

Entwicklung von neuen Testsystemen  
zur Identifizierung von  
resistenzbrechenden antibiotisch  
aktiven Naturstoffen

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität  
Mainz

vorgelegt von  
Corinna Kübler

geboren am 18.04.1987

in Stuttgart

Mainz, 2017



## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>10</b>
<b>2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>11</b>
<b>3 TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>14</b>
<b>4 EINLEITUNG.....</b>	<b>15</b>
4.1 NATURSTOFFE ALS LEITSTRUKTUREN FÜR NEUE WIRKSTOFFE.....	15
4.2 ANTIBIOTIKARESISTENZEN UND MULTIRESISTENTE ERREGER.....	17
4.3 TOXIN-ANTITOXIN SYSTEME.....	18
4.4 DAS SYSTEM MAZEF AUS <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	20
4.5 DAS SYSTEM ENDOAIA AUS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	21
4.6 <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	22
4.7 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	22
4.8 ZIELSETZUNG.....	23
<b>5 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
5.1 CHEMIKALIEN.....	24
5.2 ENZYME UND ANTIKÖRPER.....	25
5.3 REAKTIONSKITS.....	26
5.4 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	26
5.5 MEDIEN.....	29
5.6 PLASMIDE.....	32
5.7 PRIMER.....	34
5.8 SEQUENZIERUNG VON DNA.....	35
5.9 VERWENDETE PROGRAMME, DATENBANKEN UND WEBSITES.....	35
5.10 ORGANISMEN UND ZELLKULTUREN.....	37
5.10.1 Organismen für die Vermehrung von Plasmiden und die Expression von Proteinen.....	37
5.10.2 Testorganismen für die biologische Charakterisierung.....	38
5.10.3 Zelllinie für Cytotoxizitätstest.....	38
5.10.4 Bearbeitete Pilzstämme.....	38
5.11 AUFBEWAHRUNG DER ORGANISMEN.....	39
5.11.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	39
5.11.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
5.11.3 Kultivierung von Pilzen.....	39
5.12 FERMENTATIONEN.....	40
5.12.1 Fermentation im 1 l Schüttelkolben.....	40
5.12.2 Fermentation in 5 l Schüttelkolben.....	40
5.12.3 Fermentation im 20 l Maßstab.....	41

5.13	METHODEN DER AUFREINIGUNG UND ANALYSE DER SEKUNDÄRMETABOLITE.....	41
5.13.1	<i>Extraktion von Kulturfiltrat und Myzel</i> .....	41
5.13.2	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i> .....	42
5.13.3	<i>HPLC-MS</i> .....	42
5.13.4	<i>Aufreinigung von Sekundärmetaboliten</i> .....	43
5.14	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	44
5.14.1	<i>Präparation von Nukleinsäuren</i> .....	44
5.14.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	45
5.14.2.1	<i>MiniChange PCR (MC-PCR)</i> .....	46
5.14.2.2	<i>Restriction Free PCR (RF PCR)</i> .....	46
5.14.3	<i>Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese</i> .....	47
5.14.4	<i>Ligation</i> .....	48
5.14.5	<i>Transformation von Escherichia coli</i> .....	48
5.14.6	<i>Transformation von Saccharomyces cerevisiae</i> .....	49
5.14.7	<i>Klonierungen</i> .....	49
5.14.7.1	<i>pETmazEF</i> .....	49
5.14.7.2	<i>pETmazEhis</i> .....	50
5.14.7.3	<i>pETmazFstrep</i> .....	50
5.14.7.4	<i>pETmazFstrepACA</i> .....	50
5.14.7.5	<i>pETmazEstrep</i> .....	50
5.14.7.6	<i>pJeMmazEF</i> .....	51
5.14.7.7	<i>pJeMmazF</i> .....	51
5.14.7.8	<i>pYES2mazEhis</i> .....	51
5.14.7.9	<i>pEXNNT7</i> .....	51
5.14.7.10	<i>pEXIFNNT7K</i> .....	52
5.14.7.11	<i>pETendoA</i> .....	52
5.14.7.12	<i>pETendoAI</i> .....	52
5.14.7.13	<i>pJeMendoAIA</i> .....	53
5.14.7.14	<i>pEXA2NNT7bsub</i> .....	53
5.15	PROTEINBIOCHEMIE.....	53
5.15.1	<i>Proteinexpression in Escherichia coli</i> .....	53
5.15.2	<i>Proteinexpression in Saccharomyces cerevisiae</i> .....	53
5.15.3	<i>Zellaufschluss</i> .....	54
5.15.4	<i>Fällen und Konzentrieren von Proben</i> .....	54
5.15.6	<i>Western Blot Analyse</i> .....	55
5.15.7	<i>Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie</i> .....	55
5.15.7.1	<i>Hexahistidin Affinitätschromatographie</i> .....	56
5.15.7.2	<i>Streptavidin Affinitätschromatographie</i> .....	56
5.15.8	<i>Reinigung mittels GnHCl</i> .....	56
5.15.9	<i>Dialyse von Proteinen</i> .....	56
5.16	FLUORESZENZ-OLIGONUKLEOTIDTEST.....	57
5.17	BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON REINSUBSTANZEN.....	57
5.17.1	<i>Test gegen Escherichia coli BL21(DE3) pEXIFNNT7K</i> .....	57

5.17.2 Agardiffusionstest.....	58
5.17.3 Test zur Sporenkeimungshemmung.....	58
5.17.4 Zytotoxizitätstest.....	58
5.17.5 Test zur Pflanzenkeimungshemmung.....	59
5.18 IN VIVO TEST.....	59
<b>6 ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
6.1 IN VITRO TESTENTWICKLUNG.....	60
6.1.1 Reinigen von MazE und MazF nach einer Coexpression.....	62
6.1.2 Reinigen von MazE.....	64
6.1.2.1 MazEhis.....	64
6.1.2.2 MazEstrep.....	68
6.1.3 Reinigung von MazFstrep.....	70
6.1.4 Fluoreszenz-Oligonukleotidtest.....	72
6.2 IN VIVO TESTENTWICKLUNG.....	73
6.2.1 Plasmidgestaltung.....	73
6.2.2 Transformation und Expressionstests.....	75
6.2.3 Entwicklung der Methode.....	76
6.2.4 Test auf Funktionalität.....	77
6.2.5 ÜBERTRAGUNG DES IN VIVO TESTS AUF DAS SYSTEM ENDOA/ENDOAI AUS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	79
6.3 SCREENING VON EXTRAKTEN MITTELS DES IN VIVO TESTS.....	79
6.4 FERMENTATION VON PILZEN MIT AKTIVITÄT GEGEN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	80
6.4.1 <i>Hypholoma tuberosum</i> IBWF 12066.....	81
6.4.1.1 Fermentation.....	82
6.4.1.2 Isolierung von CK 12066-1.....	83
6.4.1.3 Physikalisch chemische und biologische Charakterisierung.....	83
6.4.2 <i>Psathyrella conopilus</i> (IBWF 12013).....	84
6.4.2.1 Fermentation.....	84
6.4.2.2 Isolierung von CK 12013-1.....	85
6.4.2.3 Physikalisch chemische Charakterisierung.....	86
6.4.3 <i>Wallemia muriae</i> (IBWF 15001).....	87
6.4.3.1 Fermentation.....	87
6.4.3.2 Isolierung von CK 15001-1 und CK 15001-2.....	88
6.4.3.3 Physikalisch-chemische und biologische Charakterisierung.....	89
<b>7 DISKUSSION.....</b>	<b>90</b>
7.1 ENTWICKLUNG DES IN VITRO TESTS.....	91
7.1.1 Reinigung der Komponenten MazE und MazF nach Coexpression.....	91
7.1.2 Reinigung von MazF.....	92
7.1.3 Reinigung von MazE.....	94
7.1.4 Fluoreszenz-Oligonukleotidtest.....	96
7.2 ENTWICKLUNG DES IN VIVO TESTS.....	98
7.2.1 ÜBERTRAGUNG DES IN VIVO TESTS AUF DAS SYSTEM ENDOA/ENDOAI AUS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ...100	

7.3 SCREENING MITTELS DES <i>IN VIVO</i> TESTS.....	101
7.4 FERMENTATION VON PILZEN.....	103
7.4.1 <i>Hypholoma tuberosum</i> (IBWF 12066).....	103
7.4.2 <i>Psathyrella conopilus</i> (IBWF 12013).....	104
7.4.3 <i>Wallemia muriae</i> (IBWF 15001).....	107
<b>8 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>110</b>
<b>10 ANHANG.....</b>	<b>118</b>
10.1 SEQUENZIERUNGSERGEBNISSE.....	118
10.2 ITS-SEQUENZEN.....	119
10.2.1 ITS Sequenz IBWF 12066.....	119
10.2.2 ITS-Sequenz IBWF 12013.....	120
10.2.3 ITS-Sequenz IBWF 15001.....	120
10.2.4 RBP-Sequenz IBWF 15001.....	120
10.3 TESTERGEBNISSE DER ISOLIERTEN REINSUBSTANZEN.....	121
10.4 MASHEN- UND UV-SPEKTREN DER ISOLIERTEN REINSUBSTANZEN.....	122
10.5 PLASMIDKARTEN.....	124

# 1 Abkürzungen

AB-3	Acrylamid / Bisacrylamid (29:1)
APCI	chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
DAD	Diodenarraydetektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GnHCl	Guanidin Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	HPLC mit anschließender Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LPLC	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie
MeCN	Acetonitril
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>p.a.</i>	analysenrein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der verschiedenen Typen von Toxin-Antitoxin Systemen (Page & Peti, 2016)...	18
Abbildung 2: Schema des Mechanismus von plasmidialen Toxin-Antitoxin Systemen.....	18
Abbildung 3: Chromosomal kodierte Toxin-Antitoxin Systeme bei <i>M. tuberculosis</i> (links) und <i>E. coli</i> (rechts) (Pandey & Gerdes, 2005).....	19
Abbildung 4: Funktionsschema des <i>in vitro</i> Tests.....	60
Abbildung 5: Coexpression von MazEstrep und MazFhis (beide etwa 12 kDa) mit anschließender Trennung an der FPLC.....	62
Abbildung 6: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazEhis mittels HISTrap-HP Affinitätschromatographie.....	64
Abbildung 7: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von MazEhis.....	65
Abbildung 8: Analyse von FPLC-Fractionen aus der Reinigung von MazEhis nach einer Expression in <i>S. cerevisiae</i> (verändert nach S.Adam (Adam, 2015)).....	67
Abbildung 9: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazEstrep mittels StrepTrap-HP Affinitätschromatographie.....	68
Abbildung 10: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von MazEstrep.....	68
Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen. Die obere Zeile stellt die Ausgangs-Sequenz von MazFstrep dar, die untere die ACA-bereinigte. Unterschiede sind rot markiert.....	69
Abbildung 12: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazFstrep mittels StrepTrap-HP Affinitätschromatographie.....	70
Abbildung 13: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von MazFstrep.....	70
Abbildung 14: Fluoreszenz-Oligonukleotidtest.....	71
Abbildung 15: Vergleich der veränderten Sequenz der Luciferase (oben) mit der Orginalsequenz (unten).....	73
Abbildung 16: Schema Funktionsweise Markerenzym-Plasmid.....	74
Abbildung 17: Test auf Funktionalität des <i>in vivo</i> Tests.....	77
Abbildung 18: Schema Screeningablauf <i>in vivo</i> .....	79

Abbildung 19: Die Strukturen der Stereoisomere von Oxaspirodion (Rether et al., (2004)).....	80
Abbildung 20: Fermentationsverlauf IBWF 12066 im 20 l Maßstab in MM+KP (M13) (Daten übernommen von Jan Schulte).....	81
Abbildung 21: Aufarbeitungsschema CK 12066-1.....	82
Abbildung 22: (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid (CK 12066-1).....	83
Abbildung 23: Fermentationsverlauf IBWF 12013 im 20 l Maßstab in HA-Medium (M3).....	84
Abbildung 24: Reinigungsschema CK 12013-1.....	85
Abbildung 25: Struktur von CK 12013-1, Form A und B.....	85
Abbildung 26: Fermentation <i>Wallemia muriae</i> IBWF 15001 im 7,5 l Maßstab in HMG-Medium (M4).....	86
Abbildung 27: Aufarbeitungsschema von CK 15001-1 und CK 15001-2 aus Kulturfiltrat einer Fermentation von <i>Wallemia muriae</i> IBWF 15001.....	87
Abbildung 28: Strukturformel Atromentin.....	88
Abbildung 29: Aktivität der gewonnenen Rohextrakte im <i>in vivo</i> Test. Getestet wurde mittels des Stammes BL21(DE3) pEXIFNNT7K. Es wurden analog zu den ersten Tests 100 µg/ml getestet. Die Kontrolle enthält DMSO statt Extrakt.....	88
Abbildung 30: Strukturformel von CK 12066-1 (A), (R)-Atenolol (B) und (L)-Atenolol (C).....	103
Abbildung 31: Strukturformel von CK 12013-1 (A und B), sowie strukturverwandten Substanzen (C entnommen aus Ross et al., (2014), D und E entnommen aus Lee et al., (2007)).....	105
Abbildung 32: Strukturformel von Wallemiol (A) und Wallemione (B). Entnommen aus (Frank et al., 1999).....	106
Abbildung 33: Sequenzierung von pJeMmazEF.....	117
Abbildung 34: Sequenzierung von pJeMmazF.....	118
Abbildung 35: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 12066-1.....	121
Abbildung 36: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 12013-1.....	121
Abbildung 37: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 15001-1.....	122
Abbildung 38: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 15001-2.....	122

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Leitstrukturen für Antibiotika, verändert nach Peláez, (2005) Arznei in Großbuchstaben ist der Handelsname.....	15
Tabelle 2: verwendete Primer.....	33
Tabelle 3: verwendete Organismen für die Vermehrung von Plasmiden und die Expression von Proteinen.....	36
Tabelle 4: verwendete Organismen für die biologische Charakterisierung.....	37
Tabelle 5: Standardgradient analytische HPLC.....	41
Tabelle 6: Gradient zur Trennung durch LPLC.....	42
Tabelle 7: Standard Ansatz für eine PCR mit Taq-Polymerase.....	44
Tabelle 8: Standard Ansatz für eine PCR mit Phusion-Polymerase.....	44
Tabelle 9: Standard Programm für eine PCR mit Taq-Polymerase.....	44
Tabelle 10: Standard Programm für eine PCR mit Phusion-Polymerase.....	45
Tabelle 11: Standard Zusammensetzung für eine MC-PCR.....	45
Tabelle 12: Standard Programm für eine MC-PCR.....	45
Tabelle 13: Zusammensetzung für einen Restriktionsansatz zur Kontrolle eines Plasmids oder DNA-Fragments.....	46
Tabelle 14: Zusammensetzung für einen Restriktionsansatz zur späteren Klonierung.....	46
Tabelle 15: Standard Zusammensetzung für eine Ligation.....	47
Tabelle 16: Zusammensetzung für ein SDS-Tricin Trenngel.....	53
Tabelle 17: Zusammensetzung für ein SDS-Tricin Sammelgel.....	54
Tabelle 18: Verwendete Stämme für den <i>in vivo</i> Test.....	77
Tabelle 19: Im 20 l Maßstab fermentierte Stämme.....	80
Tabelle 20: Testergebnisse (Durchführung siehe 5.17) der isolierten Reinsubstanzen.....	120

## 4 Einleitung

### 4.1 Naturstoffe als Leitstrukturen für neue Wirkstoffe

Bei der Entwicklung von Wirkstoffen in der Landwirtschaft und Medizin spielten Naturstoffe als Leitstrukturen schon immer eine große Rolle (Newman & Cragg, 2016). Sekundärmetabolite aus Pilzen dienen und dienen dabei häufig als Ausgangspunkte (Schueffler & Anke, 2014), zum Beispiel gegen phytopathogene Pilze (Thines et al., 2004). Prominentes Beispiel im Pflanzenschutz ist das Strobilurin, welches aus *Strobilurus tenacellus* isoliert wurde (Anke et al., 1977). Strobilurin wurde zu zahlreichen Folgesubstanzen wie Azoxystrobin und Kresoximmethyl (Peláez, 2005, Bartlett et al., 2001) weiterentwickelt und führt auch heute noch zu neuen Pflanzenschutzmitteln, zum Beispiel Pyraclostrobin (F500® BASF, Ludwigshafen).

Auch in der Medizin finden Naturstoffe Anwendung, beispielsweise Cyclosporin zur Immunsuppression bei Organtransplantationen (Dreyfuss et al., 1976) oder Lovastatin bei kardiovaskulären Erkrankungen (Tobert, 1988). Die bekannteste Gruppe von aktiven Naturstoffen überhaupt dürften jedoch Antibiotika, allen voran Penicillin, welches in *Penicillium chrysogenum* entdeckt (Fleming, 1929) und 1938 gereinigt (Chain et al., 2005) wurde, sein. Penicillin ist ein  $\beta$ -Lactam und inhibiert die bei der Zellwandsynthese beteiligte D-Alanin-Transpeptidase grampositiver Bakterien (Izaki et al., 1966). Die Entwicklung dieses Antibiotikums leitete eine „Goldsuche“ nach weiteren antibiotisch aktiven Metaboliten in den Jahren 1950-1970 ein, was zu zahlreichen neuen Medikamenten führte ((Peláez, 2006), siehe Tabelle 1). So dient Cephalosporin, welches natürlich in *Acremonium chrysogenum* vorkommt (Newton & Abraham, 1955), als Leitstruktur für die Gruppe der Cephalosporine. Sie gehören, wie die Penicilline, zu den  $\beta$ -Lactamen (Weil et al., 1995). Cephalosporine zeichnen sich durch eine gute Verträglichkeit und ein breites Wirkungsspektrum, allerdings nicht gegen Enterokokken (Murray, 1990), aus. Diese können mit Derivaten von Vancomycin, welches aus dem Bakterium *Amycolatopsis orientalis* isoliert wurde (Brigham & Pittenger, 1956), behandelt werden. Sie gehören zu den Glykopeptidantibiotika und inhibieren die Zellwandsynthese bei gram-positiven Bakterien (Watanakunakorn, 1984). Erythromycine wurden aus *Saccharopolyspora erythraea* isoliert (Flynn et al., 1954). Sie gehören zu den Makroliden und hemmen die bakterielle Proteinsynthese (Weisblum & Davies, 1968). Sie wirken beispielsweise gegen Mycoplasmen, Staphylococccen und mehrere gram-negative Bakterien wie *Hemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* und *Neisseria* spp. (Ginsburg & Eichenwald, 1976). Rifamycine aus

*Amycolatopsis rifamycinica* (Margalith & Pagani, 1961) dienen als Leitstruktur für die Rifampicine, makrocyclische Lactame, welche die Transkription hemmen (Wehrli et al., 1968). Sie werden beispielsweise gegen Tuberkulose eingesetzt (Floss & Yu, 2005).

Antibiotika ermöglichen heute eine weitgehende Beherrschbarkeit von zahlreichen bakteriellen Erkrankungen. Weiterhin senken sie durch präventive Anwendungen bei Operationen das Risiko für Komplikationen erheblich, vereinfachen weite Bereiche der modernen Medizin und ermöglichen Langzeitbehandlungen von immunsupprimierten Patienten, Frühgeburten, sowie Krebspatienten in der Chemotherapie.

Tabelle 1: Beispiele für Leitstrukturen für Antibiotika, verändert nach Peláez, (2005) Arznei in Großbuchstaben ist der Handelsname

Naturstoff	Arznei	Produzierender Organismus
Penicilline	Penicillin G, V, Ampicillin, Methicillin, Amoxicillin, Carbenicillin	<i>Penicillium</i> spp. (Pilz), <i>Aspergillus</i> spp. (Pilz)
Cephalosporine	MEFOXIN (Cefoxitin), CECLOR (Cefaclor), CLAFORAN (Cefotaxime), ROCEPHIN (Ceftriaxone), CEFTIN (Cefuroxime)	<i>Acremonium</i> spp. (Bakterium), <i>Emericellopsis</i> spp. (Pilz), <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> (Bakterium), <i>Streptomyces clavuligerus</i> (Bakterium)
Thienamycin	PRIMAXIN (Imipenem), INVANZ (Ertapenem)	<i>Streptomyces cattleya</i> (Bakterium)
Erythromycin	ERYTHROCIN, ZITHROMAX (Azithromycin), BIAXIN (Clarithromycin), KETEK (Telithromycin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> (Bakterium)
Vancomycin	VANCOGIN	<i>Amycolatopsis orientalis</i> (Bakterium)
Fosfomycin	MONURIL	<i>Streptomyces fradiae</i> (Bakterium)
Mupirocin (pseudomonic acid)	BACTROBAN	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Bakterium)
Fusidic acid	FUSIDIN LEO	<i>Fusidium griseum</i> (Pilz)
Streptogramine	SYNERCID (Dalfopristin/Quinupristin)	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> (Bakterium)
Daptomycin	CUBICIN	<i>Streptomyces roseosporus</i> (Bakterium)
Rifamycine	EREMFAT, RIFA, RIMACTAN (Rifampicin)	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i> (Bakterium)

## 4.2 Antibiotikaresistenzen und multiresistente Erreger

„But I would like to sound one note of warning. Penicillin is to all intents and purposes non-poisonous so there is no need to worry about giving an overdose and poisoning the patient. There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. [...]If you use penicillin, use enough.“

Alexander Fleming, Nobel Lecture 1945

Schon während der Entwicklung der ersten Antibiotika in den 1940ern fielen resistente Erreger auf (Abraham & Chain, 1940), und Alexander Fleming warnte in seiner Nobelpreisansprache 1945 vor Resistenzbildung gegen Penicillin (Fleming, 1964). In den darauffolgenden Jahren wurden zahlreiche neue Antibiotika entwickelt, sodass stets Ersatz für die durch Resistenzbildung nicht mehr wirksamen Substanzen verfügbar war. Diese „goldene Ära“ der Antibiotikaentdeckung endete in den späten 70ern (White et al., 2011). Als Gründe werden meist fehlende Finanzierbarkeit und das Versagen von modernen Screeningsystemen sowie das daraus resultierende zu hohe Risiko für Pharmafirmen genannt (Morar & Wright, 2010). Infolge dessen haben sich viele Firmen aus der Antibiotikaforschung zurückgezogen. Die Resistenzbildung schreitet jedoch immer weiter fort, beschleunigt auch durch die zunehmende Globalisierung, und erreicht teilweise alarmierende Raten. So sind in Europa bis zu 82 % der aus Erkrankten isolierten *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* gegen Cephalosporine resistent, bis zu 61 % der isolierten *Streptococcus pneumoniae* gegen Penicillin und bis zu 60 % der isolierten *Staphylococcus aureus* gegen  $\beta$ -Lactam Antibiotika (WHO, 2014). Gleichzeitig sind die wenigen neuen antibiotischen Wirkstoffe meist Derivate bereits eingesetzter Substanzen, so dass eine schnelle Resistenzbildung zu erwarten ist (Payne et al., 2007). Gegen die meisten Antibiotika sind bereits Resistenzen bekannt. So können  $\beta$ -Lactam Antibiotika wie Penicilline und Cephalosporine durch  $\beta$ -Lactamasen gespalten werden. Es kann aber auch die Zellpermeabilität reduziert oder die Penicillin bindenden Proteine verändert sein. Fluoroquinolone können ebenfalls durch eine verringerte Permeabilität am eindringen gehindert werden, oder aber die DNA Gyrase ist modifiziert, so dass die Antibiotika nicht mehr wirken (Neu, 1992). Da viele Antibiotika der selben Klasse angehören oder den gleichen Wirkort besitzen, vermitteln die Resistenzmechanismen oft eine Resistenz gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig. Resistenzvermittelnde Gene liegen dabei häufig als Cluster auf Plasmiden, was folglich automatisch zu multiresistenten Erregern führt (Akinjogunla & Enabulele, 2010). Nach den vielen Toten durch resistente Erreger zwischen 1960 und 1970

(Gangarosa et al., 1972 und Herzog, 1976) rückten diese resistenzvermittelnden Plasmide stärker in den Fokus. Sie können sich über Artgrenzen hinweg schnell verbreiten und stellen daher eine große Herausforderung an die moderne Medizin dar. Es wurden Vorschläge gemacht, um diese aus den Populationen zu eliminieren (Hahn, 1979). Die Stabilität von Plasmiden in der Population scheint häufig durch Toxin-Antitoxin Systeme gewährleistet zu werden (Moritz & Hergenrother, 2007), Medikamente die sich diese Tatsache zu Nutzen machen gibt es bisher noch nicht.

### 4.3 Toxin-Antitoxin Systeme

Toxin-Antitoxin Systeme sind kleine Module aus zwei Komponenten, deren Gene in der Regel benachbart liegen und daher direkt zusammen abgelesen werden. Sie wurden in den 80ern auf Plasmiden als stabilisierende Systeme entdeckt (Jensen & Gerdes, 1995). Mittlerweile ist bekannt, dass sie auch im Chromosom weit verbreitet sind (Van Melderen, 2010). Toxin-Antitoxin Systeme bestehen aus einem Toxin und einem Antitoxin und werden abhängig von der Beschaffenheit des Antitoxins in verschiedene Klassen eingeteilt, wobei die Klassen I-III schon länger bekannt sind (siehe Abbildung 1). Das Review von Page und Peti (2016) fasst die derzeit bekannten Toxin-Antitoxin Systeme gut zusammen: Bei Systemen des Typs I ist das Toxin ein Protein, welches die Zellmembran zerstört, und das Antitoxin eine nicht codierende RNA, welche sich an die RNA des Toxins anlagert und so dessen Translation verhindert. Systeme des Typs II sind weit verbreitet und am besten untersucht. Sie bestehen ebenfalls aus einem Protein als Toxin, sowie einem instabilen Protein als Antitoxin. Das Antitoxin lagert sich an das Toxin an und inhibiert es so. Systeme des Typs III bestehen ebenfalls aus einem Protein als Toxin und einer RNA als Antitoxin. Diese RNA bindet jedoch an das Toxin-Protein und inhibiert es so. Systeme des Typs IV bestehen aus Proteinen für beide Komponenten, ähnlich wie bei Typ II. Das Antitoxin inhibiert allerdings das Toxin nicht direkt, sondern wirkt am Angriffspunkt des Toxins dessen Wirkung entgegen. Für den Typ V ist nur ein Toxin-Antitoxin System bekannt, GhoST. Hier besteht das Toxin aus einem kleinen Peptid, welches die Zellmembran zerstört, ähnlich wie bei Typ I. Das Antitoxin ist eine RNase, welche die RNA des Toxins spaltet und so dessen Translation verhindert. Die RNA des Antitoxins wiederum wird durch das Toxin eines anderen Systems, MqsR, gespalten. Für den Typ VI ist ebenfalls nur ein System bekannt, SocAB. Beide Komponenten sind hier ein Protein, wobei sich das Antitoxin an das Toxin anlagert und so dessen Abbau durch ClpXP bewirkt.

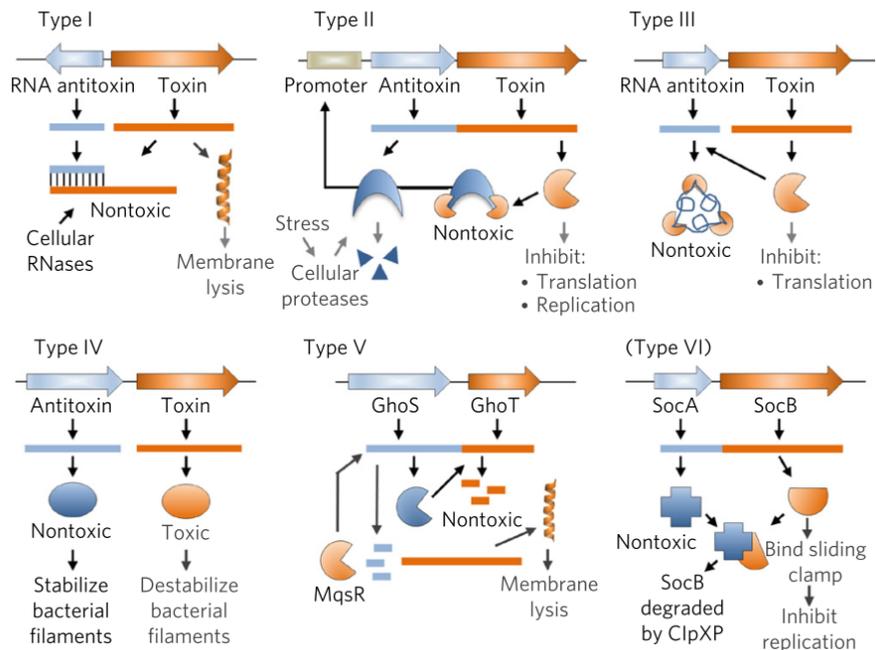


Abbildung 1: Schema der verschiedenen Typen von Toxin-Antitoxin Systemen (Page & Peti, 2016)

Die Funktion von plasmidkodierten Toxin-Antitoxin Systemen scheint aufgeklärt, sie dienen der Plasmidstabilisierung (Williams et al., 2011, Moritz & Hergenrother, 2007, Park et al., 2013, Lioy et al., 2010). Dies gewährleistet den Erhalt des Plasmides in der Population in Zeiten, in denen dieses sonst keinen Selektionsvorteil bietet (siehe Abbildung 2). Dies ist vor allem bei Resistenzplasmiden problematisch, da diese dadurch in der Population auch nach Ende der Behandlung mit Antibiotika erhalten bleiben.

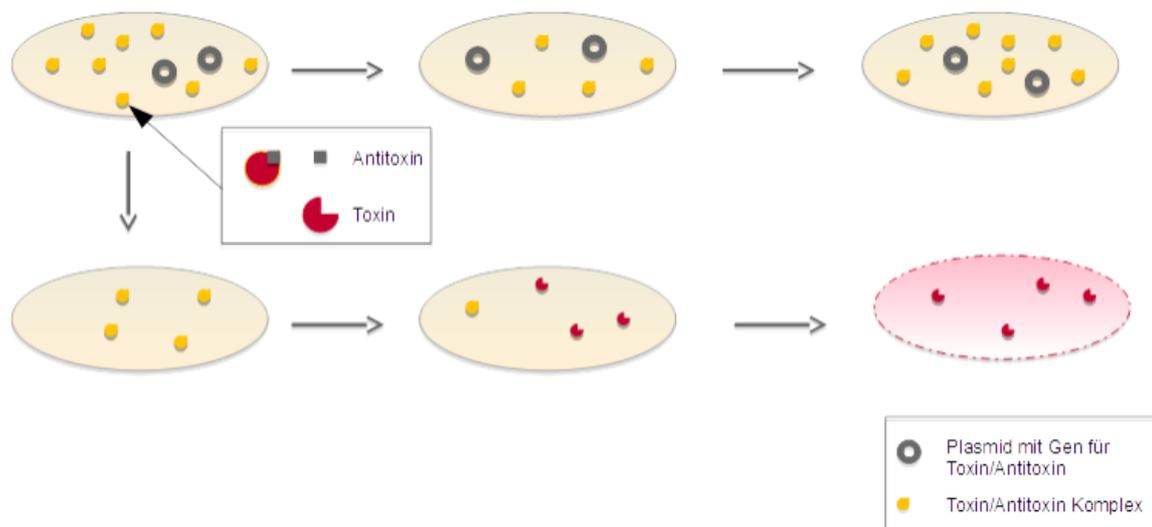


Abbildung 2: Schema des Mechanismus von plasmidialen Toxin-Antitoxin Systemen

Die Funktion von chromosomal kodierten Toxin-Antitoxin Systemen scheint deutlich komplexer als die der plasmidial kodierten zu sein. Sie beeinflussen den Zellstoffwechsel und führen so zu Persistenz oder sogar Zelltod, was vor allem Typ II Systeme sind (Page & Peti, 2016). Hierzu passt auch die Beobachtung, dass beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, welches für seine ausgeprägte Persistenz bekannt ist, zahlreiche Toxin-Antitoxin Systeme auf dem Chromosom besitzt (Abbildung 3). Da sich die Toxin-Antitoxin Systeme auf dem Chromosom teilweise komplementieren, ist es schwer, die Wirkung eines einzelnen Systems zu untersuchen. Häufig ist es nötig, mehrere Systeme zu deletieren, um eine Veränderung im Zellstoffwechsel beobachten zu können (Tsilibaris et al., 2007). Zu den am besten erforschten Toxin-Antitoxin Systemen gehören MazEF in *Escherichia coli* (Sat et al., 2003), EndoAIA in *Bacillus subtilis* (Pellegrini et al., 2005), RelBE in *Streptococcus pneumoniae* und *E. coli* (Niето et al., 2010) und Axetxe in *Enterococcus faecium* (Grady & Hayes, 2003).

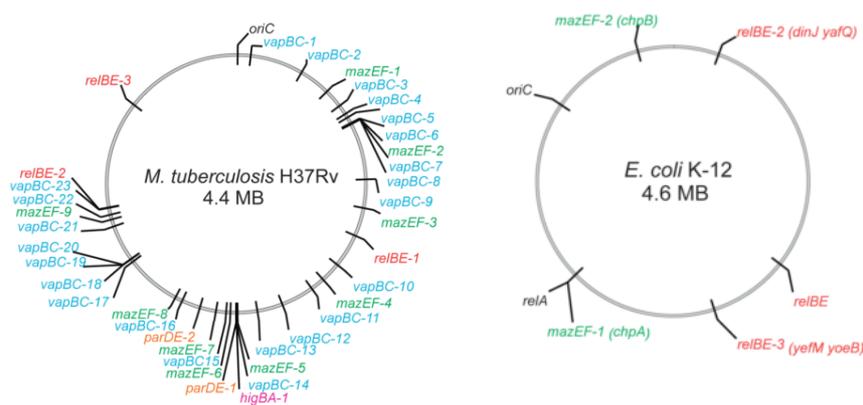


Abbildung 3: Chromosomal kodierte Toxin-Antitoxin Systeme bei *M. tuberculosis* (links) und *E. coli* (rechts) (Pandey & Gerdes, 2005)

#### 4.4 Das System MazEF aus *Escherichia coli*

Eines der am besten untersuchten und auch weit verbreiteten Toxin-Antitoxin Systeme ist MazEF. Es besteht aus der ribosomunabhängigen Endoribonuklease MazF, welche durch das Protein MazE inhibiert wird. Es handelt sich damit um ein System des Typs II. Die Proteinstruktur des Komplexes wurde 2003 von Kamada et al. aufgeklärt. Plasmidkodiert dient es der Plasmidstabilisierung, chromosomal codiert spielt es eine wichtige Rolle in der Persistenz (Tripathi et al., 2014). MazF schneidet RNA an der häufigen Sequenz ACA. Aktives MazF vermag daher nahezu alle RNA zu spalten, wodurch die Proteinneusynthese

zum Erliegen kommt. Für eine Reihe an Sequenzen schneidet MazF allerdings lediglich die Leader-Sequenz, was zu sogenannten leaderless RNA führt (Vesper et al., 2011). Zudem modifiziert es die Ribosomen, so dass diese nun verstärkt diese leaderless RNA ablesen. Vermutlich dienen die so transkribierten Proteine dem Überleben der Zelle während der Persistenz und stellen sicher, dass nach Ende der Ressourcenknappheit die Zelle wieder in den Normalzustand zurückgebracht werden kann.

Eine weitere Hypothese ist, dass MazEF nicht nur für die Ausbildung von Persistenz, sondern sogar für eine bakterielle Apoptose zuständig ist (Marianovsky et al., 2001). Hierbei sterben einige Zellen ab, um das Überleben der restlichen Population zu gewährleisten. Ein Signalstoff für diesen Vorgang ist EDF (extracellular death factor), welches die Bindung von MazE an MazF verhindert sowie die Aktivität von MazF verstärken soll (Kolodkin-Gal et al., 2007). Es handelt sich dabei um ein lineares Pentapeptid der Sequenz NNWNN. Die Gruppe beschrieb auch verwandte Signalstoffe in *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa*, welche teilweise auf die untersuchten anderen Spezies wirken. Möglicherweise dient EDF also auch dem koordinierten Wachstum der Artengemeinschaft in Biofilmen (Kumar et al., 2013).

#### 4.5 Das System EndoAIA aus *Bacillus subtilis*

Ein weiteres gut untersuchtes Toxin-Antitoxin System ist EndoAIA aus *Bacillus subtilis*, welches strukturell große Ähnlichkeit mit MazEF besitzt (Park et al., 2011). Es handelt sich dabei ebenfalls um ein System des Typs II. Das Toxin EndoA schneidet RNA ribosomunabhängig an der Sequenz UACAU. Diese Sequenz tritt gehäuft in Genen zur Synthese von Sekundärmetaboliten auf, welche beispielsweise antibiotische Aktivität besitzen oder aber für die Ausbildung eines Biofilms wichtig sind.

#### 4.6 *Escherichia coli*

*E. coli* ist ein gram-negatives begeißeltes stäbchenförmiges Darmbakterium. Es gehört zu den Enterobakterien und ist eines der am besten untersuchten Mikroorganismen. In der Biotechnologie wird *E. coli* vor allem als Wirtsorganismus für die Produktion von Proteinen verwendet, beispielsweise für die Insulinproduktion (Schmid, 2006). Neben den nicht krankheitserregenden Stämmen gibt es auch zahlreiche pathogene Stämme, so dass *E. coli* zu den häufigsten Infektionserregern gehört. Als Modellorganismus dienen attenuierte Stämme wie *E. coli* K 12, in denen sämtliche Risikofaktoren eliminiert wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme JW0427-1 und JW2753-1 stammen von *E. coli* K12 ab. Ein weiterer attenuierter Stamm ist *E. coli* B, zu welchem der in dieser Arbeit verwendete Stamm BL21(DE3) beziehungsweise BL21(DE3)plysS gehört. Diese Stammgruppe zeichnet sich durch ihre verbesserte Fähigkeit zur Überexpression von Proteinen aus.

#### 4.7 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* ist ein gram-positives unbegeißeltes stäbchenförmiges Bodenbakterium. Es dient aufgrund seiner geringen pathogenen Wirkung und einfachen Handhabung als Modellorganismus für gram-positive Bakterien und ist damit bereits gut untersucht. In der Biotechnologie wird der Organismus aufgrund seiner Fähigkeit zur Sekretion zur Produktion von Amylasen und Proteasen verwendet (Schmid, 2006).

## 4.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten Testsysteme zur Identifizierung von resistenzbrechenden antibiotisch aktiven Naturstoffen entwickelt werden. Die Testsysteme sollten dabei auf Toxin-Antitoxin Systemen basieren, da diese häufig auf Resistenzplasmiden zu finden sind und dort eine Stabilisierung des Plasmids vermitteln. Als Toxin-Antitoxin System wurde das System MazEF gewählt, da dieses zum einen weit verbreitet und zum anderen bereits gut erforscht ist. Dabei sollte die RNase Aktivität von MazF genutzt werden. Das erste Testsystem sollte *in vitro* mit Hilfe von gereinigtem MazE und MazF als *proximity-Assay* entwickelt werden und eine störfaktorfremie Umgebung zur Untersuchung von Substanzen schaffen. Das zweite Testsystem sollte *in vivo* die natürliche Situation von MazEF stabilisierten Resistenzplasmiden in *E. coli* nachstellen. Die Detektion einer aktiven Substanz sollte hierbei durch die Expression einer Luciferase und einer dadurch nachgehend detektierbaren Lumineszenz bei Substratzugabe geschehen. Mit Hilfe des Counterscreens zum *in vivo* Test sollten außerdem Substanzen mit biologischer Aktivität gegen *E. coli* identifiziert werden. In einem weiteren Experiment sollte außerdem das entwickelte *in vivo* Testsystem auf das Toxin-Antitoxin System EndoAIA aus *Bacillus subtilis* übertragen werden, um zu zeigen, dass das Testverfahren auch mit anderen Toxin-Antitoxin Systemen funktioniert.

Mit Hilfe dieser Testsysteme sollte die Extraktesammlung des IBWF getestet werden und die zugehörigen Pilze der positiven Treffer nachfermentiert werden. Aus den daraus gewonnenen Rohextrakten sollten die aktiven Substanzen isoliert und in biologischen Assays charakterisiert, sowie die Struktur aufgeklärt werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Chemikalien

#### Lösungsmittel

Aceton <i>p.a.</i>	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acetonitril <i>HPLC grade</i>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Cyclohexan <i>p.a.</i>	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
DMSO <i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethylacetat <i>p.a.</i>	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Isopropanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Methanol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt
Toluol <i>p.a.</i>	Merck, Darmstadt

#### Medienbestandteile

Bacto™-Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™-Malt Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™-Nutrient Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™-Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™-Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™-Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Agar, Granulated	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Glucose	SHS, Gesellschaft für Klinische Ernährung mbH, Heilbronn
Malzextrakt	Lindenmeyer GmbH & Co. KG, Weinsberg

#### Weitere Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid (29:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
APS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
BSA, Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
cOmpete, EDTA free Tabletten	Hoffmann-La Roche, Schweiz
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DTT	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Glycerol	Merck, Darmstadt
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
IPTG	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ladepuffer (6x Orange Loading Dye)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
L-Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate	Promega, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumsulfat reinst, entwässert	Riedel-de Haën, Seelze
PAGE-Blue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
PAGE-Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Salzsäure <i>p.a.</i> (32 %)	Merck, Darmstadt
Silicon-Entschäumer	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Urea	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim oder von Merck, Darmstadt bezogen.

### Wasser

Es wurde Wasser in drei Reinheitsstufen verwendet. Leitungswasser (H<sub>2</sub>O), destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) und entionisiertes und ultrafiltriertes Reinstwasser (H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>).

## 5.2 Enzyme und Antikörper

### Enzyme

DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific Inc., USA; NEB (New England Biolabs Inc.) Beverly, USA;
RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

### Antikörper

Anti-His (C-Term)-HRP	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Mouse anti Strep-Tag Classic:HRP	Bio-Rad, USA

### 5.3 Reaktionskits

CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
GeneJET™ Plant Genomic DNA Purif. Mini Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	Geneaid, Taiwan

### 5.4 Lösungen und Puffer

<b>L1</b>	<b>PBS</b>			
	NaCl	137	mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	mM	
	KCl	2,7	mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8	mM	
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l	
	pH	7,4		
<b>L2</b>	<b>PBST</b>			
	Tween 20	0,1	%	
	L1	ad 500	ml	
<b>L3</b>	<b>Blocking Lösung</b>			
	Tween 20	0,5	%	
	BSA	3	%	
	Magermilchpulver	1	%	
	L1	ad 50	ml	
<b>L4</b>	<b>Transferpuffer</b>			
	Tricin	100	mM	
	Tris	25	mM	
	Methanol	20	%	
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l	
	pH	8,0		
<b>L5</b>	<b>SDS Ladepuffer (6x, 10 ml)</b>			
	Tris-HCl	60	mM	
	SDS	12	%	
	Glyzerin	30	%	
	DTT	0,6	M	
	Bromphenolblau	5	mg	
	pH	6,8		
<b>L6</b>	<b>Gelpuffer</b>			
	Tris	1	M	
	SDS	0,3	%	
	H <sub>2</sub> O	ad 100	ml	
	pH	8,45		

<b>L7 Anoden Puffer</b>				
Tris		100		mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1		l
pH		8,9		
<b>L8 Kathoden Puffer</b>				
Tris		100		mM
Tricin		100		mM
SDS		1		g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1		l
pH		8,25		
<b>L9 Fixierlösung</b>				
Methanol		50		%
Eisessig		10		%
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	100		ml
<b>L10 Entfärbelösung</b>				
Methanol		30		%
Eisessig		10		%
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1		l
<b>L11 Tris Lösung</b>				
Tris		1		M
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	100		ml
pH		8,5		
<b>L12 Luminol Lösung</b>				
Luminol		0,44		g
DMSO	ad	10		ml
<b>L13 p-Coumarinsäure Lösung</b>				
p-Coumarinsäure		0,15		g
DMSO	ad	10		ml
<b>L14 Ecl I Lösung</b>				
L11		1		ml
L12		0,1		ml
L13		66		µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	10		ml
<b>L15 Ecl II Lösung</b>				
L11		1		ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)		6		µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	10		ml
<b>L16 His Bindepuffer</b>				
Natriumphosphat		50		mM
NaCl		300		mM
Imidazol		20		mM
cOmplete, EDTA free		1		Stück
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1		l
pH		8,0		

**L17 Strep Bindepuffer**

Tris		6,05	g
NaCl		4,38	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	500	ml
pH		8,0	

**L18 TAE Puffer**

Tris		4,84	g
Na <sub>2</sub> EDTA-Lösung (L19)		2	ml
Essigsäure (100%)		1,142	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1	l

**L19 Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung**

Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O		186,1	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1	l
pH		8,0	

**L20 Nitratsalzlösung  
(20x)**

NaNO <sub>3</sub>		120	g
KCl		10,4	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		10,4	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		30,4	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad	1	l

**L21 Spurenelementlösung (1000x)**

CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		0,17	g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O		0,16	g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		0,5	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		1,1	g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		0,5	
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O		5	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		0,15	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O		2,2	
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad	100	ml
pH		6,5	(KOH)

**L22**

Tris		50	mM
NaCl		500	mM
pH		7,0	

**L23**

Tris		50	mM
NaCl		1	M
Ethylenglykol		10	%
pH		7,5	

**L24**

Tris		50	mM
NaCl		500	mM
GnHCl		5	M

<b>L25</b>	Tris	20	mM
	NaCl	150	mM
	pH	7,0	
<b>L26</b>	Tris	20	mM
	NaCl	1	M
	Glycerol	5	%
	pH	7,5	
<b>L27</b>	Tris	20	mM
	NaCl	1	M
	Glycerol	1	%
	pH	7,5	
<b>L28</b>	Tris	50	mM
	NaCl	500	mM
	Imidazol	1	M
	pH	8	
<b>L29</b>	<b>TBS</b>		
	Tris	6,05	g
	NaCl	8,76	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
	pH	7,5	

## 5.5 Medien

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen für Flüssigmedien angegeben. Falls Festmedien hergestellt werden sollten, wurde zusätzlich 2 % Difco™ Agar zugesetzt. Der pH wurde mit Hilfe von 1 M HCl oder 1 M NaOH eingestellt. Anschließend wurden die Medien zur Sterilisation für 25 min bei 121 °C autoklaviert. Antibiotika wurden bei Bedarf anschließend steril zum 45 °C warmen Medium zugegeben.

<b>M1</b>	<b>LB Medium</b>		
	Bacto™-Trypton	10	g
	Bacto™-Yeast Extract	5	g
	NaCl	5	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M2</b>	<b>YT Medium</b>		
	Bacto™-Trypton	16	g
	Bacto™-Yeast Extract	10	g
	NaCl	5	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l

<b>M3</b>	<b>HA Medium</b>		
	Malzextrakt	10	g
	Hefeextrakt	4	g
	Glucose	4	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M4</b>	<b>HMG Medium</b>		
	Malzextrakt	10	g
	Hefeextrakt	10	g
	Glucose	4	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M5</b>	<b>MYA30G Medium</b>		
	Malzextrakt	10	g
	Hefeextrakt	3	g
	Glucose	300	g
	Pepton	5	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M6</b>	<b>Nutrient Broth Medium</b>		
	Nutrient Broth	8	g
	NaCl	1	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
	pH	6,5	
<b>M7</b>	<b>SOB Medium</b>		
	Trypton	20	g
	NaCl	0,5	g
	Bacto™-Yeast Extract	5	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M8</b>	<b>SOC Medium</b>		
	M7	100	ml
	Glucoselösung (1M)	2	ml
<b>M10</b>	<b>YPD Medium</b>		
	Hefeextrakt	10	g
	Pepton	20	g
	Glucose	20	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M11</b>	<b>MYA50G Medium</b>		
	Malzextrakt	10	g
	Hefeextrakt	3	g
	Glucose	500	g
	Pepton	5	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l
<b>M12</b>	<b>MEA17NaCl</b>		
	Bacto™-Malt Extract	30	g
	Pepton	5	g
	NaCl	170	g
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l

**M13 MM + KP**

Glucose	10	g
Biotinlösung (0,01 %)	250	µl
Thiamindichloridlösung (1 %)	1	ml
Nitratsalzlösung (L20)	50	ml
Spurenelementlösung (L21)	1	ml
Kartoffelpüreepulver	10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1	l

**M14 M9 Medium**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	12,8	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	g
NaCl	0,5	g
NH <sub>4</sub> Cl	1	g
Glukose	10	g
Casamino Acids	2	g
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	2	ml
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	0,1	ml
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 1	l
pH	7,4	

**M15 CM Medium**

Bacto™ Casamino Acids	1	g
Bacto™ Pepton	2	g
Bacto™ Yeast Extract	1	g
Glukose	10	g
L20	50	ml
L21	1	ml
pH	6,5	
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 1	l

**M16 SABOURAUD Medium**

SABOURAUD (2 %)- Dextrose Broth	30	g
pH	5,6	
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 1	l

## 5.6 Plasmide

### pET-51b(+)

Das Plasmid pET-51b(+) (Merck KGaA, Darmstadt) trägt die codierende Sequenz des Streptavidin-Tags II, das durch eine N-terminale Fusion mit der codierenden Sequenz des Zielproteins die Expression des entsprechenden Fusionsproteins in *Escherichia coli* erlaubt. Zusätzlich oder alternativ besitzt das Plasmid eine optionale C-terminale Histidin-Tag Sequenz, die für 10 Histidine codiert. Die Expression steht unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren, starken T7 $\lambda$ c-Promotors. Ein Ampicillin Resistenzgen ermöglicht die einfache Selektion.

### pYES2

Das Plasmid pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe) erlaubt die Expression von rekombinanten Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae*. Die Expression des Zielproteins steht unter der Kontrolle des Hefe GAL1-Promotors, was die selektive Induktion mittels Galaktose und die selektive Repression mittels Glukose ermöglicht. Das *URA3*-Gen vermittelt die Selektion von Transformanden in *S. cerevisiae*, das Ampicillin Resistenzgen vermittelt die Selektion von Transformanden in *E. coli*.

### pGEX-6P-1

Das Plasmid pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Freiburg) trägt das Glutathion-S-Transferase (GST)-Gen, das durch eine N-terminale Fusion mit der codierenden Sequenz des Zielproteins die Expression des entsprechenden Fusionsproteins in *E. coli* erlaubt. Die Expression steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, was eine selektive Induktion der Genexpression durch IPTG erlaubt. Ein Ampicillin Resistenzgen ermöglicht eine einfache Selektion.

### pJET1.2/blunt

Das Plasmid pJET1.2/blunt (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) ist ein *multicopy* Plasmid zur Klonierung und Amplifikation in *E. coli*. Durch die Linearisierung des Vektors wird eine effiziente Ligation von *blunt-end* PCR-Produkten gewährleistet. Das ohne Insert rezirkulierte Plasmid exprimiert ein letales Restriktionsenzym, was die Selektion positiver Transformanden sicherstellt. Ein Ampicillin Resistenzgen ermöglicht die einfache Selektion.

### pEX-A2

Das Plasmid pEX-A2 wird von Eurofins Scientific SE, Luxemburg verwendet, um synthetisierte Gene zu stabilisieren. Es trägt ein Ampicillin Resistenzgen.

### pEXA2NNT7

Das Plasmid pEXA2NNT7 ist eine modifizierte Variante von pEX-A2 mit dem Genkonstrukt NN sowie einem T7/*lac* Promotor in Leserichtung des Gens.

### pEXA2mazFstrep

Das Plasmid pEXA2mazFstrep enthält das von Eurofins Scientific SE, Luxemburg synthetisierte ACA-freie Gen für MazFstrep.

### pJeM1

Das Plasmid pJeM1 trägt das eGFP-Gen hinter dem durch Rhamnose induzierten Promotor *rhaP*. Es trägt ein Kanamycin Resistenzgen zur Selektion.

### pCAMBIA0380

Die pCAMBIA-Plasmide (CAMBIA, Canberra, Australien; [www.cambia.org](http://www.cambia.org)) werden gewöhnlich bei der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation verwendet. Das Plasmid pCAMBIA0380 trägt ein Kanamycin Resistenzgen, und wurde bei der Erstellung des Plasmids pEXNNT7K als *Template* für dieses Resistenzgen verwendet.

## 5.7 Primer

Die benötigten Primersequenzen wurden mittels APE (siehe 5.9) entworfen und anschließend mittels des Algorithmus „Tm Calculator“ auf der Homepage der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (USA) überprüft. Die nachfolgenden Primer (Tabelle 2) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 2: verwendete Primer

Primer	Sequenz 5'-3'
P3	GATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAGCCGCAGGAGCTC
P4	TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCGCCCAATCAGTACG
P5	ATTAGGATCCATGGTAAGCCGATACGTAC
P6	TATAGAATTCTCACTTATCGTCGTCATCC
P7	CGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCGCCAACTTTGAAAACAACCTTTGAAAAA GC
P8	TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA GA
P9	GAGAGTGCACCAATTGGGTACCAAGCTTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTG
P10	TCATGCTTGCGGCCGCAATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAG
P11	CGCAAGCGAATTCACAGATGGTCTTCACGCTCG
P12	CCATCTGTGAATTCGCTTGCGGCCGCAAT
P17	GAATTCATATGGCAAGCTGGAGCCAC
P18	GCTAAGCTTATTGCTCAGCGGTGGCAG
P25	GCGGTACCGATGATCCACAGTAGCG
P26	GGGCGGCCGCTTACCAGACTTCCTTATCTTTCCGGCTC
P32	GGCCGCAAGCATGTTACATGTCA
P33	CGAGCGTGAAGACCATTGACATGTAA
P34	GGTACCGATGATTGTGAAACGCG
P35	GCGGCCGCCTAAAAATCAATGAGTGCC
P36	CCATGGGTTTGTCTGAATCCAGCG
P37	GCGGCCGCTCCTCCGCTGACTAAG
P38	GCGGCATGGATCCATGGGTTTGTCTGAATCCAG
P39	CGGTAAGCTTCTAAAAATCAATGAGTGCCAAAC
S5	CGGTACCGATGGTAAGCCGATACGTACCCG
S6	CGCGGCCGCCTACCCAATCAGTACGTTAATTTTGGC
S7	CGCGGCCGCCAGACTTCCTTATCTTTCCGGCTCTC

Primer	Sequenz 5'-3'
S8	GCCATGGTCCACAGTAGCGTAAAGCGTTGG
S9	GCGGTACCGATGATCCACAGTAGCGTAAAGCGTTG
S10	GTGCGGCCGCCCAATCAGTACGTTAATTTGGCTTTA
S18	GCAAGCTTTACACAATGTCTATCCACAGTAGCGTAAAGCGTTGGG
S19	CGCTCGAGTTAGTGGTGGTGATGGTGATGATGGT
ITS 1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
RPB1WF	AAGACGAAGAGGCCAAGCAGT
RPB1WR	ACGCAAATAGACAATCGGAACCT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pJeMfor	TTTCCTGTCAGTAACGAG

## 5.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) und MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

## 5.9 Verwendete Programme, Datenbanken und Websites

### APE (a plasmid editor)

Das Programm (erstellt von Wayne Davis, verfügbar unter <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) dient der Darstellung und Editierung von DNA-Sequenzen. Es ermöglicht neben anderen Funktionen außerdem die Simulation von Restriktionsverdauen und bietet die Möglichkeit des *Alignments* von zwei oder mehreren Nukleotidsequenzen.

### Multalin

Die Website bietet die Möglichkeit von *Multialignments*, sowohl für DNA als auch für Proteinsequenzen (Corpet, 1988), verfügbar unter <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>).

### DNA-Protein

Die Website [http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01\\_06.html](http://www.molbiol.ru/eng/scripts/01_06.html) stellt einen Algorithmus zur Konvertierung von Basenpaaren zu kDa oder Aminosäuren und umgekehrt zur Verfügung.

### NCBI

Die Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, USA; <http://www.ncbi.nih.gov/>) diente der Durchführung von vergleichenden Sequenzanalysen mittels blastn und blastp (Altschul, 1997).

### Massenspektrendatenbank

Die Massenspektrenbibliothek (IBWF, Kaiserslautern) wurde verwendet, um bereits bekannte Substanzen zu identifizieren oder um unbekannte Substanzen zu charakterisieren.

### ChemSpider

Die Website [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) wurde zur Suche von chemischen Strukturen verwendet. Hier sind, falls vorhanden, für die Strukturen auch PubMed-Einträge hinterlegt.

### SciFinder

Die Website [www.cas.org/products/scifinder](http://www.cas.org/products/scifinder) wurde ebenfalls zur Suche von chemischen Strukturen verwendet.

### ACD/ChemSketch

Dieses Programm (Download unter <http://www.acdlabs.com>) wurde zum Zeichnen der Strukturformeln verwendet.

## 5.10 Organismen und Zellkulturen

### 5.10.1 Organismen für die Vermehrung von Plasmiden und die Expression von Proteinen

Die *E. coli* Stämme wurden auf LB-Festmediumplatten (M1), der *S.cerevisiae* Stamm wurde auf YPD-Festmediumplatten (M10) bei +4 °C gelagert. Die verwendeten Stämme sind in Tabelle 3 zusammengefasst, eine genauere Beschreibung der Aufbewahrung der Organismen findet sich unter 5.11.

Tabelle 3: verwendete Organismen für die Vermehrung von Plasmiden und die Expression von Proteinen

	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Z_M15 Tn10 (Tetr)	Stratagene, La Jolla, USA
	BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS)	Merck KGaA, Darmstadt
	BL21(DE3)pLysS	ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS) pLysS[T7p20 orip15A] (CmR)	Merck KGaA, Darmstadt
	JW0427-1	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), ΔclpP723::kan, λ <sup>-</sup> , rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Baba et al., 2006), Keio Collection
	JW2753-1	Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ <sup>-</sup> , ΔchpA791::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	(Baba et al., 2006), Keio Collection
<i>S. cerevisiae</i>	INVSc1	MATa; his3Δ1; leu2; trp1-289; ura3-52	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

### 5.10.2 Testorganismen für die biologische Charakterisierung

Die Testorganismen wurden auf den jeweiligen Medien bei +4 °C gelagert. Die jeweiligen Medien und Inkubationstemperaturen sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: verwendete Organismen für die biologische Charakterisierung

	Organismus	Inkubationstemperatur (° C)	Verwendetes Medium
Bakterien	<i>Bacillus brevis</i> ATCC 9999	37	M6
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 11632	37	M6
Pilze	<i>Botrytis cinerea</i> *	Raumtemperatur	M3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	37	M16
	<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	28	M15
	<i>Mucor miehei</i> TÜ 284	37	M3
	<i>Paecilomyces variotii</i> ETH 114646	37	M3
	<i>Penicillium notatum</i> *	27	M3
	<i>Phytophthora infestans</i> ATCC 208835	18	M3

Die mit \* gekennzeichneten Stämme wurden der Stammsammlung des IBWF Kaiserslautern entnommen.

#### Pflanzen-Keimungshemmungstest

Kolbenborstenhirse *Setaria italica* L. (Poaceae)

Kresse *Lepidium sativum* L. (Brassicaceae)

### 5.10.3 Zelllinie für Cytotoxizitätstest

HeLa-S3 DSMZ ACC 161 (Epitheliales Cervixkarzinom, human)

### 5.10.4 Bearbeitete Pilzstämme

Folgende Pilzstämme wurden vom IBWF Kaiserslautern zur Fermentation im 20 l-Maßstab zur Verfügung gestellt: IBWF 12013, IBWF 12066, IBWF 15001

Zur Aufbewahrung siehe 5.11.3.

## 5.11 Aufbewahrung der Organismen

### 5.11.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur langfristigen Aufbewahrung von Stämmen wurde ein Glycerolstock angefertigt. Dazu wurde der gewünschte *E. coli* Stamm über Nacht in 5 ml LB Medium (M1) mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Kultur in ein steriles 2,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 2 min bei 13200 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 250 µl LB Medium (M1) aufgenommen, mit 250 µl 50 % Glycerol gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Von diesen Dauerkulturen wurden bei Bedarf Verdünnungsausstriche auf Selektionsplatten gemacht. Die Platten wurden spätestens nach zwei Wochen auf frische Selektionsplatten überimpft und nicht mehr als vier Mal erneut ausgestrichen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Platten bei +4 °C gelagert.

### 5.11.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur langfristigen Aufbewahrung von Stämmen wurde ein Glycerolstock angefertigt. Dazu wurde der gewünschte *S. cerevisiae* Stamm über Nacht in 5 ml YPD Medium (M10) bei 30 °C und 220 Upm inkubiert. Anschließend wurden 2 ml der Kultur in ein steriles 2,5 ml Reaktionsgefäß überführt, für 2 min bei 13.200 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 500 µl YPD Medium (M10) aufgenommen, mit 500 µl 50 % Glycerol gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Von diesen Dauerkulturen wurden bei Bedarf Verdünnungsausstriche auf Selektionsplatten gemacht. Die Platten wurden spätestens nach zwei Wochen auf frische Selektionsplatten überimpft und maximal vier Mal erneut ausgestrichen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Platten bei +4 °C gelagert.

### 5.11.3 Kultivierung von Pilzen

Die verwendeten Pilze wurden vom IBWF zur Verfügung gestellt und dort auf Schrägröhrchen bei 4 °C als Dauerkultur gelagert. Die Kulturen wurden nach Erhalt im Allgemeinen auf HA (M3)- oder HMG (M4)- Platten inokuliert und nach Bewachsen der Platte auf eine frische überimpft (da einige Pilze sehr langsam wuchsen, variierte dieser Zeitpunkt zwischen 2-4 Wochen). Die Platten wurden mit Parafilm® M (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert.

## 5.12 Fermentationen

### 5.12.1 Fermentation im 1 l Schüttelkolben

Es wurden 500 ml Medium (HA (M3) oder HMG (M4)) in 1 l Erlenmeyerkolben mit einer Schikane mit Myzel von Festmediumplatten beimpft und bei Raumtemperatur mit 120 Upm auf Plattformschüttlern (Orbital Incubator, Sanyo Electric Co., München) inkubiert. Alle zwei Tage wurde der Gehalt an freier Glucose (DIABUR Test 5000 Teststreifen, 50 St. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und der pH-Wert (MP220, Mettler Toledo, Gießen) ermittelt. Die Fermentation wurde beendet, sobald keine freie Glucose mehr vorhanden war. Das Kulturfiltrat wurde durch Filtration vom Myzel getrennt und beides wie unter 5.13.1 beschrieben aufgearbeitet.

### 5.12.2 Fermentation in 5 l Schüttelkolben

Zur Fermentation von *Wallemia muriae* IBWF 15001 wurden drei 5 l Kolben mit 4 Schikanen mit je 2,5 l HMG-Medium (M4) mit Silikonentschäumer verwendet. Diese wurden bei Raumtemperatur mit 120 Upm auf Plattformschüttlern inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden je 100 ml Tagesprobe aus einem Kolben entnommen. Der pH-Wert und der Glukosegehalt der Probe wurden gemessen. Das Myzeltrockengewicht wurde bestimmt, in dem von der Hälfte der Probe das Myzel getrocknet und gewogen wurde. Die andere Hälfte der Probe wurde durch Filtration in Kulturfiltrat und Myzel getrennt und beides extrahiert (5.13.1). Die Fermentation wurde beendet, sobald keine freie Glucose mehr vorhanden war. Das Kulturfiltrat wurde durch Filtration vom Myzel getrennt und beides wie unter 5.13.1 beschrieben aufgearbeitet.

### 5.12.3 Fermentation im 20 l Maßstab

Zur Gewinnung ausreichender Mengen Rohextrakt für die Isolierung von Reinsubstanzen wurde im 20 l Maßstab fermentiert. Dem Medium wurde vor dem Autoklavieren Silikonentschäumer zugegeben. Als Inokulum diente eine frische, gut bewachsene 500 ml Kultur des selben Mediums. Die Fermenter (Typ Biostat A-20, Fa. Braun, Melsungen) wurden bei 22 °C mit einer Luftzufuhr von 3 l/min und Rühren bei 120 Upm betrieben. In regelmäßigen Abständen wurden je 100 ml Tagesproben entnommen. Der pH-Wert und der Glukosegehalt der Probe wurden gemessen. Das Myzeltrockengewicht wurde bestimmt, in dem von der Hälfte der Probe das Myzel getrocknet und gewogen wurde. Die andere Hälfte der Probe wurde durch Filtration in Kulturfiltrat und Myzel getrennt und beides extrahiert (5.13.1). Die Fermentation wurde beendet, sobald keine freie Glucose mehr vorhanden war. Das Kulturfiltrat wurde durch Filtration vom Myzel getrennt und bei Bedarf beides wie unter 5.13.1 beschrieben aufgearbeitet.

## 5.13 Methoden der Aufreinigung und Analyse der Sekundärmetabolite

### 5.13.1 Extraktion von Kulturfiltrat und Myzel

Das Kulturfiltrat der Nachfermentationen oder der Tagesproben wurde 1:1 (V:V) mit Ethylacetat in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die Lösemittelphase wurde über einen Papierfilter (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wasserfrei getrocknet, in einen Rundkolben überführt und unter Vakuum zur Trockene eingeeengt (Rotationsverdampfer Heidolph Laborota 4002; SpeedVac Jouan RC 10.11). Myzel der Nachfermentationen oder der Tagesproben wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit Methanol bedeckt und für 1 h gerührt. Die Flüssigkeit wurde über einen Papierfilter in einen Rundkolben überführt und bis zur Trockene eingeeengt. Das Extrakt wurde bei Tagesproben in 500 µl Methanol aufgenommen und bei Nachfermentationen auf 100 mg/ml bzw. 10 mg/ml für Messungen (5.13.2) eingestellt. Bis zur Verwendung wurden die Extrakte bei -20 °C gelagert.

### 5.13.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Analyse von Rohextrakten diente die analytische HPLC. Dazu stand eine mit einem DAD ausgestattete HPLC-Anlage (HP 1100 Series II HPLC-System, Hewlett Packard, Waldbronn) mit RP18-Trennsäule (LiChrospher 100, 125 x 4 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt) zur Verfügung. Die Proben wurden mit einer Standard-Methode (Tabelle 5) untersucht. Als Elutionsmittel dienen Acetonitril und H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit 0,1 % TFA, die Temperatur der Säule betrug 40 °C und die Flussrate 1 ml/min. Auf die Zugabe von 0,1 % TFA wurde nur verzichtet, wenn die TFA zu einer schlechteren Detektierbarkeit der zu untersuchenden Substanz führte. Es wurden 5-10 µl Tagesprobenextrakt beziehungsweise 50-100 µg Probe injiziert, wobei die Proben zuvor zentrifugiert (1 min bei 13.200 rpm) oder filtriert wurden, um Schwebstoffe zu entfernen.

Tabelle 5: Standardgradient analytische HPLC

Zeit [min]	H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub> mit 0,1 % TFA [%]	Acetonitril [%]
0	99	1
20	0	100
24	0	100
25	99	1

Durch Zuschalten eines Fraktionssammlers (Analyt-FC, Hewlett Packard, Waldbronn) konnten die Extrakte in eine 96-Well-Platte zur weiteren Aktivitätsanalyse abgelegt werden. Es wurden dafür 400 µg Extrakt verwendet. Nach der Fraktionierung wurden die Platten getrocknet und im *in vivo* Test (5.18) eingesetzt.

### 5.13.3 HPLC-MS

Die HPLC-MS (HPLC/MSD-System Series 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn) diente der Bestimmung der Molekülmasse (bzw. des m/z-Verhältnisses). Es wurde eine RP18-Säule (Superspher 100, 125x2 mm, 4 µm, Merck, Darmstadt) bei 40 °C verwendet. Die Massenspektren wurden mit APCI bei Kapillarspannungen von 3.500 V (positiv) bzw. 2.200 V (negativ) aufgenommen. Der Coronastrom betrug 4 µA (positiv) bzw. 12 µA (negativ). Die Verdampfungstemperatur betrug 400 °C und die Fragmentorspannung 140 V. Der Gradient und die Eluenten entsprachen den unter Analyse (5.13.2) beschriebenen Bedingungen, allerdings bei einer Flussrate von 0,45 ml/min. Die Ansäuerung des Wassers geschah hier außerdem mit 0,1 % HCOOH. Auf die Ansäuerung wurde hier ebenfalls nur verzichtet, falls dies zu einer schlechteren Detektierbarkeit der zu untersuchenden Substanz führte.

#### 5.13.4 Aufreinigung von Sekundärmetaboliten

##### Niederdruck- Flüssigkeitschromatographie (Flash-Chromatographie)

Die Niederdruck- Flüssigkeitschromatographie (puriFlash 4250, Interchim, Mannheim) wurde zur Vortrennung von Rohextrakten verwendet. Dazu wurde das Extrakt an Kieselgel (Geduran Si 60, Merck, Darmstadt) gebunden und über eine Kieselgelsäule fraktioniert. Als Eluenten wurden Cyclohexan, Ethylacetat und Methanol verwendet. Die Fraktionengröße betrug 250 ml, der Gradient ist in Tabelle 6 dargestellt.

*Tabelle 6: Gradient zur Trennung durch LPLC*

Fraktion	Methanol [%]	Cyclohexan [%]	Ethylacetat [%]
1	0	100	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	0	0	100
5	50	0	50
6	100	0	0
7	100	0	0
8	100	0	0
9	100	0	0

##### Festphasenextraktion an Chromabond-Kartuschen

Die C18 ec-Säulenkartuschen (Macherey Nagel, Düren) dienen der Vorreinigung von Rohextrakten und entsprechenden Zwischenprodukten. Dazu wurden die Säulen erst mit den Eluenten Acetonitril und H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> (bei Bedarf mit 0,1 % TFA) konditioniert. Anschließend wurde das Extrakt aufgebracht und mit den gewünschten Eluentengemischen mit dreifachem Säulenvolumen eluiert.

##### Präparative HPLC

Zur Isolation von Reinsubstanzen wurde das HPLC System von Jasco (JASCO Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) verwendet. Es wurden die folgenden Säulen eingesetzt:

SunFire C18 Säule (100 Å, 5 µm, 19 mm x 250 mm, 1/pkg OBD; Best.Nr. 186004027; Waters S.A.S., Saint-Quentin, Frankreich)

Zorbax Eclipse XDB-Phenyl, 250 x 9,4 mm (Agilent Technologies, USA)

Der Fluss wurde den Herstellerangaben der Säulen entsprechend eingestellt, die Temperatur betrug 22 °C. Als Elutionsmittel dienen H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit 0,1 % HCOOH und MeCN. Die geeignete (Elutions-) Methode wurde durch Tests in kleinem Maßstab an der HPLC Agilent 1100 Series auf die jeweilige Substanz angepasst und anschließend auf das Jasco-System umgerechnet.

Die so gewonnenen Fraktionen wurden in einen Rundkolben überführt und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden ausgewählte Fraktionen per HPLC (5.13.2) auf ihre Reinheit untersucht. Waren weiterhin Verunreinigungen vorhanden, wurde die Reinigung fortgesetzt. Im anderen Fall wurden die Fraktionen erneut an der HPLC/MS gemessen (5.13.3), der Reinheitsgrad bestimmt und die Substanz charakterisiert. Zur biologischen Charakterisierung wurde die Substanz dazu in einem adäquaten Lösungsmittel aufgenommen und wie unter 5.17 und 5.18 beschrieben untersucht.

## 5.14 Molekularbiologische Methoden

### 5.14.1 Präparation von Nukleinsäuren

#### Aus *Escherichia coli*

Zur Gewinnung von Plasmiden wurde eine *E. coli* Kultur in 5 ml LB-Flüssigmedium (M1) bei 37 °C und 220 Upm über Nacht inkubiert und anschließend mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit aufgearbeitet.

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde eine *E. coli* Kultur in 5 ml LB-Flüssigmedium (M1) bei 37 °C und 220 Upm über Nacht inkubiert und anschließend mit dem Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit aufgearbeitet.

#### Aus *Bacillus subtilis*

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde eine *B. subtilis* Kultur in 5 ml LB-Flüssigmedium (M1) bei 37 °C und 220 Upm über Nacht inkubiert und anschließend mit dem Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit aufgearbeitet.

#### Aus Pilzen

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde das GeneJET™ Plant Genomic DNA Purif. Mini Kit verwendet. Dazu wurde Myzel des entsprechenden Pilzes lyophilisiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu feinem Pulver gemörsert. Anschließend wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

## Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte am NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rocky River, USA).

### 5.14.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Präparation oder Analyse verwendet. Es kamen dabei die Taq-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) für Amplifikationen zur späteren Analyse sowie die Phusion-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) für Amplifikationen zur Konstruktion von Plasmiden zum Einsatz. Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels des *online*- $T_M$ -Rechners des Herstellers ermittelt. Im Folgenden (Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10) sind die Standard Ansätze und Programme (GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems, Darmstadt) für beide Polymerasen dargestellt.

*Tabelle 7: Standard Ansatz für eine PCR mit Taq-Polymerase*

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
10x Puffer + $MgCl_2$	5
Forward Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2,5
Reverse Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	1
DNA-Template (50-100 ng/ $\mu$ l)	1
DreamTaq-Polymerase	1
$H_2O_{UF}$	ad 50

*Tabelle 8: Standard Ansatz für eine PCR mit Phusion-Polymerase*

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
5x Puffer-HF	10
Forward Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2,5
Reverse Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2,5
dNTP-Mix (10 mM)	1
DNA-Template (50-100 ng/ $\mu$ l)	1
Phusion-Polymerase	0,5
$H_2O_{UF}$	ad 50

*Tabelle 9: Standard Programm für eine PCR mit Taq-Polymerase*

Initiale Denaturierung	5 min	94 °C
35 Zyklen:		
Denaturierung	30 s	94 °C
Annealing	45 s	$T_M - 2$ °C
Elongation	ca. 1 min/kb	72 °C
Terminale Elongation	10 min	72 °C

Tabelle 10: Standard Programm für eine PCR mit Phusion-Polymerase

Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
35 Zyklen:		
Denaturierung	10 s	98 °C
Annealing	30 s	$T_M+3$ °C
Elongation	ca. 30 s/kb	72 °C
Terminale Elongation	10 min	72 °C

#### 5.14.2.1 MiniChange PCR (MC-PCR)

Die Methode wurde in Anlehnung an die QuickChange PCR entwickelt, um kleinere Veränderungen an Plasmiden, wie etwa das Einführen kurzer Tags, vorzunehmen. Dazu wurden zunächst Primer entworfen, welche die neue Sequenz beinhalten und jeweils zu beiden Seiten mit etwa 15 Nukleotiden mit der Ausgangssequenz komplementär sind. Nach Durchführen der PCR wurden zum Abbau des Templates zu 19  $\mu$ l des Ansatzes 1  $\mu$ l DpnI gegeben und 1 h bei 37 °C verdaut. 4  $\mu$ l des Ansatzes wurden direkt in *E. coli* XL1blue transformiert (5.14.5). Im Folgenden sind der Standard Ansatz (Tabelle 11) und das Programm (Tabelle 12) dargestellt.

Tabelle 11: Standard Zusammensetzung für eine MC-PCR

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
5x Puffer-HF	10
Forward Primer (ca. 125 ng)	2
Reverse Primer (ca. 125 ng)	2
dNTP-Mix (10 mM)	1
DNA-Template (20-50 ng)	1
Phusion-Polymerase	1
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50

Tabelle 12: Standard Programm für eine MC-PCR

Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
18 Zyklen:		
Denaturierung	30 s	98 °C
Annealing	1 min	$T_M+3$ °C
Elongation	ca. 30 s/kb	72 °C
Terminale Elongation	10 min	72 °C

#### 5.14.2.2 Restriction Free PCR (RF PCR)

Die RF-PCR wurde nach Bond und Naus durchgeführt (Bond & Naus, 2012). Sie dient dem Einfügen von DNA-Abschnitten in Plasmide ohne die Verwendung von Restriktionsstellen oder homologen Rekombinationsstellen.

### 5.14.3 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese

#### Restriktion von Nukleinsäuren

Für Ansätze mit mehreren Enzymen wurden die Angebote auf den Websites der Hersteller zur Ermittlung der passenden Puffersysteme genutzt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Im folgenden (Tabelle 13, Tabelle 14) sind die Ansätze angegeben.

*Tabelle 13: Zusammensetzung für einen Restriktionsansatz zur Kontrolle eines Plasmids oder DNA-Fragments*

Komponente	Menge
DNA	400-800 ng
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 20 µl

*Tabelle 14: Zusammensetzung für einen Restriktionsansatz zur späteren Klonierung*

Komponente	Menge
DNA	1-5 µg
10x Restriktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50 µl

Falls Plasmide zu Klonierungszwecken restriktionsverdaut wurden, wurden diese außerdem dephosphoryliert. Dazu wurde dem Ansatz nach Durchführen der Restriktion 1 µl FastAp zugegeben, für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 65 °C deaktiviert.

#### Gelelektrophorese und Dokumentation

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde dazu in TAE-Puffer (L18) gelöst, welcher auch als Laufpuffer diente. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente die GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 50-100 V. Zur Dokumentation wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (ca. 10 µg/ml) angefärbt und mittels dem FluorS-Multimager (Biorad, München) und dem Programm Quantity One 4.3.1 (Biorad, München) aufgenommen.

#### Isolierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden aus angefärbten Agarosegelen mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt.

#### 5.14.4 Ligation

Für die Ligation wurde etwa 50 ng Plasmid und die zwei- bis dreifache Menge *Insert* verwendet. Ligationen des pJET1.2/blunt-Plasmids wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Eigene Ligationen (Zusammensetzung Tabelle 15) wurden für 60 min bei 22 °C ligiert und 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 15: Standard Zusammensetzung für eine Ligation

Insert-DNA	10 µl
Plasmid	5 µl
10x Puffer	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	2 µl
T4-Ligase	1 µl

#### 5.14.5 Transformation von *Escherichia coli*

##### Herstellen von elektrokompetenten *Escherichia coli*

Eine Glyzerolkultur des gewünschten *E. coli* Stammes wurde auf eine entsprechende Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie verwendet, um eine 5 ml Kultur mit entsprechender Selektion anzusetzen. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 220 Upm inkubiert und am nächsten Tag als Inokulum für 500 ml Medium (M1 mit 3,6 g Glucose/l) verwendet. Die Kultur wurde bei 37 °C und 220 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 wachsen gelassen und nachfolgend auf Eis für 10 min gekühlt. Die Zellen wurden bei 4000 Upm und 4 °C für 10 min in der Zentrifuge GR 422 (Jouan S.A., St Herblain Cedex, Frankreich) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal in eiskalten sterilen H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> resuspendiert und wie beschrieben pelletiert. Anschließend wurde zweimal mit steriler eiskalter Glyzerol-Lösung (10 % in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>) resuspendiert und pelletiert. Der Überstand wurde nun bis auf etwa 2 ml dekantiert und das Pellet resuspendiert. Die Suspension wurde in 75 µl Aliquots in sterile eiskalte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### Transformation von elektrokompetenten *Escherichia coli*

Die Transformation der elektrokompetenten *E. coli* mit Plasmid-DNA (3 µl eines Ligationsansatzes oder ca. 100 ng eines Plasmids) erfolgte in 1 mm-Elektroporationsküvetten (PeqLab, Erlangen) und mit Hilfe des Gene Pulser II (Biorad, München) mit den Einstellungen 25 µF, 1,3 kV, 200 Ω und 12,5 kV/cm. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl SOC-Medium (M8) resuspendiert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37 °C und 220 Upm inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf die entsprechende Selektionsplatte ausplattiert, eine zweite Platte wurde mit dem benutzten Drigalskispatel überstrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

#### 5.14.6 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Herstellung und Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach dem pYES2-Handbuch von Invitrogen (Cat. no. V825-20).

#### 5.14.7 Klonierungen

Die Plasmidkarten finden sich im Anhang (10.5).

##### 5.14.7.1 *pETmazEF*

Zur Expression von MazEF wurde mittels PCR aus gDNA (5.14.1) von *E. coli* BL21(DE3) das zu exprimierende mazEF mittels der spezifischen Primer S9 und S10 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme KpnI und NotI, welche bereits auf dem Plasmid pET51b(+) vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pET51b(+) ligiert, wobei dadurch mazE *in frame* N-Terminal an den Strep-Tag und mazF *in frame* C-Terminal an den His-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.2 pETmazEhis

Zur Expression von MazEhis wurde mittels PCR aus pETmazEF das zu exprimierende mazE mittels der spezifischen Primer S7 und S8 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme NotI und NcoI, welche bereits auf dem Plasmid pET51b(+) vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pET51b(+) ligiert, wobei dadurch mazE *in frame* C-Terminal an den His-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, JW 2753-1 oder JW 0427-1 transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.3 pETmazFstrep

Zur Expression von MazFstrep wurde mittels PCR aus pETmazEF das zu exprimierende mazF mittels der spezifischen Primer S5 und S6 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme KpnI und NotI, welche bereits auf dem Plasmid pET51b(+) vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pET51b(+) ligiert, wobei dadurch mazF *in frame* N-Terminal an den Strep-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS, transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.4 pETmazFstrepACA

Zur verbesserten Expression von MazFstrep wurde aus pEXA2mazFstrep das zu exprimierende mazFstrep mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme NcoI und SacI ausgeschnitten, und in den komplementär restringierten Vektor pET51b(+) ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.5 pETmazEstrep

Zur Expression von MazEstrep wurde aus pETmazEF das zu exprimierende mazE mittels der spezifischen Primer P25 und P26 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme NotI und KpnI, welche bereits auf dem Plasmid pET51b(+) vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pET51b(+) ligiert, wobei dadurch mazE *in frame* an den Strep-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.6 *pJeMmazEF*

Zur Expression von MazEF unter *rhaP*-Kontrolle wurde mittels PCR aus pETmazEF das zu exprimierende mazEF mittels der spezifischen Primer S17 und S18 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme NdeI und HindIII, welche bereits auf dem Plasmid pJeM1 vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pJeM1 ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS, bei Bedarf zusammen mit pEXA2NNT7, transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.7 *pJeMmazF*

Zur Expression von MazF unter *rhaP*-Kontrolle wurde mittels PCR aus pETmazFstrep das zu exprimierende mazF mittels der spezifischen Primer S17 und S18 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme NdeI und HindIII, welche bereits auf dem Plasmid pJeM1 vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pJeM1 ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS, bei Bedarf zusammen mit pEXA2NNT7, transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.8 *pYES2mazEhis*

Das Plasmid pYES2mazEhis wurde verwendet, um MazEhis in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Durch die spezifischen Primer S18 und S19 und das Plasmid pETmazEF wurde das zu exprimierende mazEhis amplifiziert und Restriktionsschnittstellen für HindIII und XhoI eingefügt, welche bereits auf dem Plasmid pYES2 vorhanden sind. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor pJET1.2 ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor pYES2 ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *S. cerevisiae* transformiert (5.14.6).

#### 5.14.7.9 *pEXNNT7*

Das Plasmid pEXNNT7 ist eine modifizierte Variante vom Plasmid pEXA2NN. Dabei wurde mittels der spezifischen Primer P9 und P10 in einer MC-PCR (5.14.2.1) ein T7/lacO Promotor vor das Luciferase-Gen eingeführt. Das erhaltene Plasmid pEXA2NNT7 wurde zum einen in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS transformiert (5.14.5), und zum anderen weiter bearbeitet.

#### 5.14.7.10 *pEXIFNNT7K*

Das Plasmid *pEXIFNNT7K* ist eine modifizierte Variante von *pEXNNT7*, indem das Ampicillin Resistenzgen durch eine Insertion mit einem Kanamycin Resistenzgen inaktiviert wurde und die das Luciferasegen wieder *in-frame* gebracht wurde. Dazu wurde mittels der spezifischen Primer P7 und P8 eine RF-PCR (5.14.2.2) durchgeführt. Als Template für das Kanamycin Resistenzgen diente das Plasmid *pCAMBIA0380*. Für die Deletion am Luciferasegen wurde mittels der spezifischen Primer P11 und P12 in einer MC-PCR (5.14.2.1) die Sequenz vor dem Luciferase-Gen so verändert, dass diese wieder *in frame* mit dem Start-Codon liegt. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)*pLysS* transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.11 *pETendoA*

Zur Expression von EndoAstrep wurde mittels PCR aus gDNA (5.14.1) von *B. subtilis* das zu exprimierende *endoA* mit Hilfe der spezifischen Primer S34 und S35 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme KpnI und NotI, welche bereits auf dem Plasmid *pET51b(+)* vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor *pJET1.2* ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor *pET51b(+)* ligiert, wobei dadurch *endoA in frame* N-Terminal an den Strep-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.12 *pETendoAI*

Zur Expression von EndoAIhis wurde mittels PCR aus gDNA (5.14.1) von *B. subtilis* das zu exprimierende *endoAI* mit Hilfe der spezifischen Primer S36 und S37 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme NcoI und NotI, welche bereits auf dem Plasmid *pET51b(+)* vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde schließlich in den Vektor *pJET1.2* ligiert. Anschließend wurde dieses wieder ausgeschnitten und in den komplementär restringierten Vektor *pET51b(+)* ligiert, wobei dadurch *endoAI in frame* C-Terminal an den His-Tag ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.13 *pJeMendoAIA*

Zur Expression von EndoAIA unter Rhamnose-Kontrolle wurde mittels PCR aus gDNA (5.14.1) von *B. subtilis* das zu exprimierende endoAIA mittels der spezifischen Primer P38 und P39 amplifiziert. Diese fügen eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme BamHI und HindIII, welche bereits auf dem Plasmid pJeM1 vorhanden sind, ein. Das PCR-Produkt wurde in den komplementär restringierten Vektor pJeM1 ligiert. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3), zusammen mit pEXA2NNT7bsub, transformiert (5.14.5).

#### 5.14.7.14 *pEXA2NNT7bsub*

Das Plasmid pEXA2NNT7bsub ist eine modifizierte Variante von pEXA2NNT7, bei der mittels der spezifischen Primer P32 und P33 in einer MC-PCR (5.14.2.1) die Sequenz vor dem Luciferase-Gen so verändert wurde, dass diese die Restriktionsschnittstellen für EndoA enthält. Das Konstrukt wurde sequenziert und in *E. coli* BL21(DE3), bei Bedarf zusammen mit pJeMendoAIA, transformiert (5.14.5).

### 5.15 Proteinbiochemie

#### 5.15.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Die Kultivierung der mit Expressionsvektoren transformierten *E. coli* Zellen erfolgte in 300 ml YT-Medium (M2) in 1 l Kolben mit 4 Schikanen bei 37 °C und 220 Upm. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 30 µl einer 1 M IPTG-Lösung induziert. Es wurde unter gleichen Bedingungen für 3 h inkubiert, die Inkubationsdauer war in Testexpressionen ermittelt worden (Herzog, 2014). Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 4000 Upm für 10 min in der Zentrifuge GR 422 pelletiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS (L1) gewaschen, erneut pelletiert, und das Pellet bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### 5.15.2 Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Expression erfolgte wie im pYES2-Handbuch (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) beschrieben.

### 5.15.3 Zellaufschluss

Die pelletierte Kultur wurde im proteochemisch optimalen Puffer aufgenommen und mit Hilfe des Ultraschallgeräts Labsonic 2000 (Braun, Melsungen) auf Eis bei einer Amplitude von 30 % für 10 s mit 6-8 Wiederholungen aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschließend in der Zentrifuge Sorvall RC 50 Plus (Sorvall, Langenselbold) bei 4 °C und 16000 Upm für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde vor der anschließenden Chromatographie (5.15.7) über 0,45 µm Cellulosefilter (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert.

### 5.15.4 Fällern und Konzentrieren von Proben

Zur Aufbewahrung oder auch der Erhöhung der Konzentration von Proteinproben geringer Konzentration wurden Proteinproben gefällt. Ein Teil Probe wurde dazu mit vier Teilen Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Nun wurde die Probe bei 13200 Upm und 4 °C für 30 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet konnte zur Analyse in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> aufgenommen werden oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

### 5.15.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden SDS-Tricin Gele verwendet, da diese eine bessere Trennung von kleinen Proteinen verglichen mit den herkömmlichen Glycin-Gelen ermöglichen (Schägger & von Jagow, 1987). Bei SDS-Tricin Gelen werden ein Anoden- und ein Kathodenpuffer (L7 und L8) verwendet, außerdem wird dem Trenngel Urea zugegeben. Folgend sind die Zusammensetzungen für Trenn- (Tabelle 16) und Sammelgel (Tabelle 17) gezeigt.

*Tabelle 16: Zusammensetzung für ein SDS-Tricin Trenngel*

Komponente	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,2 ml
Gel Puffer (L6)	1.5 ml
AB-3	1,8 ml
Urea	1,625 g
TEMED	1,75 µl
APS 10%	17,5 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung für ein SDS-Tricin Sammelgel

Komponente	Menge
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,95 ml
Gel Puffer (L6)	0,75 ml
AB-3	0,3 ml
TEMED	2,25 µl
APS 10%	22,5 µl

Die Proben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt (L5) und 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard diente PAGE-Ruler Prestained Protein Ladder. Es wurde eine Mini PROTEAN™ Kammer (Biorad, München) verwendet. Der Kathodenpuffer wurde dabei zwischen die Gele gegossen, der Anodenpuffer in die Kammer. Es wurde mit 25 mA pro Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden im Anschluss entweder 1 h mit Fixierlösung (L9) fixiert, durch PAGE-Blue Protein Staining Solution angefärbt, und mit Entfärbelösung (L10) entfärbt, oder durch Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (siehe 5.15.6).

#### 5.15.6 Western Blot Analyse

Die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran (Optitran® BA-S 83, Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte in Transfer-Puffer (L4) mit Hilfe eines Elektrobloppers (Trans-Blot SD, Biorad, München) für 1 h bei konstanten 350 mA und unter Kühlung. Anschließend wurde die Membran 2x für je 10 min mit PBS (L1) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch inkubieren in Blockinglösung (L3) für mindestens 1 h geblockt. Die Membran wurde nun 3x für je 5 min mit PBST (L2) gewaschen und anschließend für 1 h oder über Nacht mit der entsprechenden Antikörperlösung (1:5000 in PBST (L2)) inkubiert. Die Membran wurde abermals 2x für je 10 min mit PBST (L2), gefolgt von 2x für je 10 min mit PBS (L1) gewaschen. Die Detektionslösung wurde immer frisch aus gleichen Teilen Ecl I (L14) und Ecl II (L15) zubereitet und die Membran für 1 min damit inkubiert. Die Detektion des Signals erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences UK Ltd., Little Chalfont, England) für 1-10 min in einer Dunkelkammer. Die Entwicklung des Filmes erfolgte im Entwickler Agfa CP1000 (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien).

#### 5.15.7 Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen erfolgte bei 4 °C (Labcool, SANYO, München) mit Hilfe des Chromatographen NGC der Firma Biorad (München) und einem nachgeschalteten Fraktionensammler (BioFrac™ Fraktion Collector, Biorad, München). Die Proteine wurden mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Alle verwendeten

Puffer wurden zuvor über 0,45 µm Cellulosefilter (Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert sowie entgast. Zunächst wurde die Säule mit entsprechendem Bindepuffer equilibriert. Anschließend wurde der Proteinextrakt aufgetragen. Nach einem Waschschrift wurden die an der Säule gebundenen Proteine mittels eines Gradienten an Bindepuffer und Elutionspuffer von der Säule eluiert, und die Säule abschließend mit Bindepuffer reequilibriert.

#### *5.15.7.1 Hexahistidin Affinitätschromatographie*

Hexahistidin-getaggte Proteine wurden mittels Affinitätschromatographie auf 1 ml HIS Trap HP Säulen (GE Healthcare, Freiburg) mit Ni<sup>2+</sup>-Sephrose gereinigt. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, die Säule wurde mit His-Bindepuffer (L16) gewaschen und die Proteine mit einer Imidazolösung (300 mM Imidazol in L16) eluiert und dabei in 1 ml Fraktionen gesammelt.

#### *5.15.7.2 Streptavidin Affinitätschromatographie*

Proteine mit Strep II-Tag wurden per Affinitätschromatographie auf einer 1 ml Strep Trap HP Säule (GE Healthcare, Freiburg) gereinigt. Diese bindet Strep II über Streptavidin-Sephrose. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min, die Säule wurde mit Strep-Bindepuffer (L17) gewaschen und die Proteine mit einer Desthiobiotinlösung (2,5 mM Desthiobiotin in L17) eluiert und dabei in 1 ml Fraktionen gesammelt.

#### 5.15.8 Reinigung mittels GnHCl

MazEstrep sollte aus MazEF auf einer His-Säule durch einen GnHCl-Gradient gereinigt werden. Dazu wurde eine 1 ml HIS Trap HP Säule mit L22 eingespült und anschließend die Probe aufgetragen. Nun wurde die Säule mit L23 gewaschen und anschließend MazEstrep mit einem Gradient von L24 eluiert und die Fraktionen gesammelt. Die Säule und das noch darauf gebundene MazFhis wurde mit L26, L27 und L22 regeneriert und MazFhis anschließend mit einem Gradient aus L28 eluiert und die Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit L25 dialysiert und anschließend per Western Blot analysiert.

#### 5.15.9 Dialyse von Proteinen

Zur Entsalzung und um das Elutionsmittel zu entfernen wurden die Fraktionen mit Hilfe von Dialysemembranen (Slide-A-Lyzer™ Mini Dialysis Device 3.5 K MWCO, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) bei 4 °C gegen H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> für 2 h und nach Austausch des Wassers über Nacht dialysiert.

## 5.16 Fluoreszenz-Oligonukleotidtest

Dieser Test wurde von Wang und Hergenrother (Wang & Hergenrother, 2007) entwickelt. Er wurde verwendet, um Fraktionen der MazF/MazE Reinigung mit einem Fluoreszenz-markiertem Oligonukleotid auf Funktionalität und Verunreinigungen zu überprüfen. Das Oligonukleotid 6-FAM-5'-GATAUACATATG-3'-BHQ1 besteht aus einer Nukleotidsequenz mit der mittigen RNA-Sequenz *UACA*, welche der Erkennungssequenz von MazF entspricht. Weiterhin ist an das 5'-Ende der Fluoreszenzfarbstoff 6-Fluorescein-Amidit (6-FAM), sowie an der 3'-Seite ein *Quencher* (BHQ1) gekoppelt. Durch die Nukleotid-Kette bleiben Farbstoff und *Quencher* in räumlicher Nähe, es kann also kein Fluoreszenz-Signal detektiert werden. Wird die Kette beispielsweise durch MazF gespalten und ist die räumliche Nähe dadurch nicht mehr gegeben, absorbiert der *Quencher* das Fluoreszenz-Signal nicht mehr, so dass dieses detektiert werden kann. Für den Test wurden in 384-Well Platten je 6 µl der zu testenden Fraktion mit 6 µl Puffer (5x MazF Puffer von Takara Bio Inc., Japan) und 5 µl Oligonukleotid-Lösung (1 nmol/ml von IBA GmbH, Göttingen) gemischt und auf 30 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> aufgefüllt. In einer weiteren Testreihe wurde außerdem 5 µl EDF Lösung (60 µg/ml bzw. 6 mg/ml) zugegeben. Das Signal wurde bei 450 und 650 nm am EnVision (2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer) detektiert.

## 5.17 Biologische Charakterisierung von Reinsubstanzen

### 5.17.1 Test gegen *Escherichia coli* BL21(DE3) pEXIFNNT7K

Für diesen Test wurden je 100 µl einer verdünnten Kultur (ca. 0,4 OD<sub>600</sub>) von *E.coli* BL21(DE3) pEXIFNNT7K in einer 96-Well Platte vorgelegt und zu diesen je 2 µl Reinsubstanz-Lösung mit einer Endkonzentration von 0,5-100 µg/ml zugegeben. Die Reinsubstanz wurde zum Einstellen der gewünschten Konzentration mit DMSO verdünnt. Nun wurde die Platte mit atmungsaktiver Folie (Breathseal, Greiner Bio-One, Frickenhausen) versiegelt und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 37 °C inkubiert. Zur Messung wurde die Folie abgenommen und die optische Dichte mit einem Microplate-Reader (Benchmark Plus, Biorad, USA) bei 600 nm gemessen. Als Positivkontrolle dienten Ansätze, zu denen lediglich 2 µl DMSO zugegeben wurden. Eine Abnahme der Absorption korreliert mit einer geringeren Zellzahl in der Probe.

### 5.17.2 Agardiffusionstest

Die unter Tabelle 4 aufgelisteten Testkeime wurden verwendet, um Testplatten herzustellen. Die jeweils verwendeten Medien sind ebenfalls der Tabelle zu entnehmen. Die Bakterientestplatten wurden dabei zweischichtig gegossen, die untere Schicht ohne Organismen, die obere mit  $10^6$  Testkeimen/ml. Die Pilztestplatten wurden mit  $10^6$  Sporen/ml gegossen. Alle Platten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die mikrobielle Aktivität der Reinsubstanz wurde nach der Methode von Zähler (1965) bestimmt. Dazu wurden bis zu 50 µg Reinsubstanz auf Filterrondelle gegeben, das Lösemittel abdampfen gelassen und diese auf die verschiedenen Testplatten aufgelegt. Die Platten wurden nun bei der entsprechenden Temperatur (siehe ebenfalls Tabelle 4) für 24 h inkubiert und anschließend der Hemmhof gemessen. Der Test wurde freundlicherweise von Frau M. Saul-Reiss sowie Herrn W. Schuck durchgeführt.

### 5.17.3 Test zur Sporenkeimungshemmung

In diesem Test wurde die Hemmung der Sporenkeimung durch die Reinsubstanz mit Sporen von *Magnaporthe oryzae* (in M15 und  $H_2O_{UF}$ ), *Botrytis cinerea* und *Phytophthora infestans* getestet. Die Sporensuspensionen ( $2-4 \times 10^4$  Sporen/ml) wurden dazu in 96-Well-Platten vorgelegt und die Reinsubstanz in einem geringen Volumen an Lösungsmittel in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Anschließend wurde für 24 und 48 h inkubiert und mikroskopisch ausgewertet. Der Test wurde freundlicherweise von Frau M. Saul-Reiss sowie Herrn W. Schuck durchgeführt.

### 5.17.4 Zytotoxizitätstest

Die Zelllinie HeLa-S3 wurde bis zum Test in Gibco® DMEM-Medium (Invitrogen GmbH, Darmstadt) kultiviert. Für den Test wurden sie mit einer Konzentration von  $1-2 \times 10^4$  Zellen/ml in einem Volumen von 200 µl in 96-Well-Platten gegeben. Nun wurden die Platten zum Anwachsen der Zellen für 24 h inkubiert und anschließend das Medium abgezogen und durch frisches Medium mit darin gelöster Reinsubstanz ersetzt. Nach 48 und 72 h wurde die Zelllyse mikroskopisch ausgewertet. Der Test wurde freundlicherweise von Frau M. Saul-Reiss durchgeführt.

### 5.17.5 Test zur Pflanzenkeimungshemmung

In diesem Test wurde die Wirkung der Reinsubstanz auf die Keimfähigkeit von Pflanzen anhand von *Setaria italica* (Monokotyle) und *Lepidium sativum* (Dikotyle) untersucht. Dazu wurden in 48-Well-Platten Rundfilter gelegt, auf diese die Reinsubstanz aufgebracht und das Lösungsmittel abgedampft. Nun wurde in jedes Loch 12 Samen gegeben und 150 µl Leitungswasser dazu pipettiert. Die Platten wurden für fünf Tage in einem verschlossenen, befeuchteten, durchsichtigen Gefäß bei 28 °C bei Dauerbeleuchtung inkubiert. Nun wurden die Deckel der Platten abgenommen und für einen weiteren Tag inkubiert. Die Platten wurden optisch nach der Menge der ausgekeimten Samen und der Schädigung der Pflanzen ausgewertet. Der Test wurde freundlicherweise von Frau M. Saul-Reiss durchgeführt.

### 5.18 *in vivo* Test

In diesem Test wurden Extrakte von Pilzen in einer Konzentration von 100 µg/ml auf Aktivität gegen *E. coli* und MazF getestet. Als Stamm wurde für die Ermittlung einer Aktivierung von MazF BL21(DE3), transformiert mit pEXNNT7 und pJEMmazEF, und für die Bestimmung einer Aktivität gegen die Bildung der Luciferase BL21(DE3), transformiert mit pEXIFNNT7K, verwendet. Die Stämme wurden in 20 ml LB (M1) bei 37 °C und 120 rpm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 herangewachsen lassen und anschließend mit 0,5 mM IPTG und 0,2 % Rhamnose induziert. Nach drei Stunden wurde die Zelldichte erneut gemessen und die OD<sub>600</sub> in PBS (L1) auf 2 eingestellt. Zu dieser Suspension wurden die Induktionsmittel (IPTG und Rhamnose) erneut in der gleichen Endkonzentration zugegeben. Für den Test wurden in einer 96 Loch Platte je 2 µl Extrakt (Extraktesammlung des IBWF, gelöst in DMSO) mit 10,5 µl PBS (L1) gemischt. Bei Nachttests wurde zu den in 96-Well-Platten getrockneten Fraktionen je 2 µl DMSO und 10,5 µl PBS (L1) gegeben und diese darin gelöst. Davon wurden je 2 µl pro Stamm in eine 384 Loch Platte übertragen, wobei jeder Ansatz im Duplikat angesetzt wurde. Nun wurden je 30 µl der Zellsuspension dazugegeben, die Platte mit atmungsaktiver Folie (Breathseal, Greiner Bio-One, Frickenhausen) versiegelt und über Nacht in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Detektion wurde das Substrat der Luciferase (NanoGlo<sup>®</sup> Luciferase Assay Substrat, Promega, USA) 1:100 mit B-Per<sup>™</sup> (Thermo Fischer, USA) gemischt und zeitnah je 30 µl zu den Zellen gegeben. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe des Envision (2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) bei 700 nm detektiert.

## 6 Ergebnisse

Das System MazEF des Typs II aus *E. coli* gehört zu den häufigsten und am besten erforschten Toxin-Antitoxin Systemen. Plasmidkodiert dient es dem Erhalt des Plasmids in einer Population, zum Beispiel bei Resistenzplasmiden (Williams et al., 2011). Das Toxin MazF ist eine RNase, welche RNA spezifisch an der Sequenz ACA schneidet und dadurch die Proteinneusynthese weitgehend zum Erliegen bringt. Das Antitoxin MazE ist ein Protein, welches sich an MazF anlagert und es dadurch inaktiviert (Zhang et al., 2003). Mit Hilfe von zu entwickelnden geeigneten Testsystemen sollte hier eine Extraktebibliothek auf die Fähigkeit gescreent werden, die Bindung von MazE an MazF zu unterbrechen, und aktive Substanzen identifiziert werden. Zudem konnten so auch Extrakte identifiziert werden, die eine antibiotische Wirkung gegenüber *E. coli* zeigen.

### 6.1 *In vitro* Testentwicklung

Ein *in vitro* Testsystem, basierend auf der AlphaScreen-Technologie (Handbuch: User's Guide to Alpha Assays Protein:Protein Interactions, Perkin Elmer, USA), sollte dazu dienen, Extrakte auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, die Bindung von MazE an MazF in einer definierten Lösung aufzuheben und dadurch MazF zu aktivieren.

Zur Entwicklung dieses Tests sollten MazE und MazF mit zwei verschiedenen Tags versehen und jeweils separat gereinigt werden, um im Test mit je einem Donor- bzw. Akzeptor-Bead versehen zu werden. Nach Zusammengeben der beiden Komponenten bilden diese den MazEF Komplex. Dadurch werden die angehängten Donor- und Akzeptorbeads in unmittelbare Nähe gebracht. Eine Anregung des Donorbeads generiert Singulett-Sauerstoff welcher an das Akzeptor Bead weitergeleitet wird. Hier führt es zu einer Emission von Licht. Wird durch die Substanz die Interaktion von MazE zu MazF gestört, dissoziieren diese. Dadurch sind Donor- und Akzeptorbead nicht mehr in unmittelbarer Nähe (weniger als 200 nm) und das Signal erlischt (siehe Abbildung 4). Mit Hilfe des Tests kann die Extraktebibliothek auf Aktivität gegen die Bindung von MazE zu MazF getestet werden.

In diesem Testsystem können Fremdeinwirkungen weitgehend ausgeschlossen werden, da eine definierte Umgebung vorliegt. Dies kann auf der anderen Seite auch ein Nachteil sein, da nicht gewährleistet ist, dass eine Aktivität auch in der lebenden Zelle gegeben wäre. Es werden außerdem auch Substanzen abgedeckt, die nicht in die Zellen eindringen können.

Diese Substanzen sind dennoch von Interesse, da sie als Leitstrukturen dienen können. Ein weiterer Nachteil ist die Möglichkeit von falsch positiven Signalen durch hochreaktive Substanzen, welche unspezifisch (z.B. Säuren, Chaotrope, Detergenzien) mit Proteinen reagieren und dadurch eine Signalauslöschung bewirken.

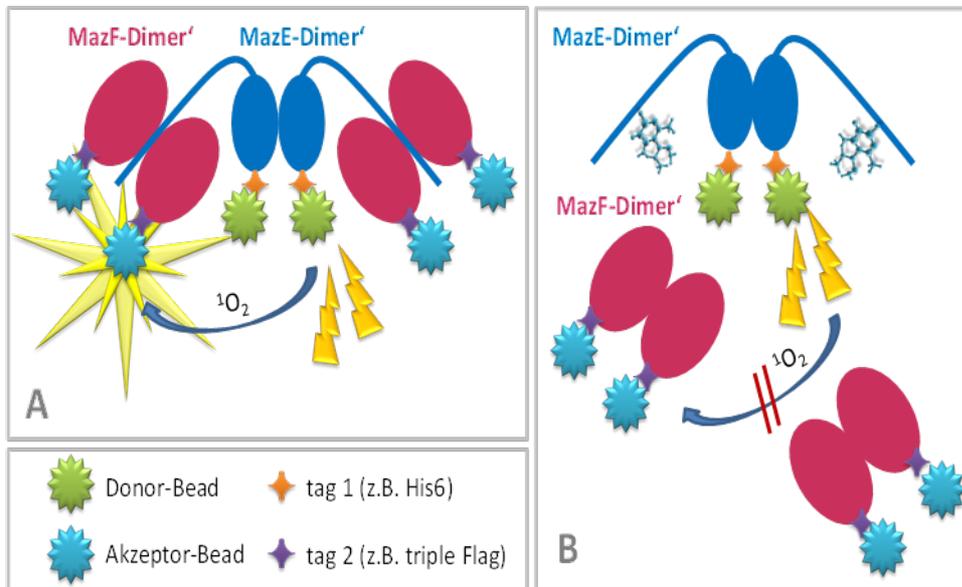


Abbildung 4: Funktionsschema des *in vitro* Tests

Für den Test müssen die Komponenten MazE und MazF rein vorliegen, um sie mit den gewünschten Beads verbinden zu können. Da sowohl MazE als auch MazF sehr kleine Proteine sind, wurden kurze Tags verwendet. Dies sollte die Wahrscheinlichkeit einer Interferenz der Tags mit der Funktionalität der Proteine minimieren. Es wurden der His-Tag, welcher aus zehn Histidin, und der Strep-Tag, welcher aus 8 Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) besteht, verwendet. Der Strep-Tag ermöglicht meist eine spezifischere Reinigung als der His-Tag, da Proteine auch natürlicherweise eine Anhäufung von Histidin enthalten können. Für MazF wurde daher der Strep-Tag gewählt, da hier mit einer aufwendigeren Expression und Reinigung gerechnet wurde. Für MazE wurde demnach der His-Tag gewählt.

Zur Kontrolle für die erfolgreiche Testentwicklung sollte EDF (*extracellular death factor*) eingesetzt werden, ein Pentapeptid mit der Sequenz Asparagin-Asparagin-Tryptophan-Asparagin-Asparagin (NNWNN). Dieses wurde in Arbeiten von Belitsky et al. (2011) als MazF aktivierend beschrieben, in dem zum einen die Bindung von MazE an MazF verhindert, sowie die Aktivität von MazF gesteigert wurde. EDF sollte auch als Kontrolle für die Entwicklung des *in vivo*-Tests dienen (siehe 6.2).

Im folgenden Abschnitt wird die Entwicklung des *in vitro* Assays (6.1.1-6.1.4) beschrieben. Es wurde nach geeigneten Methoden gesucht, MazE beziehungsweise MazF in ausreichenden Mengen zu reinigen. Die gereinigten Komponenten wurden anschließend mittels eines fluoreszenzbasierten Oligonukleotidtests (6.1.4) überprüft.

### 6.1.1 Reinigen von MazE und MazF nach einer Coexpression

In diesem Ansatz sollten die beiden Komponenten zunächst gemeinsam in einer Coexpression exprimiert werden, um anschließend voneinander getrennt und gereinigt zu werden. Dieses Verfahren wurde getestet, da die Gene für MazE und MazF natürlicherweise direkt hintereinander liegen und daher auch automatisch coexprimiert werden. Es konnte daher der entsprechende natürliche Genomabschnitt (in dieser Arbeit aus *E. coli* BL21(DE3) direkt verwendet werden. Durch die Coexpression wurde zum einen eine höhere Stabilität von MazE sowie eine verminderte toxische Wirkung von MazF während der Expression erwartet. Nach der erfolgreichen Selektion einer transformierten Kolonie sowie der Coexpression (5.15.1) zeigte sich, dass eine vollständige Trennung der beiden Proteine durch Standardverfahren an der His- bzw. Strep-Säule nicht möglich war. Die Probleme waren für beide Proteine, dass die jeweilige andere Komponente noch in Resten vorhanden war, sowie bei der Reinigung von MazEhis, dass noch weitere Proteine neben MazEF enthalten waren. Es wurden nun verschiedene Methoden getestet, um eine vollständige Trennung der beiden Komponenten zu erreichen sowie die Verunreinigungen in den MazEhis-Proben zu beseitigen.

In einem Versuch wurde eine His- und eine Strep-Säule hintereinander geschaltet. Diese Versuche wurden mit MazFhis und MazEstrep von Waltraud Herzog (Herzog, 2014) durchgeführt, sind aber auf die Variante MazFstrep und MazEhis übertragbar. Durch die nachgeschaltete Strep-Säule sollte verunreinigendes MazEstrep bei der Elution aufgefangen werden. Es stellte sich heraus, dass keine vollständige Trennung der Komponenten erreicht werden konnte (Abbildung 5, jeweils die Reihen „Strep 2“ und „His 8“). Trotz der nachgeschalteten Strep-Säule konnte MazFhis (Signal „His 8“ bei Detektion mit His-Antikörper) nicht von MazEstrep (Signal „His 8“ bei Detektion mit Strep-Antikörper) getrennt werden. Der Versuch wurde erfolgreich mit umgekehrter Reihenfolge der Säulen durchgeführt, um reines MazEstrep zu erhalten (Reihe „Strep 2“, Abbildung 5).

Da der Komplex aus MazE und MazF anscheinend sehr stabil ist, wurde versucht, zur Reinigung von MazFhis die unerwünschte Komponente MazEstrep nach Binden an die Säule abzuwaschen. Dazu wurde der Komplex zunächst an die Säule gebunden und verunreinigende Proteine abgewaschen. In einem zweiten Schritt wurden beide

Komponenten durch einen starken Urea-Gradient denaturiert, um die unerwünschte Komponente abwaschen zu können. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, führte diese Methode jedoch zu keinen detektierbaren Mengen an Zielprotein. Bei der Fraktion 30 ist in der Detektion mit Strep-Antikörper ein deutliches Signal bei etwa 24 kDa zu erkennen. Einzelnes MazEstrep beziehungsweise MazFhis hat etwa eine Größe von 12 kDa, das Signal entspricht also der doppelten Größe der Einzelkomponenten und stellt damit keine gereinigte einzelne Komponente dar.

Nachdem die Trennung des Komplexes durch diese Methoden nicht möglich und mit starken Verlusten behaftet war, wurde versucht eine Trennung mittels GnHCl zu erreichen (5.15.8), welches ähnlich wie Urea in der Lage ist Proteine reversibel zu denaturieren. Es stellte sich heraus, das auch bei der Denaturierung mittels GnHCl nach der Reinigung kein MazE oder MazF mehr detektiert werden konnte (nicht gezeigt).

Es konnte also eine Reinigung der Komponente MazEstrep nach der Coexpression erreicht werden, jedoch nicht die ebenso benötigte Reinigung von MazFhis. Die beiden Komponenten wurden daher im Folgenden getrennt exprimiert und gereinigt.

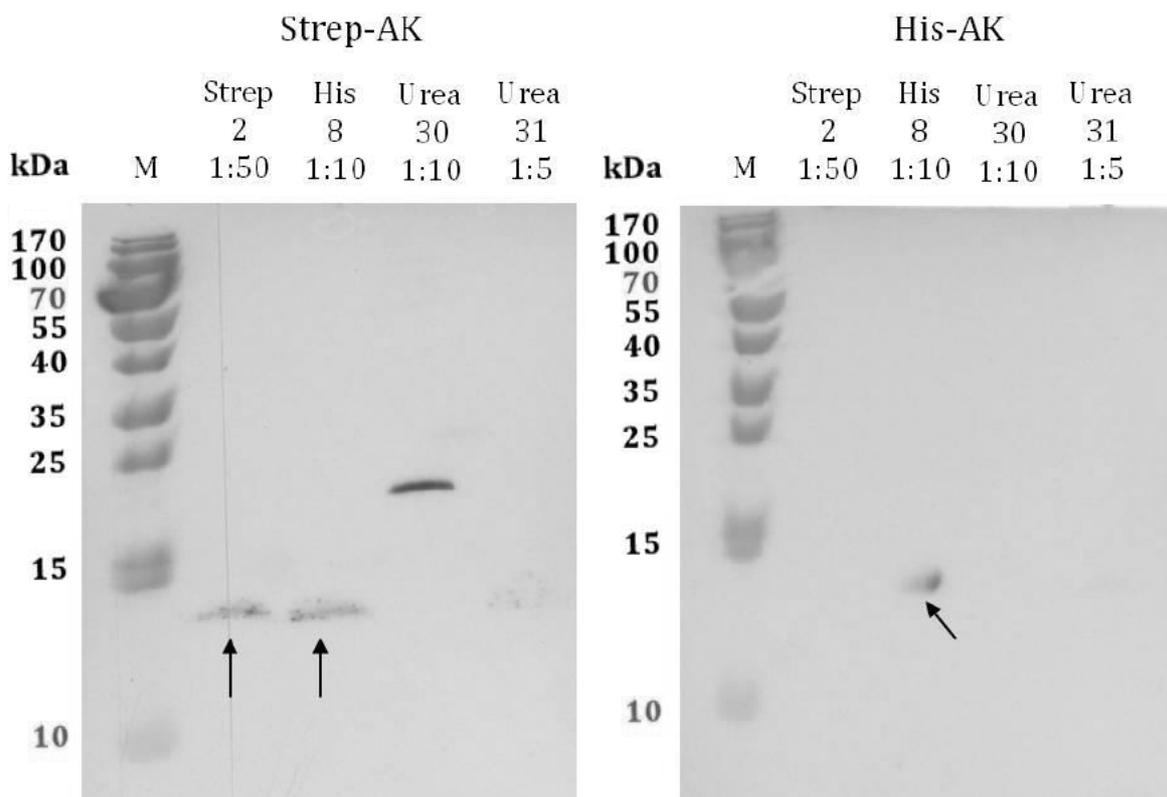


Abbildung 5: Coexpression von MazEstrep und MazFhis (beide etwa 12 kDa) mit anschließender Trennung an der FPLC.

Die linke Abbildung zeigt eine immunologische Detektion mittels Strep-Antikörper, die rechte mittels His-Antikörper. Die ersten beiden Spalten („Strep“ und „His“) zeigen Fraktionen aus den Versuchen von in Reihe geschalteten Säulen. Die beiden letzten Spalten zeigen die Fraktion 30 und 31 der Versuche mit Urea. Verändert nach Waltraud Herzog (Herzog, 2014)

## 6.1.2 Reinigen von MazE

### 6.1.2.1 *MazEhis*

Da die Trennung von MazE und MazF nach einer Coexpression nicht möglich war, wurden beide Proteine getrennt exprimiert. Es wurde erwartet, dass MazF aufwendiger zu exprimieren bzw. reinigen wäre, weshalb dieses mit dem besser zu handhabenden Strep-Tag versehen wurde, MazE fiel demnach der His-Tag zu.

Für MazEhis wurde MazE in pET51b(+) so einkloniert, dass es zwischen dem T7 Promotor und dem His-Tag lag (5.14.7.2). Die Testexpression erfolgte in BL21(DE3) und BL21(DE3)pLysS, wie in Abschnitt 5.15.1 beschrieben. Frisch aufgeschlossene Proben dieser Testexpressionen zeigten in der Western Blot Analyse (5.15.6) einen hohen Gehalt an MazE (Bilder nicht gezeigt), weshalb mit der Expression und Reinigung in größerem Maßstab fortgeschritten wurde. Da BL21(DE3)pLysS eine einfachere Probenvorbereitung ermöglichte, wurde dieser Stamm für die weiteren Versuche vorgezogen. Die Proben der Expressionen wurden wie unter 5.15.3 beschrieben für die FPLC vorbereitet. Dem Bindepuffer wurde dabei Imidazol zugegeben, da dadurch im Vergleich zu Bindepuffer ohne Imidazol eine bessere Reinigung beobachtet wurde. Für den Aufschluss wurde dem Bindepuffer, welcher auch den Aufschlusspuffer darstellte, zusätzlich ein EDTA freier Protease Inhibitor Mix zugegeben (siehe L16). Der Zusatz der Protease Inhibitoren führte zu einer Stabilisierung von MazE, was sich in einer größeren Ausbeute nach den Reinigungsschritten äußerte. Die Fraktion der löslichen Proteine wurde mittels FPLC (siehe Abschnitt 5.15.7) über eine His Säule getrennt (Schema siehe Abbildung 6) und anschließend über Nacht dialysiert (Abschnitt 5.15.9).

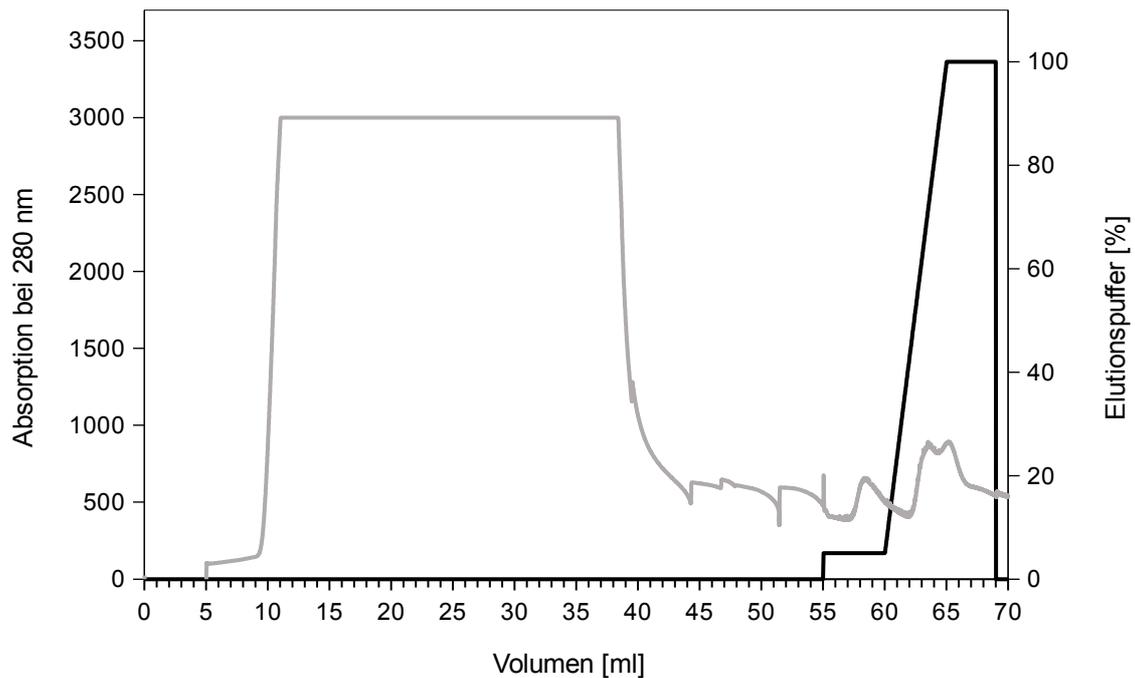


Abbildung 6: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazEhis mittels HISTrap-HP Affinitätschromatographie.

Abgebildet ist die Absorption bei 280 nm (grau) sowie der prozentuale Anteil an Elutionspuffer (schwarz). Schwankungen in der Absorption zwischen 45-55 ml Volumen kamen durch eine Fehlfunktion des Detektors bei Umschalten der Flussgeschwindigkeit zu Stande (Flussrate nicht im Bild), mit Beginn der Elution wurde der Fluss jedoch nicht mehr verändert, Absorptionsschwankungen sind also den eluierenden Proteinen zuzuschreiben. Das Eluat wurde ab dem Volumen 55 ml in 1 ml Fraktionen gesammelt.

Im folgenden SDS-PAGE-Coomassiegel (Abbildung 7, links) waren neben einem Signal bei etwa 12 kDa (entspricht MazEhis, in der Abbildung mit \* markiert) noch zahlreiche weitere Signale zu sehen. Bei der immunologischen Detektion (Durchführung siehe 5.15.6, Abbildung 7, rechts) waren die stärksten Signale im Bereich von 12 kDa, daneben waren noch weitere schwächere Signale bei 35 und ca. 11 kDa sichtbar. Die weiteren gesammelten Fraktionen wurden ebenfalls analysiert, zeigten aber eine schlechtere Trennung von MazEhis und sind daher nicht gezeigt. Daraufhin wurden in mehreren Versuchen verschiedene Schemata für die Elution getestet, um eine bessere Trennung des MazEhis von den anderen Proteinen zu erreichen. Die Elution verlief in drei Abschnitten. Zunächst wurde mit einer geringen Konzentration an Elutionspuffer gespült, um schwach gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Diese Konzentration wurde variiert. Der zweite Abschnitt der Elution bestand aus einem linearen Gradienten, in dem die Konzentration an Elutionspuffer von der gewählten Konzentration aus dem ersten Abschnitt auf 100 % zunahm. Hier wurde die Steigerung der Konzentration verlangsamt, die Gerade also abgeflacht. Im dritten Abschnitt wurde mit 100 % Elutionspuffer eluiert. Durch die Optimierungen konnte die Anzahl an verunreinigenden Proteinen verringert werden, es gelang jedoch nicht, sämtliche

Verunreinigungen zu eliminieren. Diese Reinigung mittels His-Säule schien also nicht geeignet, MazEhis vollständig zu reinigen, weshalb nun verschiedene Methoden getestet wurden, um dies zu erreichen.

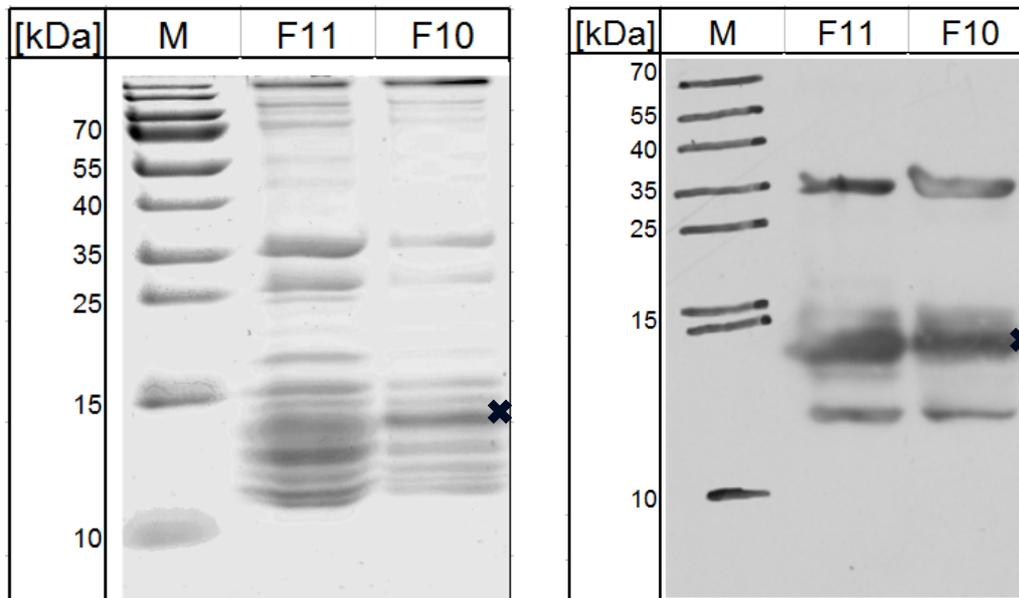


Abbildung 7: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der Affinitätschromatographischen Reinigung von MazEhis.

Es wurden je 20  $\mu$ l der Fraktionen 10 (F10) und 11 (F11) aufgetragen. Das Signal für mutmaßliches MazEhis ist mit einem Kreuz markiert. Als Marker (M) wurden 5  $\mu$ l der PAGERuler™ Prestained Protein Ladder verwendet, die Fragmentgrößen sind jeweils links vom Gel angegeben (das 15 kDa zugeordnete Fragment teilt sich beim verwendeten Geltyp in zwei Fragmente auf, der Marker ist also für die Verwendung in SDS-Tricin Gelen nicht geeignet).

Eine Möglichkeit ist, nach einem ersten Reinigungsschritt durch Affinitätschromatographie einen zweiten Reinigungsschritt durch Ionenaustausch- oder Größenausschlusschromatographie durchzuführen. Da MazE und MazF beide sehr klein und kaum unterschiedlich groß sind, wurde die Trennung nach Größe nicht getestet. Beide besitzen aber unterschiedliche isoelektrische Punkte (MazF pI 8,5, MazE pI 4,7, [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) und sind damit für eine Trennung nach Ladung durch Ionenaustauschchromatographie geeignet. Für die Anionenaustauschchromatographie sollte die Säule UNOSphereQ von Biorad verwendet werden. Da diese Säule mit dem bisher verwendeten Natriumphosphatpuffer nicht kompatibel ist, musste das Puffersystem zu Trispuffer (L29) gewechselt werden. Versuche mit diesem anderen Puffersystem zeigten eine stark reduzierte Stabilität von MazEhis. Da das angereicherte MazEhis nach dem ersten Reinigungsschritt an der His-Säule zusätzlich noch entsalzt werden musste (Econo-Pac 10 DG Column, Biorad), verringerte sich die Restmenge an MazEhis noch weiter, so dass für die Reinigung an der Anionenaustauschchromatographiesäule nicht mehr genug Rohmaterial vorhanden war. Von einer Reinigung nach dieser Methode wurde daher abgesehen.

Da es mit dem gebildeten Proteinspektrum in *E. coli* BL21(DE3)plysS nicht möglich war, eine vollständige Reinigung zu erreichen, wurden weitere Expressionssysteme getestet. Dadurch kann zum einen eventuell das Ausgangsgemisch an Proteinen so verändert werden, dass eine Reinigung an der His-Säule möglich ist, sowie zum anderen die Menge an gebildeten MazE vergrößert werden, so dass verlustbehaftete Reinigungsschritte noch ausreichende Mengen an reinem Protein ergeben.

Es wurde ein *E. coli* Stamm der Keio Collection (Baba et al., 2006), JW2753-1, mit pETmazEhis transformiert (5.14.5). Bei diesem Stamm wurde das Gen für MazF durch eine Insertion einer Kanamycin-Kassette inaktiviert. Durch das Ausschalten des MazF-Gens wurde eine einfachere Reinigung von MazEhis erwartet, da kein genomisches MazF an das exprimierte MazEhis binden kann. Testexpressionen (5.15.1) selektierter transformierter Kolonien zeigten jedoch keine ausreichende Menge an MazEhis, um eine Reinigung vorzunehmen. Es wurden mehrere Testexpressionen durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten (2,3,4,5 h sowie ÜN) Proben genommen und auf MazEhis untersucht, die gebildete Menge an MazEhis war allerdings nie ausreichend für eine Reinigung. Es wurde daher ein weiterer Stamm der oben genannten Sammlung transformiert. Bei JW0427-1 ist das Gen für die Protease ClpP durch eine Kanamycin-Kassette inaktiviert. ClpP ist die Protease, die für den schnellen Abbau von MazE verantwortlich ist (Aizenman et al., 1996). Eine Deletion dieser Protease sollte also eine Stabilisierung von MazEhis bewirken und damit zu einer höheren Ausbeute führen. Testexpressionen selektierter Transformanden zeigten jedoch auch für diesen Stamm keine ausreichende Menge an gebildetem MazEhis. Es wurde daraufhin eine Expression in *S. cerevisiae* durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pYES2mazEhis (5.14.7.8) in *S. cerevisiae* transformiert (5.14.6). Die Expression in diesem System sollte zum Einen ein anderes Proteinspektrum aufweisen. Zum Anderen enthält *S. cerevisiae* natürlicherweise weder ClpP noch MazEF, was die Expression stabilisieren und eine einfachere Reinigung ermöglichen könnte. Testexpressionen (5.15.2) selektionierter Transformanden zeigten nur ein schwaches Signal für MazEhis, eine Reinigung einer Expression in größerem Maßstab zeigte zudem, dass neben MazEhis ähnlich wie bei der Expression in *E. coli* noch weitere Proteine enthalten waren (Abbildung 8). Da eine Expression in *S. cerevisiae* also weder eine höhere Proteinmenge noch eine verbesserte Reinheit ermöglichte, wurde von der weiteren Verwendung von *S. cerevisiae* abgesehen.

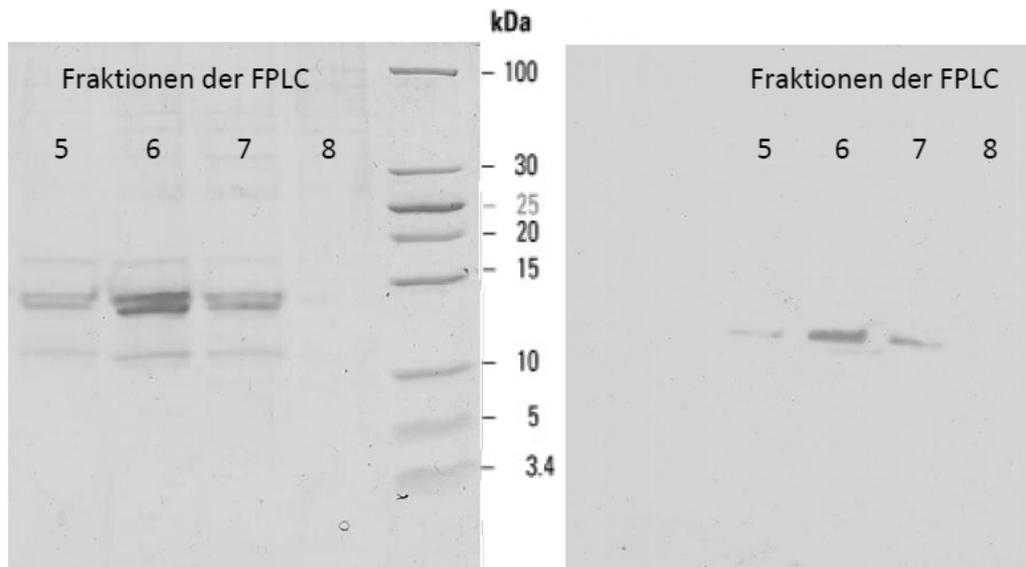


Abbildung 8: Analyse von FPLC-Fractionen aus der Reinigung von MazEhis nach einer Expression in *S. cerevisiae* (verändert nach S.Adam (Adam, 2015)).

Links ist die Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE Gels zu sehen, rechts eine immunologische Detektion des Western Blots mittels His-Antikörper.

Da eine vollständige Reinigung von MazEhis bei keiner der getesteten Methoden möglich war, wurde für die Validierung von gereinigtem MazF sowie des Oligonukleotidassays eine Expression von MazEstrep durchgeführt.

#### 6.1.2.2 MazEstrep

Da eine vollständige Reinigung von MazEhis nicht möglich war, wurde MazE in pET51b(+) so einkloniert, dass es zwischen dem T7 Promotor und dem Strep Tag lag (5.14.7.5). Die Expression erfolgte wieder in BL21(DE3)pLysS (5.15.1), die Fraktion der löslichen Proteine wurde mittels FPLC (5.15.7.2) über eine Strep-HP Säule getrennt (Abbildung 9) und die gesammelten Fraktionen anschließend über Nacht dialysiert (5.15.9). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt (5.15.5). Bei der folgenden Analyse der Fraktionen durch Western Blot (5.15.6) sowie Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels waren in beiden Fällen außer dem Signal bei ca. 12 kDa (entspricht MazEstrep) keine weiteren Signale zu sehen (Abbildung 10). Das so erhaltene reine MazEstrep wurde zur Validierung des Oligonukleotidtests (6.1.4) verwendet.

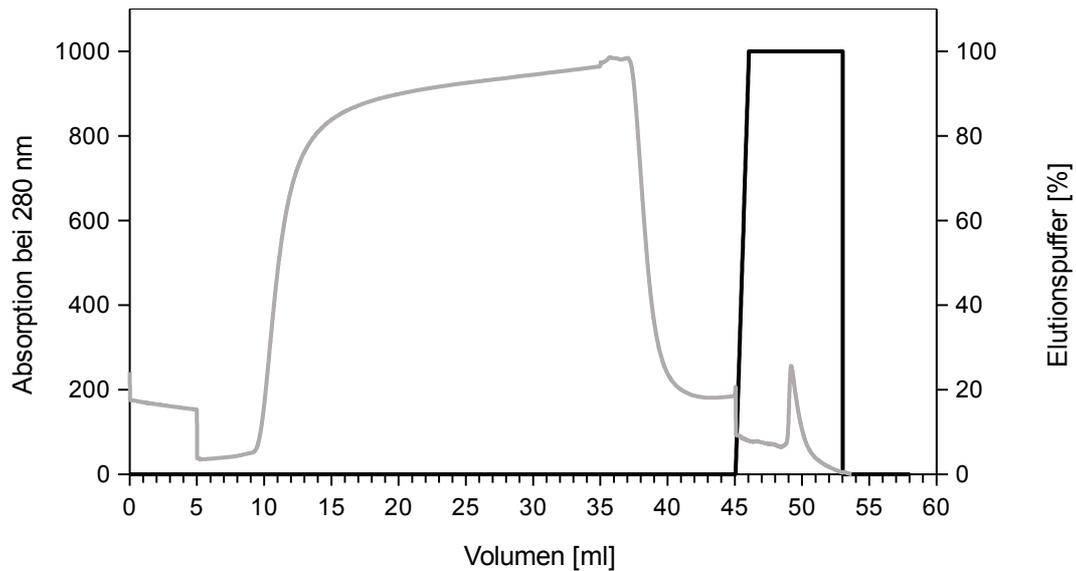


Abbildung 9: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazEstrep mittels StrepTrap-HP Affinitätschromatographie.

Abgebildet ist die Absorption bei 280 nm (grau) sowie der prozentuale Anteil an Elutionspuffer (schwarz). Das Eluat wurde ab dem Volumen 45 ml in 1 ml Fraktionen gesammelt.

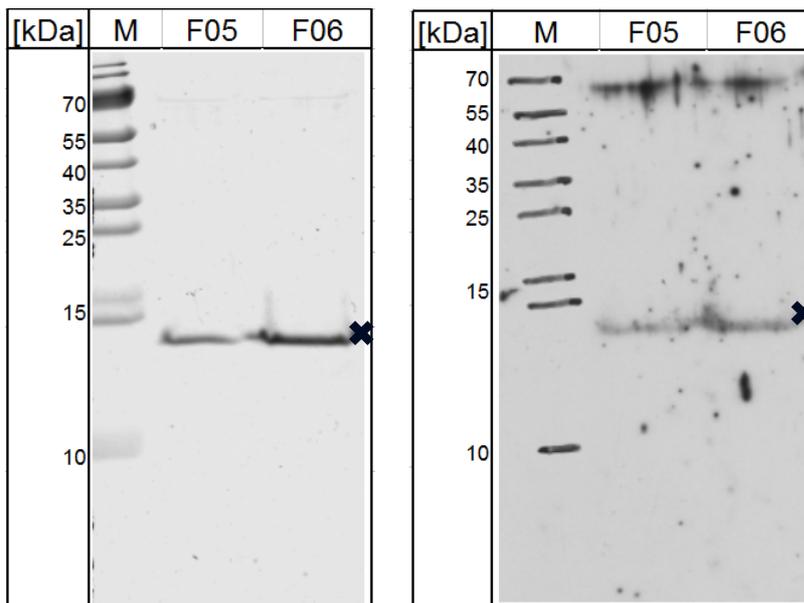


Abbildung 10: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von MazEstrep.

Es wurden je 20  $\mu$ l der Fraktionen 5 (F05) und 6 (F06) aufgetragen. Das Signal für mutmaßliches MazEstrep ist mit einem Kreuz markiert. Als Marker (M) wurden 5  $\mu$ l der PAGERuler™ Prestained Protein Ladder verwendet, die Fragmentgrößen sind jeweils links vom Gel angegeben (das 15 kDa zugeordnete Fragment teilt sich beim verwendeten Gelyp in zwei Fragmente auf, der Marker ist also für die Verwendung in SDS-Tricin Gelen nicht geeignet).

### 6.1.3 Reinigung von MazFstrep

Zur Expression von MazFstrep wurde das Gen für MazFstrep so verändert, dass im gesamten Bereich keine ACA- Sequenzen bei Beibehaltung des Aminosäure-Codes mehr vorhanden waren (zum Vergleich der Sequenzen siehe Abbildung 11).

```

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
1  ~-ATGGCAAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGATGGTAAGCCGATACGTACCCGATAITGGGCGATCTGAT 98
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
1  CCATGGCA---TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGATAAGGTACCGATGGTAAGCCGATACGTACCCGATAITGGGCGATCTGAT 97
      *           *           *           *           *           *           *           *           *

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
99  TGGGTTGATTTTGACCCGACAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGACATCGTCCAGCTGTTGCTCCTGAGTCCTTTCATGTACAACAACAAAACAGGTATGTGT 198
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
98  TGGGTTGATTTTGACCCGACGAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGGCATCGTCCAGCTGTTGCTCCTGAGTCCTTTCATGTATAATAATAAAACTGGTATGTGT 197
      *           *           *           *           *           *           *           *           *

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
199  CTGTGTGTTCCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTGAAAGTTGTTTTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAAAA 298
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
198  CTGTGTGTTCCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTGAAAGTTGTTTTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAAAA 297
      *           *           *           *           *           *           *           *           *

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
299  GTATCGCCTGGCGGGCAAGAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCCAGAGGAATTGCAACTCATTAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGTAG~~ 396
  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
298  GTATCGCCTGGCGGGCAAGAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCCAGAGGAATTGCAACTCATTAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGTAGGC 397
      *           *           *           *           *           *           *           *           *

```

Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen. Die obere Zeile stellt die Ausgangs-Sequenz von MazFstrep dar, die untere die ACA-bereinigte. Unterschiede sind rot markiert.

Dieses Gen wurde synthetisiert (MWG Eurofins Genomics, Ebersberg) und nach Erhalt in pET51b(+) hinter den T7 Promotor inkloniert (5.14.7.4). Die Expression erfolgte in BL21(DE3)pLysS (5.15.1) und die Fraktion der löslichen Proteine wurde mittels FPLC (5.15.7.2) auf einer StrepTrap-HP Säule getrennt (Abbildung 12) und anschließend über Nacht dialysiert (5.15.9). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt (5.15.5). Bei der anschließenden Analyse der Fraktionen durch Western Blot Analyse (5.15.6) sowie Coomassie-Färbung waren in beiden Fällen außer dem Signal bei ca. 15 kDa (entspricht MazFstrep) keine weiteren Signale zu sehen (Abbildung 13).

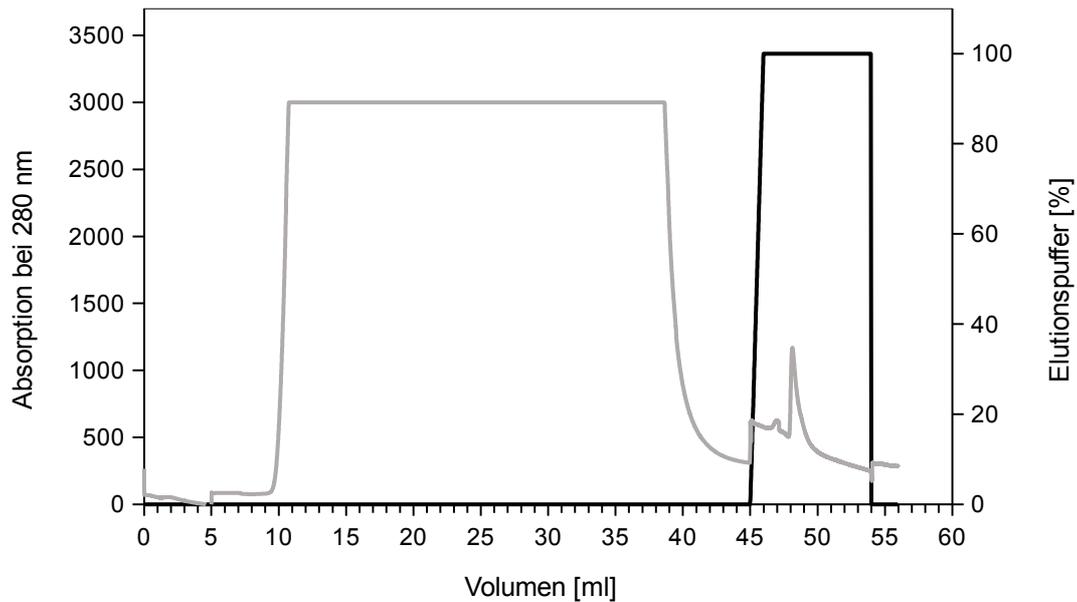


Abbildung 12: FPLC-Chromatogramm zur Aufreinigung von MazFstrep mittels StrepTrap-HP Affinitätschromatographie.

Abgebildet ist die Absorption bei 280 nm (grau) sowie der prozentuale Anteil an Elutionspuffer (schwarz). Das Eluat wurde ab dem Volumen 45 ml in 1 ml Fraktionen gesammelt.

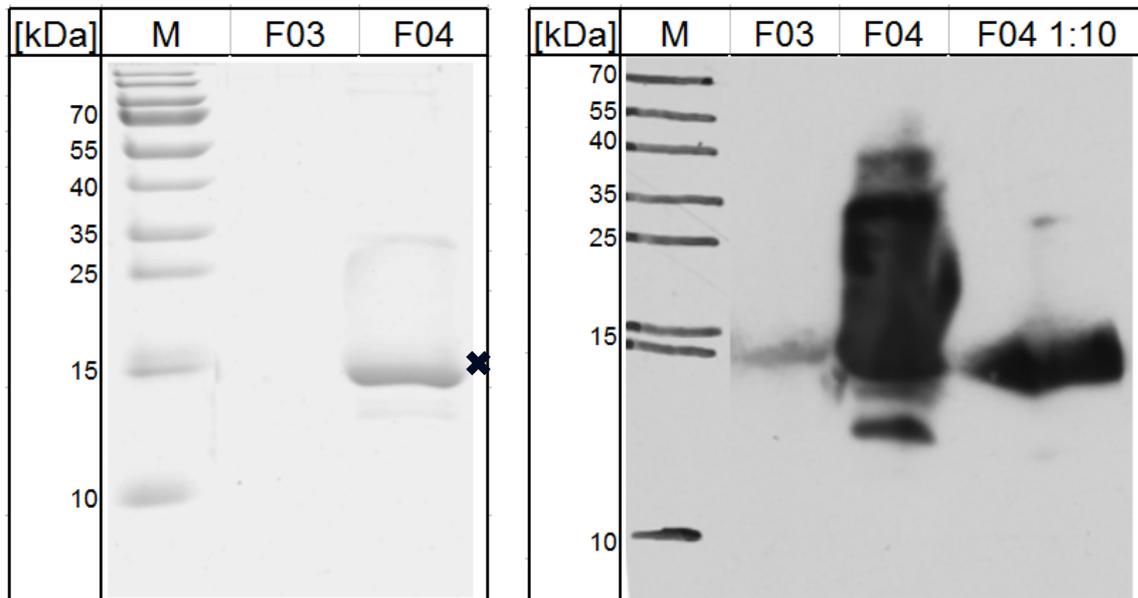


Abbildung 13: Coomassie-Färbung (links) und Western Blot Analyse (rechts) eines SDS-PAGE Gels zur Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung von MazFstrep.

Es wurden je 20  $\mu$ l der Fraktionen 3 (F03) und 4 (F04) sowie 20  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung von Fraktion 4 (F04 1:10) aufgetragen. Das Signal für mutmaßliches MazFstrep ist mit einem Kreuz markiert. Als Marker (M) wurden 5  $\mu$ l der PAGERuler™ Prestained Protein Ladder verwendet, die Fragmentgrößen sind jeweils links vom Gel angegeben (das 15 kDa zugeordnete Fragment teilt sich beim verwendeten Geltyp in zwei Fragmente auf, der Marker ist also für die Verwendung in SDS-Tricin Gelen nicht geeignet).

#### 6.1.4 Fluoreszenz-Oligonukleotidtest

Dieser Test wurde wie in 5.16 beschrieben verwendet, um die Funktionalität und Reinheit der Fraktionen von MazE und MazF zu überprüfen. Die Spaltung des Oligonukleotids, beispielsweise durch MazF, generiert ein Fluoreszenzsignal welches detektiert wird. Die Rate der Bildung des Fluoreszenzsignals steht daher in direktem Zusammenhang mit der Menge an aktivem Enzym.

Es wurde gereinigtes MazFstrep sowie MazEstrep getestet. Des Weiteren wurde eine Fraktion der MazEhis Reinigung getestet, um zu überprüfen, ob die enthaltenen Verunreinigungen Aktivität zeigten (Abbildung 14). Als Negativkontrolle diente Elutionspuffer, als Positivkontrolle eine DNaseLösung (nicht in der Abbildung gezeigt). Es wurden verschiedene Fraktionen zum Testansatz (Zusammensetzung siehe 5.16) zugegeben. Gereinigtes MazFstrep (Kreis) führte bei Zugabe zu einer starken Ausbildung von Fluoreszenz. Zugabe von gereinigtem MazEstrep (Raute) führte kaum zur Ausbildung von Fluoreszenz und verminderte bei Zugabe zu MazFstrep die Ausbildung von Fluoreszenz (Dreieck). Die Fraktion von MazEhis (Kreuz) führte bei Zugabe zu keiner Ausbildung von Fluoreszenz und konnte bei Zugabe zu MazFstrep die Ausbildung von Fluoreszenz ebenfalls vermindern (Quadrat), allerdings nicht so stark wie die MazEstrep Fraktion.

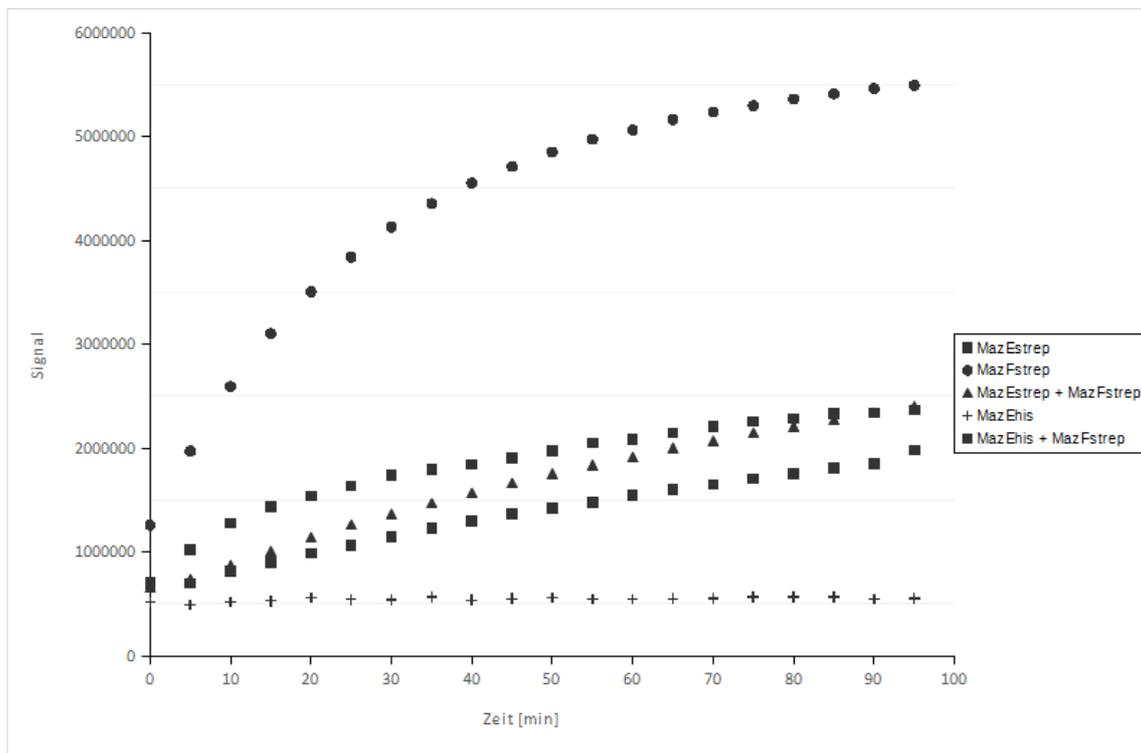


Abbildung 14: Fluoreszenz-Oligonukleotidtest.

Zu sehen ist die Ausbildung von Fluoreszenz verschiedener Ansätze über die Zeit. Jeder 30  $\mu$ l Ansatz enthielt je 6  $\mu$ l zu testende Fraktion und 5  $\mu$ l Oligonukleotid (1 nmol/ml). Getestet wurden Fraktionen von MazFstrep (Kreis), MazEhis (Kreuz), MazEstrep (Raute), MazFstrep und MazEhis (Quadrat) sowie MazFstrep und MazEstrep (Dreieck)

Sämtliche MazF enthaltenden Ansätze wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von EDF getestet. Zum Einen wurde EDF in der Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  eingesetzt, wie es bei Belitsky et al., (2011) verwendet wurde. Da kein Unterschied zu den Ansätzen ohne EDF beobachtet werden konnte, wurde zum Anderen noch eine weitaus höhere Konzentration (bis zu 1,5 mM) getestet, was jedoch auch keine Veränderung verglichen mit den Ansätzen ohne EDF bewirkte.

## 6.2 *in vivo* Testentwicklung

Dieses Testsystem sollte entwickelt werden, um Extrakte auf ihre Fähigkeit zu prüfen, die Bindung von MazE an MazF in lebenden Zellen aufzuheben und dadurch MazF zu aktivieren. Dieser Test stellt also die Situation in einem antibiotikaresistenten Pathogen nach, bei dem die Resistenz durch ein Resistenzplasmid mit stabilisierendem Toxin-Antitoxin System vermittelt wird.

Dazu wurden Stämme erstellt, welche zwei Plasmide enthielten. Ein Plasmid stellte das Resistenzplasmid nach und enthielt dementsprechend das Toxin-Antitoxin System MazEF, das zweite Plasmid diente zur Detektion einer Bildung von aktivem MazF durch eine Luciferase. Um eine Toxin-unabhängige Aktivität der getesteten Extrakte zu überprüfen, wurde ein Kontrollstamm erstellt. Dieser produziert nach Induktion die Luciferase, so dass eine allgemeine toxische Wirkung der Substanz durch fehlende Ausbildung eines Lumineszenzsignals nach Substratzugabe identifiziert werden konnte. Wie bereits erwähnt sollte auch hier EDF als Kontrollsubstanz für die Testentwicklung zum Einsatz kommen.

### 6.2.1 Plasmidgestaltung

Das Markerenzym-Plasmid pEXNNT7 (5.14.7.9) enthält eine Sequenz für eine Luciferase (NanoLuc von Promega, verändert), die so inkloniert ist, dass sie nicht im Leseraster für das erste Start-Codon nach dem Promotor ist. Es gibt allerdings noch ein zweites Start-Codon, welches vom ersten durch eine Sequenz mit ACA getrennt ist. Dieses zweite Start-Codon ist im korrekten Leseraster zum Luciferase-Gen. Die entsprechende mRNA enthält also zwei Leseraster, einmal für ein Nonsense-Protein mit dem ersten Start-Codon als Ausgangspunkt, und einmal für eine Luciferase mit dem zweiten Start-Codon als Startpunkt. Die Erwartung ist, dass aktives MazF diese mRNA an der ACA-Sequenz spaltet, und dadurch das Protein vom zweiten Start-Codon an synthetisiert wird, was zu einer aktiven Luciferase führt (siehe Abbildung 16). Das Gen steht unter einem IPTG-induzierbaren

T7/lacO Promoter. ACA-Sequenzen innerhalb des Luciferase-Gens mussten entfernt werden, da dies Schnittstellen für MazF sind. Außerdem mussten alle Stop-Codons für das alternative Leseraster innerhalb des Gens entfernt werden. Die veränderte Sequenz ist in Abbildung 15 im direkten Vergleich mit der Originalsequenz dargestellt.

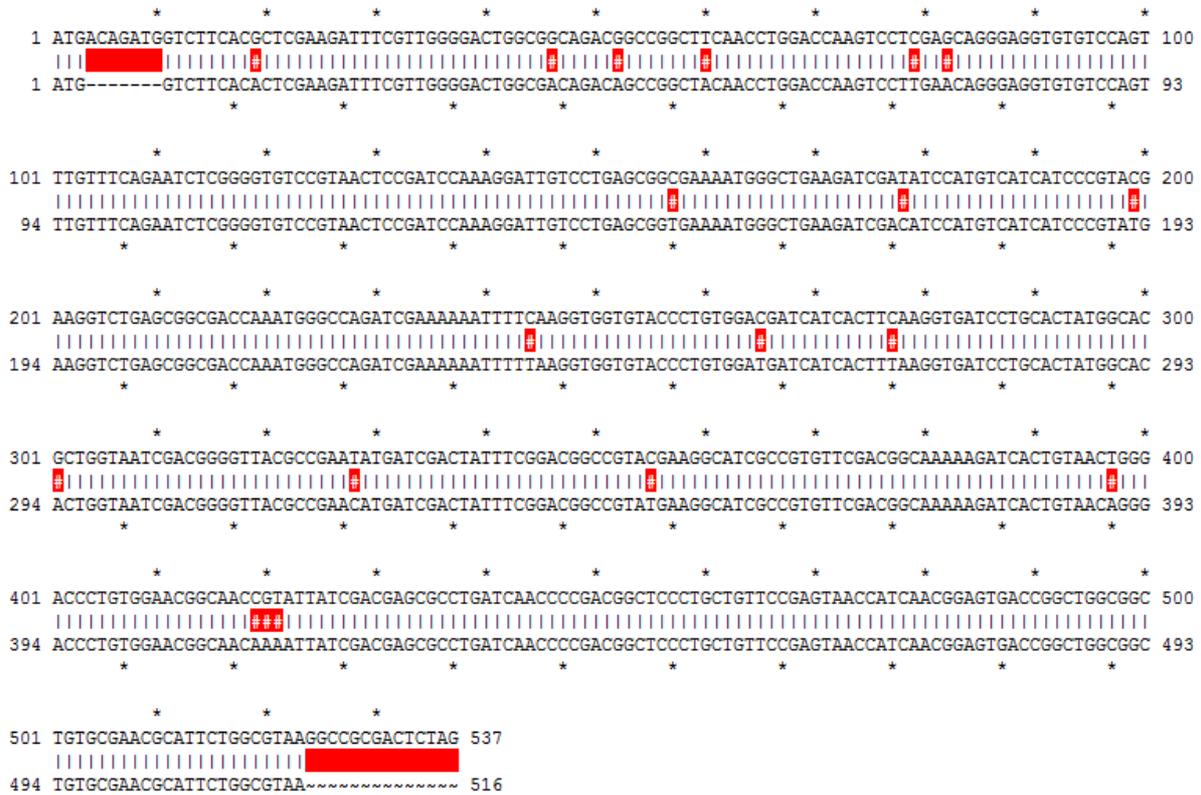


Abbildung 15: Vergleich der veränderten Sequenz der Luciferase (oben) mit der Originalsequenz (unten)

Ein vollständiger Beibehalt der Aminosäuresequenz war aufgrund der zahlreichen nötigen Änderungen nicht möglich. Durch die Änderung der Sequenz AAA an der Position 412 der Originalsequenz zu CGT wurde die Aminosäure Lysin zu Arginin ausgetauscht. Lysin ist eine polare, positiv geladene Aminosäure. Arginin weist ähnliche biochemische Eigenschaften auf und wurde daher als Substituent gewählt. Zur Kontrolle der Funktionalität wurde das so erstellte Gen für die Luciferase durch Deletion des ersten Start-Codons wieder in das korrekte Leseraster gebracht (5.14.7.10). Dieses Konstrukt diente im anschließenden Test als Kontrollstamm.

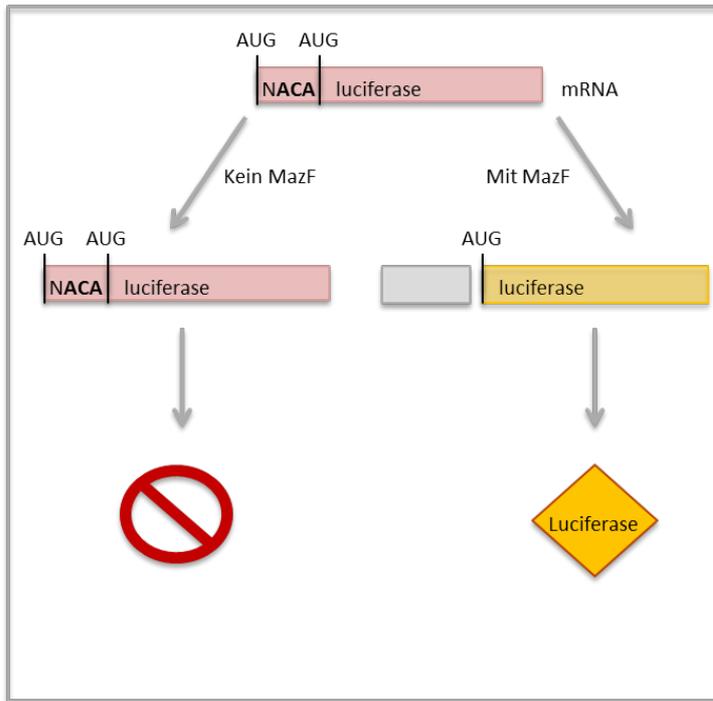


Abbildung 16: Schema Funktionsweise Markerenzym-Plasmid

Ein zweites Plasmid (5.14.7.6) enthält das Toxin-Antitoxin System MazEF unter einem Rhamnose induzierbaren rhaP Promoter (Plasmid zur Verfügung gestellt von J. Altenbuchner, Universität Stuttgart). Dieser Promoter ist besonders gut geeignet für die Expression toxischer Proteine, da er eine geringe Basalexpression zeigt. Außerdem kann so das Toxin-Antitoxin System unabhängig vom Markerenzym induziert werden.

Beide Plasmide wurden im Bereich der genannten Gene sequenziert, es wurden keine Mutationen festgestellt (siehe Anhang 10.1).

## 6.2.2 Transformation und Expressionstests

Die Plasmide wurden in BL21(DE3) sowie BL21(DE3)plysS eingebracht (5.14.5) und die Expression überprüft (5.15.1). Für das Toxin-Antitoxin System war die Überprüfung der Expression durch SDS-PAGE (5.15.5) mit anschließender Western Blot Analyse (5.15.6) möglich, da MazEF mit jeweils His- und Strep-Tag gekoppelt war. Für die Überprüfung der Expression des Markerenzym wurde die Probe mittels SDS-PAGE (5.15.5) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung ein Signal der entsprechenden Größe detektiert (nicht gezeigt).

### 6.2.3 Entwicklung der Methode

Die fertig entwickelte Methode ist unter 5.18 beschrieben. Hier wird beschrieben, wie das Protokoll entwickelt wurde. Für erste Tests wurde der Stamm BL21(DE3)plysS pEXIFNNT7 verwendet, später wurden auch wie unter 6.2.4 beschrieben mit weiteren Stämmen getestet.

Es musste zunächst ein geeignetes Medium gefunden werden, in welcher die Zellen während der Inkubationszeit nicht zu schnell abstarben und welche trotzdem geeignet für die anschließende Nachweisreaktion war. Zunächst wurden klassische Medien wie LB (M1) und Minimalmedium M9 (M14) getestet, das Problem war hier jedoch, dass die Nachweisreaktion nur zu schwachen Signalen führte. PBS (L1) war schließlich die beste Lösung, da hier eine ausreichende Ausbildung der Lumineszenz möglich war, bei gleichzeitiger Schonung der Zellen.

Der Test sollte für eine 384 Loch Platte entwickelt werden. Die Ansätze bestanden also nur aus einem geringen Flüssigkeitsvolumen. Damit die Kammern bei der Inkubation nicht austrockneten, wurden die Platten nach dem Ansetzen des Versuchs mit atmungsaktiver Folie abgeklebt und in einer Feuchtekammer inkubiert. Eine Inkubation bei 37° C verglichen zu einer Inkubation bei Raumtemperatur führte hier nicht zu unterschiedlichen Ergebnissen, weshalb die Inkubation folgend bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Aufgrund des geringen Ansatzvolumen war das Schütteln der Ansätze nicht nötig.

Als Substrat wurde NanoGlo (Promega) verwendet, welches speziell für die NanoLuciferase entwickelt wurde. Versuche mit Coelenterazin als Substrat waren erfolglos. Das Substrat (NanoGlo) konnte jedoch verdünnt eingesetzt werden. Für die Detektion mussten die Zellen aufgeschlossen werden, da das Substrat nicht membrangängig ist. Der mit dem NanoGlo gelieferte Lysispuffer stellte sich als ungeeignet heraus, vermutlich da er für eukaryontische Zellen entwickelt wurde. Stattdessen wurde der für Bakterien geeignete Lysispuffer B-Per verwendet, auf eine Zugabe von Lysozym konnte jedoch verzichtet werden. Bei der Zugabe musste darauf geachtet werden, dass keine signalverfälschenden Luftblasen entstanden, im Zweifelsfall wurde die Platte vor der Messung kurz zentrifugiert. Die Ausbildung der Lumineszenz erfolgte schnell, nahm aber mit der Zeit noch stark zu, weshalb die Platten immer über einen längeren Zeitraum (mindestens 20 min) gemessen wurden.

#### 6.2.4 Test auf Funktionalität

Die Funktionalität des Markerenzym mit korrektem Leseraster konnte durch die Verwendung des Stammes BL21(DE3) pEXIFNNT7K im Test (5.18) gezeigt werden. Es wurde eine starke Lumineszenz detektiert, wohingegen der Stamm mit dem Plasmid, welches für das Markerenzym ohne korrektes Leseraster codiert (BL21(DE3)pEXNNT7 pJeMmazEF) nach Induktion keine Lumineszenz ausbildete. Dieser sollte bei aktivem MazF ein Lumineszenzsignal ausbilden.

Als MazF aktivierende Substanz wurde EDF beschrieben (Belitsky et al., 2011). Es wurde außerdem postuliert, dass EDF als Quorum Sensing Factor dient, also ins Medium abgegeben wird und von anderen Zellen aufgenommen werden kann (Kolodkin-Gal et al., 2007). Ähnlich wie im *in vitro* Test (siehe 6.1.4) zeigte EDF im *in vivo* Test mit BL21(DE3)pEXNNT7 pJeMmazEF jedoch ebenfalls keinerlei Aktivität, die Zugabe von EDF in unterschiedlichen Konzentrationen zu Ansätzen von bis zu 17  $\mu\text{M}$  führte nicht zu einer Ausbildung von Lumineszenz, auch nicht bei Wechsel des Mediums auf LB (M1) oder M9 (M14). EDF wurde daraufhin auf seine Funktionalität überprüft. Dazu wurde wie in der Publikation von Kolodkin-Gal et al. (2007) beschrieben vorgegangen, die eingesetzte Menge an EDF betrug wie im Paper angegeben 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , der verwendete Stamm war BL21(DE3). Zur Auswertung wurden ebenfalls analog zum Paper Tropftests wie bei Amitai et al. (2009) und Erental et al. (2012) beschrieben nach der Miles und Misra Methode angesetzt. In keiner der drei durchgeführten Wiederholungen zeigte EDF eine Auswirkung auf die Anzahl der überlebenden Zellen. EDF wurde außerdem mit gereinigtem MazF und Maze getestet (siehe 6.1.4), auch hier zeigte es keinerlei Wirkung (da die Zugabe von EDF in keinem der Versuche eine Wirkung zeigte, sind die Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die Verwendung von EDF als Positivkontrolle nicht möglich war, wurde als Alternative zur Überprüfung des Testaufbaus das Plasmid pJeMmazF mit einem durch Rhamnose induzierbarem Gen für MazF entwickelt (5.14.7.7). Dieses wurde mit pEXNNT7 in *E. coli* BL21(DE3) transformiert (5.14.5). Tests mit diesem Stamm zeigten nach Induktion eine Ausbildung von Lumineszenz. Ansätze, in denen die Expression von MazF nicht induziert wurde, zeigten keine Ausbildung von Lumineszenz. Abbildung 17 zeigt die Signale für die beschriebenen verschiedenen Ansätze, in Tabelle 18 sind die verwendeten Stämme noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 18: Verwendete Stämme für den in vivo Test

Stamm	Funktionsweise	Verwendung
BL21(DE3) pEXIFNNT7K	Die Expression der funktionellen Luciferase kann durch Induktion mit IPTG induziert werden.	Kontrollstamm zur Untersuchung von Toxizität der Substanz unabhängig von MazEF
BL21(DE3) pEXNNT7 pJeMmazEF	Die Expression der out-of-frame Luciferase wird durch IPTG induziert, die Expression von MazEF durch Rhamnose	Ohne Induktion von MazEF dient dieser Stamm als Negativkontrolle. Bei Induktion von out-of-frame Luciferase sowie MazEF ist eine Untersuchung von Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf MazEF möglich
BL21(DE3) pEXNNT7 pJeMmazF	Die Expression der out-of-frame Luciferase wird durch IPTG induziert, die Expression von MazF durch Rhamnose	Dieser Stamm dient als Positivkontrolle, da eine Aktivierung von MazF durch EDF nicht möglich war. Durch die Induktion der Expression von MazF wird die Luciferase aktiviert, was bei Substratzugabe zu einer Ausbildung von Lumineszenz führt.

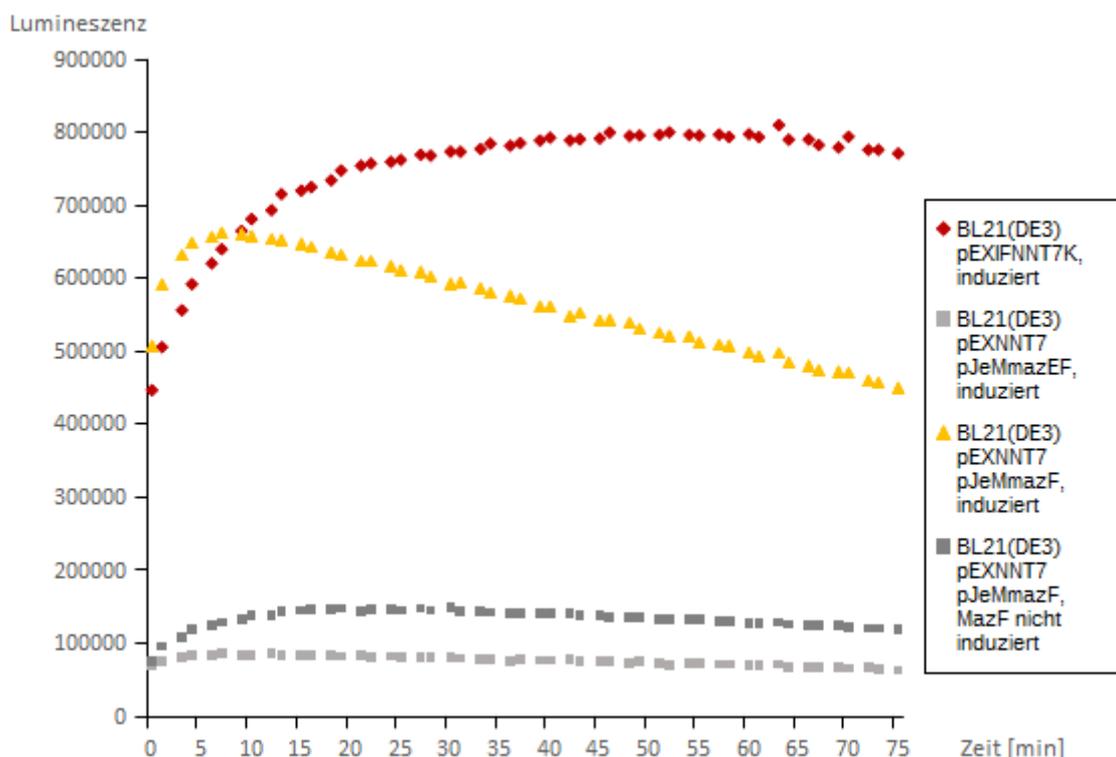


Abbildung 17: Test auf Funktionalität des in vivo Tests.

Gezeigt ist die Ausbildung der Lumineszenz über die Zeit für den induzierten Stamm BL21(DE3) pEXIFNNT7K (rote Raute), für den induzierten Stamm BL21(DE3) pEXNNT7 pJeMmazEF (hellgrauer Kasten), für den Stamm BL21(DE3) pEXNNT7 pJeMmazF bei MazF Induktion (gelbes Dreieck) sowie ohne MazF Induktion (dunkelgrauer Kasten).

### 6.2.5 Übertragung des *in vivo* Tests auf das System EndoA/EndoAI aus *Bacillus subtilis*

Der *in vivo* Test sollte auf das Toxin-Antitoxin System EndoA/EndoAI aus *Bacillus subtilis* übertragen werden. EndoA ist ebenfalls eine RNase, allerdings mit der Erkennungssequenz UACAU. Die Schnittstelle ACA des Luciferasegen tragenden Plasmids wurde entsprechend geändert (5.14.7.14). *E. coli* BL21(DE3) wurde mit den Plasmiden pEXNNT7bsub und pJeMendoAIA (5.14.7.13) transformiert (5.14.5) und die Anwesenheit der Plasmide durch einen Kontrollverdau überprüft (5.14.3). Parallel wurden die Gene *endoA* und *endoAI* zur Expression in pET-Vektoren integriert (5.14.7.11 und 5.14.7.12) und diese in BL21(DE3) transformiert (5.14.5). Die Transformation wurde auch hier mittels Kontrollverdau überprüft (5.14.3). Mit sämtlichen erstellten Stämmen wurden Testexpressionen durchgeführt (5.15.1), es konnte in keinem Fall eine Expression der Komponenten nachgewiesen werden. Eine Expression in *B. subtilis* selbst war nicht möglich, da die verwendeten Plasmide nicht für *B. subtilis* geeignet waren. Eine weitere Bearbeitung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

### 6.3 Screening von Extrakten mittels des *in vivo* Tests

Mit Hilfe des *in vivo* Testsystems wurden Extrakte aus der Extraktbibliothek des IBWF untersucht. Von Interesse waren dabei neben Extrakten, welche eine Ausbildung des Fluoreszenzsignals bei Ansätzen mit BL21(DE3) pEXNNT7 pJeMmazEF, also einer Aktivierung von MazF, bewirkten auch solche Extrakte, die eine Verminderung des Signals beim Kontrollstamm BL21(DE3) pEXIFNN bewirkten, da dies auf eine toxische Wirkung gegen *E. coli* hinwies. Es wurden insgesamt ca. 1300 Extrakte untersucht, davon wurden ca. 70 Extrakte erneut nachgeprüft. 24 dieser Extrakte wurden mittels HPLC in 96 Lochplatten getrennt (siehe 5.13.2) und in einem erneuten *in vivo* Test untersucht (siehe 5.18, Nachtest). Unter diesen Extrakten waren auch zwei, welche zu einer Aktivierung von MazF geführt hatten. Nach der Fraktionierung konnte die Aktivität dieser zwei Extrakte allerdings keiner einzelnen Fraktion mehr zugeordnet werden. Es konnten also keine wirkortspezifischen Aktivitäten im Rahmen der Arbeit verfolgt werden. 18 der fraktionierten Extrakte enthielten Substanzen, die keinem bekannten Naturstoff zugeordnet werden konnten und daher vielversprechend waren. Die Pilze, aus denen diese Extrakte gewonnen worden waren, wurden nachfermentiert und erneut extrahiert. In diesen neuen Extrakten konnte bei 8 die aktive Substanz erneut detektiert werden, so dass eine Nachfermentation im 20 l Maßstab durchgeführt wurde (siehe 6.4). Es wurden Extrakte von Pilzen aus verschiedenen Gruppen

untersucht: Basidiomyceten, Ascomyceten und Deuteromyceten. Der Verlauf des Testverfahrens ist schematisch in Abbildung 18 gezeigt.

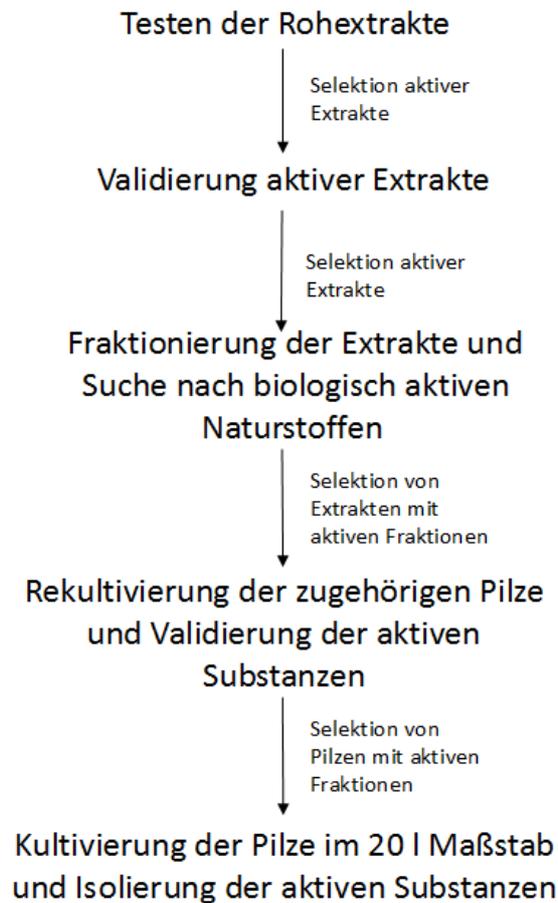


Abbildung 18: Schema Screeningablauf in vivo

#### 6.4 Fermentation von Pilzen mit Aktivität gegen *Escherichia coli*

Die in 6.3 identifizierten Pilze, deren Extrakte Aktivität gegen *E. coli* gezeigt hatten, wurden im 20 l Maßstab fermentiert (5.12.3). Von den 8 identifizierten und fermentierten Pilzen sind hier nicht alle aufgeführt (siehe Tabelle 19). Stamm IBWF 12107 zeigte kein ausreichendes Wachstum, auch in verschiedenen getesteten Medien nicht. Stamm IBWF 12004 und 12105 wurden von Saliha Erikci (Erikci, 2016) und David Heidler Edler von Heilborn (Heilborn, 2016) bearbeitet, beide produzierten die gewünschte Substanz im 20 l Maßstab nicht mehr. Die aktive Substanz von Stamm IBWF 399-08 stellte sich bei den ersten Schritten der Reinigung als das Mykotoxin Penicillinsäure heraus, die aktiven Substanzen (Isomergemisch) von *Penicillium* spp. IBWF 008-14 waren bereits durch Jan Rether (Rether, 2001) als Oxaspirodion (Struktur siehe Abbildung 19), allerdings in *Chaetomium subspirale*

beschrieben. Die Fermentation der Stämme IBWF 12066, IBWF 12013 und IBWF 15001 ist anschließend (6.4.1-6.4.3) beschrieben.

Tabelle 19: Im 20 l Maßstab fermentierte Stämme

Stammnummer	Fermentiert durch
IBWF 12004	Saliha Erikci (Erikci, 2016)
IBWF 12105	David Heidler Edler von Heilborn (Heilborn, 2016)
IBWF 399-08	Diese Arbeit (nicht gezeigt)
IBWF 008-14	Diese Arbeit (nicht gezeigt)
IBWF 12066	Diese Arbeit (siehe 6.4.1)
IBWF 12013	Diese Arbeit (siehe 6.4.2)
IBWF 15001	Diese Arbeit (siehe 6.4.3)

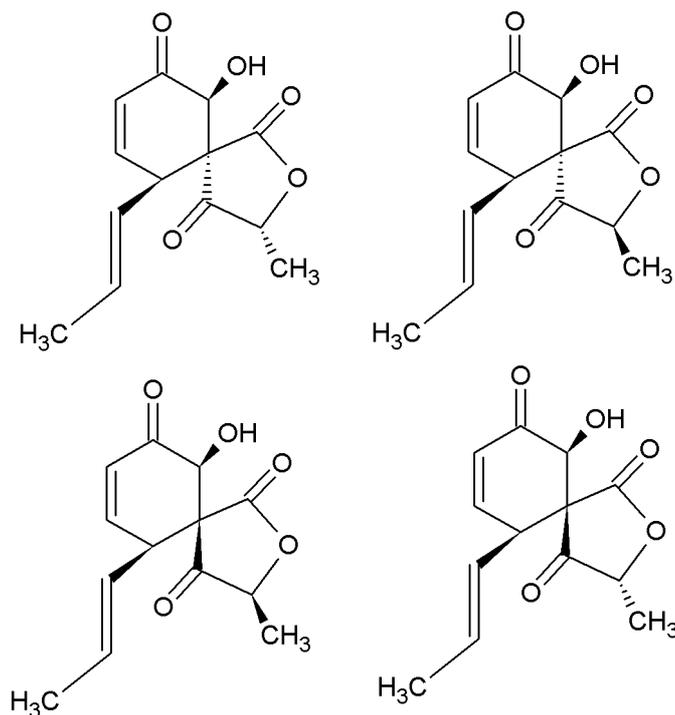


Abbildung 19: Die Strukturen der Stereoisomere von Oxaspirodion (Rether et al., (2004))

#### 6.4.1 *Hypholoma tuberosum* IBWF 12066

Das Rohextrakt dieses Pilzes fiel im Screening durch eine sehr starke Aktivität im *in vivo* Assay auf. Die Aktivität konnte durch die Fraktionierung einem einzeln stehenden Peak mit sehr eindeutigen UV-Spektrum zugeordnet werden. Eine ITS-Sequenzierung (10.2.1) und anschließender Vergleich mit der Datenbank GenBank ergab eine Übereinstimmung von 98 % mit 86 % der ITS-Sequenz von *Hypholoma tuberosum* (GenBank Accession Nr. FJ461624.1). Der Vergleich der ITS-Sequenz mit der Datenbank MycoBank führte nur zu Ergebnissen mit einer geringen Abdeckung der gesamten Sequenz. Die höchste Übereinstimmung ergab die Sequenz von *Pholiota polychroa* (CBS-Nr. 346.34) mit einer Ähnlichkeit von 97 % für 51 % der Gesamtsequenz.

##### 6.4.1.1 Fermentation

Es wurden Medientests durchgeführt und MM+KP (M13) als Medium mit der höchsten Ausbeute an CK 12066-1 identifiziert. Dabei fiel außerdem auf, dass die gesuchte Substanz nur in einem sehr kurzen Zeitfenster gebildet wurde. Daher wurde der Pilz in einem ersten 20 l Fermenter für einen längeren Zeitraum fermentiert, um die optimale Fermentationsdauer zu bestimmen. Ein zweiter Fermenter wurde unter gleichen Bedingungen angesetzt um daraus die Reinsubstanz CK 12066-1 zu gewinnen. Der Verlauf der Fermentation ist in Abbildung 20 gezeigt. Wie man erkennen kann, ist die Konzentration an CK 12066-1 an Tag 2 am höchsten, zur Gewinnung dieser Substanz wurde daher in der Folgefermentation für zwei Tage fermentiert.

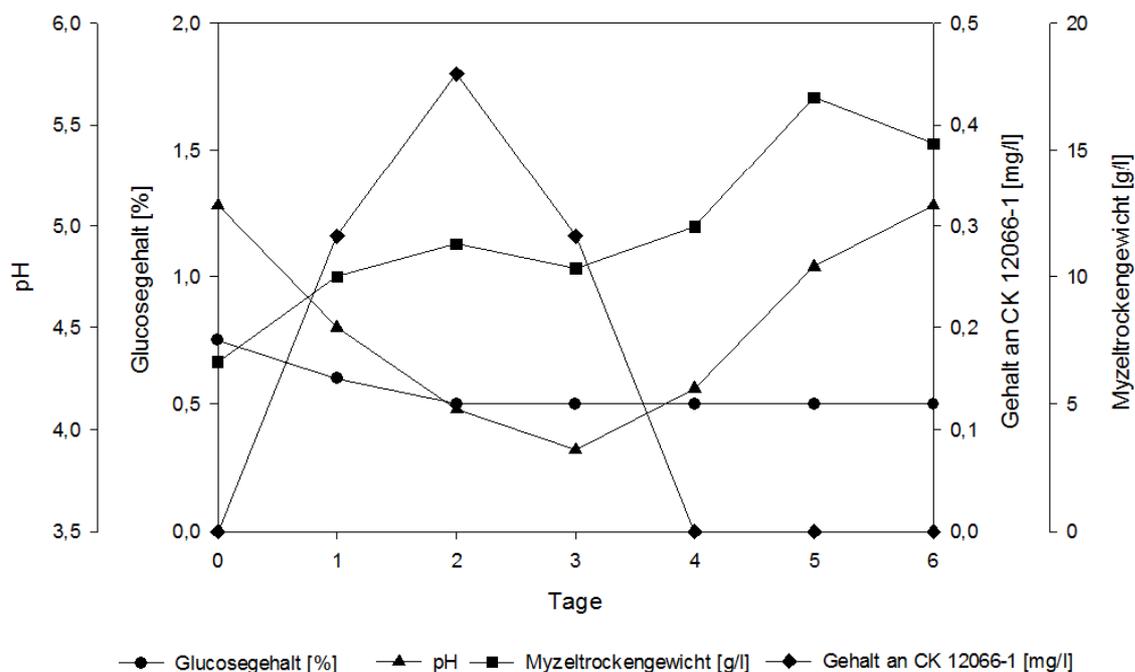


Abbildung 20: Fermentationsverlauf IBWF 12066 im 20 l Maßstab in MM+KP (M13) (Daten übernommen von Jan Schulte)

#### 6.4.1.2 Isolierung von CK 12066-1

Nach Beenden der Fermentation (zur Bestimmung der Fermentationsdauer siehe 6.4.1.1) von 12066 wurde das Kulturfiltrat durch Filtration vom Myzel getrennt und mit Ethylacetat extrahiert (siehe 5.13.1). Durch Vorreinigung an Chromabond-Kartuschen und anschließender präparativen HPLC (5.13.4) wurden 1,6 mg CK 12066-1 aus 20 l Kultur gewonnen. Das Aufarbeitungsschema ist in Abbildung 21 dargestellt. Das Rohextrakt zeigte im *in vivo* Test eine starke Aktivität (Lumineszenz von etwa 20000 Einheiten verglichen zur Kontrolle mit etwa 750000 Einheiten, siehe Abbildung 29)

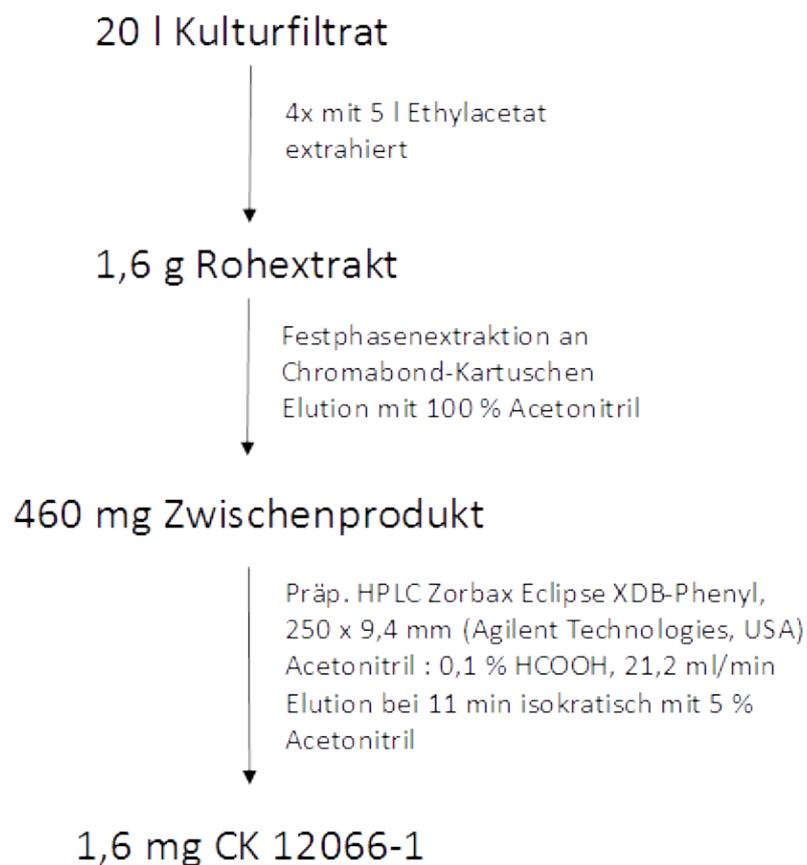


Abbildung 21: Aufarbeitungsschema CK 12066-1

#### 6.4.1.3 Physikalisch chemische und biologische Charakterisierung

Bei CK 12066-1 handelt es sich um (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid (Struktur siehe Abbildung 22, Strukturaufklärung durch Prof. Laatsch, Göttingen). Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 152,15 und die Summenformel lautet  $C_8H_8O_3$  (Masse und UV-Spektrum siehe Anhang, Abbildung 35). Die Substanz löst sich mäßig in Acetonitril und mit mindestens 5 mg/ml in DMSO. CK 12066-1 ist ein brauner amorpher Feststoff und zeigte als Reinsubstanz eine starke biologische Aktivität gegen die meisten getesteten Organismen beziehungsweise Zellen, außer *B. cinerea* und HelaS3 (siehe Anhang 10.3). Die Substanz ist

vermutlich flüchtig, weshalb bei der Einengung die Temperatur möglichst niedrig gewählt wurde.

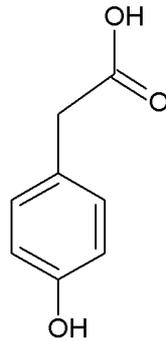


Abbildung 22: (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid (CK 12066-1)

#### 6.4.2 *Psathyrella conopilus* (IBWF 12013)

Das Rohextrakt dieses Pilzes zeigte im *in vivo* Test (5.18) eine starke Aktivität in einer Fraktion mit nur einem ausgeprägten UV-Spektrum bei 10,7 min. Eine ITS-Sequenzierung (siehe 10.2.2) und anschließender Vergleich mit der Datenbank GenBank ergab eine Übereinstimmung von 99 % mit 96 % der ITS-Sequenz von *Parasola conopilus* CBS 325.39 (GenBank Accession Nr. FJ770396.1, Synonym für *Psathyrella conopilus*). Der Vergleich mit der Datenbank MycoBank ergab ebenfalls eine Übereinstimmung von 99 % mit 96 % der ITS-Sequenz von *Parasola conopilus* CBS 325.39.

##### 6.4.2.1 Fermentation

Der Pilz IBWF 12013 wurde im 20 l Maßstab in HA-Medium (M3) fermentiert. Der pH-Wert war am ersten Tag der Fermentation bei 6 und blieb bis zum Ende der Fermentation auf diesem Niveau. Der Glukosegehalt war bis zum 3. Tag konstant, nahm bis zum 7. Tag auf 0,1 % ab und blieb dann auf diesem Niveau. Die gemessene Masse an Feststoffen nahm bis zum 8. Tag auf etwa 3,3 g/l zu, sank bis zum 11. Tag auf ca. 2 g/l, um am 12. Tag wieder auf 3,2 g/l zuzunehmen. Am 13. Tag hatte die gemessene Masse an Feststoffen wieder auf ca. 3 g/l abgenommen. Die Schwankungen sind mit der Struktur des des Myzels zu erklären, da bei kleineren Stücken mehr Feststoffe durch den Probenschlauch gelangen können (siehe auch 7.4.2). Proben der 20 l Fermentation zeigten in der HPLC-Analyse (5.13.2) ein anderes UV-Spektrum im Bereich der zuvor gemessenen Aktivität als Proben der 500 ml Kultur. Neben dem zuvor identifizierten Spektrum der aktiven Substanz eluierten in der HPLC-Messung hier weitere Substanzen mit unterschiedlichen UV-Spektren zur gleichen Zeit. Der Verlauf der Fermentation ist in Abbildung 23 gezeigt. Die Substanz CK 12013-1 wurde ab

dem 5. Tag nachgewiesen, der Gehalt nahm bis zum 12. Tag der Fermentation zu, um dann bis zum 13. Tag wieder abzunehmen. Um weitere Verluste an CK 12013-1 zu vermeiden, wurde die Fermentation beendet.

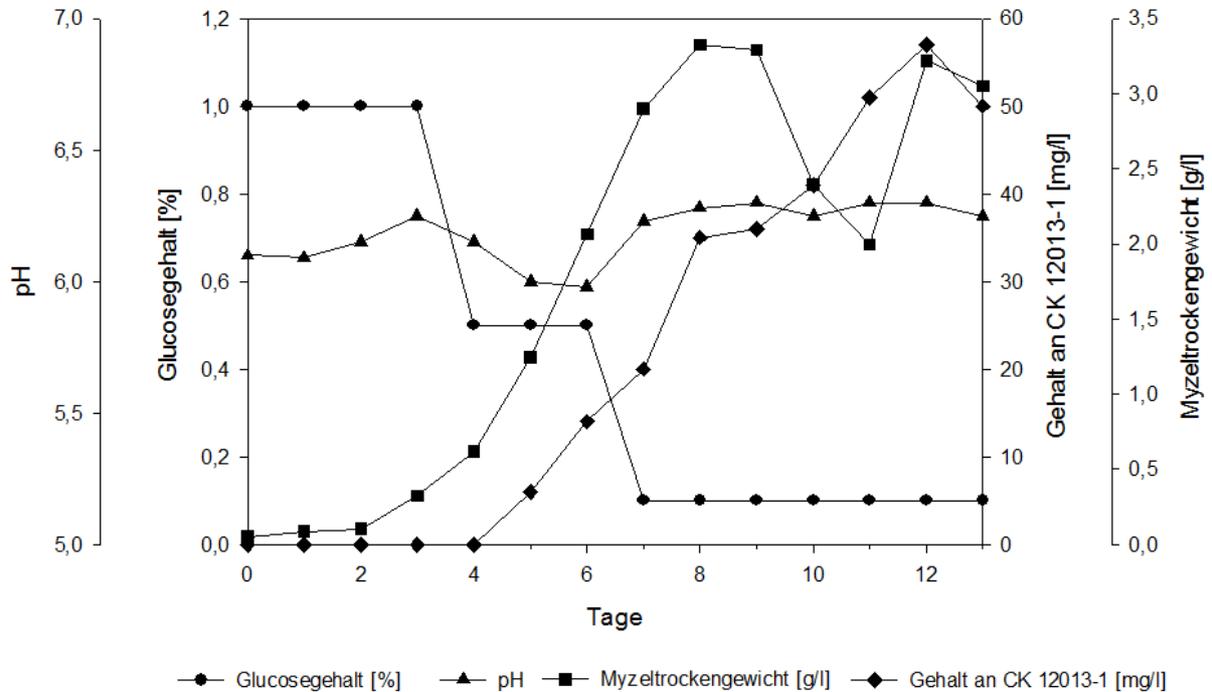


Abbildung 23: Fermentationsverlauf IBWF 12013 im 20 l Maßstab in HA-Medium (M3)

#### 6.4.2.2 Isolierung von CK 12013-1

Nach Beenden der Fermentation von IBWF 12013 wurde das Kulturfiltrat durch Filtration vom Myzel getrennt und mit Ethylacetat extrahiert (siehe 5.13.1). Im Rohextrakt waren, wie bereits bei den Tagesproben beobachtet, bei der HPLC-Analyse (5.13.2) für die Elutionszeit der Zielsubstanz mehrere UV-Spektren vorhanden. Durch Vorreinigung durch Festphasenextraktion an einer Chromabond-Kartusche und anschließender präparativen HPLC (5.13.4) wurden 8 mg CK 12013-1 aus 15 l Kultur gewonnen, wobei in weiteren unreinen Fraktionen die restlichen Substanzen mit der ursprünglich gleichen Retentionszeit der Zielsubstanz verblieben. Diese wurden nicht weiter gereinigt, da sie keine biologische Aktivität mehr zeigten. Die Aufreinigung ist in Abbildung 24 dargestellt. Das Rohextrakt zeigte im *in vivo* Test eine starke Aktivität (Lumineszenz von etwa 2000 Einheiten verglichen zur Kontrolle mit etwa 750000 Einheiten, siehe Abbildung 29)

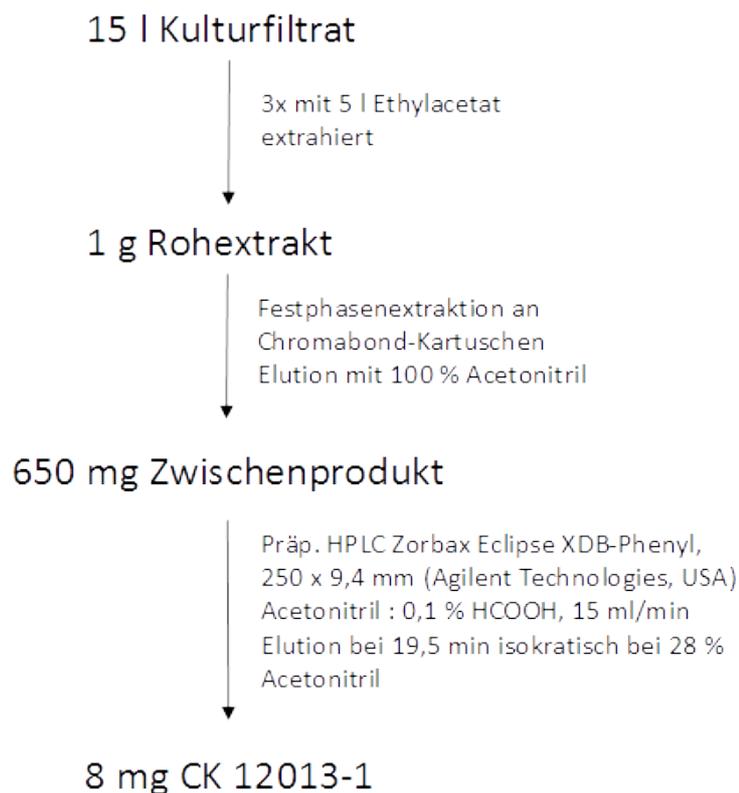


Abbildung 24: Reinigungsschema CK 12013-1

#### 6.4.2.3 Physikalisch chemische und biologische Charakterisierung

Bei CK 12013-1 handelt es sich um einen neuen Naturstoff mit dem IUPAC-Namen 11-Hydroxy-tridec-5-ene-7,9,12-triynoic acid in zwei Formen (Struktur siehe Abbildung 25, Strukturaufklärung durch Prof. Bode, Frankfurt). Die Substanz hat ein Molekulargewicht von 216 und die Summenformel lautet  $C_{13}H_{12}O_3$  (Masse und UV-Spektrum siehe Anhang, Abbildung 36). Die Substanz löst sich nur mäßig in Methanol, weshalb sie für Versuche in DMSO gelöst wurde. Sie ist ein brauner amorpher Feststoff. Im *in vivo* Test sowie gegen *E. coli* zeigte sie keine Aktivität mehr. Nahezu die gesamte Menge der Substanz wurde zur Strukturaufklärung verwendet, eine Nachisolierung wurde daher durchgeführt, um die Substanz weiter biologisch zu charakterisieren. In der biologischen Charakterisierung zeigte CK 12013-1 ausschließlich gegen HeLaS3 Zellen mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  Aktivität.

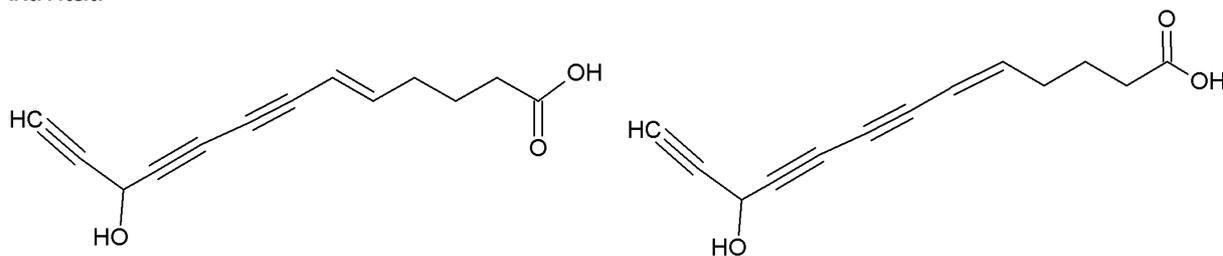


Abbildung 25: Struktur von CK 12013-1, Form A und B

### 6.4.3 *Wallemia muriae* (IBWF 15001)

Der Pilz IBWF 15001 wurde aus infiziertem Malzextrakt isoliert. Auf zunächst verwendetem HMG-Medium (M4) zeigte er kaum Wachstum, Medientests zeigten, dass hohe osmotische Bedingungen für ein gutes Wachstum nötig waren. Auf MYA30G Medium (M5) wuchs er als braun-pulvriges Myzel. Eine ITS Sequenzierung (siehe 10.2.3) und zusätzliche Sequenzierung des ribosomalen Bindeproteins (RBP, siehe 10.2.4) ergab eine 100 % Übereinstimmung von 95 % der ITS- beziehungsweise RBP-Sequenz von *Wallemia muriae* CBS 136844, einem urtümlichen Basidiomycet, welcher mit den anderen Wallemiales eine Gruppe sehr xerotoleranter Pilze bildet. Rohextrakte von Kulturen in HMG-Medium zeigten Aktivität im *in vivo* Test für den Stamm BL21(DE3) pEXIFNNT7K (5.18), weshalb eine Fermentation durchgeführt wurde.

#### 6.4.3.1 Fermentation

Eine Fermentation im 20 l-Maßstab in HMG-Medium (M4) führte nicht zur Produktion von CK 15001-1, weshalb im Anschluss 5 l-Kolben mit je 2,5 l Medium verwendet wurden. Hier zeigte sich, dass die Substanz nur bei Verwendung von Kolben mit 4 Schikanen, nicht aber bei nur einer Schikane, gebildet wurde. Insgesamt wurde im Maßstab 3 x 2,5 l fermentiert, die Kolben wurden mit je 100 ml der selben Vorkultur angeimpft. Der Verlauf der Fermentation ist in Abbildung 26 gezeigt.

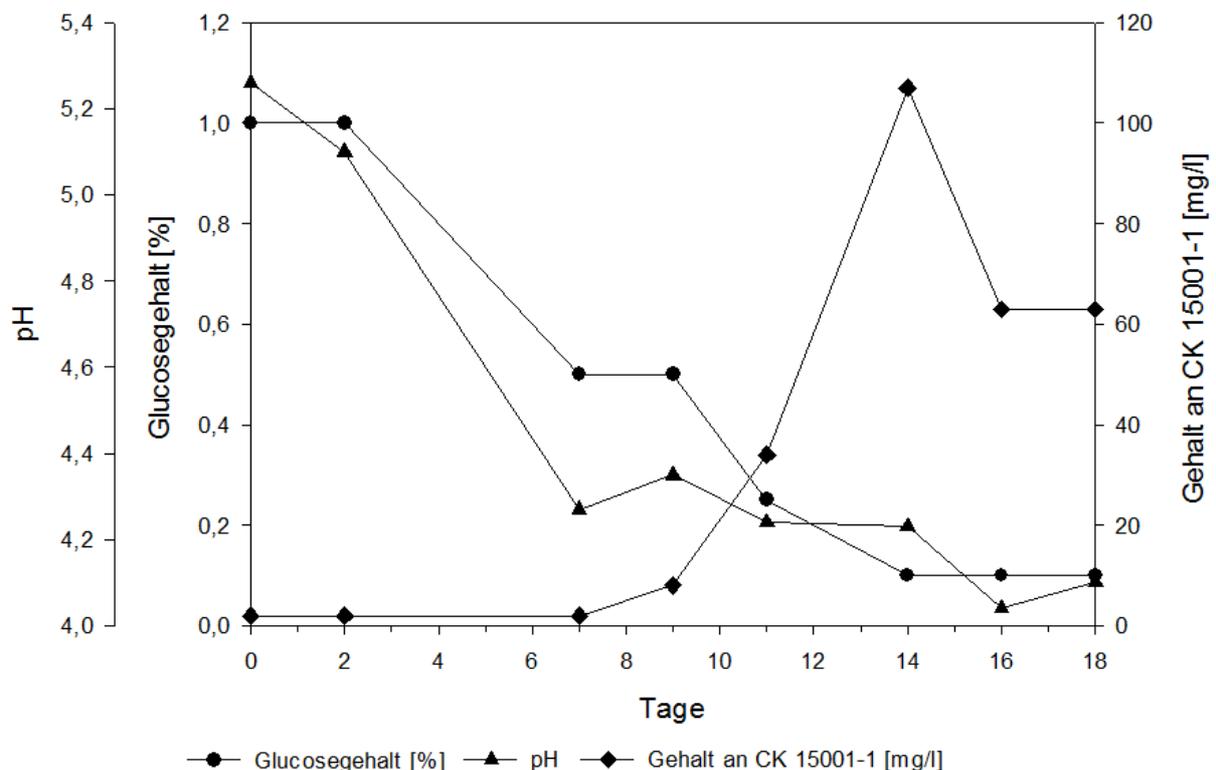


Abbildung 26: Fermentation *Wallemia muriae* IBWF 15001 im 7,5 l Maßstab in HMG-Medium (M4)

Der pH Wert sank innerhalb der ersten 7 Tage von 5,3 auf 4,3 und blieb bis zum Ende der Fermentation auf diesem Niveau. Der Glukosegehalt nahm bis zum 14. Tag auf 0,1 % ab und blieb dann auf diesem Niveau. Da die Proben per Pipette aus dem Kolben entnommen wurden, war eine repräsentative Entnahme des Myzels nicht möglich, es war allerdings zu beobachten, dass der Myzelgehalt über die gesamte Fermentationsdauer sehr gering blieb. Die Substanz CK 15001-1 wurde ab dem 7. Tag nachgewiesen, der Gehalt nahm bis zum 14. Tag der Fermentation zu, um dann bis zum 16. Tag wieder abzunehmen. Da bis zum 18. Tag keine Veränderung im Gehalt mehr festgestellt wurde, wurde die Fermentation beendet.

#### 6.4.3.2 Isolierung von CK 15001-1 und CK 15001-2

Nach Beenden der Fermentation von IBWF 15001 wurde das Kulturfiltrat durch Filtration vom Myzel getrennt und mit Ethylacetat extrahiert (siehe 5.13.1). Aus dem Rohextrakt wurden durch LPLC und präparative HPLC (5.13.4) 188 mg CK 15001-1 und 31 mg CK 15001-2 aus 7,5 l Kultur gewonnen, wobei in weiteren Fraktionen noch ungereinigte Substanz CK 15001-1 verblieb. Das Schema der Aufreinigung ist in Abbildung 27 dargestellt. Das Rohextrakt zeigte im *in vivo* Test eine gute Aktivität (Lumineszenz von etwa 250000 Einheiten verglichen zur Kontrolle mit etwa 750000 Einheiten, siehe Abbildung 29)

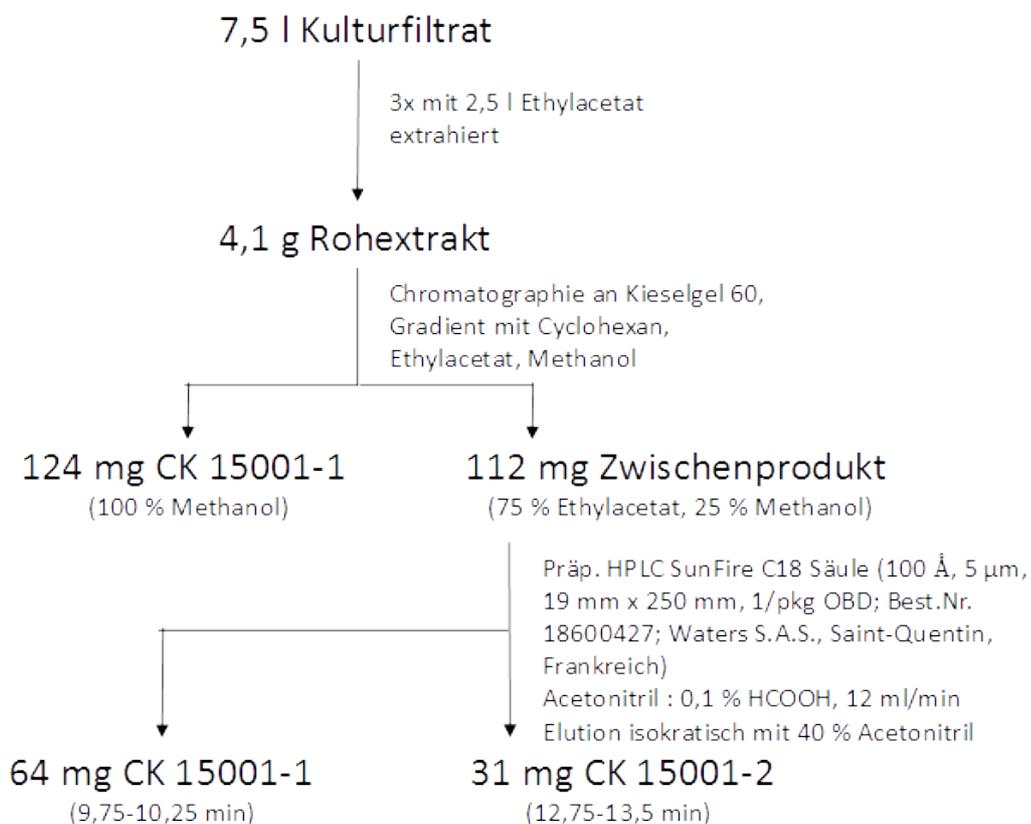


Abbildung 27: Aufarbeitungsschema von CK 15001-1 und CK 15001-2 aus Kulturfiltrat einer Fermentation von *Walleimia muriae* IBWF 15001

### 6.4.3.3 Physikalisch-chemische und biologische Charakterisierung

Bei CK 15001-1 handelt es sich um Atromentin (Struktur siehe Abbildung 28), ein in Basidiomyceten bekanntes Sekundärmetabolit. Atromentin hat ein Molekulargewicht von 324 und die Summenformel lautet  $C_{18}H_{12}O_6$  (Masse und UV-Spektrum siehe Anhang, Abbildung 37). Die Substanz löst sich nur mäßig in Methanol und kaum in Acetonitril, weshalb sie für Versuche in DMSO gelöst wurde. Atromentin ist ein braun-orangener amorpher Feststoff und zeigte als Reinsubstanz lediglich eine schwache biologische Aktivität gegen *E. coli* bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  (siehe Anhang 10.3).

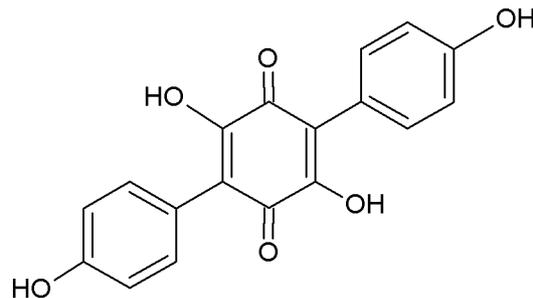


Abbildung 28: Strukturformel Atromentin

CK 15001-2 wurde zur Strukturaufklärung zu Prof. Bode, Frankfurt geschickt. Eine eindeutige Aufklärung war nicht möglich, es konnte aber gezeigt werden, dass es sich um ein Derivat von Atromentin handelt (Masse und UV-Spektrum siehe Anhang, Abbildung 38). Die Substanz löst sich sehr gut in Acetonitril und ist ein beiger amorpher Feststoff. Die Substanz zeigte bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  100 % Aktivität gegen HeLaS3 Zellen sowie eine sehr schwache Hemmung (8 %) von *E. coli* bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  (Anhang 10.3).

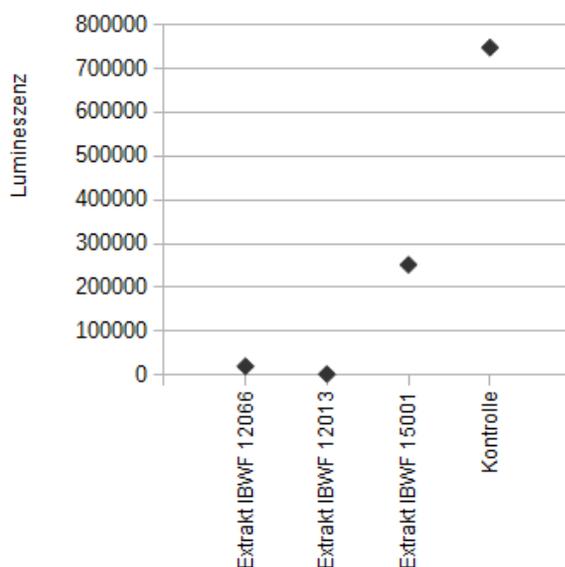


Abbildung 29: Aktivität der gewonnenen Rohextrakte im in vivo Test. Getestet wurde mittels des Stammes BL21(DE3) pEXIFNNT7K. Es wurden analog zu den ersten Tests 100  $\mu\text{g/ml}$  getestet. Die Kontrolle enthält DMSO statt Extrakt.

## 7 Diskussion

Antibiotikaresistenzen sind bekannt, seit es Antibiotika gibt (Fleming, 1964). Allerdings waren sie bis etwa 1990 nicht so stark verbreitet, dass Maßnahmen dagegen unternommen werden mussten. 1992 veröffentlichte H. Neu einen vielbeachteten Artikel in *Science*, in dem er auf die alarmierende Rate der Resistenzbildung hinwies und die Notwendigkeit der Anpassung der Antibiotikaverwendung unterstrich (Neu, 1992). Die folgenden Jahre waren geprägt von einem zunehmend verantwortungsvolleren Umgang mit Antibiotika, wie der Einschränkung in der Tiermast oder der Kategorisierung in Reserveantibiotika (Schmid, 2006). Diesen Bemühungen zum Trotz wurden jedoch vor allem auch multiresistente Erreger deutlich häufiger detektiert, mit teilweise alarmierenden Raten (WHO, 2014). Die Problematik der Bekämpfung von multiresistenten Erregern ist daher stärker in den Fokus geraten. Eine Möglichkeit wäre, sich die plasmidstabilisierenden Systeme der Antibiotikaresistenzplasmide zum Nutzen zu machen (DeNap & Hergenrother, 2005). Hierbei handelt es sich unter anderem um Toxin-Antitoxin Systeme, wie zum Beispiel dem System MazEF (Engelberg-Kulka, 2009). Dieses ist eines der ersten entdeckten, sehr häufigen und am besten untersuchten Toxin-Antitoxin Systeme (Gerdes, 2013). Substanzen mit Wirkung gegen dieses System könnten daher bei zahlreichen resistenten Erregern wirken. Die Gruppe um Kolodkin-Gal meldete 2007 die Entdeckung von EDF, einem Pentapeptid, welches zum einen die Aktivität von MazF verstärkt und zum anderen die Bindung von MazE an MazF verhindert (Kolodkin-Gal et al., 2007). Mit dieser Substanz als Kontrolle könnten Testsysteme entwickelt werden, welche ein schnelles Screening nach weiteren MazF aktivierenden Substanzen ermöglichen. Mit den entwickelten Testsystemen können Pilzextrakte des IBWF evaluiert werden. Zusätzlich werden mit dem Testsystem Substanzen mit Aktivität gegen das Wachstum oder die Proteinsynthese von *E. coli* identifiziert. Gegen diese gram-negativen Bakterien sind nur wenige Antibiotika wirksam und auch nur wenige neue Wirkstoffe in der Entwicklung (WHO, 2014).

## 7.1 Entwicklung des *in vitro* Tests

Das *in vitro* Testsystem ermöglicht den Nachweis von Substanzen, die die Bindung von MazE an MazF inhibieren und so das Auslöschung eines Fluoreszenzsignals bewirken. Da es sich um eine definierte Umgebung handelt, sind jegliche Veränderungen im Signal dem getesteten Extrakt zuzuschreiben, welches den einzigen variierenden Faktor darstellt. Außerdem sind die Angriffspunkte des getesteten Extraktes damit automatisch auf die im *in vitro* Testsystem verwendeten Komponenten beschränkt. Allerdings ist es allein mit diesem Testsystem nicht auszuschließen, dass als positiv identifizierte Extrakte Quencher, welche das Signal durch Absorption auslöschen, oder hochaktive Substanzen, welche die Proteine denaturieren und so eine Ausbildung der Fluoreszenz verhindern, enthalten. Diese falsch positiven Treffer werden durch den Einsatz des Counterscreens (das *in vivo* Testsystem) eliminiert, da hier nun die Verstärkung des Signals ein positives Ergebnis signalisiert. Ein Quencher würde also genauso wenig ein positives Ergebnis generieren wie eine Substanz, welche Proteine angreift. Der *in vitro* Test vermag des Weiteren aktive Substanzen zu identifizieren, welche die Zellmembran nicht passieren könnten. Diese Substanzen sind dennoch von Interesse, da sie als Leitstrukturen dienen können.

Für die Entwicklung des Tests wurde reines MazE und MazF benötigt. Die Komponenten mussten außerdem mit einem Tag versehen sein, um später die Beads binden zu können (siehe 6.1). Zunächst wurde versucht, die Komponenten nach einer Coexpression voneinander zu trennen (7.1.1), anschließend wurden die Komponenten jeweils einzeln exprimiert und gereinigt (7.1.2-7.1.3). Die gereinigten Komponenten wurden in einem Fluoreszenz-Oligonukleotidtest auf ihre Funktionalität überprüft (7.1.4).

### 7.1.1 Reinigung der Komponenten MazE und MazF nach Coexpression

Das Toxin-Antitoxin System MazEF besteht aus zwei Komponenten, dem Toxin MazF und dem Antitoxin MazE. Diese werden in *E. coli* natürlicherweise coexprimiert, so dass sie stets im Komplex vorliegen. MazE wird dadurch stabilisiert und die toxische Wirkung von MazF neutralisiert. Die Expression zur Reinigung der Komponenten sollte daher zunächst auch als Coexpression stattfinden. Allerdings stellte sich heraus, dass die Bindung zwischen den Komponenten enorm stabil war, was auch schon von anderen Gruppen beschrieben wurde (Wang & Hergenrother, 2007). In Folge dessen gelang eine vollständige Trennung und Reinigung der beiden Komponenten nicht. Um eine komplette Trennung zu erreichen, wurden Versuche mit Urea- beziehungsweise GnHCl-Gradienten durchgeführt (6.1.1). Die

erhaltenen Fraktionen waren reiner als Fraktionen aus Versuchen ohne Gradient, allerdings konnte in der Western Blot Analyse häufig noch die jeweils andere Komponente nachgewiesen werden. Die enorm hohen Konzentrationen an Urea bzw. GnHCl verkürzten außerdem die Lebensdauer von MazEhis. Durch die auftretenden Probleme wurde mit der Reinigung der Komponenten nach einer jeweiligen Einzelexpression begonnen. Die Coexpression wäre lediglich für eine Reinigung von MazF von Interesse, falls die Expression von einzelner MazF nicht erfolgreich wäre. Da aber MazF in großen Mengen nach einer getrennten Expression gereinigt werden konnte (siehe nächster Abschnitt), wurde die Coexpression nicht weiter verfolgt.

### 7.1.2 Reinigung von MazF

Es wurde davon ausgegangen, dass aufgrund der toxischen Wirkung von MazF nur eine geringe Rohmenge an Protein erreicht werden würde. Daher wurde MazF mit dem Strep-Tag versehen, welcher meistens eine effektivere Reinigung als der His-Tag ermöglicht. Die Transformation von *E. coli* mit dem erstellten Expressionsplasmid pETmazFstrep (5.14.7.3) führte zunächst ausschließlich zur Selektion von Kolonien, welche MazF nicht oder fehlerhaft exprimierten. Es wurde daher vermutet, dass alle korrekten Transformanten durch die toxische Wirkung des MazF kurz nach der Transformation abstarben. Dies wäre gegeben, wenn trotz der Verwendung von BL21(DE3) plysS, einem speziell für die Expression von toxischen Proteinen entwickeltem Stamm, eine geringe Basalexpression stattfand, welche ausreichend war, um die Zellen abzutöten. Das verwendete Plasmid pETmazFstrep stellt mazF unter die Kontrolle des T7/lacO Promotors. Das bedeutet, dass die Expression durch Lactose induziert wird. Komplettmedien wie LB können Spuren von Lactose enthalten, da die Komponente Trypton aus Milchprotein gewonnen wird. Diese könnten ausreichen, um eine geringe Basalexpression zu induzieren. Natürlicherweise ist das Lac-Operon so reguliert, dass es nur induziert wird, wenn zum einen Lactose vorhanden ist und zum anderen Glucose nicht vorhanden ist. Glucose verhindert also eine Induktion. Daher wurde bei weiteren Transformationsversuchen in sämtlichen Schritten etwas Glucose zugegeben, um eine Induktion durch Spuren von Lactose zu verhindern. Auf diese Weise konnte eine Transformante mit dem korrektem Plasmid selektiert werden. Für die Expression wurde keine Glucose mehr zugegeben, um eine Induktion der Expression von MazF zu ermöglichen.

Nach der Induktion war zu beobachten, dass die  $OD_{600}$  sich nur noch ein mal verdoppelte. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nach der Expression von MazF nicht mehr in der Lage sind, sich zu teilen, da die Biosynthese zum Erliegen kommt, und diente nebenbei auch als Indikator für eine erfolgreiche Expression. Mit diesem Stamm konnte MazF isoliert werden, allerdings nur in geringen Mengen. Das Problem liegt hierbei vermutlich in der Eigenschaft von MazF, sämtliche RNA mit ACA-Schnittstellen zu zerstören. Da die RNA, welche für MazF codiert, selbst auch ACA-Sequenzen enthält, wird diese ebenfalls von MazF angegriffen. Eine geringe Menge von MazF reicht dabei offensichtlich aus, um eine weitere Expression von MazF durch den kompletten Abbau der RNA zu unterbinden. Um den Abbau der eigenen RNA zu verhindern, wurde das Gen für MazF daher so verändert, dass es keine ACA-Sequenzen mehr enthielt (siehe Abbildung 11). Es wurde nach Möglichkeit darauf geachtet, Triplets zu verwenden, welche häufig in *E. coli* verwendet werden, um die Expressionsrate nicht zu verringern. Es war dabei möglich, die Basen so auszutauschen, dass die Aminosäuresequenz nicht verändert wurde (siehe Maloy et al., 1996). Da das Plasmid pET51b(+) zwischen der Sequenz für den Strep-Tag und der *Multiple-Cloning-Site* auch ACA-Sequenzen enthält, wurde der modifizierten *mazF*-Sequenz noch eine ACA-freie Sequenz für den Strep-Tag samt *Spacer* angehängt. Für den Fall des His-Tags müsste genauso vorgegangen werden, um alle ACA-Sequenzen zu eliminieren. Die Synthese wurde von Eurofins Scientific SE, Luxemburg durchgeführt und dauerte aufgrund der toxischen Wirkung von MazF mehrere Monate. Eine schnelle Änderung des verwendeten Tags war also nachträglich nicht möglich und erklärt, warum später die Tags zwischen MazF und MazE nicht gewechselt werden konnten. Transformanten, die dieses Plasmid enthielten, wurden ebenfalls stets auf glukosehaltigem Medium gehalten. Nach Induktion vermochten diese eine enorme Menge an MazFstrep zu synthetisieren. Dies kann damit erklärt werden, dass MazF nahezu alle RNA schneidet, allerdings nun nicht mehr seine eigene, da diese keine ACA-Sequenzen mehr enthält. Sämtliche noch vorhandenen Ressourcen zur Proteinexpression in der Zelle werden also für die Synthese von MazF verwendet. Da die  $OD_{600}$  sich analog zu den vorigen Versuchen nach der Induktion nur noch ein mal verdoppelte, wurde erst bei einer relativ hohen  $OD_{600}$  von etwa 1 induziert um auch ohne nachträgliches Zellwachstum eine möglichst große Menge an Produkt zu erhalten.

### 7.1.3 Reinigung von MazE

Da MazF mit dem Strep-Tag versehen worden war, musste MazE per His-Tag gereinigt werden, um am Ende für die weitere Entwicklung des *in vitro* Tests die Komponenten mit verschiedenen Tags zu haben. Die Reinigung mittels His-Tag kann erfahrungsgemäß aufwendiger werden als die Reinigung mittels Strep-Tag. Da für MazE kein toxischer Effekt erwartet wurde, wurde davon ausgegangen, dass eine hohe Ausgangsmenge an Protein erreicht werden würde, welche einen späteren Verlust während der Reinigung kompensieren könnte. Testexpressionen von BL21(DE3) pETmazEhis zeigten in der Western Blot Analyse der löslichen Fraktion nach dem Zellaufschluss auch ein wie erwartet starkes Signal für MazEhis. Da MazE ein sehr instabiles Protein ist, muss der Puffer für den Aufschluss und die Reinigung sehr genau auf das Protein angepasst werden, um die Verluste möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund wurde dem Puffer auch ein Protease-Inhibitor-Mix beigemischt, welcher die Verluste an MazEhis vor und während der Reinigung verringerte. Bei der Analyse der Fraktionen nach der Reinigung an der His-Trap-HP Säule konnte dennoch beobachtet werden, dass die Menge an MazEhis deutlich abgenommen hatte. Ein schnelles Vorgehen, also eine Reinigung in einem Schritt, wäre daher die beste Lösung, um die Verluste möglichst gering zu halten. Die Analyse der Fraktionen zeigte jedoch weiterhin, dass trotz Anwenden von verschiedenen Gradienten bei der Elution nie alle verunreinigenden Proteine entfernt werden konnten. Dies kann bei der Reinigung mittels His-Tag auftreten, da Proteine auch natürlicherweise eine histidinreiche Sequenz enthalten können, mit welcher sie in der Lage sind an die His-Trap-HP Säule zu binden, so dass eine vollständige Reinigung des Zielproteins nicht möglich ist. Deshalb ist es häufig nötig, einen zweiten Reinigungsschritt nach der Trennung an der His-Trap-HP Säule vorzunehmen.

Für einen zweiten Reinigungsschritt an der Anionenaustauschchromatographiesäule musste das Puffersystem gewechselt werden, was eine Dialyse nötig machte. Im Zuge dieser verringerte sich die Menge an MazEhis noch weiter, und nach dem zweiten Reinigungsschritt war schließlich kaum noch MazEhis vorhanden. Vermutlich ist dieses andere Puffersystem in Verbindung mit der enorm verlängerten Reinigungszeit für die Stabilität von MazE nachteilig. Diese Methode zeigte sich also als für die Reinigung des instabilen MazEhis ungeeignet.

Die Versuche zu einem zweiten Reinigungsschritt, sowie die vorangegangenen Versuche zur Trennung der Komponenten nach einer Coexpression zeigten, dass MazEhis für eine Verlängerung des Reinigungsprozesses zu instabil war. Daher wurde versucht, die störenden Proteine durch Wahl des Expressionssystems zu entfernen, um damit die anschließende einfache Reinigung nur mittels der His-Trap-HP Säule möglich zu machen. Es standen dafür verschiedene Stämme zur Verfügung. Der *E. coli* Stamm BW25113 ist ein K-12 Stamm

(Baba et al., 2006), im Gegensatz zu BL21(DE3), welcher ein B Stamm ist (siehe 4.6). Daher ist es möglich, dass ein anderes Proteinspektrum gebildet wird. Dies könnte bedeuten, dass die in *E. coli* B gebildeten nicht zu beseitigenden Proteine in *E. coli* K-12 nicht synthetisiert werden, was wiederum eine Reinigung an der His-Säule ermöglichen könnte. Aus BW25113 wurde durch die Arbeitsgruppe von Baba et al. eine Stammsammlung von Insertionsmutanten geschaffen (Baba et al., 2006). Aus dieser Sammlung wurde der Stamm JW2753-1 verwendet, in welchem das Gen, welches MazF codiert, durch eine Insertion mit einer Kanamycin-Kassette inaktiviert wurde. Dies sollte bei einer Expression und anschließenden Reinigung von MazE eine Verunreinigung durch MazF ausschließen. Der Stamm wurde mit dem in BL21(DE3) bereits erfolgreich eingesetzten Plasmid pETmazEhis transformiert und eine Testexpression durchgeführt. In der folgenden Western Blot Analyse war nur ein schwaches Signal für MazEhis zu detektieren. Es wurden daraufhin in einer Testexpression mehrere Proben über die Zeit genommen, um zu überprüfen, ob dieser Stamm eine andere optimale Expressionszeit hat. In keiner der Proben konnte ein starkes Signal für MazEhis detektiert werden. Da der Stamm *E. coli* BW25113, welcher JW2753-1 zu Grunde liegt, im Gegensatz zu BL21(DE3) nicht für die Überexpression von Proteinen optimiert ist, ist es möglich, dass das gebildete MazEhis in hohem Maße nach der Expression wieder abgebaut wird. Im ebenfalls der Arbeit von Baba et al. entnommenen Stamm JW0427-1 ist das Gen, welches für die Protease ClpP codiert, durch die Insertion einer Kanamycin-Kassette inaktiviert. Diese Protease ist für den Abbau von MazE verantwortlich (Aizenman et al., 1996), eine Expression in der entsprechenden Insertionsmutante könnte also eine Stabilisierung von MazE bedeuten. Der Stamm JW0427-1 wurde daher in einem weiteren Experiment mit pETmazEhis transformiert. Western Blot Analysen von Testexpressionen mit diesem Stamm zeigten jedoch ebenfalls keine starken Signale für MazEhis. Anscheinend ist dieser Stamm grundsätzlich in der Lage, überschüssige Proteine effektiv abzubauen. Er ist daher für die Überexpression von MazEhis ungeeignet.

Es wurde nun der *S. cerevisiae* Expressionsstamm INVSc1 auf Eignung zur Expression von MazEhis getestet. Expressionen in *S. cerevisiae* führen generell zu einer geringeren Proteinmenge, was für den Zweck der Reinigung von MazEhis nachteilig ist. Allerdings sollte das Proteinspektrum in den Zellen deutlich von dem in *E. coli* abweichen, was möglicherweise eine Reinigung ausschließlich an der His-Säule ermöglicht. Western Blot Analysen von Testexpressionen in *S. cerevisiae* INVSc1 pYESmazEhis zeigten wie erwartet nur eine moderate Menge an MazEhis, welche bei der Expression im größeren Maßstab im Verhältnis noch weiter abnahm. Es wurde dennoch testweise eine Reinigung an der His-Säule durchgeführt. Bei der folgenden Western Blot und Coomassie Analyse waren neben dem Signal für MazEhis wieder Signale für verunreinigende Proteine zu sehen. Die

Expression in *S. cerevisiae* hatte also das Problem der verunreinigenden Proteine nicht behoben. Von der weiteren Verwendung von *S. cerevisiae* als Expressionssystem wurde daher abgesehen.

Da alle Versuche, MazEhis vollständig zu reinigen, nicht erfolgreich waren, wurde eine teilweise gereinigte Fraktion von MazEhis im Oligonukleotidtest (siehe 5.16) getestet, um zu prüfen, ob es funktionell vorlag und ob die Verunreinigungen den Oligonukleotidtest beeinflussten. Außerdem wurde MazE mit einem Strep-Tag versehen, um so vollständig reines MazE<sub>strep</sub> zu erhalten. Mit diesem reinen MazE<sub>strep</sub> konnte die Funktionalität des gereinigten MazE<sub>strep</sub> im Oligonukleotidtest nachgewiesen werden (siehe 7.1.4). Da allerdings nun MazE und MazF den gleichen Tag hatten, war eine weitere Entwicklung des *in vitro* Tests nicht sinnvoll. Eine Verwendung desselben Tags würde eine Inkubation der Einzelkomponenten vor der Zusammengabe erfordern. Dies wird zum einen vom Hersteller nicht empfohlen (siehe Handbuch „User's Guide to Alpha Assays Protein:Protein Interactions“, Perkin Elmer, USA), zum anderen ist die Gefahr der sterischen Behinderung durch die Beads bei der Zusammenlagerung von MazE und MazF besonders groß, da die Proteine sehr klein sind. Am vielversprechendsten wäre daher ein Wechsel des Tags, so dass MazF mit dem His-Tag versehen ist und MazE mit dem Strep-Tag, da gezeigt werden konnte, dass eine vollständige Reinigung von MazE<sub>strep</sub> möglich ist. Für MazE<sub>his</sub> sollte das Gen wieder so konstruiert werden, dass keine ACA-Schnittstellen vorhanden sind. Da bei der Expression dieses Konstrukts analog zur Expression von pETmazE<sub>strep</sub>ACA nahezu ausschließlich MazE<sub>his</sub> synthetisiert werden würde, ist zu erwarten, dass die Reinigung an der His-Säule durch die geringe Menge an verunreinigendem Protein in einem Schritt möglich wäre. Für den Fall, dass ein zweiter Reinigungsschritt nötig wird, ist MazF außerdem deutlich stabiler als MazE, so dass hier geringere Verluste erwartet werden.

#### 7.1.4 Fluoreszenz-Oligonukleotidtest

Um zu prüfen, ob die gereinigten Komponenten für die weitere Entwicklung des *in vitro* Tests geeignet waren, wurde der Oligonukleotidtest wie durch Wang & Hergenrother (2007) beschrieben durchgeführt (6.1.4). Dabei sollte zum Einen die Funktionalität der Komponenten bestätigt werden, also ob MazF das Oligonukleotid spalten kann, und MazE die Aktivität von MazF verringert. Zum Anderen konnte geprüft werden, ob Verunreinigungen vorhanden waren. Dies ist vor allem für die MazE Fraktionen von Interesse, denn diese sollten nicht in der Lage sein, ein Signal durch Spaltung des Oligonukleotids auszubilden. Die getesteten MazE<sub>strep</sub> Fraktionen waren funktionell. Die MazEhis Fraktionen zeigten

nicht nur in Western Blot und Coomassie-Analysen Verunreinigungen, sondern auch häufig im Oligonukleotidtest, was sich durch Ausbildung von Fluoreszenz bei Zugabe dieser Fraktionen äußerte. Diese Fraktionen waren aber in der Regel dennoch in der Lage, die Aktivität von MazFstrep etwas zu verringern, das enthaltene MazEhis könnte also funktionell vorliegen. Aufgrund der enthaltenen Verunreinigungen ist es allerdings auch möglich, dass diese die Aktivität von MazF beeinflussen. Fraktionen von MazEstrep induzierten keine Fluoreszenz und vermochten außerdem die Aktivität von MazFstrep zu verringern. Da außerdem keine Verunreinigungen in der Western Blot und Coomassie Analyse detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, das MazEstrep rein und funktionell vorliegt. Da die Konzentration an aktivem MazEhis durch die Verunreinigungen nicht bestimmt werden konnte, konnte für die beiden Komponenten nicht das optimale Verhältnis von 2:1 (MazF:MazE) eingestellt werden (Wang & Hergenrother, 2007). Unterschiede der getesteten MazE Fraktionen in der Fähigkeit MazF zu inhibieren können also auch durch ein nicht optimales Verhältnis der Komponenten zu Stande kommen und sagen nichts über die Qualität des enthaltenen MazEhis aus.

Für den *in vitro* Test sollte EDF als Kontrolle dienen. Dieses vermag laut Literatur die Bindung von MazE an MazF zu verhindern, sowie die Aktivität von MazF zu verstärken (Belitsky et al., 2011). EDF wurde von Bachem (Weil am Rhein) synthetisiert, als Pulver geliefert und vor den Versuchen nach Herstellerangaben solubilisiert. Es wurde wie von Belitsky et al. 2011 beschrieben eingesetzt, zeigte allerdings keine Aktivität, weder inhibierend bei Zugabe zu MazEstrep, noch aktivierend bei Zugabe zu MazFstrep. Diese Versuche wurden mit einer EDF-Konzentration bis zu 1,5 mM durchgeführt, es konnte keine Auswirkung auf MazEF detektiert werden. Das Testen von sehr hohen Konzentrationen schließt aus, dass im Lyophilisat große Mengen an inaktivem EDF enthalten waren. Um auszuschließen, dass beispielsweise durch Anbringen der Tags EDF nicht mehr an die Komponenten binden konnte, wurde der Test wie von Belitsky et al. 2011 beschrieben durchgeführt. Dabei werden Zellen mit EDF und/oder Antibiotika behandelt und anschließend die überlebenden Zellen nach der Miles&Misra Methode ausgezählt (Kolodkin-Gal et al., 2008). Auch in diesem Test zeigte EDF keinerlei Aktivität. Auch andere Gruppen berichteten bereits von Problemen (Williams & Hergenrother, 2012), die Wirkung von EDF zu reproduzieren. Die Arbeitsgruppe, die EDF erstmals beschrieben hat, begründet dies damit, dass EDF nicht bei allen Stämmen seine Wirkung zeigt (Erental et al., 2014). Es wäre also möglich, dass EDF auch nicht in BL21(DE3) wirkt. Allerdings sollte EDF in jedem Fall eine Wirkung im Oligonukleotidtest zeigen, da dieser unabhängig von einem Stammhintergrund ist, analog zu von der Arbeitsgruppe durchgeführten Tests *in vitro* (Belitsky et al., 2011).

## 7.2 Entwicklung des *in vivo* Tests

Der *in vivo* Test ermöglicht das Testen von Substanzen an lebenden Zellen. Durch die Expression funktioneller Luciferase kommt es nach Substratzugabe zu Lumineszenz. Das Versuchsdesign ist so konzipiert, dass die Expression funktioneller Luciferase durch aktives MazF initiiert wird. Da es sich um ganze Zellen handelt, werden mit diesem Test sämtliche MazF aktivierenden Substanzen detektiert, also nicht unbedingt nur solche, die direkt die Bindung von MazE an MazF verhindern. Um auszuschließen, dass das getestete Extrakt unspezifisch zu einer Verstärkung des Lumineszenzsignals führt, wird parallel mit einem Stamm getestet, welcher nach Induktion aktive Luciferase produziert. Falls das Extrakt das Signal unspezifisch verstärkt, wird in diesem Ansatz eine Signalverstärkung erwartet. Falls nicht, sollte hier keine Signalverstärkung eintreten, da MazF hier die Bildung der Luciferase und damit die Lumineszenz nicht beeinflussen kann. Substanzen, die die Ausbildung von Lumineszenz in beiden Ansätzen verhindern, deuten auf eine zytotoxische oder zumindest proteinsynthesehemmende Wirkung hin, da hier mit großer Wahrscheinlichkeit keine aktive Luciferase gebildet werden kann. Eine Quencherwirkung ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da es sich um Lumineszenz und damit um ein breites Wellenlängenspektrum handelt. Signal auslöschende Substanzen werden daher noch mit einem Zellwachstumstest nachgetestet, um die Hemmung der Luciferase auszuschließen und die toxische Wirkung zu bestätigen.

MazF spaltet nahezu alle RNA einer Zelle an internen ACA-Schnittstellen und verhindert dadurch die Expression der jeweils codierten Proteine (Zhang et al., 2003). Einige RNA-Sequenzen werden jedoch auch nur vor dem codierenden Teil geschnitten, was zu sogenannten *leaderless* RNA Sequenzen führt (Vesper et al., 2011). In Anlehnung daran wurde die Sequenz für das Markerenzym aus der Ausgangssequenz der NanoLuc Luciferase entwickelt. Sie besteht aus einem *nonsense* Leseraster, in welchem ein zweites Leseraster liegt, welches die Luciferase codiert. Aktives MazF schneidet die RNA, so dass sich das Leseraster vom *Nonsense* zum *Sense* ändert und die Luciferase synthetisiert wird (siehe Ergebnisse, Abbildung 16). Die Funktionalität dieses Konstrukts konnte durch Coexpression von induzierbarem MazF gezeigt werden (6.2.4). Um die Expression der Luciferase und damit die Lumineszenzbildung mit der Hemmung der Interaktion von MazEF zu verbinden, wurden die Zellen mit einem zweiten Plasmid transformiert, welches MazEF codiert. Bei Zugabe von Substanzen, welche die Interaktion des Toxin-Antitoxin Komplexes stören, wird durch das nun aktive MazF die RNA gespalten und das Leseraster für die Luciferase aktiviert. Da in dem Gen außerdem alle ACA-Schnittstellen entfernt wurden, wird diese RNA nicht weiter von MazF angegriffen, die Luciferase wird nun in hohem Maße exprimiert und nach Zugabe von Substrat kann Lumineszenz erfolgen. Um die Funktionalität dieses

Konstrukts zu zeigen, sollte EDF zu den Zellen zugegeben werden, welches die Bindung von MazE an MazF verhindern sollte (Belitsky et al., 2011). Das aktivierte MazF sollte wie beschrieben zu einer Generierung von Lumineszenz führen. Wie auch schon im *in vitro* Test zeigte EDF allerdings keine Wirkung. Da außer EDF keine weitere MazEF-Komplex hemmende Substanz bekannt ist, kann auf diese Weise nicht abschließend gezeigt werden, dass die Bildung von aktivem MazF nach Spaltung des Komplexes ausreicht, um ein detektierbares Signal zu verursachen. Da jedoch die direkte Expression von individuellem MazF ausreichte, um ein deutliches Signal zu generieren (siehe Abbildung 17) und ein getestetes Extrakt wiederholbar ein Signal zu generieren vermochte (siehe 7.3), wird dennoch von der grundsätzlichen Funktionalität des Konstrukts ausgegangen.

Der Test sollte mit einer möglichst langen Einwirkzeit durchgeführt werden, um sehr instabile Substanzen auszuschließen und um die Bildung einer ausreichenden Menge an Luciferase zu gewährleisten. Der Assaypuffer musste also so gewählt werden, dass die Zellen in diesem Zeitfenster nicht lysierten. Es wurden daher zunächst Standardmedien für *E. coli* getestet. Diese hatten das Problem, dass die Lumineszenz in der anschließenden Detektion stets sehr schwach ausfiel. Möglicherweise behindern Medienbestandteile die Lumineszenz. Laut Herstellerangaben für das NanoLuc Luciferase Assay System sind eine Reihe an Assaypuffern geeignet, darunter PBS (Promega, USA). Tests mit diesem Puffer zeigten eine hohe Lumineszenz, auch nach Inkubation über Nacht. Da den Ansätzen stets Rhamnose zur Expressionsinduktion des MazEF Systems zugegeben wurde, waren auch ausreichend Nährstoffe vorhanden, um die Zellen innerhalb der Testzeit nicht absterben zu lassen. Die Ansätze wurden zunächst in einer Feuchtekammer bei 37 °C geschüttelt. Es zeigte sich jedoch, dass eine Inkubation über Nacht ohne Schütteln bei 22 °C sogar eine etwas bessere Lumineszenz bewirkte. Das Schütteln dient dem Gasaustausch des Mediums. Da das Testvolumen während der Einwirkzeit lediglich 30 µl betrug, war das zusätzliche Schütteln offenbar nicht nötig, um eine ausreichende Belüftung zu erreichen. Die Inkubation bei niedrigeren Temperaturen verlangsamte zusätzlich den Zellstoffwechsel. Vermutlich sind die Zellen dadurch in der Lage, mit den vorhandenen Nährstoffen besser zu überleben, wodurch die Expression der Luciferase und damit die Lumineszenz verstärkt wird. Für die Detektion mussten die Zellen aufgeschlossen werden, da Versuche ohne Lysispuffer nur eine schwache Lumineszenz zeigten. Dieses schwache Signal kommt wahrscheinlich durch abgestorbene und lysierte Zellen zustande. Der mit dem Substrat gelieferte Lysepuffer zeigte sich als nicht für diesen Test geeignet. Da dieser Lysepuffer für Säugerzellen entwickelt wurde, vermag er vermutlich nicht oder nur schlecht die stabile Zellwand von *E. coli* zu lysieren. Stattdessen wurde der Lysispuffer B-Per verwendet, welcher offensichtlich die Lumineszenz nicht beeinträchtigte, da nach der Zugabe eine Lumineszenz beobachtet werden konnte. Die Zugabe von Lysozym erwies sich für die Ausbildung von Lumineszenz

dagegen als nicht notwendig, vermutlich da eine komplette Lyse der Zellen nicht nötig war, sondern vielmehr eine Perforierung der Zellen ausreichte, um das Substrat in die Zellen gelangen zu lassen. Das Signal nahm dabei in der Regel bis 20 min Einwirkzeit zu, um anschließend das gleiche Niveau zu halten und schließlich wieder langsam abzufallen. Dies ist zunächst mit der allmählichen Lyse der Zellen und der anschließend beginnenden Umsetzung des Substrats bis zur maximalen Enzymaktivität der enthaltenen Luciferase zu begründen und ist analog zur im Handbuch der Luciferase beschriebenen Lumineszenz.

MazEF liegt auch chromosomal vor, welches durch die getesteten Substanzen ebenfalls aktiviert werden könnte. Die Verwendung von ganzen Zellen detektiert daher auch automatisch eine Aktivierung von chromosomalem MazF. Dessen Funktion ist noch nicht abschließend geklärt, es scheint aber für die Persistenz wichtig zu sein (Tripathi et al., 2014). Die Aktivierung von chromosomalem MazF würde also zu einem Einstellen des Zellwachstums und einer Einschränkung des Stoffwechsels führen. Dies würde sich im *in vivo* Test wahrscheinlich jedoch nicht bemerkbar machen, da das plasmidiale MazF in weitaus größeren Mengen vorliegen sollte.

### 7.2.1 Übertragung des *in vivo* Tests auf das System EndoA/EndoAI aus *Bacillus subtilis*

Der *in vivo* Test sollte auf das System EndoA/EndoAI aus *B. subtilis* übertragen werden. Die Überlegung war hier, dass der entwickelte *in vivo* Test auch auf andere Toxin-Antitoxin Systeme mit RNasen als Toxin übertragbar sein sollte, wie zum Beispiel das hier verwendete System EndoA/EndoAI aus *Bacillus subtilis*. EndoA ist ebenfalls eine RNase, mit der Erkennungssequenz UACAU. Da diese Sequenz sehr ähnlich zu der von MazF ist, wird davon ausgegangen, dass die Funktionalität des Markerenzym-Plasmids noch gegeben wäre.

EndoA und EndoAI liegen im Genom ähnlich wie MazEF direkt nebeneinander, so dass beide Proteine gleichzeitig exprimiert werden. Die Plasmide mit EndoA, EndoAI beziehungsweise EndoA/EndoAI wurden daher analog zu den MazEF-Plasmiden hergestellt. Transformanten mit individuellem EndoA wurden ebenfalls stets auf Glucose gehalten, um eine Basalexpression des Toxins zu verhindern. Bei Testexpressionen konnte für keines der Konstrukte eine Expression nachgewiesen werden. Da es sich hierbei um eine heterologe Expression eines Proteins aus *B. subtilis* in *E. coli* handelt, ist es möglich, dass die Bedingungen für eine erfolgreiche Expression nicht gegeben sind. Dies kann das Zellmilieu sein, aber auch die verwendeten codierenden Basentriplets. Jeder Organismus bevorzugt unterschiedliche Codons für die einzelnen Aminosäuren (siehe Maloy et al., 1996 für *E. coli*),

was sich in der Menge an entsprechenden t-RNAs niederschlägt. Für die weniger verwendeten Codons liegen in der Zelle auch entsprechend nur wenige t-RNAs vor. Falls das heterolog exprimierte Gen viele dieser seltenen Codons enthält, wird die Expression in der Regel abgebrochen, da nicht ausreichend t-RNAs zur Verfügung stehen. Es ist bekannt, dass *B. subtilis* andere Codons als *E. coli* bevorzugt (Naotake, 1985, hier auch eine Tabelle zu den bevorzugten Codons in *B. subtilis*). Eine Codonoptimierung ist hier also höchstwahrscheinlich nötig um eine Expression nachweisen zu können, oder aber die Expression wird im Ursprungsorganismus durchgeführt. Um eine Codonoptimierung durchzuführen, hätte die modifizierte Sequenz ähnlich wie zur Bereinigung der ACA-Schnittstellen in MazF wieder synthetisiert werden müssen. Eine Expression in *B. subtilis* selbst war hier nicht möglich, da die verwendeten Plasmide nicht für *B. subtilis* geeignet waren. Für *B. subtilis* sind deutlich weniger Expressionsplasmide bekannt, insbesondere für toxische Proteine geeignete. Ein Wechsel der Plasmide wäre daher auch nicht ohne weitere Experimente möglich. Vor diesem Hintergrund wurde von einer weiteren Bearbeitung abgesehen. Mit Hilfe dieses Testes hätte die Extraktesammlung des IBWF auf aktive Substanzen gegen das Toxin-Antitoxin System EndoAIA aus *B. subtilis* getestet werden können. Damit hätte gezeigt werden können, dass das entwickelte Testsystem auch für andere Toxin-Antitoxin Systeme verwendbar ist, soweit das Toxin aus einer RNase besteht. Da dieser Typ der Toxin-Antitoxin Systeme zu den am weitesten verbreiteten gehören, könnte mit diesem Testsystem also ein großer Teil der für resistente Pathogene relevanten Toxin-Antitoxin Systeme getestet werden.

### 7.3 Screening mittels des *in vivo* Tests

Mit Hilfe des entwickelten *in vivo* Tests wurden Extrakte aus Pilzen des IBWF gescreent. Es wurden dabei nur wenige Extrakte identifiziert, welche eine Signalverstärkung beim Ansatz mit MazEF bewirkten. Möglicherweise ist der MazEF Komplex so stabil, dass er nur sehr schwer getrennt werden kann. Die Schwierigkeiten bei der Reinigung der Komponenten für den *in vitro* Test deuteten bereits darauf hin, welche auch von anderen Gruppen berichtet wurden (Williams, 2013). Ein Problem beim Screening war, dass die Aktivität häufig nur im Rohextrakt messbar war, und nach den ersten Reinigungsschritten verloren ging. Grund hierfür kann die Instabilität der aktiven Komponente sein, so dass diese bei der Reinigung zerstört wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Aktivität nicht nur durch eine Substanz, sondern durch mehrere verursacht wird und daher dementsprechend die Aktivität bei der Trennung der Substanzen verloren geht.

Es konnte für zahlreiche Extrakte eine Signalauslöschung beobachtet werden. Daher wurden nur Extrakte mit einer starken Signalverminderung weiter untersucht sowie solche, welche in der HPLC Analyse in den aktiven Fraktionen klar definierte Substanzen enthielten. Es ist nicht auszuschließen, dass aus den nicht weiter untersuchten Extrakten noch aktive Substanzen gewonnen werden können. In dieser Arbeit wurden vor allem Extrakte, welche aus imperfekten Pilzen sowie Basidiomyceten gewonnen worden waren, untersucht. Saliha Erikci (2016) untersuchte in einem anderen Test vor allem Extrakte aus Endophyten auf Aktivität gegen *E. coli*. In ihrer Arbeit ging die Aktivität ebenfalls bei der Reinigung häufig verloren. In der Arbeit von Payne et al. ist ein Screening zu pathogenen Bakterien beschrieben, hier wurde auch ein starker Verlust der anfänglichen Hits beobachtet (Payne et al., 2007). Der Verlust von zunächst aktiven Hits bei fortschreitenden Untersuchungen scheint also normal zu sein. Nachfermentationen der Pilze, deren Extrakt Aktivität gezeigt hatte, zeigten in der HPLC Analyse häufig eine andere Zusammensetzung an UV-Spektren. Dabei kam es auch vor, dass das zuvor enthaltene Spektrum, und damit die zugehörige Substanz, welche Aktivität gezeigt hatte, nicht mehr vorhanden war. Diese Substanzen konnten entsprechend nicht gereinigt werden, da sie nicht in größerem Maßstab produziert werden konnten. Das beschriebene Phänomen der veränderten Sekundärmetabolitbildung ist bei der Kultivierung von Pilzen unter Laborbedingungen häufig zu beobachten (Brakhage, 2012). Pilze bilden Metabolite zur Verteidigung häufig nur in Anwesenheit eines Antagonisten (Gloer, 1995). Beispielsweise bildet ein Pilz des Genus *Pestalotia* nur die Substanz Pestalone, wenn ein spezielles marines Bakterium (Stamm CNJ-328) anwesend ist (Cueto et al., 2001). Da die Pilze in der Stammsammlung für eine lange Zeit kultiviert werden, kann das gebildete Substanzspektrum bei Reinkultivierung also von dem der ersten Kultivierung zur Extraktgewinnung abweichen. Durch Reisolation aus der natürlichen Umgebung kann häufig das gesuchte Sekundärmetabolit wieder nachgewiesen werden, was für die hier untersuchten Stämme keine Option ist.

In dieser Arbeit wurden etwa 1300 Extrakte untersucht, wovon knapp 20 % deutliche Aktivität im *in vivo* Test zeigten. Von diesen Extrakten kamen 8 nach Nachtests und Fraktionierung in die engere Auswahl, die Fermentation und Aufarbeitung von dreien dieser Pilze ist in dieser Arbeit beschrieben.

## 7.4 Fermentation von Pilzen

Die Extrakte der hier beschriebenen Pilze hatten im *in vivo* Test eine starke Aktivität mit einer klar definierten Substanz gezeigt. Im Test waren noch zahlreiche weitere Extrakte mit starker Aktivität aufgefallen, jedoch waren hier häufig die Substanzen nicht klar zuzuordnen. Teilweise stellte sich bei der Nachfermentation auch heraus, dass der Pilz nur sehr schlecht wuchs und so keine ausreichende Menge an Vorkultur herangezogen werden konnte. Die hier beschriebenen Pilze zeichneten sich also zum einen durch eine gut definierte aktive Substanz sowie ein gutes Wachstum in der Nachfermentation aus. Aus den hier nicht bearbeiteten Pilzen könnten also durchaus noch aktive Substanzen isoliert werden, allerdings sollte sich die Aufarbeitung bei diesen dann schwieriger gestalten.

Die gewonnenen Substanzen wurden im Anschluss noch biologisch charakterisiert, um ihre Spezifität zu untersuchen.

### 7.4.1 *Hypholoma tuberosum* (IBWF 12066)

*Hypholoma tuberosum* ist ein Basidiomycet aus der Familie der *Strophariaceae*. Er wurde von Redhead und Kroeger erstmals 1987 in Kanada beschrieben (Redhead & Kroeger, 1987). Er wächst häufig auf Holzchips oder Mulch, als kleiner braun-orangener Pilz mit gelbem Stiel, grauen Lamellen und unterirdischen Sclerotien. Die Sporen sind 8-11 µm lang mit einer Keimungspore (Derboven & Fraiture, 2009).

Der Pilz wuchs im Fermenter sehr schnell, auch die Zielsubstanz wurde bereits ab dem zweiten Tag gebildet. Nach dem dritten Tag nahm die Menge an Zielsubstanz bereits wieder stark ab, möglicherweise hängt das mit dem schnellen Wachstum zusammen. Zur Isolierung wurde daher ein weiterer Fermenter angesetzt, um die Fermentation am Tag der höchsten Substanzproduktion beenden zu können. Das Rohextrakt dieser Fermentation zeigte eine starke Aktivität im *in vivo* Test, es wurde daher mit der Reinigung der Substanz fortgefahren.

CK 12066-1 wurde als (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid identifiziert (UV-Spektrum siehe Abbildung 35). Es handelt sich um einen bereits seit 1993 bekannten Naturstoff (Gorinstein et al., 1993). (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid zeigt eine starke Aktivität gegen fast alle getesteten Organismen und Zellen (10.3), außer gegen HeLa3 Zellen. Eine unspezifische Wirkung liegt daher nahe. Cueva et al. (2010) testeten eine Reihe phenolischer Säuren, darunter auch (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid, auf Aktivität gegen verschiedene Bakterien. Sie zeigten eine starke antibiotische Wirkung von (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid gegen *E. coli* Stämme lpxC/tolC (125 µg/ml) sowie eine geringe Aktivität gegen *Lactobacillus*

*paraplantarum* (500 µg/ml). Die Substanz zeigte in Tests von Davis et al. (2011) außerdem Aktivität gegen Anhydrasen aus verschiedenen Organismen, darunter *Mycobacterium tuberculosis* und *Candida albicans*. (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid kommt als Naturstoff in zahlreichen pflanzlichen Produkten vor, beispielsweise wurde sie als natürlicher Bestandteil von Olivenöl nachgewiesen (Papadopoulos & Boskou, 1991). Sie ist ein Zwischenprodukt in der chemischen Synthese von Atenolol (Mattioda & Christidis, 2000). Atenolol (Struktur siehe Abbildung 30) ist ein selektiver Betablocker, welcher zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt wird (Mangano et al., 1996). Da (p-Hydroxy-phenyl)-acetic acid nur in einem kurzen Zeitfenster in größeren Mengen vorhanden war, ist es möglich, dass sie auch in *H. tuberosum* nur ein Zwischenprodukt darstellt.

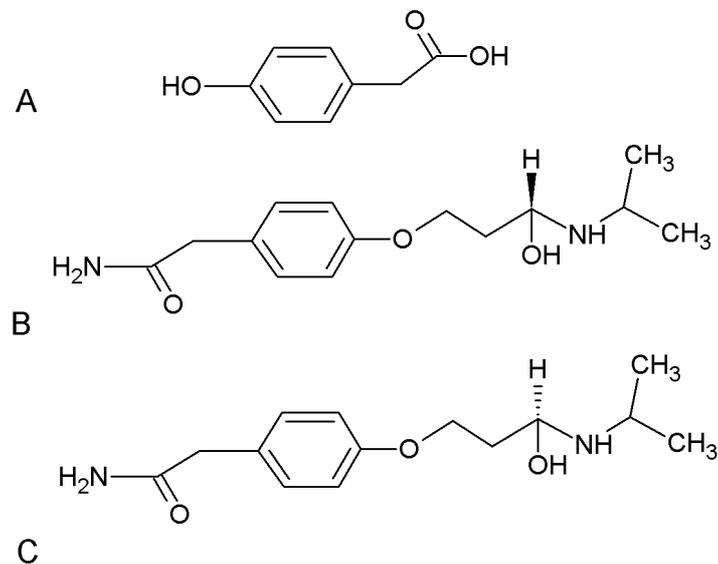


Abbildung 30: Strukturformel von CK 12066-1 (A), (R)-Atenolol (B) und (L)-Atenolol (C)

#### 7.4.2 *Psathyrella conopilus* (IBWF 12013)

*Psathyrella conopilus* ist ein Basidiomycet aus der Familie der Psathyrellaceae. Er wurde von Pearson und Dennis 1948 beschrieben (Pearson & Dennis, 1948) und wächst auf totem Holz mit einem dünnem bis zu 19 cm langem weißem Stiel und einer etwa 5 cm kleinen braunen Kappe. DNA-Untersuchungen des Genus *Psathyrella* durch Larsson & Örstadius (2008) und Padamsee et al. (2008) führten zu einer Neueinordnung von *Psathyrella conopilus* als *Parasola conopilus*. Die Untersuchungen deuten weiter darauf hin, dass der Ursprung dieses Genus *P. conopilus* ähnlich war. Die Gruppen sind sich allerdings uneinig, wo im Stammbaum der Pilz lokalisiert ist, was wiederum auch Nagy et al. (2009) anmerken.

*P. conopilus* bildete im 20 l Fermenter etwa ab dem vierten Tag verstärkt Myzel, wuchs dann stark bis zum achten Tag und erreichte hier ein Plateau. Zu diesem Zeitpunkt erreichte auch die Bildung der Zielsubstanz ein Plateau, zudem war der freie Glukosegehalt auf 0,1 % gesunken. Anschließend nahm die Myzelmenge bis zum elften Tag ab, die Menge der Zielsubstanz nahm aber wieder zu. Die Schwankungen in der Myzelmenge könnten durch das Verstopfen des Probeentnahmeschlauches zu Stande kommen, wodurch größere Myzelbrocken nicht mehr durch den Schlauch gelangen können. Der Wiederanstieg der gemessenen Myzelmenge käme dann durch den Zerfall des Myzels zustande, da die Stücke dann klein genug sind, um durch den verstopften Schlauch zu gelangen. Um ein Verstopfen des Probeentnahmeschlauches zu vermeiden wurde nach jeder Probenahme die im Schlauch befindliche Kultur mittels steriler Luft wieder in den Fermenter zurückgedrückt. Vor jeder Probennahme wurde diese Prozedur ebenfalls durchgeführt.

*P. conopilus* bildete im 20 l Fermenter ein anderes Spektrum an Metaboliten als im Schüttelkolben. Dies war insofern problematisch, als in der HPLC-Analyse im Bereich der Zielsubstanz nun zahlreiche weitere Substanzen detektiert wurden, welche eine Reinigung erschwerten. Diese zusätzlichen Substanzen konnten nicht vollständig gereinigt werden, die angereinigten Fraktionen zeigten aber im *in vivo* Test keine Aktivität. Aufgrund der erschwerten Reinigung konnte lediglich eine ausreichende Menge an CK 12013-1 für die Strukturaufklärung gewonnen werden. Eine Nachfermentation und eine Reinigung der Zielsubstanz wurde durch Sophia Hitzler durchgeführt, um sie biologisch charakterisieren zu können. Im Test zeigte die Substanz ausschließlich Aktivität gegen HeLa3 Zellen (10.3). Im *in vivo* Test sowie im *E. coli* Test zeigte CK 12013-1 keine Aktivität mehr. In beiden Tests wurde eine Konzentration von bis zu 100 µg/ml getestet, es kann also ausgeschlossen werden, dass eine zu niedrige Konzentration verwendet wurde. Beim Testen des fraktionierten Rohextraktes während dem Screening hatte die Fraktion mit der Zielsubstanz noch Aktivität gezeigt. In dieser Fraktion waren wie beschrieben noch zahlreiche weitere Substanzen enthalten. Es ist also möglich, dass CK 12013-1 nur im Zusammenspiel mit einer oder mehrerer dieser Substanzen aktiv ist.

Die Struktur ist in der Literatur nicht beschrieben. Daher ist auch nichts über die biologische Aktivität bekannt. Der IUPAC-Name der Struktur ist 11-Hydroxy-tridec-5-ene-7,9,12-triynoic acid, eine mehrfach ungesättigte sowie hydroxylierte Tridecansäure. Eine Suche in SciFinder (<http://www.cas.org/products/scifinder>) führte mit einem Wert von mindestens 90 % Ähnlichkeit zu 12 Ergebnissen (siehe Abbildung 31, Beispiele). Lee et al. untersuchten eine ganze Reihe von Polyinen (Lee et al., 2007). Dabei stellten sie fest, dass die biologische Aktivität stark von den Endgruppen der Substanz abhängt. Die der Substanz CK 12013-1 am ähnlichsten Substanzen (Abbildung 31, D und E) zeigten in den von der Gruppe

durchgeführten Tests mit HCT116 Krebszellen keine biologische Aktivität. Die durch Ross et al. beschriebene, der Substanz CK 12013-1 ähnliche Substanz (Abbildung 31, C) zeigte in den von der Gruppe durchgeführten Tests mit *B. subtilis* und MRSA ebenfalls keine biologische Aktivität. Die Gruppe beobachtete analog zu Lee et al., dass die Aktivität stark von der Endgruppe der jeweiligen Substanz abhing (Ross et al., 2014). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beobachtete Aktivität des fraktionierten Rohextraktes in dieser Arbeit wie oben vermutet durch eine andere Substanz zu Stande kam. Möglicherweise unterscheiden sich diese Substanzen nur durch ihre Endgruppe und weisen daher ähnliche UV-Spektren auf. Wie Lee et al. außerdem beschreiben, ist die Reinigung von Polyinen aufgrund ihrer Instabilität schwierig (Lee et al., 2007), es ist also auch gut möglich, dass die aktive Substanz während der Reinigung verloren ging.

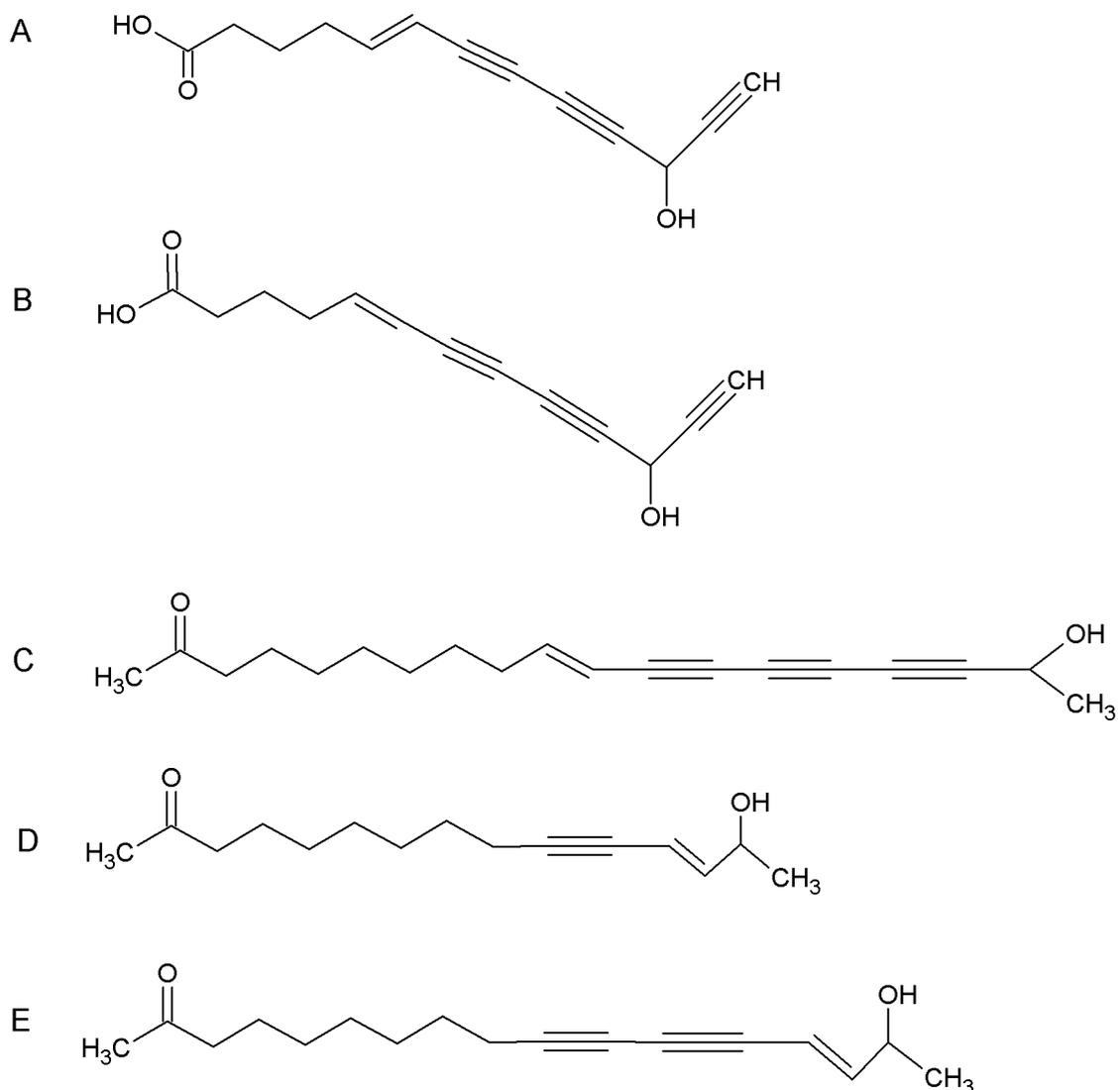


Abbildung 31: Strukturformel von CK 12013-1 (A und B), sowie strukturverwandten Substanzen (C entnommen aus Ross et al., (2014), D und E entnommen aus Lee et al., (2007)).

### 7.4.3 *Wallemia muriae* (IBWF 15001)

*Wallemia muriae* ist ein Basidiomycet aus der Familie der Wallemiaceae. Er wurde von Zalar et al. 2005 beschrieben (Zalar et al., 2005). Der Pilz wächst als pulvriges braunes Myzel in kleinen runden Kolonien. Sämtlicher Vertreter dieser Familie zeichnen sich durch enorme Xerotoleranz aus. Untersuchungen zu dieser Familie wurden bisher vor allem zu *Wallemia sebi* durchgeführt. In einer groß angelegten Studie, bei der die verschiedenen Arten von *Wallemia* untersucht wurden, wurde auch *Wallemia muriae* auf Sekundärmetabolite untersucht (Jančič et al., 2015). Hier wird auch beschrieben, dass das Spektrum der gebildeten Sekundärmetabolite stark vom verwendeten Medium, vor allem auch von der Konzentration an NaCl, abhängt. Aus *Wallemia sebi* sind die toxischen Substanzen Walleminol und Wallemione bekannt (Frank et al., 1999, Struktur siehe Abbildung 32). Walleminol zeigt eine starke biologische Aktivität bei Säugerzellen, Protozoen und Salzkrebschen mit einer Konzentration von 50 µg/ml (Wood et al., 1990). Aus *Wallemia muriae* sind bisher keine toxischen Substanzen beschrieben.

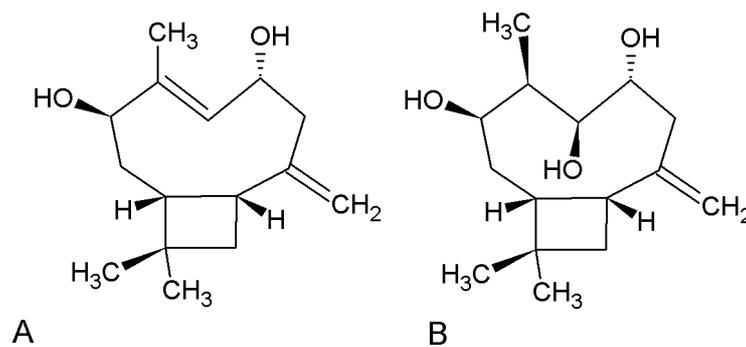


Abbildung 32: Strukturformel von Walleminol (A) und Wallemione (B). Entnommen aus (Frank et al., 1999)

Die aus *W. muriae* isolierte Zielsubstanz CK 15001-1 konnte als Atromentin identifiziert werden. Atromentin wurde bereits 1965 aus Fruchtkörpern von *Hydnellum diabolus* isoliert (Khanna et al., 1965) und seine Wirkung als Antikoagulenz beschrieben. Es ist eine verbreitete Substanz in Basidiomyceten, vor allem in der Ordnung *Polyporales*, wird aber in der Regel nur in den Fruchtkörpern gefunden, welche im Labor nicht oder nur unter bestimmten Bedingungen gezogen werden können. Daher ist die Bildung von Atromentin in *Wallemia muriae* interessant, da die Substanz nun im Fermenter produziert werden kann. Alternativ kann Atromentin auch durch chemische Synthese hergestellt werden. Der Biosyntheseweg für Atromentin ist in *Tapinella panuoides* durch Schneider et al. aufgeklärt (2008). Es gehört zu den Terphenylquinonen und stellt eine Schlüsselsubstanz im Biosyntheseweg dieser und weiterer Substanzen dar. Atromentin wird aus L-Tyrosin mit dem Zwischenprodukt 4-Hydroxyphenylpyruvat durch die L-Tyrosin:2-Oxoglutarat

Aminotransferase (*atrD*) und der Atromentin Synthetase synthetisiert (Zhou & Liu, 2010, Schneider et al., 2008).

Zheng et al. beschrieben 2005 eine antibakterielle Wirkung von Atromentin (Zheng et al., 2006) gegen *Streptococcus pneumoniae*. Hier hemmt es die ACP-Reduktase FabK mit einem IC50 von 0,24 µM. In *E. coli* konnte die Gruppe keine Hemmung der Reduktase feststellen. Außerdem zeigte Kim (2009), dass Atromentin in der humanen Leukämie-Zelllinie U937 Apoptose auslösen kann. Gereinigtes Atromentin zeigte in dieser Arbeit in der biologischen Charakterisierung keine und im *in vivo* Test kaum noch biologische Aktivität. Auch die Zugabe von DMSO zur besseren Aufnahme der Substanz in die Zellen führte nur zu einer geringen Aktivität. Eine zu geringe Konzentration an eingesetztem Atromentin ist unwahrscheinlich, da die Reinsubstanz bis zu einer Menge von 100 µg/ml getestet wurde, ohne eine eindeutige Aktivität zu zeigen. Da Zheng et al. (2005) ebenfalls keine Aktivität gegen *E. coli* feststellen konnten, ging die gemessene Aktivität des Rohextrakts im *in vivo* Test möglicherweise auf aktive verunreinigende Substanzen zurück.

Des Weiteren wurde die Substanz CK 15001-2 isoliert. Die Struktur der Substanz konnte nicht eindeutig aufgeklärt werden, es handelt sich jedoch um ein Derivat von Atromentin. Die Substanz zeigte im *in vivo* Test ebenfalls keine Aktivität gegen *E. coli*, in der biologischen Charakterisierung jedoch 100 % Aktivität gegen HeLa3-Zellen bei einer Konzentration von 5 µg/ml. Dies bestätigt Atromentin als Zwischenprodukt zu weiteren Substanzen und zeigt auf, dass diese eine biologische Aktivität haben können, die Atromentin nicht besitzt.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Pilze konnten erfolgreich im 20 l Maßstab fermentiert und die jeweiligen Zielsubstanzen in ausreichender Menge für die Strukturaufklärung und biologische Charakterisierung gereinigt werden. Die im *in vivo* Test beobachtete Aktivität des Rohextraktes konnte für die Reinsubstanz CK 12066-1 ebenfalls gezeigt werden. Die restlichen Substanzen zeigten noch eine eingeschränkte Aktivität in der biologischen Charakterisierung.

## 8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das für die Entwicklung des *in vitro* Tests nötige MazF erfolgreich exprimiert und gereinigt. Das benötigte MazE konnte ebenfalls exprimiert und teilweise gereinigt werden. Die Funktionalität der Komponenten konnte durch einen Oligonukleotidtest gezeigt werden.

In einem zweiten Teil wurde ein *in vivo* Test erfolgreich entwickelt und angewandt. Das dafür benötigte Markerenzymplasmid wurde konstruiert und zusammen mit einem Plasmid zur MazEF Expression in *E. coli* transformiert. Die Testparameter wie der Assaypuffer, die Inkubationsbedingungen, die Zelldichte, der Lysepuffer und das Substrat konnten etabliert und optimiert werden.

Es wurden mit Hilfe des *in vivo* Tests die Extrakte von 1300 Pilzen auf Aktivität gegen das Toxin-Antitoxin System MazEF sowie gegen *E. coli* untersucht. Dabei wurden vier Substanzen isoliert.

Die aus *Hypholoma tuberosum* IBWF12066 isolierte Zielsubstanz zeigte auch in Reinform bei einer Konzentration von 5 µg/ml Aktivität gegen *E. coli*. Des Weiteren zeigte diese Substanz in der biologischen Charakterisierung starke antifungische und antibakterielle Aktivität sowie gegen *M. grisea*, *B. cinerea* und *P. infestans*.

Die aus *Psathyrella conopilus* IBWF12013 isolierte Zielsubstanz CK 12013-1 ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Es handelt sich um ein Polyin mit einer Säuregruppe. Die Substanz zeigte keine Aktivität gegen *E. coli*, jedoch 100 % Aktivität gegen HeLa3-Zellen bei einer Konzentration von 50 µg/ml..

Aus *Wallemia muriae* IBWF15001 wurde zum einen die Zielsubstanz Atromentin CK 15001-1 isoliert, welches als Reinsubstanz keine biologische Aktivität zeigte. Die Substanz stellt in Basidiomyceten ein wichtiges Stoffwechselzwischenprodukt dar. Des Weiteren wurde die Substanz CK 15001-2, ein Derivat von Atromentin, isoliert. Die Substanz zeigte ebenfalls keine Aktivität gegen *E. coli*, jedoch 100 % Aktivität gegen HeLa3-Zellen bei einer Konzentration von 5 µg/ml.

## 9 Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, E. P. & CHAIN, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **146**, 837–837.
- ADAM, S. (2015). Einfluss von Naturstoffen auf Biofilme bei *Candida albicans* Expressionsstudien und Assay-Entwicklung zu dem Toxin-Antitoxin-System MazEF Masterarbeit IBWF Kaiserslautern
- AIZENMAN, E., ENGELBERG-KULKA, H. & GLASER, G. (1996). An *Escherichia coli* chromosomal 'addiction module' regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 6059–6063.
- AKINJOGUNLA, O. & ENABULELE, I. (2010). Virulence factors, plasmid profiling and curing analysis of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from. *Journal of American Science* **6**, 1022–1033.
- ALTSCHUL, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- AMITAI, S., KOLODKIN-GAL, I., HANANYA-MELTABASHI, M., SACHER, A. & ENGELBERG-KULKA, H. (2009). *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both 'death proteins' and 'survival proteins'. *PLoS genetics* **5**, e1000390.
- ANKE, T., OBERWINKLER, F., STEGLICH, W. & SCHRAMM, G. (1977). The strobilurins - New antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *The Journal of Antibiotics* **30**, 806–810.
- BABA, T., ARA, T., HASEGAWA, M., TAKAI, Y., OKUMURA, Y., BABA, M., DATSENKO, K. A., TOMITA, M., WANNER, B. L. & MORI, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* **2**, 2006.0008.
- BARTLETT, D., CLOUGH, J. & GODFREY, C. (2001). Understanding the strobilurin fungicides. *Pesticide ...* 143–148.
- BELTSKY, M., AVSHALOM, H., ERENTAL, A., YELIN, I., KUMAR, S., LONDON, N., SPERBER, M., SCHUELER-FURMAN, O. & ENGELBERG-KULKA, H. (2011). The *Escherichia coli* Extracellular Death Factor EDF Induces the Endoribonucleolytic Activities of the Toxins MazF and ChpBK. *Molecular Cell* **41**, 625–635.
- BOND, S. R. & NAUS, C. C. (2012). RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Research* **40**, 209–213.
- BRAKHAGE, A. A. (2012). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 21–32.
- BRIGHAM, R. B. & PITTENGER, R. C. (1956). *Streptomyces orientalis*, n. sp., the source of vancomycin. *Antibiotics and Chemotherapy* **6**, 642–647.

- CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., ORR- EWING, J. & SANDERS, A. G. (2005). The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. *Clin. Orthop. Relat.* **439**, 23–26.
- CORPET, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* **16**, 10881–90.
- CUETO, M., JENSEN, P. R., KAUFFMAN, C., FENICAL, W., LOBKOVSKY, E. & CLARDY, J. (2001). Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge. *Journal of Natural Products* **64**, 1444–1446.
- CUEVA, C., MORENO-ARRIBAS, M. V., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., BILLS, G., VICENTE, M. F., BASILIO, A., RIVAS, C. L., REQUENA, T., RODRÍGUEZ, J. M. & BARTOLOMÉ, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* **161**, 372–382.
- DAVIS, R. A., HOFMANN, A., OSMAN, A., HALL, R. A., MÜHLSCHLEGEL, F. A., VULLO, D., INNOCENTI, A., SUPURAN, C. T. & POULSEN, S.-A. (2011). Natural Product-Based Phenols as Novel Probes for Mycobacterial and Fungal Carbonic Anhydrases. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 1682–1692.
- DENAP, J. C. B. & HERGENROTHER, P. J. (2005). Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Organic & biomolecular chemistry* **3**, 959–66.
- DERBOVEN, P. & FRAITURE, A. (2009). *Hypholoma tuberosum*, un hypholome qui produit des sclérotés. *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles* **9**, 43–51.
- DREYFUSS, M., HÄRRI, E., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE, W. & TSCHERTER, H. (1976). Cyclosporin A and C. *European Journal Of Applied Microbiology* **3**, 125–133.
- ENGELBERG-KULKA, H. (2009). Activation of a built-in bacterial programmed cell death system as a novel mechanism of action of some antibiotics. *Commun Integr ...* **6**, 211–212.
- ERENTAL, A., KALDERON, Z., SAADA, A., SMITH, Y. & ENGELBERG-KULKA, H. (2014). Apoptosis-Like Death, an Extreme SOS Response in *Escherichia coli*. *mBio* **5**, e01426-14-e01426-14.
- ERENTAL, A., SHARON, I. & ENGELBERG-KULKA, H. (2012). Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway. *PLoS biology* **10**, e1001281.
- ERIKCI, S. (2016). Isolierung und Charakterisierung von pilzlichen Sekundärmetaboliten unter Etablierung und Verwendung von mikrobiologischen Testverfahren. Diplomarbeit IBWF Kaiserslautern
- FLEMING, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *The British Journal of Experimental Pathology* **10**, 226–236.
- FLEMING, A. (1964). Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin. *Physiology or Medicine 1942-1962*.

- FLOSS, H. G. & YU, T.-W. (2005). Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical reviews* **105**, 621–632.
- FLYNN, E. H., SIGAL, M. V., WILEY, P. F. & GERZON, K. (1954). Erythromycin. I. Properties and Degradation Studies 1. *Journal of the American Chemical Society* **76**, 3121–3131.
- FRANK, M., KINGSTON, E., JEFFERY, J. C., MOSS, M. O., MURRAY, M., SIMPSON, T. J. & SUTHERLAND, A. (1999). Walleminol and wallemione, novel caryophyllenes from the toxigenic fungus *Wallemia sebi*. *Tetrahedron Letters* **40**, 133–136.
- GANGAROSA, E. J., BENNETT, J. V., WYATT, C., PIERCE, P. E., OLARTE, J., HERNANDES, P. M., VAZQUEZ, V. & BESSUDO M, D. (1972). An Epidemic-Associated Episome? *Journal of Infectious Diseases* **126**, 215–218.
- GERDES, K. (2013). Prokaryotic toxin-antitoxins. *Prokaryotic Toxin-Antitoxins* ISBN 9783642332531, 1–365.
- GINSBURG, C. M. & EICHENWALD, H. F. (1976). Erythromycin: A review of its uses in pediatric practice. *The Journal of Pediatrics* **89**, 872–884.
- GLOER, J. B. (1995). The chemistry of fungal antagonism and defense. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1265–1274.
- GORINSTEIN, S., WEISZ, M., ZEMSER, M., TILIS, K., STILLER, A., FLAM, I. & GAT, Y. (1993). Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75**, 115–120.
- GRADY, R. & HAYES, F. (2003). Axe-Txe, a broad-spectrum proteic toxin-antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. *Molecular Microbiology* **47**, 1419–1432.
- HAHN, F. E. (1979). Chemotherapy of bacterial plasmids. *Naturwissenschaften* **66**, 555–562.
- HEILBORN, D. H. E. VON (2016). Isolierung und Charakterisierung bodenbürtiger Pilze sowie Untersuchung eines Isolats der Gattung *Penicillium* und dessen Exudat. Bachelorarbeit IBWF Kaiserslautern.
- HERZOG, C. (1976). Chemotherapy of typhoid fever: A review of literature. *Infection* **4**, 166–173.
- HERZOG, W. C. (2014). Expressionsstudien zu dem Toxin- Antitoxin-System MazEF in *Escherichia coli* Isolierung biologisch aktiver Naturstoffe aus Endophyten. Masterarbeit IBWF Kaiserslautern.
- IZAKI, K., MATSUHASHI, M. & STROMINGER, J. L. (1966). Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **55**, 656–663.
- JANČIČ, S., NGUYEN, H. D. T., FRISVAD, J. C., ZALAR, P., SCHROERS, H.-J., SEIFERT, K. A. & GUNDE-CIMERMAN, N. (2015). A Taxonomic Revision of the *Wallemia sebi* Species Complex. *PLOS ONE* **10**, e0125933.
- JENSEN, R. B. & GERDES, K. (1995). Programmed cell death in bacteria: Proteic plasmid stabilization systems. *Molecular Microbiology* **17**, 205–210.

- KAMADA, K., HANAOKA, F. & BURLEY, S. K. (2003). Crystal structure of the MazE/MazF complex: Molecular bases of antidote-toxin recognition. *Molecular Cell* **11**, 875–884.
- KHANNA, J. M., MALONE, M. H., EULER, K. L. & BRADY, L. R. (1965). Atromentin Anticoagulant from *Hydnellum diabolus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **54**, 1016–1020.
- KIM, J. H. (2009). Atromentin-Induced Apoptosis in Human Leukemia U937 Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 946–950. <http://jmb.inforang.com/>.
- KOLODKIN-GAL, I., HAZAN, R., GAATHON, A., CARMELI, S. & ENGELBERG-KULKA, H. (2007). A Linear Pentapeptide Is a Quorum-Sensing Factor Required for mazEF-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*. *Science* **318**, 652–655.
- KOLODKIN-GAL, I., SAT, B., KESHET, A. & ENGELBERG-KULKA, H. (2008). The communication factor EDF and the toxin-antitoxin module mazEF determine the mode of action of antibiotics. *PLoS biology* **6**, e319.
- KUMAR, S., KOLODKIN-GAL, I. & ENGELBERG-KULKA, H. (2013). Novel quorum-sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death. *mBio* **4**, e00314-13.
- LARSSON, E. & ÖRSTADIUS, L. (2008). Fourteen coprophilous species of *Psathyrella* identified in the Nordic countries using morphology and nuclear rDNA sequence data. *Mycological Research* **112**, 1165–1185.
- LEE, S., LEE, T., LEE, Y. M., KIM, D. & KIM, S. (2007). Solid-Phase Library Synthesis of Polyynes Similar to Natural Products. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 8422–8425.
- LIOY, V. S., REY, O., Balsa, D., PELLICER, T. & ALONSO, J. C. (2010). A toxin-antitoxin module as a target for antimicrobial development. *Plasmid* **63**, 31–39.
- MALOY, S., STEWART, V. & TAYLOR, R. (1996). *Genetic analysis of pathogenic bacteria*.
- MANGANO, D. T., LAYUG, E. L., WALLACE, A. & TATEO, I. (1996). Effect of Atenolol on Mortality and Cardiovascular Morbidity after Noncardiac Surgery. *New England Journal of Medicine* **335**, 1713–1721.
- MARGALITH, P. & PAGANI, H. (1961). Rifomycin. XIII. Fermentation and production of rifomycin complex. *Applied microbiology* **9**, 320–324.
- MARIANOVSKY, I., AIZENMAN, E., ENGELBERG-KULKA, H. & GLASER, G. (2001). The regulation of the *Escherichia coli* mazEF promoter involves an unusual alternating palindrome. *The Journal of biological chemistry* **276**, 5975–5984.
- MATTIODA, G. & CHRISTIDIS, Y. (2000). Glyoxylic Acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- VAN MELDEREN, L. (2010). Toxin-antitoxin systems: Why so many, what for? *Current Opinion in Microbiology* **13**, 781–785.
- MORAR, M. & WRIGHT, G. D. (2010). The genomic enzymology of antibiotic resistance. *Annual review of genetics* **44**, 25–51.

- MORITZ, E. M. & HERGENROTHER, P. J. (2007). Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and plasmid-encoded in vancomycin-resistant enterococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 311–316.
- MURRAY, B. E. (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 46–65.
- NAGY, L. G., KOCSUBÉ, S., PAPP, T. & VÁGVÖLGYI, C. (2009). Phylogeny and character evolution of the coprinoid mushroom genus *Parasola* as inferred from LSU and ITS nrDNA sequence data. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **22**, 28–37.
- NAOTAKE, O. (1985). Markedly unbiased codon usage in *Bacillus subtilis*. *Gene* **40**, 145–150.
- NEU, H. C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* **257**, 1064–1073.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **79**, 629–661.
- NEWTON, G. G. F. & ABRAHAM, E. P. (1955). Cephalosporin C, a New Antibiotic containing Sulphur and D- $\alpha$ -Aminoadipic Acid. *Nature* **175**, 548–548.
- NIETO, C., SADOWY, E., DE LA CAMPA, A. G., HRYNIEWICZ, W. & ESPINOSA, MANUEL NIETO, (2010). The relBE2Spn toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae*: role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates. *PloS one* **5**, e11289.
- PADAMSEE, M., MATHENY, P. B., DENTINGER, B. T. M. & MCLAUGHLIN, D. J. (2008). The mushroom family Psathyrellaceae: Evidence for large-scale polyphyly of the genus *Psathyrella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**, 415–429.
- PAGE, R. & PETI, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol* **12**, 208–214.
- PANDEY, D. P. & GERDES, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research* **33**, 966–976.
- PAPADOPOULOS, G. & BOSKOU, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* **68**, 669–671.
- PARK, J. H., YAMAGUCHI, Y. & INOUE, M. (2011). *Bacillus subtilis* MazF-bs (EndoA) is a UACAU-specific mRNA interferase. *FEBS Letters* **585**, 2526–2532.
- PARK, S. J., SON, W. S. & LEE, B. J. (2013). Structural overview of toxin-antitoxin systems in infectious bacteria: A target for developing antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 1155–1167.
- PAYNE, D. J., GWYNN, M. N., HOLMES, D. J. & POMPLIANO, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 29–40.
- PEARSON, A. & DENNIS (1948). *Psathyrella conopilus*. *Transactions of the British Mycological Society* **31**, 185.
- PELÁEZ, F. (2005). Biological activities of fungal metabolites. In *Handbook of Industrial Mycology*, Zhiqiang, A. (Ed.). New York: Marcel Dekker.

- PELÁEZ, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? *Biochemical Pharmacology* **71**, 981–990.
- PELLEGRINI, O., MATHY, N., GOGOS, A., SHAPIRO, L. & CONDON, C. (2005). The *Bacillus subtilis* ydcDE operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. *Molecular microbiology* **56**, 1139–1148.
- REDHEAD, S. A. & KROEGER, P. (1987). A sclerotium-producing *Hypholoma* from British Columbia. *Mycotaxon* **29**, 457–465.
- RETHEK, J., ERKEL, G., ANKE, T. & STERNER, O. (2004). Oxaspirodion, a New Inhibitor of Inducible TNF- $\alpha$  Expression from the Ascomycete *Chaetomium subspirale*. *The Journal of Antibiotics* **57**, 493–495.
- ROSS, C., SCHERLACH, K., KLOSS, F. & HERTWECK, C. (2014). The Molecular Basis of Conjugated Polyene Biosynthesis in Phytopathogenic Bacteria. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 7794–7798.
- SAT, B., RECHES, M. & ENGELBERG-KULKA, H. (2003). *Escherichia coli* mazEF. *Society* **185**, 1803–1807.
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* **166**, 368–379.
- SCHMID, R. D. (2006). *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik*. Wiley-Blackwell.
- SCHNEIDER, P., BOUHIREN, S. & HOFFMEISTER, D. (2008). Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete *Tapinella panuoides*. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 1487–1496.
- SCHUEFFLER, A. & ANKE, T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Natural Product Reports* 1425–1448.
- THINES, E., ANKE, H. & WEBER, R. W. S. (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological research* **108**, 14–25. h
- TOBERT, J. A. (1988). Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin. *The American Journal of Cardiology* **62**, J28–J34.
- TRIPATHI, A., DEWAN, P. C., SIDDIQUE, S. A. & VARADARAJAN, R. (2014). MazF-induced Growth Inhibition and Persister Generation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 4191–4205.
- TSILIBARIS, V., MAENHAUT-MICHEL, G., MINE, N. & VAN MELDEREN, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *Journal of Bacteriology* **189**, 6101–6108.
- VESPER, O., AMITAI, S., BELITSKY, M., BYRGAZOV, K., KABERDINA, A. C., ENGELBERG-KULKA, H. & MOLL, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell* **147**, 147–157.

- WANG, N. R. & HERGENROTHER, P. J. (2007). A continuous fluorometric assay for the assessment of MazF ribonuclease activity. *Analytical biochemistry* **371**, 173–183.
- WATANAKUNAKORN, C. (1984). Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **14**, 7–18.
- WEHRLI, W., KNÜSEL, F., SCHMID, K. & STAEHELIN, M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **61**, 667–73.
- WEIL, J., MIRAMONTI, J. & LADISCH, M. R. (1995). Cephalosporin C: Mode of action and biosynthetic pathway. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 85–87.
- WEISBLUM, B. & DAVIES, J. (1968). Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriological reviews* **32**, 493–528.
- WHITE, A. R., BLASER, M., CARRS, O., CASSELL, G., FISHMAN, N., GUIDOS, R., LEVY, S., POWERS, J., NORRBY, R., TILLOTSON, G., DAVIES, R., PROJAN, S., DAWSON, M., MONNET, D., KEOGH-BROWN, M., HAND, K., GARNER, S., FINDLAY, D., MOREL, C., WISE, R., BAX, R., BURKE, F., CHOPRA, I., CZAPLEWSKI, L., FINCH, R., LIVERMORE, D., PIDDOCK, L. J. V & WHITE, T. (2011). Effective antibacterials: At what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**, 1948–1953.
- WHO (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*.
- WILLIAMS, J. J. (2013). 'Suitability of RelBE and MazEF Toxin-Antitoxin Systems as antibacterial targets'.
- WILLIAMS, J. J., HALVORSEN, E. M., DWYER, E. M., DIFAZIO, R. M. & HERGENROTHER, P. J. (2011). Toxin-antitoxin (TA) systems are prevalent and transcribed in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* **322**, 41–50.
- WILLIAMS, J. J. & HERGENROTHER, P. J. (2012). Artificial activation of toxin-antitoxin systems as an antibacterial strategy. *Trends in microbiology* **20**, 291–8.
- WOOD, G. M., MANN, P. J., LEWIS, D. F., REID, W. J. & MOSS, M. O. (1990). Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. *Food Additives and Contaminants* **7**, 69–77.
- ZÄHNER, H. (1965). *Biologie der Antibiotika*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- ZALAR, P., SYBREN DE HOOG, G., SCHROERS, H.-J., FRANK, J. M. & GUNDE-CIMERMAN, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* **87**, 311–328.
- ZHANG, Y., ZHANG, J., HOEFELICH, K. P., IKURA, M., QING, G. & INOUE, M. (2003). MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* **12**, 913–923.
- ZHENG, C.-J., SOHN, M.-J. & KIM, W.-G. (2006). Atromentin and leucomelone, the first inhibitors specific to enoyl-ACP reductase (FabK) of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of antibiotics* **59**, 808–812.

ZHOU, Z. Y. & LIU, J. K. (2010). Pigments of fungi (macromycetes). *Nat. Prod. Rep.* **27**, 1531–1570.

# 10 Anhang

## 10.1 Sequenzierungsergebnisse

In Abbildung 33 sind die Sequenzierungsergebnisse für das Plasmid pJeMmazEF dargestellt. Es wurden die Gene *mazE* und *mazF* in das Plasmid pJeM1 eingeführt. Das Plasmid wurde zur Erstellung des Stammes BL21(DE3) pEXNNT7K pJeMmazEF verwendet, welcher im *in vivo* Test (5.18) zum Einsatz kam.

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
3601 catATGGCAAGCTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGATGATCCACAGTAGCGTAAAGCGTTGGGGAAATTCAC 3700
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
65 CATATGGCAAGCTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGATGATCCACAGTAGCGTAAAGCGTTGGGGAAATTCAC 164
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
3701 CGGCGGTGCGGATCCCGGCTACGTTAATGCAGGCGCTCAATCTGAATATTGATGATGAAGTGAAGATTGACCTGGTGGATGGCAAATTAATTATTGAGCC 3800
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
165 CGGCGGTGCGGATCCCGGCTACGTTAATGCAGGCGCTCAATCTGAATATTGATGATGAAGTGAAGATTGACCTGGTGGATGGCAAATTAATTATTGAGCC 264
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
3801 AGTGCGTAAAGAGCCCGTATTACGCTTGCTGAACTGGTCAACGACATCACGCCGAAAAACCTCCACGAGAATATCGACTGGGGAGAGCCGAAAGATAAG 3900
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
265 AGTGCGTAAAGAGCCCGTATTACGCTTGCTGAACTGGTCAACGACATCACGCCGAAAAACCTCCACGAGAATATCGACTGGGGAGAGCCGAAAGATAAG 364
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
3901 GAACTCTGGTAATGGTAAGCCGATACCGGATATGGGCGATCTGATTTGGGTTGATTTTGACCCGACAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGACATCGTCC 4000
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
365 GAACTCTGGTAATGGTAAGCCGATACCGGATATGGGCGATCTGATTTGGGTTGATTTTGACCCGACAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGACATCGTCC 464
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
4001 AGCTGTTGTCCTGAGTCTTTTCATGTACAACAACAAAACAGGTATGTGTCTGTGTGTTCCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTTCGAAGTTGTT 4100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
465 AGCTGTTGTCCTGAGTCTTTTCATGTACAACAACAACAAAACAGGTATGTGTCTGTGTGTTCCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTTCGAAGTTGTT 564
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
4101 TTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAGTATCGCCTGGCGGGCAA-GAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCA 4199
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
565 TTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAGTATCGCCTGGCGGGCAAAGAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCA 664
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
4200 GAGGAATTACAACCTCATTAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGGCGGCCGAGGACTCCGGGCTTCTCCTCAATTTCCGCT-CAICACCA-CCATCA 4297
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
665 GAGGAATTACAACCTCATTAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGGCGGCCGAGGACTCCGGGCTTCTCCTCAATTTCCGCT-CAICACCA-CCATCA 764
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
4298 TCACCATCACCACCACTAATTAACCTAGGCTGCTGCCA-CCGCTGAGCAATAAgcttaccggtttatt-gactaccggaagcagtgtagcgtgtgcttc 4395
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
765 TCACCATCACCACCACTAATTAACCTAGGCTGCTGCCA-CCGCTGAGCAATAAGCTTACCggtttattgactaccggaagcagtgtagcgtgtgcttc 864
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Abbildung 33: Sequenzierung von pJeMmazEF.

Der Bereich für die Gene *mazE* und *mazF* sind gekennzeichnet. Die obere Sequenz entspricht der geplanten Sequenz, die untere stellt das Sequenzierungsergebnis dar. Die durch das Programm ermittelte Insertion an Position 632 konnte durch Betrachten der Spektrum-Datei nicht bestätigt werden, eine Insertion wird daher ausgeschlossen. Die im hinteren Bereich ermittelten Abweichungen gehen auf eine zunehmende Ungenauigkeit der Sequenzierung zurück, und konnten durch Betrachten der Spektrum-Datei ebenfalls ausgeschlossen werden.

In Abbildung 34 sind die Sequenzierungsergebnisse für das Plasmid pJeMmazF dargestellt. Es wurde das Gen mazF in das Plasmid pJeM1 eingeführt. Das Plasmid wurde zur Erstellung des Stammes BL21(DE3) pEXNNT7K pJeMmazF verwendet, welcher im *in vivo* Test (5.18) als Kontrolle zum Einsatz kam.

```

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
3501  tggttggccaatggccccatnttctctgtcagtaacgagaaggtcgcgcaattcagggcgcttttttagactggtcgtaatgaacaattcttaagaaggagatata 3600
          |||
          47  TGGTTGCCAATGGCCCATNTTCTCTGTCAGTAAACGAGAAGGTCGCGCAATTCAGGGCGCTTTTtagactggtcgtaatgaacaattcttaagaaggagatata 146
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
3601  CATATGGCAAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGATGGTAAGCCGATACGTACCCGATATGGGCGATCTGA 3700
          |||
          147  CATATGGCAAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGGTGCAGATGACGACGACAAGGTACCGATGGTAAGCCGATACGTACCCGATATGGGCGATCTGA 246
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
3701  TTTGGGTTGATTTTGACCCGACAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGACATCGTCCAGCTGTTGTCCTGAGTCCTTTTCATGTACAACAACAAAACAGGTATGTG 3800
          |||
          247  TTTGGGTTGATTTTGACCCGACAAAAGGTAGCGAGCAAGCTGGACATCGTCCAGCTGTTGTCCTGAGTCCTTTTCATGTACAACAACAAAACAGGTATGTG 346
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
3801  TCTGTGIGTTCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTTCGAAGTTGTTTTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAAA 3900
          |||
          347  TCTGTGIGTTCCTTGTAACGCAATCAAAAGGATATCCGTTTCGAAGTTGTTTTATCCGGTCAGGAACGTGATGGCGTAGCGTTAGCTGATCAGGTAAAA 446
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *

          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
3901  AGTATCGCCTGGCGGGCAAGAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCCAGAGGAATTACAACCTCAITAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGTAGS 4000
          |||
          447  AGTATCGCCTGGCGGGCAAGAGGAGCAACGAAGAAAGGAACAGTTGCCCCAGAGGAATTACAACCTCAITAAAGCCAAAATTAACGTACTGATTGGGTAGS 546
          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *

```

Abbildung 34: Sequenzierung von pJeMmazF.

Der Bereich für das Gen mazF ist gekennzeichnet. Die obere Sequenz entspricht der geplanten Sequenz, die untere stellt das Sequenzierungsergebnis dar.

## 10.2 ITS-Sequenzen

### 10.2.1 ITS Sequenz IBWF 12066

5´-CATTATTGAATAAACCTGGCACGGTTGTAGCTGGCTTCTGCAAGTGCTCGCCGTTGTCATCTTTA  
 TTTCTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGACCTGGATGATCGAAAAATTTTCAGAAGTTAAACTTCTGGAT  
 GCGAGGTTGTTTCTTGAATAAAGGTTCTCCTTGTGTTAGGTTATTCAGGCTCTATGTCATTTTCATA  
 TACTCCAATGAATGTAACAGAATGTATCACTGGGCTTTATGCCTATAAACTATATACAACCTTCAGCA  
 ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA  
 TTCAGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTG  
 ATTGTCATTAAATTCTCAACCCCATCA-3´

### 10.2.2 ITS-Sequenz IBWF 12013

5´-CTGATTGAGGTCAGATTGGTCATGTTGTCCCTGCGGACGGTTGTAAGCTGGTCCcaTAGATCTCC  
AACACCAAGGCGTAGATAGTTATCACACCGAGGGGGATGGAGGGGAAGACCCGCTAATTCATTTTAAG  
GGAGCAGACCTAAGAAAGGCCTGCAAACCCCAAGTCCAAGCCATCACCCAGAAAAACTAGATGAG  
GTTGAGAATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAA  
AGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTGAGTTTCTATATGGGCAGAGCCCTTTGAAATC  
AACATTCTTTTATACATTCGATAGGGGTGTGTTAATAAACATAGACCTGAGACATTCGAGGGGAAGCCG  
GCCTGTGAGGGCGCGACAACCTTCGCATCCGCAACACTACAAGAGTGCGCGAGAGATAATCCCAGAGC  
CTACAAAGTGTGCACAGGTGGAAAGATAAAGGTGACGGGTGTGCACATGCTCCTAGAAGCCAGCAACA  
ACCACGCCAAGTTTATTCGATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTT  
ACTTCCTCT-3´

### 10.2.3 ITS-Sequenz IBWF 15001

5´-CTCATAATCTTCTACAAACCACTGTTTTtAAAATGTTTtaCTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTT  
GAAATATTTAAAGTTTTATAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAACGCA  
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCAC  
TCTATGGTATTCCGTAGAGTACGTCTGTTTGAGCGTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTTTT-3´

### 10.2.4 RBP-Sequenz IBWF 15001

5´-AGACGAAGaGGCCAAGCAGTATCAAGAATACCTCAACAAAGAAAAAGAAGATGCTGAGTTCCTG  
ATGAAATTGACACACCGTTGGATATACCAGCCAGAGAGAGATTTGCACGTTTCAGGGGTCTCAAGTCA  
TTCAGAACATCACCATGGGATCCTTACGAGAACCTCCCAATCGAGATGAGCAAAGTCTTTGAGTTTGA  
GAATTACGACCAGATGTCAAACGTGTAATCAAGAGGGTCAAGATGGGTATAGATGAGGATGGTGAAT  
CCACCTCAGTTGAGCCTGGCAAGAGAGTAACATTGCACATCAAAAATGTCAGCAAGGATCTCTCAGTT  
ATACAATCATCCGAATTACCACTTGTTCATATTCAGCTTACTGCCTCACGAGAAGAAGAAGTCACTTGT  
TAATATGACTATTCAGCGTAACACCGAATATACAGGTTTAGTGAAGTCCAAAGATCCACTTACCGCTA  
TTATCGGTTCAAGAAAACCTCAAATAAACCCAGTCTATTCACAAAATACACCAAAGGTTTGAACAAC  
GTACACAAGTTTGAACGATACCTCAGGCATGGTGATCCATCAGTAGCAACAATTTTCGGTCCAGTTGC  
ATGGGGTAAGGTTCCGATTGTCTATTTGCGT-3´



## 10.4 Massen- und UV-Spektren der isolierten Reinsubstanzen

Die Substanzen wurden wie unter 5.13.3 beschrieben charakterisiert. Die UV-vis-Spektren der einzelnen Reinsubstanzen wurden dabei aus dem jeweiligen HPLC-MS-Lauf entnommen. Aus diesen Messungen konnten keine Extinktionskoeffizienten und kein  $\lambda_{\max}$  bestimmt werden, da die Konzentration und das Lösungsmittelverhältnis nicht bekannt sind.

In Abbildung 35 sind die Positiv- und Negativmasse sowie das UV-Spektrum der Substanz CK 12066-1 gezeigt.

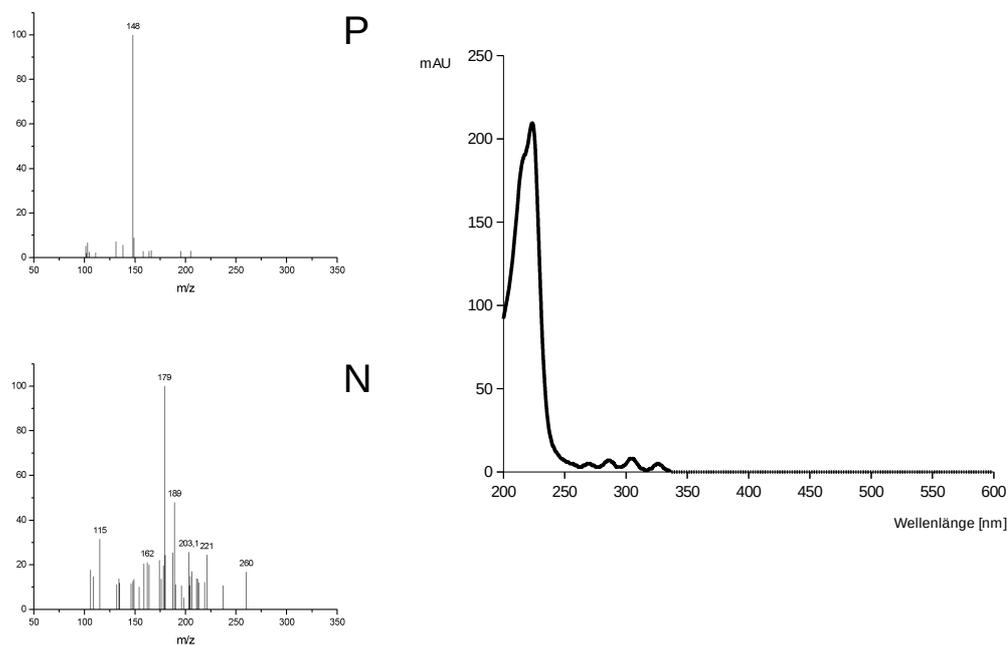


Abbildung 35: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 12066-1

In Abbildung 36 sind die Positiv- und Negativmasse sowie das UV-Spektrum der Substanz CK 12013-1 gezeigt.

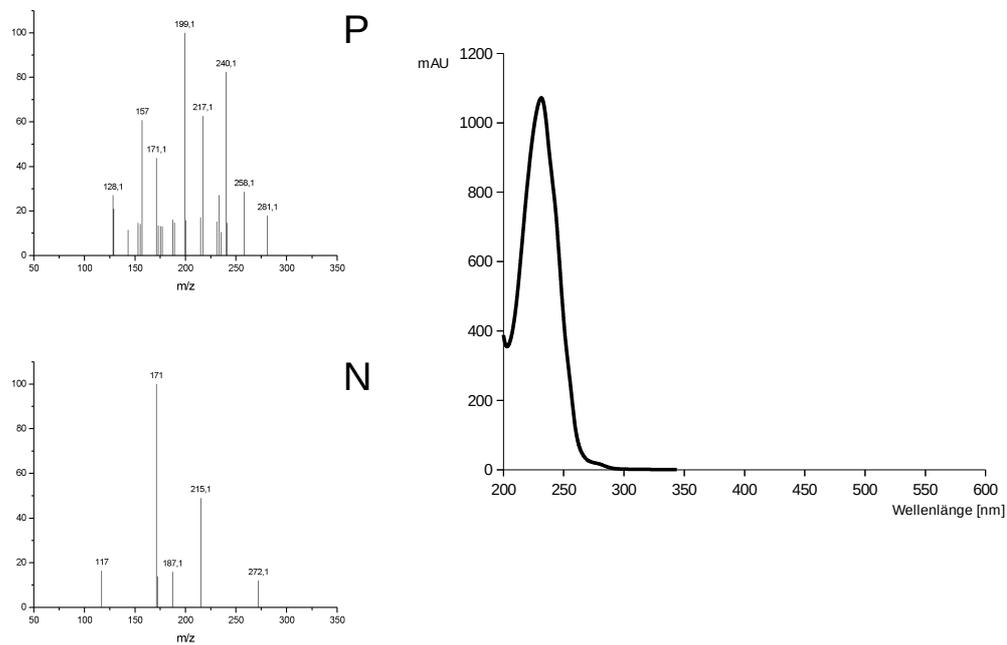


Abbildung 36: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 12013-1

In Abbildung 37 sind die Positiv- und Negativmasse sowie das UV-Spektrum der Substanz CK 15001-1 gezeigt.

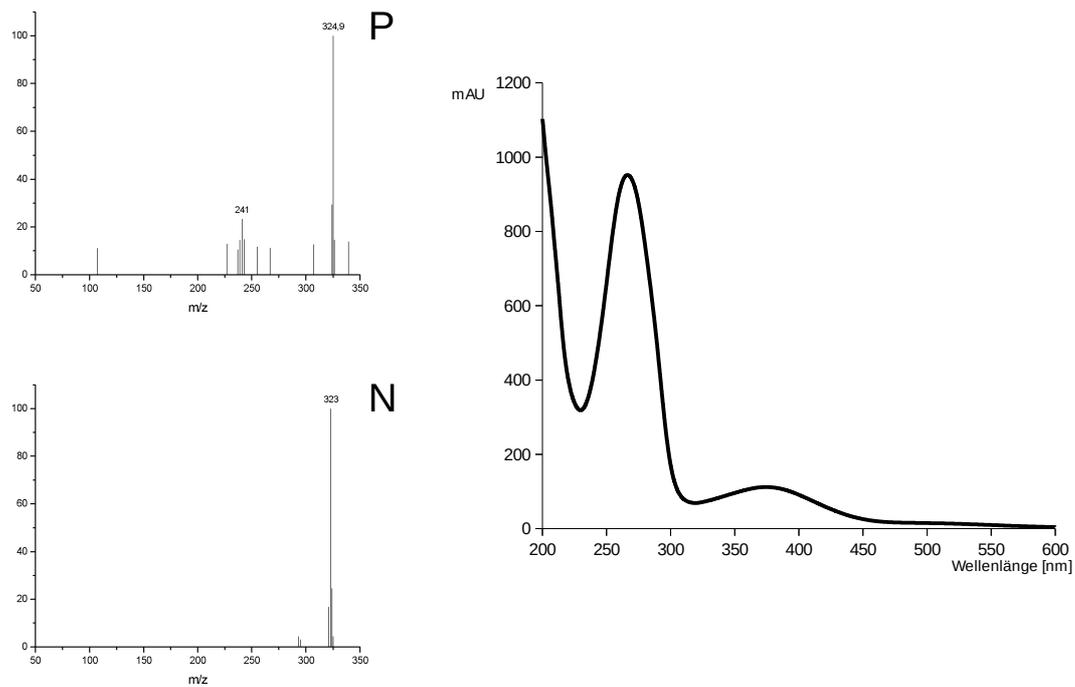


Abbildung 37: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 15001-1

In Abbildung 38 sind die Positiv- und Negativmasse sowie das UV-Spektrum der Substanz CK 15001-2 gezeigt.

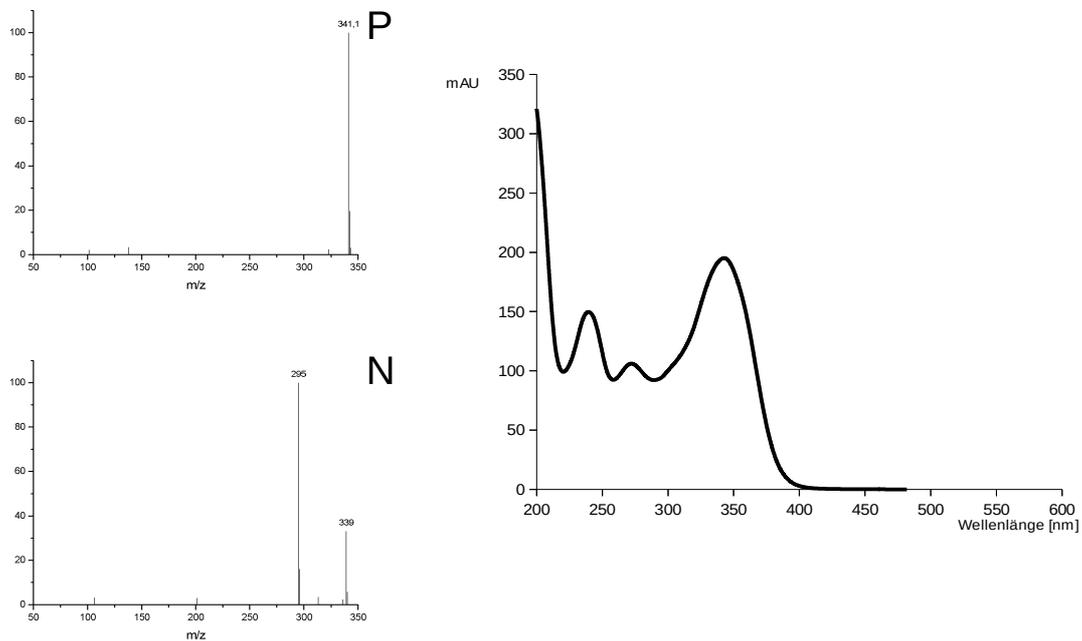
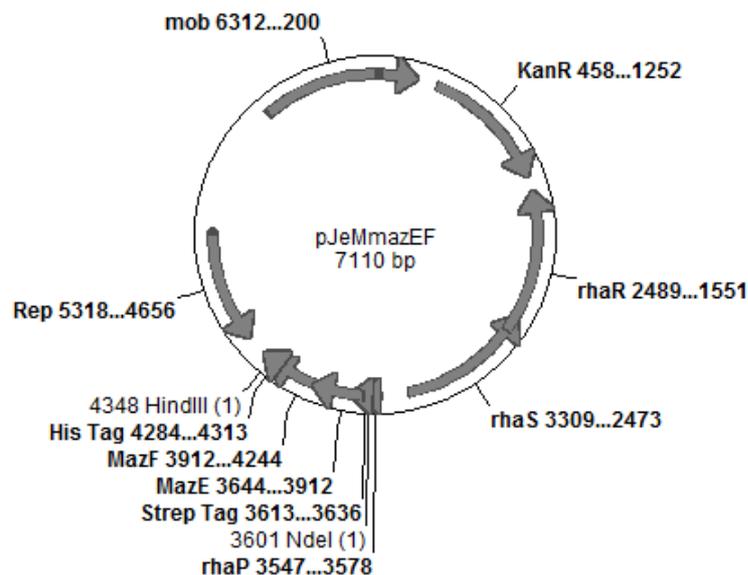


Abbildung 38: Massen- (Positiv (P)- und Negativmasse (N)) sowie UV-Spektrum (rechts) der Substanz CK 15001-2

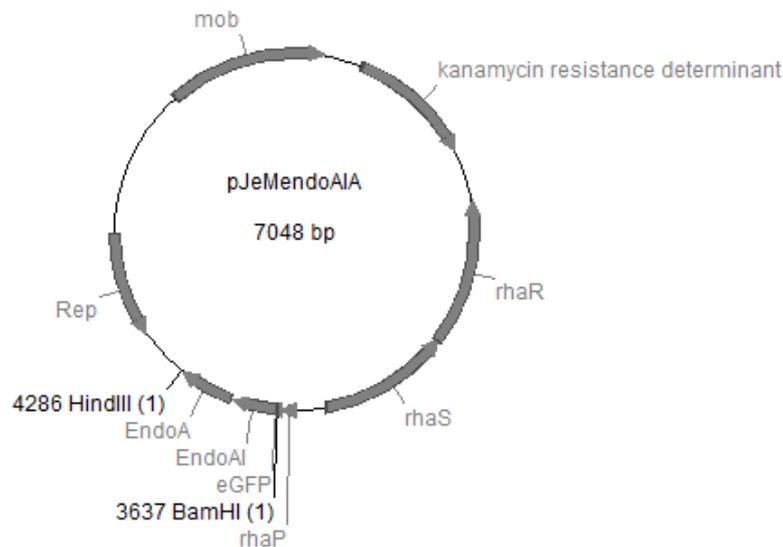
## 10.5 Plasmidkarten

Die Plasmide wurden wie unter 5.14.7 beschrieben erstellt.

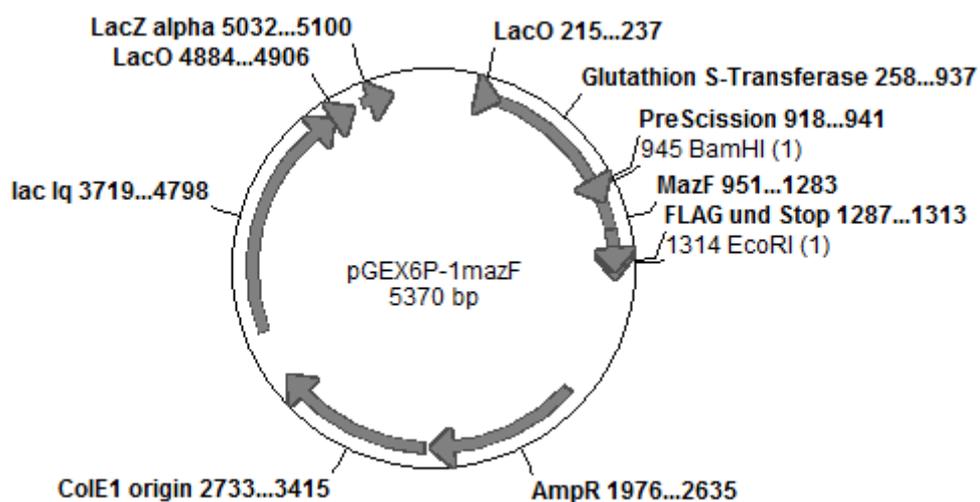
Das Plasmid pJeMmazEF enthält das Mobilisierungsgen (mob), die Replicon-Region (rep), ein für Kanamycinresistenz codierendes Gen (KanR), die Gene für RhaR und RhaS, sowie den Rhamnose Promotor (rhaP), das Gen für MazE mit der vorausgehenden Sequenz für den Strep-Tag sowie daran anschließend das Gen für MazF mit daran anhängender Sequenz für den His-Tag.



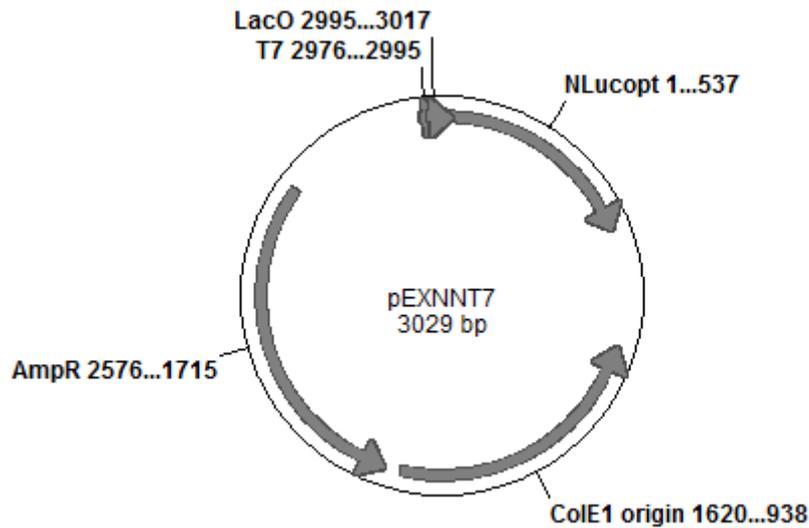
Das Plasmid pJeMendoAIA enthält das Mobilisierungsgen (mob), die Replicon-Region (Rep), ein für Kanamycinresistenz codierendes Gen (kanamycin resistance determinant), die Gene für RhaR und RhaS, sowie den Rhamnose Promotor (rhaP), das Gen für EndoAI sowie daran anschließend das Gen für EndoA.



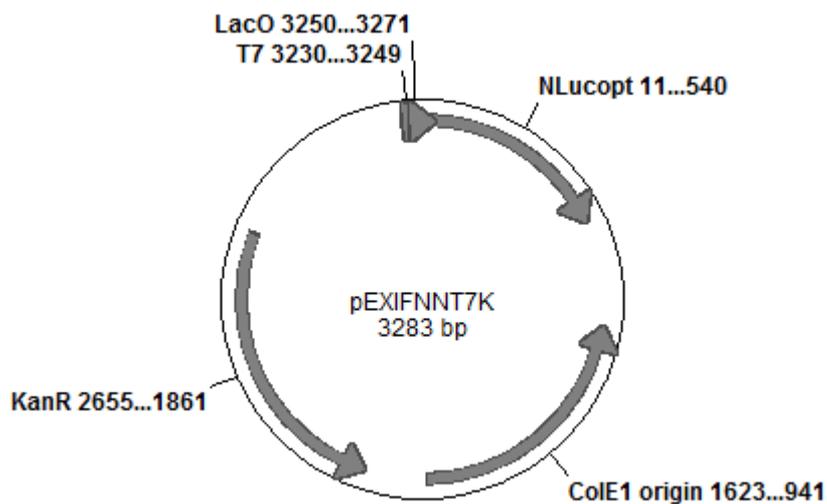
Das Plasmid pGEX6P-1mazF enthält die ColE1 Origin Region (ColE1 origin), ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), den Lactose Operator (LacO), das Gen für die Glutathion S-Transferase sowie daran anschließend das Gen für MazF mit der darauf folgenden Sequenz für den Flag-Tag(FLAG und Stop).



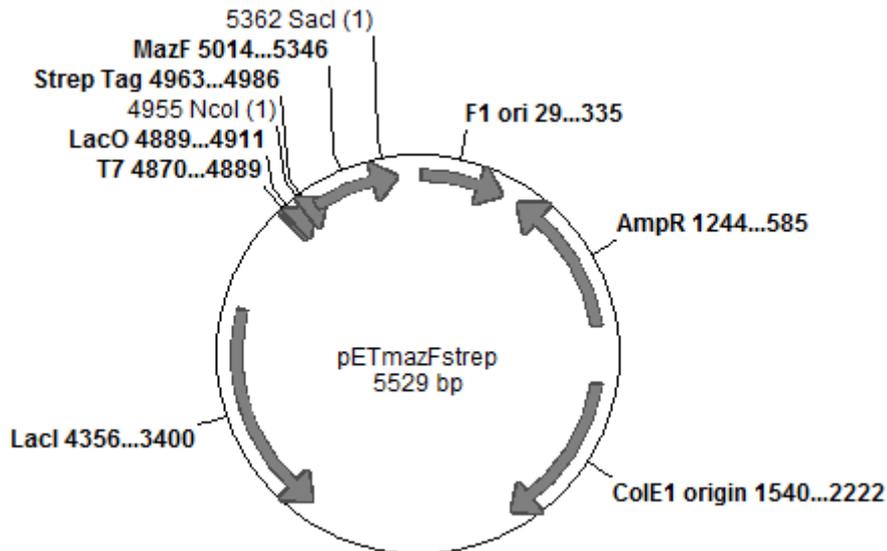
Das Plasmid pEXNNT7 enthält die ColE1 Origin Region (ColE1 origin), ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), den Lactose/T7 Operator (LacO und T7) sowie daran anschließend das Gen für die out-of-frame Luciferase (NLucopt).



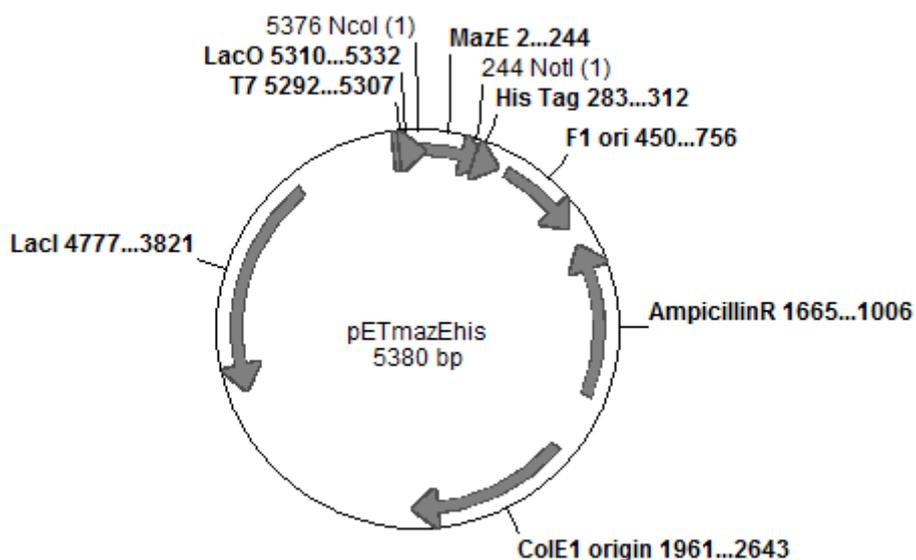
Das Plasmid pEXIFNNT7 enthält die ColE1 Origin Region (ColE1 origin), ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), den Lactose/T7 Operator (LacO und T7) sowie daran anschließend das Gen für die Luciferase (NLucopt).



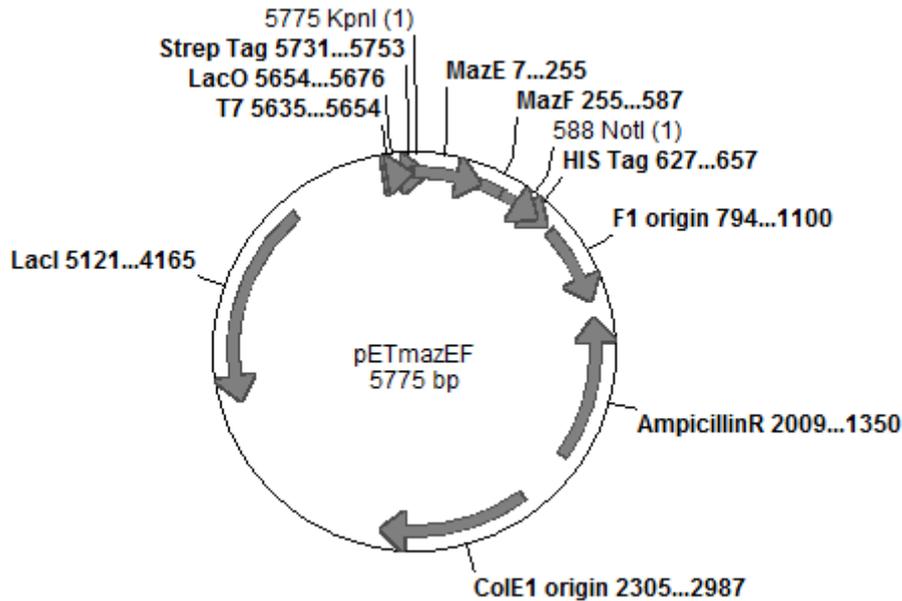
Das Plasmid pETmazFstrep enthält die ColE1 Origin Region (ColE1 origin), ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), den Lactose/T7 Operator (LacO und T7) sowie daran anschließend das Gen für MazF mit vorangehender Sequenz für den Strep-Tag (Strep Tag und MazF)



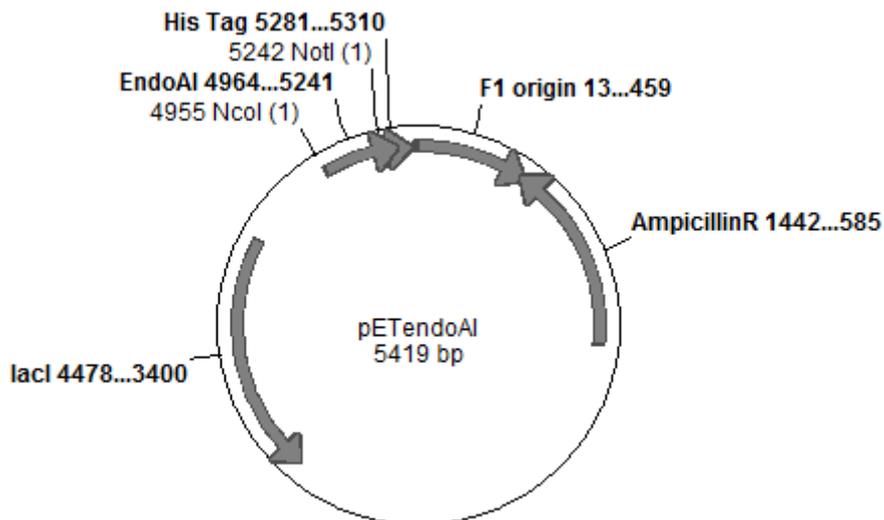
Das Plasmid pETmazEhis enthält die ColE1 Origin Region (ColE1 origin), ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), den Lactose/T7 Operator (LacO und T7) sowie daran anschließend das Gen für MazE mit darauffolgender Sequenz für den His-Tag (His Tag und MazE)



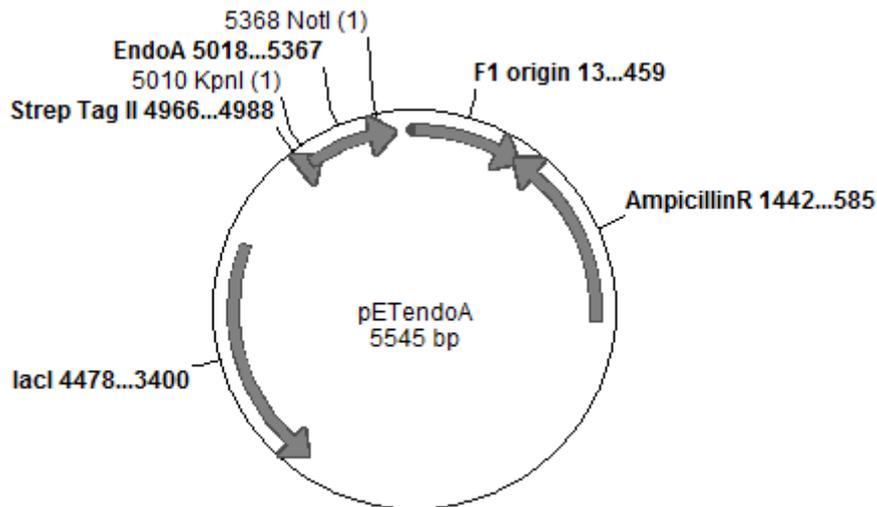
Das Plasmid pETmazEF enthält ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpicillinR), den Lactose/T7 Operator (LacO und T7), daran anschließend das Gen für MazE mit vorangehender Sequenz für den Strep-Tag (Strep Tag und MazE) und darauffolgend das Gen für MazF mit der angehängten Sequenz für den His-Tag (MazF und HIS Tag)



Das Plasmid pETendoAI enthält ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpicillinR), den Lactose/T7 Operator (nicht eingezeichnet) sowie daran anschließend das Gen für EndoAI mit darauffolgender Sequenz für den His-Tag (EndoAI und His Tag)



Das Plasmid pETendoA enthält ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpicillinR), den Lactose/T7 Operator (nicht eingezeichnet) sowie daran anschließend das Gen für EndoA mit vorhergehender Sequenz für den Strep-Tag (EndoA und Strep Tag II)



Das Plasmid pYES2mazEhis enthält ein für Ampicillinresistenz codierendes Gen (AmpR), das URA3 Gen (URA3), den GAL und T7 Promotor (GAL1 und T7) sowie daran anschließend das Gen für MazE mit darauffolgender Sequenz für den His-Tag (MazE und His Tag)

