Epoxidase- und Epoxid-Hydrolase-Enzyme in der Biosynthese des Polyetherantibiotikums Monensin

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie, Institut für Organische Chemie

der Universität Hamburg

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Vorgelegt von

Dipl. Biochem. Anna Sophie Zimmermann

aus Hannover

Hamburg, November 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2011 bis November 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christian B. W. Stark am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Disputation am 16.12.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian B. W. Stark

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

Danksagung

Mein Dank gilt Professor Dr. Christian B. W. Stark für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung sowie für die Ermöglichung der Promotion in seinem Arbeitskreis.
Ebenso danke ich Professor Dr. Joachim Thiem für die Übernahme des Zweitgutachtens.
Professor Dr. Peter F. Leadlay und Dr. Fanglu Huang danke ich für die umfassende Weitergabe von Informationen zu Vorarbeiten am Monensin-Biosynthesegencluster und für die großzügige Bereitstellung von Plasmiden und *Streptomyceten*-Stämmen.
Bei Professor Dr. Andrew Torda und bei Dr. Julia Rehbein möchte ich mich für die bioinformatische Unterstützung bedanken.
Für die Hilfe bei der Proteinaufreinigung bedanke ich mich bei Professor Dr. Andrea Rentmeister und ihren Mitarbeiterinnen sowie bei Professor Dr. Hartmut Schlüter und seinen Mitarbeitern, insbesondere bei Dr. Diana Deterra und Mariam Omidi.
Dr. Rob Meijers, Dr. Stephane Boivin, Sandra Kozak und Vanessa Vieira sowie Herrn Professor Dr. Christian Betzel und seinen Mitarbeitern, insbesondere PD Dr. Markus Perbandt, danke ich für die Unterstützung bei kristallographischen Arbeiten.
Professor Dr. Bernd Meyer und seinen Mitarbeitern danke ich dafür, dass sie mich immer so freundlich aufgenommen und mir die Geräte ihres Arbeitskreises jederzeit zur Verfügung gestellt haben. Ganz besonders danke ich Karsten Winkel für die Hilfe bei den präparativen HPLC-Aufreinigungen und den NMR-Messungen sowie Patrizia Leccese für die Unterstützung bei den SPR-Messungen.
Weiterhin danke ich meinen Kollegen Juliane Adrian, Dirk Alpers, Johannes Arp, Hannah Bieler, Lena Carstensen, Karin Chin, Mauricio Coderch, Dr. Gunnar Ehrlich, Dr. David Giera, Leona Gross, Inga-Lena Hansen, Tobias Herrmann, Steffi Lerch, Philipp Merkel, Sandra Mühmel, Jonas Müller, Dr. Alexander Roth, Fabian Rusch, Steffi Ruser, Dr. Andrea Schmidt, Dr. Jens Schmidt, Dr. Maik Tretbar und Bastian Wulff für die schöne Zeit.
Kirsten Geisler, Lilia Marcinkiewicz und Donata Mehrkens danke ich für die Unterstützung im Laboralltag und für das eine oder andere „offene Ohr“.
Ferner gilt mein Dank den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilungen für das Aufnehmen zahlreicher NMR- und Massenspektren sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Lager, der Entsorgung und der Haustechnik.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Maria Trusch für die wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit.

Meiner Familie, meinen Freunden und Karsten danke ich für die schöne Zeit im „normalen“ Leben. Bei meiner Freundin und Mitbewohnerin Lisa Oestereich möchte ich mich außerdem dafür bedanken, dass ich ihr bereits am Frühstückstisch die eine oder andere wissenschaftliche Frage stellen konnte und immer eine Antwort bekommen habe!

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Polyketide 1

1.1.1 Vorkommen und Wirkung 1

1.1.2 Polyether 2

1.1.3 Therapeutische Anwendung der Polyetherionophore 4

1.1.4 Biosynthese von Monensin 5

1.2 Oxidative Cyclisierungskaskaden für die Biosynthese von cyclischen Ethern 11

1.2.1 Acetogenine 11

1.2.2 Marine Leiterpolyether 12

1.3 Land vs. Meer 14

1.4 Flavin-abhängige Monooxygenasen 15

1.5 Epoxid-Hydrolasen in Polyether-Biosyntheseclustern 20

2 Aufgabenstellung 26

3 Material und Methoden 27

3.1 Material 27

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 27

3.1.2 Geräte 28

3.1.3 Plasmide 30

3.1.4 Bakterienstämme 31

3.1.5 Restriktionsenzyme 31

3.2 Puffer und Medien 32

3.2.1 Puffer 32

3.2.2 Antibiotika 35

3.2.3 Kulturmedien für *E. coli*-Bakterien 36

3.2.4 Medien für die Kultivierung von Streptomyceten 37

3.3 Methoden 40

3.3.1 Molekularbiologische Methoden 40

3.3.2 Heterologe Proteinexpression 46

3.3.3 Proteinaufreinigung 53

3.3.4 Biophysikalische Enzymcharakterisierung 60

3.3.5 Enzym-Aktivitätsassays 63

3.3.6 Instrumentelle Analytik 66

3.3.7 Kristallisationsexperimente ... 68
3.3.8 Bioinformatische Methoden ... 73

4 Ergebnisse und Diskussion ... 75

4.1 Flavin-abhängige Monooxygenase MonCI ... 75

4.1.1 Heterologe Expression von MonCI in *E. coli* ... 75
4.1.2 Heterologe Expression von MonCI in *S. coelicolor* CH999 ... 77
4.1.3 Reinigung der Flavin-abhängigen Monooxygenase MonCI ... 79
4.1.4 Ionenaustauschchromatographie von MonCI und massenspektrometrische Identifizierung der Verunreinigungen ... 81
4.1.5 Enzymaktivitätsassays ... 83
4.1.6 Charakterisierung des Flavin-Cofaktors ... 86
4.1.7 Homologiemodelle von MonCI ... 89

4.2 Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII ... 95

4.2.1 Klonierung und heterologe Expression ... 95
4.2.2 Reinigung der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII ... 97
4.2.3 Biophysikalische Enzymcharakterisierung ... 104
4.2.4 Funktionelle Untersuchungen ... 118
4.2.5 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse ... 122
4.2.6 Molekulare *Docking*-Experimente ... 130

5 Ausblick ... 134
6 Zusammenfassung ... 137
7 Summary ... 139
8 Analytik ... 141

8.1 Enzymassays mit der Epoxidase MonCI ... 141

8.1.1 Linalool ... 141
8.1.2 Premonensin A und B ... 141

8.2 Enzymassays mit den Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII ... 142

9 Literaturverzeichnis ... 143
10 Anhang ... 148

10.1.1 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonBI-Konstrukte ... 148
10.1.2 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonBII-Konstrukte ... 152
10.1.3 Plasmid und Aminosäuresequenz des MonBI-MonBII-Fusionskonstrukts ... 155
10.1.4 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonCI-Konstrukte ... 157
10.1.5 Premonensin-Reinigung und Charakterisierung ... 161

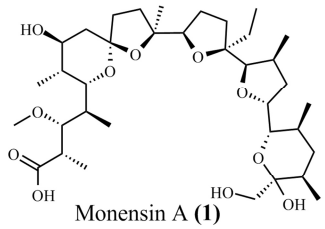
11 Gefahrstoffinformationen 163
12 Abkürzungsverzeichnis 166
13 Lebenslauf 169
14 Eidesstattliche Erklärung 170

1 Einleitung

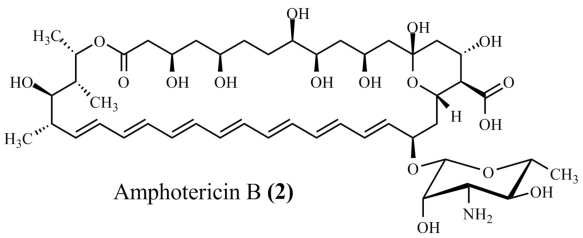
1.1 Polyketide

1.1.1 Vorkommen und Wirkung

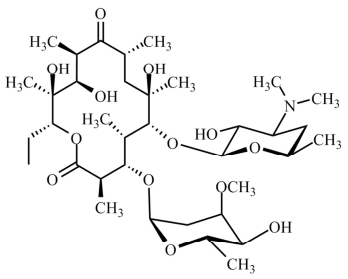
Die Naturstoffklasse der Polyketide übt seit Jahrzehnten eine große Faszination auf Chemiker und Biologen gleichermaßen aus. Die Gründe für diese Begeisterung sind vielfältig: Zum einen weisen die Polyketide ein enorm breites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf, die von extremer Toxizität bis hin zu human- und veterinärmedizinisch nutzbaren Funktionen reichen[1–3]. Zum anderen begeistern die eleganten Biosynthesewege, die für die enorme Strukturvielfalt der Polyketide verantwortlich sind[1,4]. Polyketide werden von Mikroorganismen und Pflanzen produziert[5] und dienen den Produzenten als Signalmoleküle, als Farbstoffe und als Verteidigungswaffen gegen Fressfeinde oder Konkurrenten[6].
Die Polyketide werden auf der Grundlage ihrer Struktur in fünf Gruppen unterteilt[1]. Zur Gruppe der Polyether zählt beispielsweise das Polyetherionophor Monensin A (1), das Antimykotikum Amphotericin B (2) ist in die Gruppe der Polyene einzuordnen, und das Antibiotikum Erythromycin (3) gehört zu den Makroliden. Das Krebsmedikament Doxorubicin (4) ist ein Antrachinon und das Neocarcinostatin (5) ist der Gruppe der Endiine zugehörig.



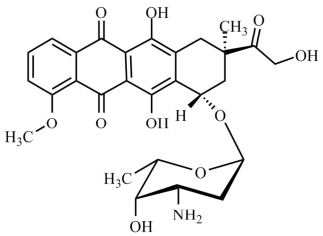
Monensin A **(1)**



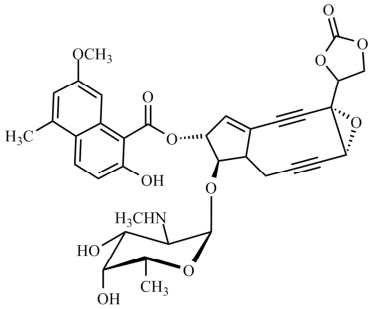
Amphotericin B **(2)**



Erythromycin A **(3)**



Doxorubicin **(4)**



Neocarcinostatin (**5**)

Abbildung 1: Polyketide werden in fünf Gruppen eingeteilt: Monensin A (1) gehört zur Gruppe der Polyether, Amphotericin B (2) ist ein Polyen, Erythromycin A (3) ist ein Makrolid, Doxorubicin (4) wird der Gruppe der Antrachinone zugeordnet und Neocarcinostatin (5) ist ein Endiin.

1.1.2 Polyether

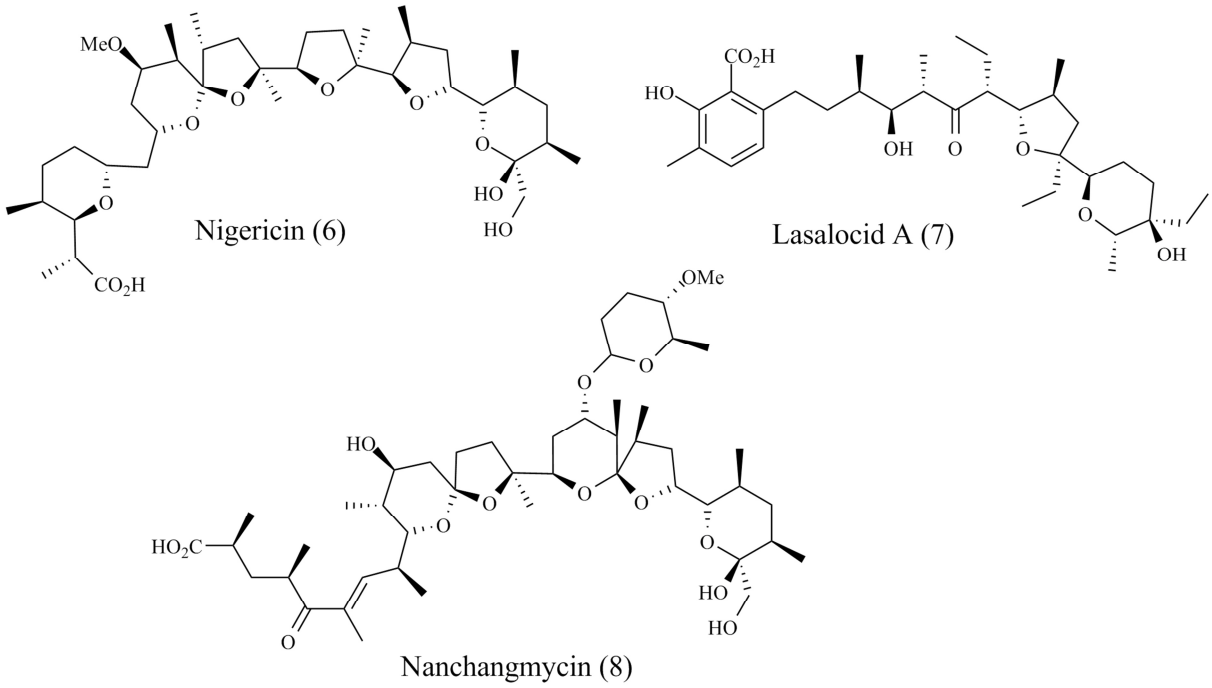


Abbildung 2: Die Polyetherionophore Nigericin (6), Lasalocid (7) und Nanchangmycin (8)

Die Polyetherantibiotika Nigericin (6) und Lasalocid (7) wurden als erste Vertreter dieser Naturstoffklasse bereits im Jahr 1951 isoliert[7,8]. Es sollte allerdings bis 1967 dauern, bis Agtarap *et al.* die erste Aufklärung der Struktur eines Polyetherantibiotikums am Beispiel von Monensin gelang[9,10]. Mittlerweile sind mehr als 120 Vertreter dieser Naturstoffklasse isoliert und charakterisiert worden, die meisten stammen aus Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces*[11–13]. Daneben gibt es aber auch eine geringe Anzahl von Polyethern, die von Meeresorganismen wie Schwämmen oder Dinoflagellaten synthetisiert werden. Hierzu gehören unter anderem die Brevetoxine[14], das Palytoxin[15] und Maitotoxin[16,17]. Die Bandbreite der biologischen Aktivität reicht bei Polyethern von antibiotischer und antimykotischer Wirkung bis hin zu extremer Giftigkeit. Besonders toxisch sind dabei einige Vertreter der marinen Polyether. Dies ist auf ihre Interaktion mit Calciumkanälen in der Zellmembran zurückzuführen[16].

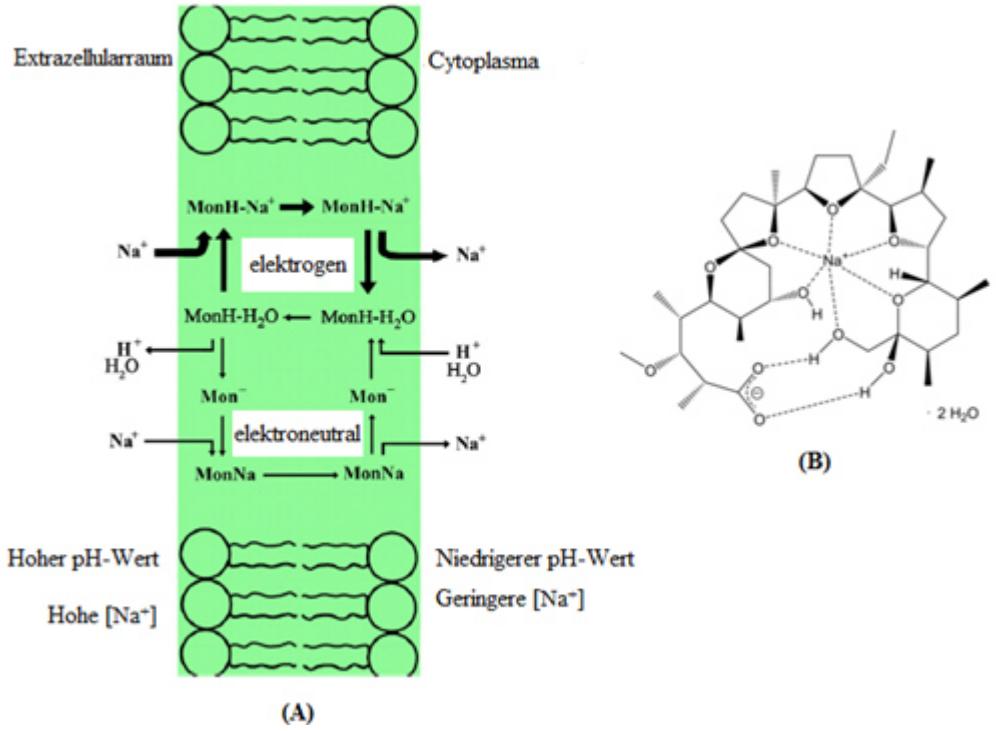


Abbildung 3: Die ionophore Wirkung von Monensin: (A) Schematische Darstellung des Monensin-vermittelten Natriumionen-Transports ins Cytoplasma[18]; (B) Schematische Darstellung der Röntgenkristallstruktur von Natrium-Monensin-Dihydrat[19]

Monensin A (1) und B sowie Nigericin (6) sind Beispiele aus der großen Familie der monovalenten Spiroketalpolyether, Nanchangmycin (8) ist ein Glycosid-Dispiroketalpolyether. Diese Polyetherantibiotika weisen antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien auf[20–22].

Polyetherionophore wie Monensin sind langkettige, verzweigte Carbonsäuren, deren biologische Aktivität auf ihrer Fähigkeit basiert, selektiv Metallkationen zu komplexieren und durch Zellmembranen zu transportieren[23]. Die Tetrahydrofuran- und Tetrahydropyranringe des Polyetherrückgrats sorgen für die charakteristische käfigartige Struktur des Moleküls. Im sauerstoffreichen Inneren dieses Käfigs kann ein Metallkation chelatisiert werden.

Monensin weist die höchste Affinität für Natriumionen auf. Im Inneren des Ionophors wird das Ion von sechs Sauerstoffatomen komplexiert[19] (siehe Abbildung 3 B). Da der resultierende neutrale Komplex nach außen hin hydrophob ist, kann er die Lipiddoppelschicht ungehindert durchqueren[24]. Die Natriumionen-Konzentration im Cytosol ist geringer ist als im Extrazellularraum, deswegen erfolgt mittels gerichteter Diffusion ein Natriumioneneinstrom in die Zelle (siehe Abbildung 3 A). Für diesen Transport wurden zwei Modelle vorgeschlagen: Beim elektroneutralen Modell erfolgt der Natriumioneneinstrom im Austausch gegen Protonen, während beim elektrogenen Modell angenommen wird, dass ausschließlich der Kationeneinstrom in die Zelle stattfindet[18]. Der Anstieg der Natriumionenkonzentration im Zellinneren führt zum Zusammenbruch des Potentialgradienten über die Zellmembran, zum Wassereintritt in die Zelle und im Fall des elektroneutralen Modells zum

Anstieg des pH-Werts im Cytosol[25]. Die damit verbundene Druckerhöhung bewirkt eine Zerstörung intrazellulärer Strukturen und damit den Zelltod[26].

1.1.3 Therapeutische Anwendung der Polyetherionophore

Polyetherantibiotika besitzen ausgeprägte Aktivität gegen *Eimeria tenella*, den Auslöser der Kokzidiose[27–29]. Diese Parasiten siedeln sich im Magen-Darm-Trakt von Nutztieren wie Hühnern oder Rindern an und führen zu lebensbedrohlichen hämorrhagischen Entzündungen[30]. Die Erkrankung sorgt für enorme finanzielle Einbußen in der Geflügelzucht und Rindermast [31]. Monensin (Coban®, Rumensin® und Coxidin®) und Salinomycin (Bio-cox®, Sacox®) machen einen Anteil von 65–70% der weltweiten Antibiotika-Nutzung zur Kontrolle der Kokzidiose aus. Auch die Polyetherantibiotika Lasalocid (Avatec®, Bovatec®), Narasin (Monteban®, Maxiban®) und Maduramicin (Cygro®) werden zur Eindämmung dieser Erkrankung eingesetzt[32]. Polyetherantibiotika steigern außerdem die Effektivität der Futterverwertung bei Rindern durch Veränderung der Fermentation im Pansen. Bei Nicht-Wiederkäuern wird das Wachstum gefördert, indem die Anzahl der kompetitiven gastrointestinalen Mikroorganismen reduziert wird.

Die orale LD_{50} von Monensin liegt bei Rindern bei 50-80 mg/kg Körpergewicht[33] und bei Hühnern sogar bei 200 mg/kg Körpergewicht[34,35]. Dagegen ist bei Pferden bereits eine orale Dosis von 2-3 mg/kg Körpergewicht tödlich[36]. Die Unterschiede lassen sich mit der unterschiedlichen Pharmakokinetik erklären – so wird Monensin in der Leber von Rindern und Hühnern schneller metabolisiert als bei anderen Lebewesen. Auch für Menschen sind Polyetherantibiotika stark toxisch und deswegen für den humantherapeutischen Einsatz ungeeignet [37]. Aufgrund ihres Potentials in der Krebstherapie sowie ihrer Antimalariawirkung sind sie trotzdem Gegenstand intensiver Forschung.

Monensin verstärkt die Wirkung des Immunotoxins 260F9-rRTA, das bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird. Indem sich der Polyether in die Zellmembran einlagert, steigert er die Permeabilität der Lipiddoppelschicht für das Immunotoxin. Auf diese Weise wird die Zytotoxizität des Krebsmedikaments verstärkt[38].

Polyetherantibiotika zeigen zudem eine signifikante Aktivität gegen Malariaparasiten, sogar gegen multiresistente Stämme[39]. Nigericin ist 30 000 mal potenter als herkömmliche Medikamente wie Chloroquin[22]. Der Malariaparasit verändert die Permeabilität der Plasmamembran von Erythrozyten für Kationen und die Beeinflussung dieses Systems scheint die Basis für die Anti-Malaria-Aktivität der Polyether zu sein.

Studien weisen darauf hin, dass Polyether Protonen aus intrazellulären Vesikeln ins Cytosol des Parasiten transportieren. Diese Ansäuerung des Cytosols führt zur Inhibierung des Hämoglobin-Abbaus, der Mitose und der Endo- und Exocytose[39].

1.1.4 Biosynthese von Monensin

Die Biosynthese von Makroliden, Polyenen und Polyethern wie Monensin wird von modularen Typ-I-Polyketid-Synthasen (PKS) katalysiert[4,40]. Hierbei handelt es sich um sehr große multifunktionale Enzyme, die aus mehreren Modulen aufgebaut sind[41]. Die einzelnen aktiven Zentren in diesen Modulen werden als Domänen bezeichnet. Jeder Reaktionsschritt wird von einem gesonderten, spezifischen aktiven Zentrum katalysiert. Die modularen Polyketid-Synthasen können als eine Art lineares Fließband betrachtet werden. Ihr Aufbau ermöglicht es in den meisten Fällen, basierend auf einer Sequenz-Analyse die Struktur des gebildeten Polyketides vorherzusagen[42,43]. Dieses Konzept wird als Colinearitätsregel bezeichnet[44].

Die Biosynthese der Polyketide beginnt am sogenannten Start- oder Lademodul, die Kettenverlängerung wird von den Verlängerungsmodulen katalysiert[40,41], und im letzten Schritt wird die Polyketidkette durch eine Thioesterase (TE) vom Enzymkomplex abgespalten[45].

2001 wurde das Biosynthesegencluster für Monensin aus *Streptomyces cinnamonensis* von Leadlay *et al.* sequenziert[46]. Dabei wurden acht Gene *monAI* bis *monAVIII* identifiziert, die für eine Ladedomäne und zwölf Verlängerungsmodule codieren. Diese sind zu fünf bimodularen und drei unimodularen Proteinen MonAI bis MonAVIII zusammengefasst (siehe Abbildung 4).

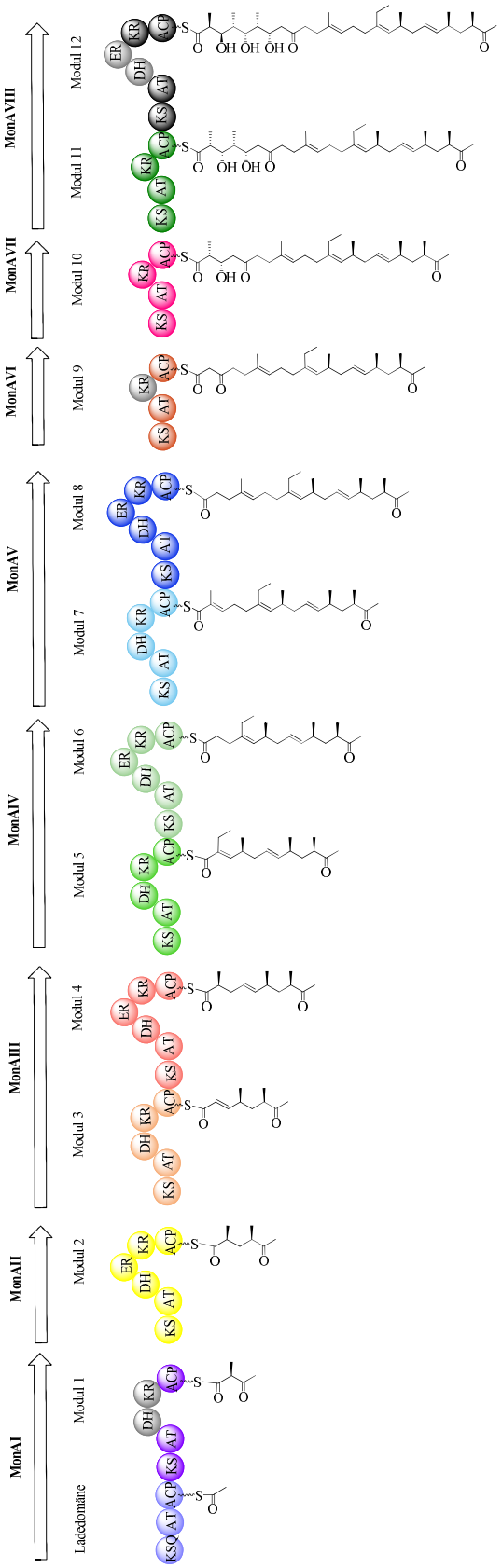


Abbildung 4: Das Monensin-Biosynthese-Gencluster besteht aus acht Genen (monAI bis monAVIII), die für eine Ladedomäne und zwölf Verlängerungsmodule codieren. Diese sind zu fünf bimodularen und drei unimodularen Proteinen MonAI bis MonAVIII zusammengefasst[46]
(KS - β-Ketoacylsynthase, KSQ - β-Ketoacylsynthase der Ladedomäne, AT - Acyltransferase, ACP - Acylcarrierprotein, DH - Dehydratase, ER - Enoylreduktase, KR - Ketoreduktase)

Die Monensin-PKS baut das Polyketidgerüst aus fünf Acetat-, einer Butyrat- and sieben Propionateinheiten auf. Die Butyrateinheit kann durch eine weitere Propionateinheit ersetzt werden, dies führt dann zur Bildung von Monensin B, das eine Methyl- anstelle einer Ethylgruppe am C16 trägt[47].

Das Lademodul enthält eine KSQ-Domäne, sie ähnelt der β-Ketoacylsynthase (KS)-Domäne, allerding ist ein konservierter Cysteinrest (C) gegen einen Glutaminrest (Q) ausgetauscht[46,48]. Die KSQ-Domäne katalysiert die Decarboxylierung von Malonat zu Acetat. Dann wird die Acetyleinheit auf einen spezifischen Cysteinrest der β-Ketoacylsynthase (KS) von Modul 1 übertragen, während das Acyl-Carrier-Protein (ACP) mit der Malonyl-Verlängerungseinheit beladen wird. Die KS katalysiert nun eine Claisen-ähnliche Kondensation, deren Triebkraft die Decarboxylierung des Malonyl-ACPs ist (siehe Abbildung 5).

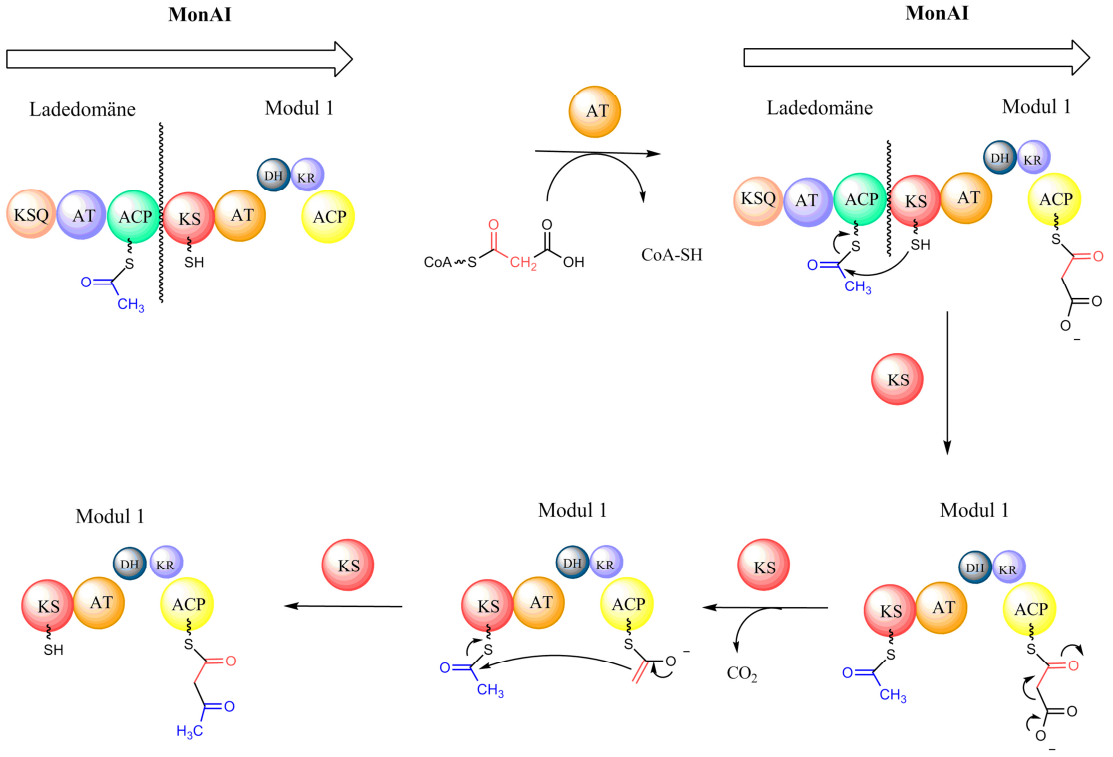


Abbildung 5: Ladedomäne und Verlängerungsmodul 1 der Monensin-PKS. Die Monensin-Biosynthese beginnt mit der decarboxylativen Kondensation einer Acetyleinheit mit einer Malonyleinheit[46].

Zusätzlich zur Kerndomäne (bestehend aus KS, AT und ACP) eines Verlängerungsmoduls können noch weitere Domänen vorhanden sein, die das entstandene Acetoacetyl-ACP reduzieren können: Die Ketoreduktase (KR) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion des β-Keto-Thioesters zum β-Hydroxy-Thioester. Dieser kann durch eine Dehydratase- (DH-) Domäne dehydratisiert werden und der resultierende α,β-ungesättigte Thioester kann dann von der Enoylreduktase- (ER-) Domäne reduziert werden. Die wachsende Polyketidkette bleibt während dieser Reduktionsschritte als Thioester an die prosthetische Phosphopantethein-Gruppe des ACPs gebunden und kann über diesen beweglichen „Arm“ den jeweiligen katalytischen Einheiten der Domäne präsentiert werden. Für den

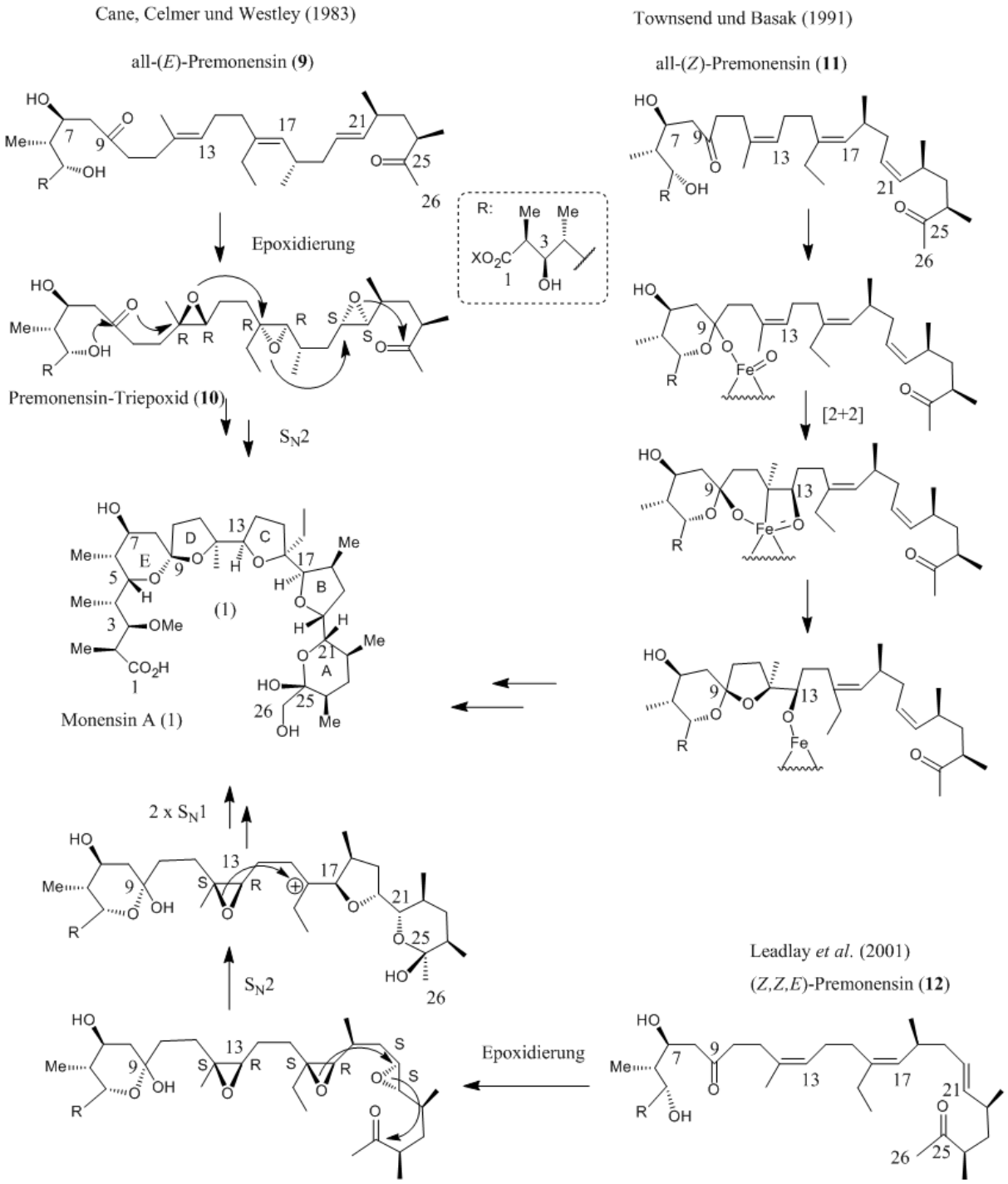
nächsten Verlängerungszyklus wird die wachsende Kette dann auf die β-Ketoacylsynthase des nächsten Moduls übertragen. Dieser Schritt wird von der Acyltransferase katalysiert[4].

Die variable Kombination der reduktiven Domänen trägt mit zur enorm breiten Strukturvielfalt der Polyketide bei ebenso wie die Variabilität der Starter- und Verlängerungseinheiten. Neben Acetyl-CoA und Malonyl-CoA können auch Methyl- sowie Ethylmalonyl-CoA inkorporiert werden[41,49].

Nach 12 Verlängerungszyklen ist das enzymgebundene acylische Trienintermediat Premonensin (9) entstanden[50]. Aus diesem offenkettigen Vorläufermolekül wird nun ein strukturell komplexer und biologisch aktiver Naturstoff gebildet. Die Hydroxylierung von C26 und die Einführung der Methylgruppe am O3 finden nach der Cyclisierung der Polyetherstruktur statt[51].

Es wird vermutet, dass das Polyetherrückgrat von Monensin und anderen Polyetherionophoren durch eine hochselektive oxidative Cyclisierungskaskade gebildet wird. Die Mechanismen dieser Reaktionen sowie die beteiligten Enzyme sind seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Durch Inkorporationsstudien mit $^{18}O_2$ konnte gezeigt werden, dass sich die Ethersauerstoffe an C13, C17, C21 und C26 in Monensin von molekularem Sauerstoff ableiten[52–54]. Dies ließ die Beteiligung einer oder mehrerer Monooxygenasen an der Biosynthese von Monensin vermuten. So postulierten Cane, Celmer und Westley 1983 ein universell gültiges stereochemisches Modell für die Biogenese der Polyetherantibiotika: Sie schlugen vor, dass die Biosynthese von Monensin über ein acyclisches *all-(E)*-Trien-Intermediat (9) verläuft, das zunächst in das Triepoxid (10) überführt wird (siehe Schema 1). Im Anschluss löst der nucleophile Angriff der C5-Hydroxygruppe auf die Carbonylgruppe am C9 eine Kaskade von *all-exo*-Epoxidöffnungen aus, durch die dann die Heterozyklen aufgebaut werden. Diese Epoxidöffnungen verlaufen alle unter Inversion, also nach S_N2[55]. Für das 12,13-Epoxid und das 16,17-Epoxid sind diese allerdings energetisch sehr ungünstig, da es sich um Inversionen an tertiären Zentren handelt.



Schema 1: Die oxidative Cyclisierung zu Monensin A ist Gegenstand intensiver Forschung. Bis heute wurden drei verschiedene Hypothesen zum Mechanismus dieser Reaktionskaskade postuliert.

Obwohl die Untersuchungen zur Polyetherbiosynthese in den folgenden Jahren die Hypothese von Cane, Celmer und Westley untermauerten, führte die Fütterung von radioaktiv markiertem *all-(E)*-Premonensin (9) nicht zur Produktion von radioaktiv markiertem Monensin (1) in *Streptomyces cinnamonensis*[56]. Dies veranlasste Townsend und Basak 1991 dazu, eine alternative Biosyntheseroute über ein *all-(Z)*-Trien (11) vorzuschlagen. Eine eisenhaltige Monooxygenase sollte dann durch eine Folge von [2+2] oxidativen Cycloadditionen den Aufbau des Polyethergrundgerüsts katalysieren[57].

2001 identifizierten Leadlay *et al.* bei der Sequenzierung des Monensin-Biosynthese-Genclusters zwei homologe Gene *monBI* und *monBII*[46]. Zunächst wurde vermutet, dass sie für Isomerasen codieren, die die *trans-cis*-Isomerisierung der Doppelbindungen in Premonensin katalysieren. Diese Vermutung veranlasste sie zur Postulierung einer dritten Biosynthese-Hypothese, bei dem das Triepoxid aus (*Z,Z,E)*-Premonensin (12) gebildet wird. Ihr Modell umging die energetisch ungünstigen Inversionen an tertiären Zentren durch den Vorschlag von zwei S_N1-Angriffen an diesen Zentren unter Retention der Stereochemie[58].

Die Sequenzierung der Biosynthese-Gencluster der Polyetherantibiotika Monensin (*mon*)[46], Nanchangmycin (*nan*)[59], Nigericin (*nig*)[60], Tetronomycin (*tet*)[61] und Lasalocid (*lsd*, *las*)[62,63] erbrachte dann weitere Hinweise für die Richtigkeit des Cane-Celmer-Westley-Mechanismus. Alle fünf Cluster enthalten konservierte Gene, die für eine Flavin-abhängige Epoxidase (*monCI* für Monensin) und eine bzw. zwei Epoxid-Hydrolasen (*monBI* und *monBII* für Monensin) codieren[64,65].

Nachdem es der Gruppe um Leadlay jedoch gelungen war, einen (*E,E,E*)-Polyketid-Trien-Monensinvorläufer aus einem Epoxidase-defizienten *S. cinnamonensis* Stamm zu isolieren[50], zog die Arbeitsgruppe ihren Biosynthesevorschlag zurück, da dieser Befund alle Mechanismen mit *Z*-Doppelbindungsintermediaten entschieden ausschloss.

Und so folgt das momentan akzeptierte Modell für die Biosynthese von Monensin der Cane-Celmer-Westley-Hypothese: Danach erfolgt zunächst eine Epoxidierung des *all-E*-Trienintermediats zum Triepoxid durch die Non-Häm, Flavin-abhängige Epoxidase MonCI. Die folgenden Epoxidöffnungs- und Ringschlussreaktionen werden dann von den beiden homologen Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII katalysiert.

1.2 Oxidative Cyclisierungskaskaden für die Biosynthese von cyclischen Ethern

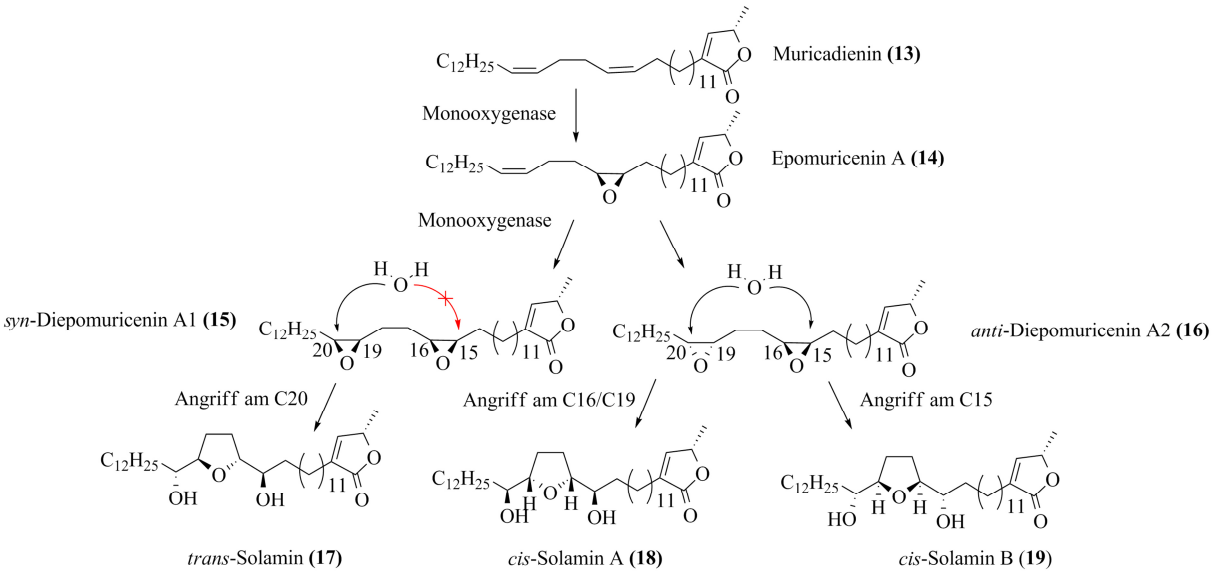
Polyetherantibiotika sind nicht die einzigen Naturstoffe mit Polyketid-Ursprung, die cyclische Ether als Strukturelemente aufweisen. Die marinen Leiterpolyether enthalten das Motiv ebenfalls, genau wie einige Vertreter der großen Gruppe der Acetogenine. Obwohl die Biosynthese dieser beiden Verbindungsklassen bei weitem nicht so gut untersucht ist wie die der Polyetherionophore, ist davon auszugehen, dass auch die cyclischen Polyether in diesen Verbindungsklassen durch oxidative Cyclisierungskaskaden aufgebaut werden.

1.2.1 Acetogenine

Die Acetogenine sind Polyketide, die ausschließlich von Pflanzen und Bäumen aus der Familie der Annonengewächse produziert werden. Bis heute sind über 400 Acetogenine isoliert und charakterisiert worden. Sie bestehen aus einer C32- oder C34-Fettsäure mit einem terminalen γ-Lacton und können neben Doppelbindungen, Hydroxy-, Keton- oder Epoxygruppen auch Tetrahydrofuran- (THF-) oder Tetrahydropyran- (THP-) Ringe enthalten.

1.2.1.1 Biosynthese der Acetogenine

Die Solamine sind drei isomere Acetogenine, die aus den Wurzeln der Stachelannone (*Annona muricata*) isoliert wurden[66]. Sie weisen neben dem charakteristischen γ-Lacton und einer C32-Kette einen einzigen THF-Ring auf. Dieser ist beim *trans*-Solamin (17) (oder nur Solamin) *trans*-konfiguriert und weist bei den beiden *cis*-Solaminen A (18) und B (19) eine *cis*-Konfiguration auf[67–69]. Studien deuten darauf hin, dass das gemeinsame Vorläufermolekül für alle drei Solamine das Muricadienin (13) ist. Die *cis*-Doppelbindungen dieses Moleküls werden epoxidiert - sowohl Epoxymuricanin A (14) und B als auch die diastereomeren Diepoxide sind bereits isoliert worden[70,71], beteiligte Monooxygenasen konnten allerdings bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Im Anschluss erfolgt die Epoxidöffnung durch den nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls. Betrachtet man nur die *cis*-Solamine, so könnte man vermuten, dass für die Epoxidöffnungen keine Enzymkatalyse nötig ist, sondern das Wasser nucleophil unselektiv am C15, C16, C19 oder C20 von *syn*-Diepomuricanin A1 (14) und *anti*-Diepomuricanin A2 (15) angreift[69,72].
Allerdings fällt auf, dass von *trans*-Solamin bisher nur ein Stereoisomer bekannt ist. 15,16,19,20-tetra-*epi*-Solamin scheint nicht gebildet zu werden. Und so ist es auch bei der Biosynthese der Acetogenine anzunehmen, dass es sich bei den oxidativen Cyclisierungen nicht um einen spontanen Prozess handelt, sondern um enzymkatalysierte Reaktionen[72].



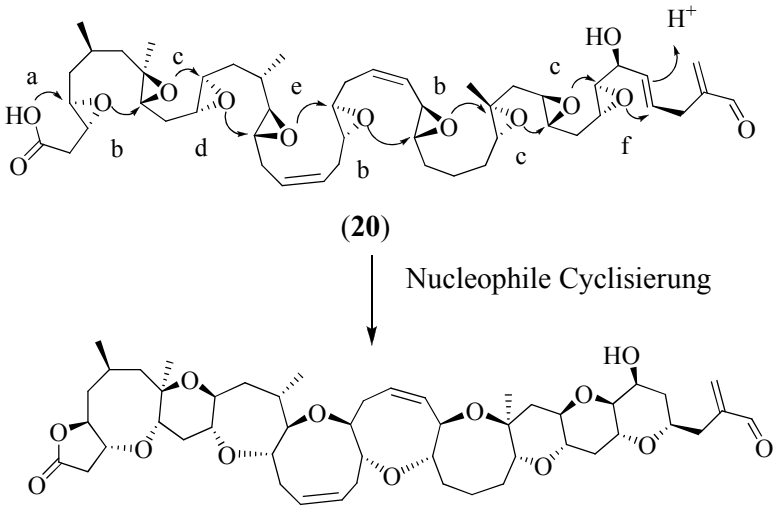
Schema 2: Mutmaßliche Biosynthese der Solamine

1.2.2 Marine Leiterpolyether

Marine Leiterpolyether werden von einzelligen Algen, den Dinoflagellaten, produziert und zeichnen sich durch *trans*-anellierte Etherringsysteme mit *trans-syn* Topographie der Ringverknüpfungen aus[73]. Zu dieser Naturstoffklasse gehört auch das Maitotoxin, der größte und toxischste nicht-polymere Naturstoff (Molekulargewicht: 3.4 kDa), bestehend aus 32 fünf- bis achtgliedrigen cyclischen Etherringen[16]. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der marinen Leiterpolyether reicht die Bandbreite ihrer biologischen Aktivitäten von extremer Giftigkeit bis hin zu antimykotischer und Antikrebswirkung[74].

1.2.2.1 Biosynthese der marinen Leiterpolyether

Brevetoxine sind Neurotoxine und werden von der Alge *Karenia brevis* produziert. Nach ihrer Isolierung und Charakterisierung durch Nakanishi und Clardy[14,75] stellten Shimizu und Nakanishi 1984 unabhängig voneinander eine Hypothese für die Biosynthese dieser Naturstoffklasse auf. Ausgehend von einem all-*trans*-Polyenvorläufermolekül, aus dem dann das all-*trans*-Epoxyintermediat (20) gebildet wird, erfolgt im letzten Schritt durch eine Kaskade von S_N2-all-*endo*-Epoxidöffnungsreaktionen die Cyclisierung zum Brevetoxin[76,77] (siehe Schema 3).



Brevetoxin A (**21**)

a: 5-*endo*-tet; b: 8-*endo*-tet; c: 6-*endo*-tet; d: 7-*endo*-tet;
e: 9-*endo*-tet (*anti*-Baldwin); f: 6-*endo*-trig (Baldwin)

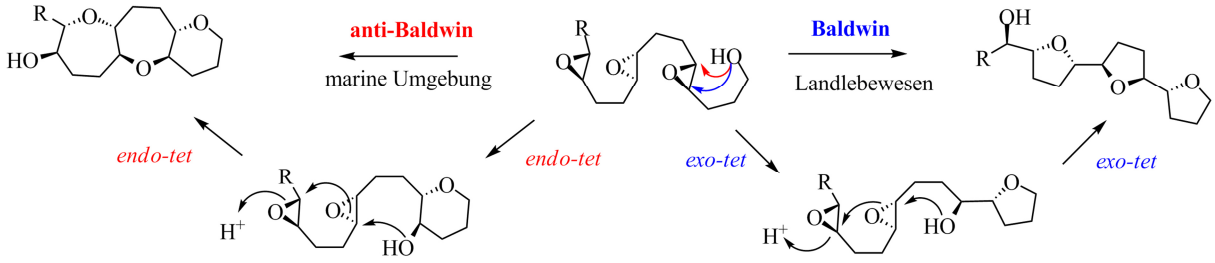
Schema 3: Nucleophile Cyclisierungskaskade zum Brevetoxin A

Damit diese Kaskade tatsächlich zur korrekten Stereochemie des Brevetoxins führt, müssen alle Epoxide die gleiche absolute Konfiguration aufweisen. Dies könnte erreicht werden, wenn eine einzige Monooxygenase jede einzelne der *trans*-Doppelbindungen im Vorläufer Polyen entweder von der *Re*- oder von der *Si*-Seite zum *all-S,S*- oder *all-R,R*-Polyepoxid epoxidiert. Anders als beim Triepoxy-Premonensin, bei dem die nun folgenden *exo-tet*-S_N2-Ringschlussreaktionen den Baldwin-Regeln entsprechend zum kinetisch begünstigten kleineren Ring verlaufen[78], müssen bei der Cyclisierung des Prebrevetoxin-Polyepoxids neun energetisch ungünstige *endo-tet*-Ringschlussreaktionen ablaufen. Dies lässt vermuten, dass diese Ringschlussreaktionen von einer (oder mehreren) Epoxid-Hydrolasen dirigiert werden[72,76,77].

Andererseits haben Modellstudien an Polyepoxiden gezeigt, dass auch bei nicht-enzymkatalysierten nucleophilen Epoxidöffnungskaskaden die *anti*-Baldwin-Produkte entstehen können: Ist bereits ein Tetrahydropyranring als „Templat“ in der Struktur vorhanden, so läuft im neutralen, wässrigen Milieu die *endo*-selektive nucleophile Epoxidöffnungskaskade zu anellierten Leiterpolyethern ab. Jamison postulierte, dass dabei sowohl Ladungsstabilisierungen als auch die Stabilisierung von *twist*-Boot-Konformationen eine Rolle spielen[79,80].

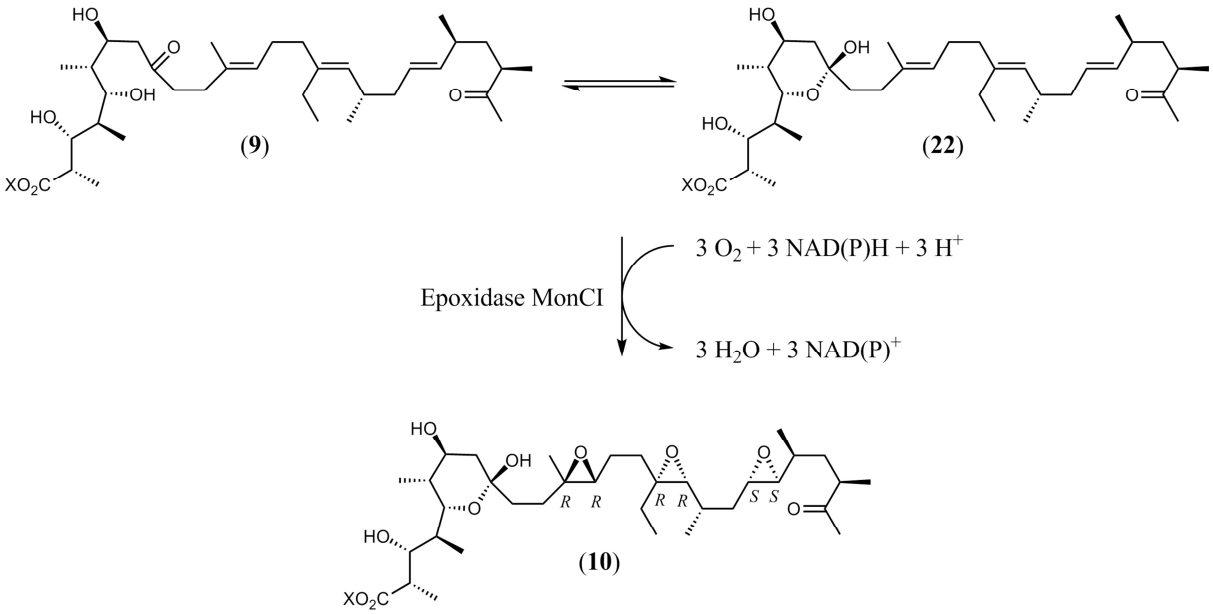
1.3 Land vs. Meer

Das Konzept für die Biosynthese von cyclischen Ethern scheint bei Pflanzen, Bakterien und Protisten gleich zu sein: Die Biosynthese verläuft in allen Fällen von all-*trans*- oder all-*cis*-Polyenen über Polyepoxide, die dann durch nucleophile Epoxidöffnung zu den Ethern cyclisieren. Ob die Ringschlüsse den Baldwin-Regeln entsprechen, scheint sowohl enzymatisch als auch durch das Lösungsmittel beeinflusst zu werden. So verlaufen die Ringschlussreaktionen bei Landlebewesen den Baldwin-Regeln entsprechend *exo*-selektiv, während in Meeresorganismen Polyepoxide durch *endo*-selektiv verlaufende Kaskaden in annelierte Polyetherringe überführt werden[72,81].



Schema 4: Land vs. Meer: Enzymatisch katalysierte Ringschlussreaktionen laufen bei Landlebewesen den Baldwin-Regeln entsprechend ab, in mariner Umgebung werden dagegen die *anti*-Baldwin Produkte gebildet[72,81].

1.4 Flavin-abhängige Monooxygenasen



Schema 5: Potentielle Triepoxidierung von Premonensin durch die Flavin-abhängige Monooxygenase MonCI

Die Biosynthese-Gencluster von Monensin, Nigericin, Nanchangmycin, Lasalocid, Salinomycin und Tetronomycin enthalten alle jeweils ein Gen, das für eine Flavin-abhängige Monooxygenase codiert[46,59–63,82]. Auch wenn bis heute noch kein Triepoxyintermediat isoliert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass MonCI alle drei Epoxidierungen von Premonensin katalysiert (siehe Schema 5). Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so wäre das Enzym die erste Epoxidase, die sowohl (*R,R*)- als auch (*S,S*)-Epoxide aufbauen kann[65]. Wie genau der katalytische Mechanismus von MonCI abläuft, ist aber noch nicht abschließend geklärt. MonCI ist ein 496 Aminosäuren langes und 53 kDa schweres Enzym[46]. Bioinformatische Studien deuten darauf hin, dass das Enzym über eine Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) / Nicotinamid-Dinukleotid-(Phosphat) (NAD(P))-Bindungsdomäne am Aminoterminus verfügt. MonCI weist am Aminoterminus ein Strang-Helix-Strang-Motiv auf, das höchstwahrscheinlich der Bindung des Flavin-Cofaktors dient. Ob es sich bei diesem Cofaktor um FAD oder um FMN handelt, bleibt ebenfalls zu klären.

In der Natur kommt Flavin in drei Formen vor. Diese unterscheiden sich in den funktionellen Gruppen an der Ribitylseitenkette: Riboflavin, Flavinmononukleotid (FMN), und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Bis jetzt sind nur Monooxygenasen bekannt, in denen der Flavin-Cofaktor nicht-kovalent gebunden ist[83].

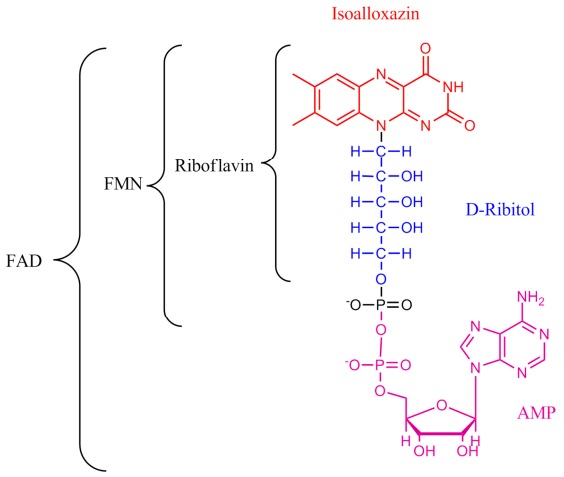
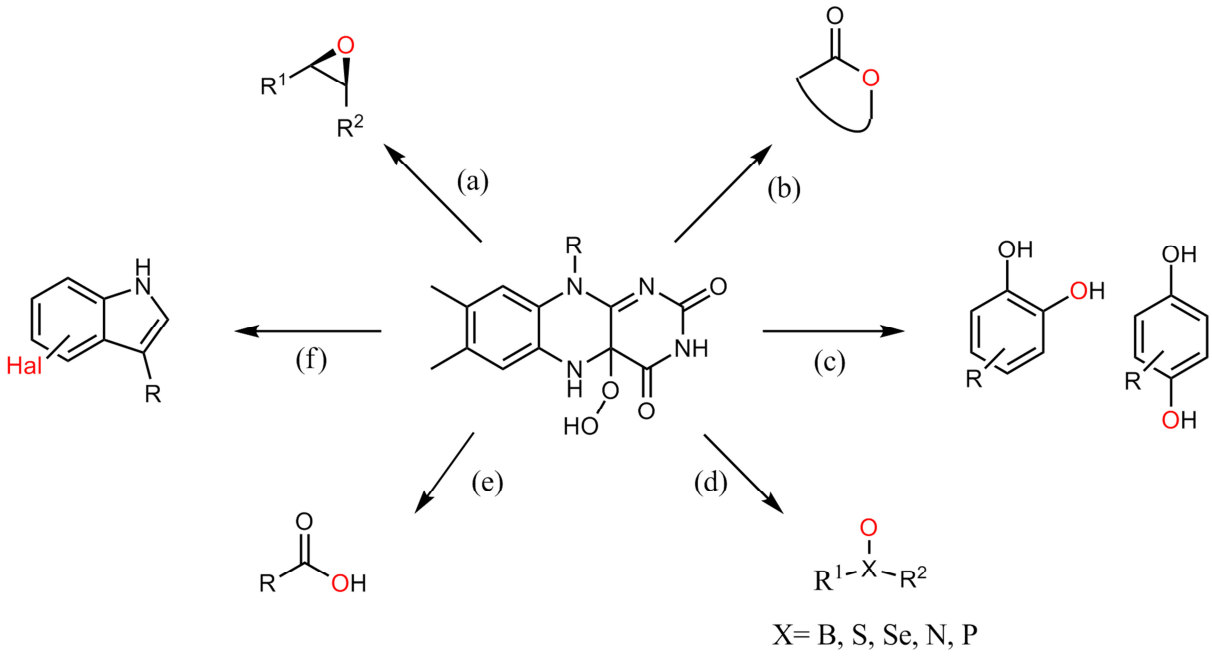


Abbildung 6: Struktur von Riboflavin/ Flavinmononukleotid (FMN), und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)[84]

Flavoprotein-Monooxygenasen spielen aber nicht nur bei der Polyketidbiosynthese eine wichtige Rolle. Sie sind sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen an einer Reihe metabolischer Prozesse beteiligt, wie dem Abbau aromatischer Verbindungen, Antibiotikaresistenzen, Cholesterin-, Antibiotika- und Siderophorbiosynthese[85].

Neben der Epoxidierung von C–C-Doppelbindungen (siehe Schema 6, (a)) katalysieren Flavin-abhängige Monooxygenasen Baeyer–Villiger-Oxidationen von (cyclischen) Ketonen (b), *ortho*- und *para*-Hydroxylierungen von Phenolen (c), Oxygenierungen von Heteroatomen (d), Oxidationen von Aldehyden zu Carbonsäuren (e) und außerdem Halogenierungsreaktionen (f). Dabei scheint die Faltung des Enzyms die Art der Oxygenierung vorzugeben[85].

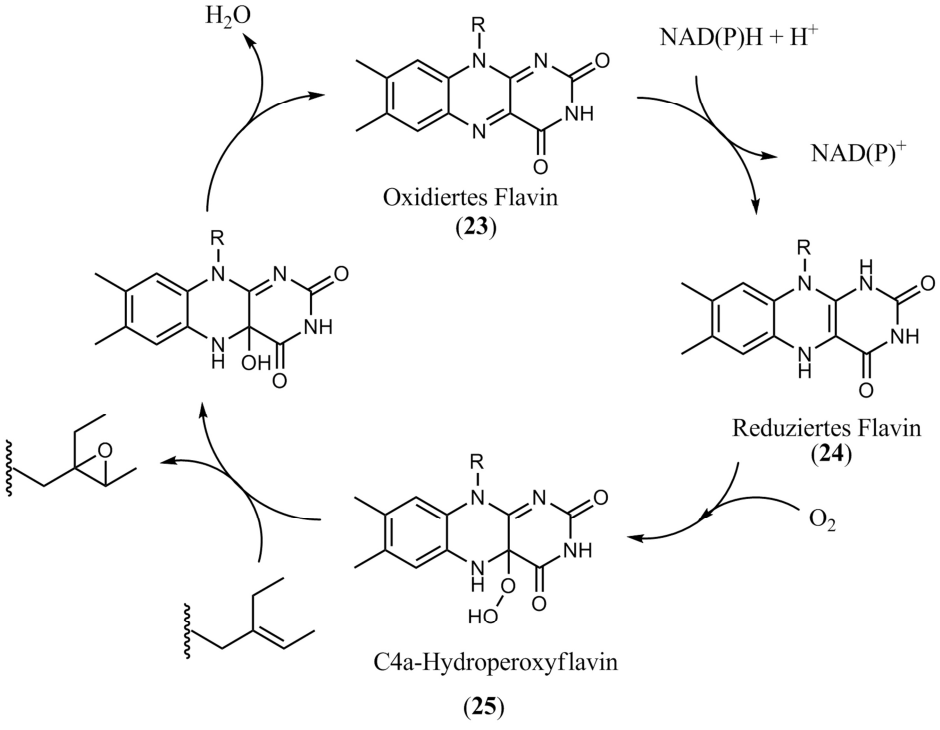


Schema 6: Reaktionen, die von Flavin-abhängigen Monooxygenasen katalysiert werden (adaptiert aus [85])

Die meisten Flavin-abhängigen Monooxygenasen verwenden molekularen Sauerstoff, um eine organische Verbindung zu oxygenieren[86]. Für diese Reaktion ist ein reduzierter Flavin-Cofaktor nötig, der dann wiederum molekularen Sauerstoff reduzieren kann. C4a-Hydroperoxyflavin ist dabei die aktive Cofaktorspezies, die das Sauerstoffatom auf das Substrat überträgt[87].

Die Enzyme werden in interne (EC 1.13.12) und externe (EC 1.14.13) Monooxygenasen unterteilt. Während die Reduktion des Flavin-Cofaktors bei internen Monooxygenasen durch das Substrat selbst erfolgt (Beispiel: Laktat-Monooxygenase (EC 1.13.12.4), die Laktat zu Pyruvat oxidiert), benötigen die externen Monooxygenasen wie MonCI reduzierte Coenzyme wie NADPH oder NADH zur Reduktion. Hierbei lässt sich wiederum unterscheiden zwischen Monooxygenasen mit Reduktionsdomäne und solchen, die eine externe Flavin-Reduktase benötigen[88].

Der Mechanismus der Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch den Flavin-Cofaktor verläuft wie in Schema 7 dargestellt: Im ersten Schritt findet eine Hydridübertragung vom reduzierten Nicotinamid-Cofaktor (NAD(P)H) auf die Isoalloxazingruppe des Flavin-Cofaktors (23) statt. Nun kann der reduzierte Flavin-Cofaktor (24) mit molekularem Sauerstoff reagieren. Dabei erfolgt die Übertragung eines Elektrons vom reduzierten Flavin auf das Sauerstoffmolekül unter Entstehung eines Komplexes aus dem Superoxid-Radikal und dem Flavinradikal. Durch eine Spinumkehr entsteht im nächsten Schritt reduzierter Sauerstoff. Bei den meisten Flavin-abhängigen Monooxygenasen bildet sich nun eine kovalente Bindung zwischen dem C4a des Flavins und dem Sauerstoffmolekül. Dabei entsteht ein reaktives C4a-Hydroperoxyflavinintermdediat (25). Flavin-abhängige Monooxygenasen stabilisieren dieses Intermediat, sodass ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen werden kann, während das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird[89,90].



Schema 7: Mechanismus der Oxygenierung durch Flavin-abhängige Monooxygenasen [91]

Die bakterielle Styrol-Monooxygenase (SMO) ist ein Beispiel für ein Zwei-Komponenten-System bestehend aus einer Monooxygenase (SMOA, StyA) und einer Reduktase (SMOB, StyB), die gemeinsam die Epoxidierung von Styrol (26) zu Styroloxid (27) katalysieren. Die NADH-abhängige Reduktase (SMOB) stellt dabei reduziertes Flavin für die Oxygenase-Komponente (SMOA) zur Verfügung. Molekularer Sauerstoff reagiert dann mit dem reduzierten Cofaktor unter Bildung eines Peroxyflavins, das im nächsten Schritt dann das Substrat Styrol oxidieren kann[92].

Da die bakteriellen SMOs eine hohe Enantioselektivität aufweisen und fast ausschließlich (*S*)-Styroloxid bilden, sind sie von sehr großem biotechnologischem Interesse[93].

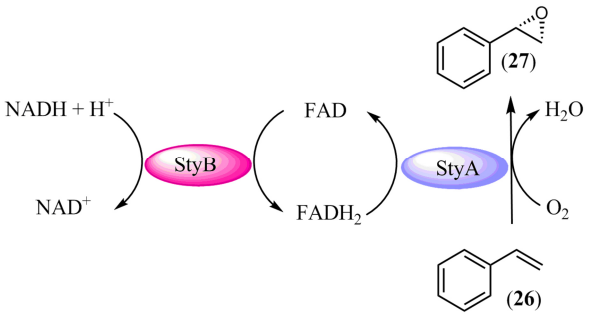


Abbildung 7: Epoxidierung von Styrol durch die bakterielle Styrol-Monooxygenase StyAB[92]

Ein weiteres Beispiel für eine Flavin-abhängige Monooxygenase ist die *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH) (EC 1.14.13.2) aus *Pseudomonas aeroguinosa.* PHBH katalysiert die *ortho*-Hydroxylierung von 4-Hydroxybenzoat (28) zu 3,4-Dihydroxybenzoat (29), eine Reaktion beim bakteriellen Abbau aromatischer Verbindungen. Jede Untereinheit dieses Homodimers enthält einen nicht-kovalent gebundenen FAD-Cofaktor[94].

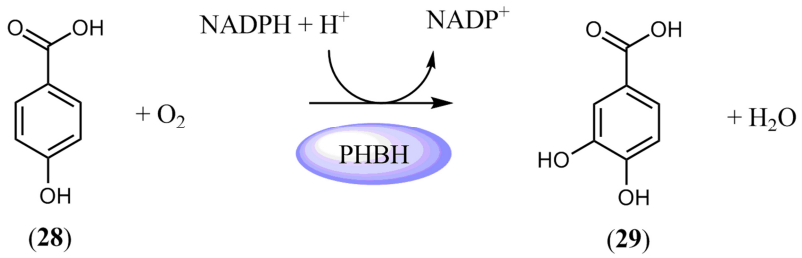


Abbildung 8: *ortho*-Hydroxylierung von 4-Hydroxybenzoat zu 3,4-Dihydroxybenzoat, katalysiert durch die *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase[94]

Die Struktur der PHBH ist röntgenkristallographisch aufgeklärt worden[95] und seine Faltung scheint unter Flavoenzymen verbreitet zu sein. In dieser Arbeit wurde die Struktur der PHBH als Vorlage für Modelling-Studien mit MonCI genutzt. Das Enzym weist eine FAD-Bindungsdomäne und eine Substrat-Bindungsdomäne auf. Das aktive Zentrum befindet sich dort, wo die beiden Domänen aufeinander treffen. In der reduktiven Halbreaktion wird das oxidierte Flavin-Coenzym des Enzym-Substrat-Komplexes durch NADPH reduziert. Die folgende oxidative Halbreaktion beginnt mit der Reaktion des reduzierten FADs mit Sauerstoff, gefolgt von der Hydroxylierung des Substrats und der

Reoxidation des Flavins. Kristallographische und *rapid-kinetics*-Studien haben gezeigt, dass der Isoalloxazinring des FAD-Cofaktors mobil ist und für die Reduktion mit NADPH aus dem aktiven Zentrum herausschwingt. Dies garantiert eine bessere Zugänglichkeit für die Reduktionsäquivalente. Für seine eigentliche enzymatische Aktivität schwingt der Isoalloxazinring dann wieder ins aktive Zentrum des Enzyms zurück[96].

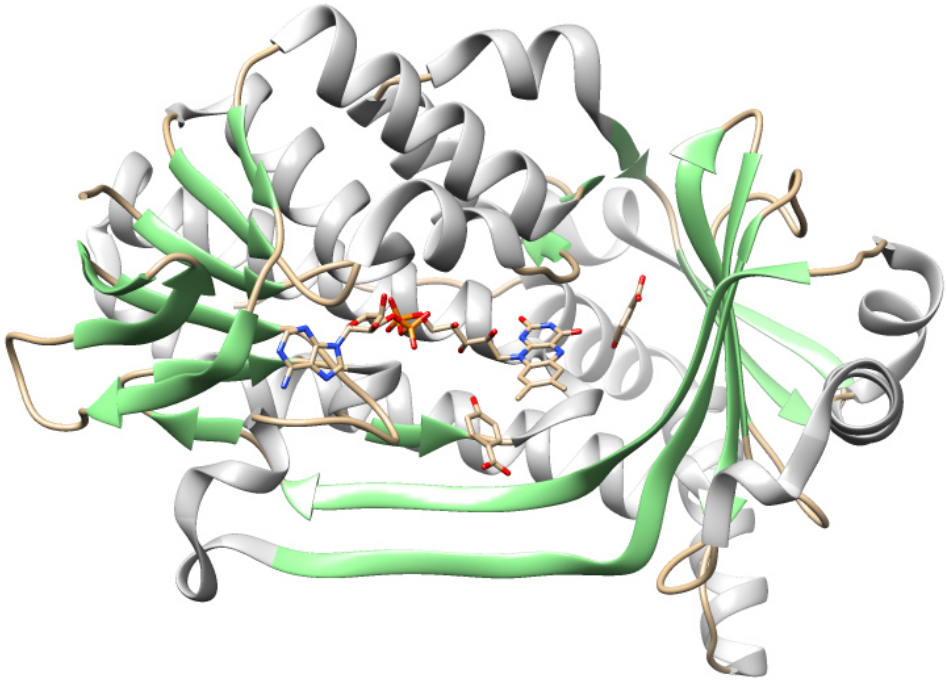
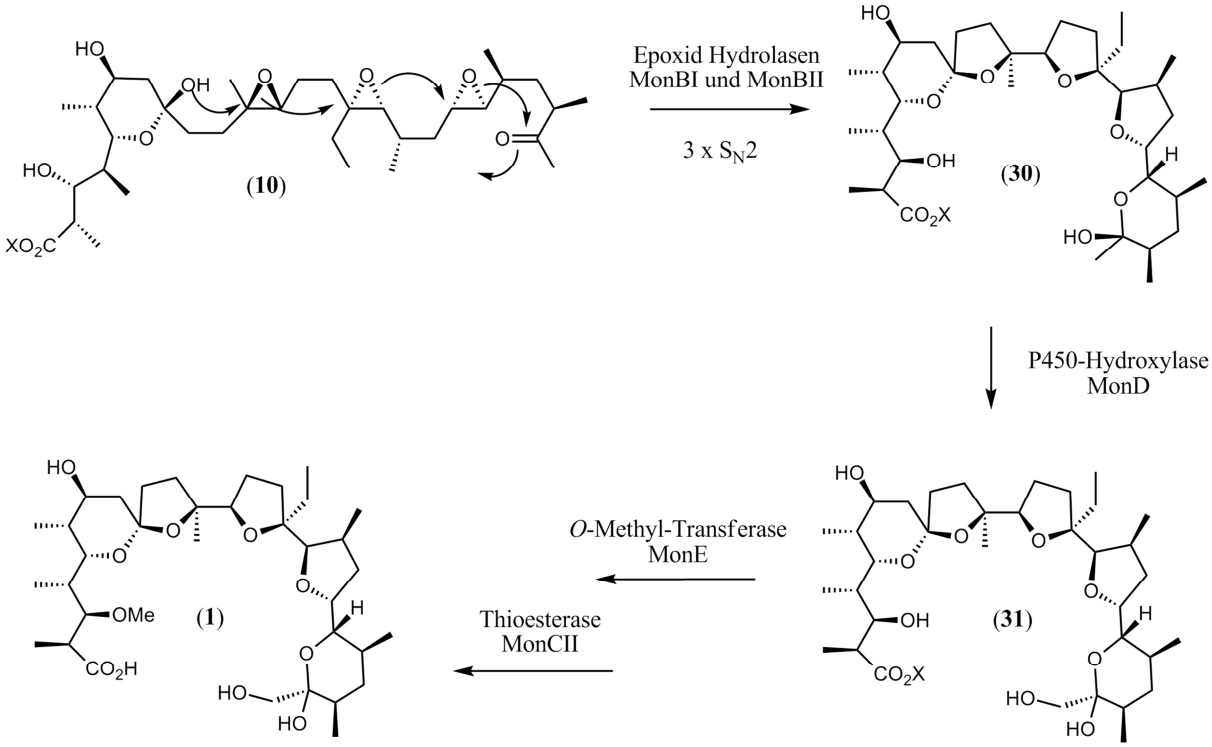


Abbildung 9: Röntgenkristallstruktur der *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase PHBH[95], (PDB ID 1k0i)

1.5 Epoxid-Hydrolasen in Polyether-Biosyntheseclustern

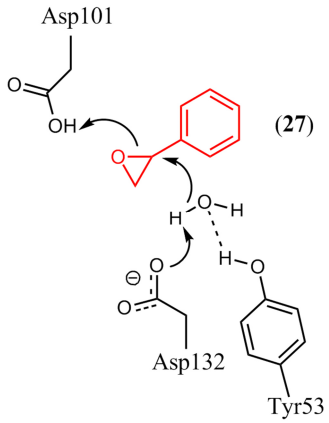
Enzymatische Epoxidöffnungskaskaden sind Schlüsselreaktionen für die Konstruktion von strukturell vielfältigen Polyethern. Die Sequenzierung der Biosynthese-Gencluster von Monensin, Nigericin, Nanchangmycin, Lasalocid, Salinomycin und Tetronomycin hat gezeigt, dass alle Cluster konservierte Epoxid-Hydrolase-Gene enthalten: *monBI*, *monBII* (Monensin)[46] und *nigBI*, *nigBII* (Nigericin)[60]. Im Fall von *lsd19* (Lasalocid)[62,63] and *nanI* (Nanchangmycin)[59], werden zwei Enzymkopien durch ein einzelnes Gen codiert. Im Biosynthesegencluster für Salinomycin sind sogar drei Gene *slnBI*, *slnBII* und *slnBIII* vorhanden, die für Epoxid-Hydrolasen codieren[82]. Das Tetronomycin-Gencluster enthält dagegen nur eine Kopie des Epoxid-Hydrolase-Gens *tmnB*. Das Polyetherantibiotikum Tetronomycin enthält dementsprechend auch nur einen Tetrahydrofuranring, der sich von einem Epoxid ableitet[61].



Schema 8: Modell der Epoxidöffnungskaskade zu Monensin, katalysiert von MonBI und MonBII[51]

Es wird vermutet, dass die Epoxid-Hydrolasen MonBI (144 Aminosäuren, 15,8 kDa) und MonBII (140 Aminosäuren, 15,5 kDa) die nucleophile all-*exo*-Öffnungskaskade des Triepoxids (10) katalysieren. Bis zum fertigen Naturstoff sind anschließend nur noch drei Reaktionen nötig: Zunächst erfolgt eine Hydroxylierung an C26, katalysiert durch die P450-Hydroxylase MonD, gefolgt von der Synthese des Methylethers an O3, katalysiert durch die *O*-Methyl-Transferase MonE[51,97]. Mit der Spaltung des Monensin-ACP-Thioesters durch die Thioesterase MonCII ist die Biosynthese des Polyethers dann abgeschlossen[45].

Die von MonBI und MonBII katalysierten Epoxidöffnungen verlaufen vermutlich mittels Säure-Base-Katalyse über einen einstufigen „Push-Pull“-Reaktionsmechanismus wie bei der Limonen-Epoxid-Hydrolase (LEH). Hier wird das angreifende Wassermolekül durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp132, Asn55 und Tyr53 positioniert und aktiviert. Asp132 wirkt zudem als Base und abstrahiert ein Proton des Wassermoleküls. Zugleich wird das geöffnete Epoxid durch Asp101 protoniert. Damit der Katalysezyklus erneut ablaufen kann, erfolgt anschließend die Übertragung des Protons von Asp132 auf Asp101. Arg99 fungiert hier als Protonenshuttle[98,99].



Schema 9: Mechanismus der Epoxidöffnung von Styroloxid (27), katalysiert durch die Limonen-Epoxid-Hydrolase[98,99]

Auch Lsd19 katalysiert die Epoxidöffnungen mittels Säure-Base-Katalyse. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind Asp38/Glu65 (Lsd19A) und Asp170/Glu197 (Lsd19B). Sequenzvergleiche legen nahe, dass Asp37/Glu64 (MonBI) und Asp38/Glu65 (MonBII) diese Aufgabe bei der Biosynthese von Monensin übernehmen. Dabei entspricht MonBII Lsd19A (39 % Sequenzidentität) und MonBI Lsd19B (44 % Sequenzidentität)[100–102].

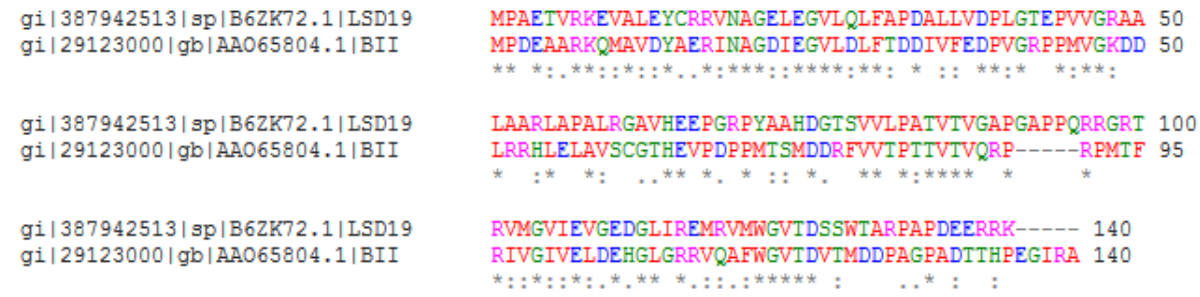


Abbildung 10: Sequenzvergleich von Lsd19A mit MonBII – Die Sequenzidentität liegt bei 39 % [1]

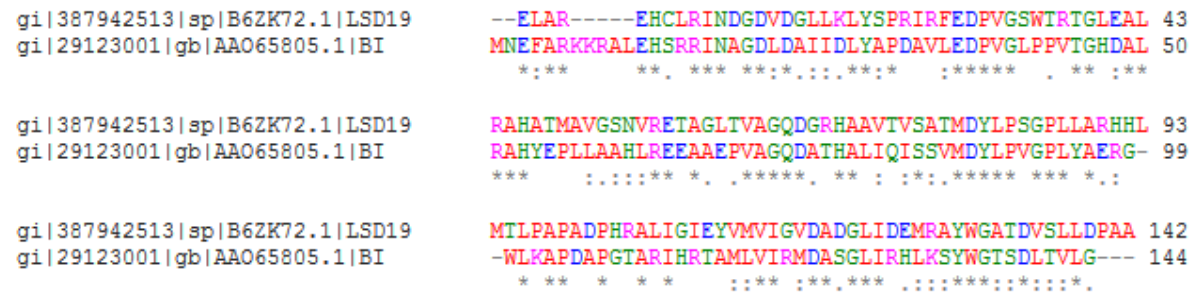
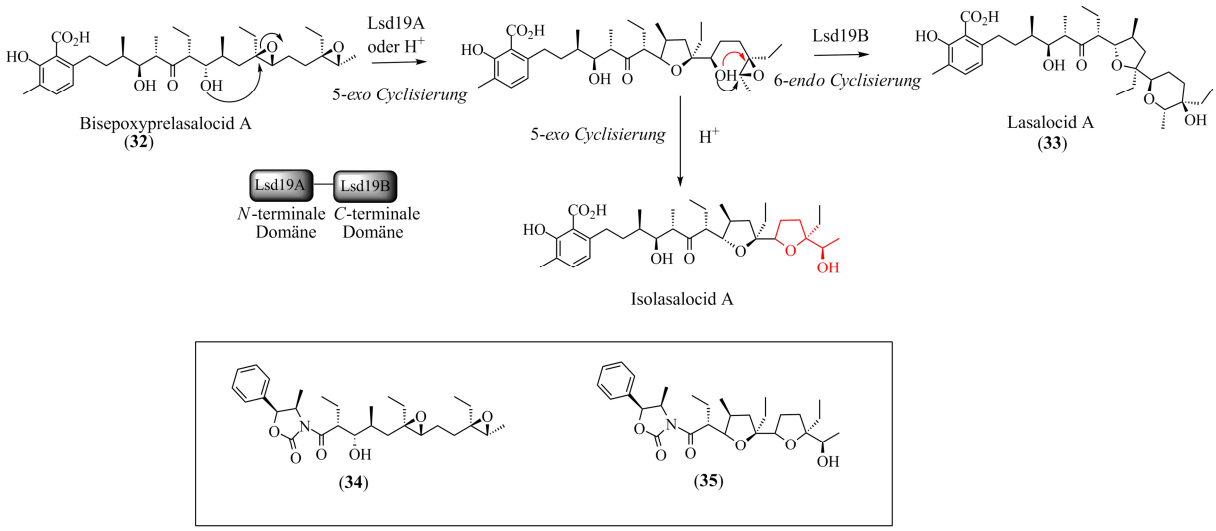


Abbildung 11: Sequenzvergleich von Lsd19B mit MonBI – Die Sequenzidentität liegt bei 44 %

Vor Beginn dieser Arbeit war keine Struktur von Polyether-Epoxid-Hydrolasen bekannt. Im Jahr 2012 gelang es dann Oikawa *et al.*, die Struktur der Epoxid-Hydrolase Lsd19 (PDB ID: 3rga) aus dem biosynthetischen Gencluster von *Streptomyces lasaliensis* aufzuklären[103](siehe Abbildung 12). Lsd19 katalysiert die Epoxidöffnung und Cyclisierung von Bisepoxyprelasalocid A (32) zum Polyetherantibiotikum Lasalocid A (33) und ist damit die erste bekannte *endo*-dirigierende Epoxid-Hydrolase. Die Domäne Lsd19B katalysiert die *anti*-Baldwin-Cyclisierung zum Tetrahydropyranring[104,105].

[1] (*) konservierte Aminosäure; (:) Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften (> 0.5 in der Gonnet-PAM-250-Matrix); (.) Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (=< 0.5 in der Gonnet-PAM-250-Matrix)
Rot – kleine und hydrophobe Aminosäure, Blau – saure Aminosäureseitenkette, Magenta – basische Aminosäureseitenkette, Grün – Glycin oder Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Aminrest in der Aminosäureseitenkette [100–102]



Schema 10: Mechanismus der nucleophilen Epoxidöffnungskasakade zu Lasalocid A, katalysiert durch Lsd19[104,105]

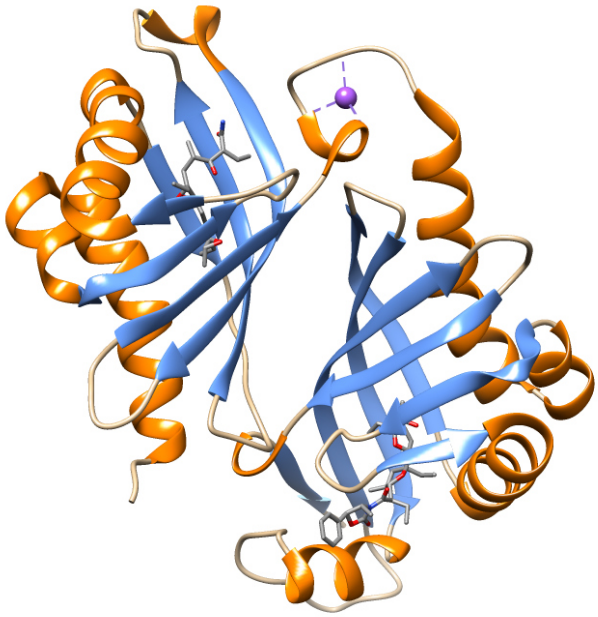
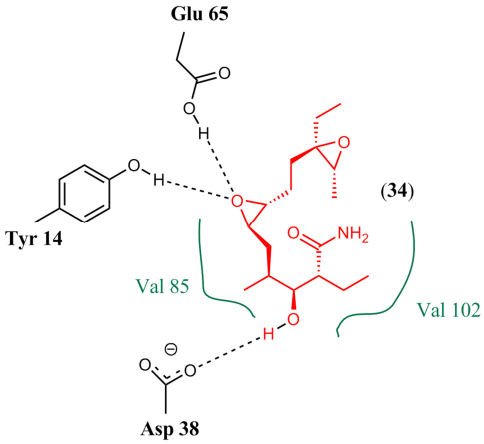


Abbildung 12: Röntgenkristallstruktur der Epoxid Hydrolase Lsd19[103] (PDB ID: 3rga)

Lsd19 wurde mit dem Modellsubstrat 34 (siehe Schema 10) bei pH 4.6 cokristallisiert und die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.59 Å gelöst. Das Enzym besteht aus zwei homologen Domänen, Lsd19A und Lsd19B, die in Kopf-Schwanz-Orientierung verknüpft und über eine kurze Schleife verbunden sind. Beide gehören zur *Nuclear Transport Factor 2* (NTF2)-Superfamilie, zu der auch die Δ-5-3-Ketosteroid-Isomerasen (KSIs) und die Limonen-1,2-Epoxid-Hydrolase (LEH)[98] gehören. Jede der beiden Domänen besteht aus einem sechssträngigen, gemischten β-Faltblatt, das zusammen mit drei α-Helices einen tiefen Trichter bildet. Lsd19B weist außerdem an der Kante dieses

Trichters eine zusätzliche 18 Aminosäuren lange Schleife-Helix-Schleife-Struktur auf. Das aktive Zentrum befindet sich bei beiden Domänen tief im Inneren des Trichters[103].

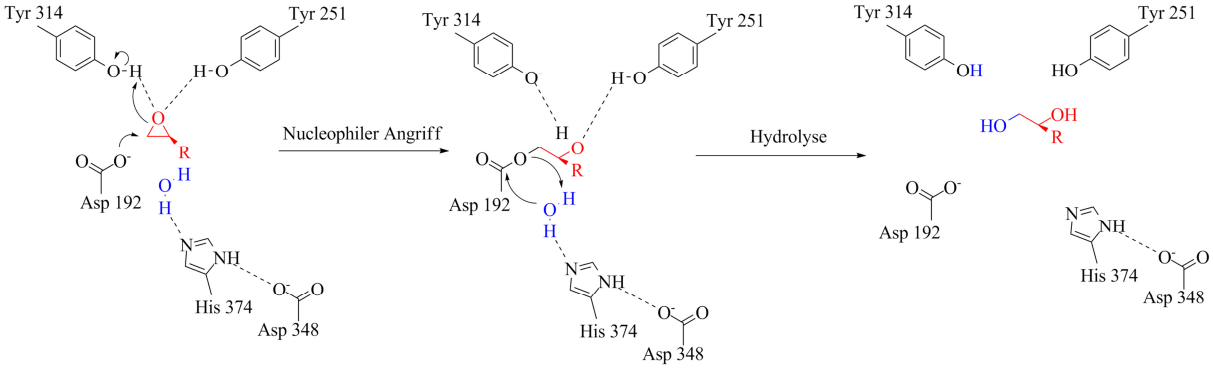
Während bei der Öffnungskaskade zum Monensin A nur Baldwin-5-*exo*-Cyclisierungen unter Bildung von THF-Ringen stattfinden, entsteht bei der Cyclisierung zum Lasalocid ein terminaler THP-Ring, der vermutlich durch eine 6-*endo*-*anti*-Baldwin-Cyclisierung gebildet wird. *In-vitro* Untersuchungen mit Testsubstraten legen nahe, dass Lsd19A die Cyclisierung des ersten Rings im Bisepoxysubstrat katalysiert, während der 6-*endo*-Ringschluss zum Tetrahydrofuran–Tetrahydropyran (THF–THP) Produkt im aktiven Zentrum von Lsd19B stattfindet. Die Kristallstruktur untermauert dieses Postulat jedoch nur bedingt: Im aktiven Zentrum von Lsd19A ist das nicht-cyclisierte Bisepoxysubstrat 34 zu finden. Das aktive Zentrum von Lsd19B enthält dagegen nicht das erwartete *anti*-Baldwin-Produkt, sondern das Baldwin-Produkt 35 mit zwei THF-Ringen. Vermutlich wurde das Enzym durch den niedrigen pH-Wert des Kristallisationspuffers inhibiert, sodass die säurekatalysierte Reaktion ablaufen konnte[103].



Schema 11: Aktives Zentrum von Lsd19A mit Bisepoxyanalog 34[103]

Der Sauerstoff des elektrophilen 18,19-Epoxids bildet Wasserstoffbrücken zum Tyrosin 14 und Glutamat 65 aus. Die Nucleophilie des 15-Hydroxylsauerstoffs wird durch eine Wasserstoffbrücke zum Aspartat 38 verstärkt.

Dieser Mechanismus unterscheidet sich stark vom katalytischen Mechanismus der klassischen Epoxid-Hydrolase (*soluble epoxide hydrolase* und *microsomal epoxide hydrolase*) mit α/β-Hydrolase-Faltung. Diese katalysieren die Öffnung von Epoxiden zu vicinalen Diolen über einen zweistufigen Mechanismus, der ein kovalent gebundenes Alkylenzymintermediat beinhaltet[106]. Die katalytische Triade besteht aus einem Histidinrest und zwei Aspartat- bzw. Glutamatresten. Essentiell sind außerdem zwei Tyrosinreste, die 5-8 Ångström vom Nucleophil entfernt sind und die Positionierung des Substrats im aktiven Zentrum kontrollieren. Die Epoxidöffnung geschieht durch den nucleophilen Angriff eines Aspartatrestes auf das niedriger substituierte Kohlenstoffatom des Epoxids. Dabei bildet sich der kovalente Substrat-Enzymkomplex. Die Histidinbase aktiviert ein Wassermolekül, das dann die Carboxylgruppe des Aspartats angreift und so das vicinale Diol als Produkt abspaltet[107,108].



Schema 12: Mechanismus der Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1[107,108]

Es ist nicht möglich, diese biosynthetische Hypothese direkt auf die Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII zu übertragen, da hier drei Etherringe von zwei Enzymen geschlossen werden müssen. Anders als bei Lasalocid stimmen die Anzahl der Domänen und die Zahl der Epoxide hier nicht überein. In dieser Arbeit wurden die Epoxid-Hydrolasen untersucht. Auf der Basis der hier gewonnenen Erkenntnisse wurde eine Hypothese zum Katalysemechanismus von MonBI und MonBII aufgestellt.

2 Aufgabenstellung

Die oxidative Cyclisierung zum Polyetherantibiotikum Monensin A ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung; zum einen, weil Monensin als eine Art Modellverbindung für die Klasse der Polyethernaturstoffe gilt und zum anderen, weil dieser elegante Biosyntheseweg zum Synthese cyclischer Ether ein Vorbild für die synthetische organische Chemie darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die enzymatische Maschinerie untersucht, die die Transformation des linearen Premonensin-Triens zum fertigen Polyethergerüst katalysiert. Das Ziel war die biophysikalische, funktionelle und strukturelle Charakterisierung der Epoxidase MonCI sowie der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII.

Basierend auf den ausführlichen Vorarbeiten die Arbeitsgruppe von Professor Peter F. Leadlay von der Universität Cambridge erfolgte zunächst die heterologe Expression und Reinigung der drei Enzyme sowie die Produktion und Reinigung des potentiellen Substrats Premonensin.

Ein besonderer Fokus lag auf der strukturellen Charakterisierung der Epoxid-Hydrolasen. Durch kristallographische Studien sollten Informationen über die Interaktionen der beiden Enzyme gewonnen werden. Ausgehend von der Kristallstruktur sollten bioinformatische Studien angestellt werden, um den katalytischen Mechanismus von MonBI und MonBII aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden von den Firmen Applichem, Fluka, Grüssing, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Sterile Plastikware wurde von der Firma Sarstedt gekauft.

Die Lösungsmittel Dichlormethan, Ethanol, Ethylacetat, Methanol und Petrolether wurden vor der Verwendung destilliert. Acetonitril und Methanol für die Flüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) wurden von VWR in HPLC-*Grade*-Qualität bezogen.

Säulenchromatographische Reinigungen von Premonensin wurden an Silicagel 60 (230-400 *mesh*, Porengröße 60 Å, Fluka) durchgeführt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit kieselgelbeschichteten Aluminiumplatten (ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254, MACHEREY-NAGEL) durchgeführt. Zur Detektion wurden UV-Licht (254 nm) und ein Kaliumpermanganat-Färbebad (0.6 g $KMnO_4$, 4 g K_2CO_3, 1 ml 5 % (w/v) NaOH in 60 ml dest. Wasser) verwendet.

3.1.2 Geräte

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Compact XS/S (Biometra)
Autoklav	VX-75 (Systec)
Circular Dichroismus-Spektrometer	J-815 (Jasco)
DLS-Messgerät	SpectroSIZE 300 (Xtal Concepts)
FPLC-Anlage	ÄKTA Purifier (GE Healthcare)
	ÄKTA Explorer (GE Healthcare)
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-4 LD plus (Christ)
Geldokumentationsanlage	BioDocAnalyze digital (Biometra)
Horizontalschüttler	K5 Digi (Edmund Bühler)
Kristallisationsroboter	Honeybee 961 (Genomic Solutions)
Magnetrührer	MR-Hei Standard (Heidolph)
	RCT Standard (IKA)
Gaschromatograph-Massenspektrometer (GC-MS)	6890N Gaschromatograph mit 5975B VL MSD (Agilent Technologies)
GC-MS-Säule	HP-5 ms, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm (Agilent Technologies)
Flüssigkeitschromatograph-Massenspektrometer (HPLC-MS)	
Analytisch:	
LC-ESI-TOF-MS	1200er Series mit 6224 TOF LC/MS (Agilent Technologies)
Analytische HPLC-Säule	Chromsep HPLC Column SS 250 x 4.6 mm, Microsorb 100-5 C18 (Varian)
	ZORBAX Eclipse XDB-C8 Analytical 4.6 x 150 mm,5 µm (Agilent Technologies)
Präparativ:	
LC-ESI-*Single Quadrupole*-MS	1200er Series mit Active Splitter G1986C und 6120 Quadrupol MS (Agilent Technologies)
Präparative HPLC-Säule:	Nucleodur C18 Isis EC 250 x 21 mm, 5 µm, 300 Å (MACHEREY-NAGEL)
Mikroskop	SZX12 mit Kamera DP10 (Olympus)
Mikrowelle	OMV-310S (O.K.)
NMR-Spektrometer	DRX 500 (Bruker Biospin)

PAGE-Kammer	Eco-Mini Gelelektrophoresekammer (Biometra)
PCR-Thermocycler	TProfessional Thermocycler (Biometra)
pH-Meter	sevenEASY (Mettler Toledo)
Photospektrometer	Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
UV/VIS-Photometer	Cary 50 (Varian)
Reinstwasseranlage	Ultra Clear TWF (Siemens Water)
Rotationsverdampfer	Hei-VAP (Heidolph)
Schrankinkubator	BD 53 Brutschrank (Binder)
Schüttelinkubator	Certomat IS (Sartorius)
Sterilwerkbank	Biowizard SilverLine Blue (130 cm) (Kojair)
Stromversorgung (Elektrophorese)	Powerpack (Biometra)
Synchrotron-Messplatz	P14-PetraIII, DESY, Hamburg, Deutschland
Oberflächenplasmonenresonanz- (*Surface Plasmon Resonance*, SPR-) Spektroskopie	
SPR-Chip	Series S NTA (GE Healthcare)
SPR-Messgerät	Biacore T100 (GE Healthcare)
Thermomixer	Thermomixer comfort (Eppendorf)
	Tsc ThermoShaker (Biometra)
Ultraschallhomogenisator	Sonopuls HD 2070 (Bandelin)
Ultraschallwasserbad	Sonorex RK1028 (Bandelin)
Vakuumzentrifuge	Concentrator plus (Eppendorf)
Waage	EMB 600-2 (Kern)
Feinwaage	ABS 220-4 (Kern)
Zentrifugen	5810R, 5804R, 5417R, 5424 (Eppendorf)
	Optima TL Ultrazentrifuge (Beckman Coulter)

3.1.3 Plasmide

Tabelle 3-2: Verwendete Plasmide

Gen	Plasmid	Resistenz	Herkunft
monCI	monCI_pET28b(+)	Kan	Arbeitskreis (AK) Professor Peter F. Leadlay
	monCI_pETM41	Kan	Eigene Herstellung
	monCI_pMAJ21b	Apr	AK Professor Peter F. Leadlay
monBI	monBI_pET20b(+)	Amp	AK Professor Peter F. Leadlay
	monBI_pETM11	Kan	Eigene Herstellung
monBII	monBII_pET20b(+)	Amp	AK Professor Peter F. Leadlay
	monBII_pET28b(+)	Kan	Eigene Herstellung
	monBII_pETM11[2]	Kan	Eigene Herstellung
monBI monBII	monBII_monBI_pETM11	Kan	Eigene Herstellung
tra, neo, RP4	pUZ8002[3]	Kan	AK Professor Peter F. Leadlay
groEL groES dnaK dnaJ grpE	pG-KJE8	Cam	Takara®
Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease	pRK792	Amp	Kapust *et al.*[109] über Addgene®

[2] monBII_pETM11 codiert nur für MonBII bis zum Thr122
[3] Für die Konjugation mit *S. coelicolor* CH999 muss *E. coli* ET12567 das Plasmid pUZ8002 enthalten.

3.1.4 Bakterienstämme

3.1.4.1 *E. coli*

Tabelle 3-3: Verwendete *E. coli*-Stämme

***E. coli*-Stamm**	**Verwendung**
DH5α™ (Invitrogen) Top10™ (Invitrogen)	Für molekularbiologische Arbeiten
BL21 (DE3) BL21 (DE3) pLysS BL21 (DE3) RIL BL21 (DE3) RIPL	Für heterologe Proteinexpressionen
ET12567	Für die Konjugation mit *S. coelicolor* CH999

3.1.4.2 *Streptomyceten*

Tabelle 3-4:Verwendete *Streptomyceten*-Stämme

***Streptomyceten*-Stamm**	**Verwendung**
Streptomyces cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII	Premonensin-Produzent (Im Genom sind die *monCI*-, *monBI*- und *monBII*-Gene durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt.)
Streptomyces coelicolor CH999	Für die heterologe Expressionen der Epoxidase MonCI

Die *Streptomyceten*-Stämme wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Peter F. Leadlay von der Universität Cambridge zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme *BamHI, BspHI, DpnI, Fast Alkaline Phosphatase, NcoI* und *XbaI* sowie die Reaktionspuffer 10 x Tango Puffer und 10 x BamHI Puffer wurden von Thermo Scientific bezogen.

3.2 Puffer und Medien

3.2.1 Puffer

Puffer für die DNA- und Proteingelektrophorese wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Es wurde bidestilliertes (bidest.) Wasser verwendet, um die 10 x konzentrierten Laufpuffer zu verdünnen.
Da der pH-Wert von Tris-Puffern temperaturabhängig ist, wurden Puffer, die bei 4 °C verwendet werden sollten, vor dem Einstellen des pH-Wertes heruntergekühlt.
Puffer für die Proteinaufreinigung und die biophysikalische Enzymcharakterisierung wurden sterilfiltriert (0.22 µm) und anschließend im Kühlschrank gelagert.

3.2.1.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Tabelle 3-5: Zusammensetzung des TAE-Laufpuffers

10 x TAE-Laufpuffer	
400 mM	TrisHCl
10 mM	EDTA
200 mM	Essigsäure

Auf pH 8.0 einstellen (bei RT)

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des DNA-Ladepuffers

10 x DNA-Ladepuffer	
36 mM	Bromphenol Blau
46 mM	Xylen Cyanol FF
40 % (v/v)	Glycerin

Mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen

- DNA-Größenstandard

GeneRuler™ DNA Ladder 1 kb (250 – 10 000 bps) (Thermo Scientific)

- DNA-Färbelösung

10 µl GelRed™ (Biotium) in 100 ml 1 x TAE-Puffer

3.2.1.2 Protein-Acrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Tabelle 3-7: Zusammensetzung des Tris-Glycin-Laufpuffers

10 x Tris-Glycin-Laufpuffer	
Für native Gele:	
250 mM	Tris-Base
2 M	Glycin
Für denaturierende Gele zusätzlich:	
1 % (w/v)	SDS

Der pH-Wert musste nicht eingestellt werden, er sollte bei RT bei 8.3 liegen.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung des PAGE-Ladepuffers

5 x PAGE-Ladepuffer	
Für native Gele:	
100 mM	TrisHCl (pH 6.8)
0.1 % (w/v)	Bromphenol Blau
10 % (v/v)	Glycerin
Für denaturierende Gele zusätzlich:	
200 mM	DTT
4 % (w/v)	SDS

Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und bei der nativen PAGE direkt auf das Gel aufgetragen. Für die denaturierende PAGE erfolgte zuvor noch ein Denaturierungsschritt, bei dem die Proben mit Puffer für 10 min auf 95 °C erhitzt wurden.

Polyacrylamid-Gele

Die Ammoniumpersulfat (APS) -Lösung wurde jeden Tag frisch in bidest. Wasser angesetzt. Bei nativen Acrylamidgelen wurde SDS durch Wasser ersetzt. Die Gele waren 0,75 mm dick.

Tabelle 3-9: Komponenten der Polyacrylamid-Trenngele

Trenngel	**7.5 %**	**10 %**	**15 %**
bidest. Wasser	5.20 ml	3.45 ml	1.60 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37.5 %/1 % w/v)	2.00 ml	3.75 ml	5.60 ml
1.5 M Tris-Base (pH 8.8)	2.60 ml	2.60 ml	2.60 ml
10 % (w/v) SDS	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
10 % (w/v) APS	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
∑	10 ml	10 ml	10 ml

Tabelle 3-10 Komponenten des Polyacrylamid-Sammelgels

Sammelgel	**5 %**
bidest. Wasser	2.88 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37.5 %/1 % w/v)	0.67 ml
1.5 M TrisHCl (pH 6.8)	1.30 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl
10 % (w/v) APS	100 µl
TEMED	10 µl
∑	5 ml

- Protein-Größenstandard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa) (Thermo Scientific)

- Coomassie-Färbereagenz

1 g Coomassie Blue R250, 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 450 ml bidest. Wasser

- Entfärbelösung

450 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 450 ml bidest. Wasser

3.2.2 Antibiotika

Tabelle 3-11: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	**Konzentration der Stammlösung [mg/ml]**	**Endkonzentration im Kulturmedium [µg/ml]**	**Lösungsmittel**
Ampicillin (Amp)	100	100	bidest. Wasser
Apramycin (Apr)	50	50	bidest. Wasser
Chloramphenicol (Cam)	34	34	Ethanol
Hygromycin B (Hyg)	50	50	PBS
Kanamycin (Kan)	50	50	Bidest. Wasser
Nalidixinsäure (Nlx)	25	500	0.15 M NaOH
Tetracyclin (Tet)	2.5	0.015	Ethanol
Thiostrepton (Thio)	25	10	DMSO

3.2.3 Kulturmedien für *E. coli*-Bakterien

Alle folgenden Angaben beziehen sich auf ein Mediumvolumen von 1 L. Falls nicht anders angegeben, wurde bidestilliertes (bidest.) Wasser verwendet.

3.2.3.1 Luria-Bertani (LB)-Medium

LB-Medium wurde zur Kultivierung von *E. coli*-Bakterien in Vorkulturen verwendet.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung von LB-Medium

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7 eingestellt.

3.2.3.2 2 x Trypton-Yeast (2TY)-Medium

2TY-Medium wurde zur Kultivierung von *E. coli*-Bakterien für die Plasmidisolation verwendet.

Tabelle 3-13: Zusammensetzung von 2TY-Medium

16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7 eingestellt.

3.2.3.3 Terrific Broth (TB)

Terrific Broth (TB) wurde zur Kultivierung von *E. coli*-Bakterien für die heterologe Genexpression verwendet.

Tabelle 3-14 Zusammensetzung von Terrific Broth

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin

Es wurde mit 900 ml bidest. Wasser aufgefüllt, und autoklaviert. Bei einer Temperatur von 60 °C oder weniger wurden 100 ml einer sterilfiltrierten Lösung mit 0.17 M KH_2PO_4 und 0.72 M K_2HPO_4 zugeben.

3.2.3.4 Super Optimal Broth (SOB-Medium)

SOB-Medium wurde für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien verwendet.

Tabelle 3-15: Zusammensetzung von SOB-Medium

20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin
10 mM	NaCl
10 mM	$MgCl_2$
2.5 mM	KCl
10 mM	$MgSO_4$

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6 bis 7 eingestellt.

3.2.3.5 Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC-Medium)

SOC-Medium ist SOB-Medium, das zusätzlich 20 mM Glucose enthält. Die Glucose wurde erst nach dem Autoklavieren aus einer 1 M sterilfiltrierten Glucosestammlösung zugesetzt.
SOC-Medium wurde für die Transformation von *E. coli*-Bakterien mit DNA verwendet.

3.2.4 Medien für die Kultivierung von Streptomyceten

3.2.4.1 Mannitol-Soja (MS)-Agar

MS-Agar wurde für die Kultivierung von *S. coelicolor* CH999 verwendet.

Tabelle 3-16: Zusammensetzung von MS-Agar

20 g	Mannitol
20 g	Sojamehl
20 g	Agar

Für den MS-Agar wurde Leitungswasser verwendet und es wurde zweimal autoklaviert.

3.2.4.2 Tryptische-Soja-Bouillon (TSB)

30 g Tryptische-Soja-Bouillon (Sigma-Aldrich) wurden mit bidest. Wasser auf 1.0 L aufgefüllt.

3.2.4.3 Super-Yeast-Extract-Malt-Extract (SuperYEME)-Medium

SuperYEME-Medium wurde für die Kultivierung von *S. coelicolor* CH999 zur heterologen Proteinexpression verwendet.

Tabelle 3-17: Zusammensetzung von SuperYEME-Medium

5.0 g	Trypton
3.0 g	Hefeextrakt
3.0 g	Malzextrakt
1.1 g	$MgCl_2$
5.0 g	Glycin
10.0 g	Glucose
340.0 g	Sucrose
75 mg	*L* -Prolin
75 mg	*L* -Arginin
75 mg	*L* -Cystein
100 mg	*L* -Histidin
15 mg	Uracil

3.2.4.4 Bulgarian Germinative Medium

Das Bulgarian Germinative Medium wurde für die Kultivierung von *S. cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII* zur Premonensin-Produktion eingesetzt.

Tabelle 3-18: Zusammensetzung des Bulgarian Germinative Mediums

15.0 g	Sojamehl
20.0 g	Dextrin
5.0 g	Glucose
1.0 g	$CaCO_3$
1.5 g	Trockenhefe

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6.4 eingestellt.

3.2.4.5 Bulgarian Production Medium

Das Bulgarian Production Medium wurde für die Kultivierung von *S. cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII* zur Premonensin-Produktion eingesetzt.

Tabelle 3-19: Komponenten des Bulgarian Production Mediums

32.6 g	Sojamehl
20.0 g	Glucose
10.66 ml	Methyloleat
2.2 g	Na_2SO_4 (wasserfrei)
2.0 g	$CaCO_3$
705 mg	$Al_2(SO_4)_3$
330 mg	$MnCl_2$
200 mg	Antifoam A
110 mg	$FeSO_4$
75 mg	K_2HPO_4
19 mg	*L*-Ascorbinsäure

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6.6-6.9 eingestellt.

3.3 Methoden

3.3.1 Molekularbiologische Methoden

3.3.1.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer Horizontal-Elektrophorese-Anlage Compact XS/S (Biometra), die mit 1 × TAE-Puffer gefüllt war. Es wurden 1 % (w/v) Agarosegele verwendet. Als Größenstandard diente die GeneRuler™ DNA Ladder 1 kb (250 - 10 000 bps) von Thermo Scientific. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 10 × DNA-Ladepuffer versetzt. In Abhängigkeit von der Geldicke erfolgte die Auftrennung für 1 bis 2 h bei 85 V Gleichspannung.

Die Färbung der DNA erfolgte nach der Gelelektrophorese mit dem DNA-Färbereagenz GelRed™ (Biotium). Die Färbelösung enthielt 10 µl GelRed™ in 100 ml 1 x TAE-Puffer und die Inkubation des Gels in der Färbelösung erfolgte für 30 – 120 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Horizontalschüttler.

Die Detektion der DNA erfolgte nach Inkubation des Geles in GelRed™ (2 µg/ml) enthaltendem 1 × TAE-Puffer unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) mit dem Geldokumentationsgerät BioDocAnalyze digital (Biometra). Es wurde der *Mid Pass* Filter (580 nm) verwendet.

3.3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Es wurden die *E. coli*-Stämme Top10 und DH5α verwendet. 5 ml 2TY-Selektionsmedium wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm auf dem Horizontalschüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit entsprechend den Angaben des Herstellers (Thermo Scientific) verwendet. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit Wasser eluiert.

3.3.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA in wässriger Lösung wurde photometrisch mit dem Nanodrop 1000 Photometer (Thermo Scientific) durch Messung der OD_{260nm} bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260nm} von 1 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Für die Messung wurden 2 µl Probe verwendet und es wurde gegen Wasser referenziert.

Die Verunreinigung von DNA-Proben mit Protein wurde durch Messen der OD_{280nm} und Berechnung des Verhältnisses OD_{260nm}/OD_{280nm} beurteilt. Dieses sollte für nicht verunreinigte DNA-Proben mindestens 1.8 betragen.

3.3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für PCR-Reaktionen wurde die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µl) (Thermo Scientific) eingesetzt. Der verwendete Puffer war der *Phusion* HF 2 x Mastermix (Thermo Scientific). Er enthält 3 mM $MgCl_2$ und 400 µM von jedem dNTP.
Die einzelnen Komponenten sind in der Reihenfolge der Zugabe aufgelistet:

Tabelle 3-20: PCR-Ansatz

10 µl	*Phusion* HF 2 x Mastermix
1 µl	Primer 1 (10 µM)
1 µl	Primer 2 (10 µM)
1 µl	Templat (1 ng/µl)
0.4 µl	DMSO
6.4 µl	bidest. Wasser
0.5 µl	*Phusion*-Polymerase
20 µl	

Für PCRs wurde der TProfessional™ Thermocycler der Firma Biometra verwendet. Das verwendete Temperaturprogramm ergibt sich aus Tabelle 3-21.

Tabelle 3-21: Temperaturprogramm für die PCR

1.	98 °C	30 s	Initiale Denaturierung	
2.	98 °C	10 s	Denaturierung	30 Wiederholungen
3.	64 °C	20 s	Annealing (Anlagerung)	
4.	72 °C	15 s	Elongation	
5.	72 °C	5 min	Terminale Elongation	
6.	4 °C	∞	Lagerung	

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert und gereinigt. Die DNA-Sequenzen sind in Tabelle 3-22 aufgelistet.

Tabelle 3-22: PCR-Primer

Name	Sequenz (5'-3')
monBI_NcoI_fwd	GCC CAT GGG CAT GAA CGA GTT CGC CCG CAA GAA GCG
monBI_Stop _BamHI_rev	GCG CGG ATC CTC AGC CGA GGA CCG TGA GAT CGG ATG
monBII_BspHI_fwd	GCC GTC ATG AGC ATG CCC GAC GAG GCC GCG CGC
monBII_ohneCTerm _Stop_BamHI	GCG CGG ATC CTC AGG TCA CGT CCG TGA CGC CCC AG
monBII_monBI _linker_fwd	CCC ACC CCG AAG GGA TAC GCG CGA TGA ACG AGT TCG CCC GCA AGA AGC
monBII_monBI _linker_rev	GCT TCT TGC GGG CGA ACT CGT TCA TCG CGC GTA TCC CTT CGG GG

3.3.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA wurde zu analytischen und präparativen Zwecken mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die verwendeten Enzyme und Puffer stammten von der Firma Thermo Scientific. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen angewandt.

3.3.1.6 *DpnI*-Verdau

Um das PCR-Templat abzubauen, erfolgte im Anschluss an die PCR ein Restriktionsverdau mit *DpnI*.

Tabelle 3-23: Reaktionsansatz für den *Dpn*I-Verdau nach einer PCR

20 µl	PCR-Produkt
5 µl	10 x Tango Puffer (Thermo Scientific)
23 µl	bidest Wasser
2 µl	*DpnI* (10 U/µl)
Mit bidest. Wasser auf 50 µl auffüllen	

Das Restriktionsenzym erkennt die Sequenz GATC, wenn bei dieser Adenin methyliert ist.
Der *Dpn*I-Verdau des PCR-Ansatzes wurde für 60 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation des Ansatzes bei 80 °C für 20 min inaktiviert.

3.3.1.7 Analytischer Restriktionsverdau

Zur Überprüfung von Ligationen wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Es wurden zwei Restriktionsendonukleasen gewählt, die die DNA so verdauten, dass anhand der Größe der resultierenden DNA-Fragmente überprüft werden konnte, ob die Konstrukte korrekt kloniert wurden.

Tabelle 3-24: Reaktionsansatz für einen analytischen Restriktionsverdau

0.5 – 1 µg	DNA
2 µl	10 x Restriktionspuffer
0.5 – 1 µl	Enzym 1
0.5 – 1 µl	Enzym 2
Mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen	

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ergibt sich aus Tabelle 3-24. Er wurde für 60 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.3.1.8 Präparativer Restriktionsverdau

Zur Vorbereitung der Ligation von DNA-Fragmenten in Vektorfragmente zur Produktion neuer Plasmide wurden sowohl die Fragmente als auch die Vektoren mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. So wurden komplementäre DNA-Enden für die Ligation erzeugt.
Der Verdau von PCR-Produkten erfolgte direkt nach dem *DpnI*-Verdau. Dazu wurden 1 bis 2 µl jeder Restriktionsendonuklease direkt zum *DpnI*-Verdau-Ansatz hinzugegeben.

Für den Verdau des Vektors wurde der folgende Ansatz verwendet:

Tabelle 3-25: Reaktionsansatz für einen präparativen Restriktionsverdau

2-5 µg	Plasmid-DNA
5 µl	10 x Restriktionspuffer
2 µl	Enzym 1
2 µl	Enzym 2
Mit bidest. Wasser auf 50 µl auffüllen	

Vor der Zugabe der Restriktionsenzyme wurden die restlichen Komponenten des Ansatzes für 10 min bei 95 °C inkubiert, um DNasen zu inaktivieren.

3.3.1.9 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Bei diesem Verfahren werden Phosphat-Reste am 5‘-Ende von DNA-Molekülen, die bei der restriktionsenzymatischen Spaltung entstehen, durch eine alkalische Phosphatase entfernt. Dadurch wird die Zirkularisierung von Vektor-DNA bei der Ligation verhindert und die Klonierungseffizienz erhöht. Zur Dephosphorylierung der Vektor-DNA wurde die *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/µl) der Firma Thermo Scientific verwendet.

Tabelle 3-26: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung von Vektor-DNA

1 – 2 µg	linearisierte Vektor-DNA
2 µl	10 x FastAP Puffer
1 µl	*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/µl)
Mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen	

Die Dephosphorylierung erfolgte für 2 bis 12 h bei 37 °C und 400 rpm. Im Anschluss erfolgte eine Inaktivierung der Phosphatase durch Inkubation des Ansatzes bei 75 °C für 5 min.

3.3.1.10 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von DNA aus PCR-Reaktionsansätzen erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Extraktion mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific). Die gereinigte DNA wurde in bidest. Wasser eluiert.

3.3.1.11 Ligation von DNA

Nach präparativem Restriktionsverdau und Aufreinigung über ein Agarosegel wurde zunächst eine Bestimmung der DNA-Konzentration von Vektor und Insert unter Verwendung des Nanodrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) durchgeführt.
Die Ligation von linearisierter Vektor-DNA mit einem 2 bis 3-fachen molaren Überschuss von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific).
Die benötigten Vektor- und Insert-Mengen wurde mit dem Ligationsrechner der Universität Düsseldorf berechnet[110].

Tabelle 3-27: Ligationsansatz

50 – 100 ng	lineare Vektor-DNA
100 – 300 ng	Insert
2 µl	10 x T4 DNA-Ligase-Puffer
1 µl	T4 DNA-Ligase
Mit bidest. Wasser auf 20 µl auffüllen	

Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte über Nacht bei 16 °C. Zur Inaktivierung der T4 DNA-Ligase nach der Reaktion wurde der Ligationsansatz für 5 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Top10™ oder *E. coli* DH5α™ (siehe 3.3.1.14).

3.3.1.12 Sequenzierungen

Neu klonierte Plasmide wurden nach der Validierung durch einen analytischen Restriktionsverdau zusätzlich mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Es wurden nur die Gen-Fragmente (*Inserts*) sequenziert. Die Proben wurden für die Sequenzierungen zu der Firma LGC Genomics geschickt und es wurden die Sequenzierprimer von LGC Genomics verwendet.

Tabelle 3-28: Primer für die Sequenzierung

	Name	**Sequenz (5‘ – 3‘)**
Forward-Primer	T7prom	TAATACGACTCACTATAGG
Reverse-Primer	T7term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Die Konzentration der eingeschickten Proben lag bei 100 ng/µl in bidest. Wasser. Pro Sequenzierung wurden 4 µL Probe benötigt, die minimal benötigte Menge lag bei 15 µL. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium).

3.3.1.13 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit dem Kit von Zymo Research nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Für die Übernachtkulturen wurde Super Optimal Broth (SOB) anstelle von ZymoBroth™ verwendet.

3.3.1.14 Transformation durch Hitzeschock

100 µl-Aliquots kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-10 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Anschließend wurde für 5 min auf Eis inkubiert, 1 ml SOC-(Super Optimal Broth with Catabolic Repression-) Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C angezogen. 50-100 µl Zellsuspension wurden auf Agarplatten mit LB-Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.3.2 Heterologe Proteinexpression

3.3.2.1 Allgemeine Anmerkungen

Sterile Arbeiten wurden in einer Biowizard SilverLine Blue Sterilwerkbank (130 cm) der Firma Kojair durchgeführt. Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Sarstedt gekauft und waren entweder steril verpackt oder wurden vor der Benutzung durch Autoklavieren sterilisiert.

Sämtliche Flüssig- und Festmedien wurden direkt nach dem Ansetzen durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den jeweiligen Medien 1.5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Alle sterilisierten Kulturmedien wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Herstellung von Agarplatten erfolgte durch Schmelzen des Agar-haltigen Mediums in der Mikrowelle. Die Zugabe der Antibiotika zum flüssigen Medium erfolgte nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C unter sterilen Bedingungen, genau wie das anschließende Gießen der Agarplatten. Platten für die *E. coli*-Kultivierung enthielten ca. 15 ml Kulturmedium pro Platte, Agarplatten für die *Streptomyceten*-Kultivierung dagegen ca. 30 ml Kulturmedium pro Platte, um ein Austrocknen während der längeren Inkubationszeiten zu verhindern. Die Platten wurden im Kühlschrank gelagert und vor der Verwendung 30 min bei 37 °C vorgewärmt. Agarplatten für die *Streptomyceten*-Kultivierung wurden außerdem direkt vor der Verwendung unter dem laminaren Luftstrom für ca. 20 min getrocknet.

Für die selektive Kultivierung von Bakterien wurde mit Antibiotika als Selektionsmarker gearbeitet. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden als 1ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Wässrige Stammlösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur Spritzenfilter steril 0.22 µm, Sarstedt).

Der Begriff Selektionsmedium bezeichnet im Folgenden Kulturmedium mit Antibiotika zur selektiven Kultivierung von Bakterien in Abhängigkeit der im Genom bzw. auf Plasmiden vorhandenen Antibiotika-Resistenzen.

3.3.2.2 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Inkubationen von Mikroorganismen auf Agarplatten erfolgten in einem BD 53 Brutschrank (Binder). Für die Inkubation von Flüssigkulturen wurde ein Schüttelinkubator Certomat IS (Sartorius) verwendet.

Die kurz- bis mittelfristige (bis zu 7 Tage) Lagerung von Bakterien erfolgte auf Agarplatten mit Selektionsmedium im Kühlschrank. Für eine langfristige Archivierung von Stämmen und Bakterienklonen wurden 500 µl einer Übernachtkultur mit 500 µl autoklaviertem Glycerin in einem 1.5 ml Schraubröhrchen gemischt und bei -80 °C eingefroren.

E. coli-Kultivierungen mit einem Kulturvolumen von 10 ml oder weniger wurden in sterilen 50 ml Schraubröhren von Sarstedt durchgeführt.

Für Testexpressionen und Ganzzell-Assays wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Kulturvolumen verwendet, große Kulturen zur heterologen Überexpression von Proteinen

wurden in 2 L Erlenmeyerkolben mit 200 bis 500 ml Kulturvolumen durchgeführt. Die Erlenmeyerkolben wurden vor Beginn der Expression durch Autoklavieren sterilisiert.

3.3.2.3 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die Plasmide mit den Genen für die zu exprimierenden Proteine wurden in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) und Derivate transformiert und auf LB-Agarplatten unter Selektionsbedingungen über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml LB-Selektionsmedium mit einem Einzelklon inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Morgen die Expressionskultur in LB-, 2TY- oder TB-Selektionsmedium im Verhältnis 1:50 inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0.4 bis 0.7 inkubiert. Die Temperatur des Inkubators wurde dann auf die Expressionstemperatur reduziert; diese lag zwischen 16 °C und 30 °C. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Stammlösung: 500 mM in bidest. Wasser) bis zu einer finalen Konzentration von 0.1 bis 1.0 mM induziert. Bei einer Coexpression mit Chaperonen (Plasmid pG-KJE8) erfolgte außerdem die Zugabe von L-Arabinose (Stammlösung: 0.2 g/ml in bidest Wasser, Endkonzentration 0.5 g/L) und Tetracyclin (Endkonzentration 15 µg/L).

Unter Induktionsbedingungen wurde die Kultur für weitere 4 bis 16 h inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 x g, 45 min, 4 °C pelletiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Vor dem Pelletieren der Zellen wurden von jeder Kultur 2 ml Proben abgenommen, die mittels Zentrifugation pelletiert und dann bis zur Analyse mittels SDS-PAGE bei -20 °C gelagert wurden.

Spezielle Expressionsbedingungen sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 3-29: Expressionsbedingungen für die Epoxid-Hydrolase MonBI

Expressionsplasmid	***E. coli*-Stamm**	**Expressionsbedingungen**
monBI_pET20b(+) pG-KJE8 oder monBI_pETM11 pG-KJE8	BL21 (DE3)	400 ml TB-Selektivmedium Induktion bei OD_{600nm} 0.7 Coexpression mit Chaperonen **Induktion** o 0.1 mM IPTG. o L-Arabinose (0.5 g/L final) o Tetracyclin (15 µg/L final) Expression bei 16 °C für 16 h

Tabelle 3-30: Expressionsbedingungen für die Epoxid-Hydrolase MonBII

Expressionsplasmid	***E. coli*-Stamm**	**Expressionsbedingungen**
monBII_pET20b(+) pG-KJE8	BL21 (DE3)	200 ml TB-Selektivmedium mit 1 % (w/v) Glucose Induktion bei OD_{600nm} 0.7 Coexpression mit Chaperonen **Induktion** o 0.1 mM IPTG. o 0.5 g/L L-Arabinose o 15 µg/L Tetracyclin Expression bei 16 °C für 16 h
monBII_pETM11	BL21 (DE3) pLysS	Inokulation mittels „Plating"-Methode 200 ml TB-Selektivmedium Induktion bei OD_{600nm} 0.4 **Induktion** o 0.1 mM IPTG Expression bei 16 °C für 16 h

Aufgrund der Toxizität von MonBII wurde zum Inokulieren der Expressionskultur die „Plating"-Methode verwendet.

Dazu wurde eine Einzelkolonie von BL21 pLysS *E. coli*-Zellen, die das monBII_pETM11 Plasmid enthielten, in 200 µl Wasser resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Die Platte wurde dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 ml TB auf die Platte gegeben, die Klone wurden mit einem sterilen Spatel vorsichtig von der Platte gelöst und in 400 ml TB-Selektivmedium gegeben.

Tabelle 3-31: Expressionsbedingungen für das Fusionsprotein der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII

Expressionsplasmid	***E. coli*-Stamm**	**Expressionsbedingungen**
monBII_monBI_pETM11 pG-KJE8	BL21 (DE3) pLysS	400 ml TB-Selektivmedium Induktion bei OD_{600nm} 0.7 Coexpression mit Chaperonen **Induktion** o 0.1 mM IPTG. o 0.5 g/L L-Arabinose o 15 µg/L Tetracyclin Expression bei 16 °C für 16 h

Tabelle 3-32: Expressionsbedingungen für TEV-Protease

Expressionsplasmid	***E. coli*-Stamm**	**Expressionsbedingungen**
pRK792	BL21 (DE3) Codon Plus RIL	400 ml TB-Selektivmedium Induktion bei OD_{600nm} 0.6 **Induktion** o 1 mM IPTG Expression bei 30 °C für 4 h

Tabelle 3-33: Expressionsbedingungen für die Flavin-abhängige Monooxygenase MonCI

Expressionsplasmid	***E. coli*-Stamm**	**Expressionsbedingungen**
monCI_pET28b(+) pG-KJE8	BL21 (DE3)	200 ml TB-Selektivmedium mit Riboflavin (1 mg/ml) Induktion bei OD_{600nm} 0.7 Coexpression mit Chaperonen **Induktion** o 0.1 mM IPTG o 0.5 g/L L-Arabinose o 15 µg/L Tetracyclin Expression bei 16 °C für 16 h
monCI_pETM41	BL21 (DE3)	300 ml TB-Selektivmedium mit Riboflavin (1 mg/ml) Induktion bei OD_{600nm} 0.7 **Induktion** o 0.2 mM IPTG Expression bei 25 °C für 5 h

3.3.2.4 Kultivierung und Lagerung von *Streptomyceten*

Die von der Arbeitsgruppe Professor Peter F. Leadlay bezogenen Lyophilisate der *Streptomyceten* wurden mit 0.5 ml Tryptischer Soja Bouillon (TSB) unter sterilen Bedingungen rehydratisiert. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspensionen wurden auf getrockneten MS-Agarplatten ausgestrichen und bei 30 °C bis zur Sporenbildung inkubiert. Die Sporen wurden mit TSB von den Platten gewaschen, mit 20 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt, und zur Archivierung als Gefrierkulturen in 1.5 ml Schraubröhren bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich wurden Flüssigkulturen (5 ml TSB-Selektionsmedium im 25 ml Erlenmeyerkolben) mit jeweils 200 µl rehydratisierter Zellsuspension angeimpft.

Nach 5 bis 7 Tagen wurden 500 µl der dichten Zellsuspension mit 500 µl sterilem Glycerin gemischt und ebenfalls als Gefrierkulturen bei -80 °C eingefroren.

Um die Bildung großer Mycelienaggregate zu verhindern und die Versorgung mit Sauerstoff zu verbessern, wurde bei der *Streptomyceten*-Kultivierung im Erlenmeyerkolben eine Stahlfeder am Boden des Kolbens angebracht.

3.3.2.5 Sporenisolation von *Streptomyces coelicolor* CH999

Eine einzelne *S. coelicolor* Kolonie wurde mithilfe eines sterilen Zahnstochers von einer Mannitol-Soja- (MS) Agarplatte isoliert und in 200 µl sterilem bidest. Wasser durch Vortexen resuspendiert. 100 µl der Sporensuspension wurden dann mithilfe eines sterilen Baumwolltupfers auf einer frischen MS-Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C für 4 bis 5 Tage kultiviert.
Um eine Kontamination der Pipetten durch die Sporen zu verhindern, erfolgte die Isolation unter Verwendung von Filterspitzen. Die bewachsene Agarplatte wurde mit 5 ml sterilem bidest. Wasser benetzt und die Sporen mit Hilfe einer sterilen Impföse suspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss durch eine mit steriler Watte gefüllte 10 ml Spritze in eine 50 ml Schraubröhre filtriert und für 5 min bei 5000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sporenpellet in 500 µl einer sterilen 20 % (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und in 1.5 ml Schraubröhrchen als 100 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren.

3.3.2.6 Konjugation von *Streptomyces coelicolor* CH999 mit *E. coli* ET12567

DNA kann mittels intergenerischer Konjugation von einem *E. coli*-Donorstamm in einen Actinomycetenstamm als Rezipient transferiert werden. Als Donor wurde der methylierungsdefiziente Stamm *E. coli* ET12567 eingesetzt, der mit dem Plasmid pUZ8002 ein sich selbst nicht transferierendes RP4-Derivat enthält, was den Stamm zum DNA-Transfer befähigt.

3.3.2.6.1 Vorbereitung des *E. coli*-Donorstammes

Das Plasmid pMAJ21b wurde mittels Hitzeschocktransformation in chemisch kompetente *E. coli* ET12567/pUZ8002 eingebracht und über Nacht bei 37 °C auf Agarplatten mit LB-Selektivmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine 5 ml-Kultur mit 2TY-Selektivmedium mit einer Kolonie von der Platte inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm kultiviert.
Am nächsten Morgen wurden 15 ml frisches 2TY-Medium (mit Chloramphenicol (Cam) und Apramycin (Apr), aber ohne Kanamycin (Kan)) mit 0.5 ml der Übernachtkultur inokuliert. Die Bakterien wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0.4 bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 800 x g, 25°C) pelletiert und das Pellet zweimal mit je 10 ml 2TY Medium gewaschen, um Antibiotika-Spuren zu entfernen, die das *Streptomyceten*-Wachstum hemmen könnten. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml TSB resuspendiert.

3.3.2.6.2 Rezipientenvorbereitung

Sporen von *Streptomyces coelicolor* CH999 wurden auf Eis aufgetaut. Dies geschah, während die *E. coli*-Zellen zentrifugiert und gewaschen wurden. Dann wurden 100 µl entfrostete Sporen in 0.5 ml TSB resuspendiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 10 min bei 50 °C.

3.3.2.6.3 Konjugation

Nach dem Abkühlen der *Streptomyceten*-Sporen wurden 0.5 ml *E. coli*-Zellsuspension und 0.5 ml *Streptomyceten*-Sporensuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. 330 µl der Mischung wurden dann pro MS-Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen und die Platten für 18 h bei 28 °C inkubiert.

Dann erfolgte eine Überschichtung mit 1 ml Nalidixinsäure-Lösung (c = 0.5 mg/ml). Die Lösung wurde durch Schwenken auf der ganzen Platte verteilt. Die Platten wurden für weitere 5 h bei 28 °C inkubiert und dann mit 1 ml Apramycin-Lösung (c = 1 mg/ml) überschichtet. Die Antibiotika-Lösungen konnten nicht gleichzeitig auf die Platte gegeben werden, da die Nalidixinsäure sonst präzipitiert wäre.

Die Agarplatten wurden bis zum Wachstum kleiner Kolonien bei 30 °C inkubiert. Dann wurden einzelne *Streptomyceten*-Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte isoliert, in 1 ml TSB resuspendiert, auf MS-Agarplatten mit Apramycin (50 µg/ml) ausgestrichen und weiter bei 30 °C inkubiert. Dieser Vorgang wird als *Replica*-Platierung bezeichnet.

3.3.2.7 MonCI-Expression in *S. coelicolor* CH999

Die heterologe Expression von MonCI in *E. coli*-Bakterien führte zu einem inaktiven Enzym. Deswegen wurde die Epoxidase in *S. coelicolor* CH999 überexprimiert.

Eine *S. coelicolor* CH999 Einzelkolonie, die das Plasmid pMAJ21b enthielt, wurde von einer *Replica*-Platte (siehe 3.3.2.6) mit einem sterilen Zahnstocher isoliert. Sie wurde verwendet, um 10 ml SuperYEME-Selektivmedium in einem 50 ml Erlenmeyerkolben zu inokulieren. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 140 rpm. Nach 4 Tagen wurden 50 ml SuperYEME Selektivmedium im 250 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml dieser Vorkultur inokuliert und für 3 Tage bei 30 °C und 140 rpm kultiviert.

Dann erfolgte die Induktion der MonCI-Expression mit 10 µg/ml Thiostrepton. Zum gleichen Zeitpunkt wurde noch einmal 50 µg/ml Apramycin zugegeben. Die Kultivierung wurde für weitere 24 h unter den gleichen Bedingungen fortgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Spatels von der Glaswand des Erlenmeyerkolbens und von der Metallspirale entfernt, in eine 50 ml Schraubröhre überführt und durch Zentrifugation (15 min, 5000 x g, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde bis zur Aufreinigung des Proteins bei -20 °C gelagert.

3.3.2.8 Kultivierung von *S. cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII* zur Premonensin-Produktion

Jedem Medium wurde zu Beginn des Kultivierungsschritts 50 µg/ml Hygromycin zugesetzt. Für den ersten Kultivierungsschritt wurde ein 25 ml Erlenmeyerkolben verwendet, alle weiteren Schritte wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Alle Erlenmeyerkolben waren mit einer Metallspirale bestückt.

Für die erste Vorkultur wurden 5 ml TSB mit 100 µl Gefrierkultur von *Streptomyces cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII* angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 130 rpm für 24 h.

Am nächsten Tag wurden 1.25 ml dieser Vorkultur in 25 ml TSB überführt. Die Kultivierung erfolgte für weitere 24 h unter den gleichen Bedingungen wie zuvor.

Wiederum 1.25 ml Übernachtkultur wurden dann als Inokulum für 25 ml Bulgarian Germination Medium verwendet. Diese Kultur wurde für 48 h bei 32 °C und 130 rpm inkubiert, bevor 1.25 ml dieser Kultur zum Animpfen der Hauptkultur verwendet wurden. Für diese Kultur wurden 50 ml Bulgarian Production Medium mit 1.2 ml autoklaviertem Sojaöl versetzt. Die gefüllten Kolben wurden gewogen, um in den folgenden Tagen den Flüssigkeitsverlust durch Auffüllen mit sterilem bidest. Wasser ausgleichen zu können. Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte für insgesamt 12 Tage bei 32 °C und 130 rpm. An Tag 4 und an Tag 8 wurden jeweils 1.2 ml autoklaviertes Sojaöl pro Kultur zugegeben und der Flüssigkeitsverlust wurde ausgeglichen.

3.3.3 Proteinaufreinigung

3.3.3.1 Zellaufschluss und Herstellung von Rohextrakten

Die Zellpellets wurden zunächst für 15 min auf Eis angetaut, anschließend in Lysepuffer (5 ml Lysepuffer pro Gramm nassen Zellpellets) resuspendiert und die Zellsuspension mit 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Stammlösung 100 mM in Isopropanol) als Proteaseinhibitor versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall-Homogenisierung mit dem Sonopuls HD 2070 (Bandelin). Pro Aufschluss konnten zwischen 2 und 20 ml Zellsuspension aufgeschlossen werden. Größere Volumina wurden durch mehrere Aufschlüsse hintereinander verarbeitet. Die Zellen wurden unter Eiskühlung in 5 bis 20 Zyklen sonifiziert, ein Zyklus bestand aus einem 10 s Puls bei 85 % Intensität, gefolgt von einer 30 s langen Pause. Die Zahl der Zyklen wurde an das Volumen angepasst. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 12 000 × g für 45 min und 4 °C sedimentiert, der geklärte Überstand wurde abgenommen und weiterverarbeitet.

3.3.3.2 Metallionen-Affinitätschromatographie

3.3.3.2.1 MonBI, MonBII und MonBI-MonBII-Fusionsprotein

Lysepuffer: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7.8
Waschpuffer: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 40 mM Imidazol, pH 7.8
Elutionspuffer: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 40-250 mM Imidazol, pH 7.8

Für MonBI, MonBII und das MonBI-MonBII-Fusionsprotein wurde die Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriessigsäure- (NTA-) Agarose mit einem ÄKTApurifier™ Chromatographiesystem (GE Healthcare) bei 4 °C durchgeführt. Die UNICORN™ Kontrollsoftware wurde zur Steuerung der Anlage verwendet.
Die Rohextrakte (siehe 3.3.3.1) wurden filtriert (0.22 µm) und dann bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte Ni^{2+}-NTA-Säule (Säulenvolumen 2 ml) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina (Sv) Waschpuffer gewaschen, um Proteine zu entfernen, die nicht an die Säule gebunden hatten. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem Gradienten von 40 mM Imidazol auf 250 mM Imidazol in Lysepuffer innerhalb von 40 min.
Das Eluat wurde in 1 ml großen Fraktionen gesammelt, die Reinheit des eluierten Proteins mittels SDS-PAGE überprüft und die sauberen Fraktionen wurden gesammelt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (siehe 3.3.3.10).

3.3.3.2.2 MonCI und TEV-Protease

Für MonCI und die TEV-Protease wurde die Ni^{2+}NTA-Affinitätschromatographie im *Batch*-Verfahren durchgeführt.

TEV-Protease

Lysepuffer A: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.8
Waschpuffer: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 25 mM Imidazol, pH 7.8
Elutionspuffer: 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 250 mM Imidazol, pH 7.8

MonCI

Lysepuffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 2 mM Imidazol, pH 8.0
Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 10 mM Imidazol, pH 8.0
Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 250 mM Imidazol, pH 8.0

Die Rohextrakte wurden mit 0.5 ml Ni^{2+}-NTA-Agarose*beads* pro 10 ml Überstand versetzt und die Mischung für 1 h auf Eis geschwenkt. Anschließend wurde die Mischung auf eine Säule gegeben (*gravity-flow* Säule, Bio-Rad). Die Ni^{2+}-NTA-*Beads* mit dem chelatisierten Protein wurden zunächst mit 10 Sv Lysepuffer und dann mit weiteren 10 Sv Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 2 Sv Elutionspuffer.
Die gereinigte TEV-Protease wurde gegen 1 L Lysepuffer bei 4 °C über Nacht dialysiert und mittels Ultrafiltration auf 1 mg/ml konzentriert. Anschließend wurde das Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.
Da sich der Flavin-Cofaktor von MonCI an Membranen anlagerte, was zu einer Denaturierung des Proteins führte, wurden nach der Elution des Proteins weder eine Dialyse noch eine Ultrafiltration durchgeführt. Stattdessen wurde die Imidazol-Konzentration durch eine 1:10-Verdünnung mit Lysepuffer verringert. Da Einfrieren ebenfalls zu einer Denaturierung von MonCI führte, wurde das Enzym nicht gelagert, sondern stets frisch für biophysikalische Untersuchungen und Enzym-Assays eingesetzt.

3.3.3.2.3 MonCI-Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Lysepuffer:	8 M Harnstoff, 0.1 M NaH_2PO_4, 10 mM TrisHCl, pH 8.0
Waschpuffer:	8 M Harnstoff, 0.1 M NaH_2PO_4, 10 mM TrisHCl, pH 6.3
Elutionspuffer 1:	8 M Harnstoff, 0.1 M NaH_2PO_4, 10 mM TrisHCl, pH 5.9
Elutionspuffer 2:	8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4, 10 mM TrisHCl, pH 4.5
Renaturierungspuffer:	0.5 M NaCl, 20 mM TrisHCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7.9

Da MonCI in *E. coli* hauptsächlich unlöslich exprimiert wurde, wurden auch Aufreinigungen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Aufreinigung fand bei Raumtemperatur statt.
Das Zellpellet wurde für 15 min auf Eis angetaut und dann im Lysepuffer resuspendiert (5 ml Lysepuffer pro Gramm nassen Zellpellets). Im Anschluss wurde die Suspension für 60 min bei Raumtemperatur gerührt und dann zentrifugiert (10 000 x g, 30 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ni^{2+}-NTA-Agarosebeads pro 4 ml Lösung versetzt. Die Lösung wurde dann für 1 h unter leichtem Schütteln auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
Anschließend wurde die Mischung auf eine Säule gegeben (*gravity-flow* Säule, Bio-Rad). Die Ni^{2+}-NTA-*Beads* mit dem chelatisierten Protein wurden zunächst mit 10 Sv Lysepuffer und dann mit weiteren 10 Sv Waschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 2 Sv Elutionspuffer 1, gefolgt von einem weiteren Elutionsschritt mit 2 Sv Elutionspuffer 2.
Mittels SDS-PAGE wurde analysiert, welcher Elutionspuffer besser für die Elution von MonCI geeignet war. Da sich das Protein in beiden Fraktionen befand, wurden die beiden Eluate in je 250 ml Renaturierungspuffer gegeben und die Lösungen über Nacht bei RT gerührt.

3.3.3.2.4 Regeneration der Ni^{2+}-NTA -Agarose

Die Regeneration der Ni^{2+}-NTA-Agarosebeads wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen; the QIAexpressionist™) und anschließend mit 8 Sv des Reinigungspuffers gewaschen und äquilibriert. Gelagert wurde die Ni^{2+}-NTA-Matrix im Reinigungspuffer mit 20 % (v/v) Ethanol.

3.3.3.3 Verdau mit TEV Protease

TEV-Protease-Puffer:	50 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7.2
Epoxid-Hydrolase-Puffer:	50 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7.2

Für Kristallisationsexperimente der Epoxid-Hydrolasen wurde der 6xHis-*Tag* vom Zielprotein abgespalten. Zu diesem Zweck wurden Konstrukte kloniert, die zwischen der Proteinsequenz und dem 6xHis-*Tag* eine TEV-Protease-Schnittstelle enthielten. Das gereinigte Protein wurde nach der Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 3.3.3.2.1) in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgewicht: 12-14 kDa) überführt und bei 4 °C gegen 1 L TEV-Protease-Puffer dialysiert (siehe 3.3.3.8). Rekombinante TEV-Protease wurde nach 3 h Dialyse des gereinigten Proteins bis zu einer Konzentration von 0.5-2 µM in den Dialyseschlauch gegeben. Simultane Dialyse und TEV-Protease-Verdau erfolgten über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde das Protein ohne 6xHis-*Tag* durch eine weitere Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Dafür wurde der über Nacht verdaute Ansatz aus dem Dialyseschlauch in eine 50 ml Schraubröhre überführt und mit 1 ml Ni^{2+}-NTA-Agarose*beads* pro 5 ml Verdau-Ansatz versetzt. Die Mischung wurde für 1 h auf Eis geschwenkt und anschließend auf eine *gravity-flow* Säule (Bio-Rad) gegeben.

Unverdautes Zielprotein sowie die TEV-Protease verblieben auf der Ni^{2+}-NTA-Matrix, während das Zielprotein ohne 6xHis-*Tag* die Säule ungehindert passieren konnte.

Nach dem Verdau wurde das Protein in Epoxid-Hydrolase-Puffer dialysiert und mittels Ultrafiltration (Ausschlussgewicht 15 kDa) auf 10 mg/ml konzentriert (siehe 3.3.3.10.)

3.3.3.4 Größenausschlusschromatographie

Laufpuffer : 50 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7.2

Mittels Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine MonBI, MonBII und das MonBI-MonBI-Fusionsprotein weiter gereinigt. Um ein MonBI-MonBII-Heterodimer herzustellen, wurden die beiden Proteine vor der Größenausschlusschromatographie im molaren Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 h bei 4 °C inkubiert.

Wenn das Fusionsprotein für Kristallisationsexperimente verwendet werden sollte, wurde vor der Größenausschlusschromatographie der 6xHis-*Tag* proteolytisch entfernt.

Für die Größenausschlusschromatographie wurde ein ÄKTAexplorer™ (GE Healthcare) System mit einer Superdex™ 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) genutzt. Zur Steuerung des Systems wurde die UNICORN™-Kontrollsoftware verwendet.

Zunächst wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einem Größenstandard durchgeführt. Dieser enthielt Thyreoglobulin (670 kDa), γ-Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B_{12} (1.35 kDa).

Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf die Säule bei 13400 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Probenschleife wurde mit 2 ml Proteinprobe gefüllt und die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate der mobilen Phase von 0.25 ml/min. Die Protein-Elution wurde über die Absorption bei 280 nm überwacht und das Eluat wurde in Fraktionen mit jeweils 0.5 ml gesammelt. Die Reinheit des Proteins wurde anschließend mittels SDS-PAGE überprüft.

Fraktionen mit reinem Zielprotein wurden gesammelt und mittels Ultrafiltration konzentriert (siehe 3.3.3.10). Die Probe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt für Experimente eingesetzt.

3.3.3.5 Ionenaustauschchromatographie

Ionenaustauschpuffer A: 20 mM Phosphatpuffer pH 4, 5, 6, 7, 8

Ionenaustauschpuffer B: 20 mM Phosphatpuffer, 1 M NaCl, pH 4, 5, 6, 7, 8

Da die Metallionen-Affinitätschromatographie kein sauberes MonCI lieferte und sich das Protein nicht für die Größenausschlusschromatographie konzentrieren ließ, wurden Reinigungsversuche mittels Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Bei diesem Verfahren lagert sich das Protein in Abhängigkeit von seiner Ladung an einer positiv oder negativ geladenen Matrix an. Durch Zugabe von Salzen wie z. B. NaCl wird das Protein anschließend wieder von der Matrix verdrängt und so eluiert.

In diesem Experiment wurde die Anlagerung von MonCI an einen Anionenaustauscher (Fractogel® EMD TMAE (M) von Merck Millipore in einer Konzentration von 160-200 mg/ml) und an einen Kationenaustauscher (Fractogel® EMD SE Hicap, Merck Millipore, in einer Konzentration von

120-160 mg/ml) untersucht. Der pH-Wert des verwendeten Puffers hat ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung des Proteins an die Matrix, da die Ladung des Proteins pH-abhängig ist. Aus diesem Grund wurden Anionenaustauschchromatographie-Ansätze bei pH-Wert 4, 5, 6 und 7 durchgeführt und die Kationenaustauschchromatographie wurde bei pH-Wert 6, 7 und 8 getestet (siehe Tabelle 3-34).

Tabelle 3-34: Getestete Ionenaustauschbedingungen

	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Anionenaustauschchromatographie	**x**	**X**	**x**	**x**	
Kationenaustauschchromatographie			**x**	**x**	**x**

Vor der Ionenaustauschchromatographie wurde MonCI zunächst mittels Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach diesem Reinigungsschritt wurde das Protein in einen Puffer mit 20 mM TrisHCl, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin dialysiert und die Proteinkonzentration wurde auf 0.5 mg/ml eingestellt.

Sieben Ansätze wurden durchgeführt (siehe Tabelle 3-34). Jeder Ansatz wurde 1: 7.5 mit dem Ionenaustauschpuffer A mit dem benötigten pH-Wert verdünnt. 300 µl dieser verdünnten Proteinlösung wurden dann auf 10 µl des Ionenaustauschers in einer 96-Well-Filterplatte (EMD Millipore) geladen. Bei dieser Platte verbleibt die Ionenaustauschermatrix auf dem Filter, während Flüssigkeiten mittels Zentrifugation durch den Filter passiert werden. Das Ionenaustauschermaterial wurde drei Mal mit je 300 µl Puffer A gewaschen. Dafür wurde die Platte jeweils 1 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit je 30 µl Puffer B, der den gleichen pH-Wert aufwies wie der entsprechende Puffer A.

3.3.3.6 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteinpräparationen wurden zu analytischen Zwecken in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (siehe 3.2.1.2). Das Gel bestand aus einem schmalen Sammelgel (5 % Acrylamid; pH 6.8) und aus dem darunter anschließenden Trenngel (7.5 – 15 % Acrylamid; pH 8.8). Je höher das molekulare Gewicht der aufzutrennenden Proteine war, desto niedriger war der Acrylamidanteil im Trenngel.

Für die denaturierende SDS-PAGE wurden Proteinproben mit 5 × SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Bei der nativen PAGE wurde nativer 5 x PAGE-Probenpuffer verwendet und der Denaturierungsschritt entfiel. 5 bis 20 µl der Proben wurden dann auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40 mA pro Gel in einer Eco-Mini Gelelektrophoresekammer (Biometra). Bei der denaturierenden SDS-PAGE enthielt der Laufpuffer 1 % (w/v) SDS.

3.3.3.6.1 Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgele

Für die Coomassie-Färbung wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 2 h bei RT auf dem Horizontalschüttler in der Färbelösung (siehe 3.2.1.2) inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 2 h in der Entfärbelösung (siehe 3.2.1.2) geschüttelt und dann in Wasser überführt. Gefärbte Gele wurden mit der Geldokumentationsanlage BioDocAnalyze™ digital (Biometra) photographiert.

3.3.3.7 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Die Proteinbande wurde aus dem Coomassie-gefärbten Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und bis zur Analyse in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß bei -20 °C gelagert. Das Protein im Gel wurde tryptisch verdaut und die Peptide per Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-ESI-IT-MS/MS) analysiert. Die Mascot® Software (Matrix Science) wurde verwendet, um die Proteine durch einen Abgleich mit der Swiss-Prot-Datenbank[111] zu identifizieren.
Die Analysen wurden von den Mitarbeitern der Core Facility Massenspektrometrie (Arbeitskreis Professor Hartmut Schlüter) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt.

3.3.3.8 Dialyse von Proteinlösungen

Zum Anpassen der Pufferzusammensetzung einer Proteinlösung wurde die Probe über Nacht gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Dabei wurden VISKING-Dialyseschläuche mit einem Ausschlussgewicht von 12-14 kDa verwendet.

3.3.3.9 Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit dem Varian Cary 50 UV/VIS Photometer bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm in Plastikküvetten (Sarstedt) mit einer Schichtdicke von 10 mm. Der Extinktionskoeffizient wurde anhand der Aminosäuresequenz mit dem Programm Protparam[112] bestimmt. Mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ($A = c \cdot d \cdot \varepsilon$) konnte dann die Proteinkonzentration berechnet werden.

3.3.3.10 Konzentrieren von Proteinlösungen

Das Volumen von Proteinlösungen wurde durch Ultrafiltration in Amicon™-Konzentratoren (EMD Millipore) verringert. Das Ausschlussgewicht der Membranen lag bei 3 kDa für MonBI und MonBII und bei 10 kDa für MonCI und das MonBII-MonBI-Fusionsprotein.

3.3.3.11 Lagerung der gereinigten Proben

Die gereinigten Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII sowie das Fusionsprotein wurden nach Konzentration auf 10 mg/ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –80 °C.

3.3.4 Biophysikalische Enzymcharakterisierung

3.3.4.1 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

AUZ-Puffer: 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM TrisHCl, 5% (v/v) Glycerin, pH 7.5

Die analytischen Ultrazentrifugationsläufe zur Bestimmung der Stöchiometrie des MonBI-MonBII-Komplexes wurden mit der Optima XL-A™ (Beckman-Coulter) Ultrazentrifuge durchgeführt. Es wurde der analytische An-50 Titanrotor mit sieben Doppelsektor-Messzellen (die achte Zelle dient als Kalibriergewicht) verwendet. Jeder Sektor wurde mit 400 µl Flüssigkeit gefüllt. Die Doppelsektorzelle (siehe Abbildung 13) ermöglicht die simultane Vermessung der Probe und des Puffers als Referenz.

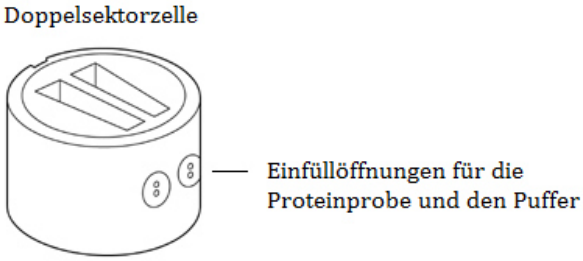


Abbildung 13: Doppelsektorzelle für die analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe bei 20 °C und 50 000 rpm durchgeführt. Diese Drehzahl entspricht in der Mitte der Messzelle 182 000 x g und am Boden der Messzelle 201 600 x g.

Während der Läufe wurden die Absorption bei 280 nm und die Interferenz über die komplette Küvettenlänge gemessen. Um die Absorptionsmessung bei 280 nm möglichst wenig zu verfälschen, wurden eine geringe DTT-Konzentration und optisch reines Glycerin (VWR) verwendet.

Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit dem Programm Sedfit.

Die Proteinproben wurden mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt und vor den Messungen über Nacht bei 4 °C in den AUZ-Puffer dialysiert.

Für die Messungen wurden je 600 µl MonBI- und MonBII-Stammlösungen mit einer Abs_{280nm} von 1.5 hergestellt, sowie 400 µl MonBI-MonBII-Komplex mit einer Abs_{280nm} von 0.7. Neben den Stammlösungen wurden verschiedene Verdünnungen vermessen.

Um die Dimerisierung von MonBI und MonBII näher zu untersuchen, wurden Titrationen von MonBII gegen MonBI durchgeführt. Dazu wurden MonBI und MonBII am Tag vor der analytischen Ultrazentrifugation im Verhältnis 1:0.5, 1:2 und 1:3 gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.3.4.2 Circulardichroismus (CD) -Messungen

Die Circulardichroismus-Messungen zur Untersuchung der Sekundärstruktur von MonBI und MonBII wurden mit dem J-815 CD-Spektrometer (Jasco) durchgeführt. Das Gerät wurde gemäß den Herstellerangaben gestartet. Über die Software Spectra Manager (Jasco) wurden die Messparameter eingestellt und die Auswertung der Ergebnisse durchgeführt.

Die Proteinproben wurden vor den Messungen über Nacht bei 4 °C gegen 1 L 20 mM K_2HPO_4, pH 7.6 bzw gegen 1 L 20 mM K_2HPO_4, 50 mM NaCl, pH 7.6 dialysiert. Direkt vor der Messung wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 13 400 x g zentrifugiert. Für die Messungen wurden 200 µl Proteinlösung mit einer Konzentration zwischen 100 µg/ml und 500 µg/ml verwendet. Es wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von 190 nm bis 260 nm aufgenommen.

Die Messungen der jeweiligen Proteinproben wurden 15 Mal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Hintergrundmessung wurde mit dem Puffer durchgeführt, gegen den das Protein dialysiert worden war. Es fanden 5 Wiederholungen dieser Messung statt.

Um die Stabilität des Proteins zu untersuchen, wurden Schmelzkurven angefertigt. Dafür wurde die Proteinprobe von 20 °C bis auf 90 °C erhitzt. Dabei erfolgte die Erfassung der Absorption bei 209 nm und bei 220 nm.

3.3.4.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

DLS-Messungen wurden durchgeführt, um die Dispersität der Proteinlösungen vor Kristallisationsversuchen zu überprüfen. Die Messungen wurden am SpectroSize 300 (Xtal Concepts) durchgeführt.

Das gereinigte Protein wurde zunächst für 30 min bei 16 100 x g und 4 °C zentrifugiert und dann mit einem UFC40GV0S Ultrafree Zentrifugenfilter (0.22 µm) (Merck Millipore) filtriert, um Aggregate oder andere große Partikel abzutrennen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt (siehe 3.3.3.9).

Da die Viskosität des Puffers die Messung enorm beeinflusst, wurde die Pufferzusammensetzung vor Beginn der Messungen in der Gerätesoftware spezifiziert. Die Messung des gestreuten Lichts erfolgte im 90°-Winkel und die Untersuchungen fanden bei einer konstanten Temperatur von 20 °C statt.

Es wurde eine Quarzküvette verwendet; diese wurde einmal leer vermessen, um zu verifizieren, dass sie sauber war. Dann erfolgte eine DLS-Untersuchung des Puffers, um auszuschließen, dass große Partikel im Puffer die Untersuchung der Proteinprobe verfälschten.

20 µl Proteinprobe wurden für die Experimente eingesetzt. Die Messung wurde 10 bis 20 Mal wiederholt und dauerte insgesamt 60 bis 120 s.

3.3.4.4 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie)

Laufpuffer 1: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 µM EDTA, pH 7.4

Laufpuffer 2: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 µM EDTA, 5 % (v/v) DMSO, pH 8.5

Nickel-Lösung: 0.5 mM $NiCl_2$-Lösung in bidest. Wasser

Proteinlösung: 1 mg/ml MonBI-MonBII-Fusionsprotein mit 6xHis-*Tag* in Laufpuffer 1 bzw. 2

Waschpuffer 1: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 7.4

Waschpuffer 2: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, 5 % (v/v) DMSO, pH 8.5

Regenerationspuffer 1A: 250 mM Imidazol in bidest. Wasser, pH 7.4

Regenerationspuffer 1B: 350 mM EDTA in bidest Wasser, pH 8.3

Die Messungen wurden mit einem Biacore® T100 Gerät (GE Healthcare) bei 25 °C durchgeführt. Die Methoden wurden mit der Biacore® T100 Control Software geschrieben und die Messdaten mit der Biacore® T100 Evaluation Software ausgewertet.

Alle Puffer wurden sterilfiltriert (0.22 µm) und im Ultraschallbad entgast. Für die Messungen wurde ein Series S Sensor Chip NTA von GE Healthcare verwendet. Auf dem Chip wurden nur Flusszelle 1 und 2 angesteuert. Flusszelle 2 wurde mit Ni^{2+}-Ionen und dem MonBI-MonBII-Fusionsprotein beladen. Flusszelle 1 diente als Referenz. Die Lösungen mit den Liganden[4] wurden deswegen über beide Flusszellen geleitet. Um ausreichende RU-Antworten für die Ligandenbindung zu erreichen, musste eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verwendet werden.

Zur Äquilibrierung des Systems und zur Stabilisierung der RU-Antwort wurden vor der Ligandenvermessung (siehe
Tabelle 3-37) fünf bis zehn Startzyklen durchgeführt (siehe Tabelle 3-35), gefolgt von einem Konditionierungsschritt (siehe Tabelle 3-36).

Tabelle 3-35: Ablauf eines Startzyklus

	Lösung	**Kontaktzeit**	**Flussrate [µl/min]**	**Zelle**
1.	Nickel-Lösung	60 s	10	2
2.	Protein-Lösung	180 s	5	2
4.	Regenerationspuffer 1A	180 s	30	1 und 2
5.	Regenerationspuffer 1B	120 s	30	1 und 2

Tabelle 3-36: Ablauf eines Konditionierungszyklus

[4] Die Liganden wurden freundlicherweise von Dipl. Chem. Johannes Arp synthetisiert.

	Lösung	Kontaktzeit	Flussrate [µl/min]	Zelle
1.	Regenerationspuffer 1B	60 s	30	1 und 2

Tabelle 3-37: Ablauf eines Ligandenvermessungszyklus

	Lösung	Kontaktzeit	Flussrate [µl/min]	Zelle
1.	Nickel-Lösung	60 s	10	2
2.	Protein-Lösung	180 s	5	2
3.	Ligand	60 s, gefolgt von 600 s Dissoziationszeit	10	1 und 2
4.	Regenerationspuffer 1A	180 s	30	1 und 2
5.	Regenerationspuffer 1B	120 s	30	1 und 2

3.3.5 Enzym-Aktivitätsassays

3.3.5.1 Aufreinigung von Premonensin

Der flüssige Anteil des Kultivierungsansatzes (siehe 3.3.2.8) wurde dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die Zellpellets wurden mit einem Spatel von der Metallspirale und der Wand des Erlenmeyerkolbens entfernt und mit 50 ml Methanol pro Ansatz extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Extrakte wurden in Dichlormethan gelöst, auf Kieselgel aufrotiert und mittels Filtrationssäule gereinigt. Dafür wurde ein Laufmittelgradient (PE/EE 9:1 (v/v) bis 100 % EE) verwendet. Die Säulenchromatographie wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, Premonensin-haltige Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

3.3.5.2 Präparative Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Der zweite Premonensin-Reinigungsschritt erfolgte mittels präparativer *Reversed Phase* (*RP*)-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer C18-Säule der Firma Macherey&Nagel (Nucleodur Isis, 250 x 21 mm, 5 µm, 300 Å) bei einer Flussrate von 20 ml/min. Die Detektion erfolgte UV-spektroskopisch mittels DAD und massenspektrometrisch durch ein ESI *single-quad*-Massenspektrometer im Positivmodus über einen Massenbereich von 500 bis 700 m/z (1200er Series mit Active Splitter G1986C und 6120 Quadrupol MS, Agilent Technologies). Die Laufmittelgemische wurden vor Verwendung im Ultraschallbad entgast. Das Rohprodukt wurde so im Eluentengemisch A/B gelöst, dass das Verhältnis der Eluenten in der Probe dem Verhältnis zu Beginn des HPLC-Laufs entsprach. Nachdem die Probe durch einen UFC40GV0S Ultrafree Zentrifugenfilter (0.22 µm) (Merck Millipore) filtriert worden war, wurden 100 µl bis 900 µl

Probe (Konzentration 10 mg/ml) eingespritzt. Zur Trennung wurde entweder der HPLC-Gradient 2 (siehe Tabelle 3-41) oder der optimierte HPLC-Gradient 3 (siehe Tabelle 3-42) verwendet.
Nach der Aufreinigung wurde das organische Lösungsmittel aus den Premonensin-haltigen Fraktionen am Rotationsverdampfer entfernt, die Probe in bidest. Wasser aufgenommen, eingefroren und das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt.

3.3.5.3 Ganzzellassays

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Flavin-abhängigen Epoxidase wurden Ganzzellassays durchgeführt. Ganzzellassays wurden in einem Kulturvolumen zwischen 1 ml und 10 ml mit einer Substratkonzentration von 1 mM durchgeführt.
Die MonCI-überexprimierenden *S. coelicolor* CH999-Kulturen (10 ml Kulturvolumen) wurden vor der Substratzugabe für 24 h unter Expressionsbedingungen kultiviert (siehe 3.3.2.7).
Da *E. coli*-Kulturen eine deutlich kürzere Generationszeit aufweisen, lagen zwischen der Induktion der MonCI-Expression (siehe 3.3.2.3) und der Substratzugabe nur 6 h. Die Kultivierungstemperatur wurde zum Zeitpunkt der Zugabe von 16 °C auf 25 °C angehoben.
Die Streptomyceten-Kultivierung erfolgte bis zum vollständigen Umsatz des Substrats oder maximal für 100 h, *E. coli*-Kultivierungen wurden für maximal 48 h durchgeführt.
Für die initiale Überprüfung der Enzymaktivität Linalool als Testsubstrat verwendet [46], da das natürliche Substrat Premonensin nur in geringen Mengen zur Verfügung stand. Premonensin wurde für die Ganzzellassays in DMSO gelöst
In regelmäßigen Abständen wurden Aliquots aus der Kultur entnommen, um den Substratumsatz zu verfolgen. Der Umsatz von Linalool wurde mittels GC-MS verfolgt. Dafür wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Diethylether extrahiert, die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mittels GC-MS analysiert.
Der Premonensin-Umsatz wurde per LC-ESI-MS analysiert. Zur Extraktion der Proben wurde Ethylacetat verwendet.

3.3.5.4 *In vitro* Assays mit gereinigtem Enzym

Aktivitätsassays mit gereinigtem Enzym wurden in einem Volumen von 100 µl bei einer Temperatur von 30 °C für 1 h bis 6 h durchgeführt. Drei verschiedene Puffer wurden auf ihre Eignung geprüft:

- 50 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7.6
- 50 mM TrisHCl, pH 7.0
- 50 mM MOPS, pH 7.0

Tabelle 3-38: Zusammensetzung der MonCI-Aktivitätsassays

1 µM	MonCI (gereinigt mittels Metallionen-Affinitätschromatographie)
40 µM	NAD(P)H
20 - 100 µM	Substrat (Linalool oder Premonensin, gelöst in DMSO)

MonBI und MonBII wurden sowohl einzeln als auch in Kombination im Enzymassy eingesetzt.

Tabelle 3-39: Zusammensetzung der MonBI/MonBII-Aktivitätsassays

1 µM	MonBI und/oder MonBII (gereinigt mittels Metallionen-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie)
20 – 100 µM	Substrat (2,3-Epoxy-2-methyl- heptan-6-ol)

Experimente mit Linalool und 2,3-Epoxy-2-methyl- heptan-6-ol [5] wurden per GC-MS untersucht, Ansätze mit Premonensin wurden in der Vakuumzentrifuge eingeengt und anschließend per LC-ESI-MS analysiert.

[5] Das Substrat wurde freundlicherweise von Dr. David Giera synthetisiert.

3.3.6 Instrumentelle Analytik

3.3.6.1 Analytische Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

Die Analyse von Enzymassays mit Premonensin wurde mittels Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (HPLC-MS) durchgeführt. Dazu wurde ein 6224 ESI-TOF-Massenspektrometer (Agilent Technologies) verwendet, das an eine 1200 Series HPLC (Agilent Technologies) gekoppelt war.

Die Trennung der Analyten erfolgte entweder an einer C18-Säule mit einer Länge von 250 mm, einem Innendurchmesser von 4.6 mm und einer Partikelgröße von 3 µm (Chromsep HPLC Column SS 250 x 4.6 mm, Microsorb 100-5 C18, Varian) oder an einer C8-Säule mit einer Länge von 150 mm, einem Innendurchmesser von 4.6 mm und einer Partikelgröße von 5 µm (ZORBAX Eclipse XDB-C8 Analytical 4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der HPLC-Gradient 1 für die Trennung verwendet (siehe Tabelle 3-40). Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe Professor Peter F. Leadlay übernommen. Im Folgenden wurde der Gradient 2 entwickelt, um auf die gängigen LC-MS-Lösungsmittel (Wasser und Acetonitril mit jeweils 0.1 % Ameisensäure) zurückgreifen zu können (siehe Tabelle 3-41). Die Probe wurde so im Eluentengemisch A/B gelöst, dass das Verhältnis der Eluenten in der Probe dem Verhältnis zu Beginn des HPLC-Laufs entsprach. 5 µl Probe (1 mg/ml) wurden eingespritzt und die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 ml/min. Die Detektion erfolgte im positiven Modus über einen Massenbereich von 300 – 1600 m/z.

Tabelle 3-40: HPLC-Gradient 1

Zeit [min]	**Eluent B [%]**	
0	80	Eluent A: 20 mM Ammoniumacetat Eluent B: Methanol
5	80	
30	100	
40	80	
60	80	

Tabelle 3-41: HPLC-Gradient 2

Zeit [min]	**Eluent B [%]**	Eluent A: bidest. Wasser + 0.1 % (v/v) Ameisensäure Eluent B: Acetonitril + 0.1 % (v/v) Ameisensäure
0	50	
5	50	
65	100	
70	50	
80	50	

Tabelle 3-42: HPLC-Gradient 3

Zeit [min]	**Eluent B [%]**	Eluent A: 95 % bidest.Wasser/ 5 % Acetonitril/ 0.1 % Ameisensäure Eluent B: 95 % Acetonitril/ 5 % bidest.Wasser/ 0.1 % Ameisensäure
0	75	
5	90	
25	100	
27	100	
30	75	

3.3.6.2 Analytische Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

GC-MS-Untersuchungen erfolgten an einem Agilent 6890N Chromatographen mit zugehörigem Massedetektorsystem Agilent 5975B VL MSD. Dabei diente Helium als Trägergas mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.9 ml/min. Es wurde eine HP-5 ms Säule (Agilent Technologies) mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0.25 mm und einer Schichtdicke von 0.25 µm verwendet. Zur Auswertung wurde das Programm MestReNova® von Mestrelab Research genutzt.

3.3.6.3 NMR-Spektroskopie

Die ^{1}H-, ^{13}C- sowie 2D-NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer DRX-500 (500 MHz ^{1}H-, 125 MHz ^{13}C-Spektren) von Bruker aufgenommen. Zur Auswertung der Spektren wurden die Programme MestReNova™ von Mestrelab Research und TopSpin™ von Bruker verwendet.

Die chemische Verschiebung δ ist in parts per million (ppm) relativ zum Signal des Lösungsmittels Chloroform-*d* (δ = 7.26 ppm im ^{1}H-NMR, δ = 77.0 ppm im ^{13}C-NMR) angegeben.

Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizitäten der Signale werden durch folgende Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, m = Multiplett.

3.3.7 Kristallisationsexperimente

3.3.7.1 Qualitätskontrolle

Um die Qualität der Proteinpräparation vor der Kristallisation zu überprüfen, wurden MALDI-MS-Analysen von den Proben durchgeführt und das Molekulargewicht der Proteine bestimmt.
Zudem wurde die Faltung der Proteine mittels Thermofluor-Assay[113] überprüft. Dazu wurde die Proteinprobe mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Orange (Invitrogen) versetzt (siehe Tabelle 3-43).

Tabelle 3-43: Ansatz für den Thermofluor Assay

5 µl	500 mM HEPES-Puffer pH 7.0 (final 100 mM)
5 µl	750 mM NaCl (final 150 mM)
2 µl	62 x SYPRO® Orange (final 5 x)
2 µl	5-20mg/ml Proteinlösung
Mit bidest. Wasser auf 25 µl auffüllen	

Die Proben wurden in einem iCycler iQ™ Real-Time PCR Cycler (Bio-Rad) von 5 °C auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenz gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlänge 530 nm.
Beide Analysen wurden von den Mitarbeitern der Sample Preparation and Characterisation (SPC) Facility am EMBL Hamburg durchgeführt.

3.3.7.2 Hochdurchsatzuntersuchung von Kristallisationsbedingungen

Um initiale Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, wurden kommerzielle Kristallisationsscreens verwendet:

- *Classic I* und *II*, *ComPAS*, *JCSG Core I* bis *IV*, *JCSG Plus* und *ProComplex* (Qiagen)
- *JB_Pi minimal* (Jena Bioscience)
- *MD Clear Strategy I* und *II, PACT premier, Stura Foodprint* (Molecular Dimensions)

MonBI und MonBII wurden sowohl einzeln als auch im Komplex untersucht. Dabei wurden die folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Tabelle 3-44: Proteinkonzentrationen in den Kristallisationsansätzen

Protein	Konzentration
MonBI:	5, 10, 15 mg/ml
MonBII:	5, 10 mg/ml
MonBI-MonBII-Komplex:	5, 10, 20 mg/ml
MonBI-MonBII-Fusionsprotein:	12, 18 mg/ml

Für die Durchmusterung der Kristallisationsbedingungen wurde die *Sitting-Drop* Methode angewandt. Dazu wurden 0.1 bis 1 µl Proteinlösung 1:1 mit Präzipitantenlösung gemischt und das Reservoir wurde mit 55 µl der Präzipitantenlösung gefüllt. Die Kristallisationsplatten (*MRC 96-Well* Platten von Molecular Dimensions) wurden mit dem Mosquito®-LCP-Roboter (TTP Labtech) oder mit dem Honeybee® 961 (Digilab) Pipettierroboter pipettiert, luftdicht verschlossen und bei 19 °C gelagert.
Das Kristallwachstum wurde mit dem automatischen Dokumentationssystem RockImager-1000 (Formulatrix) überwacht. In diesem Gerät werden die Kristallisationsplatten bei 19 °C gelagert und automatisch in regelmäßigen Intervallen über drei Monate fotografiert. Nach 14 Tagen erfolgt außerdem eine Inspektion mit UV-Licht, um zwischen organischen und anorganischen Kristallen zu differenzieren. Die Fotos von den Kristallisationstropfen wurden mit dem Crystallization Information Management System (Crims©, EMBL) inspiziert.
Alternativ erfolgte die Überprüfung und Dokumentation des Kristallwachstums mit dem Mikroskop SZX12 mit integrierter Kamera DP10 (Olympus).

3.3.7.3 Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen

3.3.7.3.1 MonBI-MonBII-Komplex

Die initialen Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation der Präzipitantenkonzentrationen um die gefundene Bedingung herum optimiert. Die Optimierungsansätze wurden in 24-*Well* Platten von Hand pipettiert und sowohl im *Sitting-Drop*-Verfahren als auch im *Hanging-Drop*-Verfahren angesetzt (die Optimierungsbedingungen sind in Tabelle 3-45 zusammengefasst).
Für *Hanging-Drop*-Experimente wurden Linbro Platten (Hampton Research) verwendet und *Sitting-Drop*-Experimente wurden in XQ-P-24S-A-Platten (MiTeGen) angesetzt.

Tabelle 3-45: Komponenten der Optimierungsplatten 1 und 2 (MonBI-MonBII-Komplex)

Optimierungsplatte 1:	Optimierungsplatte 2:
100 mM MES-Puffer pH 5.5, 6, 6.5, 7	150 mM Citrat-Puffer pH 5, 5.5, 6, 6.5
200 mM Calciumacetat	16-30 % (w/v) PEG8000
25-36 % (w/v) PEG 8000	

Pro Kristallisationsbedingung wurden drei verschiedene Tropfen mit den Proteinkonzentrationen 0 mg/ml (Negativkontrolle mit Puffer), 10 mg/ml und 15 mg/ml angesetzt. Es wurden immer 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Präzipitant gemischt. Das Reservoir enthielt jeweils 500 µl Präzipitantenlösung.

Die Proteintropfen in den *Hanging-Drop*-Ansätzen wurden auf dem Deckgläschen in die Länge gezogen und der Tropfen mit der Präzipitantenlösung wurde auf einem Ende dieses Flüssigkeitsstrichs platziert (siehe Abbildung 14). Auf diese Weise entsteht ein Präzipitantengradient in der Proteinlösung. Die Platten wurden luftdicht verschlossen und in einem klimatisierten Labor bei 19 °C gelagert.

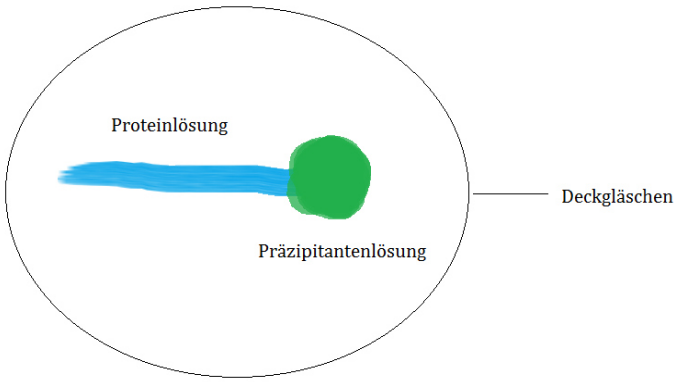


Abbildung 14: *Hanging-Drop* Anordnung für die Optimierung der MonBI/MonBII-Kristalle (Optimierungsplatten 1 und 2)

3.3.7.3.2 MonBI-MonBII-Fusionsprotein

Die ersten Ansätze zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen für das MonBI-MonBII-Fusionsprotein wurden von Hand in MRC Maxi Platten (Molecular Dimensions) angesetzt (siehe Tabelle 3-46). Im *Sitting-Drop*-Verfahren wurden 1 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml mit 1 µl Präzipitantenlösung gemischt. Das Reservoir enthielt 150 µl Präzipitantenlösung.

Tabelle 3-46: Komponenten der Optimierungplatte 3 (MonBI-MonBII-Fusionsprotein):

0.2 M, 0.3 M Natriumacetat
15 – 25 % (w/v) PEG 3350

Basierend auf den Ergebnissen dieses Experiments wurden dann weitere *Sitting-Drop*-Verfeinerungsansätze mit dem Honeybee® 961 (Digilab) Pipettierroboter in *MRC 96-Well* Platten (Molecular Dimensions) pipettiert (siehe Tabelle 3-47).
Hier wurde das Fusionsprotein in einer Konzentration von 12 mg/ml und 18 mg/ml eingesetzt und 0.5 µl sowie 0.75 µl der Proteinlösung wurden jeweils mit 0.5 µl Präzipitantenlösung gemischt.
Die luftdicht verschlossenen Platten wurden in einem klimatisierten Labor bei 19 °C gelagert.

Tabelle 3-47: Komponenten der Optimierungsplatten 4 und 5 (MonBI-MonBII-Fusionsprotein), Elf verschiedene PEG-Konzentrationen wurden getestet – die mittlere PEG-Konzentration wurde zwei Mal angesetzt.

Optimierungplatte 4	**Optimierungplatte 5**
10 % (w/v) PEG 20 000 0.1 M MES pH 6.5 15 – 26 % (w/v) PEG MME 500	0.3 M NaOAc 15 – 26 % (w/v) PEG 3350
10 % (w/v) PEG 20 000 0.1 M MES pH 6.5 15 – 26 % (w/v) PEG MME 500 0.1 M NaOAc	0.3 M NaBr 15 – 26 % (w/v) PEG 3350
0.1 M TrisHCl pH 8.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000	0.3 M NaNitrat 15 – 26 % (w/v) PEG 3350
0.1 M TrisHCl pH 8.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000 0.1 M NaOAc	0.3 M NaOAc 15 – 26 % (w/v) PEG 6000
0.1 M TrisHCl pH 7.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000	0.3 M NaBr 15 – 26 % (w/v) PEG 6000
0.1 M TrisHCl pH 7.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000 0.1 M NaOAc	0.3 M NaNitrat 15 – 26 % (w/v) PEG 6000
0.1 M HEPES pH 7.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000	0.3 M NaOAc 15 – 26 % (w/v) PEG 10 000
0.1 M HEPES pH 7.5 20 – 31 % (w/v) PEG 10 000 0.1 M NaOAc	0.3 M NaBr 15 – 26 % (w/v) PEG 10 000

3.3.7.4 Datensammlung unter Anwendung von Synchrotron-Strahlung

Die Röntgenbeugungsdaten wurden bei 100 K an dem Messplatz P13-PetraIII (DESY, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 0.968641 Å unter Verwendung eines PILATUS 6M Detektors gesammelt.
Die Kristalle wurden mit Nylon-Schlaufen (Durchmesser 0.1 mm) aus dem Kristallisationstropfen isoliert. Zum Cryoschutz wurden 10 – 15 % (v/v) Glycerin zugegeben. Die Nylon-Schlaufe wurde dann am Messplatz montiert und im flüssigen Stickstoffstrom schockgefroren. Ein kompletter Datensatz bis 3.3 Å Auflösung wurde gesammelt.

3.3.7.5 Datenprozessierung und Modelbau

Die Röntgenbeugungsdaten wurden mit dem Programm XDS[114] indiziert, integriert und skaliert. Die CCP4-Software[115] und das Programm COOT[116] wurden für Berechnungen und den Modellbau verwendet. Das Phasenproblem wurde durch molekularen Ersatz gelöst. Die Struktur der Epoxid-Hydrolase Lsd19 (PDB ID: 3rga)[103] wurde als Grundlage verwendet. Die Struktur des MonBI-MonBII-Komplexes wurde dann durch ein schrittweises Vorgehen von mehreren Zyklen gebaut. Nach jedem Zyklus wurde das Modell mit REFMAC[117] verfeinert. Durch die kontinuierliche Abnahme des R-Wertes wurde die Verbesserung des Modells überprüft.

3.3.8 Bioinformatische Methoden

Für die graphische Darstellung und Analyse von dreidimensionalen Proteinmodellen und Proteinkristallstrukturen wurde das molekulare Graphikprogram UCSF Chimera, Version 1.7 verwendet[118].
Sequenzbasierte Vorhersagen über Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm I-Tasser[119,120] generiert.
Das dreidimensionale Proteinmodell des MonBI-MonBII-Heterodimers wurde mit dem molekularen Modellierungsprogramm SWISS-MODEL[121,122] erstellt. Für den Modellierungsvorgang wurden die Sequenzen von MonBII und MonBI zusammengefügt und als zusammenhängendes Protein dargestellt. Dabei bildete MonBII den aminoterminalen Anteil der Sequenz und MonBI den carboxyterminalen Anteil. Das Programm identifizierte auf Basis der Sequenzhomologie anschließend die Kristallstruktur der Epoxid Hydrolase Lsd19 als geeignete Vorlage für den Modellierungsprozess.
Dreidimensionale Modelle der Epoxidase MonCI wurden sowohl mit SWISS-MODEL als auch mit dem Programm MODBASE[123] generiert, sodass die Ergebnisse verglichen werden konnten.
SWISS-MODEL und MODBASE nutzen beide das Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)[124,125], um homologe Sequenzen zu identifizieren. SWISS-MODEL verwendet zudem noch das Programm HHsearch[126,127], während MODBASE mit dem Programm MODELLER[128] arbeitet.
Um die Bindung potentieller Substrate an die Epoxid-Hydrolasen zu simulieren, wurden *Docking*-Experimente mit dem Programm AutoDock 4.0[129,130] durchgeführt.

Das Unterprogramm AutoGrid berechnet zunächst ein dreidimensionales Netz an Wechselwirkungsenergien für das Protein. AutoDock führt basierend auf den AutoGrid Ergebnissen das eigentliche *Docking* des Substrats durch unter Verwendung des AMBER-Kraftfeldes[131].

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Flavin-abhängige Monooxygenase MonCI

Zur Untersuchung der Epoxidase MonCI wurden verschiedene Konstrukte des Enzyms in *E. coli* und *Streptomyceten* heterolog überexprimiert. Die Reinigung erfolgte anschließend mittels Metallionen-Affinitätschromatographie.

4.1.1 Heterologe Expression von MonCI in *E. coli*

Für initiale Expressionsversuche mit MonCI in *E. coli* BL21 (DE3) wurde das Plasmid monCI_pET28b(+) verwendet. Es codiert für MonCI mit einem carboxyterminalen 6xHis-*Tag* (siehe Abbildung 15).

Abbildung 15: MonCI mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag*, codiert von monCI_pET28b(+)

Die Biosynthese von löslichem MonCI gelang mit diesem Konstrukt jedoch nicht. Das Protein wurde hauptsächlich in aggregierter Form produziert und lag in den *E. coli*-Bakterien in sogenannten Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) vor. Die Bildung von *inclusion bodies* kann ein Indiz für die mangelnde oder fehlerhafte Faltung des überexprimierten Proteins sein[132].

Um den Anteil an löslichem MonCI zu erhöhen, wurde das Enzym mit den Chaperonen DnaK, DnaJ, GrpE sowie GroES und GroEL coexprimiert. Chaperone vermitteln die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine (siehe Abbildung 16): Die wachsende Peptidkette wird während der Translation vom Hitzeschockprotein (Hsp) 70-System, bestehend aus den Chaperonen DnaK und DnaJ, stabilisiert. Diese Chaperone binden an hydrophobe Regionen, die aufgrund der ausgestreckten Konformation der wachsenden Peptidkette noch nicht im hydrophoben Inneren des Proteins verborgen sind. Wenn die Translation abgeschlossen ist, unterstützt das Chaperon GrpE den Transport von ungefalteten Polypeptiden ins Innere des Chaperons GroEL, auch Chaperonin genannt. GroEL bildet eine Art „Fass“, dessen „Deckel“ das Chaperon GroES darstellt. Diese abgeschlossene Umgebung ermöglicht die Faltung der Peptidkette.

Die Coexpression mit Chaperonen verbesserte die Löslichkeit von MonCI und ermöglichte die Aufreinigung der Epoxidase mittels nativer Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 4.1.3.1).

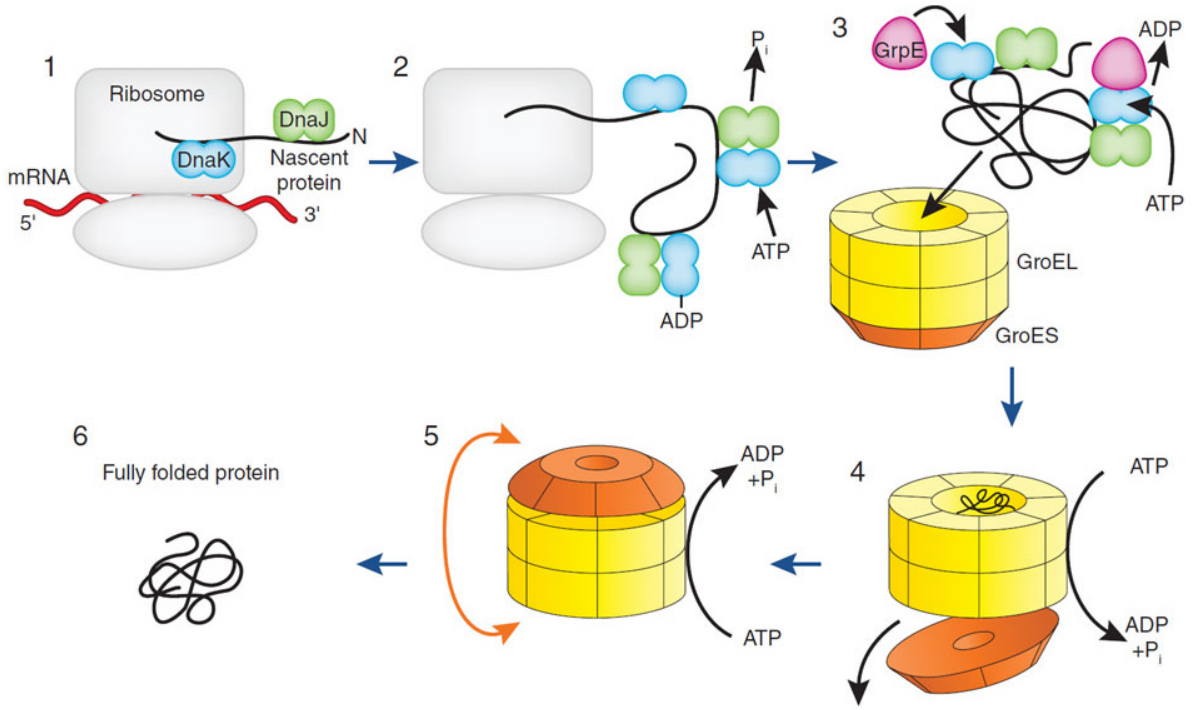


Abbildung 16 : Mechanismus der Proteinfaltung durch die Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES während und nach der Translation [133,134].

Für die heterologe Expression des Flavin-abhängigen Enzyms MonCI wurde das Kulturmedium mit 1 mg/ml Riboflavin versetzt, um sicherzustellen, dass die Vorstufe des Co-Faktors in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Dies führte zu einer Verdoppelung der geernteten Zellmasse von 7.5 g (MonCI-Expression ohne Riboflavin-Zusatz) auf 14 g pro Liter Terrific Broth. Da das Wachstum von *E. coli*-Bakterien durch die Überexpression falsch oder gar nicht gefalteter Proteine inhibiert wird[132,135], kann aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass der Cofaktor eine essentielle Rolle bei der Faltung von MonCI spielt.

In dieser Arbeit wurde *monCI* mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag* als NcoI/XhoI-Fragment in den Vektor pETM41 kloniert. Mit dem Plasmid monCI_pETM41 wurde MonCI als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein (*Maltose-Binding Protein*, MBP) exprimiert (siehe Abbildung 17). Die Fusion mit dem gut löslichen MBP kann in vielen Fällen die Faltung des Fusionspartners verbessern und dadurch seine Aggregation verhindern [135]. An beiden Termini wies dieses Konstrukt einen 6xHis-*Tag* auf, sodass eine Aufreinigung mittels Metallionen-Austauschchromatographie möglich war. Außerdem hätte das MBP samt aminoterminalem 6xHis-*Tag* nach der Aufreinigung über die TEV-Protease-Schnittstelle abspalten werden können.

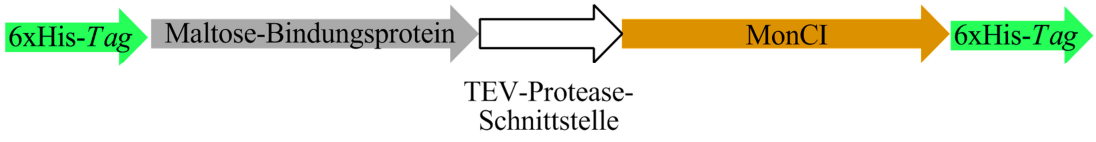


Abbildung 17: MonCI-MBP-Fusionsprotein, codiert durch das Plasmid monCI_pETM41

Auch bei MonCI führte die Fusion mit MBP zu einer enormen Steigerung des löslichen Proteinanteils. Die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Metallionen-Austauschchromatographie war ebenfalls erfolgreich (siehe Abbildung 23).

4.1.1.1 Codongebrauch

Bei der heterologen Überexpression von Proteinen in *E. coli* ist der Codongebrauch (*Codon Usage/ Codon Bias*) zu beachten. Die *wobble*-Hypothese besagt, dass in einigen Fällen mehrere Codons für die gleiche Aminosäure codieren. Welche Codons bevorzugt verwendet werden, ist abhängig vom Organismus. Je häufiger ein bestimmtes Codon von einem Organismus verwendet wird, desto höher ist die Konzentration der tRNA mit dem entsprechenden Anticodon und der dazugehörigen Aminosäure. Weicht der Codongebrauch des Zielgens stark vom Codongebrauch des Wirtsorganismus *E. coli* ab, so kann die Proteinbiosynthese des Zielproteins gehemmt sein. Ein Maß für die Abweichung ist der *Codon Adaptation Index* (CAI). Ein CAI von 1.0 bedeutet eine vollkommene Übereinstimmung des Codongebrauchs zwischen den Organismen, CAIs über 0.8 sind ein Hinweis auf gute Exprimierbarkeit des Zielgens. Für die heterologe Expression von MonCI in *E. coli* lag der CAI bei 0.69 und 10 % der *monCI*-Codons sind in *E. coli* als seltene Codons klassifiziert[136].
Der Anteil der Basen Guanin und Cytosin (GC-Anteil) des *monCI*-Gens ist mit 71.81%. sehr hoch. Idealerweise sollte der GC-Anteil eines Gens für die heterologe Überexpression in *E. coli* zwischen 30 % und 70 % liegen. Ein GC-Anteil von mehr als 70 % kann in *E. coli* die Transkriptions- und Translationseffizienz herabsetzen.

4.1.2 Heterologe Expression von MonCI in *S. coelicolor* CH999

Für die Expression von MonCI in *S. coelicolor* CH999 wurde das Plasmid pMAJ21b verwendet. Es codierte für MonCI mit einem aminoterminalen 6xHis-*Tag* (siehe Abbildung 18).

Abbildung 18: MonCI mit aminoterminalem 6xHis-*Tag*, codiert durch das Plasmid pMAJ21b

Das Einbringen von Plasmiden in *Streptomyceten* erfordert eine andere Vorgehensweise als bei *E. coli*-Bakterien. Während bei letzteren die Hitzeschocktransformation gute Ergebnisse lieferte, wurde bei *S. coelicolor* CH999 die intergenerische Konjugation mit *E. coli*-Bakterien angewandt[137–139]. Dabei wird das Plasmid von einem *E. coli*-Donor auf den *Streptomyceten*-Rezipienten übertragen. *S. coelicolor* besitzt ein methylierungsabhängiges Restriktionssystem, das Fremd-DNA anhand ihres Methylierungsmusters erkennt und abbaut. Um diesen Schutzmechanismus zu umgehen, wurde der methylierungs-defiziente *E. coli*-Stamm ET12567 als Donorstamm verwendet. Dieser enthielt außerdem das Plasmid pUZ8002[140]. Dieses F-Plasmid ist ein RK2-Derivat und ermöglicht den

horizontalen Gentransfer. Da es eine Mutation in *oriT* (*Origin of Transfer*) aufweist, wird es selbst jedoch nicht übertragen.

Nach der Konjugation wurde die *Streptomyceten-E. coli*-Mischung auf MS-Agar ohne Antibiotika ausplattiert. Nach 18-stündiger Inkubation wurde die Agarplatte zunächst mit Nalidixinsäure überschichtet, um das *E. coli*-Wachstum zu hemmen. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit Apramycin, um auf *S. coelicolor*-Zellen zu selektieren, die das Plasmid pMAJ21b aufgenommen hatten. Nach weiteren 3 bis 4 Tagen Inkubation im Brutschrank waren *S. coelicolor* CH999-Clone sichtbar. Da Nalidixinäure nur bakteriostatisch wirkt, waren zusätzlich *E. coli*-Clone auf der Platte vorhanden (siehe Abbildung 19A). Durch *Replica*-Platierung (siehe 3.3.2.6.3) konnte *S. coelicolor* mit pMAJ21b isoliert werden (siehe Abbildung 19B).

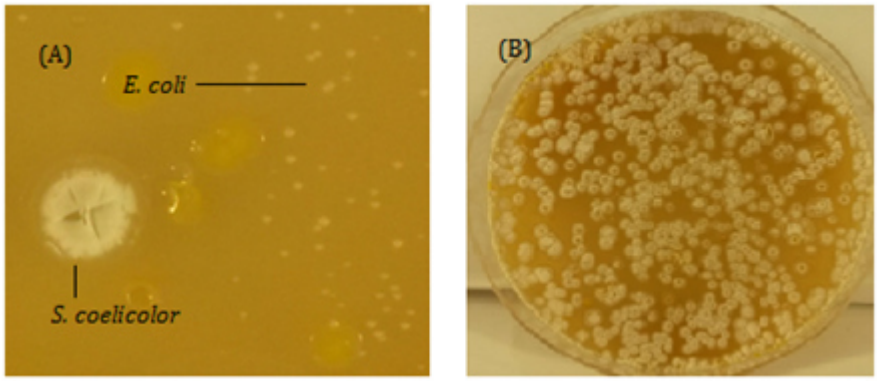


Abbildung 19: *Replica*-Platierung nach der Konjugation von *E. coli* ET12567/pUZ8002 mit *S. coelicolor* CH999 zur Übertragung des Plasmids pMAJ21b

Die Expression von MonCI in *S. coelicolor* CH999 erfolgte anschließend in Flüssigkultur (siehe Abbildung 20). Die Gelbfärbung der Zellen war allerdings nicht auf die Expression des Flavin-abhängigen Enzyms zurückzuführen – auch Kulturen, in denen die MonCI-Expression nicht induziert wurde, wiesen die gleiche Farbe auf.

Abbildung 20: MonCI-Expressionskultur (*S. coelicolor* CH999 mit Plasmid pMAJ21b). Die *Streptomyceten* wachsen sowohl im Flüssigmedium als auch als gelber Belag an der Glaswand des Erlenmeyerkolbens

Die heterologe Proteinexpression in *Streptomyceten* lieferte gute Ausbeuten an löslichem MonCI. Trotz dieses hervorragenden Ergebnisses muss der zeitliche Aufwand für dieses Experiment berücksichtigt werden: Vom Beginn der Konjugation bis zur Ernte der überexprimierenden *Streptomyceten*-Kultur vergingen mehr als drei Wochen. Eine Expression in *E. coli*-Zellen dauert

dagegen nur wenige Tage. Aus diesem Grund sollte weiterhin das Ziel verfolgt werden, MonCI in gefalteter und aktiver Form in *E. coli* zu produzieren.

4.1.3 Reinigung der Flavin-abhängigen Monooxygenase MonCI

4.1.3.1 Metallionen-Affinitätschromatographie

MonCI wurde unter Verwendung des Plasmids monCI_pET28b(+) als 54.3 kDa schweres Protein heterolog in *E. coli* exprimiert (siehe 3.3.2.3) und mittels Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung unter nativen Bedingungen lieferte ein gelbes Eluat. Die Farbe der Lösung war vermutlich auf die Anwesenheit des Flavin-Cofaktors zurückzuführen, der im oxidierten Zustand gelb ist. Bei dem Versuch, den Puffer mittels Dialyse auszutauschen, färbte sich der Dialyseschlauch gelb und im Inneren des Dialyseschlauchs entstand Proteinpräzipitat. Ein Pufferaustausch oder das Konzentrieren des Eluats mittels Ultrafiltration führte zu ähnlichen Ergebnissen: Die Membran des Ultrafilters färbte sich nach kurzer Zeit gelb und das Protein begann zu denaturieren. Vermutlich adsorbierte der für die Faltung des Proteins essentielle Flavin-Cofaktor an die Dialysemembran und ebenso an die Membran des Ultrafilters. Eine kovalente Bindung des Cofaktors an das Protein kann ausgeschlossen werden, da eine Dissoziation vom Protein unter Adsorption an Dialysemembranen in diesem Fall nicht möglich wäre.

Die native Metallionen-Austauschchromatographie lieferte geringe MonCI-Ausbeuten, da trotz der Chaperon-Coexpression ein Großteil des überexprimierten Proteins in *inclusion bodies* abgekapselt wurde (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22 links). Pro Liter Expressionskultur konnten nur 10 bis 20 mg MonCI isoliert werden. Genauere Angaben zur Ausbeute sind nicht möglich, da das eluierte Protein Verunreinigungen mit anderen Proteinen aufwies.

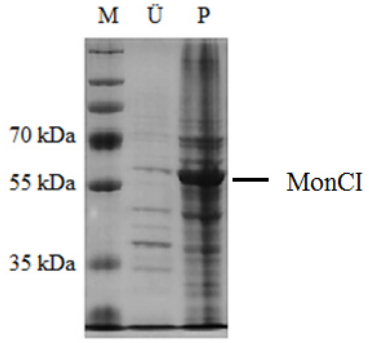


Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der löslichen (Ü - Überstand) und unlöslichen (P – Pellet) Fraktion der MonCI-Expressionskultur

Um die MonCI-Ausbeute zu erhöhen, wurde die Metallionen-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen untersucht (siehe Abbildung 22 rechts). Die Aufreinigung war erfolgreich, laut SDS-Gel enthielt das Eluat große Mengen der Epoxidase. Die anschließende

Renaturierung gelang jedoch nicht. Vermutlich enthielt das aggregierte Protein keinen Cofaktor (die Lösung war nicht gelb), weshalb eine Rückfaltung nicht möglich war.

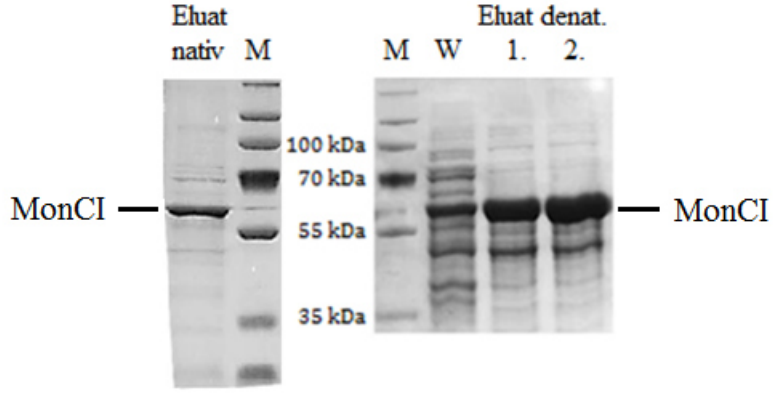


Abbildung 22: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von MonCI mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag* mittels Metallionen-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen (links) und unter denaturierenden Bedingungen (rechts).

Um die Löslichkeit von MonCI bei der heterologen Expression in *E. coli* zu verbessern, wurde MonCI als MBP-Fusionsprotein exprimiert (siehe 3.3.2.3). Das resultierende Fusionsprotein war 98.6 kDa schwer. Der Fusionspartner MBP unterstützt die Faltung des Zielproteins. Damit die Faltung bereits während der Translation beginnen kann, bildete das MBP die N-terminale Domäne des Konstrukts.
Das SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 23 zeigt deutlich, dass der Überstand nach dem Ultraschallaufschluss der Expressionskultur große Mengen des Fusionsproteins enthielt. Obwohl das Kulturmedium mit Riboflavin, der Vorstufe des MonCI-Cofaktors versetzt worden war, zeigte die Lösung mit dem gereinigten Protein keine Gelbfärbung. Diese wäre ein Hinweis auf die Anwesenheit des Flavin-Cofaktors im Enzym gewesen. Da das Enzym zudem keine Aktivität im Ganzzell- bzw. *in-vitro*-Enzymassay zeigte, kann angenommen werden, dass das Protein in der Apo-Form (also ohne Co-Faktor) exprimiert wurde.

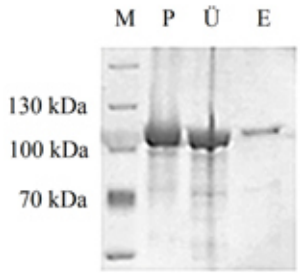


Abbildung 23: Coomassie-gefärbtes SDS-Polacrylamidgel von der Metallionen-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des MonCI-MBP Fusionsproteins, P: Zellpellet, Ü: Überstand nach dem Zellaufschluss, E: Eluat, M: Größenmarker

Die Metallionen-Affinitätschromatographie nach der Expression von MonCI in *S. coelicolor* CH999 lieferte homogenes Protein in guten Ausbeuten (siehe Abbildung 24). Das Eluat war gelb, sodass davon auszugehen ist, dass das gereinigte Protein einen Flavin-Cofaktor in oxidiertem Zustand enthielt.

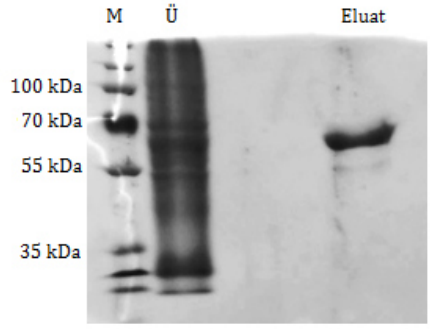
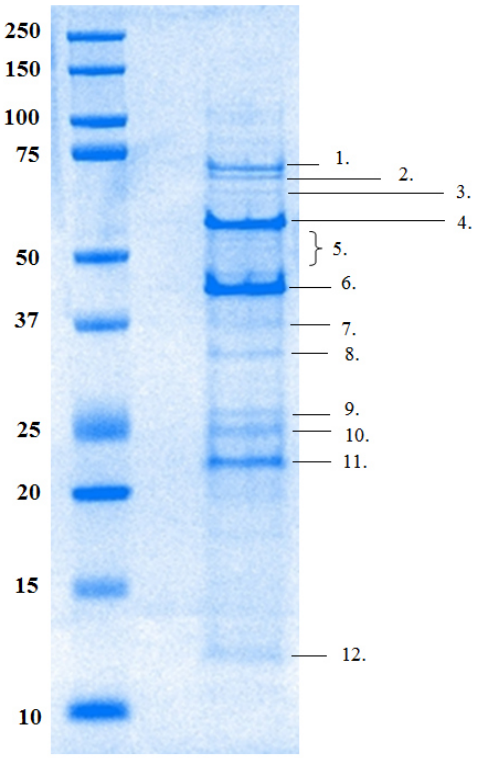


Abbildung 24: Coomassie-gefärbtes SDS-Polacrylamidgel von der Metallionen-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von MonCI aus pMAJ21b, M: Größenmarker, Ü: Überstand nach dem Zellaufschluss

Beim Vergleich der MonCI-Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel mit dem Größenstandard fiel auf, dass alle drei MonCI-Konstrukte das Migrationsverhalten eines größeren Proteins aufwiesen. Da dieser Effekt reproduzierbar war und da massenspektrometrisch bestätigt werden konnte, dass es sich bei dem Protein in dieser Bande um MonCI handelte, wurde dieses Phänomen nicht näher untersucht.

4.1.4 Ionenaustauschchromatographie von MonCI und massenspektrometrische Identifizierung der Verunreinigungen

Auch wenn die Coexpression mit Chaperonen die Proteinausbeute verbesserte, gelang es nicht, MonCI mittels Metallionen-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität zu reinigen.
Versuche, die Epoxidase mittels Ionenaustauschchromatographie zu reinigen, waren nicht erfolgreich. SDS-Polyacrylamidgele vom Eluat nach der Ionenaustauschchromatographie wiesen genau die gleichen Proteinbanden auf wie Gele von der Ausgangslösung. Zur näheren Untersuchung wurden alle Banden aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten (siehe Abbildung 25) und die Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert.



Massenspektrometrische Identifizierung

Bande 1:	Chaperon Dnak
Bande 2:	Chaperon HSP90
Bande 3:	60 kDa Chaperonin (GroEL)
Banden 4 bis 10:	MonCI und MonCI-Fragmente
Bande 11:	Chaperone DnaJ
Bande 12:	Chaperone HSP40

Abbildung 25: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel vom Eluat nach der Anionenaustauschchromatographie bei pH 6

Diese Ergebnisse liefern die Erklärung dafür, warum MonCI nicht vollständig gereinigt werden konnte: Vermutlich wurden die Chaperone im Komplex mit MonCI aufgereinigt. Diese Komplexe scheinen erst bei der Denaturierung der Proben für die SDS-PAGE zu zerfallen.

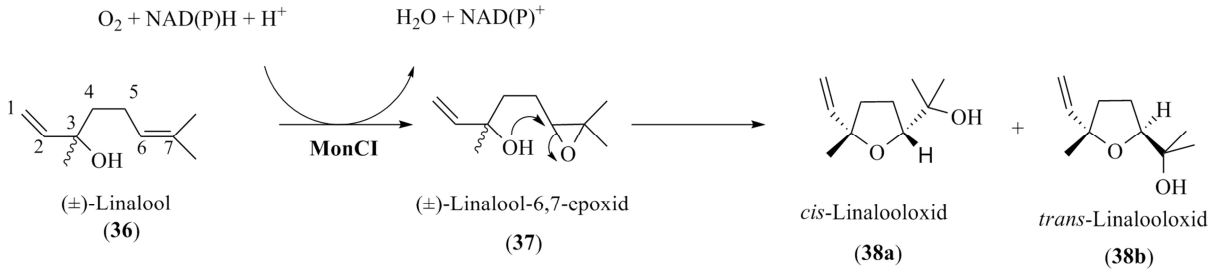
Zum anderen zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung aber auch, dass die Epoxidase MonCI abgebaut wird. Eine prominente MonCI-Bande findet sich bei einem Proteingewicht von ca. 40 kDa (Bande 6) und das kleinste MonCI-Fragment, das auf diesem Gel identifiziert werden konnte, war nur ungefähr 25 kDa schwer (Bande 10).

Möglicherweise ist der Abbau von MonCI auf die mangelnde Faltung des Proteins zurückzuführen. Diese kann zur Degradierung im Endoplasmatischen Retikulum führen[141]. Eine Reinigung der Fragmente, die den carboxyterminalen 6xHis-*Tag* noch enthalten, sollte trotzdem möglich sein.

4.1.5 Enzymaktivitätsassays

Die Enzymaktivität der Epoxidase MonCI wurde mit zwei verschiedenen Substraten untersucht. Zum einen wurde das natürliche Substrat Premonensin im *Knockout*-Stamm *S. cinnamonensis BHΔCIΔBIΔBII* produziert, gereinigt und im Enzymassay eingesetzt. Zum anderen wurde das Testsubstrat Linalool verwendet. Die Untersuchungen wurden sowohl mit dem gereinigten Enzym aus den Expressionssystemen monCI_pET28b(+) und pGKJE8 in *E. coli* sowie pMAJ21b in *S. coelicolor* durchgeführt. Zudem erfolgten *S. coelicolor*- und *E. coli*-Ganzzellassays.

4.1.5.1 Enzymaktivitätsassays mit Linalool



Schema 13: Epoxidierung und Cyclisierung von Linalool

Ganzzellassays wurden mit MonCI-exprimierenden *E. coli*-Kulturen und mit MonCI-exprimierenden *S. coelicolor*-Kulturen durchgeführt. Während in den *E. coli*-Kulturen keine Epoxidierung von Linalool (36) beobachtet wurde, erfolgte in der *Streptomyceten*-Kultur ein Umsatz des Substrats. Als Negativkontrollen wurden *S. coelicolor*-Kulturen verwendet, die das Plasmid pMAJ21b nicht enthielten. Auch diese Kulturen zeigten Enzymaktivität, allerdings war der Linaloolumsatz in den MonCI-exprimierenden Kulturen mehr als zehn Mal so hoch.

Nach 72 h war ein vollständiger Umsatz des racemischen Substrats 36 zu beobachten. Die Konfiguration der Hydroxygruppe scheint also keinen Einfluss auf die Selektivität von MonCI zu haben. Es erfolgte ausschließlich die Epoxidierung der dreifach substituierten Doppelbindung und die anschließende nicht-enzymkatalysierte 5-*exo*-Cyclisierung zum THF-Ring. Das Hydroxyepoxid konnte per GC-MS nicht detektiert werden, es konnten nur die cyclisierten Produkte *cis*-Linalooloxid (38a) und *trans*-Linalooloxid (38b) beobachtet werden. Diese beiden Produkte wurden dabei im Verhältnis 1:1 produziert.

Da sowohl die enantioselektive Epoxidierung der beiden Linalool-Enantiomere als auch die unselektive Epoxidierung des Racemats zu diesem Ergebnis führen, lässt dieses Experiment keine Aussage darüber zu, ob die Epoxidierung enantioselektiv verlief. Dies könnte jedoch einfach mit enantiomerenreinem Linalool durchgeführt werden. Eine stereoselektive Epoxidierung könnte sehr einfach über den Drehwert nachgewiesen werden und es könnte sogar bestimmt werden, welches Enantiomer gebildet wird.

Weder im *E. coli*-Ganzzellassay noch in den beiden *in-vitro*-Enzymassays konnte eine Epoxidierung von Linalool beobachtet werden. Das in *E. coli* exprimierte Enzym war vermutlich nicht korrekt gefaltet. Dies zeigten bereits die Aufreinigungsversuche mit MonCI (siehe 4.1.3) und auch die Absorptionsspektren des Enzyms (siehe 4.1.6) untermauerten diese Erklärung.

Da die in *S. coelicolor* exprimierte Epoxidase im Ganzzellassay aktiv war, ist zumindest vor der Reinigung von einem korrekt gefalteten Enzym auszugehen. Natürlich wäre es denkbar, dass die Extraktion des Enzyms zur Zerstörung der Faltung führt. Möglicherweise wäre aber auch die Anwesenheit einer Flavin-Reduktase im Versuchsansatz nötig, um die Reduktion des Flavin-Cofaktors zu garantieren. Die gelbe Farbe der Proteinlösung war ein eindeutiges Zeichen dafür, dass der Cofaktor in oxidierter Form vorlag. Reduzierte Flavine sind dagegen farblos[83]. Wurde NADH oder NADPH zur MonCI-Lösung gegeben, so war keine Entfärbung der Lösung zu beobachten. Dies geschah erst bei der Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit (siehe 4.1.6).

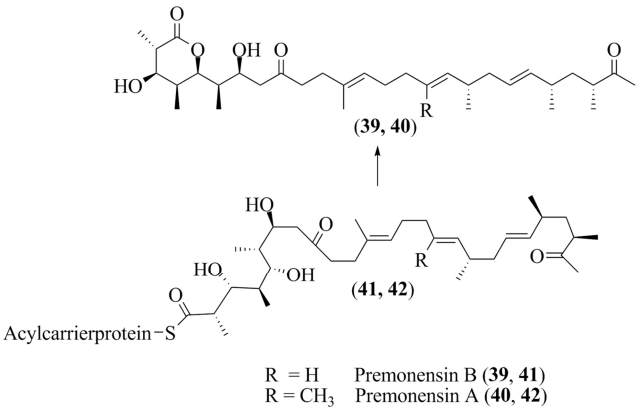
Es gibt zahlreiche Beispiele, die belegen, dass Flavinreduktasen für bestimmte Flavin-abhängige Monooxygenasen einen essentiellen Bestandteil des *in-vitro*-Aktivitätsassays darstellen[92,142–145].

Bei Zwei-Komponenten-Oxidoreduktase-Systemen (siehe 1.4) ist es nur logisch, dass die Flavin-abhängige Monooxygenase ohne dazugehörige Reduktase nicht funktionell ist. Beispielsweise ist die 4-Hydroxyphenylacetat-3-Monooxygenase HpaB nur dann katalytisch aktiv, wenn sie mit der korrespondierenden Flavin-Reduktase HpaC coexprimiert wird[146].

Aber auch bei Enzymen, von denen nicht bekannt ist, dass sie *in vivo* eine Flavin-Reduktase benötigen, kann die Anwesenheit eines solchen Enzyms im *in-vitro* Assay zum Erfolg führen. Ein solches Beispiel ist die Epoxidase Lsd18 aus dem Biosynthesegencluster von Lasalocid, deren Enzymaktivität durch die Inkubation mit der Flavin Reduktase Fre aus *E. coli* um mehr als 50 % gesteigert werden konnte [91].

4.1.5.2 Enzymaktivitätsassays mit Premonensin

Die Produktion und Reinigung von Premonensin erfolgte wie unter 3.3.2.8 beschrieben. Pro 50 ml *Streptomyceten*-Kultur konnten 0.2 bis 0.3 mg saubere Substanz erhalten werden. Sowohl die NMR-spektroskopische Untersuchung als auch die massenspektrometrische Analyse zeigten eindeutig, dass Premonensin A und B beide als δ-Lacton vorlagen.



Schema 14: Das freigesetzte Premonensin bildet das δ-Lacton

Keines der drei exprimierten MonCI-Konstrukte war in der Lage im *in-vitro*-Enzymassay oder im Ganzzellassay eine Epoxidierung des Premonensin-δ-Lactons zu katalysieren. Während mangelnde Enzymaktivität im *in-vitro*-Assay wahrscheinlich die gleichen Gründe hatte wie beim Enzymassay mit Linalool, ist es überraschend, dass das Premonensinlacton im Ganzzellassay nicht umgesetzt wurde. Ein inaktives Enzym kann als Begründung ausgeschlossen werden. Eine Erklärung muss also eher auf Seiten des Substrats gesucht werden.

Um auszuschließen, dass das Premonensinlacton nicht umgesetzt wurde, weil es aufgrund seiner Größe nicht in die Zelle gelangte, wurde ein Ultraschallaufschluss mit der Zellsuspension durchgeführt. Durch die Ultraschall-vermittelten Beschädigungen sollte die Durchlässigkeit der Zellmembran erhöht werden. Ein Umsatz war jedoch auch im Ultraschall-behandelten Ganzzelassay nicht zu beobachten.

Möglicherweise ist das 1,4-Hydroxyalkenmotiv essentiell für die Umsetzung des Substrats. Es wäre vorstellbar, dass die Anlagerung des Substrates an das Enzym durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit eben dieser Hydroxygruppe vermittelt wird. Da Premonensin als Lacton vorlag, wies das Molekül an C9 eine Ketogruppe auf. *In-vivo* ist Premonensin als Thioester an das ACP gebunden, sodass kein Lacton gebildet werden kann. So kann durch den Angriff der C5-Hydroxygruppe an C9 das Halbacetal gebildet werden und die relevante Hydroxygruppe ist vorhanden.

4.1.6 Charakterisierung des Flavin-Cofaktors

MonCI wurde sowohl in *E. coli* als auch in *S. coelicolor* CH999 exprimiert. Nach der Reinigung wurden beide Ansätze bei gleicher Proteinkonzentration photometrisch untersucht (siehe Abbildung 26). Beide Proteinlösungen waren gelb, der Flavin-Cofaktor lag also in oxidierter Form vor. Aufgrund der aeroben Aufreinigungsbedingungen ist dies keine Überraschung. Die photometrische Untersuchung der beiden Proteinpräparationen zeigte jedoch, dass die Absorptionsspektren je nach Expressionsorganismus einige Unterschiede aufwiesen.

Das Absorptionsspektrum von MonCI aus *E. coli* (rote Kurve) zeigte ein Absorptionsmaximum bei 452 nm und ein etwas schwächeres Maximum bei 478 nm. MonCI aus *S. coelicolor* (blaue Kurve) absorbierte stark zwischen 300 nm und 330 nm, und wies zwei weitere Absorptionsmaxima bei 370 nm und bei 452 nm auf. Zusätzlich ist in Abbildung 26 das Absorptionsspektrum des freien Flavin-Cofaktors (grüne Kurve) gezeigt. Dieser wurde durch Ultrafiltration vom in *E. coli* exprimierten Holo-Enzym abgetrennt: Während der Cofaktor die Membran passieren konnte, verblieb MonCI in der Ursprungslösung.

Die drei Spektren machen deutlich, dass die Umgebung des Flavin-Cofaktors einen starken Einfluss auf seine Absorptionseigenschaften hat. Die beiden Wirtsorganismen produzierten also verschiedene Formen der Epoxidase MonCI, die sich wahrscheinlich in ihrer Faltung unterschieden. Da MonCI aus *S. coelicolor* CH999 zumindest im Ganzzellassay Aktivität zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Enzym die korrekte Struktur aufwies.

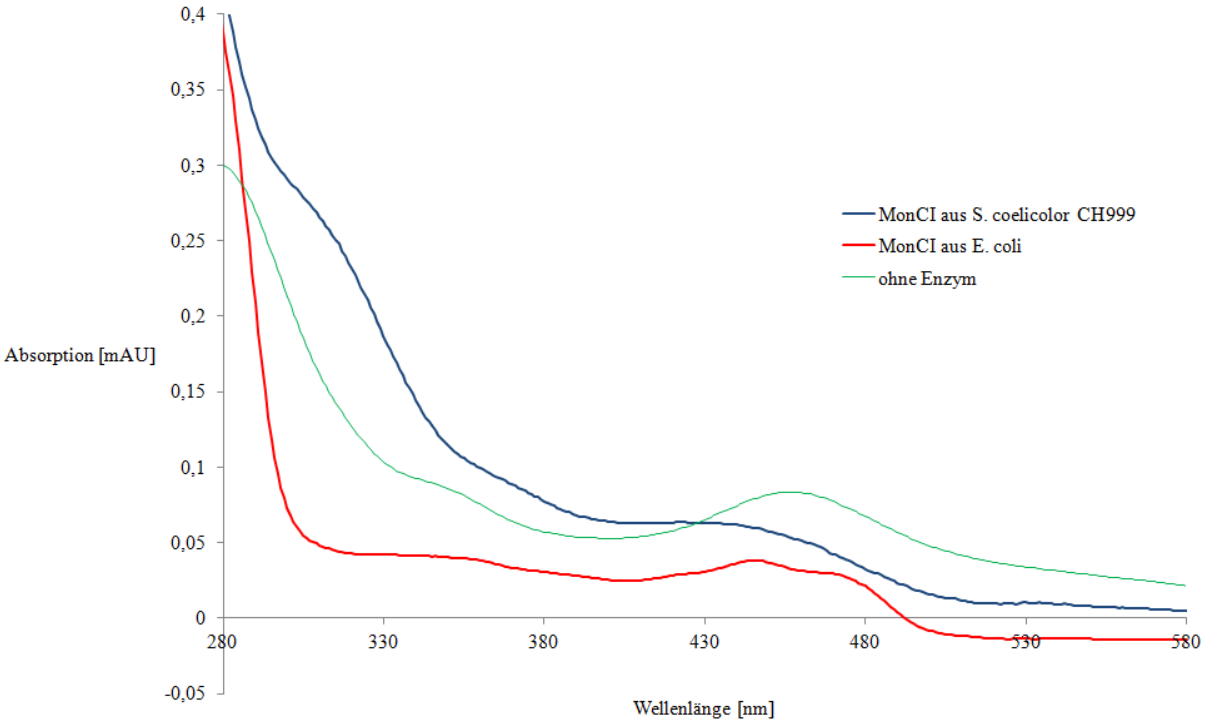


Abbildung 26: Absorptionsspektrum des Flavin-Cofaktors mit und ohne MonCI (Expression in *E. coli*)

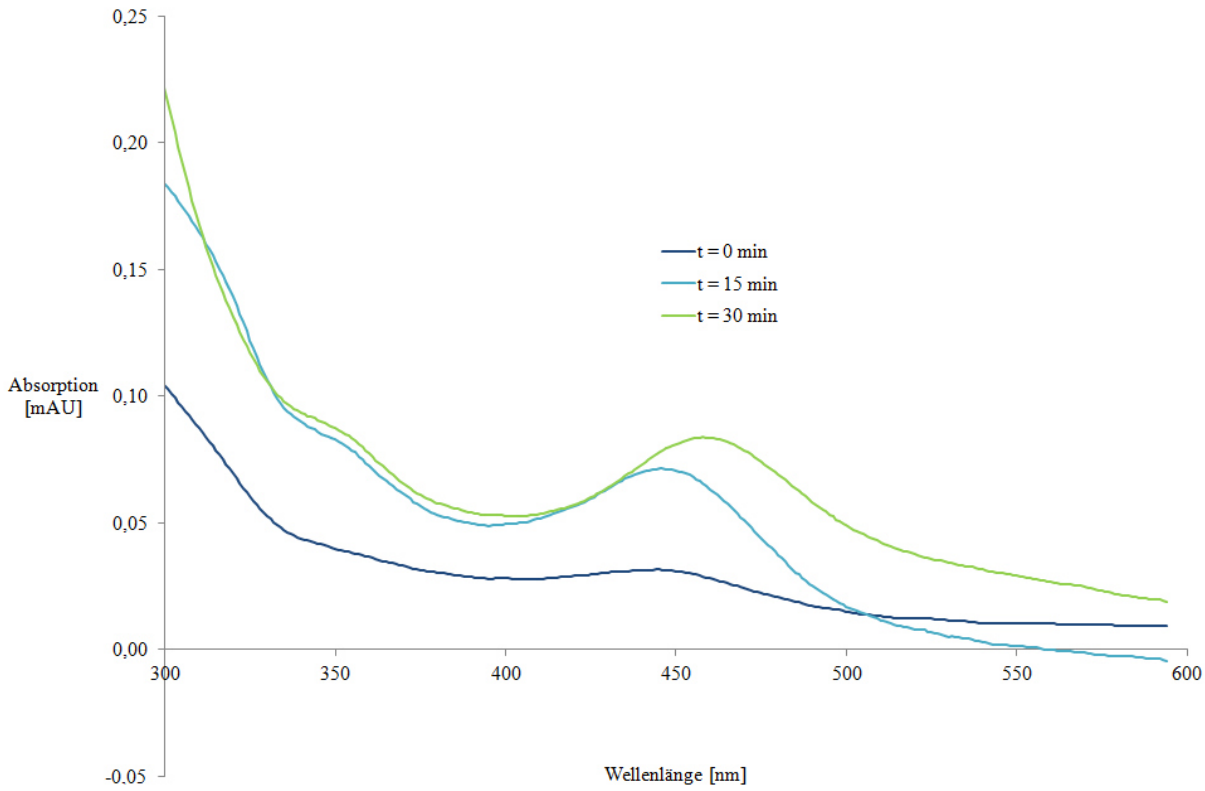
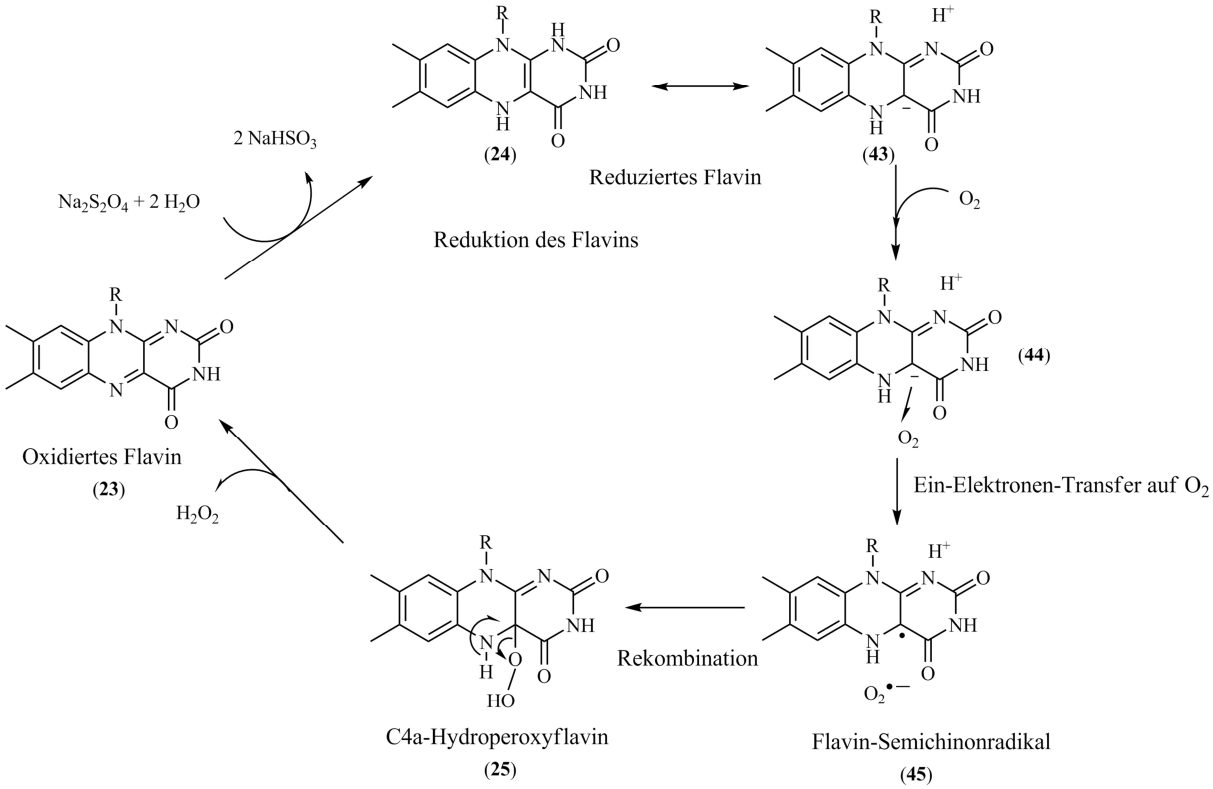


Abbildung 27: Absorptionsspektrum des Flavin-Cofaktors nach der Reduktion mit Natriumdithionit

Eine Reduktion des Flavin-Cofaktors 23 konnte durch Zugabe von Natriumdithionit erreicht werden. Die Reoxidation durch Luftsauerstoff wurde anhand der Zunahme der Absorptionsbande zwischen 450 nm und 500 nm verfolgt[147]. Vermutlich verlief die Redox-Reaktion wie in Schema 15 dargestellt: Im ersten Schritt überträgt das reduzierte Coenzym 43 ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül, dabei entstehen ein Superoxidradikal und das Flavin-Semichinonradikal 45. Nach der Rekombination zum C4a-Hydroperoxyflavin (25) wird unter Abspaltung von Wasserstoffperoxid der Flavin-Cofaktor reoxidiert[148].

Der Versuch wurde nur mit dem isolierten Flavin-Cofaktor durchgeführt, da die Zugabe von Natriumdithionit zur MonCI-Lösung zur Denaturierung des Proteins führte. Möglicherweise stand die Denaturierung in Zusammenhang mit der Entstehung von Wasserstoffperoxid bei der Reoxidation des Flavin-Cofaktors.



Schema 15: Mechanismus der Reduktion des Flavin-Cofaktors mit Natriumdithionit und Re-Oxidation durch molekularen Sauerstoff [148]

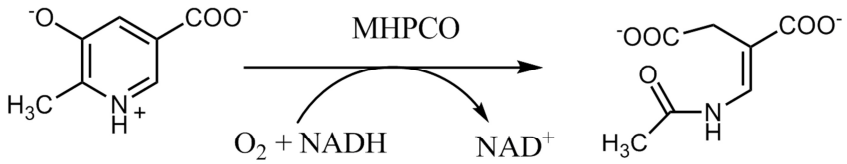
4.1.7 Homologiemodelle von MonCI

Da die Struktur von MonCI noch nicht aufgeklärt ist, wurden in dieser Arbeit Homologiemodelle der Epoxidase erstellt. Für zuverlässige Strukturmodellierungen ist normalerweise eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 30 % nötig [149]. Für die Erstellung eines dreidimensionalen MonCI-Modells konnten jedoch keine Templatstrukturen identifiziert werden, die dieses Kriterium erfüllen.

Homologiemodelle lassen sich jedoch auch mit Vorlagen erstellen, deren Sequenzübereinstimmung mit dem Zielprotein niedriger als 30 % ist, solange die Aminosäuren des aktiven Zentrums eine hohe Übereinstimmung aufweisen [150].

4.1.7.1 Homologiemodellierung mit der Vorlage 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure Oxygenase

Unter Verwendung des Homologiemodellierungs-Servers SWISS-MODEL wurde die Struktur der 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure-Oxygenase (MHPCO, PDB ID: 3all) als Modellierungsvorlage identifiziert[121,122,151]. Das FAD-abhängige Enzym ist am Abbau von Vitamin B_6 in *Pseudomonas sp*. MA-1 beteiligt[152]. Es katalysiert die Oxidation und simultane Ringöffnung von 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure (46) zu α-N-Acetylaminomethylen-Succinat (47) (siehe Schema 16).



2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure (**46**)

α-(N-Acetylaminomethylen)-Succinat (**47**)

Schema 16: Die MHPC-Oxygenase katalysiert die Oxidation und simultane Ringöffnung von 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure zu α-N-Acetylaminomethylen-Succinat

MHPCO besteht aus drei Domänen: Die aminoterminale Domäne besteht aus einem fünf-strängigen parallelen β-Faltblatt, einem dreisträngigen antiparallelen β-Faltblatt und sieben α-Helices, die in zwei Schichten angeordnet sind. Zwischen dieser Domäne und dem FAD-Cofaktor finden die meisten Wechselwirkungen statt. Der FAD-Cofaktor ist nicht kovalent ans Enzym gebunden, sondern wird durch starke Wechselwirkung im Enzym positioniert. Die zweite Domäne besteht aus einem sechssträngigen antiparallelen β-Faltblatt und drei kurzen α-Helices. Diese Domäne bildet einen Teil des aktiven Zentrums. Die dritte Domäne verbindet die ersten beiden Domänen und besteht aus einer langen α-Helix und einem doppelsträngigen antiparallelen β-Faltblatt[151]. Abbildung 28 zeigt eine Überlagerung der MHPCO-Struktur (blau) und der modellierten Struktur von MonCI (gelb). Letztere enthält ein zusätzliches β-Faltblatt, das sich von Ala384 bis Asp406 erstreckt und eine Schleife von

Pro44 bis Glu52, die wie eine Art „Schirm“ über dem Isoalloxazinring positioniert ist. Zusätzlich ist in Abbildung 28 die Qualität der Struktur-Modellierung graphisch dargestellt[121,122].

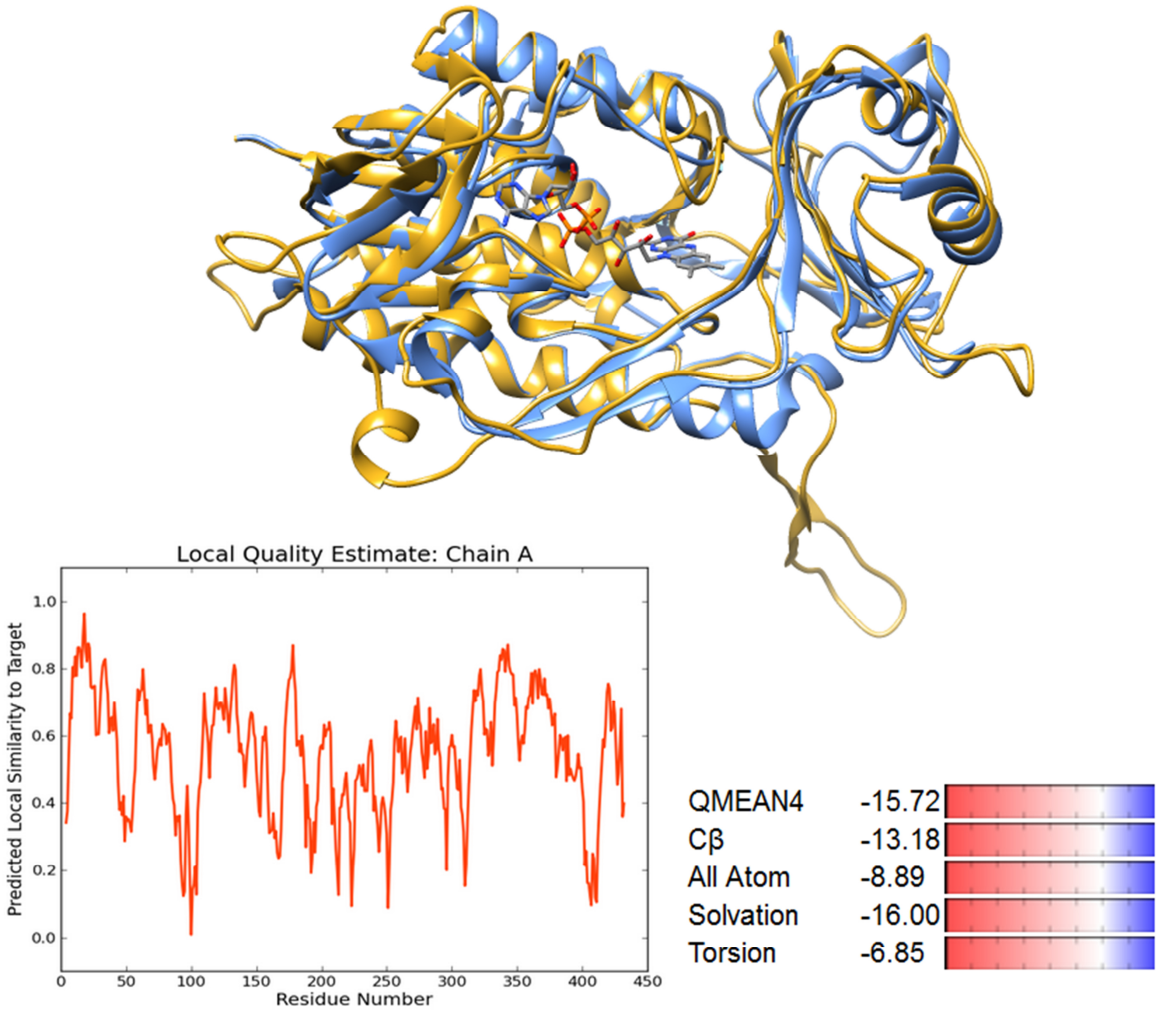


Abbildung 28: Die Struktur der 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure-Oxygenase (blau) wurde vom SWISS-MODEL-Server als Vorlage verwendet, um eine dreidimensionale Struktur der Monooxygenase MonCI (gelb) zu modellieren. Das Diagramm stellt die Qualität der Modellierung dar.

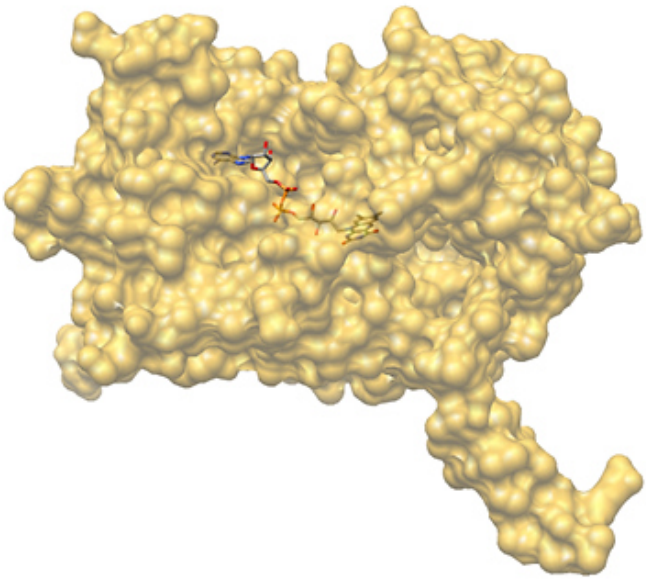


Abbildung 29: Modellierte Struktur von MonCI mit FAD-Cofaktor (Vorlage: MHPCO)

Abbildung 30 zeigt den Sequenzvergleich (*Sequence Alignment*) der Aminosäuren 5 bis 432 von MonCI mit der Aminosäuresequenz der MHPCO. Rot hinterlegt sind die Aminosäuren, die bei der MHPCO an der Bindung des FAD-Cofaktors beteiligt sind. Obwohl die Sequenzübereinstimmung mit 19 % gering ist, ist ein Großteil diese Aminosäuren konserviert. Deswegen kann angenommen werden, dass sie in der Epoxidase MonCI die gleiche Funktion erfüllen.

Der Flavin-Cofaktor der MHPCO ist in einer großen Tasche im Enzym positioniert. Diese Tasche besteht vorwiegend aus aromatischen und hydrophoben Aminosäuren. Die Adeninbase und die Ribose sind zum Teil im Inneren des Enzyms verborgen und von den hydrophilen Aminosäuren Glu41(MonCI - Glu36), Lys42 (MonCI - Arg37), Glu129 (MonCI - Glu139), Asp156 (MonCI - Thr179) und Lys161 (MonCI - Arg184) umgeben. N1 der Adeninbase bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amidstickstoff von Ala130 (MonCI – Ala140) und N6 und N7 bilden Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen zu Lys161 (MonCI - Arg184). Der Abstand zwischen der 2′-Hydroxylgruppe und Glu41 (MonCI – Glu36) ist mit 2.5 Å sehr gering. Hier besteht ebenfalls eine starke Wasserstoffbrückenbindung [151].

Während diese Homologiemodellierung detaillierte Informationen über die Aminosäuren lieferte, die potentiell an der Bindung des Flavin-Cofaktor beteiligt sind, ließen sich aus der Struktur keinerlei Hinweise auf den katalytischen Mechanismus des Enzyms ableiten. Aus diesem Grund wurde ein zweiter Modellierungsversuch mit einer anderen Vorlage durchgeführt (siehe 4.1.7.2).

```
3ALL            MANVNKTPGKTRRAEVAGGGFAGLTAAIALKQNGWDVRLHEKSSE---------LRAFGA 51
MonCI           -----MTTTRPAHAVVLGASMAGTLAAHVLARHVDAVTVVERDALPEEPQHRKGVPQARH 55
                     *. :. :* * *..:**  ** .* ::   * :  *:.:          :

3ALL            GIYLWHNGLRVLEGLG--ALDDVLQG---------SHTPPTYETWMHNKSVSKETFNG-- 98
MonCI           AHLLWSNGARLIEEMLPGTTDRLLAAGARRLGFPEDLVTLTGQGWQHRFPATQFALVASR 115
                .  ** ** *::* :   : * :* .         . .. * : * *. ..:: :: .

3ALL            --LPWRIMTRSHLHDALVNRARALGVDISVNSEAVAADPVGRLT--LQTG--EVLEADLI 152
MonCI           PLLDLTVRQQALGADNITVRQRTEAVELTGSGGGSGGRVTGVVVRDLDSGRQEQLEADLV 175
                  *   :  ::   * :. * *: .*::: .. . ..  .* :.  *::*  * *****:

3ALL            VGADGVGSKVRDSIGFKQDRWVSKDGLIRLIVPRMKKELGHGEWDNTIDMWNFWPRVQRI 212
MonCI           IDATGRGSRLKQWLAALGVPALEEDVVDAGVAYATRLFKAPPGATTHFPAVNIAADDRVR 235
                :.* * **:::: :.      :.:* :   :.  :   .     . :   *: .  :

3ALL            LYSPCNENELYLG--LMAPAADPRGSSVPIDLEVWVEMFP-----FLEPCLIEAAKLKTA 265
MonCI           EPGRFGVVYPIEGGRWLATLSCTRGAQLPTHEDEFIPFAENLNHPILADLLRDAEPLTPV 295
                  .  .      *   :*. : .**:.:* . : :: :       :*   * :*  *...

3ALL            RYDKAET------TKLDSWTRGKVALVGDAAHAMCPALAQGAGCAMVNAFSLSQDLEE-- 317
MonCI           FGSRSGANRRLYPERLEQWPDG-LLVIGDSLTAFNPIYGHGMSSAARCATTIDREFERSV 354
                  .:: :       :*:.*. * : ::**:  *: *  .:* .*   * ::.:::*.

3ALL            -----------------GSSVEDALVAWETR-IRPITDRCQALSG---DYAANRSLSKG 355
MonCI           QEGTGSARAGTRALQKAIGAAVDDPWILAATKDIDYVNCRVSATDPRLIGVDTEQRLRFA 414
                          *::*:*. :   *: *  :. * .* .    .  ::: *  .

3ALL            NMFTPAALEAARYDPLRR---VYSWPQ-------------------------------- 379
MonCI           EAITAASIRSPKASEIVTDVMSLNAPQAELGSNRFLMAMRADERLPELTAPPFLPEELAV 474
                : :*.*::.:.: . :       . **

3ALL            ----------------------
MonCI           VGLDAATISPTPTPTPTAAVRS 496
```

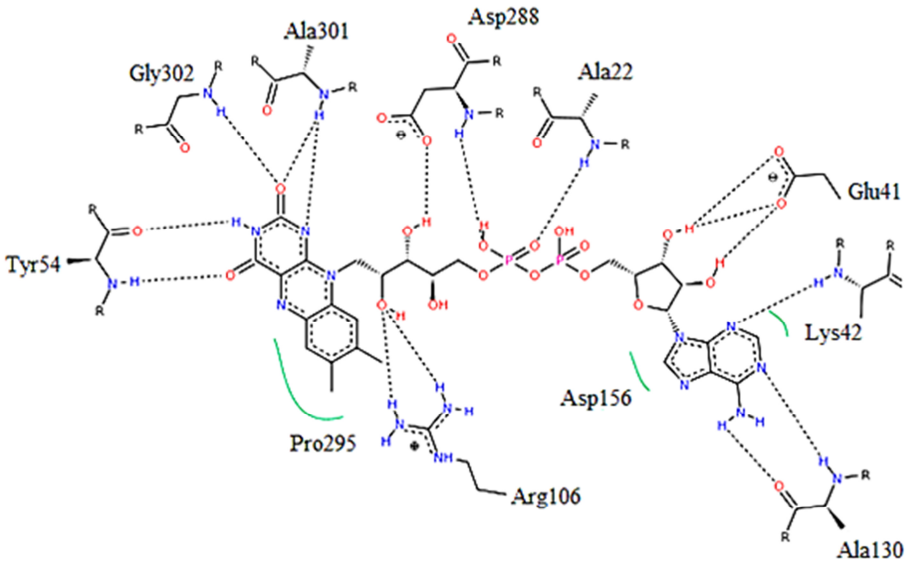
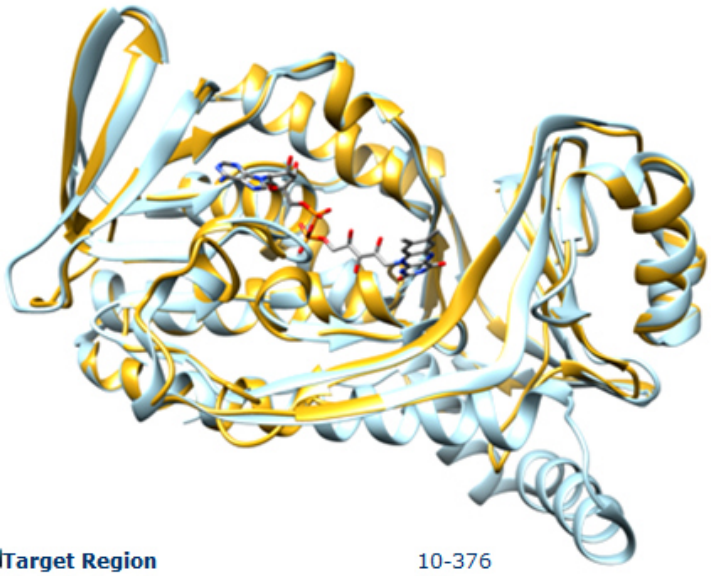


Abbildung 30: Oben: Sequenzvergleich (*Sequence Alignment*) von MonCI (obere Sequenz, Model 03) mit MHPCO (untere Sequenz, 3all), Unten: Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren der MHPCO und dem Flavin-Cofaktor

4.1.7.2 Homologiemodellierung mit der Vorlage *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH)

Die Homologiemodellierung wurde zusätzlich mit dem Server MODBASE[123] durchgeführt. Dieser identifizierte die *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH) als Vorlage für die molekulare Modellierung der Struktur von MonCI (für nähere Informationen zur PHBH siehe 1.4).



Target Region	10-376
Protein Length	496
Template PDB Code	1k0iA
Template Region	6-339
Sequence Identity	15.00%
E-Value	1e-05
GA341	0.87
Dataset	SP/TR-2004
ModPipe Version	ModPipe1.0
Model Date	2004-10-12

Abbildung 31 Die Struktur der *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH, blau) wurde vom MODBASE-Server als Vorlage verwendet, um eine dreidimensionale Struktur der Monooxygenase MonCI (gelb) zu modellieren.

Die Struktur der PHBH ist der Struktur der MHPCO sehr ähnlich. Die Domänenaufteilung der beiden Proteine ist identisch und auch hier ist FAD nicht-kovalent gebunden. Allerdings scheint die Struktur der PHBH flexibler zu sein als die der MHPCO. Zur Reduktion des Flavins und zur Bindung des Substrates *para*-Hydroxybenzoat klappen große βαβ-Domäne und die kleinere β-Faltblatt-Domäne auseinander. So kann der Flavin-Cofaktor in eine exponiertere Position heraus schwingen, um dann durch NADPH reduziert zu werden. In dieser offenen Konformation des Enzyms erfolgt auch die Bindung des Substrats[89].

Die Modellierung der MonCI-Struktur basiert auf der geschlossenen Konformation der PHBH. Bei der Betrachtung der modellierten MonCI-Oberfläche fällt auf, dass sich zwischen der βαβ-Domäne und der β-Faltblatt-Domäne ein Tunnel durch das gesamte Protein zieht. Der Isoalloxazinring des Flavin-Cofaktors reicht in diesen Tunnel hinein. Es wäre vorstellbar, dass das Substrat Premonensin diesen Tunnel durchwandert und alle drei Doppelbindungen sukzessive epoxidiert werden. Nach jeder

Epoxidierung muss der Cofaktor erneut reduziert werden. Eine Öffnung des Enzyms könnte zur simultanen Reduktion und zur Bewegung des Substrates im aktiven Zentrum führen.

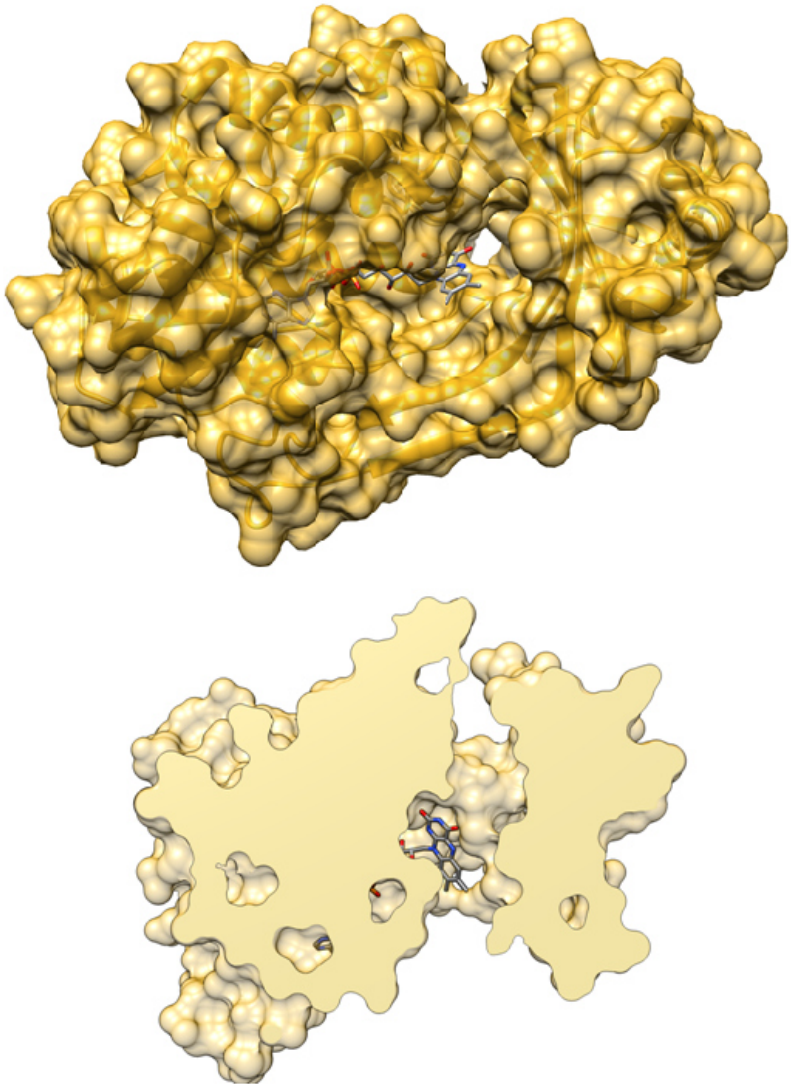


Abbildung 32: Strukturmodell von MonCI, basierend auf der Struktur der PHBH. Oben: vollständiges MonCI-Modell, Unten: der Schnitt durch das Modell verdeutlicht den Tunnel, der sich durch das modellierte Protein zieht.

4.2 Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII

MonBI und MonBII wurden in *E. coli*-Bakterien überexprimiert und per Metallionen-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie gereinigt. Anschließend erfolgte die biophysikalische und funktionelle Charakterisierung der Enzyme sowie ihre Kristallisation und Aufklärung der Röntgenkristallstruktur.

4.2.1 Klonierung und heterologe Expression

Zur heterologen Expression der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII in *E. coli* wurden die Plasmide monBI_pET20b(+) und monBII_pET20b(+) verwendet. Das MonBI-Konstrukt war in diesem Fall 17.0 kDa schwer und das MonBII-Konstrukt wies ein Gewicht von 16.5 kDa auf. Beide Proteine wurden mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag* exprimiert (siehe Abbildung 33).

Abbildung 33: MonBI- und MonBII-Konstrukte mit carboxyterminalem 6-His-Tag, exprimiert mit monBI_pET20b(+) und mit monBII_pET20b(+)

Der 6xHis-*Tag* kann in einem Proteinkonstrukt eine intrinsisch ungeordnete Region darstellen. Da ungefaltete Bereiche die Proteinkristallisation beeinträchtigen, wurden in dieser Arbeit Konstrukte kloniert, die eine Abspaltung des 6xHis-*Tags* nach der Metallionen-Affinitätschromatographie ermöglichen. Dafür wurden die Gene *monBI* und *monBII* in den Vektor pETM11 ligiert. Dieser codiert für eine TEV-Protease-Schnittstelle zwischen dem 6xHis-*Tag* und der eigentlichen Zielsequenz.

Zur Klonierung des Plasmids monBI_pETM11 wurde das Gen *monBI* mit den Oligonukleotiden monBI_NcoI_fwd und monBI_Stop_BamHI_rev durch PCR amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde als NcoI-/BamHI-Fragment in den Vektor ligiert.

Bioinformatische Modellierungen zeigten, dass der Carboxyterminus von MonBII ungefaltet sein könnte und deswegen die Kristallisation stören könnte. Aus diesem Grund wurde ein MonBII-Fragment bis Thr122 hergestellt. Die PCR des verkürzten Fragments erfolgte mit den Oligonukleotiden monBII_BspHI_fwd und monBII_ohneCTerm_Stop_BamHI_rev. Das *monBII*-Fragment wurde als BspHI -/BamHI-Fragment in den Vektor ligiert.

Zudem wurde das Plasmid monBI_monBII_pETM11 kloniert. Dieses codiert für ein Fusionskonstrukt aus aminoterminalem MonBII und carboxyterminalem MonBI.

Für diese Klonierung waren zwei aufeinanderfolgende PCRs nötig (siehe Abbildung 34): Die erste PCR diente der separaten Amplifikation der *monBI*- und *monBII*-Gene. Die Primer sorgten für die Inkorporation komplementärer Überhänge für die folgende PCR, bei der die Fragmente

zusammengefügt wurden. Das ligierte Fragment diente dann als Vorlage für die zweite PCR, dessen Produkt als BspHI- /BamHI-Fragment in den Vektor ligiert wurde.

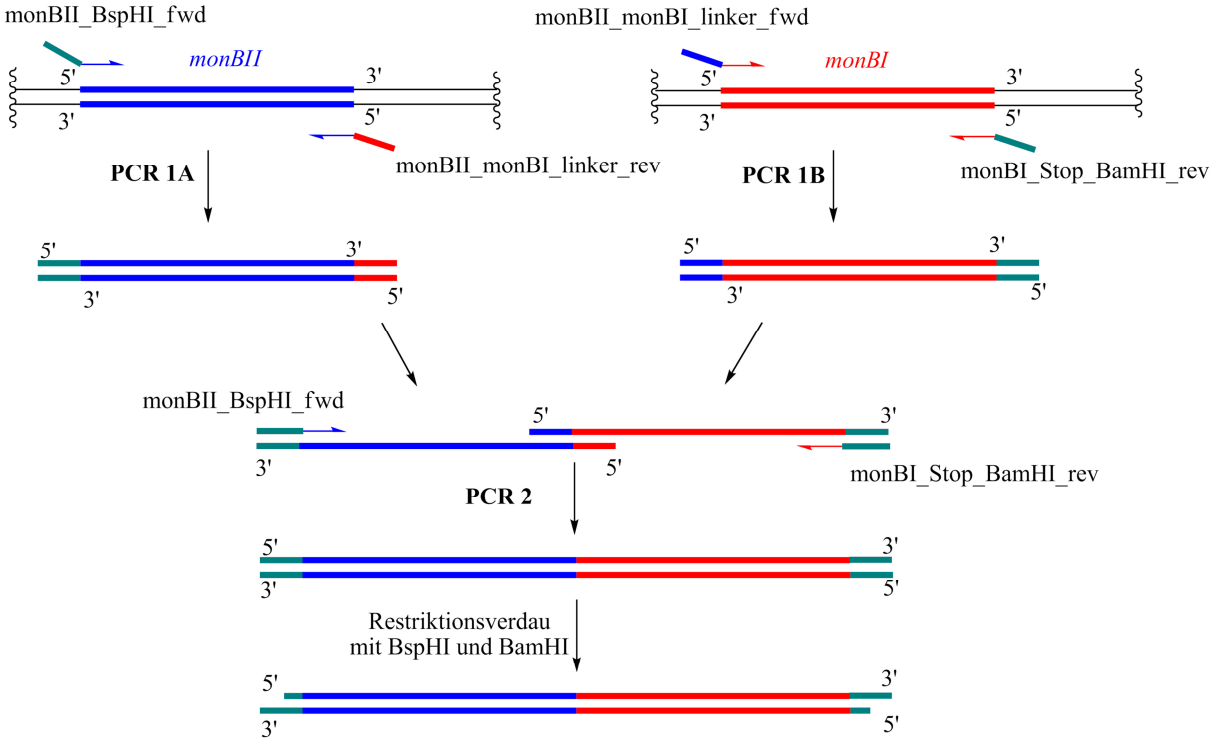


Abbildung 34: Klonierung des *monBI-monBII*-Fusionskonstrukts

Abbildung 35 zeigt die drei resultierenden Proteinkonstrukte, die mit den neu klonierten Plasmiden exprimiert werden konnten.

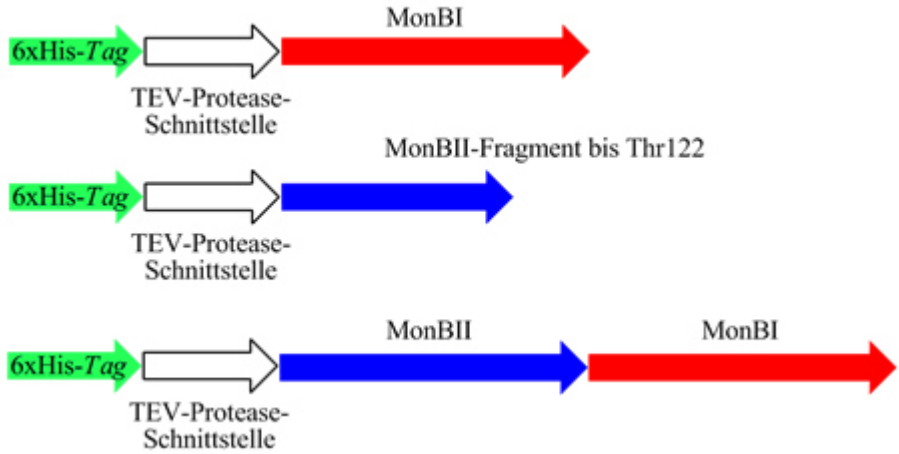


Abbildung 35: Protein-Konstrukte zur heterologen Expression der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII

Die Epoxid-Hydrolase MonBI ließ sich sowohl mit dem Plasmid monBI_pET20b(+) als auch mit monBI_pETM11 problemlos exprimieren.

Die Expression von MonBII war dagegen deutlich problematischer: Zwar wurde das Protein in *E. coli*-Bakterien löslich exprimiert, aber die Ausbeuten waren sehr gering. Vermutlich ist die Epoxid-Hydrolase toxisch für die *E. coli*-Zellen. Eine solche Toxizität steht meist in Zusammenhang mit schädlicher enzymatischer Aktivität oder mit mangelnder Faltung des heterolog exprimierten Proteins.

Während der Anzuchtphase der *E. coli*-Bakterien musste die basale Expression von MonBII unterdrückt werden. Geschah dies nicht, so war das Zellwachstum deutlich gehemmt.

Um die Epoxid Hydrolase MonBII mit dem Plasmid monBII_pET20b(+) produzieren zu können, wurde das Expressionsmedium mit 1 % (w/v) Glucose versetzt. Die Proteinexpression des Zielgens ist im pET20b(+)-Vektor über den Bacteriophagen T7-Promotor kontrolliert. Für die Initiation der Transkription ist cAMP nötig. Solange die *E. coli* Bakterien Glucose als Kohlenstoffquelle nutzen, ist die cAMP-Konzentration in der Zelle niedrig. Erst wenn andere Komponenten des Mediums (wie z. B. Glycerin) abgebaut werden, steigt die cAMP-Konzentration. Der resultierende Komplex aus cAMP und cAMP-Receptor-Protein CAP bindet an den lacUV5-Promotor und stimuliert so die Transkription der T7-RNA-Polymerase, die dann wiederum das Zielgen *monBII* transkribieren kann[153].

4.2.2 Reinigung der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII

4.2.2.1 MonBI

Das 17 kDa schwere MonBI, exprimiert mit dem Plasmid monBI_pET20b(+), ließ sich mithilfe von Metallionen-Austauschchromatographie, gefolgt von Größenausschlusschromatographie zur Homogenität reinigen (siehe Abbildung 36). Pro Liter Kulturvolumen wurden 10 ml einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml erhalten. Dieses MonBI-Konstrukt wurde für biophysikalische Studien und Kristallisationsversuche verwendet.

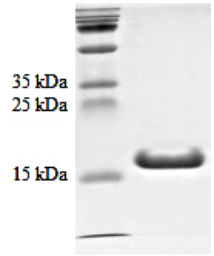


Abbildung 36: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von MonBI mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag*, exprimiert mit monBI_pET20b(+)

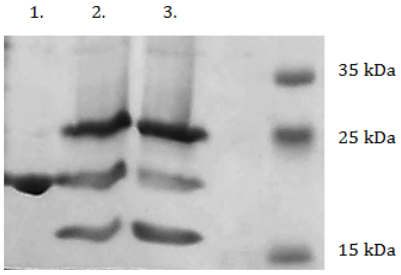


Abbildung 37: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von MonBI mit TEV-Protease-Schnittstelle und aminoterminalem 6xHis-*Tag*, exprimiert mit monBI_pETM11 (1.) Vor dem Verdau mit der TEV-Protease, (2.) nach 3 h Verdau, (3) nach 16 h Verdau (oberste Bande: TEV-Protease, mittlere Bande: MonBI mit 6xHis-*Tag*, untere Bande: MonBI ohne 6xHis-*Tag*)

MonBI aus monBI_pETM11 wurde ebenfalls zunächst per Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt. Im nächsten Schritt erfolgte der Verdau mit TEV-Protease zur Abspaltung des 6xHis-*Tags*. Vor der Spaltung ist das Protein 18.6 kDa schwer, anschließend besitzt sie noch ein Gewicht von 15.9 kDa. Abbildung 37 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel der Inkubation von MonBI mit der 27 kDa großen katalytischen Domäne der TEV-Protease. Hier wird deutlich, dass die Abspaltung des His-*Tags* nicht quantitativ verlief. Auch höhere Konzentrationen an TEV-Protease im Ansatz und die Inkubation bei höheren Temperaturen verbesserten die Ausbeute nicht.

4.2.2.2 MonBII

Die Reinigung der 16.5 kDa schweren Epoxid-Hydrolase MonBII, exprimiert mit dem Plasmid monBII_pET20b(+), mithilfe von Metallionen-Austauschchromatographie, gefolgt von Größenausschlusschromatographie war erfolgreich. Das Protein konnte zur Homogenität gereinigt werden (siehe Abbildung 38). Aus einem Liter Kulturvolumen wurden 5 ml Proteinlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml erhalten. Dieses MonBII-Konstrukt wurde für biophysikalische Studien und Kristallisationsversuche verwendet.

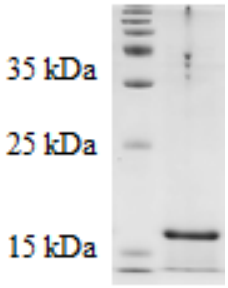


Abbildung 38: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von MonBII mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag*, exprimiert mit monBII_pET20b(+)

Die Expression von MonBII mit dem Plasmid monBII_pETM11 lieferte sehr niedrige Proteinausbeuten. Zudem war es nicht möglich, das Protein zur Homogenität zu reinigen. Aus diesem Grund wurde dieses Projekt nicht weiterverfolgt. Stattdessen lag der Fokus auf den Arbeiten mit dem MonBI-MonBII-Fusionsprotein, zumal dessen Reinigung exzellente Ergebnisse lieferte.

4.2.2.3 MonBI-MonBII-Fusionsprotein

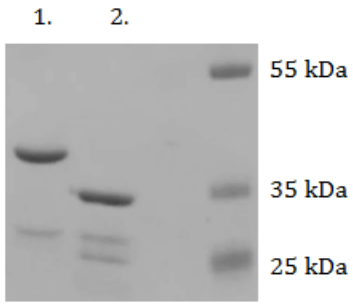


Abbildung 39: Coomassie -gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung von MonBI mit TEV-Protease-Schnittstelle und aminoterminalem 6xHis-*Tag*, (1.) unverdautes Fusionsprotein (obere Bande: Fusionsprotein mit 6xHis-*Tag*, untere Bande: Verunreinigung), (2.) Fusionsprotein nach 16 h Verdau mit TEV-Protease (obere Bande: Fusionsprotein ohne 6xHis-*Tag*, mittlere Bande: Verunreinigung, untere Bande: TEV-Protease)

Die Expression des MonBI-MonBII-Fusionsproteins lieferte hervorragende Proteinausbeuten. Das denaturierende Polyacrylamidgel in Abbildung 39 zeigt, dass die Abspaltung des 6xHis-*Tags* quantitativ verlief. Vor der Spaltung ist das Fusionsprotein 34.3 kDa schwer, danach 31.6 kDa.

Es war ein ähnlicher Effekt zu beobachten wie bei denaturierenden Polyacrylamidgelen der Epoxidase MonCI: Das Fusionsprotein wies das Migrationsverhalten eines größeren Proteins auf. Da dieser Effekt reproduzierbar war und da massenspektrometrisch bestätigt werden konnte, dass die Gel-Bande das Zielprotein enthielt, wurde dieses Phänomen nicht näher untersucht.

Nach der Abspaltung des 6xHis-*Tags* wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

Das Fusionsprotein wies ein Retentionsvolumen von 15.6 ml auf (siehe Abbildung 40). Die Schulter vor diesem Hauptpeak deutete auf Aggregation des Fusionsproteins hin.

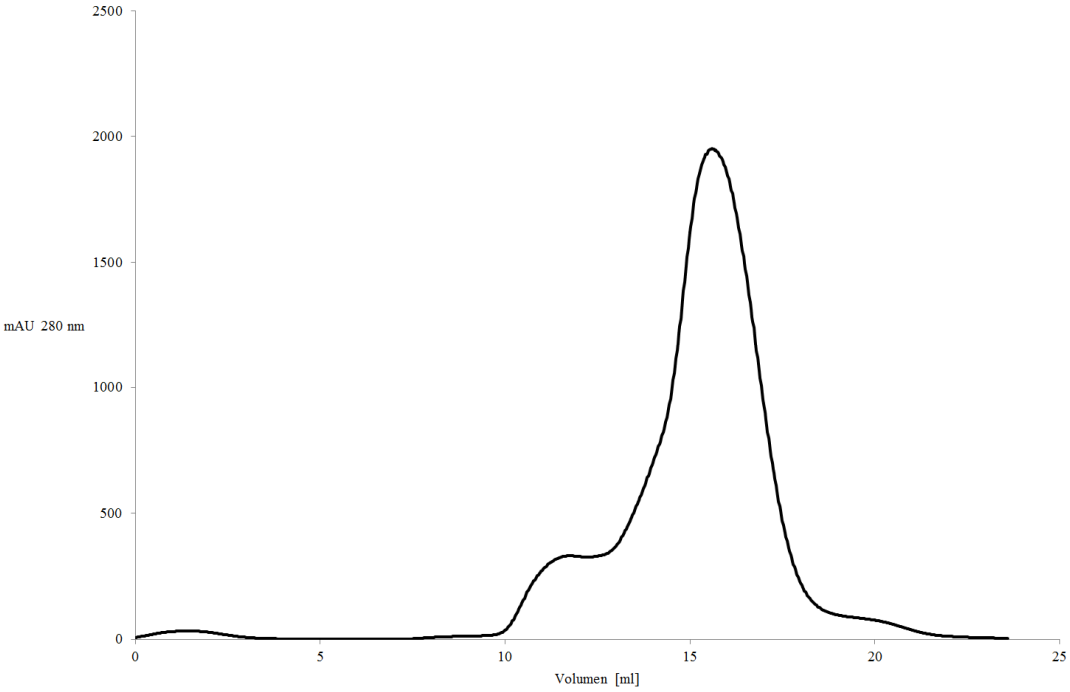


Abbildung 40: Größenausschlusschromatogramm des MonBI-MonBII-Fusionsproteins

4.2.2.4 TEV-Protease

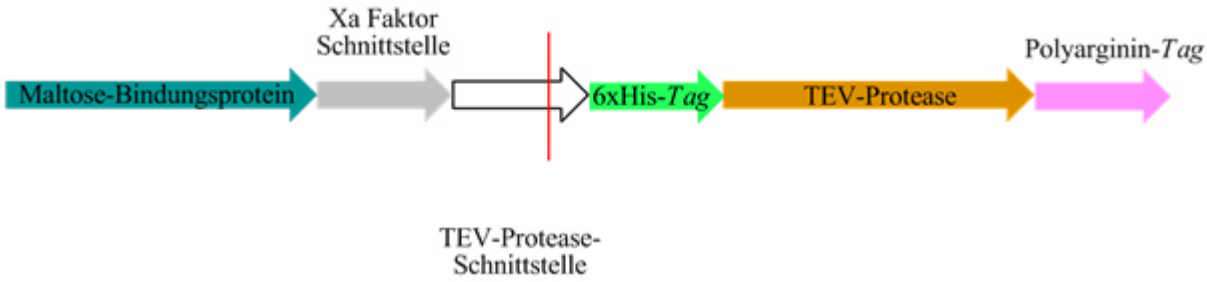


Abbildung 41: TEV-Protease-Konstrukt, exprimiert mit pRK792

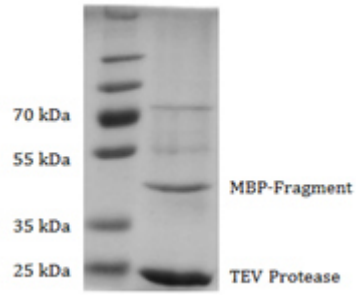


Abbildung 42: Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigung der TEV-Protease

Das Plasmid pRK792 codierte für ein Fusionsprotein der 27 kDa schweren katalytischen Domäne der TEV-Protease (Aminosäure 189 - 424) mit einem aminoterminalen Maltose-Bindungsprotein. Da das Konstrukt außerdem selbst eine TEV-Protease-Schnittstelle enthielt, spaltete die Protease das MBP nach der Expression ab. Mithilfe des 6xHis-*Tags* konnte die TEV-Protease per Metallionen-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zudem ließ sie sich auf diese Weise nach der Spaltung des Zielproteins wieder aus der Reaktionslösung entfernen. Bei der hier verwendeten TEV-Protease-Variante fand aufgrund der S219P-Mutation keine Autoinaktivierung statt[109].

4.2.2.5 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographien (auch als Gelfiltrationen bezeichnet) von MonBI und MonBII wurden in erster Linie durchgeführt, um aggregiertes Protein abzutrennen. Die Chromatogramme lieferten zudem Hinweise auf eine mögliche Heterodimer-Bildung von MonBI und MonBII.

Je größer das hydrodynamische Volumen eines Proteins ist, desto schneller passiert es die Gelfiltrationssäule. Kleine Proteine diffundieren stattdessen in die Poren des Gels und weisen deswegen höhere Retentionszeiten auf.

Abbildung 43 zeigt die Größenausschlusschromatogramme von MonBI, MonBII und einer 1:1-Mischung von MonBI und MonBII. Obwohl die Proteine in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden, unterschieden sich die Absorptionsintensitäten enorm. Dies ist auf die Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine zurückzuführen. MonBI enthält einen Phenylalanin-, zwei Tryptophan- und fünf Tyrosinreste, MonBII weist zwar fünf Phenylalaninreste auf, enthält dafür aber nur je einen Tryptophan- und einen Tyrosinrest. Der Extinktionskoeffizient von MonBI ist dementsprechend mit 18450 M^{-1} cm^{-1} mehr als doppelt so hoch wie der von MonBII, der nur bei 6990 M^{-1} cm^{-1} liegt.

MonBI (rote Kurve) wurde als einzelne Spezies mit einem Retentionsvolumen von 15.3 ml eluiert. Das Chromatogramm von MonBII (blaue Kurve) deutete auf eine deutlich stärkere Tendenz zu Aggregation hin. Die Aggregate besaßen ein Retentionsvolumen von 14.53 ml, während das nicht aggregierte Protein bei 15.51 ml eluiert wurde.

Überraschenderweise ließen sich im Chromatogramm der MonBI-MonBII-Mischung (grüne Kurve) keinerlei Hinweise auf Aggregation finden. Stattdessen war nur ein Peak mit einem Retentionsvolumen von 15.13 ml zu beobachten.

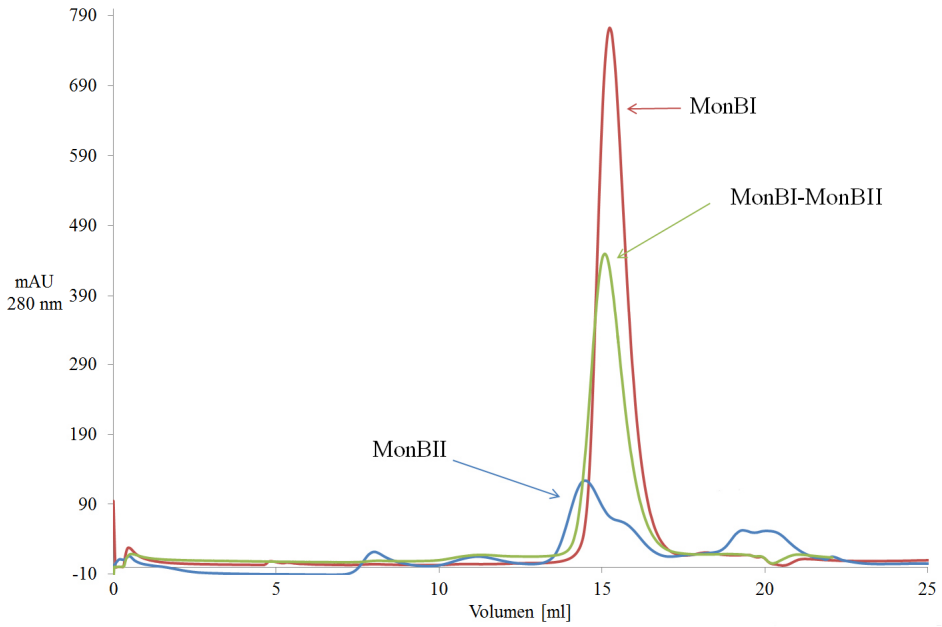


Abbildung 43: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von MonBI, MonBII und dem MonBI: MonBII Komplex

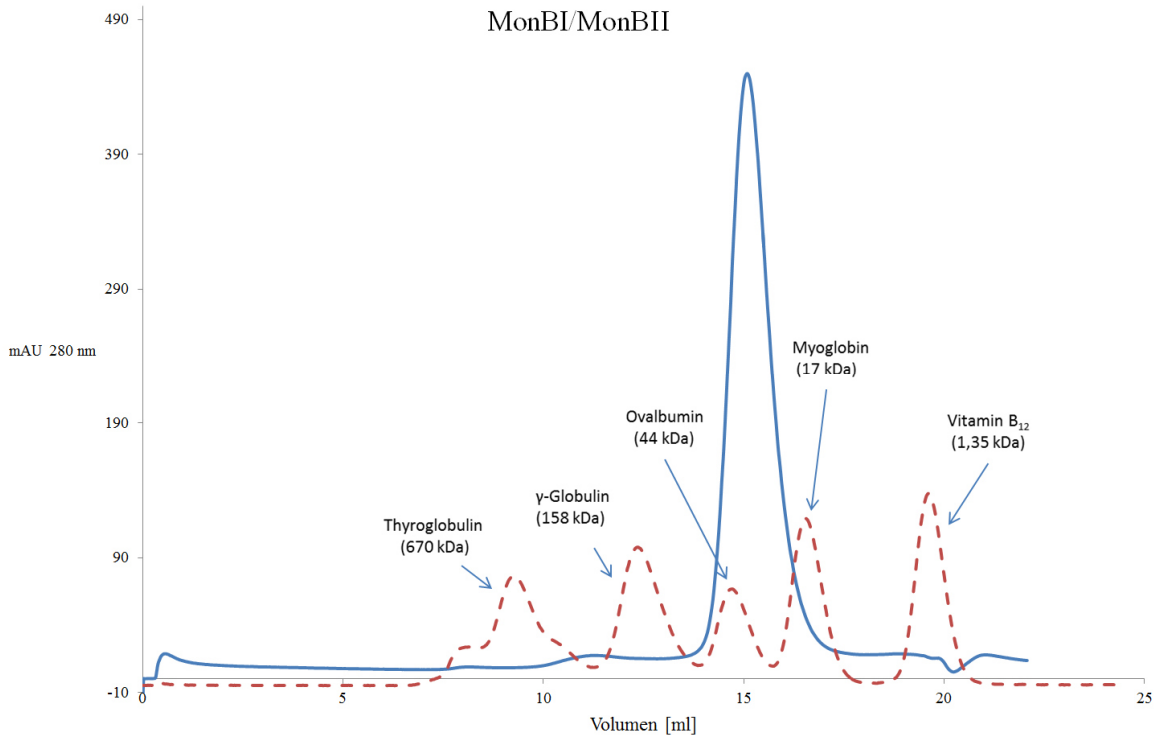


Abbildung 44: Größenausschlusschromatogramm der MonBI-MonBII-1:1-Mischung im Vergleich mit dem Größenstandard

In Abbildung 44 ist das Chromatogramm der MonBI-MonBII-Mischung im Vergleich mit dem Größenstandard dargestellt. Aufgrund ihrer Molmassen von 17.0 bzw. 16.5 kDa wäre zu erwarten, dass die beiden Epoxid-Hydrolasen ein ähnliches Retentionsvolumen aufweisen wie Myoglobin. Der Vergleich des beobachteten Retentionsvolumens von 15 bis 16 ml mit dem Größenstandard deutet stattdessen darauf hin, dass sie als Dimere eluiert werden.

Da das Größenausschlusschromatogramm der MonBI-MonBII-Mischung zudem keinerlei Hinweise auf aggregiertes MonBII zeigte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass MonBII durch Bildung eines Heterodimers mit MonBI stabilisiert wird.

Da sich die Heterodimer- und die beiden Homodimerspezies in ihrer Molmasse kaum unterscheiden (MonBI-Homodimer: 34.0 kDa, MonBII-Homodimer: 33.0 kDa und MonBI-MonBII-Heterodimer: 33.5 kDa), wäre es auch möglich, dass sich unter dem Peak zwei oder sogar drei verschiedene Spezies verbergen. So waren weitere Untersuchungen wie native PAGE und analytische Ultrazentrifugation nötig, um diese Hypothese zu belegen.

4.2.2.6 Native PAGE

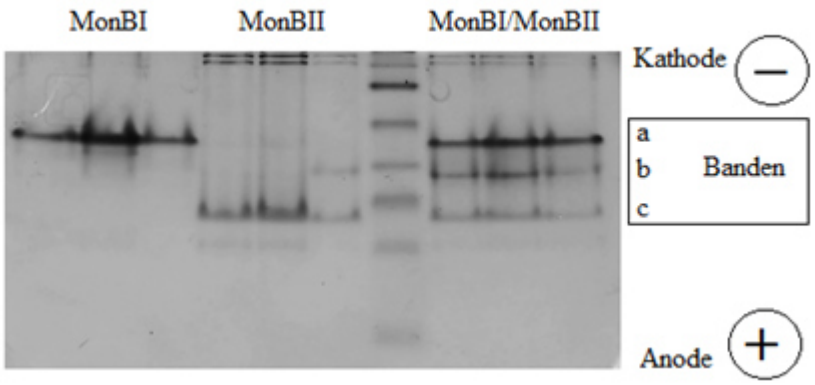


Abbildung 45: Coomassie-gefärbtes natives Polyacrylamidgel von MonBI, MonBII und einer MonBI/MonBII Mischung (1:1) nach der Größenausschlusschromatographie

Abbildung 45 zeigt das native Polyacrylamidgel von MonBI, MonBII sowie der MonBI-MonBII-Mischung nach der Größenausschlusschromatographie. Anders als bei der denaturierenden PAGE, bei der die Proteine durch Erhitzen der Probe und durch die Zugabe von DTT und SDS denaturiert werden, liegen sie bei diesem Experiment nativ vor und wandern aufgrund ihrer Form und Ladung durch das Gel. Somit liefert diese Methode Informationen über die Quartärstruktur eines Proteins.

Beide Epoxid-Hydrolasen sind negativ geladen und bewegten sich deswegen im Gel zur Anode. Ein MonBI-Molekül enthält 20 negativ geladene Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) und 15 positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin). Somit ergibt sich pro Monomer ein Überschuss von fünf negativen Ladungen. MonBII enthält 27 negativ geladene Aminosäuren und 14 positiv geladene Aminosäuren. Aufgrund des Überschusses von 13 negativen Ladungen pro Monomer bei einer sehr ähnlichen Molmasse migriert MonBII weiter durch das Polyacrylamidgel als MonBI.

Wurden die beiden Epoxid-Hydrolasen einzeln auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, so war nur eine Proteinbande sichtbar. Die MonBI-Probe wies nur Bande a auf. Hierbei handelte es sich um das MonBI-Dimer (10 negative Ladungen). Die MonBII-Probe enthielt neben einiger Aggregation vorwiegend die Spezies c (26 negative Ladungen). Die gelfiltrierte Mischung der beiden Proteine enthielt drei Hauptspezies. Die Bande b befindet sich genau in der Mitte zwischen a und c. Dies spricht dafür, dass hier das MonBI-MonBII Dimer mit 18 negativen Ladungen entstand.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Während in Bande a nur MonBI und in Bande c nur MonBII detektiert werden konnte, wurden in Bande b beide Proteine identifiziert.

Es ist anzunehmen, dass sich die unterschiedlichen Spezies miteinander im Gleichgewicht befanden. Es kann jedoch von einer starken Wechselwirkung ausgegangen werden, da die Untereinheiten des Heterodimers ansonsten im Polyacrylamidgel separiert worden wären und keine Heterodimer-Bande sichtbar gewesen wäre.

4.2.3 Biophysikalische Enzymcharakterisierung

Die heterologe Expression und Aufreinigung eines Proteins ermöglicht seine *in-vitro* Charakterisierung. Bevor weitere Experimente wie Aktivitätsassays oder Kristallisationsversuche durchgeführt werden können, ist es allerdings empfehlenswert, eine gründliche biophysikalische Charakterisierung des gereinigten Proteins durchzuführen. So können Mängel in der Proteinpräparation wie Aggregation oder mangelnde Faltung des Proteins frühzeitig erkannt werden, die ansonsten bei weiterführenden Untersuchungen Probleme bereiten würden.
Im Folgenden sind die Ergebnisse der biophysikalischen Charakterisierung der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII aufgeführt. Da die Größenausschlusschromatographie der 1:1-Proteinmischung sowie die native PAGE der gereinigten Proteine Hinweise auf eine mögliche Heterodimerbildung lieferten, sollten bei der weiterführenden Charakterisierung Belege für die Existenz des MonBI-MonBII-Heterodimers gefunden werden.

4.2.3.1 Circulardichroismus-Messungen

Zur Untersuchung der Sekundärstruktur von MonBI und MonBII wurden Circulardichroismus (CD)-Messungen durchgeführt.
Links und rechts polarisiertes Licht wird von chiralen Molekülen wie Proteinen unterschiedlich stark absorbiert. Aufgrund der Anordnung der Peptidbindungen in Sekundärstrukturelementen wie α-Helices und β-Faltblätter weisen diese charakteristische CD-Spektren auf (siehe Abbildung 46)[154,155]
Die Elliptizität von α-helicalen Proteinen ist bei 222 nm und bei 208 nm negativ und bei 193 nm stark positiv[156]. Proteine mit antiparallelen β-Faltblätter weisen negative CD-Signale bei 218 nm und positive Signale bei 195 nm auf[157]. Ungefaltete Proteine (3) besitzen dagegen eine sehr geringe Elliptizität bei Wellenlängen über 210 nm und zeigen ein negatives Signal bei 195 nm[158].

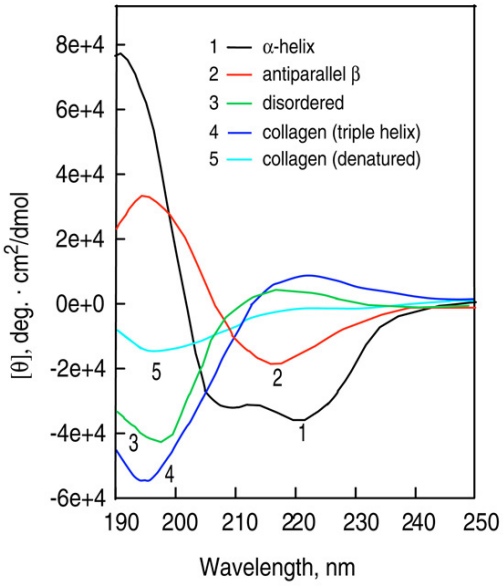


Abbildung 46: Circulardichroismus-Spektren von Sekundärstrukturelementen [154]

Es wurden CD-Spektren von MonBI, von MonBII und von der gelfiltrierten MonBI-MonBII-Mischung aufgenommen (siehe Abbildung 47). Die Proteinkonzentration aller drei Proben lag bei 0.15 mg/ml. Das CD-Spektrum der Epoxid-Hydrolase MonBI (rot) belegt, dass das Protein in gefalteter Form vorlag. Ein Maximum der Elliptizität bei 195 nm deutet auf β-Faltblätter in der Struktur hin, während die Minima bei 222 nm und bei 208 nm auf α-helicale Elemente zurückzuführen sind.

Dagegen deutet das CD-Spektrum von MonBII (blau) auf ungeordnete Regionen im Protein hin. Besonders die geringe Elliptizität bei Wellenlängen über 210 nm ist ein starker Hinweis auf ungeordnete Bereiche. Bei 193 bis 195 nm ist das Signal dagegen positiv, sodass zumindest von einer partiellen Faltung des Proteins ausgegangen werden kann.

Die Messung erfolgte in 20 mM K_2HPO_4, 50 mM NaCl, pH 7.6. Andere Additive wie DTT und EDTA konnten nicht verwendet werden, da sie aufgrund einer starken CD-Aktivität die Untersuchung des Proteins gestört hätten. So kann aus diesem Spektrum lediglich die Information gewonnen werden, dass MonBII im CD-Puffer nur partiell gefaltet vorlag. Die Untersuchung liefert keine Information darüber, wie die Faltung durch andere Additive beeinflusst wurde.

Das CD-Spektrum der gelfiltrierten MonBI-MonBII-Mischung enthält dagegen keine Hinweise auf ungefaltete Elemente in der Probe. Neben einem Maximum bei 195 nm sind zwei stark ausgeprägte Minima des CD-Signals bei 208 nm und 222 nm vorhanden. Das Spektrum weist eine starke Ähnlichkeit mit dem Spektrum von MonBI auf. Nach der Messung wurde mittels nativer PAGE verifiziert, dass die Probe nicht nur MonBI, sondern beide Proteine enthielt.

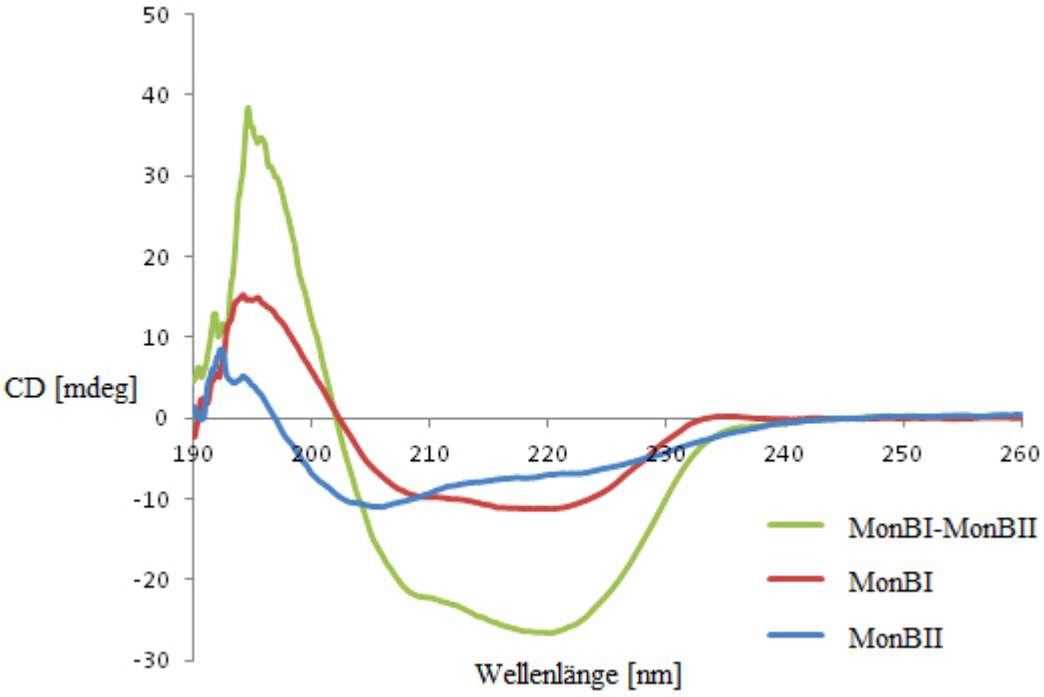


Abbildung 47: Circulardichroismus-Spektren von MonBI, MonBII und dem MonBI-MonBII-Komplex

Zur Untersuchung der Stabilität der MonBI-Sekundärstrukturen wurden außerdem Schmelzkurven aufgenommen (siehe Abbildung 48). Je mehr Energie nötig ist, um das Protein zu denaturieren, desto stabiler ist die Faltung. Die Messungen erfolgten bei 209 nm und 220 nm mit einer Proteinkonzentration von 0.425 mg/ml. Diese beiden Messpunkte wurden gewählt, da bei diesen Wellenlängen ein starkes Circulardichroismus-Signal gemessen werden konnte. Ab 55 °C stieg die Absorption bei beiden Wellenlängen, da sich das Protein entfaltete und somit eine größere Absorptionsoberfläche bot. Während das CD-Signal bei 220 nm weitestgehend konstant blieb, sorgte die Denaturierung für einen deutlichen Sprung des CD-Signals bei 209 nm von -19 mdeg auf -29 mdeg. Ungeordnete Proteine weisen bei dieser Wellenlänge ein stark negatives CD-Signal auf (siehe Abbildung 46).

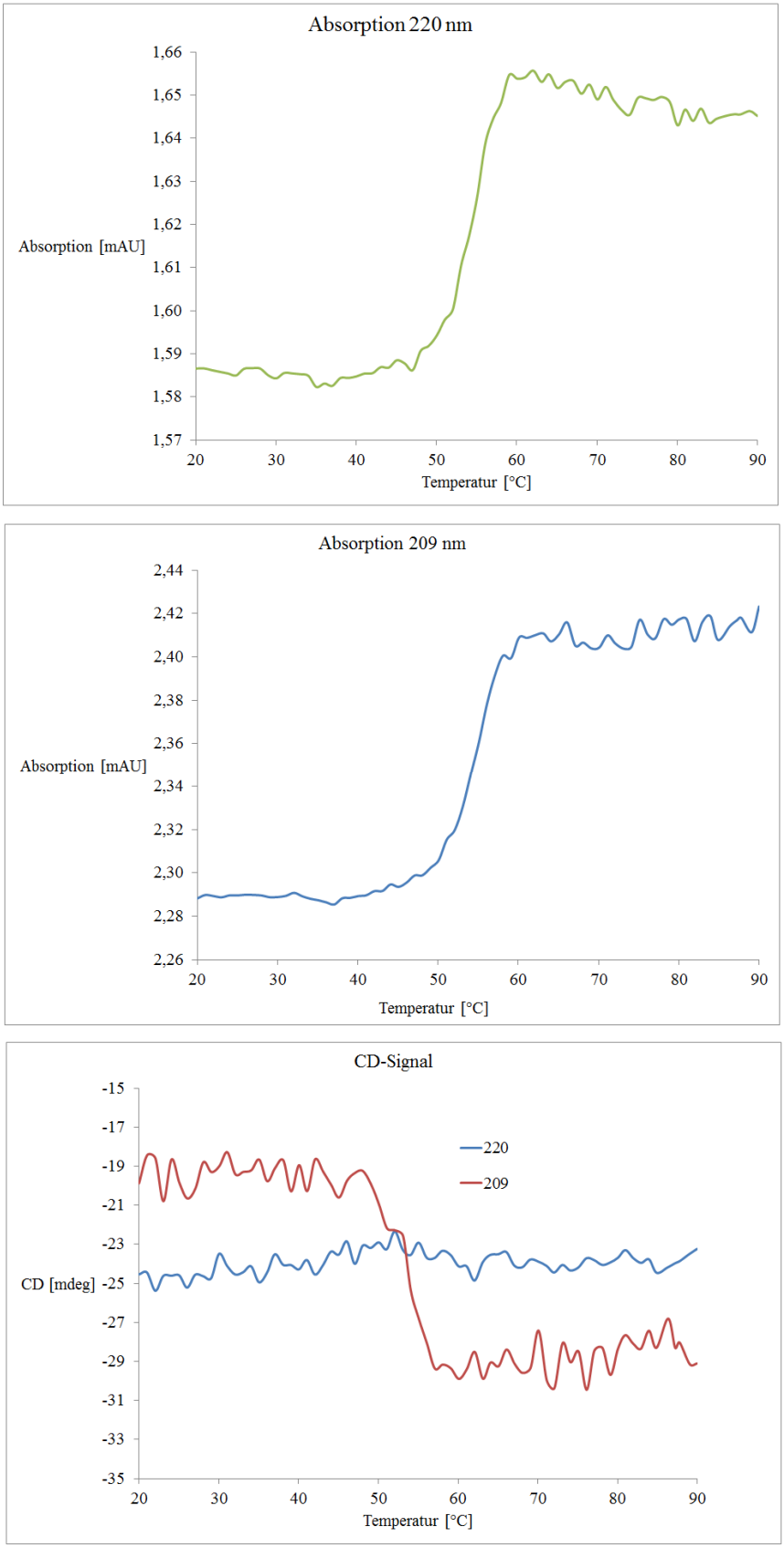


Abbildung 48: Schmelzkurven zur Überprüfung der Stabilität der MonBI-Sekundärstrukturen; Oben: Absorption bei 220 nm während der Temperaturerhöhung; Mitte: Absorption bei 209 nm während der Temperaturerhöhung; Unten: Circulardichroismus-Signal bei 220 nm und 209 nm während der Temperaturerhöhung. Je mehr Energie nötig ist, um das Protein zu denaturieren, desto stabiler ist die Faltung.

4.2.3.2 Thermofluor-Assay

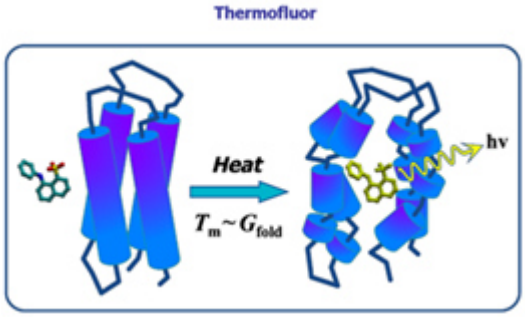


Abbildung 49: Prinzip des Thermofluor-Assays[159]

Die Faltung der Epoxid-Hydrolasen wurde zusätzlich mithilfe des Thermofluor-Assays untersucht. Dafür wurden die Proben mit SYPRO® Orange versetzt. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs wird in wässriger Umgebung gequencht. Sobald das Protein thermisch denaturiert wird, lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an hydrophobe Bereiche der Proteinstruktur an, die in nativer Form im Inneren des Proteins verborgen sind. Die hydrophobe Umgebung des Fluorophors führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz (siehe Abbildung 49)[113,160].

In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der Thermofluor-Assays von MonBI, MonBII und vom MonBI-MonBII-Komplex bei verschiedenen Proteinkonzentrationen gezeigt. MonBI und der Komplex zeigten bei niedrigen Temperaturen eine geringe Fluoreszenz, ihre Schmelztemperatur lag bei 52 °C. Der Fluoreszenzfarbstoff konnte dagegen schon bei niedrigeren Temperaturen an hydrophobe Sequenzbereiche der Epoxid-Hydrolase MonBII binden, sodass die Fluoreszenz hier nicht gequencht wurde. MonBII war also nicht oder nur teilweise gefaltet.

In allen drei Assays ist ein abnehmendes Fluoreszenzsignal bei Temperaturen über 60°C zu beobachten. Dieses Phänomen ist auf die Aggregation der Proteine und die damit verbundene Zerstörung der hydrophoben Umgebung des Fluorophors zurückzuführen.

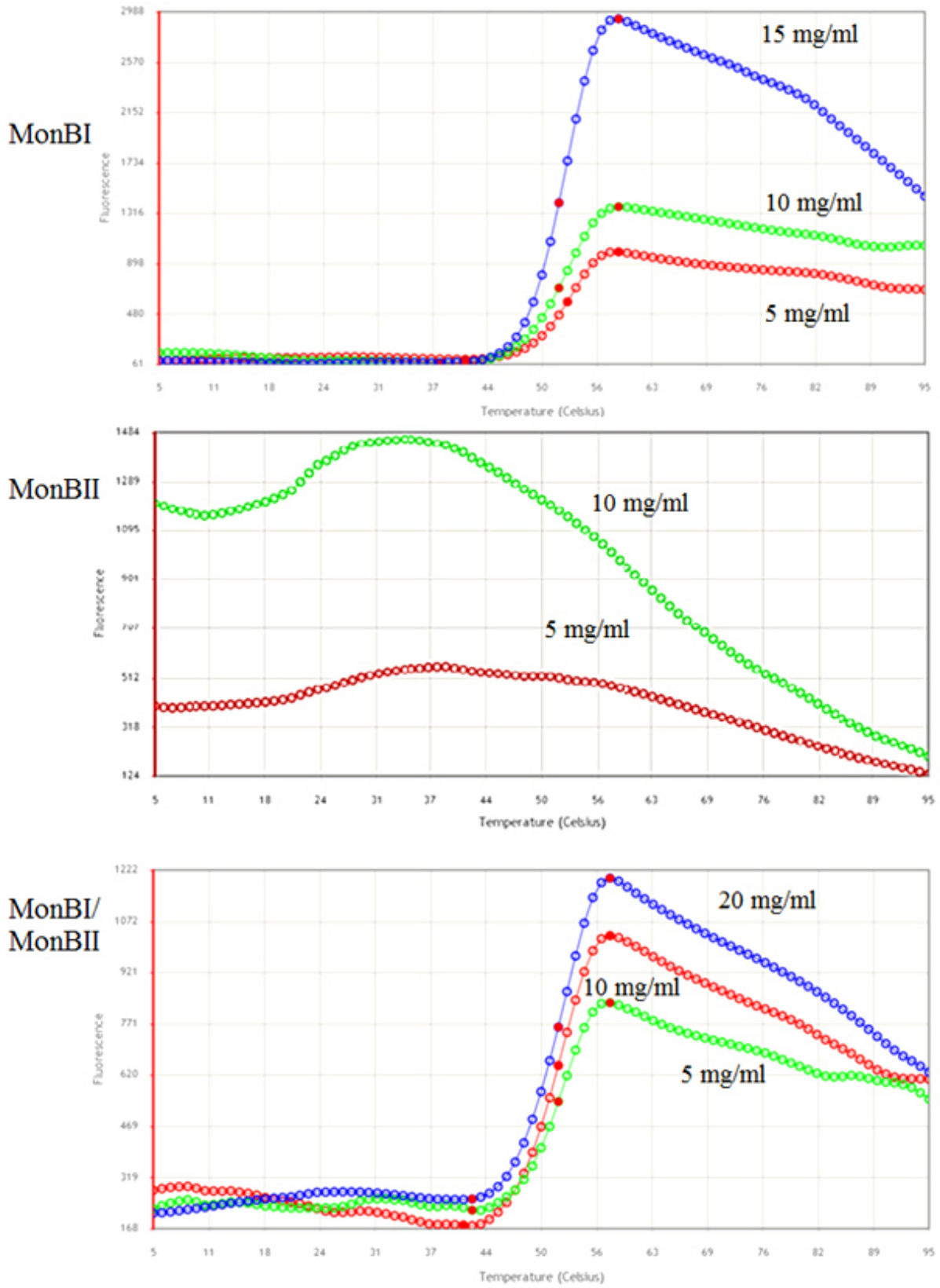


Abbildung 50: Thermofluor-Assays von MonBI, MonBII und vom MonBI-MonBII-Komplex

4.2.3.3 Analytische Ultrazentrifugation

Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde untersucht, ob MonBI und MonBII in Lösung ein Heterodimer bilden. Da MonBI und MonBII sehr ähnliche Molmassen besitzen, sich aber deutlich im Extinktionskoeffizienten bei 280 nm unterscheiden, wurden die Absorptions- und Interferenzdaten des potentiellen Dimers verglichen, um zu überprüfen, ob die beiden Epoxid-Hydrolasen in einer 1:1-Stöchiometrie vorliegen.

MonBI, MonBII und der gelfiltrierte Komplex wurden bei verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs untersucht. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm und mit Hilfe von Interferenzmessungen (das Interferenzsignal ist proportional zur Konzentration).

Bei der Analyse von MonBI in einem Konzentrationsbereich von 5.4 bis 81µM zeigte sich, dass das Protein als einzelne Spezies sedimentierte (siehe Abbildung 51). Der Sedimentationskoeffizient war unabhängig von der Proteinkonzentration und beträgt 2.2 S. Eine Korrektur auf Standardbedingungen ergab einen $s_{20,w}$-Wert von 2.7 S. Aus s-Wert und Verbreiterung der Grenzschicht wurde mit Hilfe der c(s)-Verteilung eine Molmasse von ca. 32 kDa bestimmt. Da sich aus der Aminosäuresequenz eine Molmasse von 17 kDa berechnen lässt, lag MonBI sehr wahrscheinlich in diesem Konzentrationsbereich als stabiles Dimer vor. Relativ zum unhydratisierten kugelförmigen Dimer lässt sich ein Perrinfaktor von 1.35 bestimmen. Da für ein hydratisiertes kugelförmiges Protein ein Perrinfaktor von 1.1 bis 1.2 zu erwarten wäre, wich MonBI etwas von der Kugelform ab und/oder enthielt ungefaltete Bereiche.

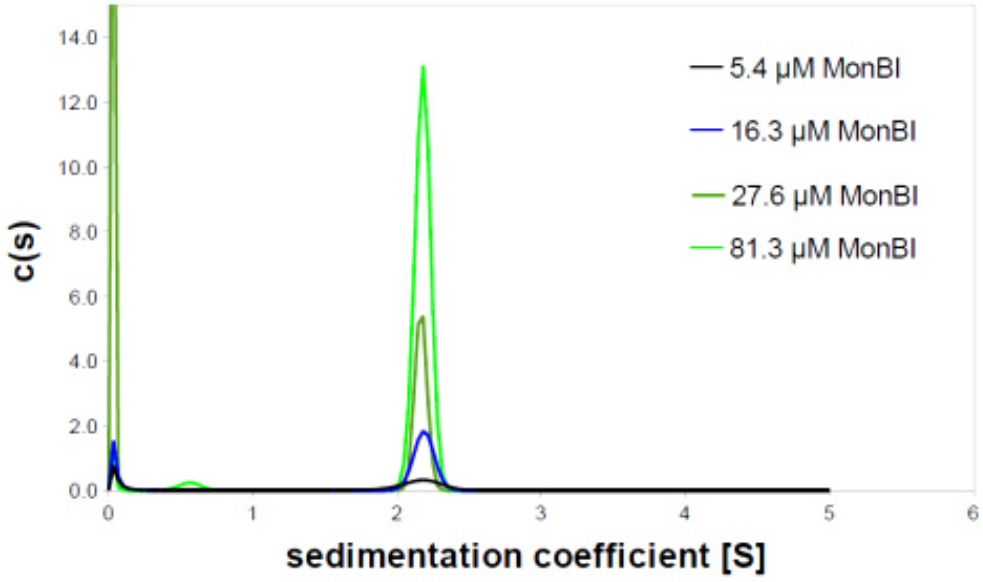


Abbildung 51: Sedimentationsanalyse von MonBI bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Gemessen wurde die Absorption bei 280 nm.

Die Analyse von MonBII zeigte hingegen ein anderes Bild (siehe Abbildung 52). Die Sedimentationskoeffizientenverteilungen wiesen hier einen deutlichen Anstieg des s-Werts mit steigender Proteinkonzentration auf. Die Maxima waren verbreitert und asymmetrisch. Vermutlich handelte es sich dabei um ein, im Vergleich zum Zeitbereich der Sedimentation, schnelles Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Außerdem zeigte sich bei MonBII noch eine weitere Spezies, die mit ca. 3.5 S sedimentiert. Da der Anteil der schneller sedimentierenden Spezies mit steigender Proteinkonzentration nicht zunahm, handelte es sich vermutlich nicht um höhere Oligomere, sondern um eine Verunreinigung.

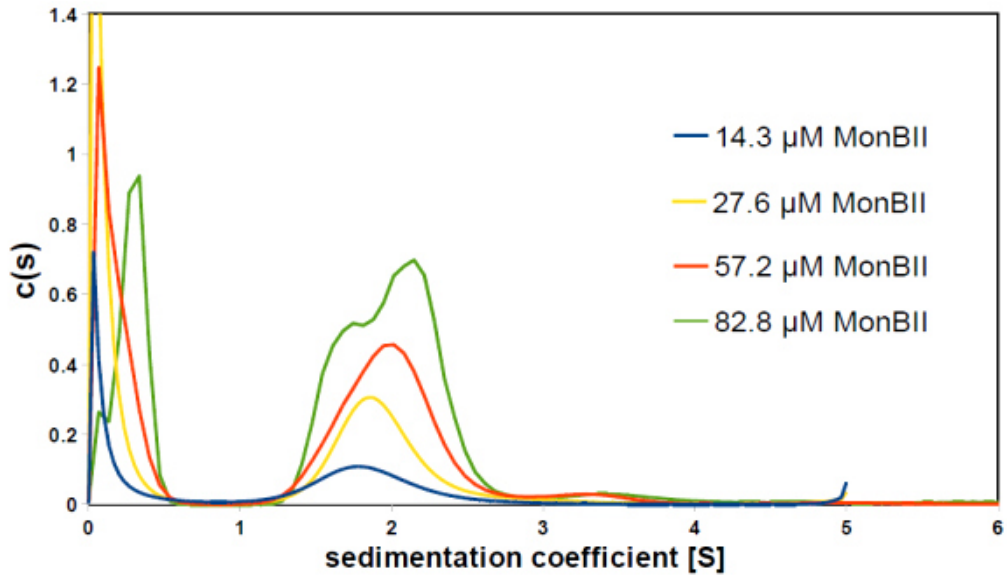


Abbildung 52: Sedimentationsanalyse von MonBII bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Gemessen wurde die Absorption bei 280 nm.

Die Analyse des gelfiltrierten MonBI-MonBII-Komplexes zeigte ähnlich wie MonBI keine Änderung des s-Werts mit der Proteinkonzentration und auch einen Sedimentationskoeffizienten von 2.2 S (siehe Abbildung 53). Bei dem bei der höchsten Proteinkonzentration auftretenden Peak bei ca. 1.4 S handelte es sich vermutlich um ein Artefakt, da er bei den anderen Proteinkonzentrationen nicht auftrat. Die aus der c(s)-Analyse bestimmte Molmasse betrug ca. 29 kDa und stimmt im Rahmen der Fehlergrenzen mit der berechneten Molmasse für den 1:1-Komplex von 33.6 kDa überein.

Ein Vergleich mit Abbildung 52 macht deutlich, dass es sich bei dem Komplex nicht einfach um eine Mischung von MonBI und MonBII handelte. In diesem Fall wären bei höheren Proteinkonzentrationen die verbreiterten Sedimentationskoeffizientenmaxima des MonBII-Monomer-Dimer-Gleichgewichts aufgetreten.

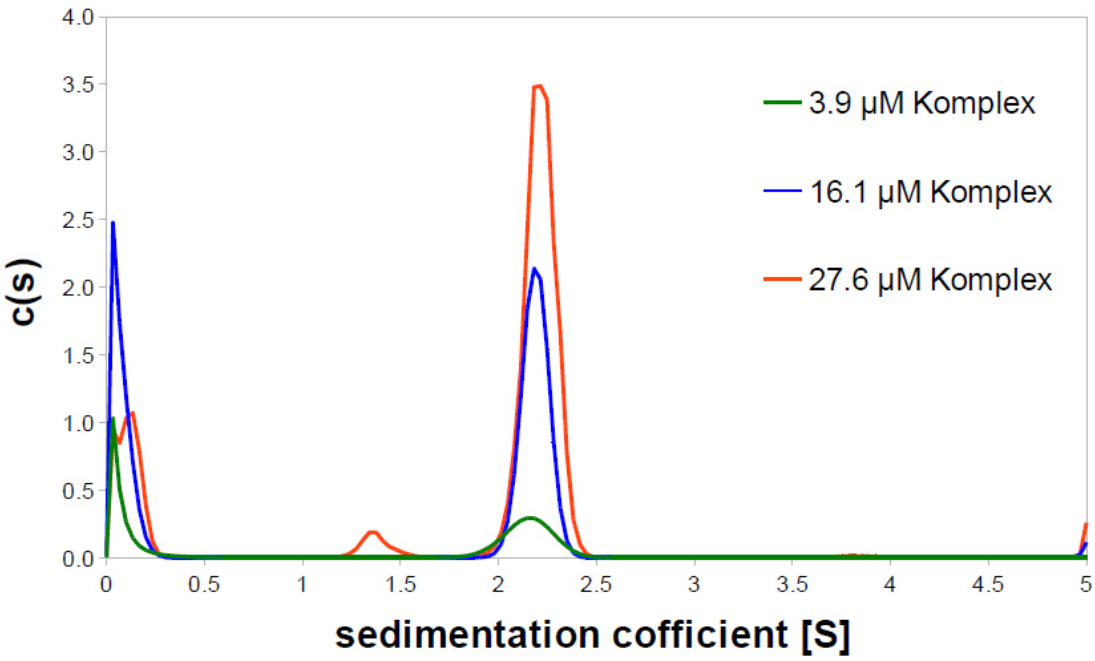


Abbildung 53: Sedimentationsanalyse eines gelfiltrierten Komplexes von MonBI und MonBII bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Gemessen wurde die Absorption bei 280 nm

Zusätzlich wurden unterschiedliche Mischungen von MonBI und MonBII hergestellt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und in einem Sedimentationsexperiment untersucht (siehe Abbildung 54). Dabei zeigte sich, dass Mischungen mit einem Überschuss von MonBII deutlich andere c(s)-Verteilung aufwiesen als der reine Komplex oder MonBI. Bei einem Überschuss von MonBI hingegen sah die Verteilung relativ ähnlich aus wie die des Komplexes. Ob die leichte s-Wert-Verschiebung zwischen Komplex und 1:0.5 Mischung MonBI/BII signifikant war, ließ sich durch dieses Experiment allerdings nicht beantworten.

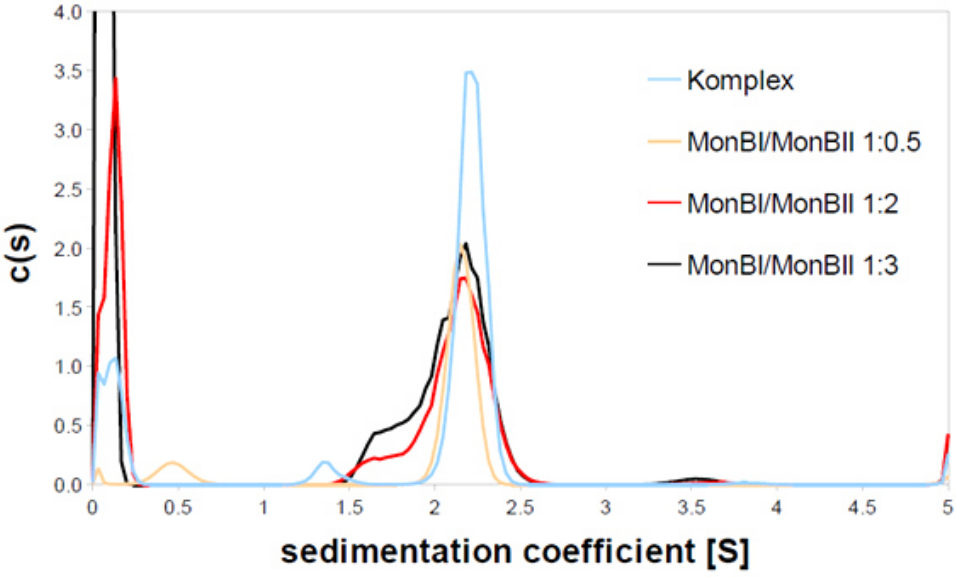


Abbildung 54: Sedimentationsanalyse von verschiedenen Mischungen von MonBI und MonBII, es befinden sich immer 27.6 µM MonBI in den Mischungen. Gemessen wurde die Absorption bei 280 nm. Zum Vergleich ist die c(s)-Verteilung von 27.6 µM Komplex dargestellt.

Betrachtet man nur die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation, so stellen sie keinen eindeutigen Beweis für die MonBI-MonBII-Heterodimerbildung dar. Bezieht man jedoch die Resultate der nativen PAGE und der Circulardichroismus-Messungen sowie des Thermofluor-Assays mit ein, so kann als gesichert gelten, dass die beiden Epoxid-Hydrolasen in Lösung als Heterodimer vorlagen.

4.2.3.4 Massenspektrometrie

Mittels MALDI-TOF-MS wurden die Aufreinigungen der beiden Epoxid-Hydrolasen sowie des 1:1-Komplexes überprüft. Die Untersuchung wurde als Vorbereitung auf die Kristallisation der beiden Proteine durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Proben auch tatsächlich nur die Zielproteine enthielten. In Abbildung 55 zeigt sich deutlich, dass die beiden Einzelproteine in reiner Form vorlagen. Das Spektrum des Komplexes wies dagegen mehrere Signale auf, die vermutlich durch größere Oligomere der Epoxid-Hydrolasen hervorgerufen wurden. Das Signal bei 50908 m/z passt zu einem einfach positiv geladenen Trimer der Einzelproteine und das Signal bei 25448 m/z könnte zu einem zweifach positiv geladenen Trimer gehören. Das Verhältnis von MonBI zu MonBII in diesen höheren Oligomeren konnte durch diese Untersuchung allerdings nicht geklärt werden.

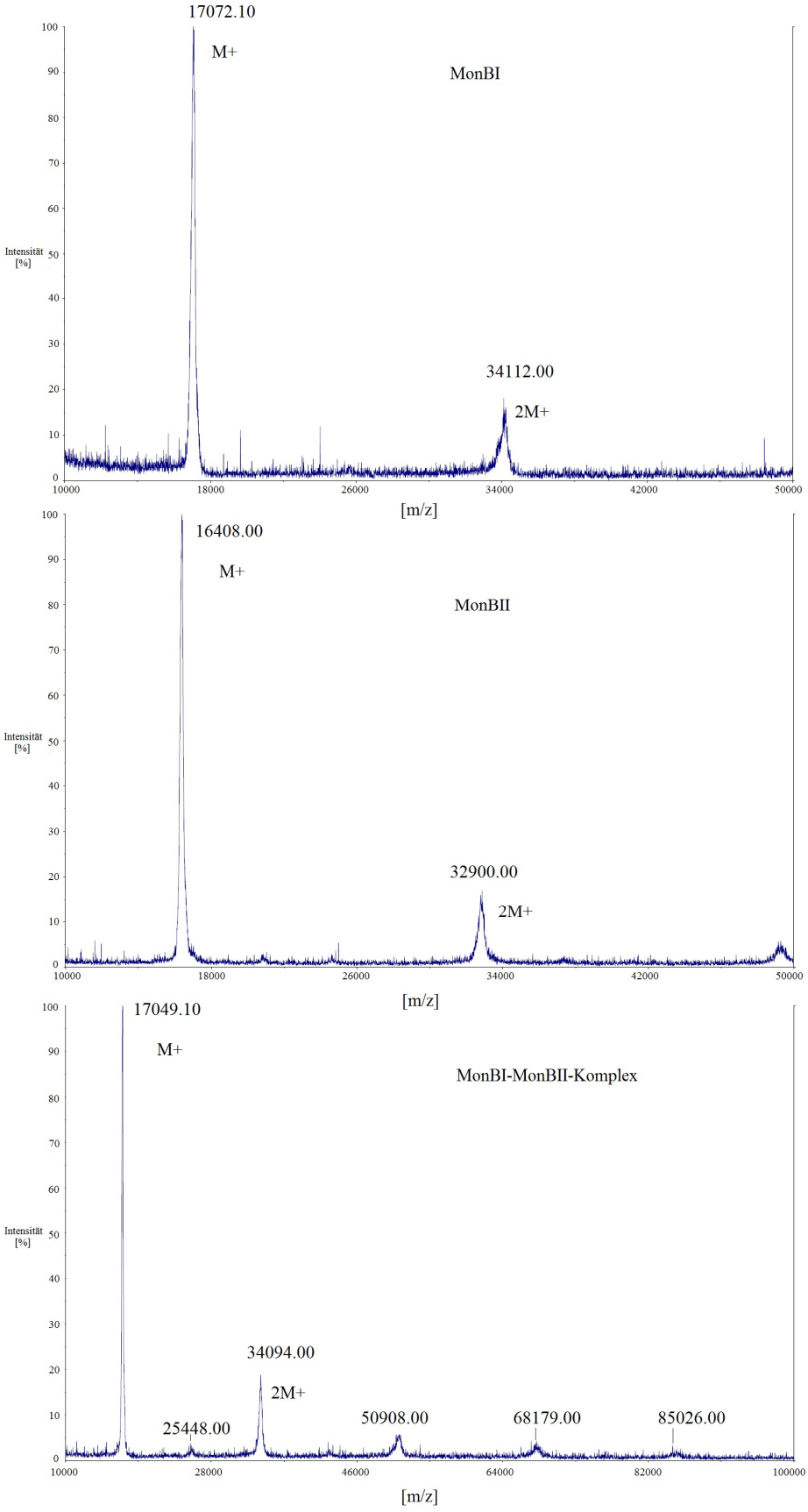


Abbildung 55: Massenspektrometrische Untersuchung der MonBI- und MonBII-Proteinaufreinigungen sowie der Aufreinigung des MonBI-MonBII-Komplexes.

4.2.3.5 Dynamische Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS)

Eine essentielle Voraussetzung für die Kristallisation eines Proteins ist, dass dieses monodispers in Lösung vorliegt und keine Aggregate bildet. Die Qualität der Proteinpräparationen wurde vor der Kristallisation mittels DLS-Spektroskopie überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass weder der MonBI-MonBII-Komplex noch das MonBI-MonBII-Fusionsprotein bei höheren Konzentrationen Aggregate bildeten.

In Abbildung 56 sind exemplarisch drei DLS-Spektren des Fusionsproteins gezeigt, die während des Konzentrierens der Probe angefertigt wurden. Die Lösung enthielt ausschließlich Partikel mit einem Radius von 4 bis 5 nm. Die Spezies mit einem Radius von 100 nm, die bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml auftrat, scheint ein Artefakt zu sein, da sie bei höheren Proteinkonzentrationen nicht vermehrt in Erscheinung trat.

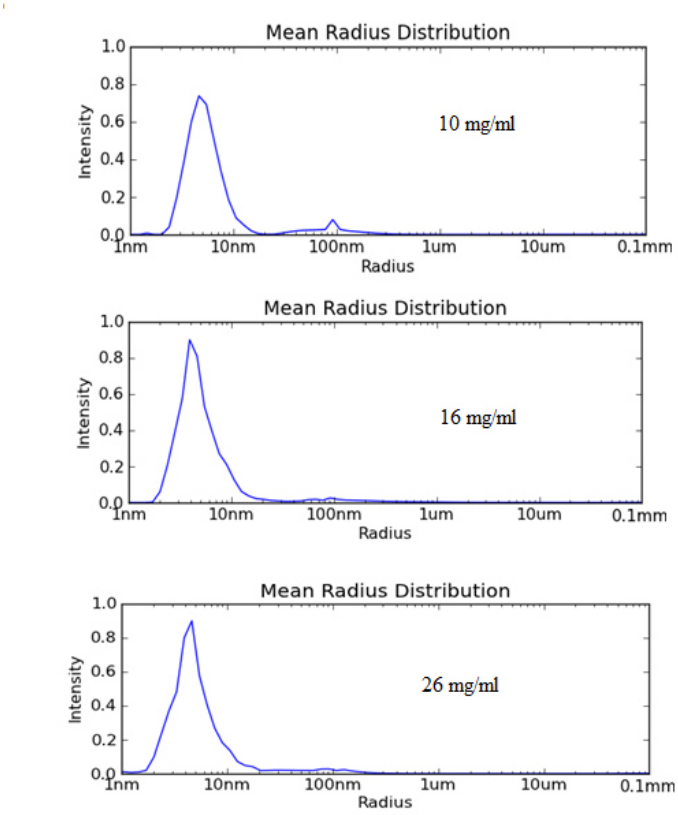


Abbildung 56: DLS-Spektren des MonBI-MonBII-Fusionsproteins

Die Stabilität eines Proteins kann ebenfalls mittels DLS untersucht werden. So kann sehr schnell überprüft werden, welche Lagerungsbedingungen geeignet sind. Der MonBI-MonBII-Komplex war außerordentlich stabil: Weder durch mehrtägige Inkubation bei 8°C noch durch bei Lagerung bei -80 °C wurde Aggregation hervorgerufen. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn die Probe zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C aufbewahrt wurde. Auf diese Weise wird die langsame Entstehung von Eiskristallen vermieden, die die Proteinfaltung zerstören kann.

Das Fusionsprotein erwies sich als weniger stabil: Aus Abbildung 57 wird deutlich, dass die Lagerung im Kühlschrank zur Aggregation führte. Nach zwei Tagen waren mehrere größere Spezies in der Lösung vorhanden. Eine Lagerung bei niedrigeren Temperaturen führte nicht zu einem besseren Ergebnis. Aus diesen Resultaten wurde gefolgert, dass Experimente mit dem Fusionsprotein direkt nach der Reinigung erfolgen mussten.

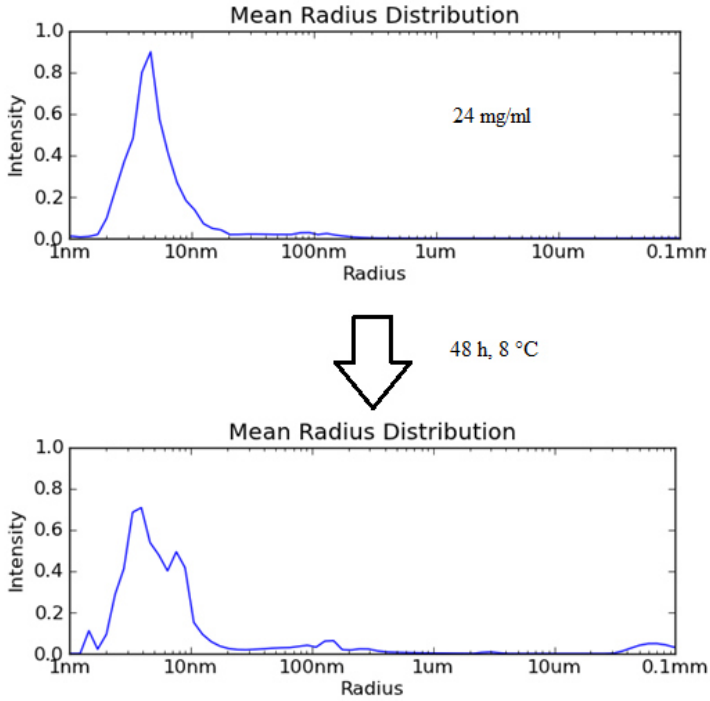
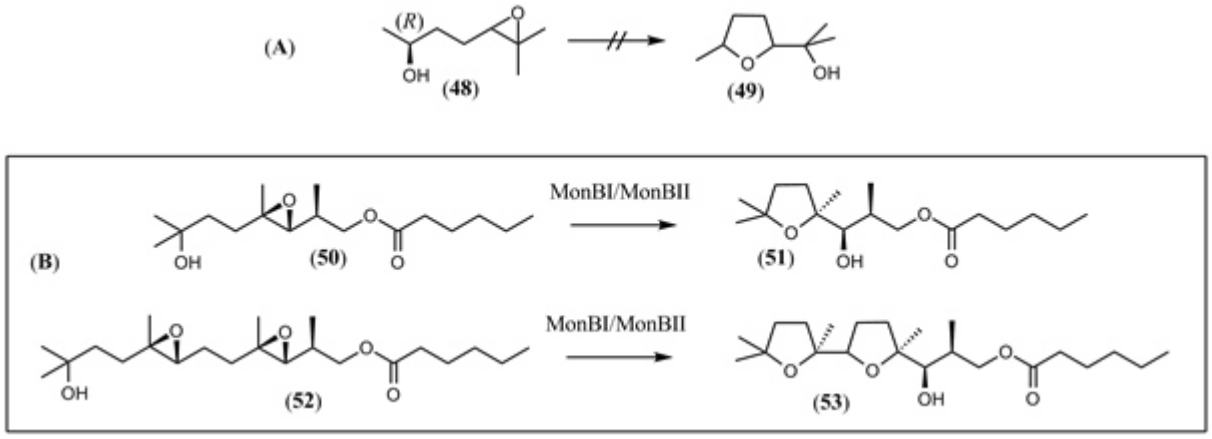


Abbildung 57: DLS-Spektren des MonBI-MonBII-Fusionsproteins – Die Lagerung bei 8 °C führt zu Proteinaggregation.

4.2.4 Funktionelle Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vitro*-Enzymaktivität der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII untersucht. Zudem wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie Untersuchungen zu Produktbindungseigenschaften der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII durchgeführt.

4.2.4.1 Enzymaktivitätsassay



Schema 17: Testsubstrate für Enzymassays mit den Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII; (A) in dieser Arbeit verwendetes Testsubstrat[6], (B) von Oikawa *et al.*verwendete Testsubstrate[161,162]

Die *in vitro*-Enzymaktivität der gereinigten Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII wurde mit dem Testsubstrat 2,3-Epoxy-2-methyl-heptan-6-ol (48) untersucht. Die Reaktion wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (siehe 3.3.5.4) und die Produktbildung per GC-MS-Analyse verfolgt. Unter keiner der getesteten Reaktionsbedingungen war ein Umsatz des Testsubstrats festzustellen. Der Enzymassay wurde zudem mit dem Fusionsprotein durchgeführt, nachdem der 6xHis-Tag abgespalten worden war. Auch in diesem Experiment ließ sich kein Umsatz des Testsubstrats beobachten.

Oikawa *et al.* konnten die katalytische Aktivität der Epoxid-Hydrolasen im *in-vitro*-Enzymassay bereits demonstrieren[161,162]. In diesen Experimenten wurden sowohl der Monoepoxyester 50 als auch der Bisepoxyester 52 verwendet (siehe Schema 17). Diese beiden Testsubstrate unterscheiden sich erheblich vom 2,3-Epoxy-2-Methyl-Heptan-6-ol, sowohl in der Länge der Kohlenstoffketten als auch im Substitutionsmuster der Epoxide. Während der nucleophile Angriff bei der 5-*exo*-Cyclisierung von 48 an dem sekundären C5 erfolgen würde, handelt es sich bei den korrespondierenden Elektrophilen in 50 und 52 um tertiäre Epoxid-Kohlenstoffe.

Bei den Enzymaktivitätsassays mit 50 und 52 konnte beobachtet werden, dass die 5-*exo*-Cyclisierung von 52 zur Bis-THF-Verbindung 53 quantitativ verlief, während nur ein geringer Anteil des Monoepoxids 50 umgesetzt wurde [162].

[6] Das Testsubstrat wurde freundlicherweise von Dr. David Giera synthetisiert.

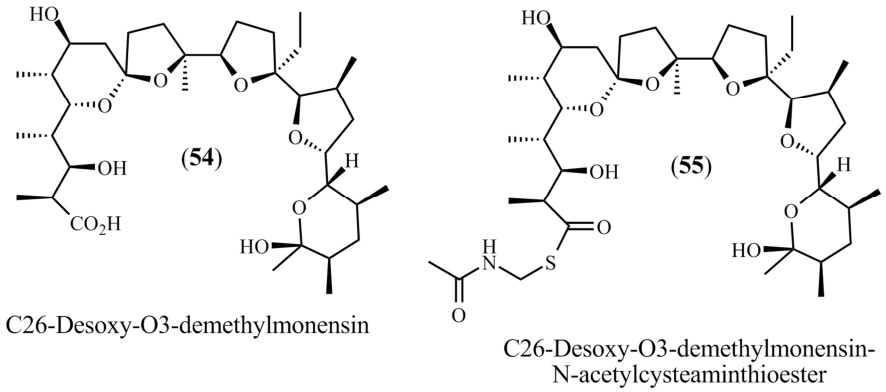
Oikawa *et al*. beobachteten außerdem, dass die Cyclisierung zum ersten THF-Ring auch bei Abwesenheit von MonBI stattfand, während das Bis-THF-Produkt nur gebildet wurde, wenn beide Epoxid-Hydrolasen im Assay vorhanden waren. Aus diesem Grund postulierten sie, dass die erste Cyclisierung von MonBII katalysiert wird und die folgende Ringschlussreaktion von MonBI[162].

4.2.4.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Die Qualität eines Proteinkristalls kann in vielen Fällen durch Cokristallisation mit dem Substrat oder mit einem Inhibitor verbessert werden [163]. In einigen Fällen kann auch die Cokristallisation mit dem Reaktionsprodukt zum Erfolg führen. Die Röntgenkristallstrukturen der Shikimat-Dehydrogenasen aus *Thermus thermophilus* (AroE) [164] und *Aquifex aeolicus* (AarSDH) [165] sowie die Struktur des bifunktionellen Enzyms Dehydroquinat-Dehydratase-Shikimat-Dehydrogenase (DHQ-SDH) aus *Arabidopsis thaliana* [166,167] sind Beispiele für die erfolgreiche Strukturaufklärung durch Cokristallisation mit dem Reaktionsprodukt Shikimisäure.

Trifft die Cane-Celmer-Westley-Hypothese zu, so ist das Produkt der Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII das C26-Dehydroxy-O3-Demethylmonensin, das als Thioester an das Acylcarrierprotein gebunden ist (siehe 1.5).

Um potentielle Liganden für die Cokristallisation mit den Epoxid-Hydrolasen zu identifizieren, wurde mithilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR)-Spektroskopie das Bindungsverhalten von C26-Desoxy-O3-demethylmonensin (54) und C26-Desoxy-O3-demethylmonensin-N-acetylcysteaminthioester (55) an das MonBI-MonBII-Fusionsprotein untersucht[7].



Schema 18: Liganden für die SPR-Messungen mit dem MonBI-MonBII-Fusionsprotein

[7] Die Liganden wurden freundlicherweise von Dipl. Chem. Johannes Arp synthetisiert.

Für die SPR-Messungen wurde das MonBI-MonBII-Fusionsprotein verwendet und über seinen 6xHis-*Tag* auf einem Ni^{2+}-NTA-SPR-Chip immobilisiert. Dieser Chip wurde gewählt, da die DLS-Messungen gezeigt hatten, dass das Fusionsprotein eine kurze Halbwertszeit hatte. Bei einem Ni^{2+}-NTA-Chip konnte die Proteinbelegung erneuert werden, da das Protein als Chelatkomplex auf dem Chip gebunden hatte und mithilfe von Imidazol und Harnstoff wieder von der Chipoberfläche entfernt werden konnte.

Die Lokalisierung des 6xHis-*Tags* war für diese Untersuchung ideal, da er nicht in der näheren Umgebung eines der beiden aktiven Zentren befand. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass beide aktive Zentren trotz der Bindung an die Chipoberfläche für potentielle Liganden noch zugänglich waren.

Erste Untersuchungen wurden mit Verbindung 54 in Konzentrationen von 13.4 µM bis 430 µM in Laufpuffer ohne DMSO durchgeführt. Die blaue Kurve in Abbildung 58 zeigt, dass eine Bindung an das Fusionsprotein stattfand. Die Ligandenkonzentrationen waren jedoch zu niedrig, um die Sättigung der Bindung zu erreichen.

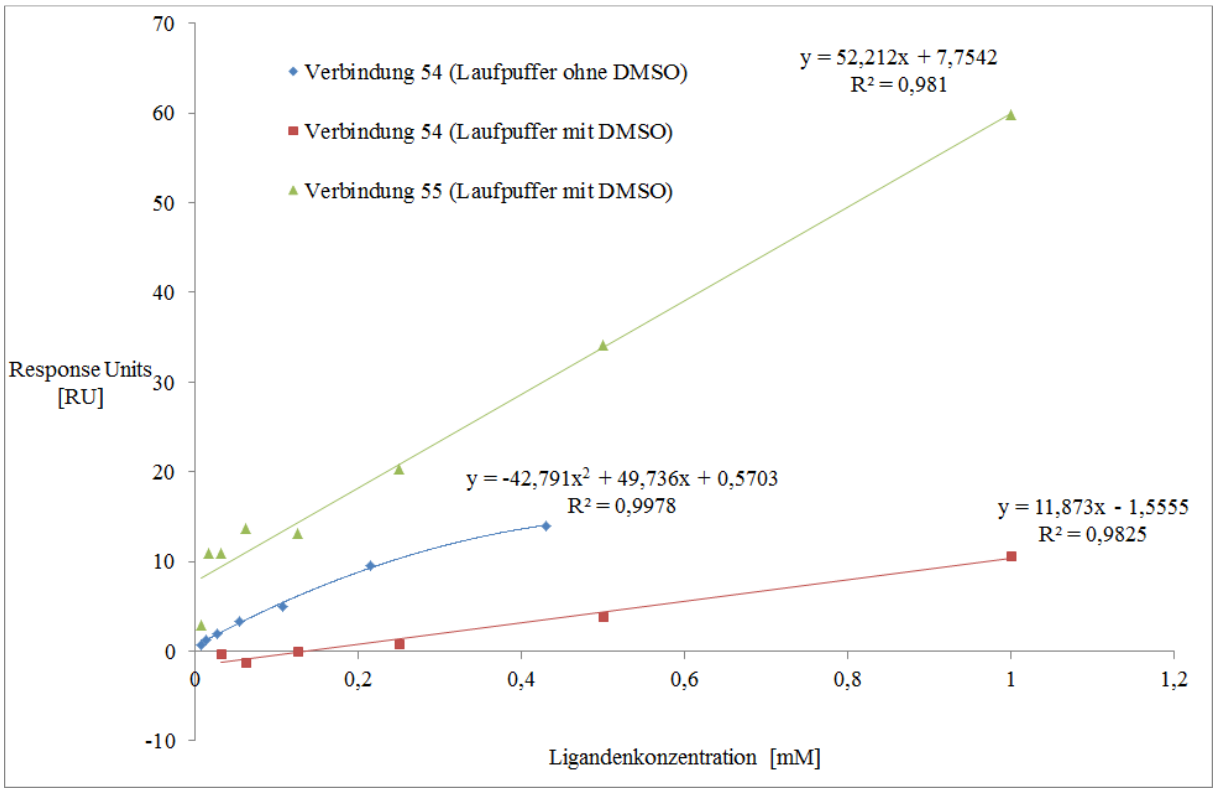


Abbildung 58: SPR-Untersuchung der Bindung von C26-Desoxy-O3-Demethylmonensin und C26-Desoxy-O3-Demethylmonensin-Thioester an das MonBI-MonBII-Fusionsprotein

Daraufhin wurde der Laufpuffer mit 5 % (v/v) DMSO versetzt, um die Löslichkeit der Liganden zu erhöhen. Die Messergebnisse sind in Abbildung 58 aufgetragen (rot). Weder bei den Messungen mit Verbindung 54 noch mit dem Thioester 55 (grün) ergaben sich in DMSO-haltigem Laufpuffer Sättigungskurven. Zwar fand eine Bindung statt, aber dieses Ereignis wird durch eine Gerade beschrieben. Somit ist davon auszugehen, dass die Bindung unspezifisch war. Es wäre möglich, dass

das Fusionsprotein durch den Zusatz von DMSO denaturiert wurde und die Liganden unspezifisch an hydrophobe Bereiche des Proteins binden konnten. Dies könnte erklären, warum der Thioester ungefähr 10 Mal so gut an das MonBI-MonBII-Fusionsprotein band wie die polarere freie Säure. Trotzdem ist dieses Ergebnis sehr interessant und bedarf weiterer Untersuchung, um festzustellen, ob es mit dem nativen Protein reproduzierbar ist. Schließlich war das Thioestermotiv auch bei den molekularen *Docking*-Experimenten mit möglichen Epoxid-Hydrolase-Substraten notwendig, um eine Bindung an das aktive Zentrum zu erzielen (siehe 4.2.6).

Für weiterführende Untersuchungen wäre allerdings die Verwendung eines anderen SPR-Chips empfehlenswert. Die Bindung des Proteins an den Ni^{2+}-NTA-Chip stellte sich als nicht sonderlich stabil heraus. Während der Ligandenvermessung war eine kontinuierliche Elution des gebundenen Proteins vom SPR-Chip zu beobachten. Dies führte zu einer negativen Steigung der Basislinie. Um die hier erzielten Ergebnisse zu verifizieren, wäre es ratsam, die Messungen noch einmal mit einem kovalent immobilisierten Protein zu wiederholen.

4.2.5 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Initiale Kristallisationsversuche und die Datensammlung am Synchrotronwurden im Rahmen des BioStructX-Förderprogramms am EMBL Hamburg mit Dr. Rob Meijers und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Die Röntgenstrukturanalyse und weiterführende Kristallisationsexperimente erfolgten im Anschluss in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Christian Betzel.

4.2.5.1 Durchmusterung der Kristallisationsbedingungen

Um Bedingungen zu identifizieren, unter denen die Epoxid-Hydrolasen kristallisierten, wurden die beiden Proteine und die MonBI-MonBII-Mischung mit 14 kommerziell erhältlichen Kristallisationsscreens (à 96 Bedingungen) getestet. Pro Screen wurden bis zu drei verschiedene Proteinkonzentrationen eingesetzt, sodass insgesamt die Untersuchung von über 6000 Bedingungen erfolgte.

4.2.5.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Initiale Kristalle des MonBI-MonBII-Komplexes wurden im *Sitting-Drop*-Verfahren mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml erhalten. Das Reservoir enthielt 0.2 M Magnesiumacetat, 0.1 M Natriumcacodylat, 20 % PEG 8000, pH 6.5.
Die Kristalle fluoreszierten unter UV-Licht. Zudem erzeugten sie Röntgenbeugungssignale mit einer Auflösung von 30 Å. Diese Röntgenbeugungseigenschaften sind typisch für kleine Proteinkristalle. Mit diesen Kontrollexperimenten wurde sichergestellt, dass die Kristalle aus Protein und nicht aus Salz bestanden.

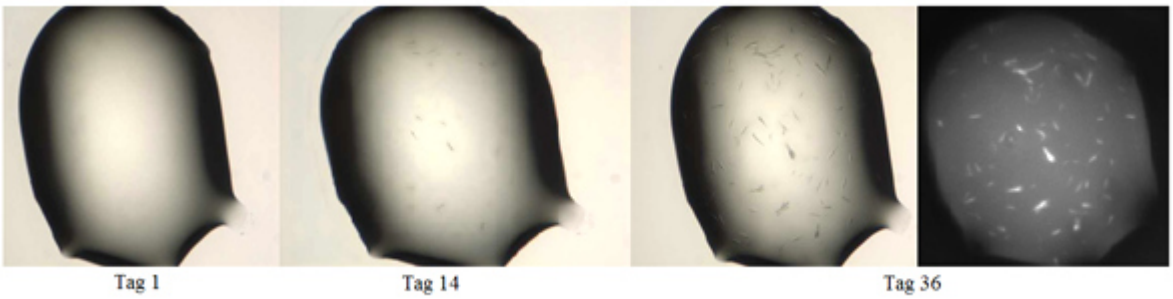


Abbildung 59: Verlauf des initialen erfolgreichen Sitting-Drop-Kristallisationsexperiments mit dem MonBI-MonBII-Heterodimer (Tag 36 rechts: Die Kristalle fluoreszierten unter UV-Licht)

Um eine höhere Auflösung bei der Röntgenbeugung zu erzielen, war es notwendig, größere Kristalle des MonBI-MonBII-Komplexes zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden die Kristallisationsbedingungen optimiert. Bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml konnten innerhalb von 7 Tagen unter den folgenden Bedingungen Kristalle gezüchtet werden.

Tabelle 4-1: Kristallisationsbedingungen für das MonBI-MonBII-Heterodimer

	Zusammensetzung des Reservoirs	Methode
A	0.15 M Citrat, 31 % (w/v) PEG 8000, pH 6.5	*Hanging-Drop* [8]
B	0.01 M Natriumborat, 1.2 M Natriumcitrat, pH 8.5	*Sitting-Drop*
C	0.1 M Bis Tris Propan, 0.2 M Natriumnitrat, 20 % (w/v) PEG 3350, pH 6.5	*Sitting-Drop*

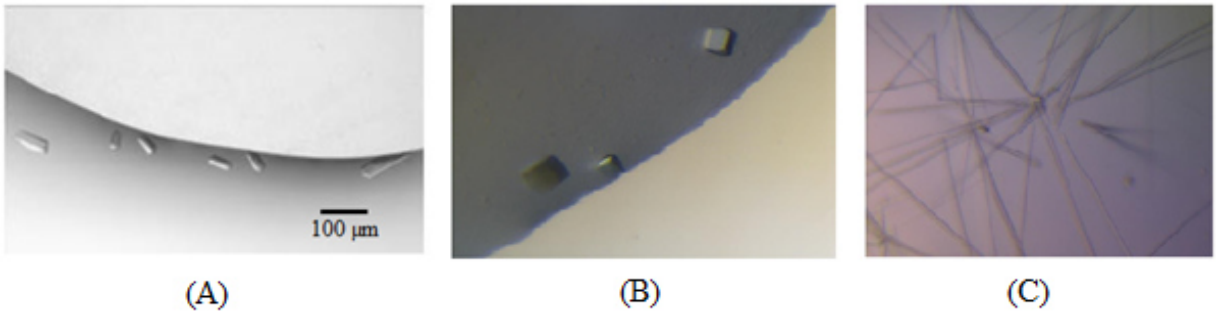


Abbildung 60: Kristalle des MonBI-MonBII-Heterodimers (Die Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 4-1 aufgelistet.)

Um besser geordnete Kristalle, d. h. Kristalle mit geringerer Mosaizität zu erzeugen, wurde das MonBI-MonBII-Fusionsprotein ohne 6xHis-*Tag* kristallisiert. Bei einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml konnten unter den folgenden Bedingungen Proteinkristalle gezüchtet werden:

Tabelle 4-2: Kristallisationsbedingungen für das MonBI-MonBII-Heterodimer

	Zusammensetzung des Reservoirs	Kristallisationsmethode
(D)	0.2 M Natriumnitrat, 20 % (w/v) PEG 3350	*Sitting-Drop*-Verfahren
(E)	0.2 M Natriumacetat, 20 % (w/v) PEG 3350	*Sitting-Drop*-Verfahren

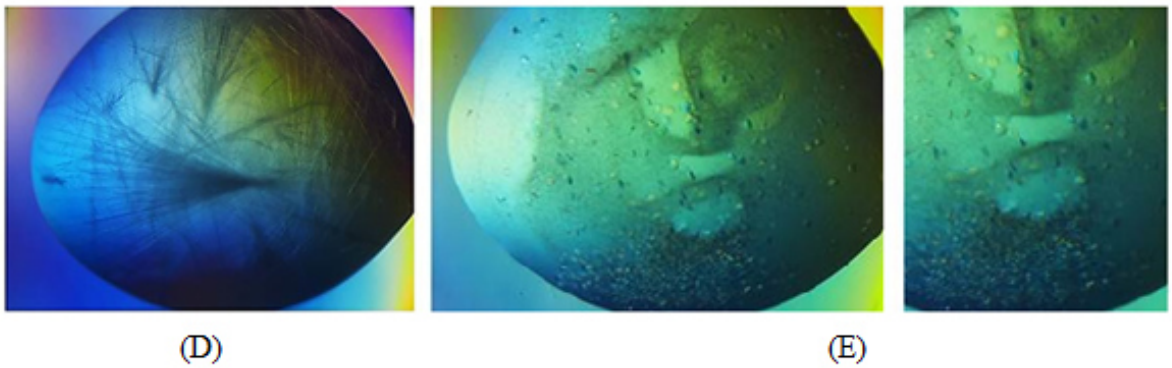


Abbildung 61: Kristalle des MonBI-MonBII-Fusionsproteins (Die Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 4-2 aufgelistet.)

Trotz zahlreicher Optimierungsversuche blieben diese Kristalle jedoch entweder sehr klein (~50 µm Durchmesser) oder wuchsen als Nadeln. Nadelförmige Kristalle liefern keine auswertbaren Röntgenbeugungsmuster, da sie aufgrund ihrer Form vom Röntgenstrahl größtenteils verfehlt werden.

[8] Für nähere Informationen zu diesem Ansatz siehe 3.3.7.3.1

Ein möglicher Weg zu qualitativ hochwertigeren Kristallen könnte die Verwendung der kleinen Kristalle aus Ansatz E (siehe Abbildung 61) als Impfkristalle in neuen Ansätzen sein.

Oikawa *et al.* gelang es 2014, die Epoxid Hydrolase MonBI als Homodimer zu kristallisieren [162]. MonBI wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml im *Hanging-Drop*-Verfahren eingesetzt. Das Reservoir enthielt 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0), 2.25 M Natriumchlorid und 15% (v/v) PEG6000. Diese Bedingungen wurden auch in dieser Arbeit getestet, die Ergebnisse konnten hier jedoch nicht reproduziert werden.

4.2.5.3 Datensammlung, Aufklärung und Verfeinerung der Kristallstruktur

Mit den Kristallen aus Ansatz A (siehe Abbildung 60) wurde ein kompletter Datensatz bis 3.3 Å Auflösung gesammelt. Die Kristalle waren primitiv tetragonal und gehörten zur Raumgruppe P 4_32_12 mit den Zellparametern a = b = 77.814 Å, c = 100.98 Å und $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Die asymmetrische Einheit enthielt ein MonBI-MonBII-Heterodimer. Der Matthews-Koeffizient lag bei 2.39 $Å^3$/Da. Daraus ergab sich ein Lösungsmittelanteil im Kristall von 48.62 %.

Die Struktur des MonBI-MonBII-Komplexes wurde durch molekularen Ersatz gelöst. Als Vorlage diente die Röntgenkristallstruktur der Epoxid-Hydrolase Lsd19 (PDB-ID: 3rga) aus dem Biosynthesecluster des Polyetherantibiotikums Lasalocid [103].

Tabelle 4-3:Datensammlung und Strukturverfeinerung

Raumgruppe	P 4_32_12
Einheitszellparameter	a = 77.814 Å; b = 77.814 Å; c = 100.98 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Matthews-Koeffizient V_M	2.39 $Å^3$/Da
Lösemittelgehalt	48.62 %
Datenvollständigkeit	99.8 (100)[9] %
Mittlere Intensität/σ(Intensität)	11.7 (3.1)
Auflösung	30-3.3 Å
R_{merge}	16.6 %
Gesamtzahl der Reflektionen	52346 (7702)
Einzigartige Reflektionen	4262 (600)
R_{work}	30.9 %
R_{free}	47.4 %
Proteinatome	2100
Lösungsmittelatome	Nicht modelliert
Ligandenatome	Nicht modelliert

[9] In Klammern sind die Werte für die höchste Auflösung (3.3 Å) angegeben.

Mittlerer B Wert	20 Å^2
Mittlere quadratische Abweichung:	
Bindungen	0.0131 Å
Bindungswinkel	1.8239°
Ramachandran-Plot-Analyse:	
Favorisierte Regionen	70.11 %
Erlaubte Regionen	15.30 %
Großzügig erlaubte Regionen	14.49 %

Das finale Modell des MonBI-MonBII-Heterodimers besteht aus 271 Aminosäuren (MonBII 1 bis 128 und MonBI 1 bis 143). Die carboxyterminalen Aminosäuren 129 bis 140 der Epoxid Hydrolase wurden nicht in das Modell einbezogen, da der Unterschied zur Struktur der molekularen Vorlage Lsd19 in diesem Bereich zu gravierend war. Die Röntgenkristallstruktur von Lsd19, die im molekularen Ersatz als Vorlage verwendet wurde, besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit den Domänen Lsd19A und Lsd19B. Der Carboxyterminus von Lsd19A bildet die Verbindung zwischen diesen beiden Domänen. MonBII mit carboxyterminalem 6xHis-*Tag* weist dagegen eine andere Konformation auf.

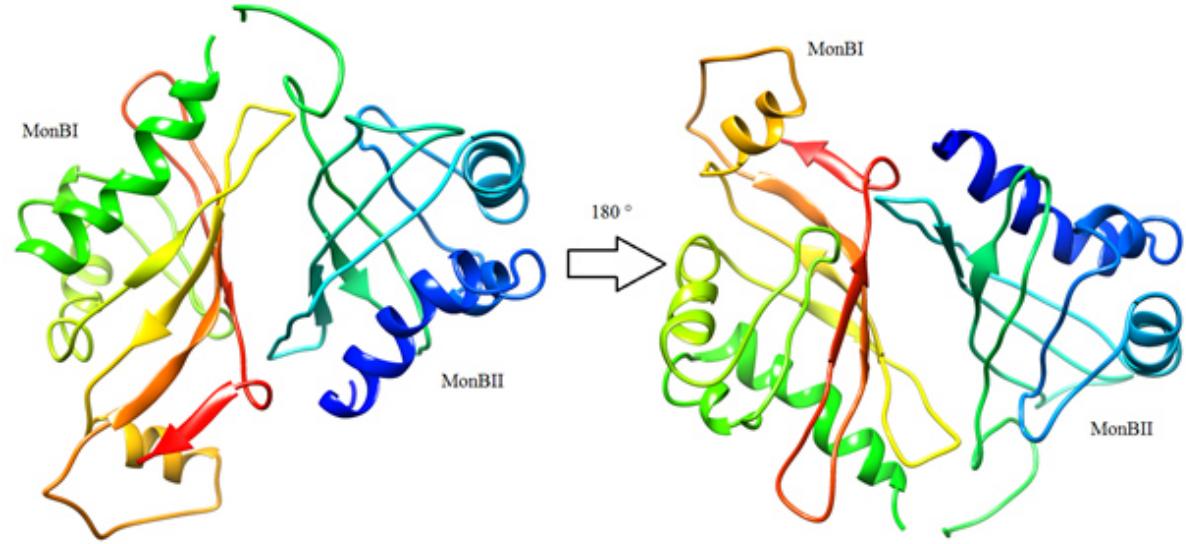


Abbildung 62: Röntgenkristallstruktur des MonBI-MonBII-Heterodimers

Die beiden Proteine bilden ein Heterodimer mit einer Kopf-Schwanz-Anordnung. Das Heterodimer gehört zur Superfamilie der NTF2-ähnlichen Proteine und jede Untereinheit weist eine SnoaL-ähnliche Faltung auf [168,169]. Das MonBI-Monomer besteht aus vier α-Helices und drei antiparallelen β-Faltblättern und das MonBII-Monomer setzt sich aus drei α-Helices und drei antiparallelen β-Faltblättern zusammen. Die Sekundärstrukturelemente bilden zwei Trichter, deren Öffnungen in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Im Inneren der beiden Trichter befinden sich die potentiellen

aktiven Zentren der Enzyme. Die zusätzliche α-Helixstruktur in MonBI liegt als Loop-Helix-Loop-Struktur vor der Öffnung zum aktiven Zentrum.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Oikawa *et al*. bei der Kristallisation der Epoxid-Hydrolase MonBI als Homodimer erzielen (PDB ID: 3wmd) [162]. Die Überlagerung mit dieser MonBI-Struktur ergab einen sehr guten RMSD-Wert von 0.988 Å. Auch die Überlagerung mit der Röntgenkristallstruktur der Epoxid-Hydrolase Lsd19 zeigte, dass sich die Strukturen sehr ähnlich sind. Hier lag der RMSD-Wert bei 1.7 Å[170].

Als katalytisch aktive Aminosäuren wurden bei der Epoxid-Hydrolase MonBI Asp37 und Glu64 identifiziert [64,161]. Die Aminosäuren sind in der Kristallstruktur auf gegenüberliegenden Seiten des vermuteten aktiven Zentrums angeordnet, ihre Carboxylgruppen sind zur Mitte des Trichters orientiert und sind 8.1 Å voneinander entfernt (siehe Abbildung 63).

In MonBII ist die Positionierung der katalytisch aktiven Aminosäuren Asp38 und Glu65 analog zu der in MonBI. Die beiden Carboxylgruppen sind mit 8.3 Å ähnlich weit voneinander entfernt wie im aktiven Zentrum von MonBI.

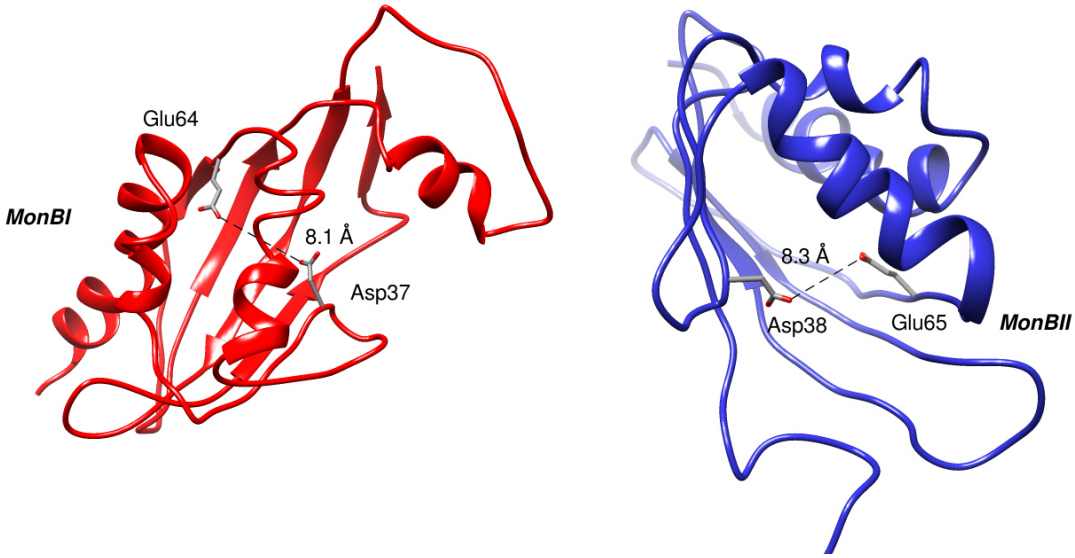
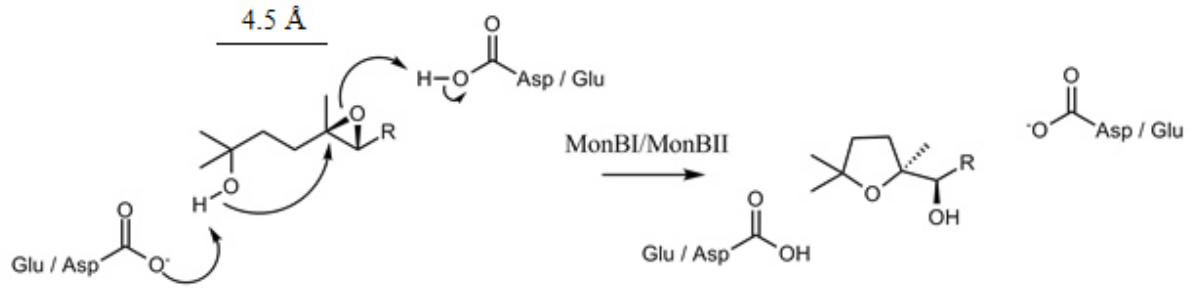


Abbildung 63: Position der katalytisch aktiven Aminosäuren in der Röntgenkristallstruktur von MonBI und MonBII

Diese Positionierung der katalytisch aktiven Aminosäuren ermöglicht die Epoxidöffnung und Cyclisierung zum Baldwin-Produkt mittels Säure/Base-Katalyse [103] (siehe Schema 19). Die Distanz zwischen dem nucleophilen Sauerstoff des Halbacetals und der C12 des angegriffenen Epoxids beträgt in Verbindung 57 (siehe Schema 20) beträgt 4.5 Å.



Schema 19: Mechanismus der Epoxidöffnung und Cyclisierung nach Oikawa *et al.*[161]

Aufgrund der konkaven Form der beiden Untereinheiten finden die Wechselwirkungen ausschließlich am oberen und unteren Ende des Heterodimers statt (siehe Abbildung 64). Hier ist die räumliche Nähe der Aminosäurenseitenketten von MonBI und MonBII groß genug für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen

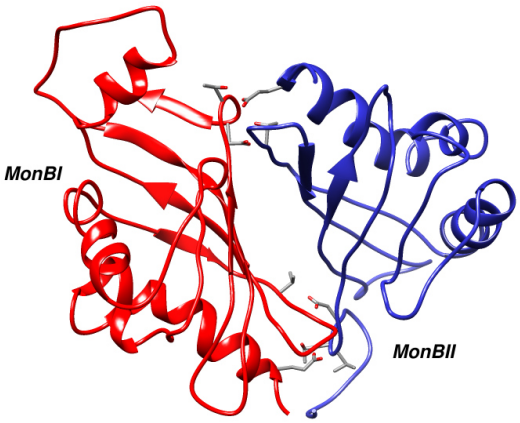


Abbildung 64: Interaktionen zwischen den Untereinheiten des Heterodimers

Die Hydroxygruppe von Thr137 (MonBI) befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zur Carboxylgruppe von Glu4 (MonBII). Diese Caroxylgruppe könnte außerdem mit Ser138 (MonBI) interagieren. Auch der geringe Abstand der Carboxylgruppe von Asp139 (MonBI) zur Hydroxygruppe des Thr72 (MonBII) lässt eine Wasserstoffbrückenbindung vermuten.

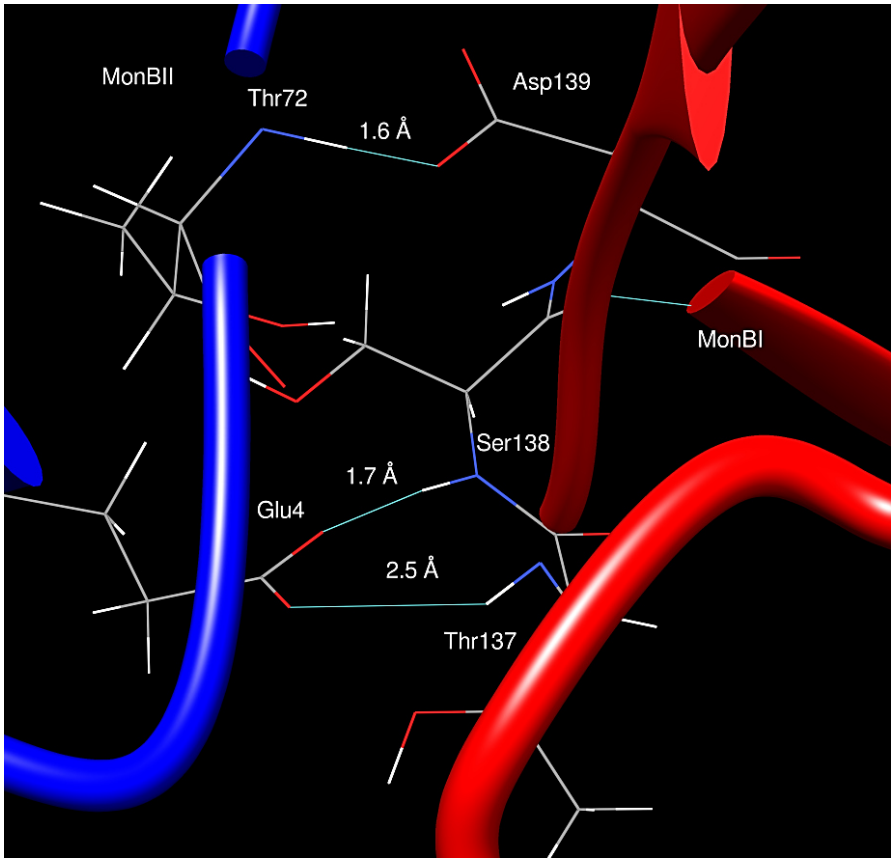


Abbildung 65: Mögliche Interaktionen zwischen Glu4; Thr72 (MonBII), Thr137, Ser138 und Asp139 (MonBI)

Am anderen Ende der Kontaktfläche der Untereinheiten kann von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr119 und Asp120 (MonBII) mit Glu3 und Ala71 (MonBI) ausgegangen werden (siehe Abbildung 66).

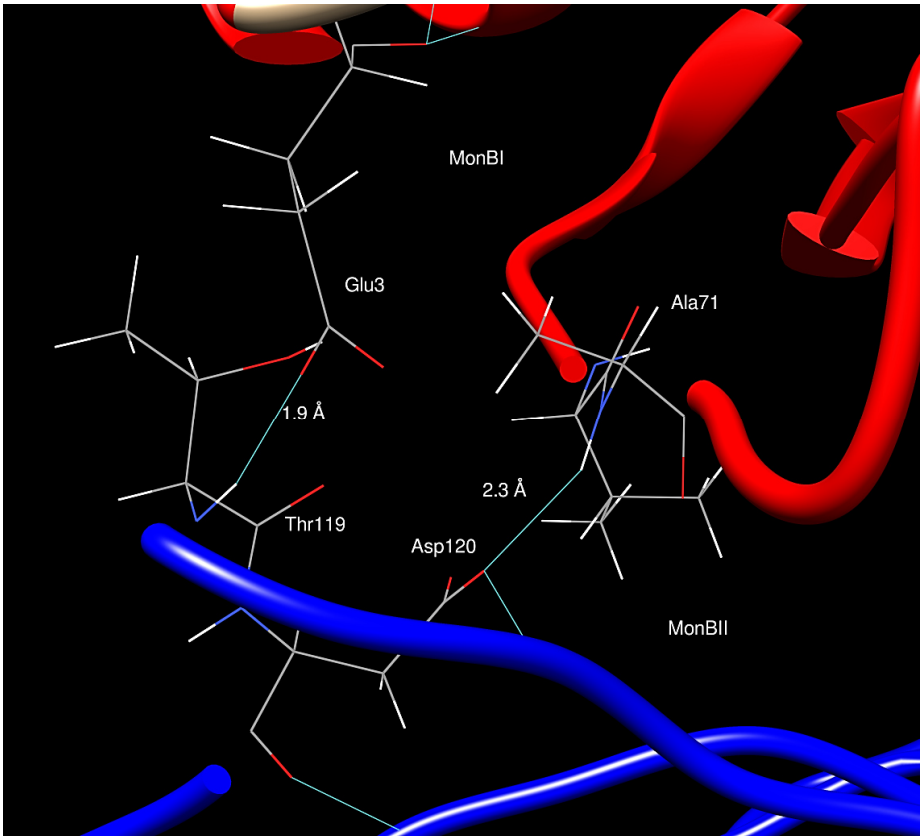


Abbildung 66: Mögliche Interaktionen der Aminosäuren Glu3 und Val70 (MonBI) mit Val118, Thr119 und Asp120 (MonBII)

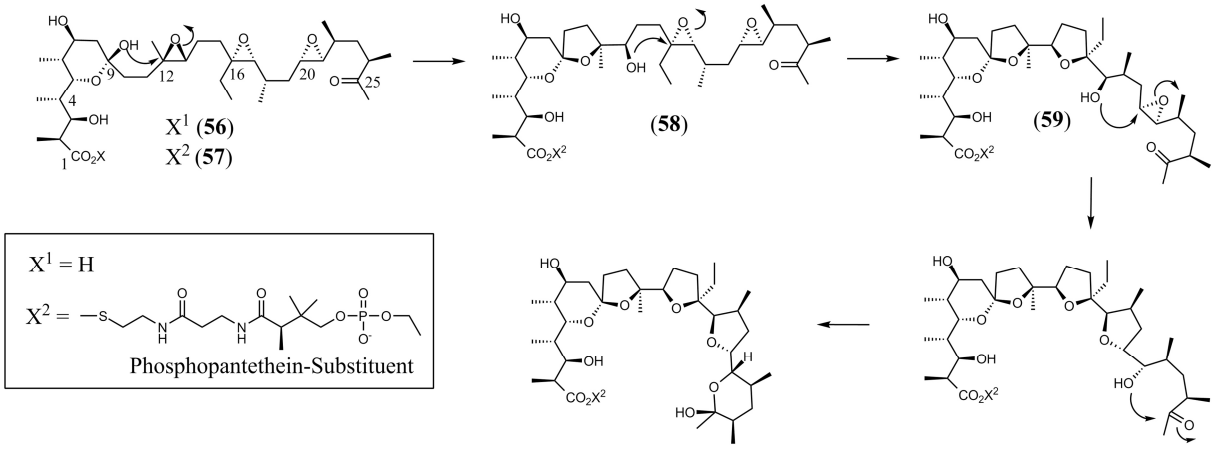
Mit 3.3 Å ist die Auflösung der hier vorgestellten Röntgenkristallstruktur des MonBI-MonBII-Heterodimers recht moderat. Zwar können mit dieser Struktur die Lage und Orientierung der Sekundärstrukturelemente zuverlässig bestimmt werden und auch die ungefähre Position der Aminosäureseitenketten kann aufgeklärt werden. Detailliertere Informationen z. B. über die genaue Orientierung der funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren im Protein sind aus dieser Röntgenkristallstruktur nicht zuverlässig zu entnehmen. Diese Informationen sind es jedoch, die Erkenntnisse über den katalytischen Mechanismus eines Enzyms zulassen. Um MonBI und MonBII diese Informationen zu entlocken, wäre es dementsprechend nötig, Kristalle zu züchten, die bessere Röntgenbeugungseigenschaften aufweisen. Anstelle von molekularem Ersatz könnte das Phasenproblem auch per SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion) oder MAD (Multi-wavelength Anomalous Dispersion) gelöst werden. Dafür müssten die Proteine entweder mit Selenocystein exprimiert werden oder die Kristalle vor der Datensammlung in einer Schwermetalllösung getränkt werden. SAD- und MAD-Methoden führen häufig zu akkurateren Elektronendichtekarten als der molekulare Ersatz[171].

4.2.6 Molekulare *Docking*-Experimente

Nach der Cane-Celmer-Westley-Hypothese wird Premonensin zunächst dreifach epoxidiert, bevor die Epoxid-Hydrolasen die Cyclisierungskaskade zur Bildung des Polyetherrückgrats katalysieren. Die einzelnen Schritte dieser Kaskade sind in Schema 20 dargestellt. Sie beinhaltet drei nucleophile Epoxidöffnungsreaktionen, allerdings codiert das Biosynthesegencluster nur für zwei Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII. Die Frage, welche Reaktion an welchem aktiven Zentrum stattfindet, wurde mit bioinformatischen Methoden adressiert. Für die Untersuchungen wurde das molekulare *Docking*-Programm AutoDock4 verwendet [129,130].

Da die MonBI-MonBII-Kristallstruktur keine atomare Auflösung besaß, wurde ein MonBI-MonBII-Homologiemodell verwendet. Das Modell basierte auf der Struktur der Epoxid Hydrolase Lsd19 und wurde mit dem SWISS-MODEL-Server erstellt. Auf diese Weise konnten mögliche Fehler in der Röntgenkristallstruktur umgangen werden.

Die Liganden 56 bis 59 wurden nacheinander auf eine mögliche Bindung an das aktive Zentrum von MonBI und von MonBII hin untersucht. Dabei wurde angenommen, dass gute Bindungseigenschaften ein Hinweis auf die Beteiligung des entsprechenden Enzyms an der Katalyse der Reaktion sind.



Schema 20: Postulierte Zwischenstufen der Cyclisierungskaskade von Triepoxypremonensin. Die Verbindungen 56 bis 59 wurden in molekularen *Docking*-Experimenten als Substrate eingesetzt.

Der Triepoxyligand wurde sowohl als Säure (56) als auch als Phosphopantethein-Thioester (57) im *Docking*-Experiment eingesetzt. AutoDock4 erlaubt insgesamt nur 32 frei drehbare Bindungen im Experiment. Da dies genau die Zahl der Bindungen war, die in Verbindung 57 rotieren konnten, wurde das Enzym als rigide definiert.

Um überhaupt eine Bindung an das Enzym zu erzielen, war die Anwesenheit des cyclischen Halbacetals im Liganden essentiell. Verbindung 56 wurde als freie Säure im *Docking*-Experiment eingesetzt. Es war keine Bindung im Bereich des aktiven Zentrums von MonBI festzustellen, dafür konnte aber eine Bindung an das aktive Zentrum von MonBII beobachtet werden (siehe Abbildung 67). Tyr14 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff an C25. Außerdem besteht eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arg42 und der Carboxylgruppe. Aufgrund dieser

Interaktionen ragt das Substrat jedoch nicht weit genug ins aktive Zentrum hinein und keines der drei Epoxide befindet sich in der Nähe der katalytisch aktiven Aminosäuren Asp38 und Glu65.

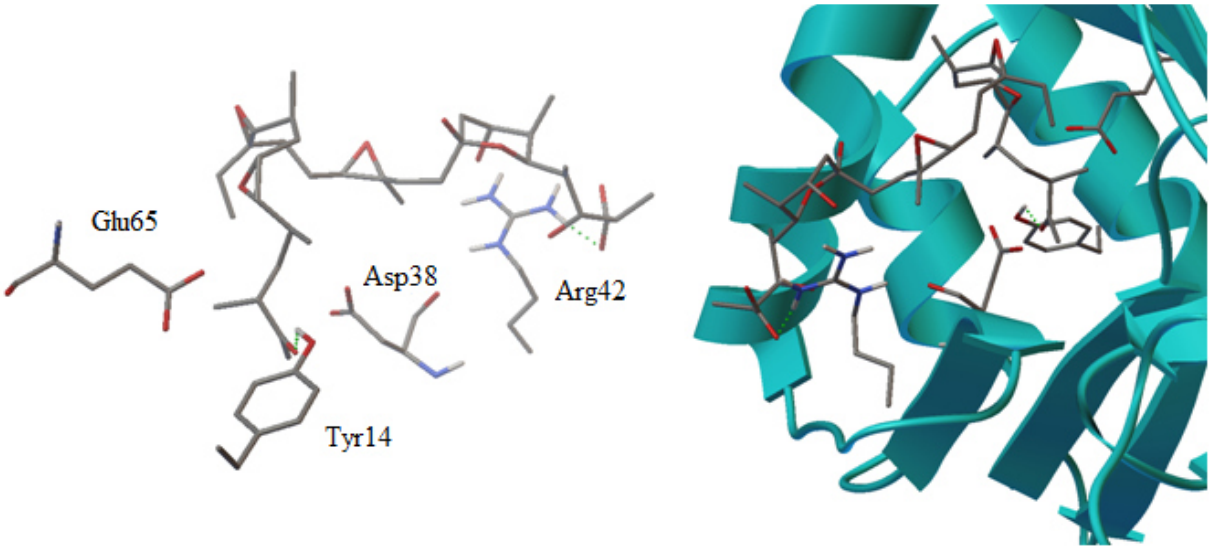


Abbildung 67: Modellierte Bindung des Liganden 56 an die Epoxid Hydrolase MonBII

Nun liegt das Substrat *in vivo* allerdings nicht als freie Säure vor, sondern ist als Thioester über eine Phosphopantethein-Einheit an das ACP gebunden. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit der Verbindung 57 als Phosphopantethein-Thioester wiederholt (siehe Schema 20). Erneut war nur eine Bindung an das aktive Zentrum von MonBII zu beobachten (siehe Abbildung 68), die Bindungsenergie lag bei -0.52 kcal/mol. Leu57 interagiert mit der Phosphatgruppe des Phosphopantethein-Substituenten und das andere Ende des Substrats wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr83 und dem Carbonylsauerstoff an C25 tief im Inneren des aktiven Zentrums verankert. Das katalytisch aktive Asp38 interagiert mit dem 16,17-Epoxid und mit dem 20,21-Epoxid. Zwar kann keine Interaktion mit dem 12,13-Epoxid detektiert werden, aber diese Konformation könnte trotzdem einen Hinweis auf die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum von MonBII darstellen.

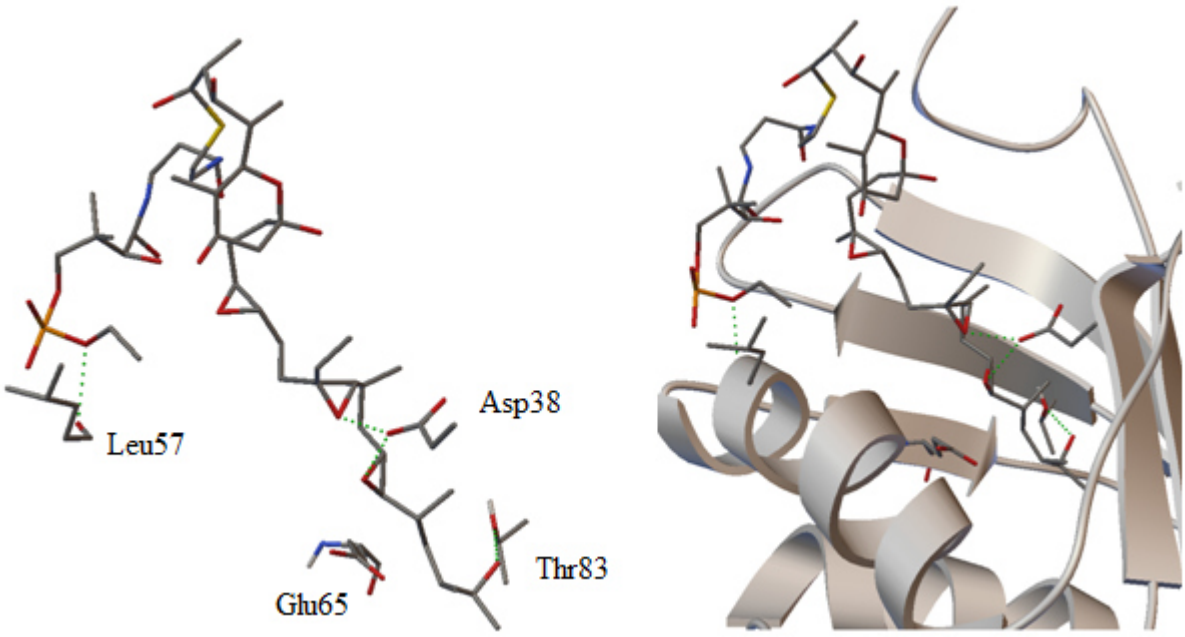


Abbildung 68: Modellierte Bindung des Liganden 57 an die Epoxid Hydrolase MonBII

Abbildung 69 zeigt das Ergebnis des *Docking*-Experiments mit Verbindung 58. Hier ist der erste THF-Ring bereits geschlossen und das Substrat enthält nur noch zwei Epoxide. Der Ligand bindet an das aktive Zentrum von MonBII (die Bindungsenergie lag bei -1.34 kcal/mol) und Asp38 bildet eine Wasserstoffbrücke zum 16,17-Epoxid. Die Hydroxygruppe an C13 ist in Richtung des Glu65 orientiert. Aus dieser Konformation heraus wäre eine Deprotonierung des Alkohols möglich, gefolgt von einer 5-*exo*-Cyclisierung.

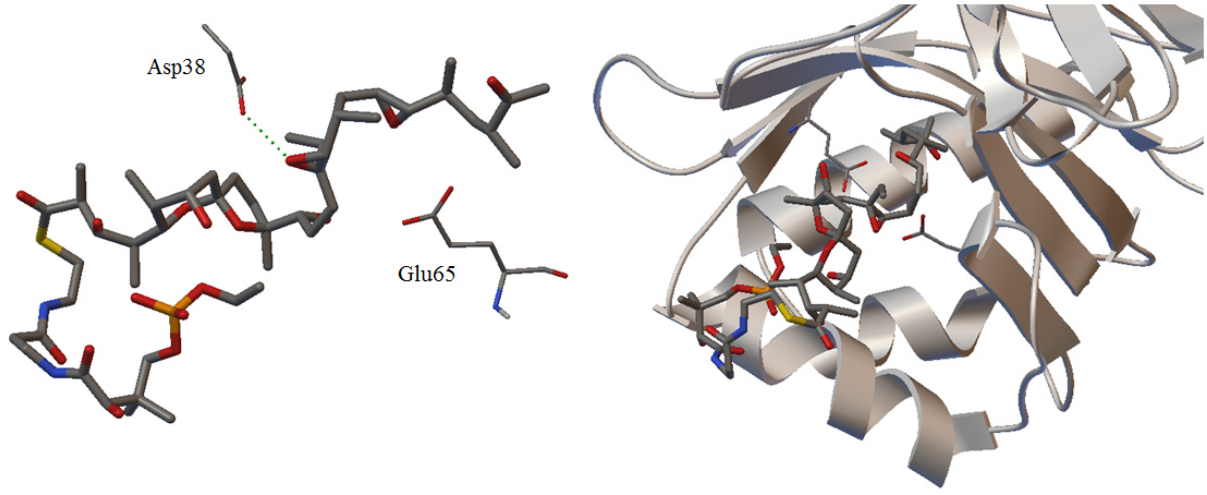


Abbildung 69: Modellierte Bindung des Liganden 58 an die Epoxid Hydrolase MonBII

Bis zu diesem Punkt in der Cyclisierungskaskade konnte mit dem Programm AutoDock4 keine Substratbindung an das aktive Zentrum von MonBI detektiert werden. Das *Docking*-Experiment mit der zweifach cyclisierten Verbindung 59 zeigte eine Bindung des Substrats an das aktive Zentrum von MonBI (siehe Abbildung: 70) mit einem guten Bindungsenergiewert von -4.9 kcal/mol. Aufgrund der

beiden THF-Ringe weist das Substrat bereits Ansätze der „käfigartigen“ Struktur des fertigen Polyethers auf. Wegen dieser Konformation kann es nicht in das Innere des Enzyms hineinragen, zumal die vierte Helix des Proteins vor dem Eingang zum potentiellen aktiven Zentrum eine zusätzliche sterische Hinderung darstellt (siehe 4.2.5.3). Stattdessen liegt der Ligand in geknickter Anordnung auf der Proteinoberfläche. Die Carbonylgruppe an C25 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Arg114 und die Hydroxygruppe an C7 interagiert mit His53. Zwar kann hier keine Interaktion beobachtet werden, die die Hydroxygruppe an C17 aktiviert. Trotzdem wäre ein nucleophiler Rückseitenangriff am 20,21-Epoxid aufgrund der Konformation des Substrats möglich.

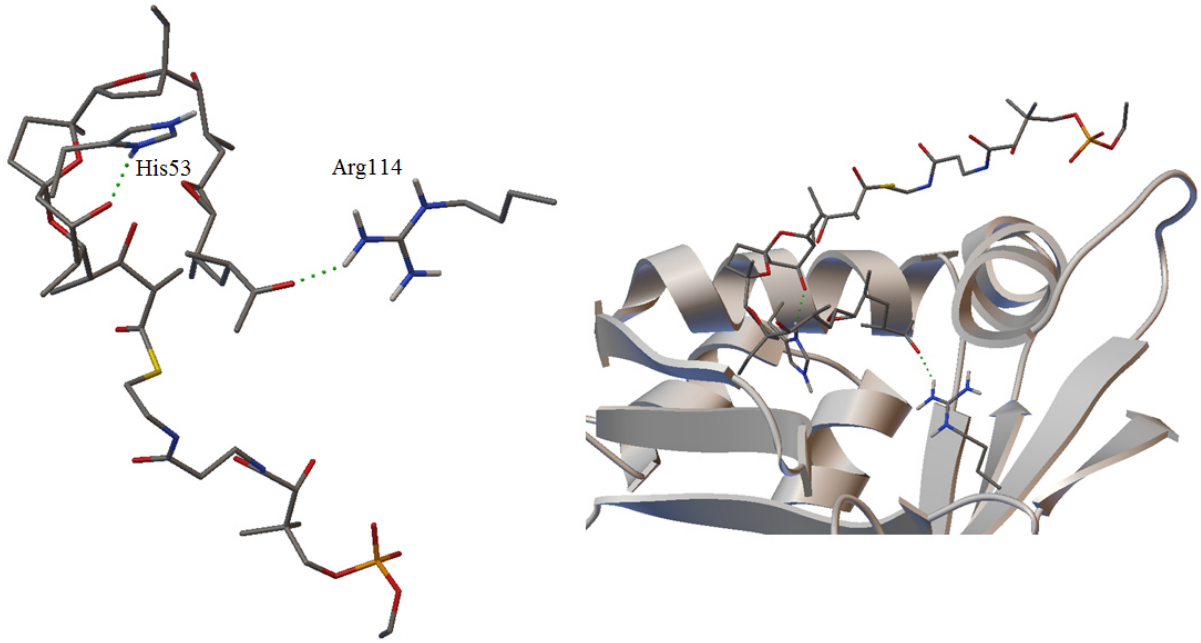


Abbildung: 70 Modellierte Bindung des Liganden 59 an die Epoxid Hydrolase MonBII

Die Ergebnisse des molekularen *Dockings* in Kombination mit den Beobachtungen von Oikawa *et al.* (siehe 4.2.4.1) legen nahe, dass der erste und der zweite THF-Ring in Monensin im aktiven Zentrum der Epoxid-Hydrolase MonBII gebildet werden, während die dritte 5-*exo*-Cyclisierung von der Epoxid-Hydrolase MonBI katalysiert wird. Ob die berechnete Konformation von 59 bei der Bindung an MonBI (siehe Abbildung: 70) tatsächlich der Orientierung während der Ringschlussreaktion entspricht, müsste durch molekulare *Docking*-Experimente mit höherer Rechenleistung und durch Cokristallisationsexperimente überprüft werden.

5 Ausblick

Während die Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII Schritt für Schritt ihre Geheimnisse preisgeben, bleibt der katalytische Mechanismus der Flavin-abhängigen Monooxygenase MonCI weiterhin rätselhaft. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob die Epoxidase tatsächlich in der Lage ist, selektiv zwei (*R,R*)-Epoxide und ein (*S,S*)-Epoxid in das Substrat Premonensin einzuführen. Es wäre natürlich auch denkbar, dass MonCI als unselektive Epoxidase agiert und alle Premonensin-Triepoxid-Diastereomere synthetisiert. In diesem Fall wäre dann die hochselektive Umsetzung des korrekt konfigurierten Premonensin-Triepoxids durch die Epoxid-Hydrolasen notwendig, um zu Monensin zu gelangen.

Möglichkeit 2 ist eine Substratkontrolle: Die Seite, von der die Epoxidierung der Doppelbindung erfolgt, wird durch die Konformation des Substrats im aktiven Zentrum vorgegeben.

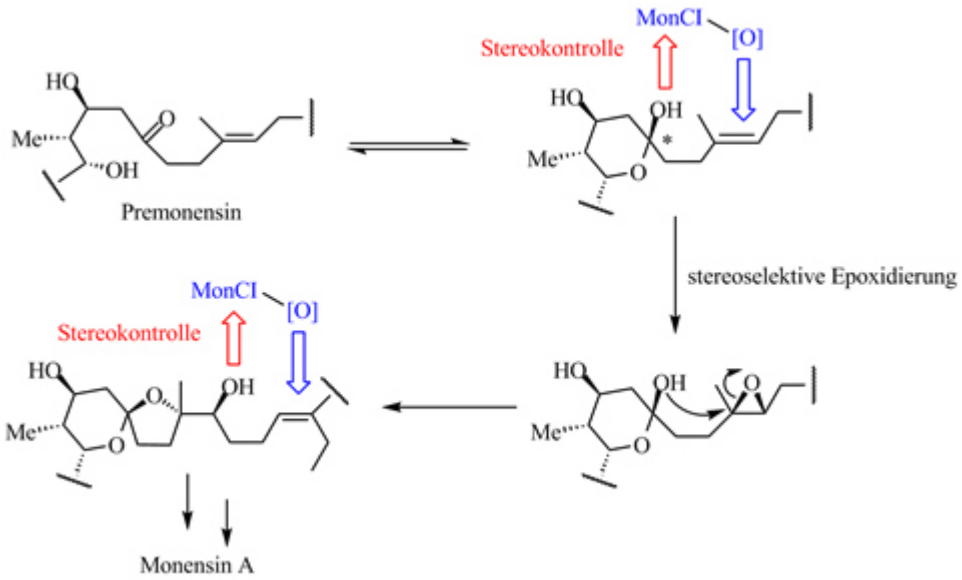
Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für Möglichkeit 2: Da die Hydroxygruppe an C9 essentiell für die Umsetzung des Substrats zu sein scheint (siehe 4.1.5), kann von einer sehr spezifischen Wechselwirkung mit MonCI ausgegangen werden. Vermutlich bildet die Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer Aminosäureseitenkette im Enzym. Auf diese Weise wäre das Substrat dann in einer definierten Konformation im aktiven Zentrum fixiert und die Epoxidierung der C12-C13-Doppelbindung könnte nur von einer Seite erfolgen.

MonCI enthält höchstwahrscheinlich nur ein Flavin-Molekül. Damit die Katalyse stattfinden kann, muss sich das Substrat in unmittelbarer Nähe zum Cofaktor befinden. Für die Epoxidierung von drei Doppelbindungen muss also entweder der Cofaktor wandern oder das Substrat.

Zum einen könnte Premonensin im aktiven Zentrum in einem Halbkreis um den Flavin-Cofaktor angeordnet sein. Dieser könnte dann von einer Doppelbindung zur nächsten wandern und diese von der dem Cofaktor zugewandten Seite epoxidieren.

Zum anderen könnte das Substrat durch das aktive Zentrum des Enzyms hindurchwandern, so wie es das MonCI-Homologiemodell in 4.1.7.2 vermuten lässt. Wenn alle drei Epoxidierungsreaktionen direkt nacheinander erfolgen, so enthielte Premonensin nur eine Hydroxygruppe, die die Anlagerung an das aktive Zentrum vermitteln könnte. Damit wäre die Stereokontrolle nur unzureichend gesichert.

Alternativ bestünde die Möglichkeit, dass nach der Epoxidierung der C12-C13-Doppelbindung zunächst die Cyclisierung des ersten THF-Rings stattfindet (siehe Schema 21). Diese Reaktion könnte im Zentrum von MonBII erfolgen, während der Flavin-Cofaktor reduziert wird. Die Epoxidöffnung würde eine Hydroxygruppe an C13 generieren, die dann wiederum die Anlagerung an das aktive Zentrum für die Epoxidierung der C16-C17-Doppelbindung vermitteln könnte. Nach zwei Epoxidierungs-Cyclisierungs-Runden wäre das Polyetherrückgrat von Monensin fast vollständig aufgebaut. Die Konformation dieser rigiden Struktur würde die Epoxidierung der dritten Doppelbindung kontrollieren.



Schema 21: Enzymatische Katalyse der oxidativen Cyclisierung zu Monensin nach Stark[10]

Der Flavin-Cofaktor der Epoxidase MonCI muss nach jeder Epoxidierung reduziert werden. Dieser Prozess kann entweder durch die Epoxidase selbst katalysiert werden oder ohne Enzymkatalyse erfolgen. Möglich wäre allerdings auch, dass eine externe Flavinreduktase diese Aufgabe übernimmt. Abbildung 71 zeigt einen Ausschnitt aus dem Biosynthesegencluster von Monensin. Das Polyketid-Verlängerungsmodul 12, das die Inkorporation der letzten Propionateinheit katalysiert (siehe 1.1.4), enthält neben dem ACP, der Ketoreduktase (KR) und der Acyltransferase (AT) eine Enoylreduktase (ER) und eine Dehydratase (DH) -Domäne, die jedoch beim Aufbau der Polyketidkette keine Funktion erfüllen. Auch das Modul MonAVI enthält eine nicht-funktionsfähige Ketoreduktase (KR). Es wäre vorstellbar, dass eines dieser drei Gene nicht korrekt annotiert wurde und tatsächlich eine Flavin-Reduktase darstellt.

[10] Unveröffentlichte Ergebnisse

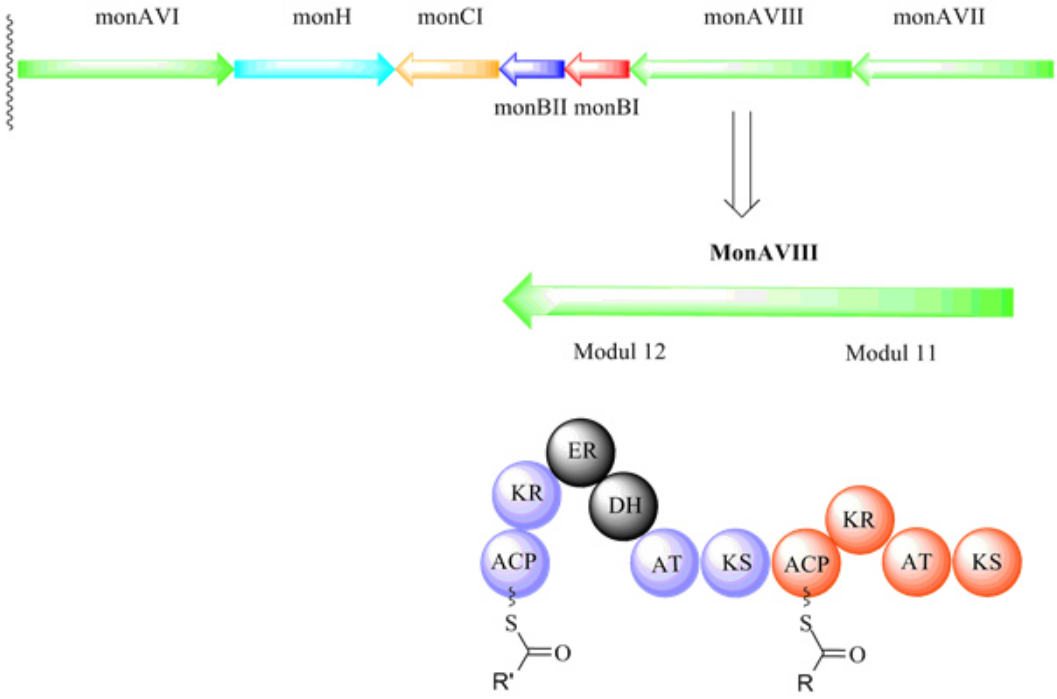


Abbildung 71: Ausschnitt aus dem Monensin-Biosynthesegencluster

Um den Mechanismus der oxidativen Cyclisierung zu Monensin A und anderen Polyetherantibiotika zu verstehen, wird es essentiell sein, die oben erörterten Fragen zu beantworten. Ein vollständiges Verständnis des Monensin-Biosynthesewegs könnte die Herstellung neuer Monensin-Derivate mit verbesserten Eigenschaften ermöglichen. Zum einem könnte die Inkorporation synthetischer Vorstufen während der Monensin-Biosynthese potente neue Derivate produzieren. Dieser Ansatz wird als Mutasynthese bezeichnet[172,173]. Auch die Kombinatorische Biosynthese könnte zum Erfolg führen. Bei diesem Verfahren werden Polyketidsynthase-Module und -Domänen neu kombiniert und unter Umständen auch genetisch modifiziert, sodass sie eine andere Substratspezifität erhalten[2,174].

Die Suche nach neuen Antibiotika muss mit Hochdruck vorangetrieben werden, denn die Medizin benötigt dringend neue Wirkstoffe, um multiresistenten Erreger zu bekämpfen. Zudem muss der nicht indizierte Einsatz von Antibiotika unterbunden werden. Während Kampagnen und Aufklärungsarbeit bereits dafür gesorgt haben, dass die falsche Anwendung von Antibiotika in der Humantherapie in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gerückt ist, wird häufig übersehen, dass auch die Veterinärmedizin von diesem Problem betroffen ist. Monensin und andere Polyetherionophore werden in großem Maßstab in der Nutztierhaltung eingesetzt. So wird Monensin dem Geflügelfutter als Zusatz beigemischt und Milchkühen zur Vorbeugung der Ketose verabreicht. Neben der Suche nach neuen Antibiotika bedarf dieser Aspekt des Antibiotikaeinsatzes sicherlich auch einer kritischen Betrachtung.

6 Zusammenfassung

Das Antibiotikum Monensin A wird vom Actinomyceten *Streptomyces cinnamonensis* produziert und ist einer der wichtigsten und am besten untersuchten Vertreter der großen Naturstoffklasse der Polyetherionophore. Ihre hochkomplexe Struktur und die eleganten Biosynthesewege faszinieren Chemiker und Biologen seit Jahrzehnten.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme untersucht, die die oxidative Cyclisierungskaskade zu Monensin A katalysieren. Diese Transformation überführt das lineare Vorläufer-Trien Premonensin in den biologisch aktiven Naturstoff. Die Reaktionsfolge wird von der Flavin-abhängigen Epoxidase MonCI und von den beiden Epoxid Hydrolasen MonBI und MonBII katalysiert. Alle drei Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* überexprimiert; MonCI wurde zusätzlich in *Streptomyceten* exprimiert. Alle drei Enzyme konnten anschließend zur Homogenität gereinigt werden.

MonCI war nicht korrekt gefaltet wenn es in *E. coli* produziert wurde und zeigte dementsprechend auch keine katalytische Aktivität. Dieses Ergebnis belegte, dass die heterologe Expression in *Streptomyceten* essentiell für die Untersuchung dieses Enzyms war. MonCI zeigte zwar keine katalytische Aktivität im *in-vitro*-Enzymassay, aber die Epoxidierungsaktivität konnte im *Streptomyceten*-Ganzzellassayam Testsubstrat Linalool demonstriert werden.

Zwei Homologiemodelle der Epoxidase MonCI wurden generiert. Als Vorlagen wurden die 2-Methyl-3-Hydroxypyridin-5-Carbonsäure-Oxygenase (MHPCO) und die *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase verwendet. Sequenzvergleiche zeigten, dass die Flavin-Cofaktor-Bindungsstelle in der MHPCO und in MonCI größtenteils konserviert ist.

Die Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII lagen in Lösung als Heterodimer vor. Dies konnte durch Größenausschlusschromatographie, native PAGE, massenspektrometrische Analyse, analytische Ultrazentrifugation und Homologiemodellierungs-Experimente bestätigt werden. Circulardichroismus-Untersuchungen und Thermofluor Assays zeigten, dass die Heterodimerbildung die Faltung von MonBII verbessert.

Das MonBI-MonBII-Heterodimer wurde per *Sitting-Drop*-Methode kristallisiert. Das Reservoir enthielt 31 % Polyethylenglycol 8000 und 0.15 M Citrat pH 6.5. Die Kristalle gehörten zur P 4_32_12 primitiv tetragonalen Raumgruppe mit den Zelldimensionen a = b = 77.814 Å, c = 100.98 Å und $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Die Auflösung lag bei 3.3 Å und die Struktur wurde durch molekularen Ersatz gelöst. Das Heterodimer wies eine Kopf-Schwanz-Orientierung auf und ähnelte somit der Homodimer-Struktur der NTF2-ähnlichen Proteine.

Zur Optimierung der Kristalle wurde ein Fusionskonstrukt der beiden Epoxid-Hydrolasen hergestellt. In diesem Konstrukt bildete MonBII die aminoterminale Domäne und MonBI die carboxyterminale Domäne. Das Konstrukt enthielt außerdem einen aminoterminalen 6xHis-*Tag*, der an einer TEV-Protease-Schnittstelle abgespalten werden konnte.

Molekulare *Docking*-Studien mit möglichen Substraten unterstützten die Hypothese, dass die nukleophilen Öffnungen der 12,13- und 16,17-Epoxide und 5-*exo*-Cyclisierungen im aktiven Zentrum von MonBII stattfinden und dass MonBI die finale Epoxidöffnung und Cyclisierung zum letzten THF-Ring in der Monensin A katalysiert.

7 Summary

Monensin A, produced by the actinomycete *Streptomyces cinnamonensis*, is one of the most important and best studied members of the large family of ionophoric polyether antibiotics. Their highly complex structures and intriguing mechanisms of their biogenesis have fascinated chemists and biologists alike.

This thesis has been concerned with investigating key steps in the biosynthesis of the antibiotic Monensin A. Its polyether skeleton is constructed by an oxidative cyclization cascade which transforms the linear precursor alken premonensin into the biologically active antibiotic.

The enzymatic machinery catalyzing this transformation consists of the flavin-dependent epoxidase MonCI and the two epoxide hydrolases MonBI and MonBII. All three enzymes were heterologously expressed in *E. coli* and in the case of the epoxidase MonCI also in *Streptomyces*. All three enzymes could be purified to homogeneity.

MonCI was not properly folded when heterologously expressed in *E. coli* and therefore displayed no catalytic activity. This proved that heterologous expression in *Streptomyces* hosts was essential for studying this enzyme. Although MonCI showed no catalytic activity in the *in vitro* assay, epoxidation activity was demonstrated in a *Streptomyces* whole-cell assay using the test substrate linalool.

Two homology models of MonCI were generated, using 2-methyl-3-hydroxypyridine-5-carboxylic acid oxygenase (MHPCO) and *para*-hydroxybenzoate-hydroxylase as templates. The binding site for the flavin cofactor seems to be conserved in MHPCO and MonCI.

For MonBI and MonBII gel filtration, native protein gel electrophoresis, analysis by mass spectrometry and analytical ultracentrifugation as well as homology modeling indicated that the two enzymes form a heterodimer in solution. Circular dichroism measurements and thermofluor assays demonstrated that heterodimer formation enhances correct folding of MonBII.

A complex of MonBI and MonBII was crystallized applying the sitting drop method using 31 % polyethylene glycol 8000 and 0.15 M citrate pH 6.5. The crystals belonged to the P 4_32_12 primitive tetragonal space group with cell dimensions a = b = 77.814 Å, c = 100.98 Å and $\alpha = \beta = \gamma = 90°$. Diffraction data were collected to a resolution of 3.3 Å and molecular replacement was used to solve the structure.

The two enzymes form a heterodimer which is oriented in a head-to-tail fashion, resembling the homodimer structure of single-domain NTF2-like proteins.

To optimize the crystals and to obtain an x-ray crystal structure with a higher resolution a fusion construct of the two proteins was produced, where MonBII was the N-terminal domain and MonBI was the C-terminal domain. The construct also contained an N-terminal 6xHis-*Tag*, which could be cleaved via a TEV protease cleavage site.

Docking studies with potential substrates support the hypothesis that MonBII catalyses the first two nucleophilic epoxide opening reactions and subsequent 5-*exo*-cyclizations and MonBI is responsible for catalysis of the final epoxide opening and ring closure in the oxidative cyclization cascade towards the polyether antibiotic Monensin A.

8 Analytik

8.1 Enzymassays mit der Epoxidase MonCI

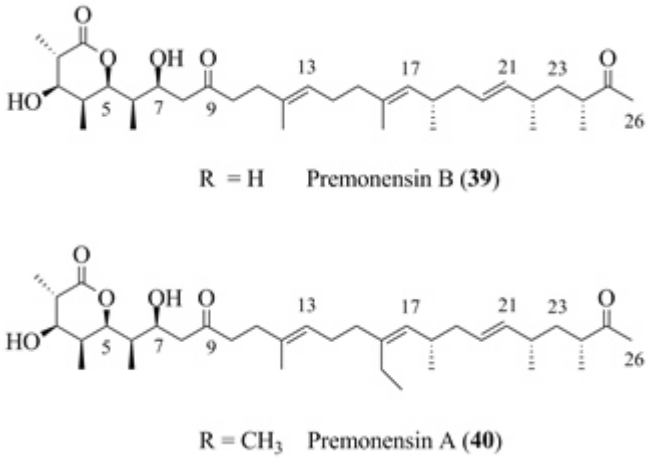
8.1.1 Linalool

Für die Durchführung des Enzymassays siehe 3.3.5

GC-MS: (DB_50_S_ET2O_NEU) *trans*-Linalooloxid (3.66 min): m/z =53.1 (10.4 %); 55.1 (39.1 %); 59.1 (100.0 %, $[C_4H_7]^+$); 68.1 (34.22 %); 94.1 (63.8 %); 111.0 (42.8 %, $[M\text{-}C_3H_6OH]^+$); 137.1 (7.3 %, $M\text{-}O\text{-}OH]^+$); 155.1 (8 %, $[M\text{-}CH_3]^+$). *cis*-Linalooloxid (3.73 min): m/z =53.1 (9.3 %); 55.1 (36.2 %); 59.1 (100.0 %, $[C_4H_7]^+$); 68.1 (34.0 %); 94.1 (64.4 %); 111.0 (37.4 %, $[M\text{-}C_3H_6OH]^+$); 136.1 (14.3 %, $M\text{-}OH\text{-}OH]^+$); 155.1 (16.1 %, $[M\text{-}CH_3]^+$).

Linalool (3.76 min): m/z = 51.0 (4.1 %); 55.1 (55.1 %, $[C_4H_7]^+$); 65.1 (4.9 %; 67.1 (29.1 %); 68.0 (17.6 %); 69.0 (47.1 %); 71.1 (100 %) 80.1 (36.3 %); 83.1 (20.6 %) 93.1 (88.7 %); 94.0 (23.6 %), 109.1 (9.1 %, $[M\text{-}C_2H_2\text{-}H_2O]^+$); 121.1 (34.8 %, $[M\text{-}H_2O\text{-}CH_3]^+$); 136.1 (9.7%, $[M\text{-}H_2O]^+$).

8.1.2 Premonensin A und B



Schema 22: Premonensin A und B

Premonensin B

HPLC-ESI-MS (positiv): (25.9 min) $[M+H]^+$ berechnet: m/z = 561.4173, gefunden: m/z = 561.4158; $[M+NH_4]^+$ berechnet: m/z = 578.4438, gefunden: m/z = 578.4446;

$[M+Na]^+$ berechnet: m/z = 583.3992, gefunden: m/z = 583.4026.

Premonensin B wurde nur in so geringen Mengen isoliert, das nicht genügend Substanz für eine NMR-Analyse vorhanden war.

Premonensin A

HPLC-ESI-MS (positiv): (27.8 min) $[M+H]^+$ berechnet: m/z = 575.4273, gefunden: m/z = 575.4312; $[M+NH_4]^+$ berechnet: m/z = 592.4538, gefunden: m/z = 592.4573;
$[M+Na]^+$ berechnet: m/z = 597.4092, gefunden: m/z = 597.4128; $[M+K]^+$ berechnet: m/z = 613.3832, gefunden: m/z = 613.3904.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 5.34 (dt, *J* =b 14.6, 7.1 Hz, 1H, H-20), 5.20 – 5.09 (m, 2H, H-13/21), 4.86 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-17), 4.26-4.18 (m, 2H, H-5/7), 3.86 (d, *J* = 10.7, 1H, H-3), 2.86 (dd, *J* = 18.0, 9.9 Hz, 1H, H-8a), 2.59 – 2.32 (m, 6H, H-2/4/8b/10/18), 2.27 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-11), 1.79-1.72 (m, 1H, H-6), 1.66-1.56 (m, 4H, H-12‘, H23a), 1.41 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H2‘) ppm.
Die restlichen Signale im Spektrum konnten nicht zugeordnet werden.

8.2 Enzymassays mit den Epoxid-Hydrolasen MonBI und MonBII

Für die Durchführung des Enzymassays siehe 3.3.5

GC-MS: (DB-50_SET2O_NEU) 2,3-Epoxy-2-methyl-heptan-6-ol (**48**) (3.53 min): m/z = 57.1 (10.5 %, [*t*-Bu] $^+$); 59.1 (100.0 %, [*iso*-Prop-OH] $^+$); 71.1 (57.2 %, $[M-C_4H_8OH]^+$); 87.1 (4.0 %); 102.1 (24.4 %); 111.1 (1.4 %, $[C_8H_{16}]^+$); 129.0 (3.8 %, $[M-CH_3]^+$); 144.2 (2.8 %, M^+).
1-Isopropyl-4-methyl-Tetrahydrofuran (**49**) (3.23 min): m/z = 55.1 (10.1 %); 57.1 (22.2 %, [*t*-Bu] $^+$); 59.1 (100 %, $[C_3H_7OH]^+$); 72.1 (6.2 %); 85.1 (78.7 % [THF-Me] $^+$); 86.1 (4.6 %; THF+H-Me] $^+$); 102.1 (35.52 %); 111.1 (1.4 %, $[C_8H_{16}]^+$); 129.0 (3.8 %,$[M-CH_3]^+$); 130.1 (1.1 % $M+H-CH_3]^+$).

9 Literaturverzeichnis

(1) Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48*, 4688.
(2) Weissman, K. J.; Leadlay, P. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925.
(3) Khosla, C. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2577.
(4) Staunton, J.; Weissman, K. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
(5) Clardy, J.; Walsh, C. *Nature* **2004**, *432*, 829.
(6) Hutchinson, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 3336.
(7) Berger, J.; Rachlin, A. I.; Scott, W. E.; Sternbach, L. H.; Goldberg, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5295.
(8) Harned, R. L.; Hidy, P. H.; Corum, C. J.; Jones, K. L. *Antibiot. Chemother.* **1951**, *1*, 594.
(9) Agtarap, A.; Chamberlin, J. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, *7*, 359.
(10) Agtarap, A.; Chamberlin, J. W.; Pinkerton, M.; Steinrauf, L. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5737.
(11) Dutton, C. J.; Banks, B. J.; Cooper, C. B. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 165.
(12) Westley, J. W. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 35.
(13) Westley, J. W.; Evans, R. H.; Sello, L. H.; Troupe, N.; Liu, C.; Miller, P. A. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1981**, *34*, 1248.
(14) Lin, Y.-Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6773.
(15) Ramos, V.; Vasconcelos, V. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2021.
(16) Yokoyama, A.; Murata, M.; Oshima, Y.; Iwashita, T.; Yasumoto, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **1988**, *104*, 184.
(17) Nicolaou, K. C.; Aversa, R. J. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 359.
(18) Huczyński, A.; Janczak, J.; Łowicki, D.; Brzezinski, B. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2012**, *1818*, 2108.
(19) Almeida Paz, F. A.; Gates, P. J.; Fowler, S.; Gallimore, A.; Harvey, B.; Lopes, N. P.; Stark, C. B. W.; Staunton, J.; Klinowski, J.; Spencer, J. B. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online* **2003**, *59*, m1050.
(20) Huczyński, A.; Stefańska, J.; Przybylski, P.; Brzezinski, B.; Bartl, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2585.
(21) Tanaka, R.; Nagatsu, A.; Mizukami, H.; Ogihara, Y.; Sakakibara, J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3005.
(22) Dorkov, P.; Pantcheva, I. N.; Sheldrick, W. S.; Mayer-Figge, H.; Petrova, R.; Mitewa, M. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 26.
(23) Pressman, B. C.; Harris, E. J.; Jagger, W. S.; Johnson, J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, *58*, 1949.
(24) Wang, Z.; Suo, X.; Xia, X.; Shen, J. *J. Parasitol.* **2006**, *92*, 1092.
(25) Couzinet, S.; Dubremetz, J. F.; Buzoni-Gatel, D.; Jeminet, G.; Prensier, G. *Parasitology* **2000**, *121 (Pt 4)*, 359.
(26) Russell, J. B.; Houlihan, A. J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 65.
(27) Haberkorn, A. *Parasitol. Res.* **1996**, *82*, 193.
(28) Lawrence, K. *Vet. Rec.* **1988**, *123*, 323.
(29) Mahmoudi, N.; de Julián-Ortiz, J.-V.; Ciceron, L.; Gálvez, J.; Mazier, D.; Danis, M.; Derouin, F.; García-Domenech, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 489.
(30) Lavine, M. D.; Arrizabalaga, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 745.
(31) Shirley, M. W.; Smith, A. L.; Blake, D. P. *Vaccine* **2007**, *25*, 5540.
(32) Brimble, M. A. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
(33) Potter, E. L.; Van Duyn, R.; Cooley, C. O. *J. Anim. Sci.* **1984**, *58*, 1499.
(34) Chalmers, G. A. *Can. Vet. J.* **1981**, *22*, 21.
(35) Howell, J.; Hanson, J.; Onderka, D.; Harries, W. N. *Avian Dis.* **1980**, *24*, 1050.

(36) T, M. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1976**, *169*, 1098.
(37) Caldeira, C.; Neves, W. S.; Cury, P. M.; Serrano, P.; Baptista, M. A.; Burdmann, E. A. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **2001**, *38*, 1108.
(38) Griffin, T. W.; Pagnini, P. G.; Houston, L. L. *J. Biol. Response Mod.* **1987**, *6*, 537.
(39) Gumila, C.; Ancelin, M. L.; Delort, A. M.; Jeminet, G.; Vial, H. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 523.
(40) Cortes, J.; Haydock, S. F.; Roberts, G. A.; Bevitt, D. J.; Leadlay, P. F. *Nature* **1990**, *348*, 176.
(41) Donadio, S.; Staver, M. J.; McAlpine, J. B.; Swanson, S. J.; Katz, L. *Science* **1991**, *252*, 675.
(42) Callahan, B.; Thattai, M.; Shraiman, B. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 19410.
(43) Nguyen, T.; Ishida, K.; Jenke-Kodama, H.; Dittmann, E.; Gurgui, C.; Hochmuth, T.; Taudien, S.; Platzer, M.; Hertweck, C.; Piel, J. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 225.
(44) Minowa, Y.; Araki, M.; Kanehisa, M. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 1500.
(45) Harvey, B. M.; Hong, H.; Jones, M. A.; Hughes-Thomas, Z. A.; Goss, R. M.; Heathcote, M. L.; Bolanos-Garcia, V. M.; Kroutil, W.; Staunton, J.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2006**, *7*, 1435.
(46) Oliynyk, M.; Stark, C. B. W.; Bhatt, A.; Jones, M. A.; Hughes-Thomas, Z. A.; Wilkinson, C.; Oliynyk, Z.; Demydchuk, Y.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 1179.
(47) Day, L. E.; Chamberlin, J. W.; Gordee, E. Z.; Chen, S.; Gorman, M.; Hamill, R. L.; Ness, T.; Weeks, R. E.; Stroshane, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 410.
(48) Bisang, C.; Long, P. F.; Cortés, J.; Westcott, J.; Crosby, J.; Matharu, A. L.; Cox, R. J.; Simpson, T. J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Nature* **1999**, *401*, 502.
(49) Cane, D. E.; Walsh, C. T.; Khosla, C. *Science* **1998**, *282*, 63.
(50) Bhatt, A.; Stark, C. B. W.; Harvey, B. M.; Gallimore, A. R.; Demydchuk, Y. A.; Spencer, J. B.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2005**, *44*, 7075.
(51) Hüttel, W.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 361.
(52) Cane, D. E.; Liang, T.-C.; Hasler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5962.
(53) Cane, D. E.; Liang, T. C.; Hasler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7274.
(54) Ajaz, A. A.; Robinson, J. A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 679.
(55) Cane, D. E.; Celmer, W. D.; Westley, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3594.
(56) Holmes, D. S.; Sherringham, J. A.; Dyer, U. C.; Russell, S. T.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 239.
(57) Townsend, C. A.; Basak, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2591.
(58) Leadlay, P. F.; Staunton, J.; Oliynyk, M.; Bisang, C.; Cortés, J.; Frost, E.; Hughes-Thomas, Z. A.; Jones, M. A.; Kendrew, S. G.; Lester, J. B.; Long, P. F.; McArthur, H. A.; McCormick, E. L.; Oliynyk, Z.; Stark, C. B. W.; Wilkinson, C. J. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 360.
(59) Sun, Y.; Zhou, X.; Dong, H.; Tu, G.; Wang, M.; Wang, B.; Deng, Z. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 431.
(60) Harvey, B. M.; Mironenko, T.; Sun, Y.; Hong, H.; Deng, Z.; Leadlay, P. F.; Weissman, K. J.; Haydock, S. F. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 703.
(61) Demydchuk, Y.; Sun, Y.; Hong, H.; Staunton, J.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2008**, *9*, 1136.
(62) Migita, A.; Watanabe, M.; Hirose, Y.; Watanabe, K.; Tokiwano, T.; Kinashi, H.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 169.
(63) Smith, L.; Hong, H.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2008**, *9*, 2967.
(64) Gallimore, A. R.; Stark, C. B. W.; Bhatt, A.; Harvey, B. M.; Demydchuk, Y.; Bolanos-Garcia, V.; Fowler, D. J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 453.
(65) Liu, T.; Cane, D. E.; Deng, Z. *Methods Enzymol.* **2009**, *459*, 187.
(66) Zafra-Polo, C.; Figadère, B.; Gallardo, T.; Tormo, J. R.; Cortes, D. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1087.
(67) Gleye, C.; Duret, P.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 576.
(68) Myint, S. H.; Cortes, D.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Lebęuf, M.; Cavé, A.; Cotte, J.; Quéro, A.-M. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3335.
(69) Hu, Y.; Cecil, A. R. L.; Frank, X.; Gleye, C.; Figadère, B.; Brown, R. C. D. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1217.

(70) Sahpaz, S.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Saez, J.; Cortes, D. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 199.
(71) Hisham, A.; Sreekala, U.; Pieters, L.; Bruyne, T. D.; Van den Heuvel, H.; Claeys, M. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6913.
(72) Gallimore, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 266.
(73) Gallimore, A. R.; Spencer, J. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4406.
(74) Nicolaou, K. C.; Frederick, M. O.; Aversa, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47*, 7182.
(75) Shimizu, Y.; Chou, H. N.; Bando, H.; Van Duyne, G.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 514.
(76) Nakanishi, K. *Toxicon* **1985**, *23*, 473.
(77) Chou, H. N.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2184.
(78) Baldwin, J. E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1976**, 734.
(79) Morten, C. J.; Byers, J. A.; Van Dyke, A. R.; Vilotijevic, I.; Jamison, T. F. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3175.
(80) Vilotijevic, I.; Jamison, T. F. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 763.
(81) Vilotijevic, I.; Jamison, T. F. *Science* **2007**, *317*, 1189.
(82) Jiang, C.; Wang, H.; Kang, Q.; Liu, J.; Bai, L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 994.
(83) Huijbers, M. M. E.; Montersino, S.; Westphal, A. H.; Tischler, D.; van Berkel, W. J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *544*, 2.
(84) Tsuge, H.; Mitsuda, H. *J. Biochem. (Tokyo)* **1973**, *73*, 199.
(85) Ceccoli, R. D.; Bianchi, D. A.; Rial, D. V. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 25.
(86) Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459.
(87) Ghisla, S.; Massey, V. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1989**, *181*, 1.
(88) Van Berkel, W. J. H.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670.
(89) Entsch, B.; van Berkel, W. J. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1995**, *9*, 476.
(90) Tischler, D.; Schlömann, M.; van Berkel, W. J. H.; Gassner, G. T. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3848.
(91) Minami, A.; Shimaya, M.; Suzuki, G.; Migita, A.; Shinde, S. S.; Sato, K.; Watanabe, K.; Tamura, T.; Oguri, H.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246.
(92) Otto, K.; Hofstetter, K.; Röthlisberger, M.; Witholt, B.; Schmid, A. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5292.
(93) Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. G.; Witholt, B.; Schmid, A. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 33.
(94) Suárez, M.; Martín, M.; Ferrer, E.; Garrido-Pertierra, A. *Arch. Microbiol.* **1995**, *164*, 70.
(95) Schreuder, H. A.; Prick, P. A. J.; Wierenga, R. K.; Vriend, G.; Wilson, K. S.; Hol, W. G. J.; Drenth, J. *J. Mol. Biol.* **1989**, *208*, 679.
(96) Brender, J. R.; Dertouzos, J.; Ballou, D. P.; Massey, V.; Palfey, B. A.; Entsch, B.; Steel, D. G.; Gafni, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18171.
(97) Ashworth, D. M.; Holmes, D. S.; Robinson, J. A.; Oikawa, H.; Cane, D. E. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1989**, *42*, 1088.
(98) Arand, M.; Hallberg, B. M.; Zou, J.; Bergfors, T.; Oesch, F.; van der Werf, M. J.; de Bont, J. A. M.; Jones, T. A.; Mowbray, S. L. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2583.
(99) Van der Werf, M. J.; Swarts, H. J.; de Bont, J. A. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2092.
(100) Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W695.
(101) McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y. M.; Buso, N.; Cowley, A. P.; Lopez, R. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W597.
(102) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947.
(103) Hotta, K.; Chen, X.; Paton, R. S.; Minami, A.; Li, H.; Swaminathan, K.; Mathews, I. I.; Watanabe, K.; Oikawa, H.; Houk, K. N.; Kim, C.-Y. *Nature* **2012**, *483*, 355.
(104) Matsuura, Y.; Shichijo, Y.; Minami, A.; Migita, A.; Oguri, H.; Watanabe, M.; Tokiwano, T.; Watanabe, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2226.
(105) Minami, A.; Migita, A.; Inada, D.; Hotta, K.; Watanabe, K.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1638.
(106) O'Hagan, D.; Schmidberger, J. W. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 900.

(107) Nardini, M.; Rink, R.; Janssen, D. B.; Dijkstra, B. W. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11*, 1035.
(108) Nardini, M.; Ridder, I. S.; Rozeboom, H. J.; Kalk, K. H.; Rink, R.; Janssen, D. B.; Dijkstra, B. W. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14579.
(109) Kapust, R. B.; Tözsér, J.; Fox, J. D.; Anderson, D. E.; Cherry, S.; Copeland, T. D.; Waugh, D. S. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 993.
(110) Ligation Calculator.
(111) Consortium, T. U. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D191.
(112) *The Proteomics Protocols Handbook*.
(113) Boivin, S.; Kozak, S.; Meijers, R. *Protein Expr. Purif.* **2013**, *91*, 192.
(114) Kabsch, W. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125.
(115) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235.
(116) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486.
(117) Vagin, A. A.; Steiner, R. A.; Lebedev, A. A.; Potterton, L.; McNicholas, S.; Long, F.; Murshudov, G. N. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2184.
(118) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605.
(119) Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725.
(120) Zhang, Y. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 40.
(121) Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195.
(122) Bordoli, L.; Kiefer, F.; Arnold, K.; Benkert, P.; Battey, J.; Schwede, T. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1.
(123) Pieper, U.; Eswar, N.; Davis, F. P.; Braberg, H.; Madhusudhan, M. S.; Rossi, A.; Marti-Renom, M.; Karchin, R.; Webb, B. M.; Eramian, D.; Shen, M.-Y.; Kelly, L.; Melo, F.; Sali, A. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D291.
(124) Zhang, J.; Madden, T. L. *Genome Res.* **1997**, *7*, 649.
(125) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403.
(126) Söding, J. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 951.
(127) Soding, J.; Biegert, A.; Lupas, A. N. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W244.
(128) Eswar, N.; Webb, B.; Marti-Renom, M. A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, D.; Shen, M.-Y.; Pieper, U.; Sali, A. *Curr. Protoc. Protein Sci. Editor. Board John E Coligan Al* **2007**, *Chapter 2*, Unit 2.9.
(129) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785.
(130) Morris, G. M.; Huey, R.; Olson, A. J. *Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis Al* **2008**, *Chapter 8*, Unit 8.14.
(131) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668.
(132) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.
(133) Hartl, F. U. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1206.
(134) Martin, J.; Hartl, F. U. *Structure* **1993**, *1*, 161.
(135) Kapust, R. B.; Waugh, D. S. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1999**, *8*, 1668.
(136) Puigbò, P.; Bravo, I. G.; Garcia-Vallvé, S. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 65.
(137) Mazodier, P.; Petter, R.; Thompson, C. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3583.
(138) Trieu-Cuot, P.; Carlier, C.; Courvalin, P. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 4388.
(139) Thompson, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **1986**, *18 Suppl C*, 13.
(140) Paget, M. S. B.; Chamberlin, L.; Atrih, A.; Foster, S. J.; Buttner, M. J. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 204.
(141) Travers, K. J.; Patil, C. K.; Wodicka, L.; Lockhart, D. J.; Weissman, J. S.; Walter, P. *Cell* **2000**, *101*, 249.
(142) Campbell, Z. T.; Baldwin, T. O. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 8322.
(143) Spyrou, G.; Haggård-Ljungquist, E.; Krook, M.; Jörnvall, H.; Nilsson, E.; Reichard, P. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3673.

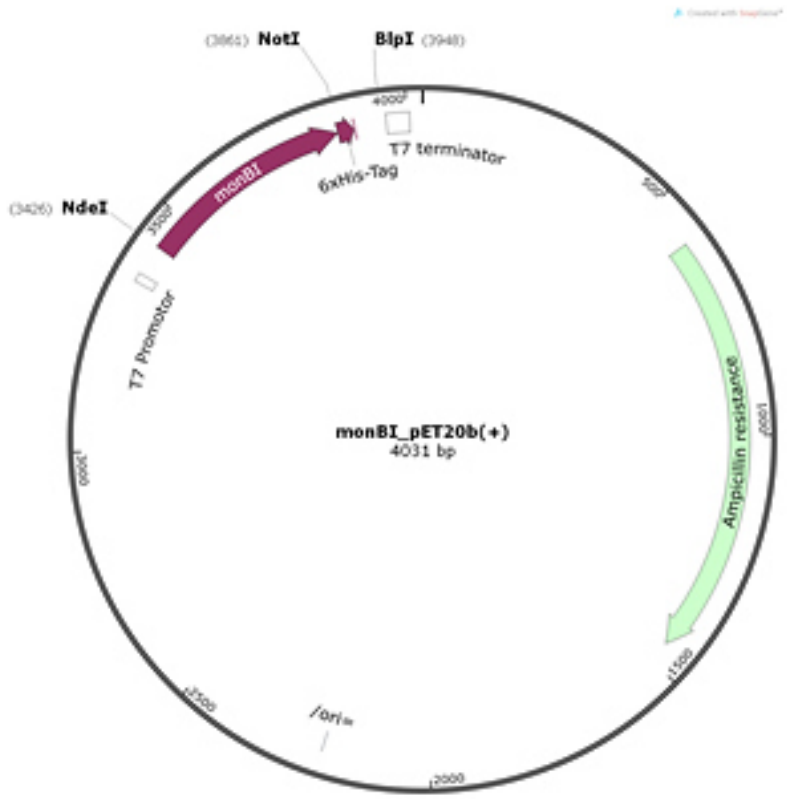
(144) Nijvipakul, S.; Wongratana, J.; Suadee, C.; Entsch, B.; Ballou, D. P.; Chaiyen, P. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1531.
(145) Ballou, D. P.; Entsch, B.; Cole, L. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 590.
(146) Xun, L.; Sandvik, E. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 481.
(147) Tan, T. C.; Spadiut, O.; Wongnate, T.; Sucharitakul, J.; Krondorfer, I.; Sygmund, C.; Haltrich, D.; Chaiyen, P.; Peterbauer, C. K.; Divne, C. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53567.
(148) Holliday, G. L.; Andreini, C.; Fischer, J. D.; Rahman, S. A.; Almonacid, D. E.; Williams, S. T.; Pearson, W. R. *Nucleic Acids Res.* **2011**, gkr799.
(149) Sander, C.; Schneider, R. *Proteins* **1991**, *9*, 56.
(150) Du, H.; Brender, J. R.; Zhang, J.; Zhang, Y. *Methods San Diego Calif* **2014**.
(151) McCulloch, K. M.; Mukherjee, T.; Begley, T. P.; Ealick, S. E. *Biochemistry (Mosc.)* **2009**, *48*, 4139.
(152) Chaiyen, P.; Brissette, P.; Ballou, D. P.; Massey, V. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36*, 13856.
(153) Grossman, T. H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R.; Osburne, M. S. *Gene* **1998**, *209*, 95.
(154) Greenfield, N. J. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876.
(155) Sreerama, N.; Woody, R. W. *Methods Enzymol.* **2004**, *383*, 318.
(156) Holzwarth, G.; Doty, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 218.
(157) Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry (Mosc.)* **1969**, *8*, 4108.
(158) Venyaminov SYu, null; Baikalov, I. A.; Shen, Z. M.; Wu, C. S.; Yang, J. T. *Anal. Biochem.* **1993**, *214*, 17.
(159) Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 429.
(160) Ericsson, U. B.; Hallberg, B. M.; DeTitta, G. T.; Dekker, N.; Nordlund, P. *Anal. Biochem.* **2006**, *357*, 289.
(161) Sato, K.; Minami, A.; Ose, T.; Oguri, H.; Oikawa, H. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5277.
(162) Minami, A.; Ose, T.; Sato, K.; Oikawa, A.; Kuroki, K.; Maenaka, K.; Oguri, H.; Oikawa, H. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 562.
(163) Vedadi, M.; Niesen, F. H.; Allali-Hassani, A.; Fedorov, O. Y.; Finerty, P. J.; Wasney, G. A.; Yeung, R.; Arrowsmith, C.; Ball, L. J.; Berglund, H.; Hui, R.; Marsden, B. D.; Nordlund, P.; Sundstrom, M.; Weigelt, J.; Edwards, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 15835.
(164) Bagautdinov, B.; Kunishima, N. *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 424.
(165) Gan, J.; Wu, Y.; Prabakaran, P.; Gu, Y.; Li, Y.; Andrykovitch, M.; Liu, H.; Gong, Y.; Yan, H.; Ji, X. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46*, 9513.
(166) Singh, S. A.; Christendat, D. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45*, 7787.
(167) Singh, S. A.; Christendat, D. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2153.
(168) Eberhardt, R. Y.; Chang, Y.; Bateman, A.; Murzin, A. G.; Axelrod, H. L.; Hwang, W. C.; Aravind, L. *BMC Bioinformatics* **2013**, *14*, 327.
(169) Sultana, A.; Kallio, P.; Jansson, A.; Wang, J.-S.; Niemi, J.; Mantsala, P.; Schneider, G. *EMBO J.* **2004**, *23*, 1911.
(170) Holm, L.; Rosenström, P. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W545.
(171) Taylor, G. L. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 325.
(172) Kennedy, J. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25.
(173) Weissman, K. J. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 139.
(174) Menzella, H. G.; Reeves, C. D. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 238.
(175) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Humana Press, 2005; pp. 571–607.

10 Anhang

10.1.1 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonBI-Konstrukte

Die Informationen zu den einzelnen Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ProtParam generiert[175].

10.1.1.1 Plasmid: monBI_pET20b(+)




```
        10         20         30         40         50         60
MNEFARKKRA LEHSRRINAG DLDAIIDLYA PDAVLEDPVG LPPVTGHDAL RAHYEPLLAA

        70         80         90        100        110        120
HLREEAAEPV AGQDATHALI QISSVMDYLP VGPLYAERGW LKAPDAPGTA RIHRTAMLVI

       130        140        150
RMDASGLIRH LKSYWGTSDL TVLGAAALEH HHHHH
```

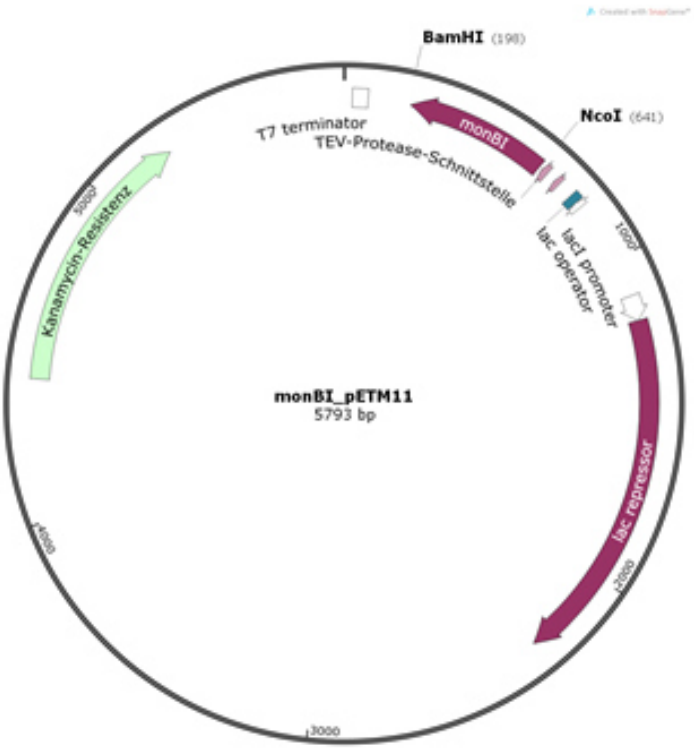
Number of amino acids: 155
Molecular weight: 17029.3
Theoretical pI: 6.20

Ala (A)	24	15.5%	Met (M)	4	2.6%
Arg (R)	11	7.1%	Phe (F)	1	0.6%
Asn (N)	2	1.3%	Pro (P)	10	6.5%
Asp (D)	11	7.1%	Ser (S)	6	3.9%
Cys (C)	0	0.0%	Thr (T)	6	3.9%
Gln (Q)	2	1.3%	Trp (W)	2	1.3%
Glu (E)	9	5.8%	Tyr (Y)	5	3.2%
Gly (G)	10	6.5%	Val (V)	8	5.2%
His (H)	13	8.4%	Pyl (O)	0	0.0%
Ile (I)	8	5.2%	Sec (U)	0	0.0%
Leu (L)	19	12.3%			
Lys (K)	4	2.6%			

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 20
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 15

Formula: $C_{757}H_{1190}N_{224}O_{217}S_4$
Total number of atoms: 2392
Extinction coefficients:
Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 18450
Abs 0.1% (=1 g/l) 1.083
Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is M (Met).
The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 39.38
This classifies the protein as stable.
Aliphatic index: 98.39
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.210

10.1.1.2 Plasmid: monBI_pETM11



HHHHHHPMSD YDIPTTENLY FQGAMGMNEF ARKKRALEHS RRINAGDLDA IIDLYAPDAV

70 80 90 100 110 120
LEDPVGLPPV TGHDALRAHY EPLLAAHLRE EAAEPVAGQD ATHALIQISS VMDYLPVGPL

130 140 150 160 170
YAERGWLKAP DAPGTARIHR TAMLVIRMDA SGLIRHLKSY WGTSDLTVLG

Number of amino acids: 170
Molecular weight: 18806.3
Theoretical pI: 5.97

Ala (A)	22	12.9%	Lys (K)	4	2.4%
Arg (R)	11	6.5%	Met (M)	6	3.5%
Asn (N)	3	1.8%	Phe (F)	2	1.2%
Asp (D)	13	7.6%	Pro (P)	12	7.1%
Cys (C)	0	0.0%	Ser (S)	7	4.1%
Gln (Q)	3	1.8%	Thr (T)	8	4.7%
Glu (E)	9	5.3%	Trp (W)	2	1.2%
Gly (G)	12	7.1%	Tyr (Y)	7	4.1%
His (H)	13	7.6%	Val (V)	8	4.7%
Ile (I)	9	5.3%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	19	11.2%	Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 22
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 15

Formula: $C_{836}H_{1299}N_{241}O_{243}S_6$
Total number of atoms: 2625

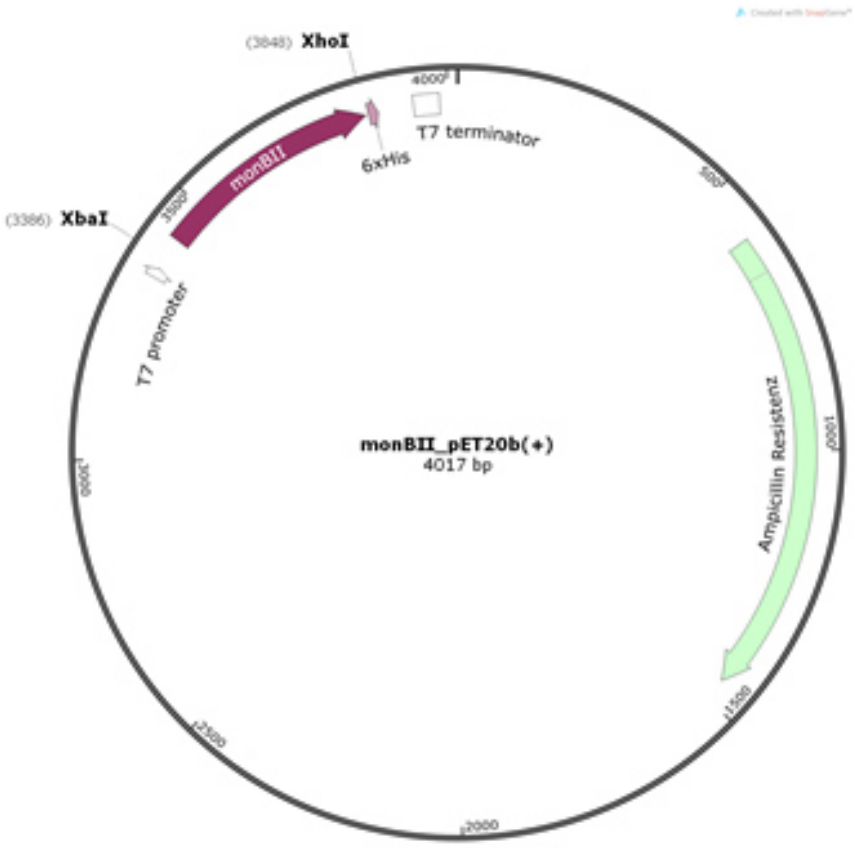
Extinction coefficients:
Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 21430
Abs 0.1% (=1 g/l) 1.140
Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is H (His).
The estimated half-life is: 3.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
10 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 41.56
This classifies the protein as unstable.
Aliphatic index: 90.82

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.282

10.1.2 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonBII-Konstrukte

10.1.2.1 Plasmid: monBII_pET20b(+)




```
        10         20         30         40         50         60
MPDEAARKQM AVDYAERINA GDIEGVLDLF TDDIVFEDPV GRPPMVGKDD LRRHLELAVS

        70         80         90        100        110        120
CGTHEVPDPP MTSMDDRFVV TPTTVTVQRP RPMTFRIVGI VELDEHGLGR RVQAFWGVTD

       130        140
VTMDDPAGPA DTTHPEGIRA LEHHHHHH
```

Number of amino acids: 148
Molecular weight: 16531.5
Theoretical pI: 5.00

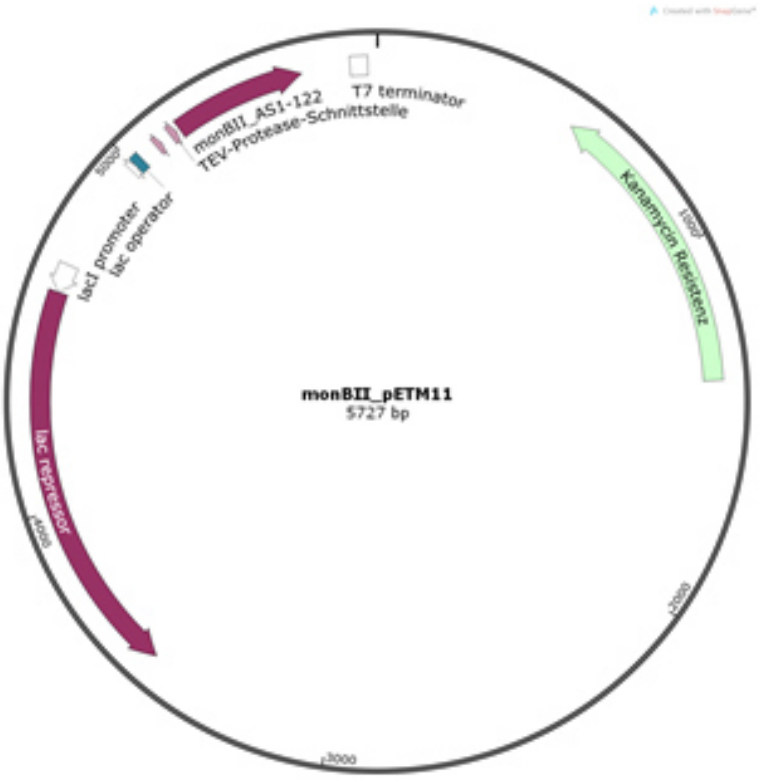
Ala (A)	10	6.8%	Lys (K)	2	1.4%
Arg (R)	12	8.1%	Met (M)	7	4.7%
Asn (N)	1	0.7%	Phe (F)	5	3.4%
Asp (D)	17	11.5%	Pro (P)	13	8.8%
Cys (C)	1	0.7%	Ser (S)	2	1.4%
Gln (Q)	3	2.0%	Thr (T)	12	8.1%
Glu (E)	10	6.8%	Trp (W)	1	0.7%
Gly (G)	11	7.4%	Tyr (Y)	1	0.7%
His (H)	10	6.8%	Val (V)	16	10.8%
Ile (I)	6	4.1%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	8	5.4%	Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 27
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 14

Atomic composition:
Formula: $C_{719}H_{1123}N_{211}O_{222}S_8$
Total number of atoms: 2283
Extinction coefficients:
Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 6990
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.423, assuming all pairs of Cys residues form cystines
Ext. coefficient 6990
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.423, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is M (Met).
The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 30.27
This classifies the protein as stable.
Aliphatic index: 75.00
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.455

10.1.2.2 Plasmid: monBII_pETM11




```
        10         20         30         40         50         60
HHHHHHPMSD YDIPTTENLY FQGAMSMPDE AARKQMAVDY AERINAGDIE GVLDLFTDDI

        70         80         90        100        110        120
VFEDPVGRPP MVGKDDLRRH LELAVSCGTH EVPDPPMTSM DDRFVVTPTT VTVQRPRPMT

       130        140
FRIVGIVELD EHGLGRRVQA FWGVTDVT
```

Number of amino acids: 148
Molecular weight: 16718.8
Theoretical pI: 4.97

Ala (A)	8	5.4%	Lys (K)	2	1.4%
Arg (R)	11	7.4%	Met (M)	8	5.4%
Asn (N)	2	1.4%	Phe (F)	6	4.1%
Asp (D)	16	10.8%	Pro (P)	12	8.1%
Cys (C)	1	0.7%	Ser (S)	4	2.7%
Gln (Q)	4	2.7%	Thr (T)	12	8.1%
Glu (E)	9	6.1%	Trp (W)	1	0.7%
Gly (G)	10	6.8%	Tyr (Y)	3	2.0%
His (H)	9	6.1%	Val (V)	16	10.8%
Ile (I)	6	4.1%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	8	5.4%	Sec (U)	0	0.0%

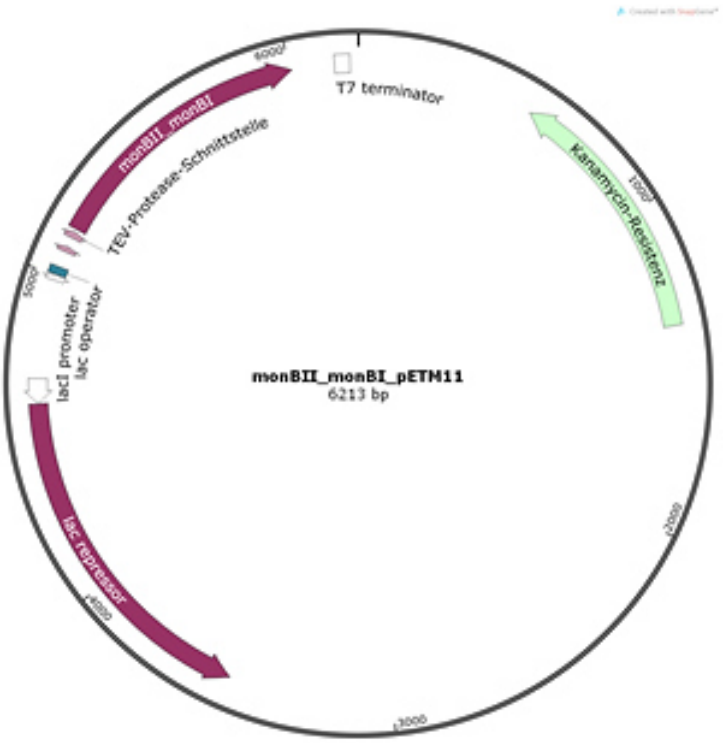
Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 25
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 13
Formula: $C_{732}H_{1132}N_{208}O_{224}S_9$
Total number of atoms: 2305
Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 9970
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.596, assuming all pairs of Cys residues form cystines
Ext. coefficient 9970
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.596, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is H (His).
The estimated half-life is: 3.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
10 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 36.72
This classifies the protein as stable.
Aliphatic index: 73.65
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.410

10.1.3 Plasmid und Aminosäuresequenz des MonBI-MonBII-Fusionskonstrukts

10.1.3.1 Plasmid: monBII_monBI_pETM11




```
        10         20         30         40         50         60
HHHHHHPMSD YDIPTTENLY FQGAMSMPDE AARKQMAVDY AERINAGDIE GVLDLFTDDI

        70         80         90        100        110        120
VFEDPVGRPP MVGKDDLRRH LELAVSCGTH EVPDPPMTSM DDRFVVTPTT VTVQRPRPMT

       130        140        150        160        170        180
FRIVGIVELD EHGLGRRVQA FWGVTDVTMD DPAGPADTTH PEGIRAMNEF ARKKRALEHS

       190        200        210        220        230        240
RRINAGDLDA IIDLYAPDAV LEDPVGLPPV TGHDALRAHY EPLLAAHLRE EAAEPVAGQD

       250        260        270        280        290        300
ATHALIQISS VMDYLPVGPL YAERGWLKAP DAPGTARIHR TAMLVIRMDA SGLIRHLKSY

       310
WGTSDLTVLG
```

Number of amino acids: 310
Molecular weight: 34284.8
Theoretical pI: 5.22

Ala (A)	32	10.3%	Lys (K)	6	1.9%
Arg (R)	23	7.4%	Met (M)	13	4.2%
Asn (N)	4	1.3%	Phe (F)	7	2.3%
Asp (D)	30	9.7%	Pro (P)	25	8.1%
Cys (C)	1	0.3%	Ser (S)	10	3.2%
Gln (Q)	6	1.9%	Thr (T)	20	6.5%
Glu (E)	18	5.8%	Trp (W)	3	1.0%
Gly (G)	22	7.1%	Tyr (Y)	8	2.6%
His (H)	17	5.5%	Val (V)	24	7.7%
Ile (I)	15	4.8%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	26	8.4%	Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 48
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 29

Formula: $C_{1509}H_{2362}N_{432}O_{455}S_{14}$
Total number of atoms: 4772

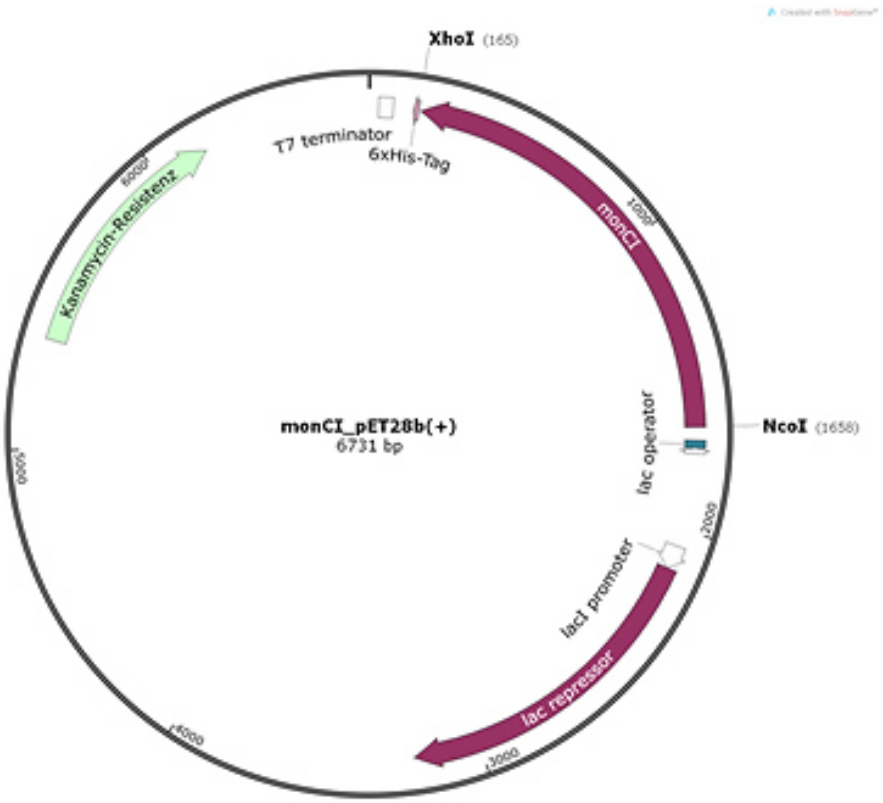
Extinction coefficients:
Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 28420
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.829, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 28420
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.829, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is H (His).
The estimated half-life is: 3.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
10 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 38.68
This classifies the protein as stable.
Aliphatic index: 84.35
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.312

10.1.4 Plasmide und Aminosäuresequenzen der MonCI-Konstrukte

10.1.4.1 Plasmid: monCI_pET28b(+)




```
        10         20         30         40         50         60
MVTTTRPAHA VVLGASMAGT LAAHVLARHV DAVTVVERDA LPEEPQHRKG VPQARHAHLL

        70         80         90        100        110        120
WSNGARLIEE MLPGTTDRLL AAGARRLGFP EDLVTLTGQG WQHRFPATQF ALVASRPLLD

       130        140        150        160        170        180
LTVRQQALGA DNITVRQRTE AVELTGSGGG SGGRVTGVVV RDLDSGRQEQ LEADLVIDAT

       190        200        210        220        230        240
GRGSRLKQWL AALGVPALEE DVVDAGVAYA TRLFKAPPGA TTHFPAVNIA ADDRVREPGR

       250        260        270        280        290        300
FGVVYPIEGG RWLATLSCTR GAQLPTHEDE FIPFAENLNH PILADLLRDA EPLTPVFGSR

       310        320        330        340        350        360
SGANRRLYPE RLEQWPDGLL VIGDSLTAFN PIYGHGMSSA ARCATTIDRE FERSVQEGTG

       370        380        390        400        410        420
SARAGTRALQ KAIGAAVDDP WILAATKDID YVNCRVSATD PRLIGVDTEQ RLRFAEAITA

       430        440        450        460        470        480
ASIRSPKASE IVTDVMSLNA PQAELGSNRF LMAMRADERL PELTAPPFLP EELAVVGLDA

       490        500
ATISPTPTPT PTAAVRSLEH HHHHH
```

Number of amino acids: 505
Molecular weight: 54321.4

Theoretical pI: 5.88

Ala (A)	68	13.5%	Lys (K)	6	1.2%
Arg (R)	44	8.7%	Met (M)	7	1.4%
Asn (N)	10	2.0%	Phe (F)	14	2.8%
Asp (D)	29	5.7%	Pro (P)	34	6.7%
Cys (C)	3	0.6%	Ser (S)	23	4.6%
Gln (Q)	17	3.4%	Thr (T)	39	7.7%
Glu (E)	32	6.3%	Trp (W)	6	1.2%
Gly (G)	41	8.1%	Tyr (Y)	5	1.0%
His (H)	17	3.4%	Val (V)	39	7.7%
Ile (I)	18	3.6%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	53	10.5%	Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 61
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 50

Formula: $C_{2386}H_{3816}N_{710}O_{722}S_{10}$
Total number of atoms: 7644

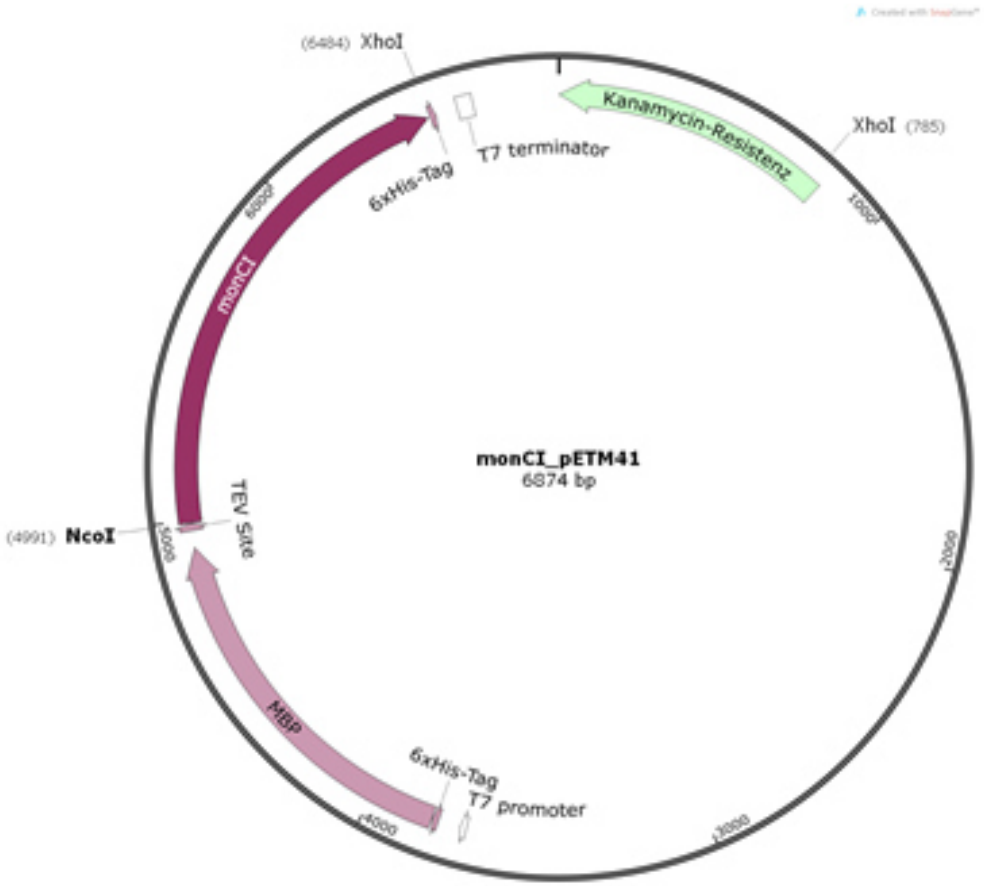
Extinction coefficients:
Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.
Ext. coefficient 40575
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.747, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 40450
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.745, assuming all Cys residues are reduced
Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 45.79
This classifies the protein as unstable.
Aliphatic index: 90.69
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.166

10.1.4.2 monCI_pETM41




```
        10         20         30         40         50         60
HHHHHHMKIE EGKLVIWING DKGYNGLAEV GKKFEKDTGI KVTVEHPDKL EEKFPQVAAT

        70         80         90        100        110        120
GDGPDIIFWA HDRFGGYAQS GLLAEITPDK AFQDKLYPFT WDAVRYNGKL IAYPIAVEAL

       130        140        150        160        170        180
SLIYNKDLLP NPPKTWEEIP ALDKELKAKG KSALMFNLQE PYFTWPLIAA DGGYAFKYEN

       190        200        210        220        230        240
GKYDIKDVGV DNAGAKAGLT FLVDLIKNKH MNADTDYSIA EAAFNKGETA MTINGPWAWS

       250        260        270        280        290        300
NIDTSKVNYG VTVLPTFKGQ PSKPFVGVLS AGINAASPNK ELAKEFLENY LLTDEGLEAV

       310        320        330        340        350        360
NKDKPLGAVA LKSYEEELAK DPRIAATMEN AQKGEIMPNI PQMSAFWYAV RTAVINAASG

       370        380        390        400        410        420
RQTVDEALKD AQTNSSSNNN NNNNNNPMSE NLYFQGAMVT TTRPAHAVVL GASMAGTLAA

       430        440        450        460        470        480
HVLARHVDAV TVVERDALPE EPQHRKGVPQ ARHAHLLWSN GARLIEEMLP GTTDRLLAAG

       490        500        510        520        530        540
ARRLGFPEDL VTLTGQGWQH RFPATQFALV ASRPLLDLTV RQQALGADNI TVRQRTEAVE

       550        560        570        580        590        600
LTGSGGGSGG RVTGVVVRDL DSGRQEQLEA DLVIDATGRG SRLKQWLAAL GVPALEEDVV
```

```
       610        620        630        640        650        660
DAGVAYATRL FKAPPGATTH FPAVNIAADD RVREPGRFGV VYPIEGGRWL ATLSCTRGAQ

       670        680        690        700        710        720
LPTHEDEFIP FAENLNHPIL ADLLRDAEPL TPVFGSRSGA NRRLYPERLE QWPDGLLVIG



       730        740        750        760        770        780
DSLTAFNPIY GHGMSSAARC ATTIDREFER SVQEGTGSAR AGTRALQKAI GAAVDDPWIL

       790        800        810        820        830        840
AATKDIDYVN CRVSATDPRL IGVDTEQRLR FAEAITAASI RSPKASEIVT DVMSLNAPQA

       850        860        870        880        890        900
ELGSNRFLMA MRADERLPEL TAPPFLPEEL AVVGLDAATI SPTPTPTPTA AVRSLEHHHH HH
```

Number of amino acids: 902
Molecular weight: 98106.8
Theoretical pI: 5.67

Ala (A)	113	12.5%	Lys (K)	42	4.7%
Arg (R)	49	5.4%	Met (M)	15	1.7%
Asn (N)	42	4.7%	Phe (F)	30	3.3%
Asp (D)	53	5.9%	Pro (P)	56	6.2%
Cys (C)	3	0.3%	Ser (S)	39	4.3%
Gln (Q)	27	3.0%	Thr (T)	58	6.4%
Glu (E)	60	6.7%	Trp (W)	14	1.6%
Gly (G)	71	7.9%	Tyr (Y)	21	2.3%
His (H)	26	2.9%	Val (V)	59	6.5%
Ile (I)	40	4.4%	Pyl (O)	0	0.0%
Leu (L)	84	9.3%	Sec (U)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 113
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 91

Formula: $C_{4363}H_{6844}N_{1226}O_{1316}S_{18}$
Total number of atoms: 13767

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of M^{-1} cm^{-1}, at 280 nm measured in water.

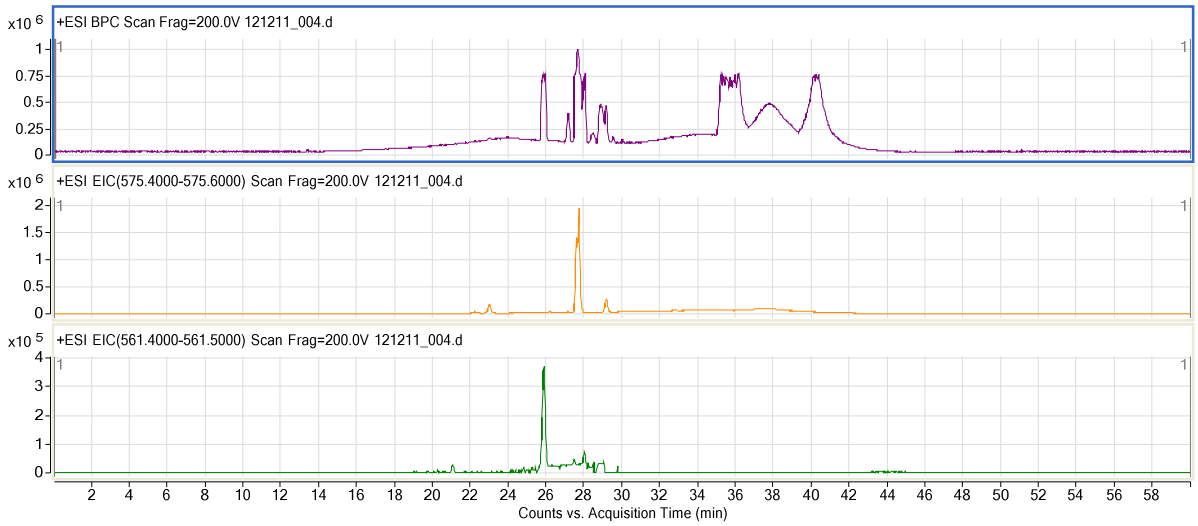
```
Ext. coefficient   108415
Abs 0.1% (=1 g/l)   1.105, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient   108290
Abs 0.1% (=1 g/l)   1.104, assuming all Cys residues are reduced
```

Estimated half-life:
The N-terminal of the sequence considered is H (His).
The estimated half-life is: 3.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
10 min (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

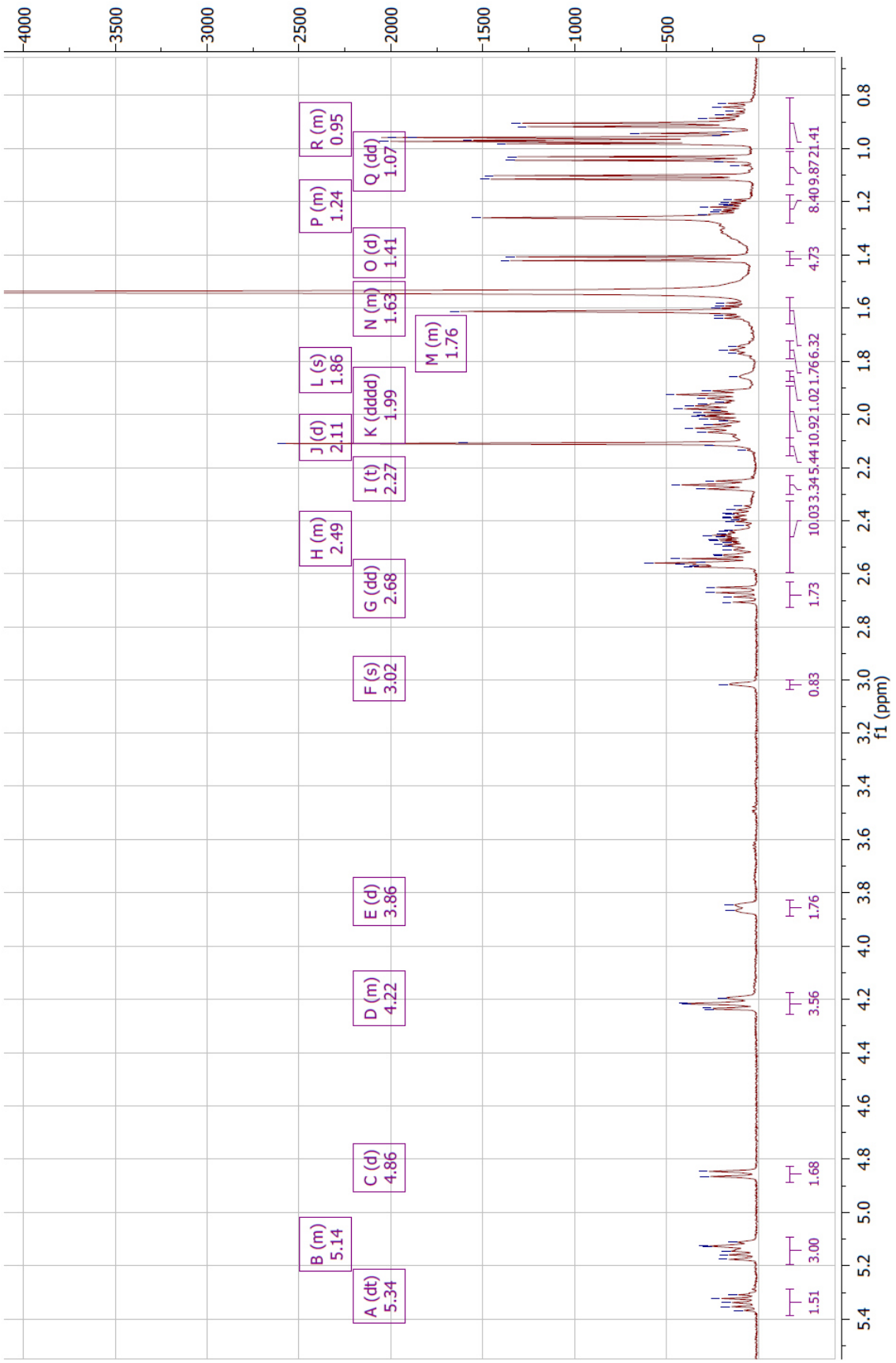
Instability index:
The instability index (II) is computed to be 34.61
This classifies the protein as stable.
Aliphatic index: 85.11
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.292

10.1.5 Premonensin-Reinigung und Charakterisierung

HPLC-Chromatogramme von Premonensin (Oben: *Base Peak Chromatogram*, Mitte: *Extracted Ion Chromatogram* 575.4-575.6 m/z, Unten: *Extracted Ion Chromatogram* 561.4-561.5 m/z)



[1]H-NMR-Spektrum von Premonensin A



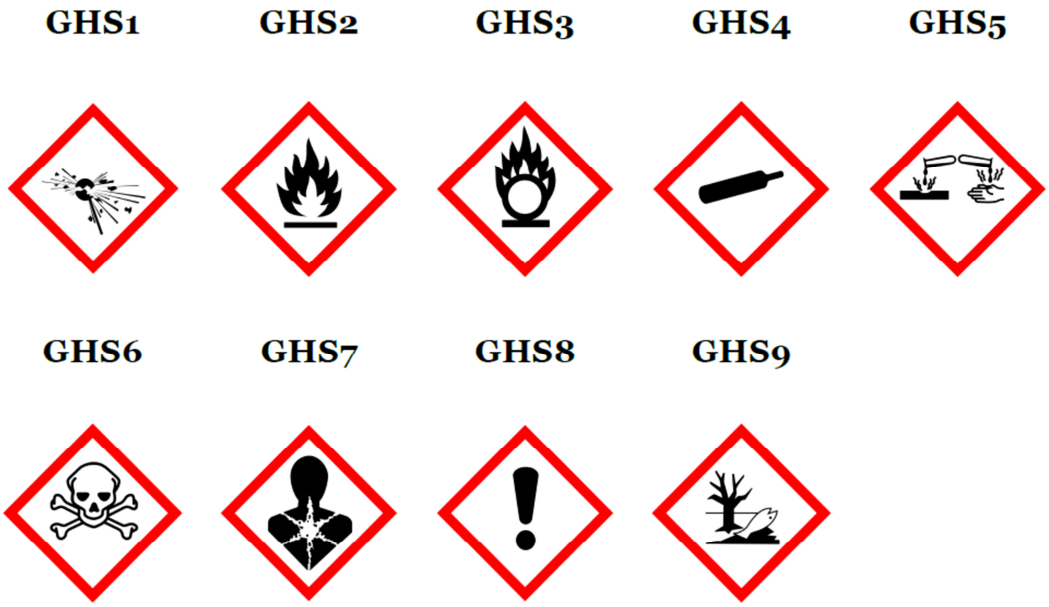
11 Gefahrstoffinformationen

Tabelle 11-1:Gefahrstoffinformationen

Substanz	**GHS**	**H/P-Sätze**
Aceton	GHS02 GHS07	H225, H319, H336 P210, P233, P305+P351+P338
Acetonitril	GHS02 GHS07	H225, H332, H302, H312, H319 P210, P305 + P351 + P338, P403+ P235
Acrylamid (37 %)	GHS06 GHS08	H301, H312, H316, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372
Ameisensäure	GHS02 GHS05	H226, H314 P260, P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338,
Ampicillin	GHS08	H334, H317 P280, P261, P302+P352, P342+P311
Antifoam A	GHS07	H319, H332, H335 P261, P305 + P351 + P338
APS	GHS03 GHS07	H272, H302, H315, H317, H319, H334, H335 P280, P305+351+338, P302+352, P304+P341,
Apramycin	GHS05 GHS08	H290, H315, H319, H360 P201, P305 + P351 + P338, P308 + P313
Chloramphenicol	GHS08	H350 P201, P308 + P313
Chloroform-d	GHS07 GHS08	H302, H315, H351, H373 P281
DTT	GHS07	H302, H315, H319, H335 P302+352, P305+P351+P338
EDTA	GHS07	H319 P305+P351+P338
Essigsäure	GHS02 GHS05	H226, H314 P280, P305+351+338, P310
Ethanol	GHS02	H225 P210

Ethylacetat	GHS02 GHS07	H225, H319, H336 P210, P261, P305 + P351 + P338
Hygromycin B	GHS05 GHS06	H300+310+330, H318, H334 P260, P264, P280, P284, P301 + P310, P302 + P350
Imidazol	GHS05 GHS06	H301; H314; H361 P260, P281, P303+P361+P353, P301+P330+P331,
Kaliumhydroxid	GHS05 GHS07	H209, H302, H314 P 280, P305+P351+P338, P310
Kanamycin	GHS08	H360 P201, P308 + P313
MES	GHS07	H315, H319, H335 P261, P305+351+338
Methanol	GHS02 GHS06	H225, H301, H311, H331, H370 P210, P260, P280, P233, P301+P310+P311
Nalidixinsäure	GHS08	H334 P261, P342+311
Natriumhydroxid	GHS05	H314 P280, P305 + P351 + P338, P310
Nickelsulfat	GHS08 GHS09 GHS07	H332, H315, H334, H317, H341, H350i, H360D, H372 H410 P201, P261, P273, P280, P308 + P313, P501
PMSF	GHS06 GHS05	H301, H314 P280, P305+P351+P338, P310
Salzsäure (6 N)	GHS05 GHS07	H280, H314, H331, H261, H280 P305+P351+P338, P310, P410+P403
Schwefelsäure	GHS05	H290, H314 P280, P305 + P351 + P338, P310
SDS	GHS02 GHS06	H228, H302, H311, H315, H319, H335 P210, P261, P280, P312, P305+351+338
TEMED	GHS02 GHS05	H225, H302, H314, H332, P261, P280, P305+351+338
Tetracyclin	GHS07	H315, H319, H335 P261, P305 + P351 + P338
Thiostrepton	GHS07	H302

Tris	GHS07	H315, H319, H335 P261, P305+P351+P338



12 Abkürzungsverzeichnis

Å Angström (1 Å – 10^{-10} m)
ACP Acyl-Carrier-Protein
Amp Ampicillin
APS Ammoniumpersulfat
AT Acyltransferase
ATP Adenosintriphosphat
bzw. beziehungsweise
bp/kb Basenpaare, Kilobasenpaare
°C Grad Celcius
ca. circa
Cam Chloramphenicol
C Kohlenstoff
cm Zentimeter
CD Circulardichroismus
CoA Coenzym A
Da/ kDa Dalton, Kilodalton
d desoxy
DC Dünnschichtchromatographie
deg *degree* (Winkelmaß)
DH Dehydratase
DLS dynamische Lichtbeugung
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure
dNTP 2'-Desoxynukleosidtriphosphat
DTT Dithiotreitol
E.coli Escherichia coli
EDTA Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER Enoylreduktase
ESI Elektrospray Ionisation
FPLC *Fast Liquid Protein Chromatography*
x g – vielfaches der Erdbeschleunigung
h Stunde
HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hyg Hygromycin B
IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan Kanamycin
KR Ketoreduktase
KS Ketosynthase-
kV Kilovolt
L Liter
M Molar
MALDI *Matrix assisted laser desorption/ionisation*
MBP *Maltose binding protein*
Me Methyl
MES 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
µ mikro
mg Milligramm
min Minute
ml Milliliter
mM Millimolar

MS Massenspektrometrie
MS/MS Tandem-Massenspektrometrie
MW Molekulargewicht
N Stickstoff
Nlx Nalidixinsäure
NRPS nichtribosomale Peptisynthetase
NTA Nitrilotriessigsäure
O Sauerstoff
OD Optische Dichte
ORF *open reading frame*
Ω Ohm
P Phosphor
p.A. pro analysis
PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS phosphatgepufferte Salzlösung
PCR Polymerase-Kettenreaktion
PDB Protein Data Bank
PEG Polyethylenglykol
pI Isoelektrischer Punkt
PKS Polyketidsynthase
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
Ppant Phosphopantethein
rpm *revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT Raumtemperatur
Rt Retentionszeit
S Schwefel
s Sekunde
SDS Natriumlaurylsulfat
Sv Säulenvolumen
TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE Thioesterase
TEMED N,N,N′,N′-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet Tetracyclin
TOF *Time of flight*
U Units
UV Ultraviolett
ÜN über Nacht
V Volt
v/v *volume/volume*
λ Wellenlänge [nm]
w/v *weight/volume*
Ww Wechselwirkungen

Tabelle 12-1: Aminosäureabkürzungen

Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	Aminosäure
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anna Sophie Zimmermann

Geburtsdatum: 23. Dezember 1985

Geburtsort: Hannover

Ausbildung

11.2011 bis 11.2014 Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie

Dissertation in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Christian B. W. Stark

„Untersuchung der enzymkatalysierten oxidativen Cyclisierung zum Polyetherantibiotikum Monensin“

04.2011 Biochemie-Diplom Leibniz Universität Hannover

Abschlussnote 1.2

06. – 12.2010 Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie

Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Detlef Neumann

“Analyse der Histaminkonzentrationen in Geweben der Maus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen“

07 – 12.2009 University of Cambridge (UK), Department of Biochemistry

Praktikum im Labor von Professor Peter F. Leadlay, FRS FRSC

10.2005 – 06.2009 Studium der Biochemie, Leibniz Universität Hannover

05.2005 Abitur, Wilhelm-Raabe-Schule (Gymnasium), Hannover

Abiturnote: 1.3

Publikationen

- A.S. Zimmermann, H. Burhenne, V. Kaever, R. Seifert, D. Neumann, Inflamm Res 60 (2011).
- J.N. Andexer, S.G. Kendrew, M. Nur-e-Alam, O. Lazos, T.A. Foster, A.S. Zimmermann, T.D. Warneck, D. Suthar, N.J. Coates, F.E. Koehn, J.S. Skotnicki, G.T. Carter, M.A. Gregory, C.J. Martin, S.J. Moss, P.F. Leadlay, B. Wilkinson, Proc Natl Acad Sci USA 108 (2011).

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.
Ich erkläre zusätzlich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in abgeänderter Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Es handelt sich hierbei um meinen ersten Promotionsversuch.

Hamburg, den

Anna Sophie Zimmermann