



FRIEDRICH-SCHILLER-  
**UNIVERSITÄT**  
**JENA**

# **Untersuchungen zu Polyketidsynthesen aus *Dictyostelium discoideum***

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apotheker und Diplom Pharmazeut

**Tilman Forberger**

geboren am 12. Juni 1982 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Winckler
2. Prof. Dr. Pierre Stallforth
3. Prof. Dr. Ludwig Eichinger

Tag der öffentlichen Verteidigung: 27.02.2023

*Meinen Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die soziale Amöbe <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	1
1.1.1 Phylogenie.....	1
1.1.2 Lebenszyklus.....	3
1.1.3 Der cAMP-Signalweg .....	6
1.1.4 Kooperation und Betrug .....	9
1.1.4.1 <i>Cheating</i> -Strategien.....	10
1.1.4.2 <i>Cheating</i> Mechanismen und Kontrolle von <i>Cheatern</i> .....	11
1.1.4.3 Überblick über bekannte <i>Cheater</i> -Stämme in <i>D. discoideum</i> .....	14
1.2 Naturstoffe aus <i>D. discoideum</i> .....	15
1.2.1 Polyketide.....	16
1.2.2 Polyketidsynthasen.....	16
1.2.3 Polyketid-Biosynthese .....	18
1.2.4 <i>D. discoideum</i> als Produzent von Sekundärmetaboliten.....	20
1.2.5 Die Entwicklungsfaktoren DIF-1 und MPBD.....	21
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Laborgeräte .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika .....	27
2.1.4 Lösungen und Puffer .....	29
2.1.5 Nährmedien.....	30
2.1.6 Antikörper.....	31
2.1.7 Kits, Enzyme und Größenstandards .....	31
2.1.8 Mikroorganismen.....	32
2.1.9 Softwareprogramme .....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	34
2.2.1.1 Isolation genomischer DNA .....	34
2.2.1.2 Isolation verdaubarer genomischer DNA .....	34

2.2.1.3	Isolation von RNA und Synthese von cDNA.....	35
2.2.1.4	Quantitative PCR.....	35
2.2.1.5	SDS-PAGE.....	36
2.2.1.6	Western Blot.....	36
2.2.1.7	Southern Blot mit biotinylierter Sonde.....	37
2.2.2	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> .....	38
2.2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	38
2.2.2.2	Herstellung von Zell-Pellets.....	38
2.2.2.3	Waschen von <i>D. discoideum</i> Zellen.....	38
2.2.2.4	Pulsen von <i>D. discoideum</i> Zellen mit cAMP.....	39
2.2.2.5	<i>Cheating-Assay</i> .....	39
2.2.2.6	Bestimmung der Sporulationseffizienz und der Keimfähigkeit der Sporen.....	40
2.2.3	Naturstoffchemische und Analytische Methoden.....	40
2.2.3.1	Gewinnung von Extrakten aus <i>D. discoideum</i> Kulturen.....	40
2.2.3.2	Durchflusszytometrie.....	42
2.2.3.3	HPLC-DAD.....	42
2.2.3.4	UHPLC-ESI-HRAM/MS und Auswertung mit XCMS-Online™.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1	Aktivierung der Sekundärstoffbiosynthese durch Variation der Kultivierungsbedingungen.....	45
3.2	Genexpressionsanalyse der PKS-Gene von <i>D. discoideum</i> .....	49
3.2.1	PKS-Gene in <i>D. discoideum</i> .....	49
3.2.2	Untersuchungen zur Genregulation der PKS-Gene in <i>D. discoideum</i> .....	53
3.2.3	Die <i>pks26</i> -REMI-Mutante.....	60
3.3	Herstellung einer <i>pks26</i> -Knock-Out-Mutante.....	63
3.3.1	Strategie zur Generierung einer <i>pks26</i> -Knock-Out-Mutante.....	64
3.3.2	Überprüfung der korrekten Integration der Knock-Out-Kassette.....	66
3.3.3	Untersuchung der <i>pks26</i> -Expression in der Knock-Out-Mutante.....	69
3.4	Aktivierung der <i>pks26</i> -Expression durch Promotor-Knock-In („ <i>gene activation</i> “ ).....	70
3.4.1	Strategie zur Erzeugung der <i>pks26</i> -Genaktivierungsmutante.....	71
3.4.2	Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der GA-Mutanten.....	74
3.5	Einfluss der <i>pks26</i> -Expression auf den Sekundärmetabolismus.....	80
3.6	Kooperationsverhalten während der Entwicklung.....	88
3.7	Untersuchungen zu <i>pks26</i> -abhängigem Einfluss auf die Fitness.....	96
3.7.1	Einfluss der <i>pks26</i> -Expression auf die Entwicklungsfähigkeit.....	97
3.7.2	Effizienz der Sporenbildung und Sporenkeimung.....	100
3.7.3	Wachstum in Flüssigmedium.....	102
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>105</b>
4.1	Induktion der Biosynthese von Naturstoffen.....	105

---

4.1.1 Der OSMAC-Ansatz zur Induktion der Biosynthese von Sekundärmetaboliten.....	105
4.1.1.1 Kultivierungsbedingungen.....	106
4.1.1.2 Extraktion.....	108
4.1.1.3 Detektion/Analytik.....	109
4.1.2 Aktivierung von <i>pks26</i> durch Promotortausch.....	110
4.1.2.1 Erstellung der <i>pks26</i> -Mutanten mittels homologer Rekombination.....	110
4.1.2.2 Kultivierungsbedingungen.....	115
4.1.2.3 Extraktion.....	116
4.1.2.4 Detektion/Analytik.....	116
4.1.3 Ausblick.....	119
4.2 Physiologische Funktion von <i>pks26</i> .....	119
4.2.1 Mögliche Funktion von <i>pks26</i> als entwicklungs- und cAMP-pulsabhängiges Gen.....	119
4.2.2 Einfluss von <i>pks26</i> auf das Kooperationsverhalten.....	122
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>129</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>131</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>151</b>
A - Verwendete Oligonukleotide.....	151
B - Sequenzierter Bereich der <i>pks26</i> -Genaktivierungsmutante.....	154
C - PKS26-assoziierte <i>features</i> .....	154
D - Hergestellte Plasmide.....	155
<b>Liste der wissenschaftlichen Publikationen.....</b>	<b>157</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>159</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>161</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>163</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenie der Dictyostelia .....	3
Abbildung 2: Die Lebenszyklen von <i>D. discoideum</i> .....	4
Abbildung 3: Der cAMP-Regelkreis während der frühen Entwicklung in <i>D. discoideum</i> .....	7
Abbildung 4: <i>Cheating</i> -Strategien.....	11
Abbildung 5: Grundprinzipien der Polyketid-Biosynthese.....	19
Abbildung 6: Sekundärmetabolite aus <i>D. discoideum</i> .....	21
Abbildung 7: Chromatogramme von Extrakten des Wildtyps AX2.....	48
Abbildung 8: Expressionsprofile der entwicklungsabhängigen <i>D. discoideum</i> PKS- Gene.....	52
Abbildung 9: Entwicklungs- und pulsabhängige Regulation der <i>D. discoideum</i> PKS- Gene.....	55
Abbildung 10: Entwicklungs- und pulsabhängige Regulation ausgewählter <i>D. discoideum</i> PKS-Gene.....	56
Abbildung 11: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Untersuchung der Entwicklungs- und Pulsabhängigkeit von <i>pks26</i> .....	58
Abbildung 12: Entwicklungs- und cAMP-abhängige Regulation von <i>pks26</i> .....	59
Abbildung 13: Vergleich der Genexpression von <i>csaA</i> und <i>pks26</i> in AX2, AX4 und Pks26-REMI.....	61
Abbildung 14: Strategie zur Erzeugung einer <i>pks26</i> -Knock-Out-Mutante.....	65
Abbildung 15: PCR-Charakterisierung von Pks26-KO.....	66
Abbildung 16: Southern Blot zum Nachweis des <i>pks26</i> -Knock-Out.....	68
Abbildung 17: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Kontrolle der Expression von <i>pks26</i> in den Knock-Out-Stämmen.....	69
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Genaktivierungsstrategie für <i>pks26</i> .....	73
Abbildung 19: Test auf Vektorintegration.....	76
Abbildung 20: Southern Blot zur Überprüfung der <i>pks26</i> -GA-Mutanten.....	77
Abbildung 21: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Überprüfung der <i>pks26</i> - Expression der Genaktivierungsmutanten.....	78
Abbildung 22: Western-Blot zum Nachweis von Flag-Pks26.....	79
Abbildung 23: Kultivierung, Extraktion und analytischer Prozess der LC-MS- Untersuchung der <i>pks26</i> -Mutanten.....	81
Abbildung 24: TIC-Chromatogramme der Gesamtkulturextrakte.....	83
Abbildung 25: Hauptkomponentenanalyse der UHPLC-ESI-HRAM/MS-Daten der <i>pks26</i> -Mutanten.....	85
Abbildung 26: <i>Volcano Plot</i> zum Vergleich der Gesamtkulturextrakte von AX4 und Pks26-GA.....	87



---

Abbildung 27: GFP-Markierung am Beispiel der Sporen von AX4.....	90
Abbildung 28: Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des GFP-Signals von AX4 und AX4-GFP.....	91
Abbildung 29: Einfluss der GFP-Markierung auf das <i>Cheating</i> -Verhalten.....	93
Abbildung 30: Vergleich der GFP-markierten <i>pks26</i> -Mutanten mit AX4 im <i>Cheating</i> -Assay.....	94
Abbildung 31: Vergleich der <i>pks26</i> -Mutanten mit dem GFP-markierten AX4 im <i>Cheating</i> -Assay.....	95
Abbildung 32: Entwicklungsphänotypisierung der <i>pks26</i> -Mutanten im Vergleich zu AX4.....	99
Abbildung 33: Sporenbildung der <i>pks26</i> -Mutanten im Vergleich zu AX4.....	100
Abbildung 34: Keimfähigkeit der Sporen der <i>pks26</i> -Mutanten im Vergleich zu AX4.....	101
Abbildung 35: Wachstum der <i>pks26</i> -Mutanten in Flüssigmedium im Vergleich zu AX4.....	103
Abbildung 36: Expressionsprofile bekannter <i>Cheater</i> - und <i>Loser</i> -Gene während der multizellulären Entwicklung.....	120
Abbildung 37: Sequenzierter Bereich der <i>pks26</i> -Genaktivierungsmutante.....	154

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte.....	25
Tabelle 2:	Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 3:	Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika.....	27
Tabelle 4:	Lösungen und Puffer .....	29
Tabelle 5:	Nährmedien .....	30
Tabelle 6:	Antikörper .....	31
Tabelle 7:	Kits, Enzyme, Größenstandards.....	31
Tabelle 8:	<i>Escherichia coli</i> K-12 Stämme .....	32
Tabelle 9:	<i>D. discoideum</i> -Stämme.....	33
Tabelle 10:	Softwareprogramme .....	33
Tabelle 11:	Einteilung der PKS-Gene in <i>D. discoideum</i> nach ihrer Domänenstruktur.....	50
Tabelle 12:	Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26.....	88
Tabelle 13:	Liste der verwendeten Oligonukleotide .....	151
Tabelle 14:	Liste der PKS26-assoziierten <i>features</i> .....	154
Tabelle 15:	Liste der hergestellten Plasmide. ....	155

## Abkürzungsverzeichnis

3'-HR	3'-homologe Region
5'-HR	5'-homologe Region
A15P	Aktin-15-Promotor
A6P	Aktin-6-Promotor
ACA	Adenylatcyclase A
ACP	Acyl-Carrier-Protein
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
AT	Acyltransferase
Bsr	Blasticidinresistenzgen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAR	cAMP-Rezeptor
CCR	<i>carbon catabolite repression</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalkonsynthase
CMF	<i>conditioned medium factor</i>
CRISPR/Cas9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (Cas) proteins</i>
DH	Dehydratase
dH <sub>2</sub> O	entionisiertes Wasser
DIF 1	<i>differentiation inducing factor 1</i>
EIC	<i>extracted-ion chromatogram</i>
ER	Enoylreduktase
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
FAS	Fettsäuresynthasen
GA	Genaktivierung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gRNA	guide-RNA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
KR	Ketoreduktase
KS	β-Ketosynthase
MCS	<i>multiple cloning site</i>

---

mhcAT	Terminator des Myosin-Gens
MPBD	4-Methyl-5-pentylbenzen-1,3-diol
MT	Methyltransferase
OSMAC	<i>one strain-many compounds</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pds A	extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase
PKA	cAMP-abhängigen Proteinkinase
PKS	Polyketidsynthasen
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
PSF	<i>prestravation factor</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
Reg A	intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase
REMI	<i>restriction enzyme-mediated integration</i>
RPKM	<i>Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads</i>
RT-qPCR	Reverse-Transkriptase-Quantitative-PCR
SPE	<i>solid phase extraction</i> (Festphasenextraktion)
TIC	<i>total ion current</i> (Gesamtionenstrom)
UHPLC-ESI- HRAM/MS	<i>Ultra high performance liquid chromatography electrospray ionization high resolution accurate mass spectrometry</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die soziale Amöbe *Dictyostelium discoideum*

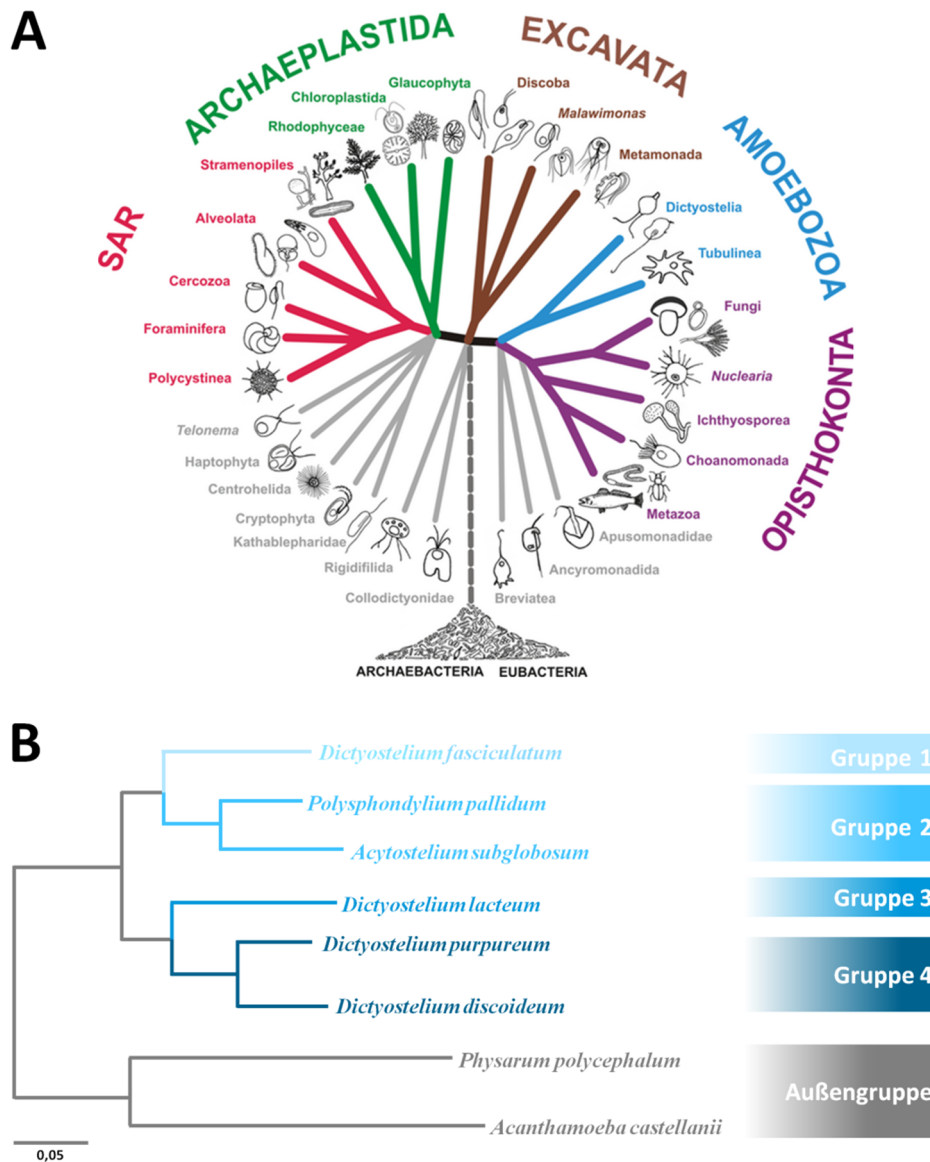
Die Dictyostelia sind weltweit verbreitete eukaryotische Bodenorganismen, deren Lebensraum sich von der Arktis bis in tropische Regionen, von Wüsten bis in Regenwälder erstreckt. Ihre höchste Artendichte findet sich in Waldböden der gemäßigten und tropischen Zonen (Cavender 1973, Raper 1984, Swanson *et al.* 1999). Die einzelligen Amöben ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien. Versiegt die Nahrungsquelle, können tausende Amöben aggregieren und zu einem multizellulären Fruchtkörper differenzieren, weshalb sie ebenfalls unter dem Namen „soziale Amöben“ bekannt sind. Diese aggregative Entwicklungsfähigkeit, bei welcher sich eine einzellige Wachstumsphase mit einer multizellulären Entwicklungs- und Verbreitungsphase abwechselt, wurde erstmalig bei den Dictyostelia beschrieben und insbesondere im Modelorganismus *Dictyostelium discoideum* eingehend untersucht (Raper und Smith 1939, Escalante und Vicente 2000, Kessin 2001). Die Art *D. discoideum* wurde 1933 in den Laubwäldern der Berge North Carolinas entdeckt und von Kenneth Raper beschrieben (Raper 1935). Unter optimalen Bedingungen und ausreichendem Nahrungsangebot verdoppeln sich die einzelligen Amöben durch mitotische Teilung alle 4 Stunden und phagozytieren Mikroorganismen mit einer Rate von eins pro Minute (Cosson und Soldati 2008). Der auf hohe Makropinozytoseraten selektionierte Stamm AX2 zeigt axenisches Wachstum mit einer Verdopplungszeit von 8-9 Stunden (Watts und Ashworth 1970). Dies ermöglichte umfangreiche biochemische und molekularbiologische Studien und damit den Aufstieg von *D. discoideum* zum Modellorganismus für verschiedenste Forschungsfelder (Annesley und Fisher 2009, Koller *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016, Pergolizzi *et al.* 2019, Schaf *et al.* 2019). Während des vegetativen Wachstums bewegen sich die 10-20 µm großen Amöben durch das Zusammenwirken von Aktin und Myosinfilamenten fort. Dabei bilden die Zellen Pseudopodien aus und können auf chemische Reize reagieren.

### 1.1.1 Phylogenie

Aufgrund der Ähnlichkeit des Sorokarps mit pilzlichen Fruchtkörpern wurde *D. discoideum* lange Zeit fälschlicherweise den Pilzen zugeordnet (Cappuccinelli und

Ashworth 1977). Frühe Arbeiten zeigten, dass ein amöboider Lebensstil nicht Taxa-spezifisch ist, sondern sich über das gesamte eukaryotische Reich verteilt. Eine genaue systematische Einordnung nur aufgrund morphologischer Unterschiede erwies sich zudem als äußerst schwierig (Patterson 1999).

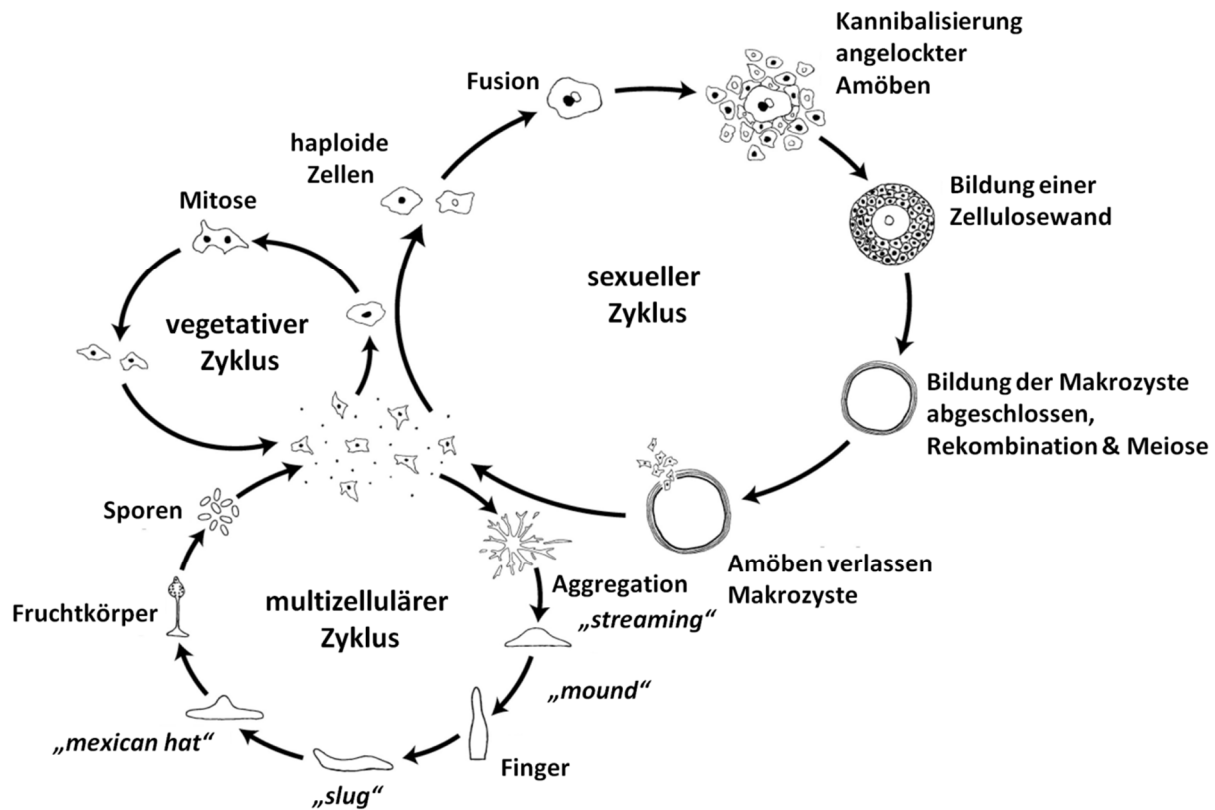
Nach neueren phylogenetischen Untersuchungen gehört *D. discoideum* im eukaryotischen Reich zur Supergruppe der Amoebozoa, welche eine Schwestergruppe der Opisthokonta (Tiere und Pilze) darstellt (Baldauf und Doolittle 1997, Adl *et al.* 2012, Hug *et al.* 2016) (Abbildung 1 A). Innerhalb der Amoebozoa wird *D. discoideum* zum Subphylum Conosa, zur Klasse Mycetozoa und zur Ordnung Dictyostelia zugeordnet (Glöckner und Noegel, 2013; Cavalier-Smith *et al.*, 2015). Die Taxonomie der Dictyostelia basierte lange Zeit auf der Morphologie der Sorokarpier. Dabei wurden drei Morphotypen unterschieden: *Dictyostelium* (zelluläre, meist unverzweigte Stiele, über 100 Arten), *Polysphondylium* (regelmäßig angeordnete Quirle von zellulären Seitenstielen am mittigen, zellulären Hauptstiel, über 30 Arten) und *Acytostelium* (azelluläre Stiele, mind. 16 Arten) (Raper 1984). In den letzten Jahren wurde jedoch durch verfeinerte kladistische Analysen sowie phylogenetische Untersuchungen von 18S-rDNA-Sequenzen gezeigt, dass die traditionelle, auf der Morphologie basierende Taxonomie der Dictyostelia nicht die phylogenetischen Beziehungen der Arten abbildet (Swanson *et al.* 2002). Basierend auf 18S-rDNA sowie  $\alpha$ -Tubulin-Sequenzen wurden die Dictyostelia erstmals in vier molekulare Hauptgruppen untergliedert, von denen interessanterweise keine einzige mit der traditionellen morphologischen Einteilung übereinstimmte (Schaap *et al.* 2006, Romeralo *et al.* 2011). Beispielsweise verteilt sich der Morphotyp *Dictyostelium* über die Mehrheit der molekularen Gruppen. Nach der Sequenzierung des Genoms eines Vertreters jeder Gruppe wurde eine phylogenetische Einteilung basierend auf funktionell unterschiedlichen Proteinen möglich. Durch Analysen von 213 universellen Amoebozoen-Proteinen sowie 47 konstitutiv exprimierten Proteinen konnten die Dictyostelia in zwei Schwestergruppen (Gruppe 1+2 und Gruppe 3+4) untergliedert werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Spezies *D. discoideum* befindet sich zusammen mit *D. purpureum* in der phylogenetisch jüngsten Gruppe 4 (Sheikh *et al.* 2015, Singh *et al.* 2016) (Abbildung 1 B). Neuere Untersuchungen auf der Basis von sechs Proteinen von 52 *Dictyostelium*-Spezies zeigen eine weitere Trennung von Gruppe 4 in zwei Untergruppen, welche sich weiter in 5 Kläden unterteilen (Schilde *et al.* 2019).



**Abbildung 1: Phylogenie der Dictyostelia.** (A) Schematische Darstellung der Klassifizierung der Eukaryoten inklusive der 5 Supergruppen (Adl *et al.* 2012). (B) Stammbaum der Dictyostelia basierend auf den Sequenzen von 213 universellen Amoebozoen-Proteinen. Modifiziert nach Sheikh *et al.* 2015.

### 1.1.2 Lebenszyklus

Die meiste Zeit verbringt *D. discoideum* als Einzeller im Boden. Abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren durchläuft die soziale Amöbe drei verschiedene Zyklen: 1. vegetativer Zyklus, 2. multizellulärer Zyklus, 3. sexueller Zyklus (Abbildung 2). Bei günstigen Umweltbedingungen erfolgt die Vermehrung im vegetativen Zyklus durch Zellteilung.



**Abbildung 2: Die Lebenszyklen von *D. discoideum*.** Schematische nicht maßstabsgetreu gezeichnete Darstellung. „The life cycles of *Dictyostelium discoideum*“ von David Brown & Joan E. Strassmann genutzt unter CC Creative Commons Attribution 3.0 (CC BY 3.0 / <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), Beschriftungen ins Deutsche übersetzt.

Werden die Lebensbedingungen für das vegetative Wachstum ungünstig, bspw. durch eine Reduktion des Nahrungsangebots, Zelldichten nahe des Maximums oder niedrige Temperaturen, wechseln die Amöben in den multizellulären Zyklus. Hierbei beginnen die Zellen nach einigen Stunden, zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) stoßweise zu sekretieren (Goldbeter 1975). Dieses dient ihnen als chemotaktisches und interzelluläres Signalmolekül (Reymond *et al.* 1995). Das sezernierte cAMP wird von den umliegenden Zellen wahrgenommen, welche ebenfalls mit der pulsatilen Sekretion beginnen. Dies führt zu einer Verstärkung des Signals (Goldbeter 2006). Bei dieser als Aggregation bezeichneten Entwicklungsphase bewegen sich die Zellen auf das von sogenannten Schrittmacherzellen gebildete Aggregationszentrum zu („streaming“). Dort bilden  $10^4 - 10^5$  Zellen ein Pseudoplasmodium, in welchem die Einzelzellen ihre Integrität behalten (Brock und Gomer 1999). Im so genannten „mound“-Stadium bildet sich eine Spitze („tipped mound“), welche sich zu einer aufrechten Struktur dem so genannten Finger weiter entwickeln kann (Abbildung 2). Ist die Umgebung dunkel und feucht, können die Zellen in ein motiles „slug“-Stadium übergehen. In diesem wird das 2–4 mm



lange Pseudoplasmodium geschützt durch eine extrazelluläre Matrix und kann auf exogene Reize wie Temperatur, Licht, Feuchtigkeit und chemische Gradienten reagieren. Mit Hilfe des *Slug*-Stadiums ist es den Zellen möglich eine günstigere Umgebung für die Bildung von Fruchtkörpern und somit für die Verbreitung der Sporen zu finden. So zum Beispiel bewegt sich der *Slug* in Richtung des Lichtes in höhere Waldbodenschichten und entgegen der Ammoniumkonzentration, welche als Stoffwechselprodukt ein Indikator für hohe Zelldichten ist. Bereits in dieser Entwicklungsphase beginnt die Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen. Nach der Aggregation differenzieren alle Zellen vorerst in Präsporenzellen. Im Weiteren erfolgt bei den Zellen, welche die Spitze des *Slug* erreicht haben, eine weitere Differenzierung in Prästielzellen (Romeralo *et al.* 2013, Schilde *et al.* 2014). Demnach besteht das Pseudoplasmodium sowohl im Finger- als auch im *Slug*-Stadium zu 20 % aus Prästielzellen und 80 % aus Präsporenzellen. Dieses Verhältnis bleibt über die gesamte Entwicklung konstant, wobei sich die Zelltypen ineinander umwandeln können (Raper 1935, 1940). Einige undifferenzierte Zellen bilden die Nachhut. Nach Abschluss der Migration folgt die Phase der Kulmination, in welcher die Prästielzellen zum Zentrum wandern und mit der Ausbildung des Stiels beginnen („*mexican hat*“) (Raper und Fennell 1952). Weitere Prästielzellen wandern in die Röhre, vakuolisieren und sterben unter Bildung einer Zellulosewand. Mit diesem wachsenden Stiel bewegen sich die Präsporenzellen nach oben und differenzieren in fertige Sporen. Während die Nachhutzellen vakuolisieren und sterben, bilden sie die Basalscheibe (Raper 1940). Voll entwickelte Sorokarprien von *D. discoideum* trocknen nicht aus, was eine Verbreitung einzelner Sporen durch den Wind praktisch ausschließt. Sie kleben an einander und werden durch Wasser, Insekten und auch kleine Tiere verbreitet, um an einem neuen Ort auszukeimen (Suthers 1985, Stephenson und Landolt 1992).

Der sexuelle Zyklus von *D. discoideum* beginnt durch die Fusion zweier kompetenter haploider Zellen zu einer diploiden Zygote, welche mittels cAMP-Pulsen ca. 200 haploide Zellen anlockt (Abbildung 2) (O’Day 1979, Saga und Yanagisawa 1983, O’Day *et al.* 1987). Von einer Schutzschicht umhüllt, ernährt sich die Zygote von den angelockten Zellen und entwickelt sich unter Ausbildung einer fünfschichtigen Zellwand zu einer sehr widerstandsfähigen Makrozyste. Diese entlässt nach Meiose und mehreren Runden Zellteilung eine große Anzahl haploider Amöben (Okada *et al.* 1986, O’Day und Keszei 2012).

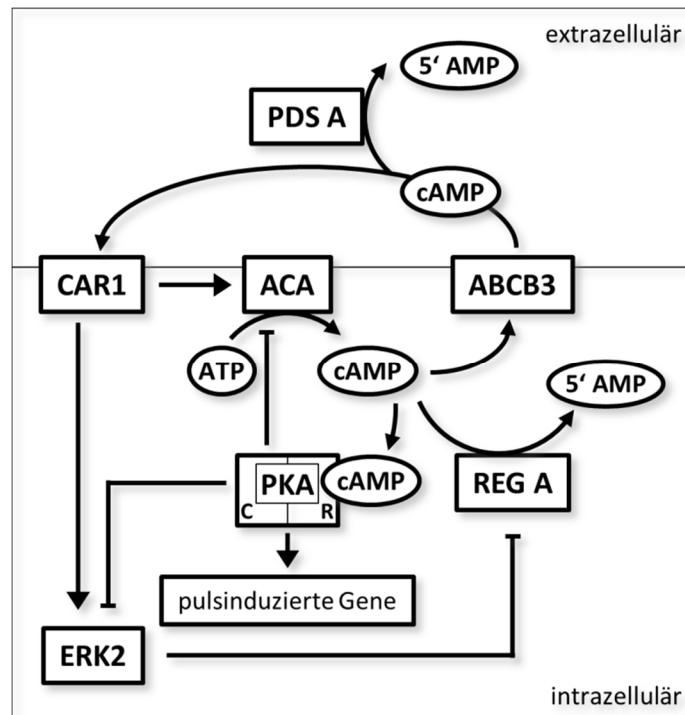
Es ist noch nicht vollständig verstanden, welche Faktoren darüber entscheiden, ob die

Amöben einen Fruchtkörper bilden oder den sexuellen Zyklus beginnen. Ein fein abgestimmtes System, um die Dichte und das Verhältnis der umliegenden Amöben und Beuteorganismen wahrzunehmen (*quorum sensing*), scheint dafür eine wichtige Rolle zu spielen. (Du *et al.* 2015)

### 1.1.3 Der cAMP-Signalweg

Die Einleitung der frühen Entwicklung von *D. discoideum* wird durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert, in welchem u.a. kleine Moleküle als Signalmoleküle von Bedeutung sind (vgl. 1.2.5). Im Folgenden soll ein Überblick über diese Thematik gegeben werden.

Während des vegetativen Wachstums überwachen die Amöben das Verhältnis von Zelldichte zur umliegenden Bakterienanzahl durch die konstante Sekretion des Glykoproteins „*prestarvation factor*“ (PSF) (Clarke *et al.* 1987). Bei hohen PSF-Werten und gleichzeitig niedrigen Bakterientitern beenden die Amöben die Vermehrung und beginnen mit der Expression aggregationspezifischer Gene. Damit treten die Zellen in den multizellulären Entwicklungszyklus ein (Clarke und Gomer 1995). Mit Hilfe des „*conditioned medium factor*“ (CMF) haben die Zellen eine weitere Möglichkeit, ihre Zelldichte wahrzunehmen. Dieses Protein wird in wachsenden Zellen mit konstanter Rate synthetisiert, jedoch beginnt die Sekretion erst nach der Induktion durch Hungerstress (Gomer *et al.* 1991). Ebenfalls durch Hungerstress induziert wird die extrazelluläre Präsentation des vegetativ exprimierten CMF-Rezeptors (Jain und Gomer 1994). CMF und PSF stimulieren die Expression von Genen, welche für die cAMP-Synthese, -Detektion und -Degradation und damit für die folgenden cAMP-Signalkaskaden notwendig sind (Clarke und Gomer 1995, Deery und Gomer 1999). Diese neu induzierten Gene kodieren u.a. für die Adenylatcyclase A (ACA, cAMP-Synthese) (Klein 1976), cAMP-Rezeptoren (CARs) (Galvin *et al.* 1984, Insall *et al.* 1994), extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase (PDS A, cAMP-Hydrolyse) (Goidl *et al.* 1972) sowie die intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase (REG A, cAMP-Hydrolyse) (Shaulsky *et al.* 1998). Sie bilden zusammen mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) (de Gunzburg *et al.* 1984) ein biochemisches Netzwerk, welches beginnt, cAMP zu produzieren (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Der cAMP-Regelkreis während der frühen Entwicklung in *D. discoideum*.** cAMP - zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat, PKA - cAMP-abhängige Proteinkinase A, ACA - Adenylatcyclase A, CAR1 - cAMP-Rezeptor 1, ERK2 - *extracellular signal-regulated kinase 2* (MAP-Kinase) REG A - intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase, PDS A - extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase, ABCB3 - ABC-Transporter B3.

Das Binden von cAMP am membranständigen Rezeptor CAR1 aktiviert die ACA, so dass diese fünfmal mehr cAMP produziert (Insall *et al.* 1994, Swaney *et al.* 2010). Adenosintriphosphat (ATP) wird in cAMP umgewandelt und die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt rapide. Ein Großteil des gebildeten cAMPs wird aktiv über den ABC-Transporter B3 (ABCB3) sekretiert und kann zu cAMP-Rezeptoren derselben oder anderen Zellen diffundieren, wodurch die Weitergabe des chemotaktischen Signals erfolgt (Kesbeke und Van Haastert 1988, Garcia und Parent 2008, Miranda *et al.* 2015). Ebenfalls durch das Binden von cAMP an CAR1 wird die MAP-Kinase ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) aktiviert, welche durch Phosphorylierung die Aktivität von REG A senkt und somit cAMP-Konzentration steigen lässt (Maeda *et al.* 2004, Kuburich *et al.* 2019). Die Aktivität der ACA erreicht nach ca. 90 Sekunden ihren Höhepunkt und wird von der hochkonservierten Serin/Threonin-Kinase PKA beendet. Übersteigt die intrazelluläre cAMP-Konzentration den Wert von 100 nM, bindet cAMP an verschiedenen Positionen an die regulatorische Untereinheit der PKA (PKA-R). Daraufhin wird die katalytische Untereinheit PKA-C freigesetzt, welche über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten verschiedener Proteine indirekt die Aktivierung von ACA inhibiert (Veron *et al.* 1988, Lee 1991, Dammann *et al.* 1998). Darüber hinaus phosphoryliert

PKA-C den Transkriptionsfaktors GataC, was zur Induktion pulsabhängiger Gene führt (Cai *et al.* 2014). Anschließend kommt die cAMP-Bildung für mehrere Minuten zum Erliegen. Durch REG A, welche cAMP in 5'-Adenosinmonophosphat (5'AMP) abbaut, wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration schnell gesenkt. Als Folge bindet cAMP nicht mehr an PKA-C, so dass PKA wieder in heterodimerer inaktiver Form vorliegt. Nach der Dephosphorylierung verschiedener Proteine kann ACA durch extrazelluläres cAMP erneut aktiviert werden. Das System ist wieder im Ausgangszustand (Mann *et al.* 1997, Shaulsky *et al.* 1998, McMains *et al.* 2008). Durch dieses negative Feedback wird die Zeit limitiert, in der ACA und PKA beide aktiviert sind. Somit kommt es zur Ausbildung der für *D. discoideum* typischen pulsatilen Sekretion von cAMP mit einer Periodendauer von 6-8 Minuten, wobei sich Zellen in räumlicher Nähe miteinander synchronisieren. (Goldbeter 1975, Laub und Loomis 1998, Maeda *et al.* 2004)

Extrazelluläres cAMP wird sehr schnell durch PDS A abgebaut. Größe und Form der cAMP-Wellen, welche von einem Aggregat nach außen gelangen, werden durch die PDS A-Aktivität sowie einem 26 kDa großen spezifischen Inhibitor bestimmt (Franke und Kessin 1981, Orlow *et al.* 1981, Sugang *et al.* 1997). Der Inhibitor reduziert die Affinität von PDS A zu cAMP und wird sekretiert, wenn die extrazelluläre cAMP-Konzentration niedrig ist (Kessin *et al.* 1979, Rossier *et al.* 1983).

Diese cAMP-Pulse werden für die chemotaktische Bewegung sowie für die Induktion cAMP-pulsabhängiger Gene genutzt (Reymond *et al.* 1995). Für die zeitliche und räumliche Regulation von für die Chemotaxis notwendigen Signalwegen spielt PKA eine direkte Rolle (Scavello *et al.* 2017). Die Größenordnung der cAMP-Signalweitergabe ist abhängig von der Änderung der extrazellulären cAMP-Konzentration und zeigt über einen großen Zelldichtebereich eine große Robustheit (Kamino *et al.* 2017). Die einzelnen Zellen bewegen sich auf höhere cAMP-Konzentrationen zu und sezernieren selbst cAMP auf der der Signalquelle abgewandten Seite. Dies führt zum sternförmigen Einströmen der Zellen in Aggregationszentren (Aubry und Firtel 1999). Neben der direkten Sekretion von cAMP setzen die Zellen extrazelluläre Vesikel frei, welche zur Synthese und Sekretion von cAMP in der Lage sind. Somit hinterlassen die Zellen eine noch nachhaltigere Spur an Signalmolekülen und ermöglichen das koordinierte Strömen in einem komplexen multizellulären System (Kriebel *et al.* 2018).

Mutationen in den am cAMP-Signalweg beteiligten Enzymen und Rezeptoren machen die Zellen unfähig zu aggregieren, daher gilt der cAMP-Signalweg als essentiell für die

multizelluläre Entwicklung von *D. discoideum* (McMains *et al.* 2008, Loomis 2014). Dies konnte darüber hinaus durch die Bildgebung einzelner Zellen sowie deren cAMP-Signalen bestätigt werden (Gregor *et al.* 2010). In der multizellulären *Slug*-Phase spielen oszillierende cAMP-Wellen ebenfalls eine Rolle, jedoch scheinen diese nicht essentiell zu sein (Hashimura *et al.* 2019, Singer *et al.* 2019)

#### 1.1.4 Kooperation und Betrug

Die Bildung multizellulärer Organismen geschieht bei *D. discoideum* durch die Aggregation tausender Einzelzellen und nicht aus einer einzelnen Zelle wie bei den Metazoa (Kessin 2001, Bonner 2009). Diese aggregative Entwicklung bietet die Möglichkeit, dass verschiedene Genotypen an der Fruchtkörperbildung teilnehmen. Kooperieren in diesem Prozess beide Stämme miteinander, entspricht das Verhältnis der Amöben vor der Entwicklung dem Verhältnis der Sporen im Sporenkopf des Fruchtkörpers. Beide Stämme tragen zur Bildung des Fruchtkörpers gleichermaßen bei und profitieren auch gleichermaßen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass ein Genotyp die Regeln der Kooperation verletzt und einen größeren Anteil Sporen bildet, als ihm eigentlich zusteht. Diese Zellen kooperieren nur eingeschränkt oder gar nicht, profitieren jedoch von den aus der Kooperation resultierenden Vorteilen und werden aus diesem Grund als sogenannte „*Cheater*“ (dt.: „Betrüger“) bezeichnet. Umgekehrt wird ein weniger Sporen produzierender Stamm „*Loser*“ (dt.: „Verlierer“) genannt (Strassmann *et al.* 2000). *Cheating* geschieht somit im grundsätzlichen Rahmen geordneter kooperativer Handlungen, welche der *Cheater* in einer bestimmten Art und Weise verletzt (Strassmann und Queller 2011).

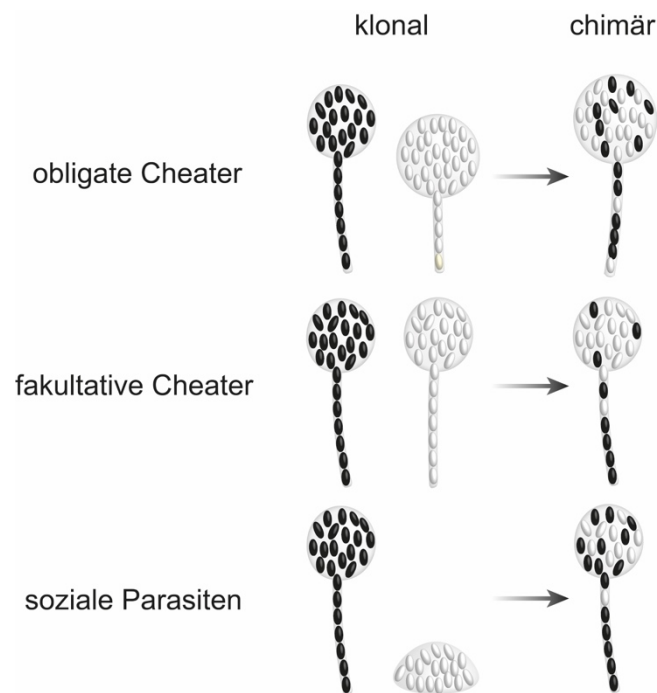
In der freien Natur sind die meisten Fruchtkörper von *D. discoideum* klonal. Ein Grund dafür ist die Verbreitung der Sporen als Einheit. Somit ist sehr wahrscheinlich, dass benachbarte Amöben den gleichen Genotyp besitzen und im Falle von Nahrungsmangel einen klonalen Fruchtkörper bilden (Suthers 1985, Stephenson und Landolt 1992). Es konnten jedoch auch genetisch unterschiedliche Klone in der freien Natur nachgewiesen werden, sowie ein geringer Anteil chimärer Fruchtkörper (Fortunato *et al.* 2003, Gilbert *et al.* 2007). *Cheating* in *D. discoideum* ist demnach als natürlicher Prozess zu verstehen, welcher nicht nur unter artifiziellen Bedingungen im Labor stattfindet.

Da bei der multizellulären Entwicklung lediglich die Sporenzellen überleben und Nachkommen bilden können, besteht zwischen den Genotypen eines chimären

Fruchtkörpers ein genetischer Konflikt. Die Zeichen dieses Konfliktes sind sichtbar. Chimäre *Slugs* legen bei gleicher Zellzahl eine kürzere Wegstrecke zurück als klonale. Dies könnte das Resultat des verstärkten Wettkampfs sein, um außerhalb der Spitze der *Slug* zu bleiben, welche zu toten Stielzellen differenziert. Allerdings wird dieser Effekt in der Natur durch die oftmals höhere Zellzahl chimärer *Slugs* kompensiert (Foster *et al.* 2002). Ein weiteres Zeichen des Konflikts ist der höhere Anteil an Sporenzellen, vermutlich weil es wenig vorteilhaft ist, eine Stielzelle zu werden um eine nicht verwandte Sporenzelle zu tragen (Buttery *et al.* 2009, Strassmann und Queller 2011). Damit einhergehend bilden Chimären kleinere Fruchtkörper als die Einzelklone.

#### **1.1.4.1 Cheating-Strategien**

Es gibt prinzipiell drei Arten, wie Genotypen während der Entwicklung miteinander konkurrieren können. Ein Stamm könnte immer einen größeren Anteil Sporen- anstatt Stielzellen bilden als sein Konkurrent. Dies würde ihm in einer Mischung einen evolutionären Vorteil bringen, während es bei klonaler Entwicklung zum Nachteil werden könnte, z.B. wenn die Höhe der Fruchtkörper kleiner als optimal ist. Bei diesem als „obligates Cheating“ bezeichneten Verhalten bilden die Genotypen den gleichen Anteil Sporenzellen, egal ob die Fruchtkörperbildung klonal oder in einer Chimäre stattfindet. Als „fakultatives Cheating“ wird ein Verhalten bezeichnet, welches sich bei einer Chimäre im Vergleich zur klonalen Entwicklung unterscheidet. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn ein Genotyp seine Sporenbildung in einer Chimäre erhöht oder die des Konkurrenten senkt, was bei klonaler Entwicklung nicht der Fall ist (Santorelli *et al.* 2008, Buttery *et al.* 2009). Als „soziale Parasiten“ werden Stämme bezeichnet, welche nur gemeinsam mit einem Partner einen Fruchtkörper bilden können. In klonaler Entwicklung bilden diese ausschließlich Sporen (Ennis *et al.* 2000) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Cheating-Strategien.** Schematische Darstellung der drei Möglichkeiten wie Klone von *D. discoideum* ihren Partner während der gemeinsamen multizellulären Entwicklung betrügen können. Nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Modifiziert nach Strassmann und Queller 2011.

#### 1.1.4.2 Cheating Mechanismen und Kontrolle von Cheatern

Aufgrund der Komplexität der Regulation der multizellulären Entwicklung sind für die Ausbildung eines *Cheater*-Phänotyps viele Mechanismen denkbar. In einer genomabdeckenden Studie aus dem Jahr 2008 konnten über 100 Gene identifiziert werden, deren Knock-out einen fakultativen *Cheater*-Phänotyp hervorruft (Santorelli *et al.* 2008). Die beschriebenen Gene zeigen unterschiedlichste Funktionen wie bspw.: GTPase regulatorische Aktivität, Polyketidsynthese, Nukleotidbindungsaktivität oder Phosphorsäureester-Hydrolase-Aktivität. Einige dieser Aktivitäten sind in die Zell-Zell-Kommunikation, Bildung von Sekundärmetaboliten oder Signaltransduktion involviert. Darüber hinaus sind weitere Mechanismen für das Ausbilden eines *Cheater*-Phänotyps denkbar (Santorelli *et al.* 2013):

- Der frühere Eintritt in die Entwicklung und die damit verbundene frühere Expression von sporenspezifischen Genen (Kuzdzal-Fick *et al.* 2010).
- Eine höhere Teilungsrate während der Entwicklung bspw. durch die Präsenz von mehrkernigen Zellen.
- Kannibalismus und Hemmung der Entwicklung anderer Genotypen, wie in

*Dictyostelium caveatum* beschrieben (Nizak *et al.* 2007).

- Produktion eines zytotoxischen Faktors wie in *Polysphondylium pallidum* beschrieben (Mizutani *et al.* 1990, Mizutani und Yanagisawa 1990).
- Unterbrechung der Zell-Zell-Kommunikationswege, welche das strikte 80:20 Verhältnis von Sporen- zu Stielzellen ermöglichen.

Durch die vermehrte Sporenbildung haben *Cheater* einen entscheidenden evolutionären Vorteil. Daher stellt sich die Frage, warum mit einem Verlierer-Status assoziierte Gene nicht aus der Population eliminiert werden. Im Folgenden werden Verwandtschaftsgrad, Pleiotropie, Fitness und Resistenz als mögliche Wege zur *Cheater*-Kontrolle kurz erläutert.

## VERWANDTSCHAFTSGRAD

Wenn der genetische Verwandtschaftsgrad innerhalb der sozialen Gruppe hoch genug ist, kann die Vermehrung von *Cheatern* kontrolliert werden. Die genetische Verwandtschaft ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein in einem Individuum gefundenes Allel auch in einem anderen Individuum vorhanden ist. Ein Verwandtschaftsgrad von „0“ entspricht einer zufälligen Mischung, wohingegen „1“ eine einheitliche genetische Gruppe anzeigt. Am Beispiel von ChtA konnte gezeigt werden, dass sich dieser soziale Parasit nur bei geringem Verwandtschaftsgrad durchsetzt. Je höher die Frequenz des *Cheaters* in einer Population, desto geringer fiel die Sporenproduktion aus, wodurch ChtA sowie die Wildtypzellen beeinträchtigt wurden. Somit kann sich ChtA nur bei geringem Verwandtschaftsgrad vermehren und würde bei hohem Verwandtschaftsgrad, wie sie in Fruchtkörpern in Feldsammlungen nachgewiesen wurde durch die eigene reduzierte Sporenproduktion benachteiligt und damit scheitern. (Fortunato *et al.* 2003, Gilbert *et al.* 2007, Strassmann und Queller 2011, Levin *et al.* 2015).

Erdproben enthalten oft viele verschiedene Klone von *D. discoideum*, welche einen geringen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Die aus ihnen gebildeten Fruchtkörper aber sind nahezu klonal. Eine Möglichkeit einen hohen Verwandtschaftsgrad zu erreichen, ist es Nicht-Verwandte (bzw. *Cheater*-Stämme) aus der eigenen Gruppe auszuschließen. In *D. discoideum* wird dies über die Zelladhäsionsgene *tgrB* und *tgrC* vermittelt (Ostrowski *et al.* 2008, Benabentos *et al.* 2009). Dabei handelt es sich um hochvariable Gene, deren Sequenzunterschiede sehr stark mit der Segregation von Wildstämmen korrelieren. Während der Aggregationsphase bindet das *tgrC*-Protein an das *tgrB*-Protein und



ermöglicht es der Zelle fremd von nicht-fremd zu unterscheiden (Hirose *et al.* 2011). Auf diese Weise kann sich ein *Loser*-Stamm vor einem vermeintlichen *Cheater* schützen und eine gemeinsame Fruchtkörperbildung, bei welcher der *Cheater* mehr als seinen fairen Anteil Sporen bildet, verhindert werden (Ho *et al.* 2013). Wird *tgrB* oder *tgrC* deletiert, können die Zellen lockere Aggregate bilden, scheitern jedoch an der Bildung fester Aggregate und verteilen sich wieder (Loomis 2014).

### PLEIOTROPIE

Werden mehrere phänotypische Merkmale von ein und demselben Gen hervorgerufen, wird dies als Pleiotropie bezeichnet. Vermittelt ein Gen neben einem kooperativen Phänotyp zusätzlich eine essentielle Funktion kann ein durch Mutation hervorgerufener *Cheater*-Phänotyp nicht überleben, da ihm ebenfalls die essentielle Funktion des Gens fehlt (Foster *et al.* 2004).

### FITNESS

Starke mit Glucose kultivierte Zellen differenzieren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in Sporen als durch Hunger geschwächte Zellen. Ebenso differenzieren durch hohe pH-Werte geschwächte Zellen deutlich seltener zu Sporen (Leach *et al.* 1973, Thompson und Kay 2000a, Castillo *et al.* 2011). Auch konnten zellzyklusabhängige Effekte auf die Ausbildung eines *Cheater*-Phänotyps nachgewiesen werden. Zellen, welche die multizelluläre Entwicklung in der S- oder frühen G2-Phase begannen, differenzierten häufiger zu Stielzellen als Zellen aus der späten G2-Phase, welchen mehr Zeit zum Wachstum und Ressourcen zur Verfügung stand (Gomer und Firtel 1987, Araki *et al.* 1994, Azhar *et al.* 2001). Die Ausbildung eines *Cheater*-Phänotyps wird demnach durch die Phase im Zellzyklus und die damit einhergehenden Fitness-Unterschiede kontrolliert.

### CHEATER-RESISTENZ

Kooperierende Stämme können „Resistenzen“ gegen einen *Cheater* entwickeln, ohne selbst zum *Cheater* zu werden. Nach Vermischung eines *Cheater*-Stammes mit einer zufällig mutierten Population konnten *Cheater*-resistente Klone isoliert werden, welche auch im Vergleich mit dem Wildtyp keinen *Cheater*-Phänotyp zeigten (Khare *et al.* 2009).

### 1.1.4.3 Überblick über bekannte *Cheater*-Stämme in *D. discoideum*

Einen Überblick über die bisher beschriebenen *Cheater*-Mutanten gibt der folgende Abschnitt. Der erste im Labor erzeugte *Cheater*-Stamm (ChtA, *cheater A*) wurde bei einem Screening nach Mutanten isoliert, die in einer gemischten Population vorrangig Fruchtkörper bilden (Ennis *et al.* 2000). Bei klonaler Entwicklung ist dieser Stamm nicht in der Lage, einen Fruchtkörper zu bilden, während er in einer Chimäre einen deutlich größeren Anteil an Sporenzellen differenzieren kann. Somit ist er ein sozialer Parasit. Wildtypzellen, welche bereits sporenzellspezifische Gene exprimieren, werden von ChtA dazu gebracht, in tote Stielzellen zu differenzieren. ChtA selbst bildet im chimären Fruchtkörper keine Stielzellen. Das in ChtA zerstörte Gen *fbxA* codiert u.a. für ein F-Box-Protein, welches ein Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems ist. Somit ist ChtA nicht in der Lage, bestimmte Target-Proteine abzubauen. Diese scheinen bspw. eine wichtige Rolle an der Regulation des Verhältnisses von Sporen- zu Stielzellen sowie deren räumlicher Verteilung während des *Slug*-Stadiums zu spielen (Dao *et al.* 2000, Ennis *et al.* 2003).

In einem Screening nach *Cheater*-Mutanten, welche bei klonaler Entwicklung ebenfalls normale Fruchtkörper bilden können (fakultative *Cheater*), wurde der Stamm ChtB isoliert (Santorelli *et al.* 2008) (LAS1). Bei klonaler Entwicklung hat ChtB eine höhere Expression des Präsporengens *cotB* als sein Elternstamm. Gleichzeitig hindert ChtB in einer gleichteiligen Mischung die Wildtypzellen daran, in Sporenzellen zu differenzieren, indem die Expression des Präsporengens *cotB* in Wildtypzellen reduziert wird. Somit bildet ChtB ca. 60 % der Sporen einer Chimäre. Darüber hinaus konnten keine Fitness-Nachteile bei ChtB festgestellt werden (Morphologie, Verdopplungszeit, Sporenproduktion, Keimfähigkeit), welche die Ausbreitung von *Cheatern* in einer Population verhindern könnten. Die Verdopplungszeit bei axenischem Wachstum in HL5-Medium ist im Vergleich zu AX4 leicht erhöht. Das in ChtB zerstörte Gen war bis dato nicht näher beschrieben und wurde in Analogie zum ChtA-Mutanten *chtB* genannt. (Santorelli *et al.* 2013)

Ein weiterer fakultativer *Cheater* ist ChtC. Dieser Stamm wurde ebenfalls durch Santorelli und Kollegen entdeckt (Santorelli *et al.* 2008) (LAS5) und von Khare *et al.* näher beschrieben (Khare und Shaulsky 2010). In einer Chimäre kann die ChtC-Mutante die Differenzierung der eigenen Prästielzellen nicht aufrechterhalten, was dazu führt, dass einige frühere Prästielzellen zu Präsporenzellen transdifferenzieren. Darüber hinaus

wird durch die ChtC-Mutante die Prästielzelldifferenzierung in den Wildtypzellen erhöht. In einer gleichteiligen Mischung mit Wildtypzellen bildet ChtA somit ca. 57 % der Sporen. Bei klonaler Entwicklung hat dieser Defekt jedoch keinen Einfluss auf die Morphologie der Fruchtkörper oder die Keimfähigkeit der Sporen. Die Expression bestimmter später stielzellspezifischer Gene ist in ChtC eingeschränkt (Khare und Shaulsky 2010). Das in ChtC zerstörte Gen (*chtC*) codiert für ein 75 kDa großes Protein mit einer Signalpeptidsequenz sowie einer transmembranären Domäne am N-Terminus. Das Gen wird während der gesamten multizellulären Entwicklung mit einem Maximum bei 12 Stunden exprimiert. Im Fingerstadium ist die *chtC* mRNA in allen Zellen gleichmäßig verteilt nachweisbar. Während der Bildung des Stiels konzentriert sich die *chtC*-Expression auf den Bereich unterhalb des Sporenkopfes. Damit ist *chtC* das am meisten in der Stielregion angereicherte Gen sowie eines der wenigen beschriebenen Gene mit Einfluss auf die Entwicklung anderer Zelltypen.

Die Studie von Santorelli *et al.* konnte fünf weitere *Cheater*-Mutanten mit intragenischen Insertionen finden, von denen bisher keine näher untersucht wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine zufällige Insertion in das Polyketidsynthasegen *pks26* einen *Loser*-Phänotyp bewirkt. Wenn das Ausbleiben des *pks26*-spezifischen Polyketids für die Ausbildung des *Loser*-Phänotyps ursächlich ist, könnte damit der Einfluss eines Sekundärmetaboliten auf das Kooperationsverhalten von *D. discoideum* bewiesen werden.

## 1.2 Naturstoffe aus *D. discoideum*

Seit über 80 Jahren wird *D. discoideum* in verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen als Modellorganismus genutzt. Dabei spielte die Identifikation von Sekundärmetaboliten in *D. discoideum* eine eher untergeordnete Rolle. Dennoch wurde eine nicht unerhebliche Zahl an Sekundärmetaboliten beschrieben (vgl. Abbildung 6). Erst mit der Sequenzierung des Genoms im Jahr 2005 wurde das vollständige biosynthetische Potential und damit eine Vielzahl noch nicht identifizierter potentieller Sekundärmetaboliten dieser sozialen Amöbe offen gelegt (Eichinger *et al.* 2005).

Die Beteiligung von Sekundärmetaboliten an der komplexen Regulation der multizellulären Entwicklung ist nachgewiesen (Thompson und Kay 2000b, Narita *et al.* 2014). Wie oben erwähnt, erzeugt die Insertion in das Polyketidsynthasegen *pks26* einen *Loser*-Phänotyp (Santorelli *et al.* 2008). Aus diesem Grund liegt ein Fokus dieser Arbeit

auf der Identifizierung des *pks26*-Biosyntheseproduktes und dessen Einfluss auf das Kooperationsverhalten.

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über Polyketide, deren Biosynthese sowie die daran beteiligten Enzyme. Anschließend werden bekannte Sekundärmetaboliten von *D. discoideum* vorgestellt und auf zwei Moleküle detaillierter eingegangen.

### 1.2.1 Polyketide

Polyketide stellen eine der strukturell vielfältigsten Gruppen von Naturstoffen dar. Als Produkte des Sekundärstoffwechsels sind sie für das Wachstum und die Entwicklung des Individuums entbehrlich, können jedoch unentbehrlich für den Fortbestand der Art sein, wenn sie einen Selektionsvorteil mit sich bringen. (Hänsel und Sticher 2010) Die Fähigkeit zur Biosynthese bestimmter Sekundärmetaboliten ist nicht allgemein verbreitet, sondern auf einzelne Organismen(-gruppen) beschränkt. Vielfach findet die energieaufwändige Biosynthese nur in bestimmten Entwicklungsphasen oder unter Einfluss spezifischer Reize statt (Hänsel und Sticher 2010). Der Begriff Polyketide wurde von John Norman Collie geprägt und umfasste in seiner ursprünglichen Bedeutung Substanzen, welche Polyketomethylen-Gruppen  $(\text{CH}_2\text{-CO})_n$  enthielten (Collie 1907). Heute werden Polyketide über ihren gemeinsamen Biosyntheseweg definiert, bei dem eine Startereinheit – im einfachsten Fall Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) – in mehreren Schritten mit einer Verlängerungseinheit wie Malonyl-Coenzym A (Malonyl-CoA) unter Kondensation verlängert wird. Als Zwischenprodukt entsteht eine Polyketosäure mit den für Polyketiden charakteristischen  $\text{—CH}_2\text{CO—}$ Gruppen (Bentley und Bennett 1999). Die Verfügbarkeit unterschiedlichster Startermoleküle sowie die weit verbreiteten postbiosynthetischen Modifikationen erklären, dass Polyketide trotz ihrer einheitlichen Biosynthese unterschiedlichste Stoffgruppen wie beispielsweise Polyphenole, Flavonoide, Anthrachinone, Makrolide, Polyene und Polyether umfassen.

### 1.2.2 Polyketidsynthasen

Bei Polyketidsynthasen (PKS) handelt sich um große Proteinkomplexe, welche die einzelnen Reaktionsschritte mit Hilfe unterschiedlicher funktioneller Domänen katalysieren. Eine minimale PKS besteht aus einer  $\beta$ -Ketosynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP). Meist sind weitere Domänen mit reduzierenden Aktivitäten wie Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und

Enoylreduktase (ER) vorhanden sowie eine Methyltransferase (MT). PKS werden abhängig von ihrer Struktur in drei Typen untergliedert. Darüber hinaus werden sie aufgrund ihrer Arbeitsweise unterschieden. Während iterative PKS mehrere Verlängerungszyklen mit einem Modul durchführen, verwenden nicht iterative PKS jedes Modul nur einmal.

Bei Typ-I-PKS sind die einzelnen Domänen linear angeordnet und kovalent miteinander verknüpft, so dass sie große multifunktionale Enzyme darstellen. Nicht iterative Typ-I-PKS sind aus mehreren aneinander gereihten katalytischen Modulen bestehende Megasyntasen und wurden bisher hauptsächlich in Prokaryoten nachgewiesen. Da jedes Modul üblicherweise nur für einen Elongationsschritt verantwortlich ist, korreliert die Zahl der Module mit der Zahl der ausgeführten Erweiterungszyklen, was eine Vorhersage der erzeugten Polyketidstrukturen ermöglicht (Fischbach und Walsh 2006). Iterative Typ-I-PKS wurden bisher vorrangig in Eukaryoten wie Pilzen und der Amöbe *D. discoideum* nachgewiesen (Cox 2007, Zucko *et al.* 2007). Sie sind aus einem einzigen Modul aufgebaut und werden je nach Anwesenheit von  $\beta$ -Keto-Reduktase-Domänen in nicht reduzierende, teilweise reduzierende und hoch reduzierende PKS untergliedert. Bei jedem Elongationszyklus können die vorhandenen  $\beta$ -Keto-Reduktase-Domänen anders verwendet werden. Der dem Verwendungsmuster zugrunde liegende Mechanismus ist bisher größtenteils unbekannt, wodurch eine Vorhersage der erzeugten Polyketidstrukturen nicht möglich ist (Hertweck 2009a).

Typ-II-PKS bilden dissoziierbare Komplexe meist monofunktionaler Enzyme und wurden bisher nur in Prokaryoten nachgewiesen. Sie bestehen aus zwei KS-Domänen ( $KS_\alpha$  und  $KS_\beta$ , welche auch als „chain length factor“ bezeichnet wird) und einem ACP. Die Struktur der gebildeten Polyketide wird durch weitere Domänen wie Ketoreduktasen, Zyklasen und Aromatasen bestimmt (Hertweck *et al.* 2007).

Typ-III-PKS sind homodimere Proteine vom Chalkonsynthase-Typ. Sie wurden bisher hauptsächlich in Pflanzen, aber auch in Prokaryoten und Pilzen nachgewiesen (Moore und Hopke 2001, Pfeifer *et al.* 2001, Seshime *et al.* 2005) Sie sind multifunktional und nicht in Domänen organisiert. Sie führen alle Schritte der Polyketid-Biosynthese von der Wahl des Starters über die Elongation bis zur Zyklisierung aus (Hertweck 2009b, Pandith *et al.* 2020).

Die Grenzen dieser Klassifizierung sind jedoch fließend (Shen 2003, Müller 2004, Chen

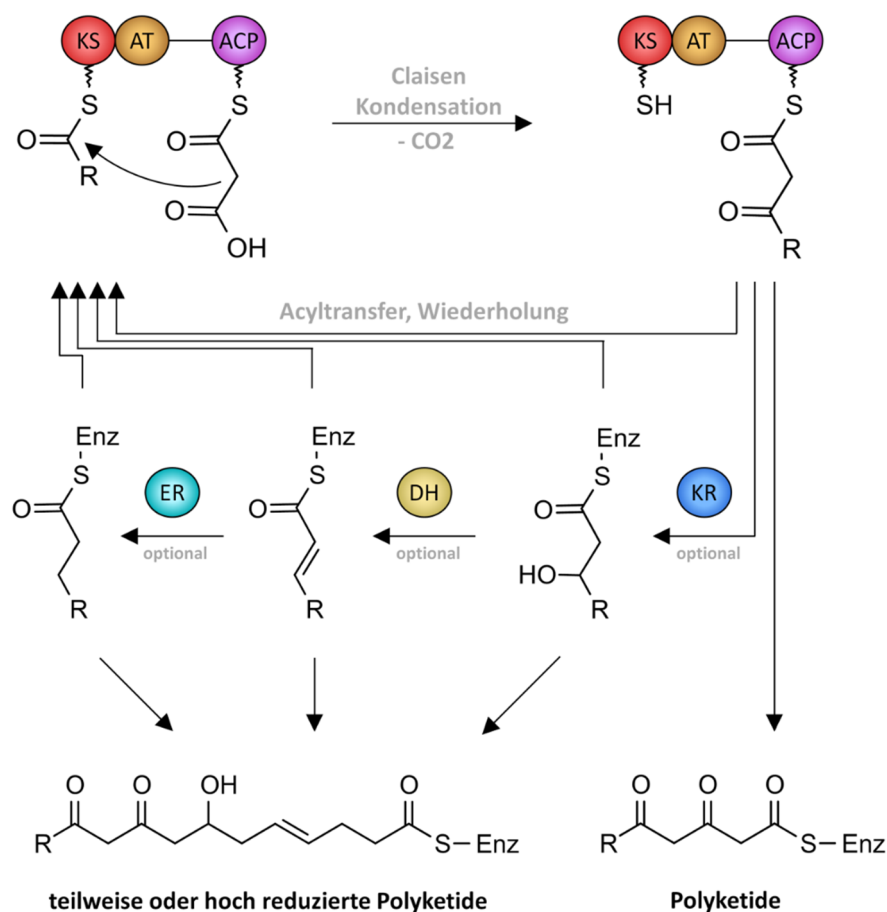
und Du 2016). Es existieren auch Mischformen bzw. Hybride aus Fettsäuresynthasen und PKS (Austin *et al.* 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nicht-iterative modulare PKS durch Mehrfachverwendung einzelner Module längere Kette prozessieren können (Wilkinson *et al.* 2000, Hong *et al.* 2016).

### 1.2.3 Polyketid-Biosynthese

Nach den ersten frühen Theorien von J. N. Collie, welche seinerzeit leider nicht weiterverfolgt wurden, nahm erst 48 Jahre später Robert Robinson die Gedanken über den Biosyntheseweg der Polyketide wieder auf (Robinson 1955). Seine Hypothese vom Aufbau der Polyketide aus Polyketonen wurde von seinem Schüler Arthur Birch weiterentwickelt und durch Fütterungsversuche mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Acetat-Einheiten untermauert (Birch und Donovan 1953, Birch *et al.* 1955) Der heute als Collie-Birch-Polyketidhypothese bekannte Aufbau der Polyketide aus Acetat-Einheiten führte schließlich zu breiter Akzeptanz (Staunton und Weissman 2001). Demnach ähnelt die Biosynthese von Polyketiden der Fettsäurebiosynthese in erheblichem Maß. Aus einfachen Vorstufen wie Acetyl-CoA und Malonyl-CoA werden durch sich wiederholende decarboxylierende Claisen-Thioester-Kondensationen Polyketide bzw. Fettsäuren aufgebaut. Während bei der Fettsäurebiosynthese ein vollständig gesättigtes Acyl-Rückgrat entsteht, sind die Reduktionsschritte bei der Polyketid-Synthese optional (Staunton und Weissman 2001).

Um eine Verknüpfung mit dem Substrat zu gewährleisten, ist vor der eigentlichen Polyketidbiosynthese eine Aktivierung des ACP notwendig (Weissman 2005, Beld *et al.* 2014). Dafür wird Coenzym A in einer von Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) katalysierten Reaktion kovalent an das ACP gebunden. Für einen Kettenverlängerungsschritt sind mehrere katalytische Reaktionen notwendig. Im ersten Schritt wird die Startereinheit Acetyl-CoA durch die AT-Domäne auf das aktivierte ACP übertragen (Abbildung 5). Sobald die Startereinheit auf die KS-Domäne übergegangen ist, überträgt die AT-Domäne die Verlängerungseinheit Malonyl-CoA auf das aktivierte ACP (Herbst *et al.* 2018). Nun katalysiert die KS eine Claisen-Thioester-Kondensation zwischen der Verlängerungseinheit und dem Starter, so dass unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung ein  $\beta$ -Ketoester resultiert. Dabei wird die KS entladen, so dass der Zyklus von Neuem beginnen kann. Optional kann sich eine  $\beta$ -Keto-Prozessierung durch die Ketoreduktase, Dehydratase oder Enoylreduktase anschließen. Somit wird die  $\beta$ -ständige Ketogruppe beibehalten oder zur

Hydroxyl-, Methin- oder Methylengruppe prozessiert. Durch die Möglichkeit einer unvollständigen reduktiven Schleife erhöht sich die Diversität in den Produkten enorm. Nach Abschluss der ersten Runde der Polyketidkettenverlängerung beginnt der Zyklus von Neuem mit dem bisher gebildeten Zwischenprodukt sowie Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit. Hat das entstehende Polyketid-Rückgrat seine definierte Kettenlänge erreicht, wird es durch Lactonisierung, Hydrolyse oder reduktive Freisetzung von der PKS abgetrennt (Kohli und Walsh 2003, Bailey *et al.* 2007). Danach folgt oftmals eine Zyklisierung des Grundgerüsts. Durch C-C-Bindungsspaltungen und Umlagerungen sowie sekundäre Zyklisierungen können sich im Anschluss neue Kohlenstoff- und Heterozyklen bilden. Abschließend kann die Struktur des entstehenden Polyketids durch Post-PKS-Prozessierungen wie Glykosylierungen, Alkylierungen, Acylübertragungen oder Hydroxylierungen modifiziert werden (Rix *et al.* 2002).

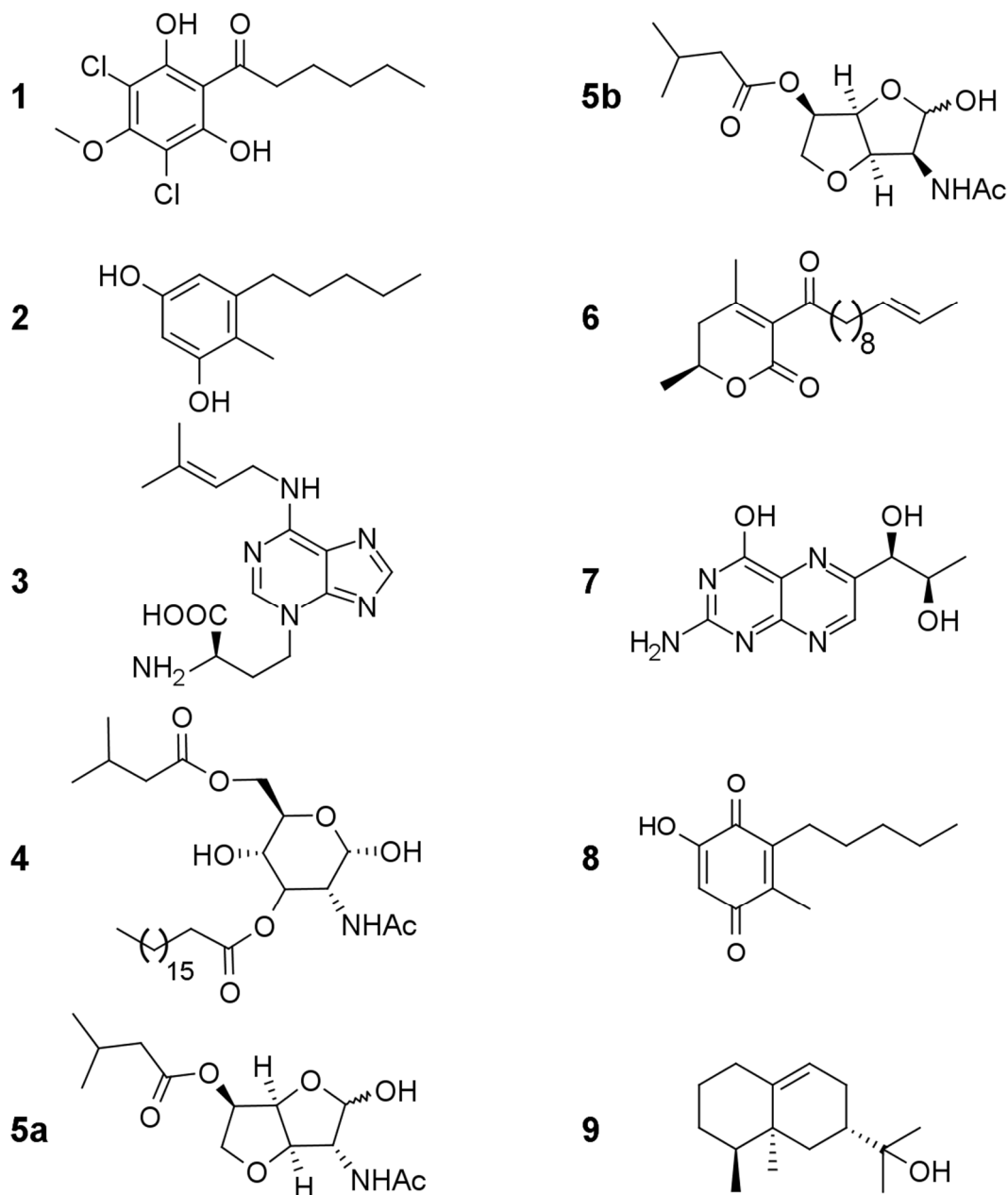


**Abbildung 5: Grundprinzipien der Polyketid-Biosynthese.** Schematische Darstellung der Kettenverlängerung während der Polyketid - Biosynthese inklusive optionaler β-Keto-Prozessierung. **KS** - β-Ketosynthase, **AT** - Acyltransferase, **ACP** - Acyl-Carrier-Protein, **KR** - Ketoreduktase, **DH** - Dehydratase, **ER** - Enoylreduktase, **Enz** - Enzym, Modifiziert nach Hopwood 1997 und Hertweck 2009b.

#### 1.2.4 *D. discoideum* als Produzent von Sekundärmetaboliten

Durch weitere Analysen der Sequenzdaten von *D. discoideum* konnten 45 PKS-Gene sowie neun Terpensynthase-Gene identifiziert werden (Zucko *et al.* 2007, Chen *et al.* 2016). Zusätzlich wurden zwölf O-Methyltransferasen, welche post-biosynthetische Modifikationen ausführen können, beschrieben (Ghosh *et al.* 2008) sowie der Nachweis einer Cytochrom P450-Beteiligung an der Sekundärstoffbiosynthese erbracht (Chen *et al.* 2019). Neben den Polyketiden *Differentiation inducing factor-1* (DIF-1) und 4-Methyl-5-pentylbenzen-1,3-diol (MPBD), die im Folgenden näher beschrieben werden, konnten Sekundärmetaboliten aus Fruchtkörpern bzw. Sporen (L-Discadenin (Obata *et al.* 1973), Dictyoglucosamin B (Kikuchi *et al.* 2002), Furanodictin A und B (Kikuchi *et al.* 2001), Dictyopyron A (Takaya *et al.* 2000)), vegetativen Zellen (Dictyopterin (KLEIN *et al.* 1990)), Mediumüberständen (Dictyochinon (Takaya *et al.* 2014)) sowie aus dem volatilen Bouquet entwickelnder Zellen (Discoidol, Discodiene (CYP-Abbauprodukt von Discoidol) (Chen *et al.* 2019)) isoliert werden (Abbildung 6).





**Abbildung 6: Sekundärmetabolite aus *D. discoideum*.** 1 DIF-1, 2 MPBD, 3 L-Discadenin, 4 Dictyoglucosamin B, 5a Furanodictin A, 5b Furanodictin B, 6 Dictyopyron A, 7 Dictyopterin, 8 Dictyochinon, 9 Discoidol.

Viele der beschriebenen Sekundärmetaboliten wirken als Entwicklungsfaktoren, teilweise konnte auch eine entwicklungsabhängige Genexpression/Biosynthese nachgewiesen werden (Loomis 2014, Araki und Saito 2019)

### 1.2.5 Die Entwicklungsfaktoren DIF-1 und MPBD

Zu den am besten untersuchten Sekundärmetaboliten aus *D. discoideum* zählen das in der späten Aggregationsphase sekretierte Morphogen DIF-1 (Morris *et al.* 1988b) und der in der frühen Aggregation sowie zu Beginn der Fruchtkörperbildung produzierte

Entwicklungsfaktor MPBD (Saito *et al.* 2006) (Abbildung 6).

DIF-1 wurde bereits 1976 als diffusionsfähiger Faktor aus Pufferüberständen entwickelnder Zellen isoliert (Town *et al.* 1976). Trotz umfassender Versuche konnten zunächst nur Substanzmengen im Nanogramm-Bereich isoliert werden. Mit einer Menge von 50 µg gelang später die Aufklärung der Struktur (Morris *et al.* 1988a). Die Biosynthese von DIF-1 erfolgt in drei Schritten (Kay 1998). Im ersten Schritt erfolgt die Bildung des Polyketid-Rückgrats über PKS37, eines der beiden TypI/TypIII hybriden PKS-Enzyme in *D. discoideum* (Austin *et al.* 2006). Anschließend erfolgt eine Dichlorierung des aromatischen Ringes über eine Flavin-abhängige Halogenase, welche durch *chlA* codiert wird (Neumann *et al.* 2010). Im finalen Schritt wird über die *O*-Methyltransferase *DmtA* eine Methylgruppe auf die zu den Chlorgruppen orthoständige OH-Gruppe übertragen (Thompson und Kay 2000b). Die für die Biosynthese verantwortlichen Gene sind in einem Cluster auf Chromosom 5 kodiert und weisen ein identisches Expressionsprofil auf. Die Gene *pks37* und *chlA* liegen in direkter Nachbarschaft und teilen sich einen gemeinsamen Promotor, was eine gleiche transkriptionelle Regulation nahe legt (Neumann *et al.* 2010). DIF-1 wird in der Präsporenregion der *Slugs* biosynthetisiert, induziert die Bildung von Prästielzellen und ist an der Bildung der Baselscheibe sowie der den Sporenkopf haltenden Lower Cup-Zellen beteiligt (Saito *et al.* 2008). Für DIF-1 und seine Derivate konnten verschiedene biologische und pharmakologische Wirkungen nachgewiesen werden, was dieses Molekül zu einer sehr interessanten Leitstruktur für die Arzneistoffentwicklung macht (Kubohara und Kikuchi 2018).

In den Untersuchungen des *dmtA*-Knock-Out Stammes, welcher keine nachweisbaren Mengen an DIF-1 produziert, konnten weitere stielzellinduzierenden Aktivitäten detektiert werden. Die Strukturaufklärung scheiterte zunächst jedoch an den geringen biosynthetisierten Substanzmengen (Serafimidis und Kay 2005). Nach einer deutlichen Erhöhung der extrahierten Zellzahl konnte MPBD aus entwickelnden Zellen mit Hilfe eines Adsorberharzes aufgereinigt und strukturell aufgeklärt werden (Saito *et al.* 2006). Zeitgleich wurde MPBD aus Fruchtkörpern von *D. mucoroides* isoliert (Kikuchi *et al.* 2006). Auf der Basis von *in vitro* Fütterungsversuchen wurde die Biosynthese durch das TypI/TypIII-hybride Enzym PKS1 vorgeschlagen (Ghosh *et al.* 2008) und später durch Supplementationsexperimente sowie dem Vergleich eines *pks1*-Knock-Out Stammes mit AX2 bestätigt (Narita *et al.* 2011). Die Expression von *pks1* zeigt einen starken Höhepunkt in der frühen Entwicklung sowie einen leichten Anstieg während der

Fruchtkörperbildung (Austin *et al.* 2006, Narita *et al.* 2011). Der *pks1*-Knock-Out zeigt eine um drei Stunden verzögerte Aggregation, und eine fehlende chemotaktische Reaktion auf cAMP-Pulse. Darüber hinaus sind nur 20 % der Sporen vollständig ausgebildet. Dies deutet auf eine Rolle von MPBD im cAMP-Signalweg während der Aggregation hin (Narita *et al.* 2014). Der Einfluss von MPBD auf die Sporenreifung wird über den membranständigen Rezeptor CrlA vermittelt und ist unabhängig von der Funktion während der Aggregation (Anjard *et al.* 2011, Kondo *et al.* 2019). In Struktur-Wirkungs-Studien wurden antimikrobielle und zytostatische Eigenschaften nachgewiesen (Kikuchi *et al.* 2006, Murata *et al.* 2016).

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Annotation des Genoms von *D. discoideum* offenbarte die überraschend hohe Anzahl von 40 funktionalen Genen für Polyketidsynthasen und ließ damit ein großes Potenzial für die Biosynthese von Sekundärstoffen vermuten. Polyketide können als Differenzierungsfaktoren entscheidende Funktionen übernehmen, was bereits mehrfach gezeigt wurde. Die Regulation der Biosynthese von Sekundärmetaboliten ist oft sehr komplex, da dieser energieaufwändige Prozess nur bei Bedarf stattfinden soll. Aus diesem Grund werden viele Gene für die Produktion von Sekundärmetaboliten unter Standard-Kultivierungsbedingungen im Labor nicht exprimiert. Ziel des ersten Teils dieser Dissertation ist es daher, durch systematische Änderung der Kultivierungsparameter Bedingungen zu finden, unter denen die Biosynthese von Sekundärmetaboliten aktiviert ist. Dabei sollen vegetative Zellen als auch differenzierende Zellen untersucht werden. Nach Extraktion von Kulturüberstand und Zellen sollen die Extrakte analysiert und neue Substanzen durch Vergleich mit der Standardbedingung identifiziert werden. Der zweite Teil dieser Arbeit legt einen Fokus auf PKS-Gene in *D. discoideum*, die während der multizellulären Entwicklung eine differentielle Expression aufweisen. Es soll die Funktion von mindestens einem entwicklungs- und/oder cAMP regulierten PKS-Gen untersucht werden. Mittels homologer Rekombination sollen Knock-Out-Mutanten von interessanten PKS-Genen erzeugt werden, so dass durch Vergleich von induzierter Bedingung und Knock-Out Rückschlüsse auf das Biosyntheseprodukt gezogen werden können. Da bei der Isolierung entwicklungsregulierter Polyketide während der Entwicklungsphase von einer niedrigen Biosyntheserate einerseits und einem hohen experimentellen Aufwand andererseits auszugehen ist, sollen interessante PKS-Gene

während der Wachstumsphase konstitutiv überexprimiert werden. Ziel ist es durch Vergleich des Wildtyps mit Knock-Out- und Überexpressionsmutanten Sekundärmetaboliten mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu identifizieren. In einem letzten Schritt sollen Phänotypen der erzeugten Mutanten im vegetativen Wachstum sowie während der multizellulären Entwicklung charakterisiert werden, um Erkenntnisse über physiologische Funktionen der analysierten Polyketidsynthasen zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Typenbezeichnung (Firma, Firmensitz)
Analysenwaage	A 210 P, BP 210 P und RC 210 P (Sartorius, Göttingen)
Blockthermostate	Combi-Therm CH100 (Peqlab, Erlangen) 91-D1100 (Peqlab, Erlangen) MHR 11 (HLC Biotech, Beveland)
Blotapparatur	20 x 20 cm Semi-Dry-Blotter (Biostep, Jahnsdorf)
Dampfsterilisator (Autoklav)	Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
Elektroporator	Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Gefriertrocknungsanlage	Freezemobile (Virtis, Gardiner, NY, USA) Alpha 2-4 (Christ, Osterode)
Gelelektrophorese DNA	PerfektBlue™ Gelsystem Mini (Peqlab, Erlangen)
Gelelektrophorese Protein	PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin M (Peqlab, Erlangen)
Geldokumentation	Gel Jet Imager 2004 (Intas, Göttingen)
Inkubator (Schrank)	TS 606-G/4-i (WTW, Weilheim) B20 (Heraeus, Hanau)
Inkubator (Schüttler)	Multitron Standard 2 (Infors, Einsbach)
Mikropipetten	VWR Signature™ Pipettor 0,1 – 2 µl, 2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl (VWR International, Darmstadt)
Mikroskop + Kamera	Binokular-Mikroskop SZX9 (Olympus, Shinjuko, Tokio, Japan) Mikroskop CKX 41 (Olympus, Shinjuko, Tokio, Japan) Kamera Evolution® MP COLOR (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)

<b>Gerät</b>	<b>Typenbezeichnung (Firma, Firmensitz)</b>
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Real-Time-PCR-System	Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
Rotationsverdampfer	VV 2000 (Heidolph, Kehlheim) mit Pumpsystemen CVC2 (Vacubrand, Werkheim) oder rotavac control (Heidolph, Kehlheim)
Schüttelwasserbad	SW22 (Jalubo, Seelbach)
Schüttler	KS 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen)
Sterilwerkbank	MRF-B 1900 GS (STEAG Reinraumtechnik, Pliezhausen)
Thermocycler	Primus 96 advanced (Peqlab, Erlangen), T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
Vakuumpzentrifuge	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Waagen	E2000D, BA 6100 und PT 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasseraufbereitung	Seradest SD2800 (SERAL Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach)
Zellzählssystem	Casy Zellzähler Modell DT (Schärfe System, Reutlingen)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5702 (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg) Rotina 420 R (Hettich, Tuttlingen) Avanti® J-E (Beckmann Coulter, Brea, CA, USA)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
CL-Xposure® Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektroporationsküvette 1 mm, 2 mm, 4 mm)	Peqlab, Erlangen

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
Film_Entwickler GBX Entwickler	Kodak, Rochester, NY, USA
Film-Fixierer GBX	Kodak, Rochester, NY, USA
Filterpapier 3 MM Whatman	GE Healthcare, Chicago, IL USA
Multiwellplatte (24 Well)	Greiner Bio-One, Ficklenhausen
Nitrocellulose-Membran Amersham Hybond™-N <sup>+</sup>	GE Healthcare, Chicago, IL USA
Papierfilter (5-8µm)	VWR International, Darmstadt
Petrischalen	Greiner Bio-One, Ficklenhausen
Pipettenspitzen, unsteril	Greiner Bio-One, Ficklenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Ficklenhausen
Rotilabo® Spritzenfilter steril 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Sterile Einmalpipetten (5, 10 ml)	Greiner Bio-One, Ficklenhausen
Sterile Einmalskalpelle	Aesculap, Tuttlingen
LC-Kurzgewindeflaschen mit Zubehör	VWR International, Darmstadt

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien, Antibiotika

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Serva, Heidelberg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (X- $\alpha$ -Gal)	Roth, Karlsruhe
50× Denhardt's-Lösung	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Blasticidin S	Invitrogen / Thermo Fisher

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
	Scientific, Waltham, MA, USA
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
D-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
EvaGreen™ Flurescent DNA Stain	Jena Bioscience, Jena
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin 86 %	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
HL5-Medium	Formedium™, Hunstanton, Norfolk, UK
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Laemmli-Puffer (2x)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
ROX Referenz Dye	Jena Bioscience, Jena
SIH-Medium	Formedium™, Hunstanton, Norfolk, UK
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton	Serva, Heidelberg



## 2.1.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Name	Firma / Firmensitz
10x Low-TE Puffer	100 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; auf pH 8 einstellen
10x TBS	200 mM Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,4
2x HBS	274 mM NaCl / 10 mM KCl / 1,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 11 mM D-Glucose / 42 mM HEPES / pH 7 einstellen und steril filtrieren
20x SSC	3 M NaCl / 300 mM Natriumcitrat
50x Phosphatpuffer	735 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / pH 5,7 einstellen und autoklavieren
Anodenpuffer I	300 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4
BSA-Blockierlösung	3 % BSA in TBS-T
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl
Elektroporationspuffer (für <i>D. discoideum</i> )	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 50 mM D-(+)-Saccharose / pH 6,1 einstellen und autoklavieren
Hybridisierlösung (50 ml)	25 ml Formamid / 12,5 ml 20x SSC / 5 ml 10 % SDS / 1 ml 50x Dennhardt's - Lösung / 6,5 ml dH <sub>2</sub> O / 5 µg/ml Heringssperma-DNA
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 40 mM 6-Amino-Hexansäure; 20 % Methanol; pH 9,4
Lysepuffer (genomische DNA)	0,32 M Saccharose / 10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 5 mM MgCl <sub>2</sub> / 1 % Triton X-100
Milch-Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T
Neutralisierlösung	0,5 M Tris HCl pH 7,5 / 1,5 M NaCl / 1 mM EDTA
Prä-Hybridisierlösung (50 ml)	25 ml Formamid / 12,5 ml 20x SSC, 5 ml 10 % SDS / 5,5 ml dH <sub>2</sub> O / 2 ml 50x Dennhardt's - Lösung / 50 µg/ml Heringssperma - DNA (vor Zugabe 5 min, 95°C)
Pufferlösung A (genomische DNA)	10 mM Tris HCl pH 7,5 / 10 mM EDTA

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
Pufferlösung B (genomische DNA)	10 mM Tris HCl pH 7,5 / 0,7 % SDS
Schocklösung (2 ml)	1 ml 2× HBS / 0,4 ml dH <sub>2</sub> O / 0,6 ml 60 % (m/V) Glucose
Southern-Basispuffer (SB-Puffer)	0,1 M Tris HCl pH 7,5 / 0,15 M NaCl
Sporenpuffer	1× Phosphatpuffer / 1 % (V/V) Triton X-100
TBS-T	1xTBS; 0,05 % Tween 20

### 2.1.5 Nährmedien

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 l Nährmedium. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium 18 g/l Agar zugegeben. Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Medien autoklaviert

Tabelle 5: Nährmedien

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung / Herstellung</b>
FM-Medium	19,3 g FM-Granulat
HL5-Medium	22g HL5-Pulver; nach Autoklavieren Zugabe von 25 ml 40 % Glucose-Lösung
LB-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl
MES-Medium	10 g Bacto-Pepton; 5 g Hefeextrakt; 1,3 g MES; pH 7,1 einstellen
Phosphat-Agar	20 ml 50x Phosphatpuffer; pH 6,5 einstellen
SIH-Medium	20,3 g SIH-Pulver, steril filtrieren (Han <i>et al.</i> 2004)
SOC-Medium	5 g Trypton; 5 g Hefeextrakt, 1 g Glucose

## 2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Name	Beschreibung
Anti-Aktin	Primärer, polyklonaler, in Kaninchen entwickelter Antikörper zur Detektion von Gesamt-Aktin von <i>D. discoideum</i> , Verdünnung im Western Blot 1:3000 (Frankel <i>et al.</i> 1990)
Anti-Flag	Primärer, muriner, monoklonaler IgG1/kappa Antikörper zur Detektion von N- oder C-terminalen DYKDDDDK-Marker (Flag-Tag), Verdünnung im Western Blot 1:1000, #A00013, Genscript, Piscataway, NJ, USA
Anti-Mouse IgG, HRP gekoppelt	Sekundärer, in Pferden entwickelter Antikörper zur Detektion von murinen primären Antikörpern, Verdünnung im Western Blot: 1:2000, #7076, Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Rabbit IgG, HRP gekoppelt	Sekundärer, in Ziegen entwickelter Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern aus Kaninchen, Verdünnung im Western Blot 1:2000, #7074, Cell Signaling, Danvers, MA, USA

## 2.1.7 Kits, Enzyme und Größenstandards

Tabelle 7: Kits, Enzyme, Größenstandards

Name	Firma / Firmensitz
Agarose Gel Extraction Kit	Jena Bioscience, Jena
Biotin PCR Labeling Core Kit	Jena Bioscience, Jena
ECL® Advance Western Blotting Detection-Kit	GE Healthcare, Chicago, IL USA
High Fidelity Polymerase Kit	Jena Bioscience, Jena
Omniscript® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T® Vector System	Promega, Madison, WI, USA
QIAquick® Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase-Set	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

<b>Name</b>	<b>Firma / Firmensitz</b>
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Calf-Intestin-Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Proteinase-K	Fermentas / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Ribonuklease-A	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4-DNA-Ligase	Fermentas / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Streptavidin-HRP	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taq-Polymerase	Jena Bioscience, Jena
Biotinylated 2-Log DNA-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt/Main
pUC19 BsiSI (HpaII) Digest	Jena Bioscience, Jena
Lambda DNA/PstI Digest	Jena Bioscience, Jena
Low-Range DNA-Ladder	Jena Bioscience, Jena
Mid-Range DNA-Ladder	Jena Bioscience, Jena
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

### 2.1.8 Mikroorganismen

Tabelle 8: *Escherichia coli* K-12 Stämme

<b>Stamm</b>	<b>Beschreibung</b>
DH5α™	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ-
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-

Tabelle 9: *D. discoideum*-Stämme

Stamm	Beschreibung
AX2	Axenisch wachsende , durch natürliche Selektion erzeugte Mutante (Sussman und Sussman 1967, Watts und Ashworth 1970) des Isolats NC4 (Raper 1935), axeA2, axeB2, axeC2
AX4	Axenisch wachsende, durch natürliche Selektion erzeugte Mutante (Nellen <i>et al.</i> 1984, Knecht <i>et al.</i> 1986) des Isolats NC4 (Raper 1935), axeA1,axeB1,axeC1
Pks26-REMI	In einem <i>Cheater</i> -Screening gefundene <i>Loser</i> -Mutante des Laborstammes AX4 (Santorelli <i>et al.</i> 2008). REMI-Insertion in <i>pks26</i> , axeA1, axeB1, axeC1, pks26-[pBSR1], bsR, bezogen von dictyBase Stockcenter ( <a href="http://dictybase.org/StockCenter/StockCenter.html">http://dictybase.org/StockCenter/StockCenter.html</a> ), Stamm-ID DBS0252645

Für die Isolation von Einzelklonen von *D. discoideum* sowie zur Bestimmung der Sporenkeimfähigkeit wurde *Raoultella planticola* (DSM 3069) verwendet.

### 2.1.9 Softwareprogramme

Tabelle 10: Softwareprogramme

Name	Beschreibung
pDraw1.1.128	Visualisierung, Analyse und Klonierung von DNA-Sequenzen, AcaClone Software ( <a href="http://www.acaclone.com">http://www.acaclone.com</a> )
MxPro–Mx3000P v3.00	qPCR-Software (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
ChemStation Rev. B.02.01	HPLC-Software (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)
Xcalibur™ 4.0	UHPLC-HRAM/MS-Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
XCMS online™ Version 3.7.1	statistische Analyse massenspektrometrischer Daten ( <a href="https://xcmsonline.scripps.edu">https://xcmsonline.scripps.edu</a> )(Tautenhahn <i>et al.</i> 2012, Gowda <i>et al.</i> 2014)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Für das Screening nach positiven Rekombinationsereignissen wurde genomische DNA isoliert, welche zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: „polymerase chain reaction“) geeignet ist. Pellets mit  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in folgendem Puffer resuspendiert:

336  $\mu$ l d H<sub>2</sub>O  
40  $\mu$ l 10x Taq-Polymerase-Puffer  
20  $\mu$ l Triton X-100 (10 %)  
4  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml)

Nach Inkubation bei 56°C für 60 min und Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C wird die Suspension für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l RNase A-Lösung (1 mg/ml) erfolgte der Verdau der RNA bei Inkubation für 30min bei 37°C. Für einen PCR-Ansatz wurden 2-10 $\mu$ l der entstandenen Lösung verwendet.

#### 2.2.1.2 Isolation verdaubarer genomischer DNA

Für die Isolation verdaubarer genomischer DNA werden  $5 \times 10^8$  Zellen bei 4°C und 150 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet in 50 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 ml 10 % Triton-X-100 und einer Inkubation auf Eis für 10 min wurde bei 14.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellkernpellet in 5 ml Pufferlösung A (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5; 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde 5,5 ml Pufferlösung B (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5; 0,7 % SDS) und 30  $\mu$ l RNase A (1mg/ml) zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) und weiterer Inkubation für 60 min bei 55 °C wurden 10 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 25:24:1) zugegeben und vermischt. Von der durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14.000 x g entstandenen oberen wässrigen Phase wurden 8 ml vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden 8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) zugegeben und gemischt. Von der nach

Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 x *g* entstandenen oberen Phase wurden 5 ml abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Durch Zugabe von 12,5 ml 100 % Ethanol und 500 µl 5M NaCl sowie Inkubation über Nacht bei -20 °C wurde die genomische DNA aus der Lösung gefällt. Durch eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 14.000 x *g* wurde eine Pellet erhalten, welches mit 10 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Aufnahme in 400 µl dH<sub>2</sub>O in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol und 40 µl 5M NaCl wurde nach einer erneuten Inkubation bei -20 °C für 30 Minuten die genomische DNA aus der Lösung gefällt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 10.000 x *g* sowie dreimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet vorsichtig bei 37°C getrocknet und zum Abschluss in 400 µl Low-TE Puffer aufgenommen. Die Konzentration der erhaltenen DNA-Präparation wurde durch photometrische Messung bei 260 nm ermittelt.

### **2.2.1.3 Isolation von RNA und Synthese von cDNA**

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen von *D. discoideum* erfolgte mit dem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) unter Verwendung des Protokolls für tierische Zellen. Der optionale Verdau genomischer DNA wurde mit dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente ein Pellet von  $2 \times 10^7$  Zellen, welches zuvor mindestens über Nacht bei -80°C gelagert wurde. Nach der Elution mit  $2 \times 50$  µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) erfolgte im direkten Anschluss mit dem *Omniscript Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Dabei wurden je Reaktion 500 ng RNA sowie ein oligo (dT)<sub>18</sub>-Primer verwendet.

### **2.2.1.4 Quantitative PCR**

Die quantitative PCR (qPCR, engl.: „*quantitive polymerase chain reaction*“) diente der Bestimmung des relativen Expressionslevels einzelner Gene. Als Template wurde eine 1:10 Verdünnung einer wie unter 2.2.1.3 erhaltenen cDNA-Lösung verwendet. Als Referenzgen wurde das Gen *gpdA* verwendet, welches für die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase kodiert. Die dafür verwendeten Primer Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 umspannen ein Intron, so dass eine konventionelle PCR an cDNA und genomischer DNA Produkte unterschiedlicher Größe liefert. Auf diesem Wege konnte eine Verunreinigung des Templates mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die verwendeten Primer

sind im Anhang aufgeführt (Anhang - A - Verwendete OligonukleotideA - Verwendete ).

Die qPCR wurde mit dem Gerät Mx3000P (Stratagene) unter Verwendung eines Taq-Polymerase-Kits (Jena Bioscience), dem Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® (Jena Bioscience) sowie dem Referenzfarbstoff ROX (Jena Bioscience) durchgeführt. Das Temperaturprogramm begann mit einem 10 minütigen initialen Denaturierungsschritt bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit je 45 s Denaturierung bei 95°C, 45 s Hybridisierung bei 55°C und 30 s Elongation bei 68°C. Danach folgte ein einminütiger terminaler Denaturierungsschritt bei 95°C. Anschließend wurde von jeder Probe eine Schmelzkurve aufgenommen, welche zur weiteren Kontrolle des entstandenen Produktes herangezogen wurde. Von jeder Primerkombination wurden Dreifachbestimmungen sowie ein Reaktionsansatz ohne cDNA durchgeführt. Die relative Genexpression im Vergleich zum Referenzgen *gpdA* (*fold change*) wurde anhand der Methode nach Pfaffl berechnet (Pfaffl 2001). Wenn nicht anders angegeben wurden für jedes zu bestimmende Gen drei unabhängige Proben gemessen.

#### **2.2.1.5 SDS-PAGE**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht verwendet und unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli 1970).

Die vorbereiteten Proben wurden 20 min auf Eis aufgetaut, im Verhältnis 1:1 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und bei 10.000 x g zentrifugiert. Ein entsprechendes Volumen des Überstandes wurde anschließend auf die Geltaschen aufgetragen. Für das diskontinuierliche System wurden jeweils frisch hergestellte 4 %ige Polyacrylamid(PAA)-Sammelgele und 10 %ige PAA-Trenngele verwendet. Die Auftrennung fand bei 110 V (Sammelgel) bzw. 150 V (Trenngel) mit 1x SDS-Laufpuffer statt. Nach deren Abschluss folgte ein Transfer der getrennten Proteine auf eine Membran mittels Western-Blot (2.2.1.6). Als Marker kam Page Ruler™ zur Anwendung.

#### **2.2.1.6 Western Blot**

Der im Rahmen dieser Arbeit praktizierte Blot wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt (Kyhse-Andersen 1984). Die Proteine wurden für 1-1,5 Stunden mit 0,8-1,2 mA/cm<sup>2</sup> vom Trenngel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Im Anschluss



wurde die Membran für 60 min mit 3 % BSA in TBS-T-Puffer blockiert und danach über Nacht bei 4°C unter Schwenken mit dem primären Antikörper (0) inkubiert. Nach Abgießen der Antikörperlösung wurde die Membran dreimal mit TBS-T für 15 min gewaschen, wonach ein weiteres Mal mit 5 % Milchpulver in TBS-T blockiert wurde. Die Behandlung mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal mit TBS-T für 30 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem „ECL® Advance Western-Blotting Detection-Kit“ gemäß den Herstellerangaben. Die Expositionszeiten variierten zwischen 10 s und mehreren Stunden.

### **2.2.1.7 Southern Blot mit biotinylierter Sonde**

Für die PCR-Reaktionen zur Erzeugung der biotinylierten Sonde wurde das „Biotin PCR Labeling Core Kit“ (Jena Bioscience) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden fünf parallele Reaktionen mit dem Plasmid pLPBLP-pks26KO als Matrize und den Primern pks26-23 und pks26-24 durchgeführt. Anschließend wurden die Amplifikate über eine Säule aufgereinigt und in 2 Schritten mit je 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

Für einen Ansatz zum Restriktionsverdau genomischer DNA wurden verwendet:

15 µg verdaubare genomische DNA (2.2.1.2)  
10 µl 10-fach Enzym-Puffer  
20 Einheiten Restriktionsenzym  
ad 100 µl dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend eine Ethanol-Fällung durchgeführt und das erhaltene DNA-Pellet in 20 µl Low-TE Puffer resuspendiert.

Die verdaute genomische DNA wurde für ca 4 h bei 80 V in einem Agarosegel mit einer Konzentration von 1 % elektrophoretisch aufgetrennt, wobei der Größenstandard „Biotinylated 2-Log DNA Ladder“ verwendet wurde.

Der Kapillar-Blot sowie die Detektion erfolgte unter Standardbedingungen (Rapley und Williams 2002). Dabei wurde eine Hybond™ N<sup>+</sup>-Nitrozellulose sowie das „ECL® Advance Western-Blotting Detection-Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

## 2.2.2 Kultivierung von *D. discoideum*

### 2.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Axenisch wachsende Stämme von *D. discoideum* wurden in Petrischalen mit HL5-, FM- oder SIH-Medium bei 22°C kultiviert. Schüttelkulturen wurden bei 150 rpm bis zu einer Zelldichte von  $4-6 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert, damit sollte ein Übergang in die stationäre Wachstumsphase vermieden werden. Die *pks26*-Mutanten wurden 24 Stunden nach der Inokulation aus einem Glycerin-Stock für etwa 12 Generationen in HL5-Medium + Blasticidin (5 µg/ml) kultiviert. Danach schloss sich eine Kultivierung in reinem HL5-Medium an. Die mit pDXA-GFP2 transformierten Stämme wurden in HL5-Medium kultiviert, welches 8 µg/ml G418 enthielt.

Die Herstellung von Gefrierkulturen zur Langzeitlagerung, Elektrotransformation von *D. discoideum*-Zellen sowie die Phänotypisierung auf Phosphatagar-Platten wurde in Anlehnung an Standardprotokolle durchgeführt (Eichinger und Rivero 2006, 2013, Fey *et al.* 2007). Im Folgenden werden daher ausschließlich ausgewählte Methoden beschrieben.

### 2.2.2.2 Herstellung von Zell-Pellets

Für die Isolation von genomischer DNA und RNA dienten Pellets von  $2 \times 10^7$  Zellen als Ausgangsmaterial. Das entsprechende Volumen Zellsuspension wurde bei 4°C und  $150 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 ml eisgekühltem  $1 \times$  Phosphatpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Schritts wurde das entstandene Pellet in 1 ml eisgekühltem  $1 \times$  Phosphatpuffer resuspendiert und für 1 min bei  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet für die weitere Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.3 Waschen von *D. discoideum* Zellen

Von logarithmisch in Schüttelkultur wachsenden Zellen wurde die Zelldichte bestimmt und die gewünschte Zellzahl bei  $150 \times g$  und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einem halben Volumen eisgekühltem  $1 \times$  Phosphatpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt.

#### **2.2.2.4 Pulsen von *D. discoideum* Zellen mit cAMP**

Die gewünschte Menge gewaschene *D. discoideum*-Zellen (2.2.2.3) wurden mit raumtemperierten  $1 \times$  Phosphatpuffer aufgenommen, so dass eine rechnerische Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml entstand. Mit dieser Zellsuspension wurden sofort sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 1 ml befüllt, die Zellen durch einminütige Zentrifugation bei  $10.000 \times g$  pelletiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert (Probe  $t_0$ ). Von der verbleibenden Zellsuspension wurden jeweils 20 ml in zwei 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 2 h bei 150 rpm und  $22^\circ\text{C}$  inkubiert. Ab einer Kultivierungszeit von 2 h wurde eine Kultur in einem 6 min Intervall mit 20  $\mu\text{l}$  einer frisch hergestellten 30  $\mu\text{M}$  cAMP-Lösung versetzt. Die andere Kultur wurde ohne cAMP-Zugabe weiter kultiviert. Nach insgesamt 7 h Kultivierungszeit wurden von jeder Kultur 6 Pellets wie oben beschrieben hergestellt (Probe  $t_7, t_7+\text{cAMP}$ ). Die Pellets dienten im Weiteren zur Extraktion von RNA.

#### **2.2.2.5 Cheating-Assay**

Um das Kooperationsverhalten zweier Stämme während der gemeinsamen Entwicklung zu untersuchen, wurde ein *Cheating*-Assay durchgeführt. Die gewünschte Menge gewaschene *D. discoideum*-Zellen (2.2.2.3) wurden mit raumtemperierten  $1 \times$  Phosphatpuffer aufgenommen und auf eine rechnerische Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml eingestellt. Aus diesen Zellsuspensionen wurden Mischungen im Verhältnis 50:50 der zu testenden Stammkombinationen hergestellt. Um die Zellen im weiteren Verlauf unterscheiden zu können, wurde jeweils ein GFP-markierter mit einem nicht GFP-markierten Stamm gemischt. Von den fertigen Mischungen sowie von den Zellsuspensionen der GFP-markierten Einzelstämme wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  in die Mitte einer zuvor für mindestens fünf Minuten getrockneten Phosphatagar-Platte ( $\varnothing = 5 \text{ cm}$ ) gegeben und mit Hilfe einer Pipettenspitze auf eine Fläche von etwa  $2,5 \times 2,5 \text{ cm}$  verteilt. Nach dem Trocknen unter der Sterilwerkbank für etwa 5 min wurden die Phosphatagar-Platten bei  $22^\circ\text{C}$  für 72 Stunden inkubiert. Von den übrigen Zellsuspensionen wurde mittels Durchflusszytometrie der tatsächliche Anteil an GFP-positiven Zellen ermittelt. Nach Beendigung der Entwicklung wurden die Sporen geerntet. Dafür wurde der Agar mit einem Skalpell in etwa 5 mm breite Streifen geschnitten und vollständig in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Anzahl der Sporen möglichst vollständig zu erfassen, wurde das verwendete Skalpell mit 3 ml Sporenpuffer gewaschen und die Waschlösung direkt in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach intensivem Vortexen wurde die

Sporen-Konzentration mittels CASY-Zellzähler sowie der Anteil an GFP-markierten Sporen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### **2.2.2.6 Bestimmung der Sporulationseffizienz und der Keimfähigkeit der Sporen**

Um die Keimfähigkeit der Sporen zu bestimmen, wurde die gewünschte Menge gewaschener *D. discoideum*-Zellen (2.2.2.3) mit raumtemperierten 1× Phosphatpuffer auf eine rechnerische Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 5 ml dieser Zellsuspension auf einer Phosphatagar-Platte ausplattiert. Nach 72 Stunden Inkubation bei 22°C wurden die entstandenen Fruchtkörper mit 5 ml Sporenpuffer von der Platte gewaschen, so dass nur die Sporen überleben konnten. Nach Bestimmung der Sporen-Konzentration mit dem Casy Zellzähler konnte die Sporulationseffizienz aus der Anzahl eingesetzter Zellen und der Anzahl gefundener Sporen berechnet werden. Anschließend wurden genau 100 Sporen mit 1 ml einer frischen Kultur von *R. planticola* gemischt und auf einer 1/5-SM-Agarplatte ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei RT wurden die entstandenen Plaques ausgezählt und gegen Wildtyp verglichen (Keimfähigkeit der Sporen).

### **2.2.3 Naturstoffchemische und Analytische Methoden**

#### **2.2.3.1 Gewinnung von Extrakten aus *D. discoideum* Kulturen**

EXTRAKTION VON ZELLEN UND KULTURÜBERSTÄNDEN:

Um die Auswirkungen der Variation der Kultivierungsbedingungen zu untersuchen, wurden Zellen und Kulturüberstand separat extrahiert. Wenn nicht anders angegeben wurden 100 ml *D. discoideum* Kultur vom Stamm AX2 verwendet. Die Kultur wurde bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert und anschließend mikroskopisch auf Kontaminationen geprüft. Nach Beendigung der Kultivierung wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die Kultur wurde im Verhältnis 1:4 geteilt und 5 min bei  $1200 \times g$  und 4°C zentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden dekantiert und vereinigt. Die Pellets wurden in 20 ml kaltem 1×Phosphatpuffer resuspendiert und erneut bei  $1200 \times g$  und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und dieser Schritt ein weiteres Mal durchgeführt. Die Pellets wurden bei -80°C gelagert. Für die Extraktion wurden die Pellets mit 50 ml Ethylacetat (großes Pellet) bzw. 50 ml Methanol (kleines Pellet) versetzt und für 30 min bei 70 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Nach

Filtration über wasserfreiem Natriumsulfat wurde das Extraktionsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zu einem Restvolumen von ca. 2 ml entfernt (Wasserbadtemperatur max. 40°C), so dass dieses in ein luftdichtes Gläschen überführt werden konnte. Nach einmaligem Nachspülen mit Extraktionsmittel wurde dieses mittels Stickstoffstrom vollständig entfernt.

Für die methanolische Extraktion des Kulturüberstands wurde 1 ml lyophilisiert, mit 20 ml Methanol versetzt und für 30min bei 70 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. Der Rest des Kulturüberstands wurde in einen Scheidetrichter überführt und einmalig mit einem Volumen Ethylacetat für 5 min ausgeschüttelt. Die Entfernung des Extraktionsmittels erfolgte analog der Extraktion der Zellen. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die gewonnenen Extrakte bei -30°C gelagert.

#### EXTRAKTION VON KULTURÜBERSTÄNDEN HUNGERNDER ZELLEN:

Für die Extraktion von Kulturüberständen hungernder Zellen wurde der Stamm AX2 verwendet. Als Extraktionsmittel kamen zwei Adsorberharze (XAD-4, XAD-16) sowie Ethylacetat zum Einsatz. Das zuvor einmal mit Methanol und dreimal mit 1×Phosphatpuffer gewaschene Adsorberharz (1,5 g/100 ml) wurde in einem Dialyseschlauch zusammen mit der Kultur für 18 h bei 22°C und 150 rpm inkubiert. Vor der Elution mit dreimal 20 ml Methanol wurde das Harz einmal mit entionisiertem Wasser gewaschen. Die vereinigten Eluate wurden über wasserfreiem Natriumsulfat filtriert und das Lösungsmittel wie oben beschrieben entfernt. Die auf diese Weise extrahierte Kultur wurde zentrifugiert und der Kulturüberstand dreimal mit einem Volumen Ethylacetat für 5 min ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden ebenfalls über wasserfreiem Natriumsulfat filtriert und das Lösungsmittel wie oben beschrieben entfernt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -30°C.

#### EXTRAKTION VON GESAMTKULTUREN:

Für die Gewinnung von *D. discoideum* Kulturextrakten wurden 30 ml frische Kulturen verwendet, welche ab Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 2,5 mM Natriumacetat supplementiert wurden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Kulturen nach Erreichen der stationären Wachstumsphase und einer mikroskopischen Kontaminationskontrolle bei 1200 × g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand

wurde vorsichtig dekantiert und gegebenenfalls der pH-Wert eingestellt. Nach der Überführung des Überstandes in einen Scheidetrichter erfolgte das Ausschütteln mit einem Volumen Ethylacetat für 5 min. Die organische Phase wurde nach der Phasentrennung gesammelt und eine Spatelspitze wasserfreies Natriumsulfat zugegeben. Das Gemisch wurde kurz ruhen gelassen und über ein Papierfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde wie im Abschnitt Extraktion von Zellen und Kulturüberständen beschrieben entfernt und der Extrakt in ein luftdichtes Gläschen überführt. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die gewonnenen Extrakte bei -30°C gelagert.

### **2.2.3.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wurde genutzt, um in den im *Cheating*-Assay gewonnenen Suspensionen aus Amöben bzw. Sporen den Anteil an GFP-markierten Amöben bzw. Sporen zu bestimmen. Für die Messung wurde ein BD FACSCanto™ II flow cytometer BD Biosciences (Heidelberg) verwendet. Die gewonnenen Daten wurde mit der Software FlowJow BD Biosciences (Heidelberg) ausgewertet.

### **2.2.3.3 HPLC-DAD**

High Performance Flüssigchromatographie gekoppelt mit Dioden Array Detektor (HPLC-DAD) wurde mit einer Agilent 1200 Anlage durchgeführt. Für die Chromatographie wurde eine Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 4,6 mm, 3,5 µm) Säule Agilent (Santa Clara, CA, USA) bei 25°C und einer Flussrate von 1°ml/min verwendet. Die verwendete mobile Phase bestand aus A = 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser und B = Acetonitril. Das Injektionsvolumen wurde der Probenkonzentration angepasst. Es wurde ein linearer Lösungsmittelgradient von 99 % A nach 100 % B innerhalb von 30 min durchgeführt. Danach folgten isokratische Bedingungen für 2 min sowie Rückspülen auf 99 % A innerhalb von 0,1 min, was dann für 4,9 min gehalten wurde. Dioden Array Detektion wurde von 210 – 500 nm durchgeführt. Chromatogramme wurde bei 210, 254, 280, 300, 366 sowie 500 nm ausgegeben.

#### 2.2.3.4 UHPLC-ESI-HRAM/MS und Auswertung mit XCMS-Online™

UHPLC-ESI-HRAM/MS:

Ultra High Performance Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochaufgelöster Elektrosprayionisation Massenspektrometrie (*Ultra high performance liquid chromatography electrospray ionization high resolution accurate mass spectrometry*-UHPLC-ESI-HRAM/MS) wurde mit Thermo Scientific™ (Bremen) UltiMate HPG-3400RS binäre Pumpe, WPS-3000 Autosampler (Temperatur 10°C) und TCC-3200 Säulen Compartment durchgeführt. Für die Chromatographie wurde eine Kinetex® C-18 (50 × 2,1 mm; 1,7 µm) Säule Phenomenex (Aschaffenburg) bei 25°C verwendet. Die Flussrate betrug 0,6 ml/min. Die verwendete mobile Phase bestand aus A = 2 % Acetonitril in Wasser und B = 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril. Je Messung wurden 2 µl Messlösung injiziert. Es wurde ein linearer Lösungsmittelgradient von 100 % A (0 – 0,2 min) nach 100 % B (7 – 9 min) verwendet. Vor jeder Probeninjektion wurde die Säule für 1 min bei 100 % A äquilibriert. Massenspektren wurden mit einem Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer aufgenommen, ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisation (ESI) Ionenquelle. Aufgrund der gerätebedingten hohen Reproduzierbarkeit wurden alle Proben einmalig gemessen.

AUSWERTUNG MIT XCMS ONLINE™:

Die Daten der mit UHPLC-HRMS vermessenen Kulturextrakte wurden mit der webbasierten Plattform XCMS Online™ (Tautenhahn *et al.* 2012, Gowda *et al.* 2014) prozessiert. Dabei umfasst die Datenauswertung drei Schritte: die Feature-Erkennung, die Ermittlung von Übereinstimmung und eine kontextabhängige Analyse der resultierenden Messwerte (Mahieu *et al.* 2016). Bei der Feature-Erkennung ist das Ziel aus den chromatographischen Rohdaten Signale zu isolieren, welche von realen Stoffen und nicht dem Rauschen stammen. Extrahierte Signale mit einem einzigartigen Verhältnis von Masse zu Ladung, Retentionszeit und Peakform werden dabei als Feature bezeichnet. Im zweiten Schritt wird in den verschiedenen Datensätzen nach gleichen, zu nur einem Analyten gehörigen Features gesucht. Der dritte Schritt umfasst eine statistische Analyse der Intensitäten der detektierten Features. Somit können Features identifiziert werden, deren relative Intensitäten in den verschiedenen Datensätzen variieren. Im durchgeführten Experiment wurden folgende Parameter verwendet: Für die Feature-

Erkennung wurde die Methode „centWave“ verwendet ( $\Delta m/z=2,5$  ppm, minimum peak width=5. maximum peak width=20 s). Für die Retentionszeitkorrektur wurde die Methode „obiwarp“ verwendet (profStep=1). Parameter für das Chromatogramm-Alignment mzwid=0,015, minfrac=0,5, bw=5.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aktivierung der Sekundärstoffbiosynthese durch Variation der Kultivierungsbedingungen

Spätestens seit der Sequenzierung des *D. discoideum* Genoms im Jahr 2005 ist dessen außergewöhnliches Potential für die Biosynthese sekundärer Metaboliten unbestritten (Eichinger *et al.* 2005). Die große Anzahl an PKS-Genen lässt eine ebenso große Vielfalt polyketidischer Naturstoffe vermuten, von denen bisher nur wenige beschrieben sind (Morris *et al.* 1988b, Saito *et al.* 2006). Eine mögliche Ursache für die geringe Anzahl strukturaufgeklärter Polyketide aus *D. discoideum* könnte in der Regulation der PKS-Gene liegen. Als Teil des Sekundärmetabolismus findet die energieaufwändige Biosynthese nicht permanent statt, sondern nur wenn es für das Überleben des Organismus einen Vorteil bringt. Unter den günstigen Kultivierungsbedingungen im Labor sind Biosynthesecluster daher oft inaktiv. Der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Biosynthese mikrobieller Naturstoffe ist seit langem bekannt. In der Natur kann die Änderung des Metaboloms als Reaktion auf eine Änderung der Umgebung (bspw. Nährstoffmangel, Toxine) die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen (Firn und Jones 2000). Unser Wissen über das komplizierte regulatorische Netzwerk in einer einzelnen Zelle ist jedoch sehr begrenzt. Für die Anregung inaktiver Biosynthesegene ist ein zufälliger Ansatz sehr viel versprechend. Durch die Variation einfach zugänglicher Parameter kann die Biosynthese von Sekundärstoffen beeinflusst werden. Auf dieser Basis wurde der OSMAC-Ansatz (*one strain - many compounds*) entwickelt (Bode *et al.* 2002). Kleine Veränderungen der Kultivierungsbedingungen können das Sekundärstoffprofil eines einzelnen Stammes sehr stark ändern. Beispielsweise konnten durch die Verwendung von destilliertem Wasser anstatt Leitungswasser für die Herstellung des Mediums sechs neue Sekundärmetaboliten aus dem pflanzenassoziierten Pilz *P. quadrisepata* isoliert werden (Paranagama *et al.* 2007).

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 3.1) wurde nach bisher nicht beschriebenen Sekundärmetaboliten in *D. discoideum* Kulturextrakten gesucht. In Anlehnung an den OSMAC-Ansatz wurden die Kultivierungsbedingungen variiert und die Extrakte auf Veränderungen im chromatographischen Profil untersucht. Für die Untersuchung wurden die Fertigmedien HL5 und FM verwendet. Als Variation wurden diese mit verschiedenen Zusätzen versehen, welche nach Recherche in der wissenschaftlichen

Literatur ausgewählt wurden. Der Einfluss von Schwermetallionen auf den mikrobiellen Sekundärmetabolismus beispielsweise ist bereits mehrfach beschrieben (Failla und Niehaus 1986, Serafimidis und Kay 2005). Daher wurde der Effekt verschiedener Schwermetallsalze untersucht. Die von den Zellen tolerierten maximalen Konzentrationen wurden stets empirisch ermittelt. Als Standardbedingung wurde die Kultivierung in reinem HL5-Medium festgelegt. Auf die Komposition vollständig neuer Medien für die Kultivierung von *D. discoideum* wurde verzichtet, da dies als wenig erfolgsversprechend eingeschätzt wurde.

Darüber hinaus wurden Kulturextrakte hungernder Zellen untersucht. Als Standardbedingung wurde hier die Inkubation für 18 Stunden in  $1\times$  Phosphatpuffer bei einer Zelldichte von  $2\times 10^7$  Zellen/ml festgelegt.

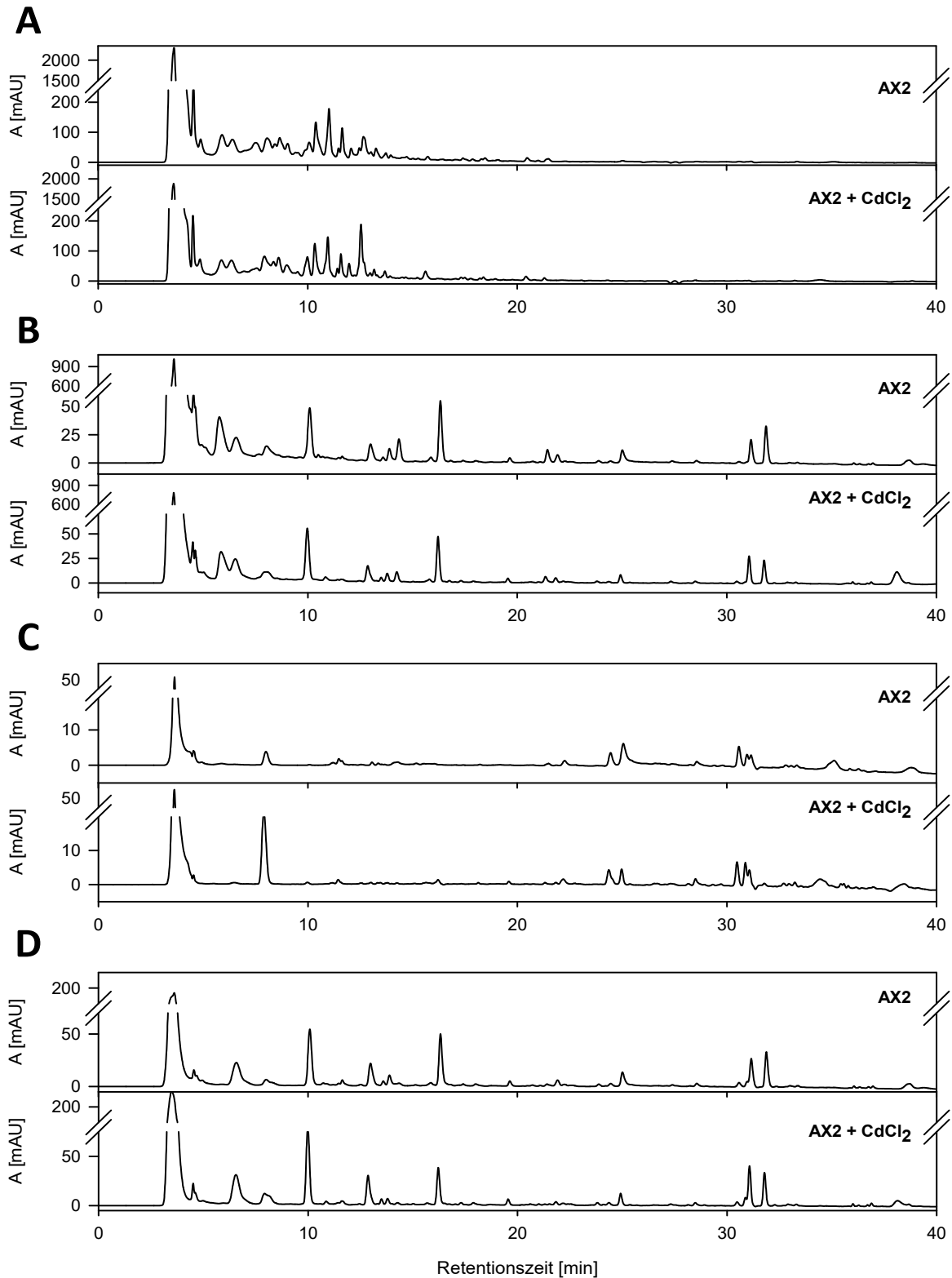
Folgende Zusätze/Variationen zu den Standardbedingungen wurden untersucht:

- Salze:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$
- Ethanol
- osmotischer Stress (Sorbitol, Phosphatpufferkonzentration)
- Glucose
- pH-Wert
- Licht
- Waldbodenextrakt
- Kultivierungszeit
- Cerulenin

Durch die separate Extraktion von Zellen und Kulturüberstand (vgl. 2.2.3.1) wurde eine Vortrennung erzielt und es konnte zwischen Substanzen, die ins Medium sezerniert wurden bzw. aus dem Medium stammten und intrazellulären Substanzen unterschieden werden. Die Substanzpeaks der zellulären Extrakte wurden erst durch diese Vortrennung sichtbar, da sie im Gesamtextrakt von den Mediumpeaks überlagert wurden. Als Extraktionsmittel wurden Ethylacetat und Methanol verwendet, wodurch jeweils zwei sich in der Lipophilie unterscheidende Extrakte erhalten wurden. Für die Auswertung wurden die HPLC-DAD Chromatogramme der Variation einem visuellen Vergleich mit der jeweiligen Standardbedingung unterzogen. Dazu wurde der Wellenlängenbereich von 210-500 nm überprüft und ebenfalls die UV/Vis-Spektren für die Auswertung mit einbezogen.

Bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Variationen der Kultivierungsbedingungen ließen sich mit den gewählten Methoden signifikante Unterschiede zur jeweiligen Standardbedingung feststellen. Die Chromatogramme verschiedener Replikate gleicher Bedingungen zeigten ein praktisch identisches chromatographisches Profil.

Im Folgenden wird exemplarisch die Auswertung bei 254 nm für die Kultivierung in HL5-Medium + 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  dargestellt (Abbildung 7). Allen Chromatogrammen war der jeweils intensivste Peak bei ca. 3–5 min gleich. Die Chromatogramme der mit Ethylacetat extrahierten Kulturüberstände (A) zeigten im Retentionszeitfenster von 3-14 min mindestens 25 Peaks mit sehr hoher Intensität. In diesem Bereich war die Trennung teilweise ungenügend und konnte auch durch Optimierung des Lösungsmittelgradienten nicht ausreichend verbessert werden. Auf eine Vortrennung wurde dennoch verzichtet, um ein möglichst großes Substanzspektrum erfassen zu können. Danach folgten im Retentionszeitfenster von 14-22 min 11 weitere Peaks geringer Intensität. Im Chromatogramm der methanolischen Kulturüberstandsextrakte (B) verteilten sich 15 meist gut getrennte Peaks über den Retentionszeitbereich von 5–32 min. Die Chromatogramme der zellulären Ethylacetatextrakte (C) zeigten in beiden Bedingungen neben den intensivsten Peaks bei 3,8 min bzw. 8 min sechs weitere Peaks geringer Intensität mit jeweils identischem UV-Vis-Spektrum. In den Chromatogrammen der methanolischen Zellextrakte verteilten sich die Peaks meist gut getrennt über den Retentionszeitbereich von 5-32 min. Die Peaks bei 8 min, 10 min, 13 min, 16,3 min, 25 min, 31,1 min und 31,9 min wiesen ein sehr ähnliches UV-Vis-Spektrum wie die Peaks gleicher Retentionszeit in (D) auf. Demnach lag es nahe, dass sie von den gleichen Substanzen stammten bzw. ähnliche chromophore Systeme aufwiesen.



**Abbildung 7: Chromatogramme von Extrakten des Wildtyps AX2.** Der Stamm AX2 wurde in reinem HL5 sowie HL5, dem 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  zugeben wurde, bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen sowie der Kulturüberstand extrahiert und die Chromatogramme der Extrakte bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  aufgezeichnet. (A) Ethylacetat-extrakt Kulturüberstand, (B) Methanolextrakt Kulturüberstand, (C) Ethylacetatextrakt Zellen, (D) Methanolextrakt Zellen.

In einem weiteren Experiment wurde der Effekt von Cerulenin auf das detektierbare Substanzspektrum untersucht. Dieser Inhibitor der Fettsäure- und Polyketidbiosynthese bindet irreversibel an die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthase. Darüber hinaus wurde eine Hemmung der HMG-CoA-Synthase Aktivität beschrieben. (Omura 1976, Heath und Rock 2002). Für die Untersuchung wurden Konzentrationen von 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M, sowie mehrmalige Zugaben von 50  $\mu$ M Cerulenin in 1 $\times$ Phosphatpuffer verwendet. Die hungernden Zellen wurden analog den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert und extrahiert. Auch hier konnten in den Chromatogrammen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Standardbedingung festgestellt werden.

### 3.2 Genexpressionsanalyse der PKS-Gene von *D. discoideum*




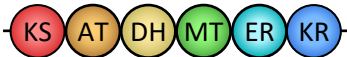

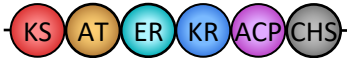
Das Genom von *D. discoideum* beherbergt eine überraschend große Anzahl an PKS-Genen. Im Zuge der Sequenzierung des Genoms wurden bei einer initialen Analyse 43 PKS-Gene identifiziert (Eichinger *et al.* 2005). Zu Beginn der nachfolgend beschriebenen molekularbiologischen Arbeiten wurde ein Überblick über die PKS-Gene in *D. discoideum*, deren Struktur, Phylogenie sowie Expression erstellt.

#### 3.2.1 PKS-Gene in *D. discoideum*

Nach den ersten Daten von Eichinger *et al.* wurden die vorhandenen Sequenzdaten weitergehend untersucht, wodurch die beschriebenen PKS-Gene teilweise korrigiert und ihre Anzahl auf 45 erhöht werden konnten (Eichinger *et al.* 2005, Zucko *et al.* 2007). Diese wurden nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Genom mit *pks1* – *pks45* benannt. Von den 45 PKS-Genen waren fünf vermeintliche Pseudogene (*pks4*, *pks11*, *pks12*, *pks20*, *pks43*), wohingegen die restlichen 40 Gene als potentiell funktionale PKS-Gene beschrieben wurden. Davon wiesen *pks1* und *pks37* eine hybride Typ I/Typ III-Struktur mit einer chalkonsynthaseähnlichen Domäne auf und sind für die Biosynthese der Polyketide MPBD und DIF-1 essentiell, welche wichtige Regulatoren während der terminalen Differenzierung von *D. discoideum* darstellen (Austin *et al.* 2006, Ghosh *et al.* 2008). Die 38 verbleibenden Gene codieren für iterative Typ I-PKS-Enzyme und besitzen den grundlegenden Aufbau: KS-AT-ER-KR-ACP, welcher in den meisten Fällen durch die Domänen DH oder/und MT erweitert ist (Tabelle 11). Aufgrund des reichen Vorkommens von Reduktasedomänen werden alle PKS-Gene in *D. discoideum* zu den reduzierenden PKS gezählt. Ferner konnten *pks16* und *pks17* als Fettsäuresynthasen (FAS) identifiziert

werden (Zucko *et al.* 2007).

**Tabelle 11: Einteilung der PKS-Gene in *D. discoideum* nach ihrer Domänenstruktur.** Erstellt aus Daten von Zucko *et al.* 2007.

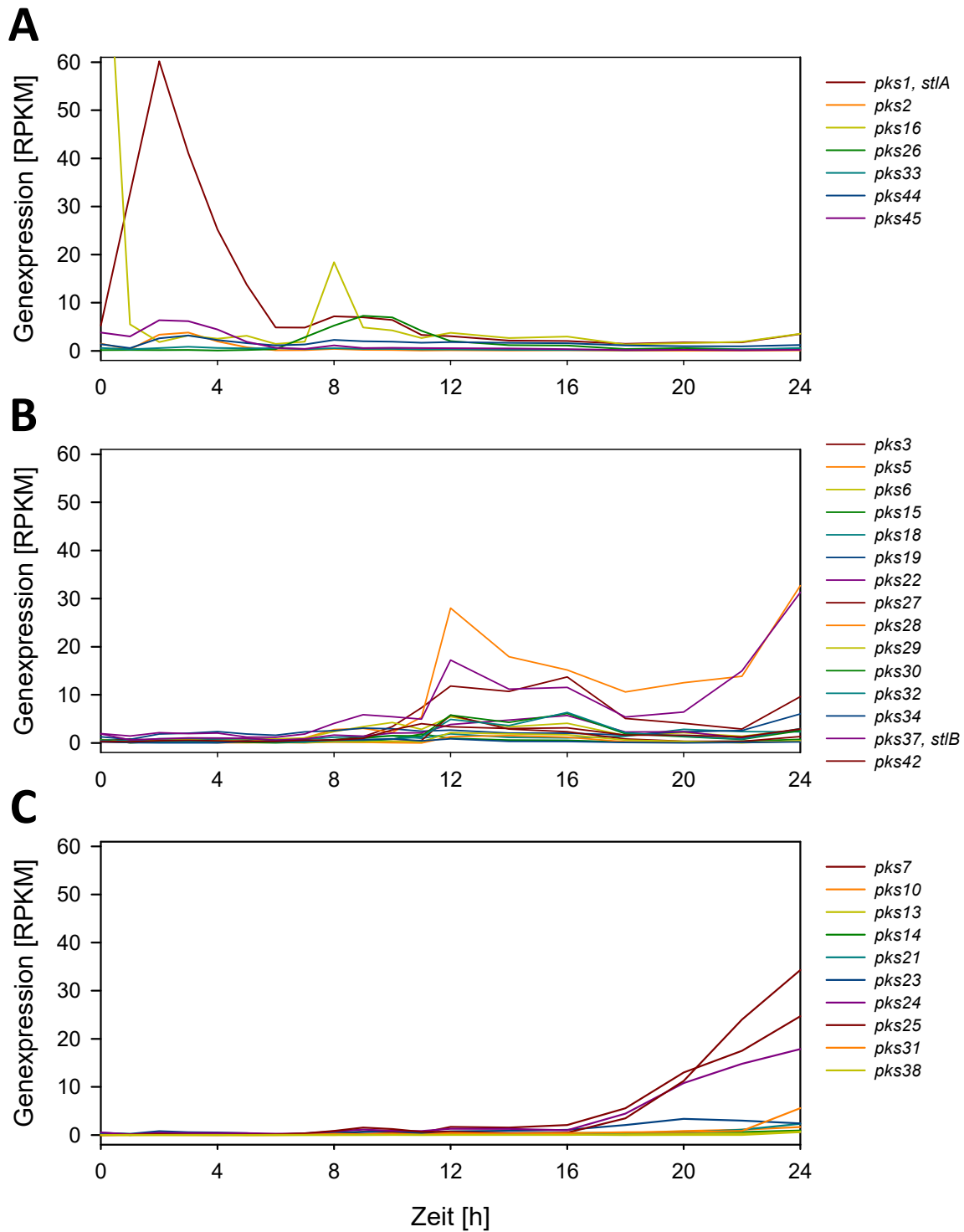
Domänenstruktur	Genname
	<i>pks1 (stlA)</i>
	<i>pks2, pks5, pks6, pks7, pks8, pks9, pks10, pks11, pks13, pks15, pks18, pks22, pks23, pks25, pks26, pks27, pks28, pks29, pks30, pks31, pks32, pks33, pks34, pks35, pks36, pks38, pks39, pks40, pks41, pks42, pks43, pks45</i>
	<i>pks3, pks14, pks16, pks17, pks19, pks20, pks21, pks24, pks44</i>
	<i>pks4</i>
	<i>pks12</i>
	<i>pks37 (stlB)</i>

Alle PKS-Proteine von *D. discoideum* bilden eine monophylogenetische Gruppe (Zucko *et al.* 2007, Ghosh *et al.* 2008). Stammbäume der KS- sowie AT-Domänen zeigen die hybriden Typ I/Typ III Gene *pks1* und *pks37* sowie die putativen Fettsäuresynthasen *pks16* und *pks17* deutlich entfernt von den restlichen 41 Polyketidsynthasen, welche eine eigene Gruppe bilden. In einem Vergleich der KS-Domänen mit sozialen Amöben der zu *D. discoideum* paraphyletisch entstandenen Gruppen 1 und 2 (*D. fasciculatum* bzw. *P. pallidum*) sind nur die Typ I/Typ III-Hybride *pks1* und *pks37* klare Orthologe. Darüber hinaus weisen alle drei Spezies umfassende Erweiterungen einzelner Vorläufergene auf. (Heidel *et al.* 2011)

Die Verteilung der PKS-Gene im Genom von *D. discoideum* erstreckt sich über alle sechs Chromosomen. 32 PKS-Gene befinden sich in Clustern von zwei bis fünf Genen. In einem Cluster weisen die Gene oft eine gleichartige Domänenstruktur sowie einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad auf DNA-Ebene auf (bspw. *pks19, pks20, pks21*). Dies deutet auf eine Entstehung durch Genduplikationen hin. Unterschiede in der Domänenstruktur innerhalb

eines Clusters sind selten (*pks24/pks25*, *pks44/pks45*). 13 Gene befinden sich nicht in einem Cluster (*pks1*, *pks2*, *pks3*, *pks4*, *pks10*, *pks13*, *pks14*, *pks15*, *pks18*, *pks26*, *pks35*, *pks36*, *pks37*) (Zucko *et al.* 2007).

Die Expression der PKS-Gene variiert deutlich. Nur wenige werden während des vegetativen Wachstums exprimiert, wobei eine Abhängigkeit von der Nahrungsquelle diskutiert wird (Akabane und Saito 2010). Ein Großteil der PKS-Gene zeigt in der multizellulären Entwicklung eine verstärkte Expression. Anhand verfügbarer RNA-Sequenzierungs-Daten wurden diese entwicklungsabhängigen PKS-Gene in drei Gruppen eingeteilt (Abbildung 8). Dabei ließen sich sieben PKS-Gene der frühen Entwicklung (Abbildung 8 A) zuordnen. Hervorzuheben ist hier die Fettsäuresynthase *pks16*, deren Aktivitätsmaximum erwartungsgemäß in der vegetativen Wachstumsphase zu finden ist. Sofort nach Beginn der Hungerphase fällt ihre Aktivität stark ab. Weitere Maxima in dieser Gruppe befinden sich bei 1 bis 4 Stunden (*pks1*, *pks2*, *pks44*, *pks45*) sowie bei 6 bis 11 Stunden (*pks1*, *pks16*, *pks26*). In der zweiten Hälfte der Entwicklung ab ca. 12 Stunden wird der überwiegende Teil der PKS-Gene exprimiert (Gruppe 2 und 3). Zur mittleren Entwicklungsphase (Gruppe 2) ließen sich 15 PKS-Gene mit einem Maximum zwischen 10 und 18 Stunden zuordnen. Zusätzlich steigt die Aktivität nahezu aller Gene in dieser Gruppe ab 22 Stunden wieder an. Gruppe 3 umfasste 10 PKS-Gene, die ausschließlich in der späten Entwicklung ab 18 Stunden eine erhöhte Aktivität aufweisen. Nicht zugeordnet wurden vier PKS-Gene, die keine entwicklungsabhängige Regulation zeigen (*pks17*, *pks39*, *pks40*, *pks41*).



**Abbildung 8: Expressionsprofile der entwicklungsabhängigen *D. discoideum* PKS-Gene.** Einteilung der *D. discoideum* PKS-Gene nach ihrer Regulation während der multizellulären Entwicklung. (A) Frühe Entwicklungsphase, (B) Mittlere Entwicklungsphase, (C) Späte Entwicklungsphase, RPKM: Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads, Dargestellt ist RPKM als Maß für die auf die Genlänge und Sequenziertiefe normalisierte Expressionsstärke von Genen aus einer Probe. Je höher der RPKM-Wert, desto höher ist die Genexpression. Daten entnommen von <https://dictyexpress.research.bcm.edu>, Zugriffsdatum: 02.11.2020 Rosengarten *et al.* 2015, Stajdohar *et al.* 2015.



Betrachtet man die Regulation von PKS-Genen in einem gemeinsamen Cluster, lässt sich keine Tendenz zur gemeinsamen Regulation feststellen. Dies wird durch eine Analyse der Promotorregionen belegt. Von fünf ermittelten PKS-Paaren mit hoher Homologie in der Promotorregion, finden sich lediglich zwei in einem gemeinsamen Cluster (Zucko *et al.* 2007).

Im Folgenden werden diese Expressionsdaten durch eigene Untersuchungen untermauert und ergänzt. Basierend auf diesen Daten wurde *pks26* für weitere Untersuchungen ausgewählt.

### 3.2.2 Untersuchungen zur Genregulation der PKS-Gene in *D. discoideum*

Bei ungünstigen Umweltbedingungen kann *D. discoideum* aus dem vegetativen Wachstum in eine multizelluläre Entwicklungsphase übertreten. Diese führt zur Differenzierung in u.a. abgestorbenen Stiel- und lebenden Sporenzellen und ermöglicht es dem Organismus widrige Bedingungen zu überdauern. Im Einzelnen führen hohe Zelldichten bzw. ein niedriges Nährstoffangebot in vegetativen Zellen zur Sekretion der Quorum-Sensing-Faktoren PSF und CMF (Clarke *et al.* 1987, Gomer *et al.* 1991). Im Anschluss beginnen sogenannte Schrittmacherzellen das chemotaktische Signalmolekül cAMP zu sezernieren (Durston 1974). Während der ersten acht Stunden der Entwicklung verläuft die Synthese und Sekretion von cAMP periodisch. Infolge eines komplexen Rückkopplungsmechanismus zwischen der Bildung und der Degradation erreicht die cAMP-Synthese im Abstand von 6-8 Minuten ein Maximum. Ein Großteil des gebildeten cAMPs wird sekretiert und kann die cAMP-Rezeptoren derselben Zelle oder auch angrenzender Zellen aktivieren, welche ihrerseits mit der periodischen cAMP-Bildung beginnen (vgl. 1.1.3) (Swaney *et al.* 2010). Dies hat eine Synchronisierung der Zellen zur Folge, weshalb sich die cAMP-Konzentration wellenartig ändert. Diese cAMP-Pulse steuern einerseits die chemotaktische Aggregation und andererseits die Induktion früher pulsabhängiger Entwicklungsgene (Gerisch *et al.* 1975, Reymond *et al.* 1995, Iranfar *et al.* 2003). Von den Genen der frühen Entwicklung zeigen *carA*, *gpaB* und *pdsA* eine cAMP-Puls-unabhängige Expression. Eine Gruppe von 13 Genen wird dagegen deutlich stärker exprimiert, wenn die Zellen mit cAMP-Pulsen behandelt werden. Zu diesen pulsabhängigen Genen gehören u.a. das Gen für die aggregationspezifische Adenylatcyclase A (*acaA*) und *csaA*, welches für ein Zell-Zell-Adhäsionsprotein kodiert (Iranfar *et al.* 2003).

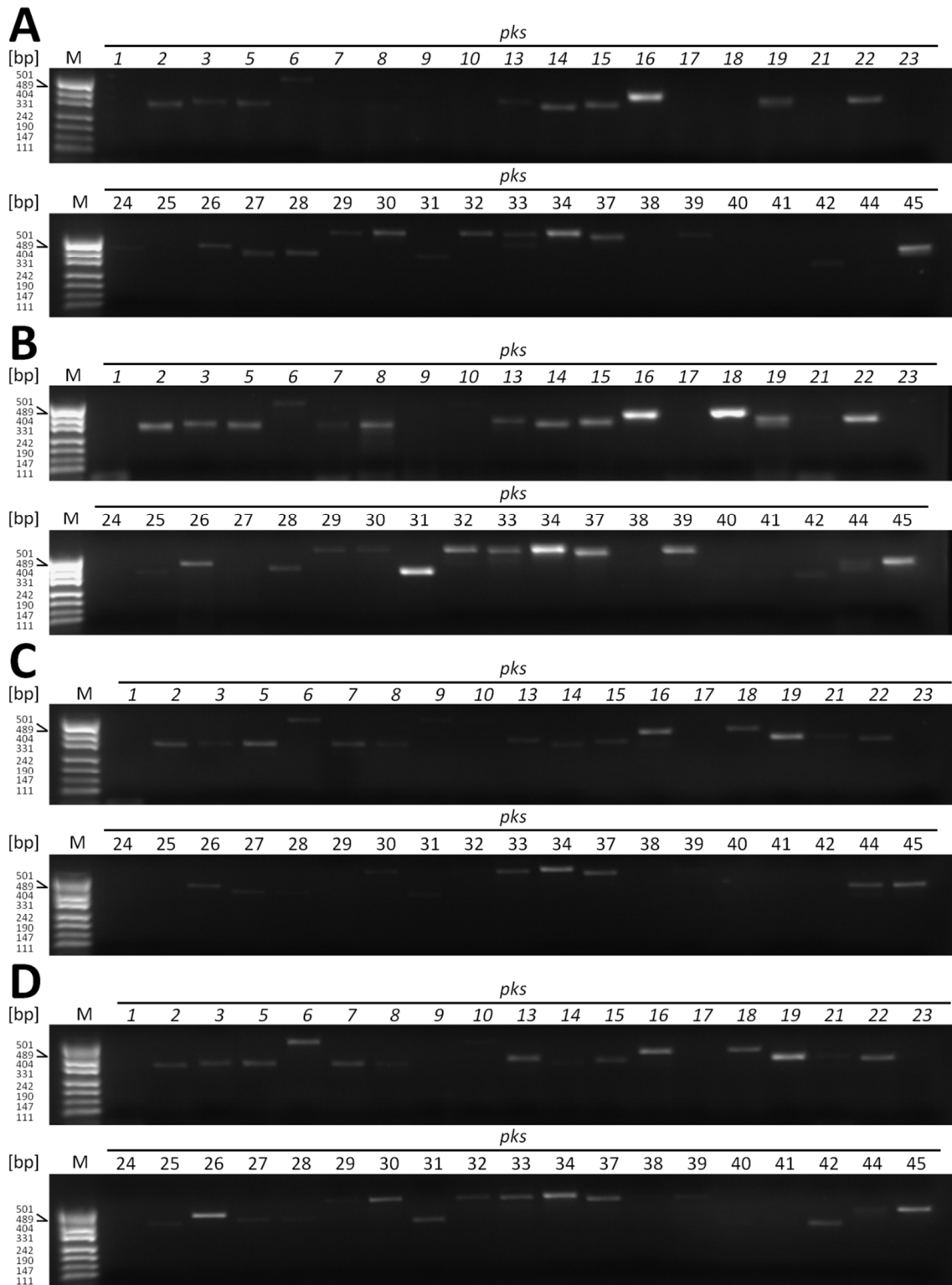
Unter Laborbedingungen zeigen *D. discoideum* Zellen eine deutliche Induktion pulsabhängiger Gene, wenn sie in nährstofffreiem Puffer kultiviert und in sechsminütigen Intervallen mit 30 nM cAMP gepulst werden. Unter diesen Bedingungen ist die Zelldichte sehr homogen. Es kann daher von einer höheren Synchronität der Genexpression ausgegangen werden, im Gegensatz zur Entwicklung auf festem Untergrund, bei welcher lokale Unterschiede in der Zelldichte unvermeidbar sind. Darüber hinaus können die Effekte von cAMP-Pulsen relativ isoliert beobachtet werden. (Iranfar *et al.* 2003).

Im Folgenden wird der Fragestellung nachgegangen, ob die PKS-Gene in *D. discoideum* durch alleiniges Hungern in einer Schüttelkultur induziert werden können. Weiterhin wird der Effekt des cAMP-Pulsens auf das Expressionslevel der PKS-Gene ermittelt. Ziel ist es, ein stark entwicklungs- und pulsabhängiges PKS-Gen zu finden, denn diese Eigenschaft legt eine Rolle während der multizellulären Entwicklung nahe. Anschließend wird in weiteren Untersuchungen die Genregulation genauer charakterisiert.

Die Entwicklungs- sowie Pulsabhängigkeit in Schüttelkultur wurde von 38 PKS-Genen mittels konventioneller RT-PCR untersucht (Abbildung 9). Nach der Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellpellets wurde eine Reverse Transkription durchgeführt, d.h. es wurde mit Hilfe eines poly(dT)<sub>18</sub>-Primers, komplementäre DNA (cDNA) erzeugt. Diese diente als Template in der darauffolgenden PCR. Im Ergebnis ließ sich die vorliegende mRNA-Menge in den Proben als Maß für die Genexpression anhand der Bandenstärke semi-quantitativ abschätzen.

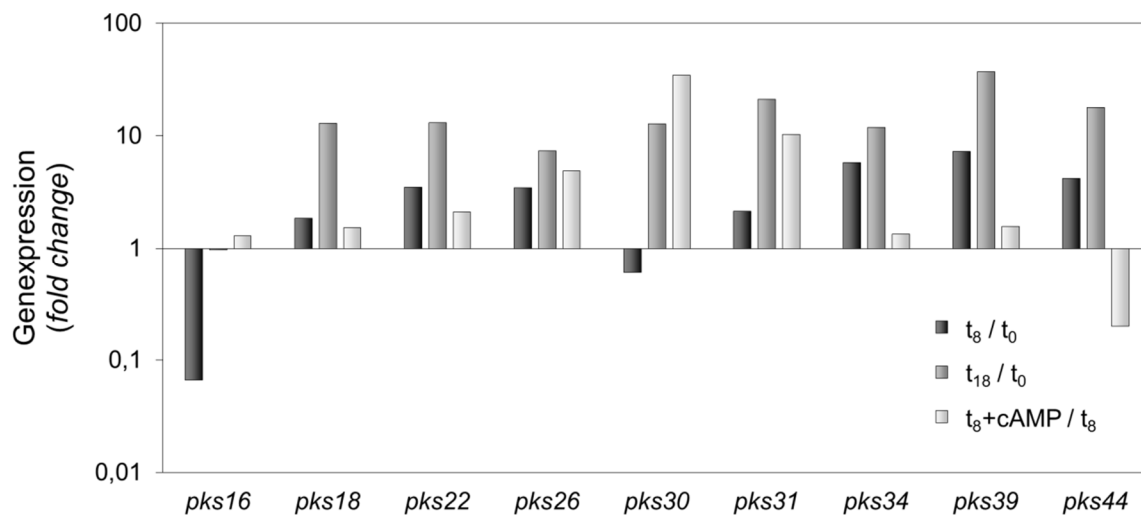
Um den alleinigen Effekt der Kultivierung in Phosphatpuffer abzuschätzen, wurde die Expression nach 18-stündiger Kultivierung in Phosphatpuffer mit der Expression vegetativer Zellen verglichen (Abbildung 9 A und B). Dabei zeigten *pks8*, *pks16*, *pks18*, *pks22*, *pks26*, *pks31*, *pks34* und *pks39* eine erhöhte Expression im. Das Gen *pks27* wurde reprimiert.

Durch den Vergleich der Expression nach 8-stündiger Kultivierung in Phosphatpuffer mit und ohne pulsatile Zugabe von 30 nM cAMP konnte der Einfluss des Pulsens mit cAMP abgeschätzt werden. (Abbildung 9 C und D). Dabei zeigten *pks26*, *pks30*, *pks31* und *pks42* eine erhöhte Expression, während die Expression von *pks44* sank.



**Abbildung 9: Entwicklungs- und pulsabhängige Regulation der *D. discoideum* PKS-Gene.** Die PCR wurde an cDNA vegetativer AX2-Zellen (A), Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 18 Stunden (B), Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 8 Stunden (C), sowie Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 2 Stunden gefolgt von Pulsen mit 30 nM cAMP für weitere 6 Stunden (D) durchgeführt. Als Primerpaare wurden verwendet: *pks*-Gennummer-1/*pks*-Gennummer-2 (Siehe Anhang A - Verwendete Oligonukleotide), Marker: pUC19 BsiSI (HpaII) Digest. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Ralf Carl durchgeführt.

Anschließend wurden neun Kandidatengene für RT-qPCR Messungen ausgewählt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Entwicklungs- und pulsabhängige Regulation ausgewählter *D. discoideum* PKS-Gene.** Dargestellt ist der *fold change* als Maß für die relative Genexpression der untersuchten Bedingung bezogen auf die Expression des Gens in vegetativen Zellen bzw. nach 8-stündiger Inkubation in 1 × Phosphatpuffer. Ein *fold change* von 1 entspricht der Expression in der Bezugsbedingung. Ein *fold change* größer als 1 entspricht einer erhöhten Expression in der untersuchten Bedingung. Untersucht wurden die 8- bzw. 18-stündige Inkubation in 1 × Phosphatpuffer ( $t_8$  bzw.  $t_{18}$ ) sowie die 8-stündige Inkubation in 1 × Phosphatpuffer inklusive pulsatile Zugabe von 30 nM cAMP in 6-min Intervallen von Stunde 3 bis 6 gefolgt von einer einmaligen Zugabe von 300  $\mu$ M cAMP ( $t_8 + \text{cAMP}$ ). Es wurden mindestens zwei biologische Replikate gemessen und ähnliche Daten erhalten. Referenzgen: *gpdA*. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Ralf Carl durchgeführt.

Nach achtstündiger Kultivierung in 1 × Phosphatpuffer ohne die pulsatile Zugabe von cAMP zeigten die Gene *pks18*, *pks22*, *pks26*, *pks31*, *pks34*, *pks39* und *pks44* eine erhöhte Expression im Vergleich zu wachsenden Zellen ( $t_8/t_0$ ), die durch eine anschließende 10-stündige Hungerphase noch vergrößert werden konnte ( $t_{18}/t_0$ ). Dagegen zeigten die Gene *pks16* und *pks30* nach achtstündigem Hungern der Zellen eine deutliche Abnahme der Expression. Durch eine 18-stündige Hungerphase konnte diese jedoch wieder nahezu aufgehoben (*pks16*) bzw. in einen Anstieg der Expression verwandelt werden (*pks30*). Im Gegensatz zur achtstündigen Kultivierung hatte die 18-stündige Hungerphase ausnahmslos einen Expressionsanstieg der untersuchten PKS-Gene zur Folge.

Um die cAMP-abhängige Genexpression betrachten zu können, wurden Zellen nach pulsatiler Zugabe von cAMP mit Zellen nach alleiniger achtstündiger Kultivierung in Phosphatpuffer verglichen ( $t_8 + \text{cAMP}/t_8$ ). Hierbei zeigten *pks16*, *pks18*, *pks22*, *pks26*, *pks30*, *pks31*, *pks34* und *pks39* eine erhöhte Expression. Das Gen *pks26* wurde nach der Behandlung mit cAMP 5-fach stärker exprimiert. Die höchsten Werte für den Expressionsanstieg konnten für *pks30* (34-fach) und *pks31* (10-fach) beobachtet werden.

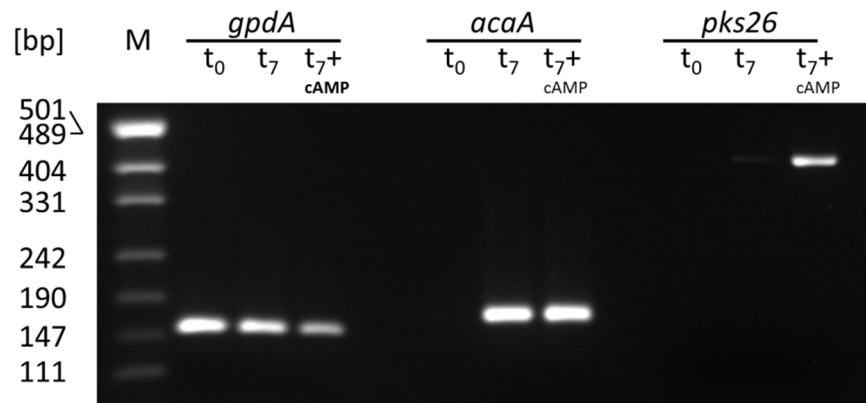
Des Weiteren zeigte das Gen *pks44* eine pulsinduzierte Verringerung der Expression auf ein Fünftel.

Für die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wies *pks26* eine Reihe von interessanten Eigenschaften auf und wurde daher näher untersucht. Das Gen besitzt keine hohe Sequenzhomologie zu anderen PKS-Genen in *D. discoideum* und befindet sich im Gegensatz zu *pks30* und *pks31* nicht in einem Cluster mit anderen PKS-Genen, wodurch es genetisch gut zugänglich ist (Zucko *et al.* 2007). Laut dictyExpress zeigt es in der multizellulären Entwicklung von 8-10 Stunden eine verstärkte Expression (vgl. Abbildung 8). Die Genexpressionsuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben eine deutliche Induktion durch Kultivierung in Phosphatpuffer für 8 bzw. 18 Stunden sowie durch Pulsen mit 30 nM cAMP. Des Weiteren existierte mit dem Stamm Pks26-REMI bereits eine Mutante mit einem beschriebenen Phänotyp (vgl. 3.2.3).

Das etablierte Versuchsprotokoll wurde für die folgenden Versuche zur Expression von *pks26* angepasst. Zum einen wurde das Pulsen mit cAMP in sechsminütigen Intervallen von vier auf fünf Stunden verlängert. Zum anderen wurde auf die einmalige abschließende Zugabe von 300 µM cAMP verzichtet und die Zellen bereits nach sieben Stunden Gesamtkultivierungszeit pelletiert (vgl. 2.2.2.3).

Mit dem veränderten Versuchsprotokoll wurde zunächst ein weiteres Pulsexperiment durchgeführt, um die Genexpression von *pks26* mittels konventioneller RT-PCR zu bestimmen. Hierzu wurden Zellpellets vegetativer Zellen ( $t_0$ ), hungernder Zellen ( $t_7$ ), sowie von Zellen, welche mit cAMP-Pulsen behandelt wurden ( $t_7$ +cAMP), erzeugt. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, nach der Extraktion von Gesamt-RNA cDNA erzeugt.

Für jede Bedingung wurden PCRs an drei Genen durchgeführt (Abbildung 11). Das konstitutiv exprimierte Gen *gpdA* kodiert für die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und diente als Kontrolle der cDNA. Ferner umspannen die verwendeten Primer Q-GAPDH-01 und Q-GAPDH-02 ein Intron, so dass eine PCR an cDNA und genomischer DNA Produkte unterschiedlicher Größe liefert. Auf diesem Wege war es möglich, eine Verunreinigung des Templates mit genomischer DNA zu erkennen, welche ein 247 bp langes Produkt liefern würde. Abbildung 11 zeigt, dass alle drei cDNA-Präparationen frei von genomischer DNA waren. Die PCR an *gpdA* ergab das für cDNA erwartete Produkt von 156 bp Länge.



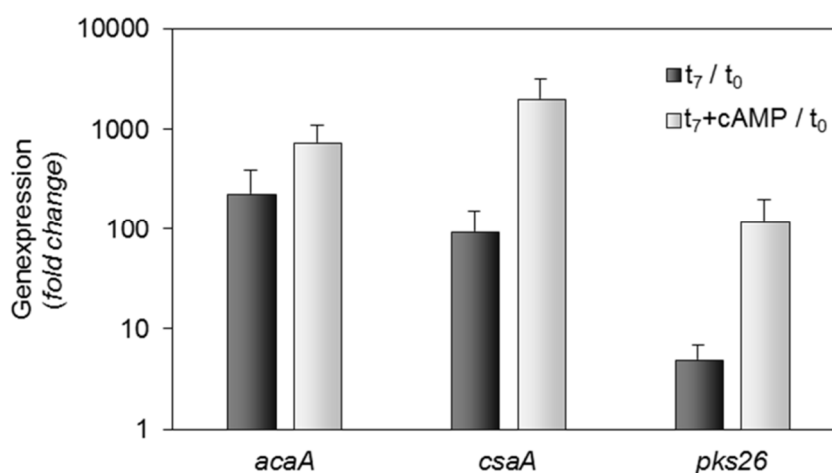
**Abbildung 11: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Untersuchung der Entwicklungs- und Pulsabhängigkeit von *pks26*.** Die PCR wurde an cDNA vegetativer Zellen ( $t_0$ ), Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 7 Stunden ( $t_7$ ) sowie Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 2 Stunden gefolgt von Pulsen mit 30 nM cAMP für weitere 5 Stunden ( $t_7+cAMP$ ) durchgeführt. Als Primerpaare wurden verwendet: *gpdA*: Q-GAPDH-01/Q-GAPDH-02, *acaA*: acaA-04/acaA-09, *pks26*: pks26-1/pks26-2, Marker: pUC19 BsiSI (HpaII) Digest.

Wie oben beschrieben, ist die aggregationsabhängige Adenylatcyclase A ein entwicklungs- und cAMP-pulsabhängiges Gen. Daher wurde dieses Gen als Entwicklungsmarker verwendet. Die Überprüfung der *acaA*-Expression gewährleistet somit das Vorliegen der gewünschten Bedingungen. Im vorliegenden Fall sind die PCR-Produkte mit der korrekten Länge von 172 bp bei  $t_7$  und  $t_7+cAMP$  zu erkennen. In vegetativen Zellen wurde *acaA* wie zu erwarten nicht exprimiert. Nach sieben Stunden in  $1 \times$  Phosphatpuffer konnte ein deutlicher Expressionsanstieg nachgewiesen werden. Zusätzliches Pulsen mit 30 nM cAMP schien die Expression nicht erheblich zu verstärken. Aufgrund der semi-quantitativen Auswertung war hier keine weitere Differenzierung zwischen  $t_7$  und  $t_7+cAMP$  möglich. Genauere Aussagen dazu konnten auf Grundlage der RT-qPCR-Messungen gemacht werden (vgl. Abbildung 12).

Die PCR an *pks26* lieferte Produkte korrekter Länge von 425 bp. In vegetativen Zellen war keine Expression detektierbar. Nach siebenstündiger Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer war eine sehr schwache Expression nachweisbar, welche sich durch das zusätzliche Pulsen mit 30 nM cAMP deutlich verstärkte. Somit konnten die bisherigen Ergebnisse auch unter dem veränderten Versuchsprotokoll bestätigt werden. Die Expression von *pks26* ist entwicklungs- sowie cAMP-abhängig.

Eine abschließende Charakterisierung der Expression von *pks26* zeigten die Ergebnisse der RT-qPCR-Messungen aus Pulsexperimenten dreier biologischer Replikate (Abbildung 12). Dargestellt ist die relative Änderung der Expression („*fold change*“) bezogen auf die

Expression in vegetativen Zellen ( $t_0$ ). Als Entwicklungsmarker wurden die Gene *acaA* und *csaA* analysiert. Die Adenylatcyclase zeigte nach 7 Stunden in Phosphatpuffer eine 227-fach höhere Expression als in wachsenden Zellen. Durch zusätzliches Pulsen mit 30 nM cAMP wurde die Expression auf das 740-Fache erhöht. Dem entsprechend verhielt sich *csaA*. Alleiniges Hungern in Phosphatpuffer für 7 Stunden bewirkte eine 94-fache Überexpression verglichen mit wachsenden Zellen, während das Pulsen mit cAMP eine 2007-fache Überexpression des Gens hervorrief. Dies entsprach der für beide Gene erwarteten Regulation.



**Abbildung 12: Entwicklungs- und cAMP-abhängige Regulation von *pks26*.** Dargestellt ist der *fold change* als Maß für die relative Genexpression der untersuchten Bedingung bezogen auf die Expression des Gens in vegetativen Zellen ( $t_0$ ). Ein *fold change* von 1 entspricht der Expression in vegetativen Zellen. Ein *fold change* größer als 1 entspricht einer Überexpression in der untersuchten Bedingung. Untersucht wurden die 7-stündige Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer ( $t_7$ ) sowie die 7-stündige Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer inklusive pulsatile Zugaben von 30 nM cAMP in 6-min Intervallen von Stunde 3-7 ( $t_7 + \text{cAMP}$ ). Referenzgen: *gpdA*, Ergebnisse stellen Mittelwerte von drei unabhängigen Kulturen dar  $\pm$  Standardabweichung.

Das Gen *pks26* wies eine 5-fache Überexpression nach siebenstündigem Hungern in Phosphatpuffer auf. Das fünfständige Pulsen mit cAMP erhöhte das Expressionslevel auf das 120-Fache der Expression in vegetativen Zellen. Die dargestellten Ergebnisse belegen somit eindeutig die entwicklungs- und cAMP-abhängige Regulation von *pks26*.

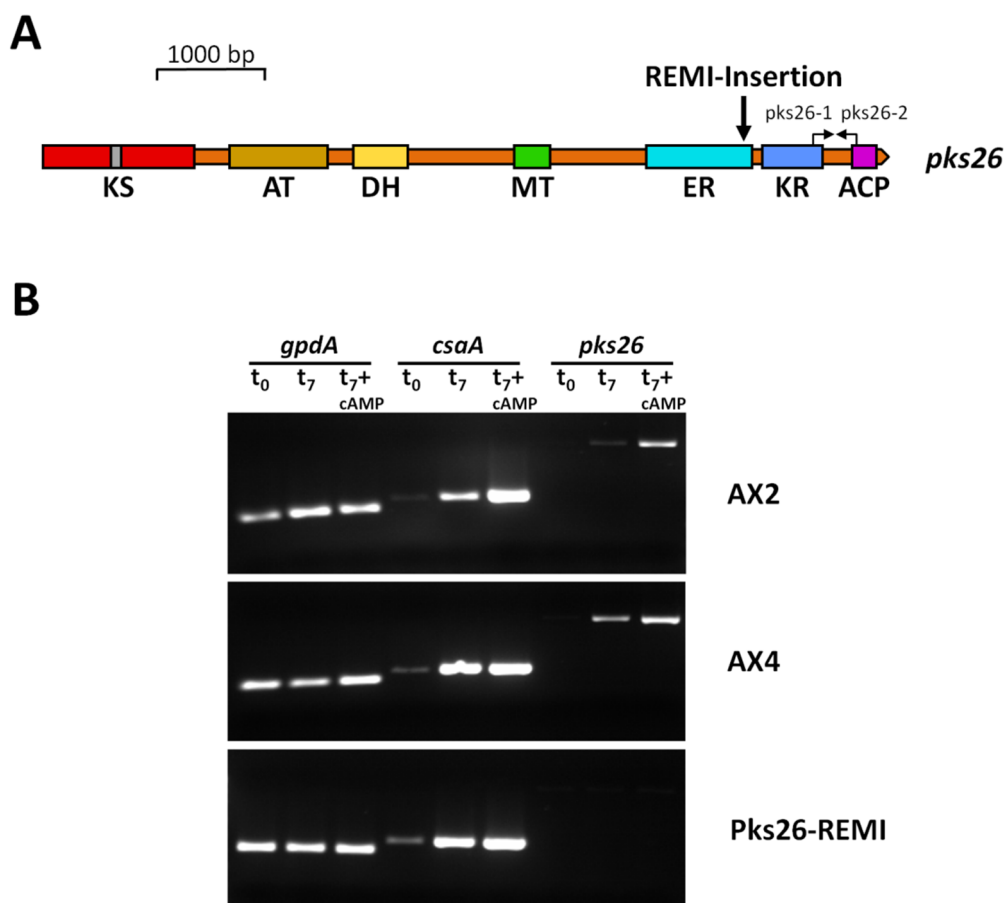
In einem nächsten Schritt wurde versucht die physiologische Funktion von *pks26* näher zu charakterisieren und Hinweise auf ein mögliches Biosyntheseprodukt zu finden. Zu dem existierte zu Beginn dieser Arbeiten bereits eine *pks26*-REMI-Mutante, welche im anschließenden Kapitel näher beschrieben werden soll.

### 3.2.3 Die *pks26*-REMI-Mutante

Durch die gemeinsame Transformation von linearisierter Plasmid-DNA sowie der für die Linearisierung verwendeten Restriktionsendonuklease können Integrationsereignisse an genomischen Restriktionsschnittstellen erzeugt werden (Schiestl und Petes 1991, Kuspa und Loomis 1992). Mit dieser „*restriction enzyme-mediated integration*“ (REMI) genannten Methode wurden in einem genomweiten Screening in *D. discoideum* mehr als 100 Mutationen in unterschiedlichsten Genen mit Einfluss auf die Kooperationsfähigkeit der Amöben identifiziert (Santorelli *et al.* 2008). Unter den auffälligen Genen fanden sich zwei PKS-Gene. *Pks2*, dessen Knock-Out zu einem *Cheater*-Phänotyp führte und *pks26*, bei welchem die Insertion des REMI-Plasmids einen sogenannten *Loser*-Phänotyp hervorrief. In der *pks26*-REMI-Mutante (Pks26-REMI) konnte die Integration des REMI-Plasmids auf Chromosom 5 an Position 1550261 nachgewiesen werden, was der ER-Domäne des codierten Enzyms entspricht (Abbildung 13 A). Demnach konnte die Mutante Pks26-REMI nur ein verkürztes PKS26-Protein bilden, welches lediglich die Domänen KS, AT, DH, MT sowie eine verkürzte ER-Domäne enthält (Zucko *et al.* 2007). Aufgrund des vollständigen Fehlens der KR- sowie insbesondere der essentiellen ACP-Domäne konnte davon ausgegangen werden, dass das resultierende PKS-Protein für die Polyketidbiosynthese nicht funktional ist (Santorelli *et al.* 2008).

Für die Suche nach dem Biosyntheseprodukt von *pks26* war die Pks26-REMI-Mutante ein sehr guter Vergleichsstamm zum Wildtyp, da in den Extrakten das *pks26*-spezifische Polyketid nicht zu finden sein sollte. Die Mutante Pks26-REMI wurde vom *Dictyostelium*-Stockcenter bezogen und näher untersucht. Da Pks26-REMI auf dem Elternstamm AX4 basiert, sollten alle weiteren Experimente im Vergleich mit AX4 statt wie in den vorhergehenden Experimenten mit AX2 durchgeführt werden. Da die formale Möglichkeit bestand, dass sich die Wildtypstämme in Nuancen unterscheiden, sollte die Genexpression der Stämme verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Pulsexperimente mit AX2, AX4 sowie Pks26-REMI durchgeführt und die Genexpression des Entwicklungsmarkers *csaA* sowie von *pks26* mittels RT-PCR gemessen (Abbildung 13 B). Dabei wurde analog der vorangegangenen Pulsexperimente vorgegangen.





**Abbildung 13: Vergleich der Genexpression von *csaA* und *pks26* in AX2, AX4 und Pks26-REMI.** (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *pks26*. Die Sequenz der KS-Domäne enthält ein Intron (grau). Die schwarzen Pfeile zeigen die Positionen der bei der RT-PCR verwendeten Primer pks26-1 und pks26-2 an. KS: Ketosynthase, AT: Acyltransferase, DH: Dehydratase, MT: Methyltransferase, ER: Enoylreduktase, KR: Ketoreduktase, ACP: Acyl Carrier Protein. Grafik erstellt nach (Zucko *et al.* 2007, Santorelli *et al.* 2008). (B) Gelelektrophorese der RT-PCR zum Vergleich der Genexpression. Die PCR wurde an cDNA vegetativer Zellen ( $t_0$ ), Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 7 Stunden ( $t_7$ ) sowie Zellen nach Inkubation in  $1 \times$  Phosphatpuffer für 2 Stunden gefolgt von Pulsen mit 30 nM cAMP für weitere 5 Stunden ( $t_7+$ cAMP) durchgeführt. Als Primerpaare wurden verwendet: *gpdA*: Q-GAPDH-01/Q-GAPDH-02, *csaA*: csaA-05/csaA-06, *pks26*: pks26-1/pks26-2.

Die PCR am Referenzgen *gpdA* ergab in allen Proben ein Produkt korrekter Länge und nahezu gleicher Intensität. Demnach konnten Verunreinigungen mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die Wildtypstämme AX2 mit AX4 zeigten vernachlässigbare Unterschiede. Der Entwicklungsmarker *csaA* erfuhr in beiden Stämmen nach alleiniger Kultivierung in Phosphatpuffer für 7 Stunden einen starken Expressionsanstieg. Durch zusätzliches Pulsen mit cAMP konnte dieser noch erhöht werden. Das Gen *pks26* zeigte in beiden Stämmen ein vergleichbares Expressionsmuster. In beiden Stämmen konnte die *pks26*-Expression durch zusätzliches Pulsen mit cAMP noch gesteigert werden. Damit zeigte *pks26* in beiden Wildtypstämmen das gleiche entwicklungs- und pulsabhängige Expressionsprofil, es konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen den Stämmen

festgestellt werden. Alle weiteren Experimente konnten demnach aufbauend auf dem Wildtypstamm AX4 durchgeführt werden.

Die *csaA*-Expression von Pks26-REMI verhielt sich analog zu den beiden Wildtypstämmen (Abbildung 13B). Die REMI-Mutante ging demnach unter den gewählten Bedingungen ebenso wie der Wildtyp in die frühe Entwicklungsphase über. Kein Produkt ergab die RT-PCR an *pks26*, d.h. ein entwicklungs- und cAMP-abhängiger Anstieg der *pks26*-Expression war in der *pks26*-REMI-Mutante nicht nachweisbar. Die für die RT-PCR verwendeten Primer *pks26*-1 und *pks26*-2 hybridisierten „hinter“ der REMI-Plasmid-Insertion (vgl. Abbildung 13 A). Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass weder durch alleiniges Hungern noch durch Pulsen mit cAMP ein vollständiges Transkript von *pks26* induziert werden konnte und somit ebenfalls die vermeintliche physiologische Funktion von PKS26 nicht mehr vorhanden war. Eine Transkription des vorderen unvollständigen Teils von *pks26* sowie eine bisher noch unbekannte Funktion dieses verkürzten Proteins konnte jedoch formal nicht ausgeschlossen werden. Um einen vollständigen Knock-Out von *pks26* sicherzustellen, was es demnach notwendig, das Gen im Bereich der KS- oder AT-Domäne zu unterbrechen. Daher sollte ein solcher gezielter Knock-Out von *pks26* im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden (3.3).

Nach dem Überprüfen der Genexpression wurde der Stamm Pks26-REMI weitergehend charakterisiert. Im Vergleich zu AX4 wurde das Wachstumsverhalten in HL5, die multizelluläre Entwicklung auf Phosphatagar-Platten sowie die Morphologie der Fruchtkörper betrachtet. Wesentliche Unterschiede konnten dabei nicht beobachtet werden. (vgl. 3.7.1, 3.7.3)

Ferner wurden erste Extraktionsversuche durchgeführt, um ein PKS26-Produkt zu identifizieren. Nach dem Pulsen von AX4- und Pks26-REMI analog der vorangegangenen Versuche wurden die Zellen bis zum Zeitpunkt  $t_{24}$  weiter kultiviert, so dass sezernierte Moleküle - ausreichende Stabilität vorausgesetzt - im Kulturmedium angereichert würden. Anschließend wurden Ethylacetatextrakte der Kulturüberstände hergestellt und diese chromatographisch analysiert, wobei ein UV/Vis-Detektor zum Einsatz kam. Beim Vergleich der Chromatogramme konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Erwartung, dass sich die Chromatogramme von Pks26-REMI durch das Fehlen eines oder mehrerer Peaks auszeichnen, konnte nicht bestätigt werden. An dieser Stelle soll kurz auf mögliche Ursachen eingegangen werden. Ausgehend von einer erfolgreichen Expression des PKS26-Proteins kann mit der Frage begonnen werden,

ob das resultierende Polyketid in nachweisbaren Mengen ins Medium sezerniert wird oder seine Wirkung intrazellulär entfaltet. Weiterhin war unbekannt, ob und wie lange das gesuchte Molekül stabil vorliegen würde sowie mit welchem Extraktionsmittel bzw. welcher Extraktionsmethode es sich in nachweisbaren Mengen extrahieren ließe. Schließlich könnten auch die chromatographische Auftrennung und die verwendete Detektionsmethode mögliche Ursachen darstellen. Enthält die gesuchte Substanz kein Chromophor, ist sie mit einem UV/Vis-Detektor nicht nachweisbar.

Um diesen Problemen begegnen zu können, musste einerseits eine Extraktions- und Detektionsmethode verwendet werden, welche ein möglichst breites Substanzspektrum erfasst, andererseits musste sichergestellt werden, dass das gesuchte Molekül in für die Detektion ausreichenden Mengen biosynthetisiert werden konnte. Daher wurde die chromatographische Trennung und Detektion in den weiteren Extraktionsversuchen mit UHPLC und hochaufgelöstem Massenspektrometer durchgeführt. Hiermit konnte eine weitaus größere Anzahl an möglichen Molekülen erfasst werden. Das Pulsen mit cAMP stellte für die Induktion der Biosynthese des *pks26*-spezifischen Polyketids nur bedingt eine Lösung dar. Die durch das Pulsen gesteigerte Expression von *pks26* wurde nur für wenige Stunden aufrechterhalten, weshalb für die Protein- sowie Polyketid-Biosynthese nur verhältnismäßig wenig Zeit blieb. Zudem wurden auch andere cAMP-pulsabhängige Gene aktiviert, deren Produkte die Detektion des *pks26*-spezifischen Polyketids stören könnten. Eine potenzielle Lösung dieses Problems wird in Kapitel 3.4 besprochen.

### 3.3 Herstellung einer *pks26*-Knock-Out-Mutante

Nach der Charakterisierung der *pks26*-REMI-Mutante sollte nun eine auf AX4 basierende Knock-Out-Mutante von *pks26* mittels homologer Rekombination erstellt werden. Die Motivation hierfür kann mit den folgenden drei Argumenten begründet werden:

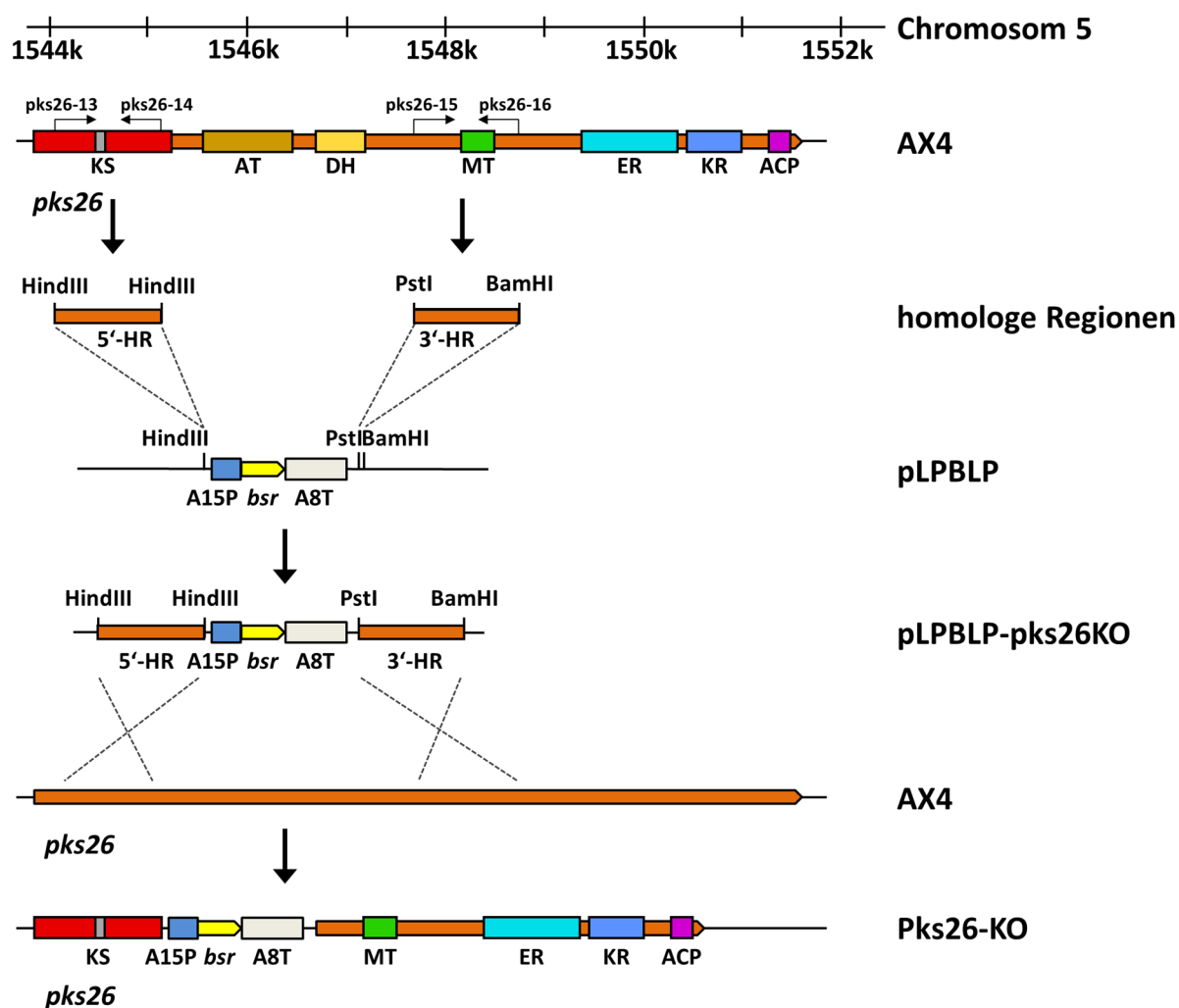
- Anders als bei der *pks26*-REMI-Mutante, bei welcher *pks26* im hinteren Bereich unterbrochen wurde, sollte das Gen bereits im Bereich der KS-Domäne mittels homologer Rekombination unterbrochen und die AT- und DH-Domäne deletiert werden. Dies stellte eine saubere Lösung dar, um die Funktion von *pks26* auszuschalten.
- Wildtyp ist nicht gleich Wildtyp. Zwischen den *D. discoideum*-Wildtypstämmen verschiedener Arbeitsgruppen ließen sich teils deutliche Unterschiede im Phänotyp beobachten. Diese können durch genetische Duplikationen

hervorgerufen werden und bspw. das Wachstums- bzw. Entwicklungsverhalten beeinflussen (Bloomfield *et al.* 2008). Der *Loser*-Phänotyp der *pks26*-REMI-Mutante beschreibt einen Prozess, der während der multizellulären Entwicklung stattfindet (Santorelli *et al.* 2008). Daher war es von außerordentlicher Bedeutung, dass bei einem *Cheating*-Assay alle Vergleichsstämme auf dem identischen Elternstamm basieren. Dies galt darüber hinaus auch für die weiteren durchgeführten Charakterisierungsassays.

- Die vollständig unabhängige Wiederholung des *pks26*-Knock-Outs ermöglichte zudem eine Verifizierung des bereits beschriebenen *Loser*-Phänotyps.

### 3.3.1 Strategie zur Generierung einer *pks26*-Knock-Out-Mutante

Für die Generierung des *pks26*-Knock-Out-Vektors diente pLPBLP als Ausgangsvektor. In diesem sind sechs Stopcodons in allen sechs Leserahmen, gefolgt von einer geflochtenen Blasticidin-Kassette, lokalisiert (Faix *et al.* 2004). Die notwendigen homologen Regionen (HR) wurden an genomischer DNA von AX4 unter Verwendung der Primerpaare *pks26*-13/*pks26*-14 (5'-HR) und *pks26*-15/*pks26*-16 (3'-HR) amplifiziert und sukzessive in pLPBLP ligiert, wofür die in den Primern enthaltenen Restriktionsschnittstellen genutzt wurden. Der auf diesem Weg erhaltene Vektor wurde pLPBLP-*pks26*KO genannt (Abbildung 14).

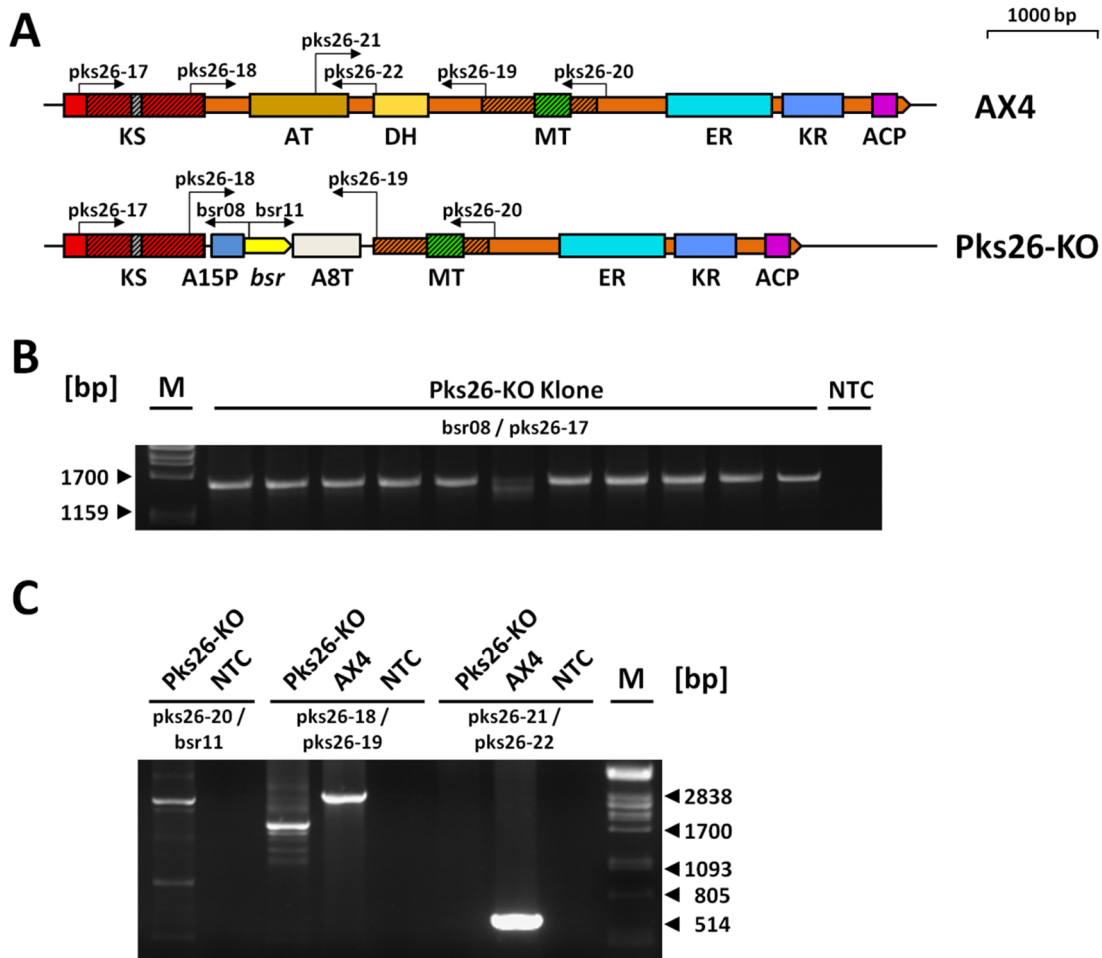


**Abbildung 14: Strategie zur Erzeugung einer *pks26*-Knock-Out-Mutante.** Dargestellt ist der genomische *pks26*-Locus in *D. discoideum*. Nach PCR-Amplifikation der 3'- und 5'-homologen Regionen wurden diese in den Vektor pLPBLP kloniert, wodurch das *pks26*-Knock-Out-Plasmid entstand, welches nach erfolgreicher homologer Rekombination im vorderen Bereich von *pks26* integrierte. bsr: Blasticidinresistenzgen, A15P: Aktin15-Promotor, A8T: Aktin8-Terminator.

Nach der Linearisierung mit Sall wurde pLPBLP-*pks26*KO in AX4 transformiert und blasticidinresistente Klone mittels PCR überprüft. Da nach dem Screening von ca. 300 Klonen kein positives Rekombinationsereignis gefunden werden konnte, wurde dazu übergegangen die *pks26*-Knock-Out-Kassette ohne Vektoranteile in AX4 zu transformieren. Diese wurde durch einen Sall/BamHI-Verdau von pLPBLP-*pks26*KO bzw. eine PCR am Plasmid pLPBLP-*pks26*KO mit den Primern pks26-13 und pks26-16 gewonnen. Nach diesen Änderungen konnten verschiedene positive Rekombinationsereignisse gefunden werden.

### 3.3.2 Überprüfung der korrekten Integration der Knock-Out-Kassette

Für das Screening wurde der *bsr*-spezifische Primer *bsr08* sowie *pks26-17* verwendet, welcher oberhalb des Bereichs der homologen Rekombination hybridisierte. Positive Klone sollten demnach eine Bande von 1622 bp aufweisen (Abbildung 15 B).

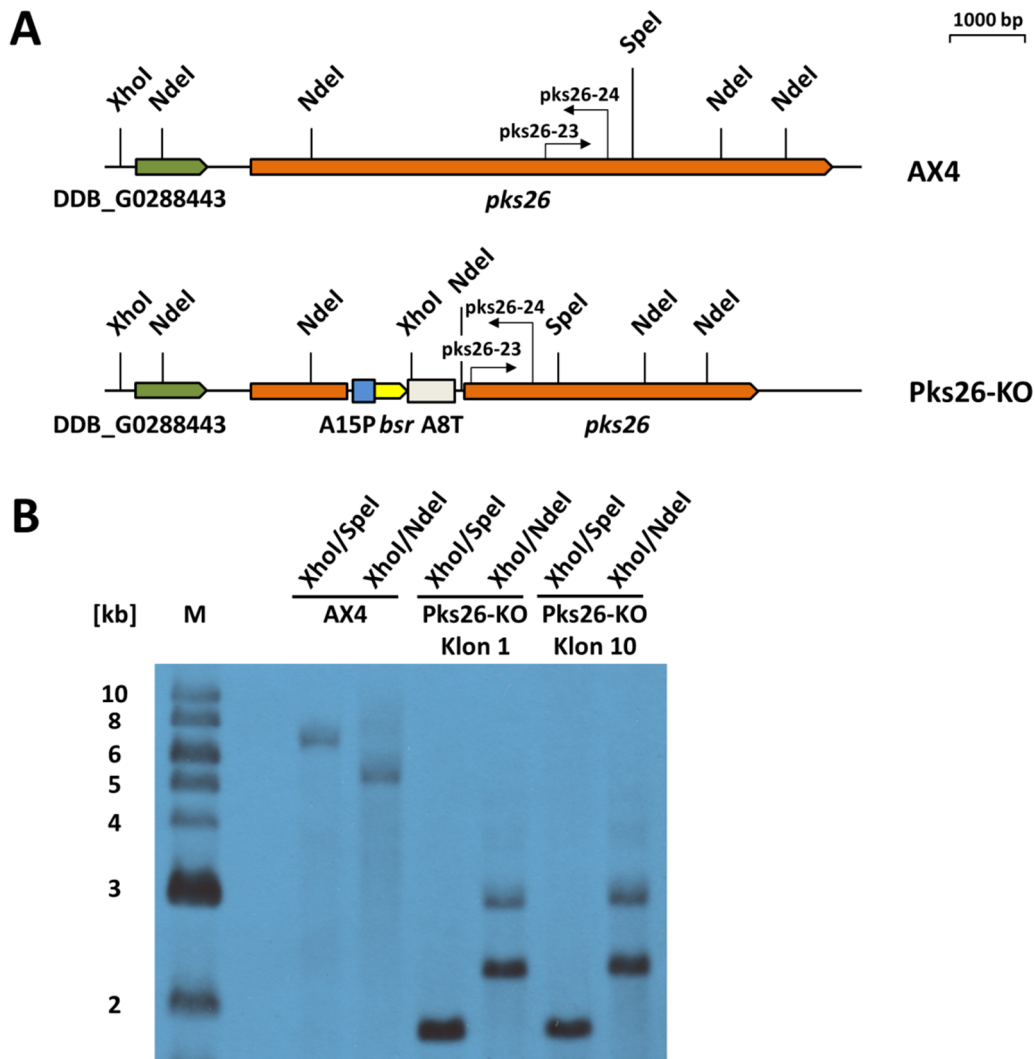


**Abbildung 15: PCR-Charakterisierung von Pks26-KO.** (A) Schematische Darstellung des *pks26*-Locus im Wildtyp AX4 und Pks26-KO. Die schwarzen Pfeile zeigen die Positionen der verwendeten Primer an. (B) Gelelektrophorese der Screening-PCR zum Test auf Integration der KO-Kassette. Untersucht wurde genomische DNA von 11 blasticidinresistenten Klone. (C) Gelelektrophorese der PCR-Charakterisierung von Pks26-KO Klon 1. Die verwendeten Primer sind oberhalb der jeweiligen Gelspuren angegeben. M: Lambda DNA/PstI Digest.

Eine Auswahl der gefundenen positiven Klone wurde weitergehend per PCR charakterisiert. Nach der im Screening verwendeten Primerkombination, welche in der BSR-Kassette sowie in dem Bereich oberhalb der homologen Rekombination hybridisierte, sollte nun der Bereich unterhalb der homologen Rekombination mit den Primern *bsr11/pks26-20* überprüft werden. Dabei sollten bei korrekter Integration ein Produkt von 2330 bp Länge gebildet werden (Abbildung 15 C). Durch diese zwei PCR's

konnte der korrekte Integrationsort der BSR-Kassette belegt werden. Ein Nachweis der korrekten Größe der BSR-Kassette erfolgte mit den Primern pks26-18/pks26-19, welche in den homologen Regionen hybridisieren. Der Abstand der homologen Regionen im Wildtyp beträgt etwa 2500 bp, während er in pLPBLP-pks26KO nur etwa 1600 bp beträgt. Folglich war zwischen Pks26-KO und AX4 ein Unterschied in der Produktlänge von etwa 900 bp zu erwarten (Abbildung 15 C). Mit einer weiteren Primerkombination sollte auf die Abwesenheit der Wildtypsequenz getestet werden. Die Primer pks26-21/pks26-22 binden in der authentischen *pks26*-Sequenz zwischen den homologen Regionen. Diese Sequenz sollte in Pks26-KO nicht mehr vorhanden sein, weshalb nur bei einer PCR an AX4 ein 602 bp langes Produkt gebildet werden kann (Abbildung 15 C). Zusammenfassend konnte die korrekte Integration der *pks26*-Knock-Out-Kassette mit vier verschiedenen Primerkombinationen nachgewiesen werden.

Die genomische Situation am *pks26*-Gen sollte mit einer unabhängigen Methode weiter untersucht werden. Um die korrekte Integration der Knock-Out-Kassette mit einem Southern Blot nachzuweisen, wurde die am 5'-Ende des Aktin-8-Terminators befindliche XhoI-Schnittstelle genutzt (Abbildung 16). In der Wildtypsequenz befindet sich eine XhoI-Schnittstelle oberhalb des Gens DDB\_G0288443. Ein Verdau mit XhoI und einem weiteren Restriktionsenzym, welches in passendem Abstand unterhalb der Integrationsstelle der KO-Kassette schneidet, sollte demnach bei genomischer DNA von AX4 und Pks26-KO Fragmente unterschiedlicher Größe ergeben. Diese konnten mit Hilfe einer biotinylierten Sonde detektiert werden, welche durch eine PCR mit den Primern pks26-23 und pks26-24 an genomischer DNA von AX4 gewonnen wurde. Für die Untersuchung wurde genomische DNA von AX4 sowie zwei unabhängigen Pks26-KO-Klonen gewonnen. In zwei getrennten Ansätzen wurde diese mit den Restriktionsenzymen XhoI/SpeI und XhoI/NdeI inkubiert. Beim Verdau von AX4 mit XhoI/SpeI war ein Fragment von ca. 6,7 kb Größe zu erkennen, was den Erwartungen entsprach (Abbildung 16 B). Im Gegensatz dazu zeigten beide Knock-Out-Mutanten ein Fragment von etwa 1,9 kb Größe. Dies bestätigte die korrekte Integration der Knock-Out-Kassette.



**Abbildung 16: Southern Blot zum Nachweis des *pks26*-Knock-Out.** (A) Schematische Darstellung des Zielgenlocus im *D. discoideum* Wildtypstamm AX4 und des *pks26*-Knock-Out-Stammes Pks26-KO. Die schwarzen Pfeile markieren die Bindestellen der für die Herstellung der biotinylierten Sonde verwendeten Primer pks26-23 und pks26-24. (B) Southern Blot. Genomische DNA der *D. discoideum* Stämme AX4 und Pks26-KO Klon 1 und 10 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI/SpeI und XhoI/NdeI verdaut. Zur Detektion wurde eine *pks26*-spezifische biotinylierte Sonde verwendet. Als Marker diente Biotinyliated 2-Log DNA Ladder (NEB).

Der Verdau mit XhoI/NdeI hingegen ergab ein unerwartetes Bild. Der Wildtyp AX4 zeigte eine etwa 5,4 kb große Bande, welche einem reinen NdeI Fragment entsprach. Der korrekte *pks26*-Knock-Out sollte ein 3,1 kb großes XhoI/NdeI-Fragment ergeben. Beide Knock-Out-Mutanten zeigten das erwartete Fragment, jedoch zusätzlich eine Bande von etwa 2,5 kb Größe. Diese kann durch eine zusätzliche NdeI-Schnittstelle erklärt werden. Sie stammt aus der MCS des verwendeten Vektors pLPBLP und befindet sich wenige Basenpaare oberhalb der PstI-Schnittstelle, in welche die 3'-HR kloniert wurde. Im Zuge der homologen Rekombination wurde sie zusammen mit der KO-Kassette integriert. Unter der Annahme, dass der Verdau an dieser NdeI-Schnittstelle nur unvollständig

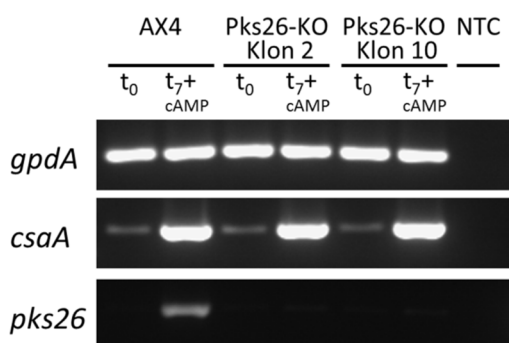


erfolgte, ergaben sich die beobachteten Fragmente von 2,5 kb und 3,1 kb Größe.

Wie die vorliegenden Ergebnisse aus den PCR-Untersuchungen sowie des Southern Blots deutlich zeigten, erfolgte die Integration der *pks26*-Knock-Out Kasette am korrekten Locus. Der Knock-Out von *pks26* konnte damit bestätigt werden.

### 3.3.3 Untersuchung der *pks26*-Expression in der Knock-Out-Mutante

Nach der Bestätigung des Knock-Outs von *pks26* stellte sich als erstes die Frage, ob die Integration der KO-Kasette die Transkription des Genes unterbindet. Wie bereits dargestellt wurde, wird das Gen in vegetativen Zellen nicht exprimiert, reagiert jedoch auf pulsatile Zugabe von cAMP. Aus diesem Grund wurde ein Pulsexperiment mit AX4 als Vergleich sowie zwei unabhängigen Klonen des *pks26*-Knock-Outs durchgeführt. Anschließend wurde die Genexpression mittels konventioneller RT-PCR bestimmt (Abbildung 17) (vgl. 3.2.2). Das konstitutiv exprimierte Gen *gpdA* diente dabei als Ladekontrolle sowie Kontrolle der Qualität der cDNA-Zubereitungen. Mit Hilfe des Entwicklungsmarkers *csaA* war es möglich, den entwicklungsstimulierenden Effekt des Pulsens mit cAMP zu überprüfen. Die für die Amplifikation des *pks26*-Transkripts verwendeten Primer hybridisieren am 3'-Ende von *pks26* (vgl. Abbildung 13 A).



**Abbildung 17: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Kontrolle der Expression von *pks26* in den Knock-Out-Stämmen.** Die PCR wurde an cDNA vegetativer Zellen (t<sub>0</sub>) sowie Zellen nach Inkubation in 1 × Phosphatpuffer für 2 Stunden gefolgt von Pulsen mit 30 nM cAMP für weitere 5 Stunden (t<sub>7</sub>+cAMP) durchgeführt. Als Primerpaare wurden verwendet: *gpdA*: Q-GAPDH-01/Q-GAPDH-02, *csaA*: csaA-05/csaA-06, *pks26*: pks26-1/pks26-2.

Die Intensität der *gpdA*-Banden war in allen Proben konstant und auch die Länge der PCR-Produkte entsprach den erwarteten 156 bp. Der Entwicklungsmarker *csaA* wurde bei AX4 und den beiden *pks26*-Knock-Out-Stämmen gleichermaßen exprimiert. In vegetativen Zellen (t<sub>0</sub>) war die Expression sehr gering, während das Pulsen hungernder Zellen mit

30 nM cAMP einen starken Anstieg der Genexpression zur Folge hatte ( $t_7+cAMP$ ). Somit haben die erforderlichen Bedingungen für die Induktion der *pks26*-Expression vorgelegen. In AX4 erfolgte diese wie bereits in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt wurde (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 13). In vegetativen Zellen ist keine Expression nachweisbar ( $t_0$ ), wohingegen das Pulsieren mit cAMP einen deutlichen Expressionsanstieg zur Folge hatte ( $t_7+cAMP$ ). Betrachtete man die *pks26*-Expression der untersuchten *pks26*-Knock-Out-Mutanten, so ließ sich weder in vegetativen noch in gepulsten Zellen eine deutliche Bande erkennen. Jedoch war bei beiden untersuchten Zeitpunkten in den KO-Mutanten sowie in vegetativen Wildtypzellen eine äußerst schwache Bande zu erkennen. Diese wurde als cAMP-pulsunabhängiges Artefakt interpretiert. Sie zeigte unabhängig von der Bedingung stets die gleiche schwache Intensität. Wurde die RT-PCR mit der Primerkombination *pks26*-21/-22 durchgeführt, welche innerhalb der deletierten Region hybridisiert (vgl. Abbildung 15 A), war lediglich eine Bande bei gepulsten Wildtypzellen nachweisbar. Die beiden KO-Mutanten zeigten keine Expression, d. h. *pks26* war durch fünfstündiges Pulsieren hungernder Zellen nicht mehr induzierbar.

### **3.4 Aktivierung der *pks26*-Expression durch Promotor-Knock-In („gene activation“)**

Durch den Knock-Out von *pks26* war in vegetativen Zellen kein veränderter Phänotyp zu erwarten, da das Gen lediglich in der frühen Entwicklungsphase, sowie nach dem Pulsieren mit cAMP exprimiert wird. Für die Identifikation und Isolation des *pks26* spezifischen Polyketids stellte *Pks26*-KO als Vergleichsstamm ein wertvolles Werkzeug dar.

Um das *pks26* spezifische Polyketid zu identifizieren, wurden konstant hohe Expressionslevel von *pks26* benötigt. Allein durch das Pulsieren mit cAMP war dies, insbesondere im Hinblick auf die Kultivierung größerer Volumina, nicht zu gewährleisten. Die Genaktivierungsstrategie, welche eine anhaltende Überexpression von *pks26* in vegetativen Zellen gewährleistet, stellte für dieses Problem eine sehr gute Lösung dar. Für die Überexpression eines Gens wird klassischerweise der Wildtyp mit einem Expressionsplasmid transformiert, welches das gewünschte Gen unter der Kontrolle eines starken Promotors beinhaltet. Nachteile dieser Vorgehensweise ist die Notwendigkeit, das vollständige Gen in einen Expressionsvektor zu klonieren, was aufgrund der Größe des *pks26*-Gens und seines hohen AT-Gehalts nicht trivial ist, sowie die beachtliche Anzahl an Insertionen an zufälligen Loci, welche zu ungewünschten

Veränderungen in der Genexpression führen können (Windhof *et al.* 2013). Dennoch wurde versucht, das 7713 bp lange *pks26*-Gen in den *Dictyostelium*-Expressionsvektor pPT130 (Thomason *et al.* 2006) zu klonieren, was jedoch scheiterte. Die Überexpression von *pks26* sollte aus diesen Gründen mit Hilfe einer „Genaktivierungsmethode“ (GA) erfolgen, in dem der endogene *pks26*-Promotor mittels homologer Rekombination durch den starken und weitgehend konstitutiv aktiven Aktin-15-Promotor ausgetauscht wurde. Diese Strategie führte bereits in abgewandelter Form in anderen Organismen zur Aktivierung stiller Naturstoffcluster und zur Isolierung neuer Naturstoffe (Kennedy und Turner 1996, Chiang *et al.* 2009, Brakhage und Schroeckh 2011, Biggins *et al.* 2012). und wurde auch in *D. discoideum* bereits einmal zur Aktivierung des in vegetativ wachsenden Zellen nicht exprimierten Gens *agnC* (codiert für ein Argonaut-Protein aus der RNAi-Maschinerie von *D. discoideum*) erfolgreich angewendet (Schmith *et al.* 2015).

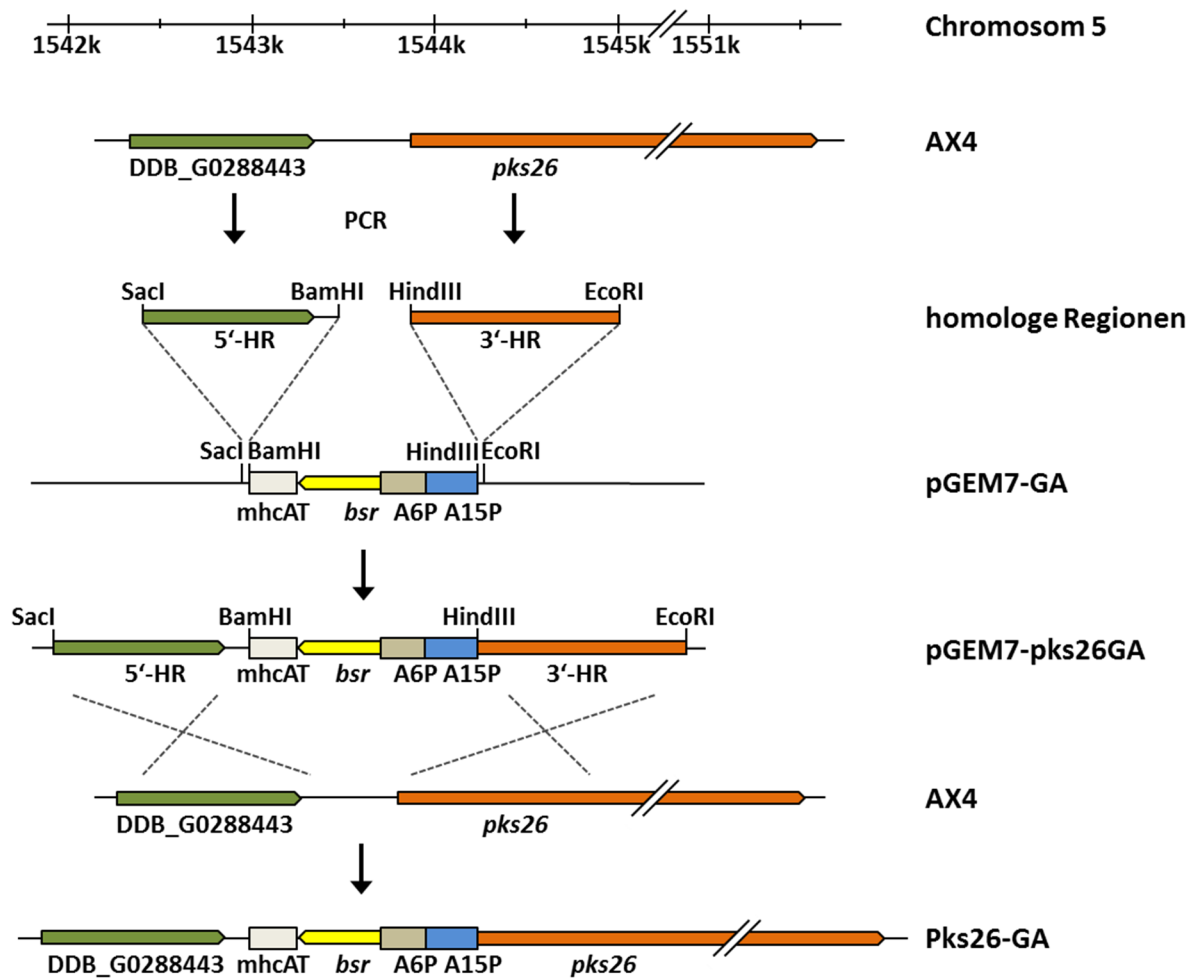
### 3.4.1 Strategie zur Erzeugung der *pks26*-Genaktivierungsmutante

Für einen erfolgreichen Promotoraustausch mittels homologer Rekombination war es notwendig, einen Vektor zu konstruieren, in welchem ein Aktin15-Promotor von den authentischen *D. discoideum* Sequenzen flankiert wird, die sich ober- und unterhalb des *pks26*-Promotors befinden. Um zusätzlich zur veränderten Transkriptmenge auch die gesteigerte Proteinexpression nachweisen zu können, sollte nicht nur eine reine *pks26*-GA-Mutante (Pks26-GA) erzeugt werden, sondern auch eine *pks26*-GA-Mutante, in welcher ein PKS26-Protein mit einem N-terminalen FLAG-Tag exprimiert wird (FLAG-Pks26-GA). Im Folgenden wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Strategie für die Erzeugung der *pks26*-Genaktivierungsmutante beschrieben (Abbildung 18). Die Strategie für FLAG-Pks26-GA war analog. Auf Unterschiede wird an den entsprechenden Stellen hingewiesen.

Der *D. discoideum* Expressionsvektor pDM326 beinhaltet eine Blasticidin Resistenzkassette mit einem Aktin-6-Promotor (A6P) und einem Terminator des Myosin-Gens (*mhcAT*). Der Aktin-6-Promotor war mit einem Aktin-15-Promotor fusioniert, der in gegenläufiger Expressionsrichtung funktionierte (Veltman *et al.* 2009). Durch einen Restriktionsverdau mit BamHI und BglII wurde ein Fragment erhalten, welches die Resistenzkassette zusammen mit dem Aktin-15-Promotor enthielt (Abbildung 18). Dieses wurde in den mit BamHI linearisierten Klonierungsvektor pGEM7zf(-) ligiert, so dass sich der Aktin-15-Promotor neben der HindIII-Schnittstelle auf pGEM7zf(-) befand. Da BamHI

und BglII einen identischen 5'-Überhang von vier Basen beim Restriktionsverdau erzeugen, sich aber in den restlichen zwei Basen der Erkennungssequenz unterscheiden, wurde die BglII-Schnittstelle durch die erfolgreiche Ligation zerstört. Der so erhaltene Vektor (pGEM7-Pks26-GA) konnte als Ausgangsvektor für die Erzeugung verschiedener GA-Stämme genutzt werden.

Anschließend wurden die ca. 1000 bp umfassenden Regionen an 3'- und 5'-Seite des *pks26*-Promotors per PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Die dafür verwendeten Primer beinhalteten am 5'-Ende die Sequenzen der für die Klonierung notwendigen Restriktionsendonukleasen. Für die 5'-homologe Region wurde mit den Primern pks26-3/pks26-4 eine PCR an genomischer DNA von AX4 durchgeführt, so dass ein 1065 bp langes Produkt entstand, welches die Nukleotide 47–975 des oberhalb von *pks26* lokalisierten Gens DDB\_G0288443 sowie 135 bp des intergenischen Bereichs zu *pks26* beinhaltet. Dieses wurde als SacI/BamHI-Fragment in pGEM7-GA kloniert.



**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Genaktivierungsstrategie für *pks26*.** Dargestellt ist der genomische *pks26*-Locus in *D. discoideum*. Nach PCR-Amplifikation der 3'- und 5'-homologen Regionen wurden diese in *pGEM7-GA* kloniert, wodurch das *pks26*-Genaktivierungsplasmid entstand. Nach erfolgreicher homologer Rekombination wurde die Expression von *pks26* durch den konstitutiv aktiven Aktin-15-Promotor gesteuert. *mhcAT*: Myosin Heavy Chain A-Terminator, *bsr*: Blastizidinresistenzgen, *A6P*: Aktin-6-Promotor, *A15P*: Aktin-15-Promotor.

Die 3'-homologe Region (3'-HR) wurde mit den Primern *pks26-5/pks26-6* an genomischer DNA von AX4 amplifiziert. Das 1137 bp lange Produkt umfasste die Nukleotide 1-1106 von *pks26* und wurde als *HindIII/EcoRI*-Fragment in *pGEM7-GA* kloniert, welcher bereits die 5'-HR enthielt. Im Falle von Flag-Pks26-GA wurde die 3'-HR mit den Primern *pks26-12/pks26-6* am Plasmid *pGEM-pks26HR2\_neu* per PCR amplifiziert. Dabei enthielt der 89 bp lange Primer *pks26-12* nach dem Transkriptionsstart die Sequenz für einen doppelten FLAG-Tag, so dass nach erfolgreicher homologer Rekombination ein N-terminal FLAG-markiertes PKS26-Protein gebildet werden sollte. Das 1173 bp lange PCR-Produkt wurde als *HindIII/EcoRI*-Fragment in den Vektor *pGEM7-HR1\_pks26GA* kloniert.

Der erhaltene Vektor pGEM7-pks26GA (pGEM7-FLAG-pks26GA) wurde durch einen SacI-Verdau linearisiert und in AX4-Zellen transformiert. Nach einer Selektion in HL5-Medium, welches 6 µg/µl Blasticidin enthielt, wurden die entstandenen Klone vereinzelt und genomische DNA extrahiert. Das PCR-Screening für eine korrekte Insertion der GA-Kassette wurde mit einem Blasticidin-Gen spezifischen Primer durchgeführt sowie einem Primer, welcher außerhalb der 3'-HR hybridisierte. Positive Klone wurden darüber hinaus durch eine die 5'-HR überspannende PCR überprüft (Daten nicht gezeigt).

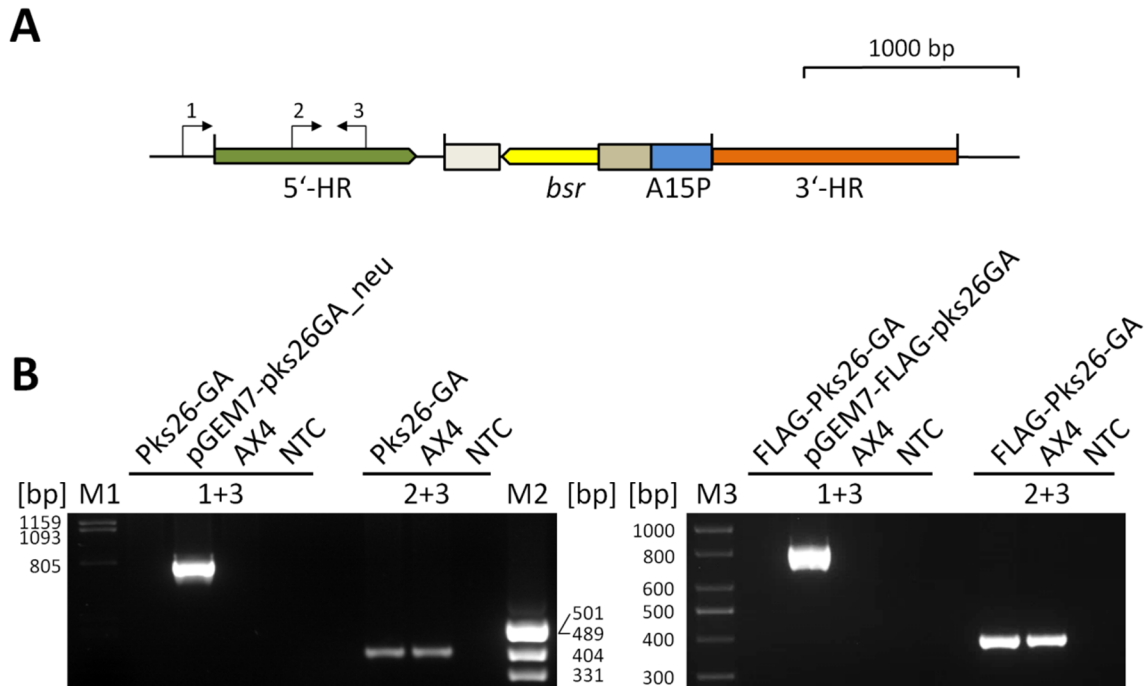
### 3.4.2 Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der GA-Mutanten

Für eine korrekte Expression des PKS26-Proteins war eine fehlerfreie Sequenz im Bereich der 3'-HR, in der das Startcodon liegt, sowie eine korrekte Integration der GA-Kassette eine grundlegende Voraussetzung. In einem ersten Versuch zur Erzeugung einer *pks26*-GA-Mutante wurde der *pks26*-Locus nach der homologen Rekombination sequenziert. Dabei fiel ein durch eine Punktmutation eingeführtes Stoppcodon auf, was zur Folge hatte, dass nur wenige Aminosäuren des N-Terminus des PKS26-Proteins exprimiert wurden. Die betreffende Mutante wies zwar eine deutlich erhöhte Genexpression von *pks26* auf, war aber aufgrund des eingeführten Stoppcodons für die Identifikation des PKS26-Biosyntheseproduktes aufgrund der fehlenden Proteinbildung nicht geeignet (vgl. Abbildung 21). Aus diesem Grund wurde die 3'-HR in pGEM7-pks26GA durch eine erneut amplifizierte ersetzt und dadurch der Vektor pGEM7-pks26GA\_neu erhalten. Nach Transformation und weiterem Screening konnte eine geeignete Mutante identifiziert und der *pks26*-Locus im Bereich der homologen Rekombination sequenziert werden (vgl. Anhang B – Sequenzierter Bereich der *pks26*-Genaktivierungsmutante). Die Sequenz umfasste die letzten 62 bp des A15-Promotors, eine Linkerregion, welche die zerstörte BglII-Schnittstelle, die Schnittstelle für HindIII und 19 bp der authentischen *pks26*-Upstream-Sequenz enthält, sowie die ersten 1208 bp von *pks26*. Die Alignment-Untersuchungen ergaben einen korrekten Übergang von rekombinierter zu authentischer *pks26*-Sequenz. Somit konnte eine Verschiebung des Leserahmens ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde eine Punktmutation festgestellt. Adenin an Position 456 der dargestellten Sequenz wurde dabei durch Guanin ersetzt. Dieser Austausch führte jedoch nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz im PKS26-Protein, so dass er toleriert werden konnte.

Bei der Generierung des Stammes FLAG-Pks26-GA wurde die 3'-HR lediglich im Vektor sequenziert. Das Alignment mit der *pks26*-Sequenz ergab eine fehlerfreie Sequenz der 3'-HR inklusive der bereits im Template enthaltenen stillen Mutation. Die Sequenz eines doppelten FLAG-Tags befand sich hinter dem ATG im gleichen Leserahmen wie *pks26*.

Zur Bestätigung des korrekten Promotoraustausches wurden im nächsten Schritt die erzeugten Genaktivierungsmutanten durch weitere unabhängige Methoden überprüft. Bei einer homologen Rekombination bestand neben der gewünschten alleinigen Integration der von beiden homologen Regionen flankierten Sequenz durch eine Doppelrekombination naturgemäß auch die Möglichkeit einer Einfachrekombination. Im Falle von *pks26* würde hierbei nach der Hybridisierung der 3'-HR der vollständige GA-Vektor in den Bereich am 5'-Ende von *pks26* integrieren, was wiederum ungewünschte Effekte, beispielsweise auf die Expression umliegender Gene, haben kann. Ein zielgenauer alleiniger Austausch des *pks26*-Promotors findet nicht statt. Nachdem für beide GA-Stämme die korrekte homologe Rekombination am *pks26*-Locus durch Sequenzierungen überprüft wurde, sollte nun ebenfalls das 5'-Ende der GA-Kassette in beiden Stämmen überprüft und eine Integration von Vektor-DNA ausgeschlossen werden. Hierfür wurde an genomischer DNA der GA-Mutanten eine PCR mit dem vektorspezifischen Primer RSP und dem Primer DDB\_G0288443-04, welcher in der 5'-HR hybridisiert, durchgeführt (Abbildung 19 B, Primerkombination 1+3). Nur bei einer Integration des Vektorgerüsts konnte an genomischer DNA von Pks26-GA sowie FLAG-Pks26-GA ein PCR-Produkt von 830 bp Länge entstehen. Als Positivkontrolle diente der jeweilige GA-Vektor pGEM7-*pks26GA\_neu* bzw. pGEM7-FLAG-*pks26GA* und als Negativkontrolle wurde genomische DNA von AX4 verwendet. Während die Positivkontrolle die erwartete Bande zeigte, ergab die Primerkombination 1+3 an beiden GA-Mutanten keine Bande (Abbildung 19 B). Negativkontrollen und NTC (*no template control*) zeigten ebenfalls keine Banden. Da es sich um einen Negativbeweis durch das Ausbleiben einer Bande handelt, musste die Qualität der verwendeten DNA-Präparationen durch eine weitere PCR sichergestellt werden. Die Primer DDB\_G0288443-03 und DDB\_G0288443-04 hybridisieren im Bereich der 5'-HR und ergaben an den drei verwendeten DNA-Präparationen das korrekte Produkt von 401 bp Länge, was deren hinreichende Qualität zeigte (Abbildung 19, Primerkombination 2+3). Da die Kontroll-PCRs die erwarteten Ergebnisse lieferten, konnte von einwandfreien PCR Bedingungen ausgegangen werden. Weder genomische DNA von Pks26-GA noch FLAG-Pks26-GA ergab mit der vektorspezifischen

Primerkombination 1+3 eine Bande. Dies sprach gegen eine Integration des Vektorgerüsts und war ein weiterer Nachweis, dass bei beiden GA-Stämmen ein alleiniger Austausch des authentischen *pks26*-Promotors gegen den Aktin15-Promotor erfolgt ist.

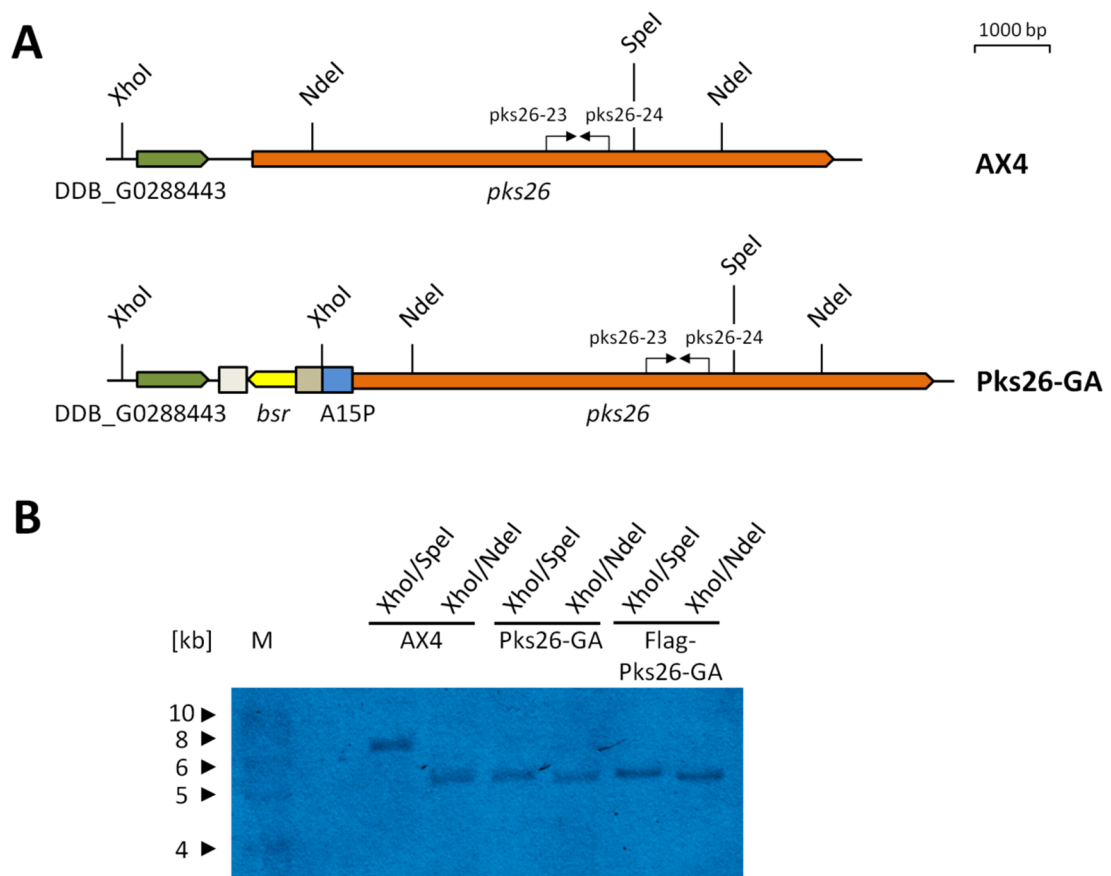


**Abbildung 19: Test auf Vektorintegration.** (A) Schematische Darstellung der Genaktivierungskassette auf den Plasmiden pGEM7-pks26GA<sub>neu</sub> und pGEM7-FLAG-pks26GA. Die schwarzen Pfeile zeigen die Positionen der verwendeten Primer an. Primer 1=RSP, Primer 2=DDB\_G0288443-03, Primer 3=DDB\_G0288443-04. (B) PCR-Analyse zum Test auf Vektorintegration. Die Primerkombination 1+3 ergab nur am jeweiligen GA-Plasmid ein Produkt der erwarteten Größe, nicht aber an genomischer DNA der korrekten GA-Mutante. Als Negativkontrolle wurde eine PCR an genomischer DNA von AX4 durchgeführt. Die Primerkombination 2+3 diente zum Qualitätsnachweis der genomischen DNA-Präparationen. M1: Lambda DNA/PstI Digest, M2: pUC19 BsiSI (HpaII) Digest, M3: Low-Range DNA-Ladder, NTC: no template control.

Um die genomische Situation am *pks26*-Gen weiter zu untersuchen, sollte ein Southern Blot durchgeführt werden (Abbildung 20). Im Bereich des *pks26*-Locus befindet sich eine XhoI-Restriktionsschnittstelle stromaufwärts von DDB\_G0288443. Durch die Integration der GA-Kassette am korrekten Ort wurde eine zusätzliche XhoI-Schnittstelle eingefügt, welche sich am 5'-Ende des Aktin 15-Promotors etwa 1,4 kb stromabwärts der nativen XhoI-Schnittstelle befindet (Abbildung 20 A). Ein Verdau mit XhoI und einem weiteren Restriktionsenzym, welches einmalig im Bereich des *pks26*-Locus schneidet, sollte demnach bei AX4 und Pks26-GA Fragmente unterschiedlicher Größe ergeben. Diese könnten mit Hilfe eines Southern Blots sichtbar gemacht werden. Zur Überprüfung dieser



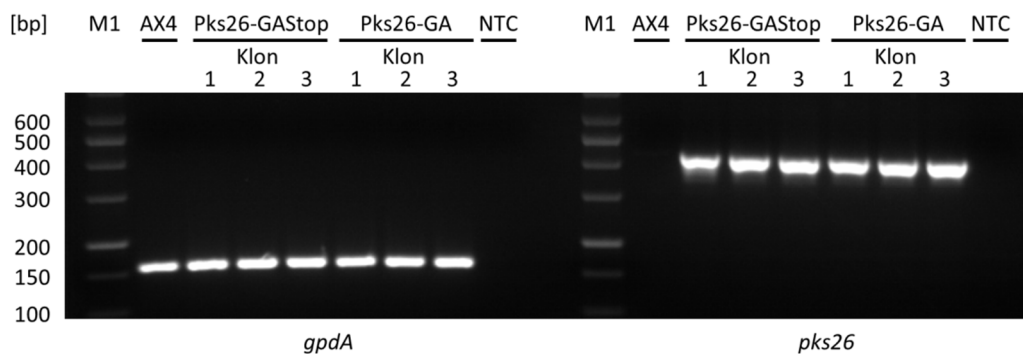
Theorie wurde vom Wildtypstamm AX4 sowie von den *pks26*-Genaktivierungsmutanten Pks26-GA und Flag-Pks26-GA verdaubare genomische DNA isoliert und mit den Restriktionsenzymkombinationen XhoI/SpeI sowie XhoI/NdeI verdaut. Die Detektion der Fragmente erfolgte mit einer biotinylierten Sonde, welche durch eine PCR mit den Primern pks26-23 und pks26-24 an genomischer DNA von AX4 gewonnen wurde. Für den Verdau mit XhoI/SpeI ließen sich die erwarteten Fragmente von ca. 6,7 kb (AX4) und ca. 5,4 kb (Pks26-GA und Flag-Pks26-GA) erkennen (Abbildung 20 B). Des Weiteren zeigte der Verdau mit XhoI/NdeI für alle drei Stämme ein Fragment von 5,4 kb Länge. Dies entsprach ebenfalls den Erwartungen, da dieser Verdau lediglich ein detektierbares NdeI Fragment erzeugte, dessen Länge sich in AX4 und den beiden GA-Mutanten nicht unterscheidet.



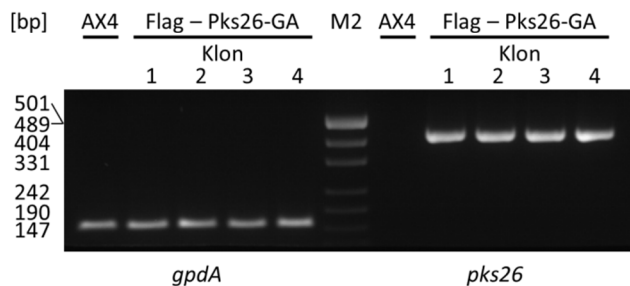
**Abbildung 20: Southern Blot zur Überprüfung der *pks26*-GA-Mutanten.** (A) Schematische Darstellung des Zielgens im *D. discoideum* Wildtypstamm AX4 und des *pks26*-Genaktivierungsstamms Pks26-GA, welcher in dieser Darstellung ebenfalls Flag-Pks26-GA entspricht. Die schwarzen Pfeile markieren die Bindestellen der für die Herstellung der biotinylierten Sonde verwendeten Primer pks26-23 und pks26-24. (B) Southern Blot. Genomische DNA der *D. discoideum* Stämme AX4 und Pks26-GA wurde mit den Restriktionsenzymkombinationen XhoI/SpeI und XhoI/NdeI verdaut. Zur Detektion wurde eine *pks26*-spezifische biotinylierte Sonde verwendet. Als Marker diente Biotinyliated 2-Log DNA Ladder (NEB).

Nachdem der *pks26*-Locus der erzeugten Genaktivierungsmutanten mit verschiedenen Methoden untersucht wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass ein korrekter Austausch des nativen *pks26*-Promotors durch den Aktin 15-Promotor erfolgt ist. Als nächster Schritt sollte nun die Genexpression von *pks26* während des vegetativen Wachstums in den erzeugten Mutanten untersucht werden. Dafür wurde eine konventionelle RT-PCR an cDNA von drei bzw. vier unabhängigen Klonen durchgeführt (Abbildung 21).

## A



## B

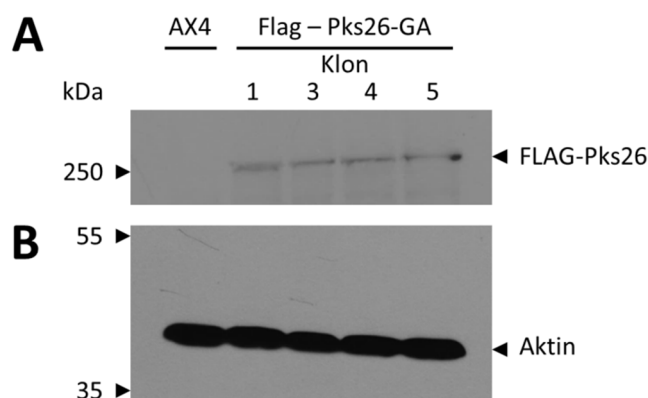


**Abbildung 21: Gelelektrophorese der RT-PCR zur Überprüfung der *pks26*-Expression der Genaktivierungsmutanten.** (A) Expression von *pks26* in den Genaktivierungsmutanten Pks26-GAStop und Pks26-GA (B) Expression von *pks26* in den Genaktivierungsmutanten Flag-Pks26-GA Die PCR wurde jeweils an cDNA vegetativer Zellen von 3 bzw. 4 unabhängigen Klone durchgeführt. Als Primerpaare wurden verwendet: *gpdA*: Q-GAPDH-01/Q-GAPDH-02, *pks26*: pks26-1/pks26-2, M1: Low Range DNA Ladder, M2: pUC19 BsiSI (HpaII) Digest.

Das Gen *gpdA* diente dabei als Kontrolle der verwendeten cDNA Präparationen (vgl. 3.2.2). Durch die alleinige Amplifikation des 156 bp langen Produkts konnte eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden, welche ein zusätzliches Produkt von 247 bp Länge erzeugt hätte. Durch die gleiche Bandenstärke konnte von einer etwa gleichen Menge an eingesetzter RNA ausgegangen werden. Demnach konnte die Produktmenge der PCR an *pks26* für die Abschätzung des Expressionslevels

herangezogen werden. Der Stamm AX4 zeigte wie erwartet keine Bande bzw. keine Expression von *pks26* (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 13). Dahingegen zeigten die drei Klone von Pks26-GAStop und Pks26-GA eine mit *gpdA* vergleichbare Expressionsstärke, wobei die Produktlänge den erwarteten 425 bp entsprach. Innerhalb der GA-Mutanten war kein Unterschied in der Expression von *pks26* erkennbar. Ebenso verhielten sich die vier untersuchten Klone von Flag-Pks26-GA. Auch sie zeigten im Gegensatz zum Wildtyp während des vegetativen Wachstums eine starke Expression von *pks26*. Damit konnte auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden, dass der Austausch des nativen *pks26*-Promotors gegen den Aktin 15-Promotor zu einer robusten Erhöhung des Expressionslevels von *pks26* in vegetativen Zellen führte.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Erhöhung des Transkriptionslevels sollte nachfolgend die Bildung des FLAG-markierten PKS26-Proteins in FLAG-Pks26-GA-Transformanten nachgewiesen werden. Hierfür wurden Gesamtzelllysate von AX4 und vier unabhängigen Klonen von FLAG-Pks26-GA in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot untersucht (Abbildung 22). Dabei wurde die Detektion des FLAG-Pks26-Proteins mit einem FLAG-spezifischen Antikörper durchgeführt. Anschließend erfolgte die Detektion von Aktin mit einem Aktin-Antikörper als Beladungskontrolle.



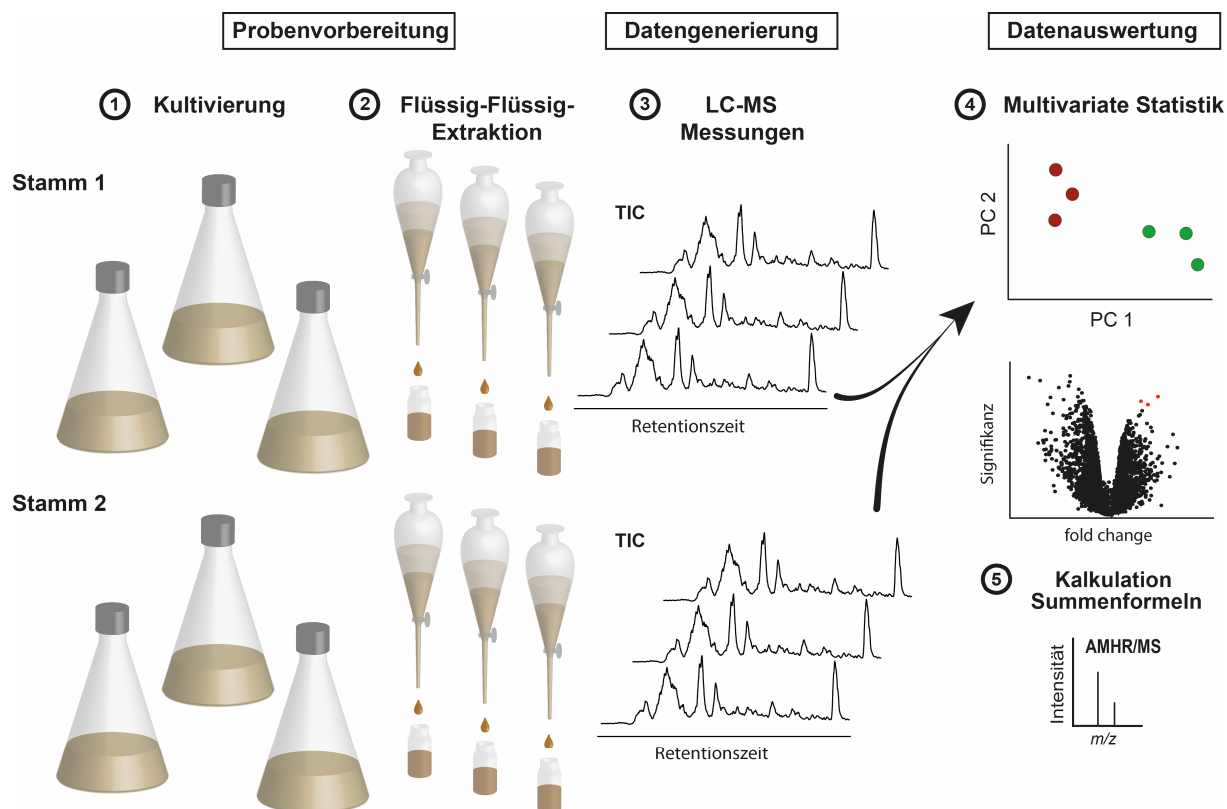
**Abbildung 22: Western-Blot zum Nachweis von Flag-Pks26.** Western-Blot von Gesamtzelllysaten von AX4 und vier unabhängigen Klonen der FLAG-markierten *pks26*-Genaktivierungsmutante FLAG-Pks26-GA. Zur Detektion wurde ein gegen den N-terminalen FLAG-Tag gerichteter Antikörper (A) sowie ein Aktin-Antikörper (B) verwendet.

Die Detektion mit dem FLAG-spezifischen Antikörper zeigte FLAG-Pks26 in den vier untersuchten Mutanten (Abbildung 22, A). Somit konnte für FLAG-Pks26-GA nach der deutlich erhöhten Genexpression ebenfalls die Expression des PKS26-Proteins

nachgewiesen werden. Die Laufhöhe der Bande entsprach dabei dem berechneten Molekulargewicht von ca. 290 kDa. Für die Identifizierung des *pks26*-abhängigen Polyketids stellte FLAG-Pks26GA ein sehr gut geeignetes Werkzeug dar, da davon ausgegangen werden konnte, dass die für die Biosynthese notwendige Polyketidsynthase bereits in vegetativen Zellen zur Verfügung steht und nicht nur während der multizellulären Entwicklung induziert wird. Die geplanten Extraktionsversuche wurden daher mit Pks26-GA sowie FLAG-Pks26-GA durchgeführt.

### **3.5 Einfluss der *pks26*-Expression auf den Sekundärmetabolismus**

Nach erfolgreicher Erzeugung der *pks26*-Genaktivierungs- sowie der Knock-Out-Mutanten stand zusammen mit dem Wildtyp AX4 ein geeignetes Set an Stämmen zur Verfügung, um in vergleichenden Untersuchungen mittels LC-MS das Metabolom zu untersuchen. Ziel war es hierbei, im Gesamtkulturextrakt der jeweiligen Kandidatenstämme ein PKS26-spezifisches Polyketid zu identifizieren sowie den Einfluss der veränderten Gen- bzw. Proteinexpression auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu untersuchen. Die Identifikation möglicher PKS26-spezifischen Polyketide erfolgte nach dem in Abbildung 23 dargestellten Workflow.

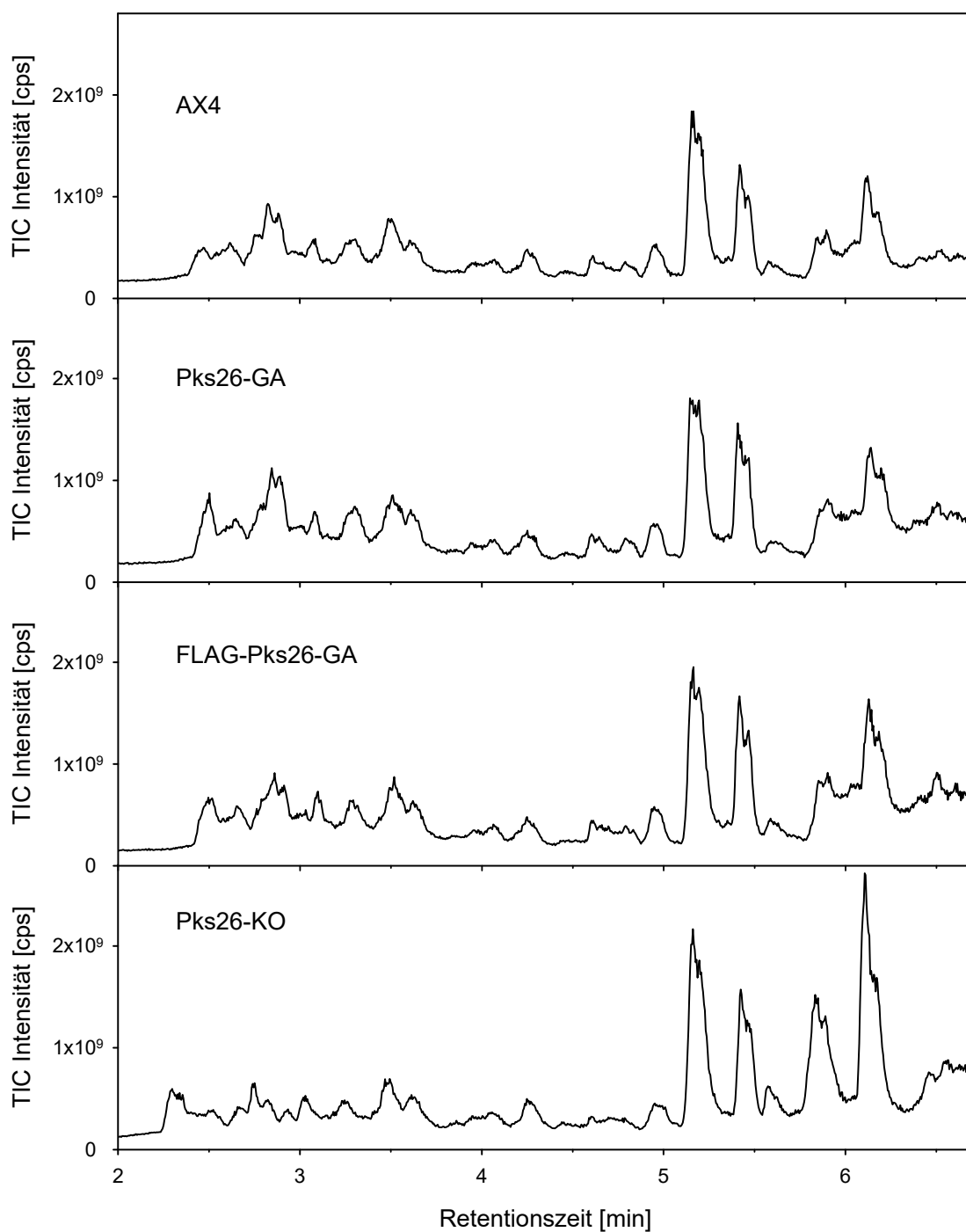


**Abbildung 23: Kultivierung, Extraktion und analytischer Prozess der LC-MS-Untersuchung der *pks26*-Mutanten.** Die Stämme AX4, Pk26-GA, FLAG-Pks26-GA und Pks26-KO wurden in SIH-Medium jeweils in biologischen Triplikaten kultiviert und ab der exponentiellen Wachstumsphase mit 2,5 mM Natriumacetat supplementiert (1). Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Gesamtkultur mit Ethylacetat extrahiert (2). Die Rohextrakte wurden mittels UHPLC-ESI-HRAM/MS analysiert (3). Die erhaltenen Datensätze wurden mit der Software XCMS online™ (Tautenhahn *et al.* 2012, Gowda *et al.* 2014) statistisch ausgewertet und interessante „features“ über eine zusätzliche Filterstrategie extrahiert (4). Mit der Software Xcalibur™ (Thermo Scientific) wurden aus den gemessenen *m/z* Summenformeln berechnet (5).

Die erzeugten *pks26*-Mutanten Pks26-GA, FLAG-Pks26-GA, Pks26-KO sowie der Wildtyp AX4 wurden jeweils in Triplikaten bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert. Nach Extraktion der jeweiligen Gesamtkultur wurden die biologischen Replikate mittels UHPLC-ESI-HRAM/MS analysiert. UHPLC-ESI-HRAM/MS vereint für die Identifikation und Analyse von Naturstoffen mehrere Vorteile. Die UHPLC ermöglicht durch die kurzen Analyselaufzeiten bei gleichzeitiger sehr guter Trennleistung einen hohen Probendurchsatz. Zudem ist es mittels HRAM/MS-Geräten, wie dem hier verwendeten Q Exactive Plus Orbitrap-Massenspektrometer, möglich, Summenformeln zu den einzelnen Massen aufgrund der Massengenauigkeit von 0,5-1 ppm exakt zu kalkulieren und die einzelnen Marker infolge des Auflösungsvermögens von bis zu  $R=280000$  sicher zu isolieren (Brenton und Godfrey 2010).

Die mit UHPLC-ESI-HRAM/MS aufgenommenen Datensätze wurden anschließend einer visuell-qualitativen Vorauswertung unterzogen, um augenscheinliche Unterschiede im chromatographischen Profil der Gesamtionenstrom-Chromatogramme (TIC, engl.: „*total ion current*“) der einzelnen Stämme zu identifizieren (Abbildung 24). Im Ergebnis zeigten sich keine visuell erfassbaren Unterschiede in den einzelnen Messungen. Insbesondere AX4, Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA wiesen ein nahezu identisches chromatographisches Profil auf. Lediglich das Chromatogramm von Pks26-KO zeigte im Vergleich zu AX4 einen leicht unterschiedlichen Intensitätsverlauf im Retentionszeitfenster von 2,25–2,5 min. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Peak-Intensität bei 5,75–6,25 min im Vergleich zu AX4 beobachtet werden. Als Ursache dieser Unterschiede konnten aber keine diskreten Massen im Spektrum identifiziert werden.

Durch die Kultivierung in einem komplexen Medium (vgl. 2.1.5) findet sich eine erhebliche Anzahl an Mediumbestandteilen im Extrakt und so auch im Chromatogramm wieder. Dies erschwert die visuelle Analyse deutlich. Es ist möglich, dass Sekundärmetabolite wie z.B. Polyketide durch Mediumbestandteile maskiert werden und dadurch nicht visuell im Spektrum identifiziert werden können.



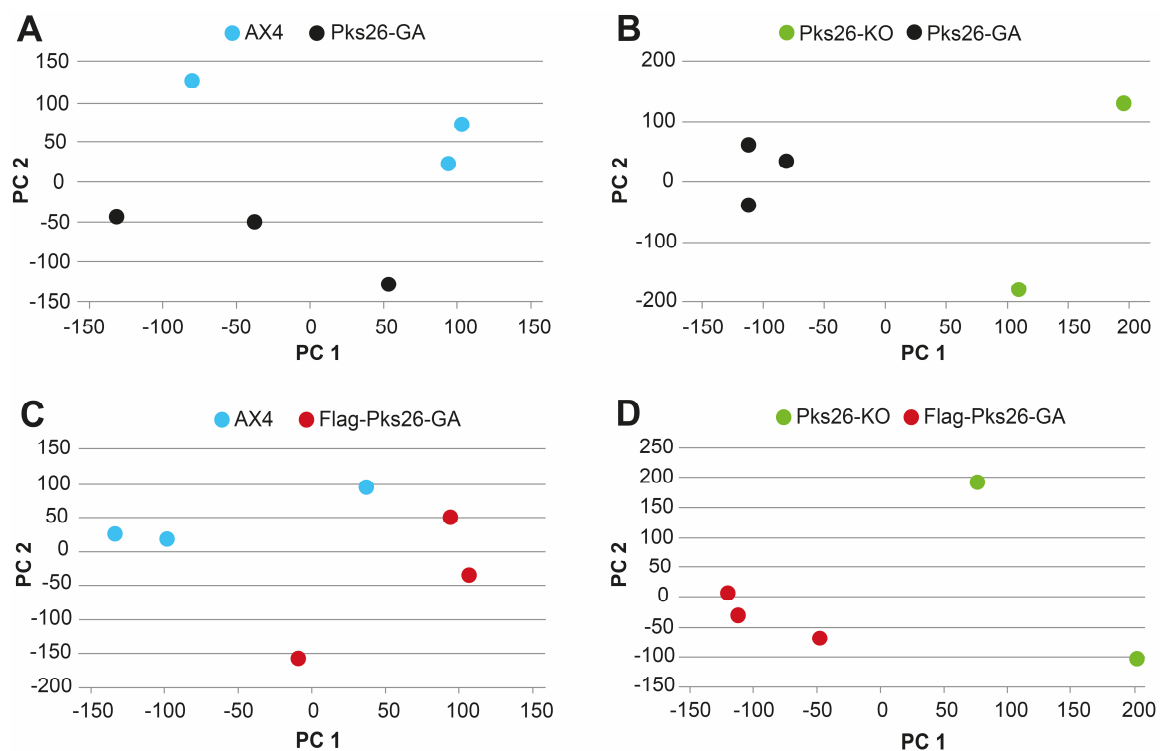
**Abbildung 24: TIC-Chromatogramme der Gesamtkulturextrakte.** Verwendet wurden die UHPLC-ESI-HRAM/MS-Daten der Gesamtkulturextrakte des Wildtyps AX4 sowie der *pk26*-Mutanten Pks26-KO, Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA.

Daher wurde in einem weiteren Schritt ein *metabolic profiling* mit den Stämmen durchgeführt, um den Zielmetabolit (PKS26-spezifisches Polyketid), welcher möglicherweise durch Überlagerung mit weiteren Substanzen visuell nicht demaskierbar war, zu identifizieren. Hierfür eignet sich der metabolomische Ansatz insbesondere, da

dadurch kleine Moleküle < 1000 Da erfasst werden. Metabolomische Untersuchungen mittels LC-MS sind besonders in der chemischen Ökologie verbreitet, um unbekannte Metabolite zu identifizieren (Kuhlich und Pohnert 2015). Zur *in silico* Prozessierung des Datensatzes wurde hier auf die Software XCMS online™ (Tautenhahn *et al.* 2012, Gowda *et al.* 2014) zurückgegriffen (vgl. 2.2.3.4).

Im ersten Schritt der Prozessierung wurden die sogenannten „*features*“ ermittelt. Dies sind Signale, welche ein einzigartiges Verhältnis von Masse zu Ladung, Retentionszeit und Peakform aufweisen. In einem zweiten Schritt wurde ein Retentionszeit-Alignment durchgeführt und in den verschiedenen Datensätzen nach gleichen *features* gesucht. Der dritte Schritt umfasste eine Analyse der Intensitäten der detektierten *features* sowie einen Signifikanz-Test (T-Test). Eine Hauptkomponentenanalyse (PCA, engl.: „*principal component analysis*“) reduzierte den multidimensionalen UHPLC-ESI-HRAM/MS-Datensatz auf Hauptkomponenten (PC, engl.: „*principal component*“), welche die Gesamtvarianz abbilden (Wold *et al.* 1987). Die erhaltenen Werte für die ersten zwei Hauptkomponenten, welchen den größten Teil der Gesamtvarianz im Datensatz abbilden, wurden in einem zweidimensionalen Koordinatensystem, dem Score Plot dargestellt (Abbildung 25). Somit ließen sich Unterschiede und generelle Tendenzen in multidimensionalen Datensätzen erkennen, ohne die dafür verantwortlichen Parameter genau zu kennen. Für die vorliegende Untersuchung wurden Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA jeweils mit dem Elternstamm AX4 sowie mit der *pks26*-Knock-Out-Mutante Pks26-KO verglichen und die Unterschiede zwischen den Gesamtkulturextrakten im Score Plot visualisiert (Abbildung 25 A-D).





**Abbildung 25: Hauptkomponentenanalyse der UHPLC-ESI-HRAM/MS-Daten der *pks26*-Mutanten.** Aus der Hauptkomponentenanalyse resultierende Score Plots. Verwendet wurden die UHPLC-ESI-HRAM/MS-Daten der Gesamtkulturextrakte des Wildtyps AX4 sowie der *pks26*-Mutanten Pks26-KO, Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA. Es wurden jeweils zwei Stämme miteinander verglichen. (A) Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA, (B) AX4 und Pks26-KO, (C) AX4 und Pks26-GA, (D) AX4 und FLAG-Pks26-GA. Für Pks26-KO konnten nur zwei biologische Replikate ausgewertet werden.

Der Vergleich von Pks26-GA mit AX4 zeigte eine Trennung in zwei Gruppen anhand der zweiten Hauptkomponente, während in der ersten Hauptkomponente keine Trennung erkennbar war (PC1 27 %, PC2 24 %) (Abbildung 25 A). Im Score Plot von Pks26-KO und Pks26-GA waren ebenfalls zwei gut getrennte Gruppen zu erkennen, welche sich in der ersten Hauptkomponente unterscheiden ließen (PC1 41 %, PC2 28 %) (Abbildung 25 B).

Der Wildtyp AX4 und FLAG-Pks26-GA zeigten im Score Plot nur eine schwache Trennung (PC1 27 %, PC2 22 %) (Abbildung 25 C). Verglichen gegen Pks26-KO zeigte FLAG-Pks26-GA jedoch eine deutliche Trennung anhand der ersten Hauptkomponente (PC1 38 %, PC2 28 %) (Abbildung 25 D).

Weiterführend wurden die erhaltenen XCMS-Datensätze mit Hilfe einer geeigneten Filterstrategie in vier Schritten nach möglichen Biosyntheseprodukten von Pks26 untersucht, welche für die Trennung verantwortlich sein könnten. Im ersten Schritt wurden *features* extrahiert, deren Intensität im Vergleich zu AX4 zunahm. Hierfür wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5% und eine relative Änderung der Peakintensität (*fold change*) von  $\geq 1,5$  angenommen. *Features*, deren Intensität im Vergleich zu AX4 abnahm,

wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Im zweiten Schritt wurden die extrahierten *features* anhand des jeweiligen *extracted ion chromatogram* (EIC) bewertet und *features* aussortiert, welche nicht einem diskreten Peak zugeordnet werden konnten. Die auf diesem Weg für Pks26-GA und FLAG-Pks26-GA erhaltenen *features* wurden in einem dritten Schritt zusammengeführt. *Features*, welche nicht aus beiden Stämmen extrahiert werden konnten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Von den auf diesem Weg erhaltenen *features* wurden im vierten Schritt *features* ausgeschlossen, welche eine erhebliche Intensität in Pks26-KO zeigten. Durch diese Strategie konnten die umfangreichen UHPLC-ESI-HRAM/MS-Datensätzen auf wenige hochrelevante Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26 reduziert werden.

Die oben dargelegte Filterstrategie wurde im Folgenden auf die einzelnen metabolomischen Vergleichsuntersuchungen angewendet. Beim Vergleich von Pks26-GA mit AX4 wurden von XCMS online 35.557 *features* erkannt. Durch den ersten Schritt der oben beschriebenen Filterstrategie konnten 765 signifikante *features* isoliert und diese nach Bewertung der EIC auf 239 *features* reduziert werden.

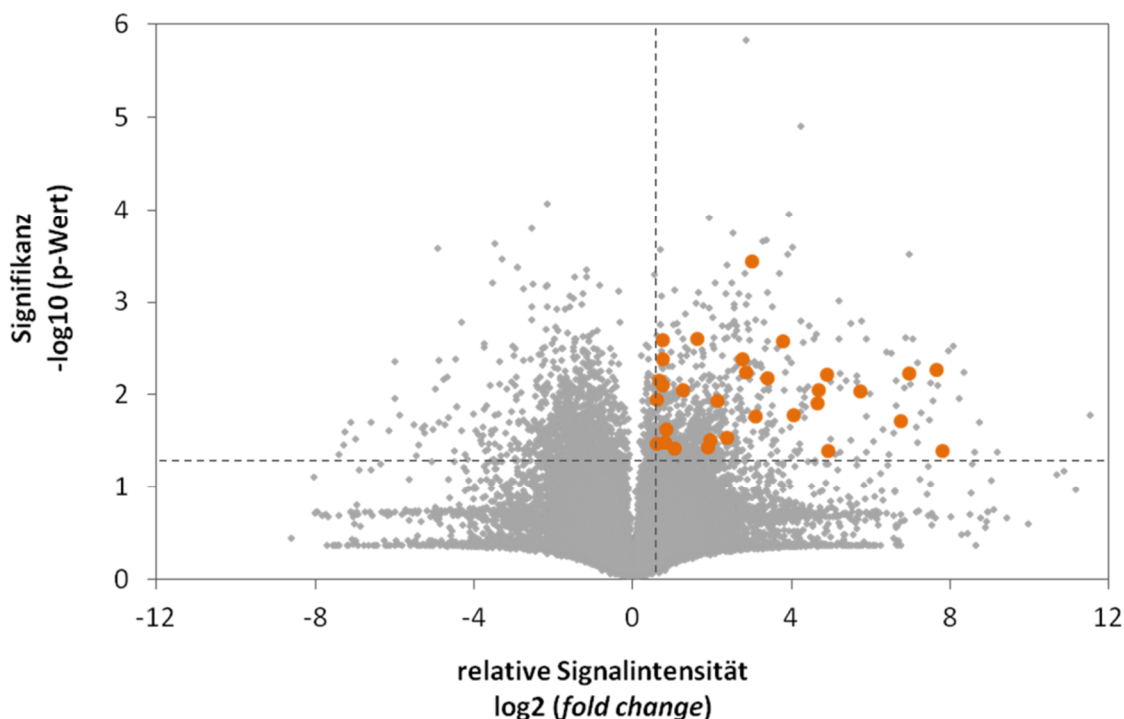
Beim Vergleich von FLAG-Pks26-GA mit AX4 wurden von XCMS online 35.362 *features* detektiert, von denen 732 als signifikante *features* extrahiert werden konnten. Nach Bewertung der EIC konnte der Datensatz auf 213 *features* reduziert werden.

Durch Zusammenführen der aus den Vergleichen von Pks26-GA bzw. FLAG-Pks26-GA mit AX4 erhaltenen *features* wurden 44 *features* isoliert, deren relative Intensität sowohl in Pks26-GA als auch in FLAG-Pks26-GA signifikant anstieg.

Nach Bewertung der Intensitäten in Pks26-KO konnte die Liste im letzten Schritt auf 31 PKS26-assoziierte *features* reduziert werden, diese gelten als sehr wahrscheinliche Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26 (vgl. Tabelle 12).

Zur Visualisierung von *fold change* und statistischer Signifikanz der detektierten *features* aus dem Vergleich von AX4 mit Pks26-GA wurde ein *Volcano Plot*-Histogramm erstellt (Abbildung 26). Alle PKS26-assoziierten *features* (orange Punkte) befinden sich im rechten Quadranten und zeigen einen hohen *fold change* sowie hohe statistische Signifikanz. Es wird deutlich, dass durch die angewandte Filterstrategie die Anzahl der isolierten PKS26-assoziierten *features* jenseits der Schwellenwerte für *fold change* und p-Wert deutlich reduziert werden konnte. Die resultierenden 31 *m/z* stellten sehr wahrscheinliche Kandidaten dar, welche weitergehend untersucht werden müssten. Die

Erwartung, ein einzelnes, herausragendes PKS26-assoziiertes *feature* zu finden, wurde nicht bestätigt.



**Abbildung 26: Volcano Plot zum Vergleich der Gesamtkulturextrakte von AX4 und Pks26-GA.** Verwendet wurden Daten basierend auf der UHPLC-ESI-HRAM/MS-Analyse der Gesamtkulturextrakte von AX4 und Pks26-GA. Die waagerechte Linie zeigt den Schwellenwert von  $p \leq 0,05$  an. Die senkrechte Linie zeigt den Schwellenwert für den *fold change* von  $\geq 1,5$  an. *Features* im linken Quadranten des Volcano Plots zeigen höhere Intensitäten in AX4. *Features* im rechten Quadranten zeigen höhere Intensitäten in Pks26-GA. Orange Punkte stehen für die identifizierten 31 interessanten *features*.

Von den 31 interessanten *features* wurden mit Hilfe der Software Xcalibur™ Summenformeln berechnet. Dabei wurden als mögliche Strukturbestandteile die Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff einbezogen. Im Anschluss an die Berechnung wurden nur Summenformeln mit einer relativen Massengenauigkeit von  $\leq 3$  ppm weiter berücksichtigt und das Zahlenverhältnis der Elemente untereinander bewertet. War das Verhältnis C/O niedrig oder die Anzahl an N sehr hoch, wurden die Summenformeln ausgeschlossen. Bei mehreren gleichartigen Summenformelvorschlägen wurden die mit der geringeren Massenabweichung höher bewertet. *Features*, für die keine plausiblen Summenformeln berechnet werden konnten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Somit verblieben 21 *features* in der Auswertung. Eine vollständige Übersicht aller 31 PKS26-assoziierten *features* befindet sich im Anhang C - PKS26-

assoziierte *features*. Tabelle 12 zeigt die hochwahrscheinlichen Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26.

**Tabelle 12: Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26.** Nach Analyse der Gesamtkulturextrakte von AX4, Pks26-GA, FLAG-Pks26-GA und Pks26-KO isolierte Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von *pks26*. *Fold change* und *p*-Wert resultieren aus dem Vergleich AX4 und Pks26-GA. Die Berechnung der Summenformeln mit Xcalibur™ (Thermo Scientific) wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: 0-70 Kohlenstoff, 0-80 Wasserstoff, 0-20 Sauerstoff, 0-15 Stickstoff

<b>m/z</b> <b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>p-Wert</b>	<b>fold</b> <b>change</b>	<b>Summenformel-</b> <b>vorschlag [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>relative Massen-</b> <b>genauigkeit [ppm]</b>
264,1023	0,0041	1,69	[C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-0,58
374,0783	0,0025	3,08	[C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	-1,97
379,1974	0,0054	201,90	[C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub> ] <sup>+</sup>	1,56
405,0995	0,0377	2,06	[C <sub>26</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-1,50
430,3307	0,0167	8,48	[C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	2,93
493,3329	0,0059	30,04	[C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2,26
505,2329	0,0284	5,20	[C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	-1,90
541,2075	0,0087	25,92	[C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> O <sub>10</sub> ] <sup>+</sup>	0,24
545,3655	0,0112	1,52	[C <sub>39</sub> H <sub>47</sub> NO] <sup>+</sup>	-0,49
557,2243	0,0233	1,78	[C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> O <sub>13</sub> ] <sup>+</sup>	1,59
574,2046	0,0320	1,75	[C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>12</sub> ] <sup>+</sup>	-0,74
600,4170	0,0004	8,02	[C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-1,43
630,5153	0,0088	2,39	[C <sub>47</sub> H <sub>66</sub> ] <sup>+</sup>	-1,83
651,4198	0,0362	3,69	[C <sub>47</sub> H <sub>55</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-0,62
654,5386	0,0397	224,80	[C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	1,56
661,4500	0,0026	1,67	[C <sub>45</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	0,76
672,5010	0,0090	53,48	[C <sub>47</sub> H <sub>64</sub> N <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	-1,29
698,5677	0,0403	30,29	[C <sub>51</sub> H <sub>72</sub> N] <sup>+</sup>	1,75
705,4666	0,0166	16,49	[C <sub>51</sub> H <sub>61</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	-0,79
718,5731	0,0307	3,90	[C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> O <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	-2,30
746,5883	0,0058	125,04	[C <sub>52</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	0,93

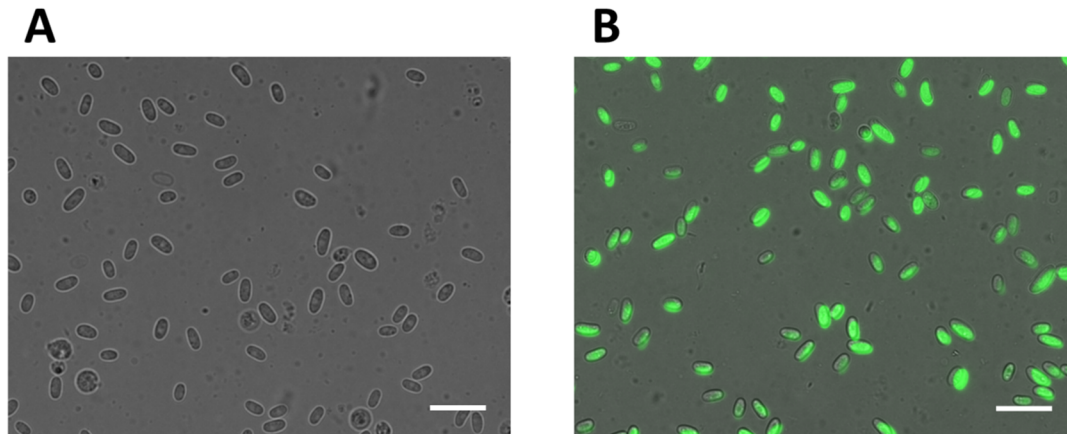
### 3.6 Kooperationsverhalten während der Entwicklung

Unter ungünstigen Umweltbedingungen kann *D. discoideum* durch die Aggregation von einzelligen Amöben multizelluläre Fruchtkörper bilden. Bei diesem Prozess sterben etwa 20 % der Amöben während der Differenzierung zu vakuolisierten Stielzellen, wohingegen 80 % der Amöben als keimfähige Sporenzellen das Überleben ihrer Art sichern. Ein solcher Fruchtkörper kann auch von unterschiedlichen Genotypen gebildet werden, was das Potential für Konkurrenz birgt. Ein Genotyp könnte auf Kosten des anderen einen

größeren Anteil an Sporenzellen bilden und seine Überlebenschancen damit verbessern (Strassmann *et al.* 2000). Beginnen zwei *D. discoideum*-Stämme im Verhältnis 50:50 mit der gemeinsamen Entwicklung, sollte sich dieses Verhältnis nach vollständiger Entwicklung auch im Sporenkopf wiederfinden. Abweichungen davon haben evolutionäre Vor- bzw. Nachteile zur Folge, weshalb die betreffenden Stämme in *Cheater* bzw. *Loser* unterschieden werden (vgl. 1.1.4). Der Knock-Out von *pks26* hat im Fall der *pks26*-REMI-Mutante zu einem *Loser*-Phänotyp geführt (Santorelli *et al.* 2008). In Experimenten von Santorelli *et al.* bildete dieser Stamm in einer 50:50 Mischung mit dem Elternstamm AX4 nur 45,7 %  $\pm$ 7,3 der Sporen. Diese Beobachtung sollte nachfolgend mit dem in dieser Arbeit neu etablierten Knock-Out von *pks26* und ergänzend mit einem PKS26-Überexpressionsstamm überprüft werden.

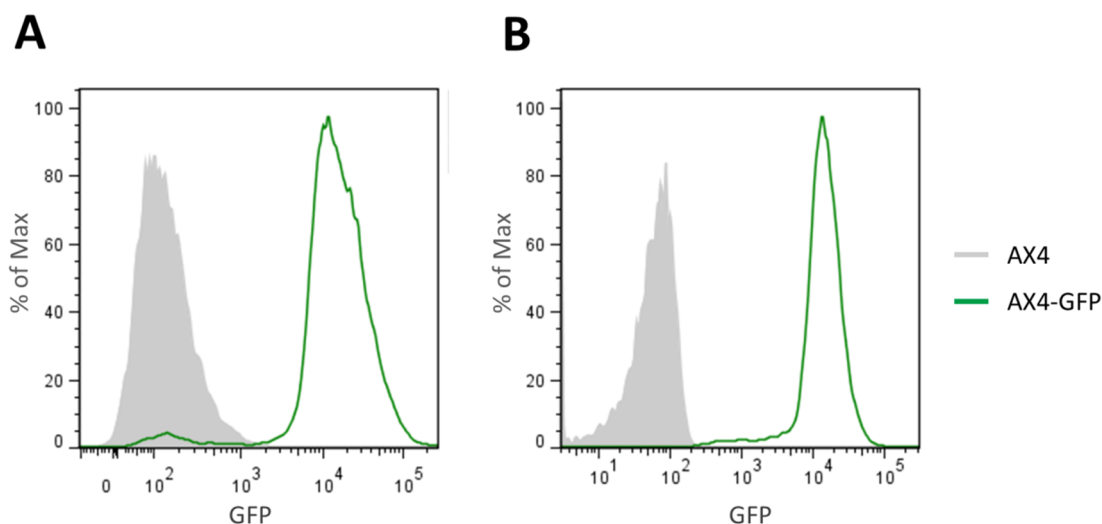
Dazu wurden mit allen erzeugten *pks26*-Mutanten *Cheating*-Assays jeweils im Vergleich mit dem Elternstamm AX4 durchgeführt. Die zu vergleichenden Stämme wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, in Phosphatpuffer gewaschen und die Zellen im Verhältnis 50:50 gemischt. Diese Mischung wurde auf eine Phosphatagar-Platte ausplattiert und nach 72 Stunden Inkubation die gebildeten Sporen geerntet und ausgezählt. Als Ergebnis wurde der prozentuale Anteil des zu untersuchenden Stammes vor und nach der Entwicklung angegeben.

Um die Zellen in einer Mischung voneinander unterscheiden zu können, wurde jeweils ein GFP-exprimierender Stamm verwendet. Auf dem Plasmid pDXA-GFP2 (Levi *et al.* 2000) befindet sich das GFP-Gen unter der Kontrolle eines Aktin15-Promotors, welcher in der vegetativen- wie auch der Entwicklungsphase aktiv ist. Somit konnten transformierte Zellen bzw. deren Sporen von nicht transformierten Zellen/Sporen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie unterschieden werden. Für die weiteren Untersuchungen wurden Einzelklone mit dem höchsten Anteil an fluoreszierenden Zellen nach Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewählt (Abbildung 27).



**Abbildung 27: GFP-Markierung am Beispiel der Sporen von AX4.** Exemplarische Darstellung von Sporen von AX4 (A) und AX4-GFP (B), wie sie während der Durchführung des *Cheating*-Assays gewonnen wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Die Bestimmung des Anteils an fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen in den Amöben- und Sporenmischungen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (2.2.3.2). Im Vergleich zur manuellen Auszählung durch Fluoreszenzmikroskopie kann mit dieser Methode mit geringerem Zeitaufwand eine weitaus größere Anzahl an Zellen gezählt werden. Um zu überprüfen, ob mit dieser Messmethode zwischen fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Amöben bzw. Sporen differenziert werden kann, wurden Amöben- und Sporensuspensionen von AX4 und AX4-GFP einzeln durchflusszytometrisch vermessen. Zur Auswertung wurde die Intensität der GFP-Signale der Amöben bzw. Sporen in je einem Histogramm dargestellt. Im Histogramm der Amöbensuspensionen von AX4 und AX4-GFP war ein deutlicher Unterschied der Intensität des GFP-Signals von fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Amöben erkennbar, welcher sich in den zwei gut getrennten Populationen widerspiegelte (Abbildung 28 A). Des Weiteren zeigte sich bei der Messung von AX4-GFP auch ein geringer Anteil von nicht fluoreszierenden Amöben. Die Histogramme der Sporensuspensionen zeigten ebenfalls zwei gut getrennte Populationen (Abbildung 28 B). Somit konnte festgestellt werden, dass die durchflusszytometrische Differenzierung von fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Amöben sowie Sporen, welchen im *Cheating*-Assay gewonnen wurden, sehr gut möglich war.



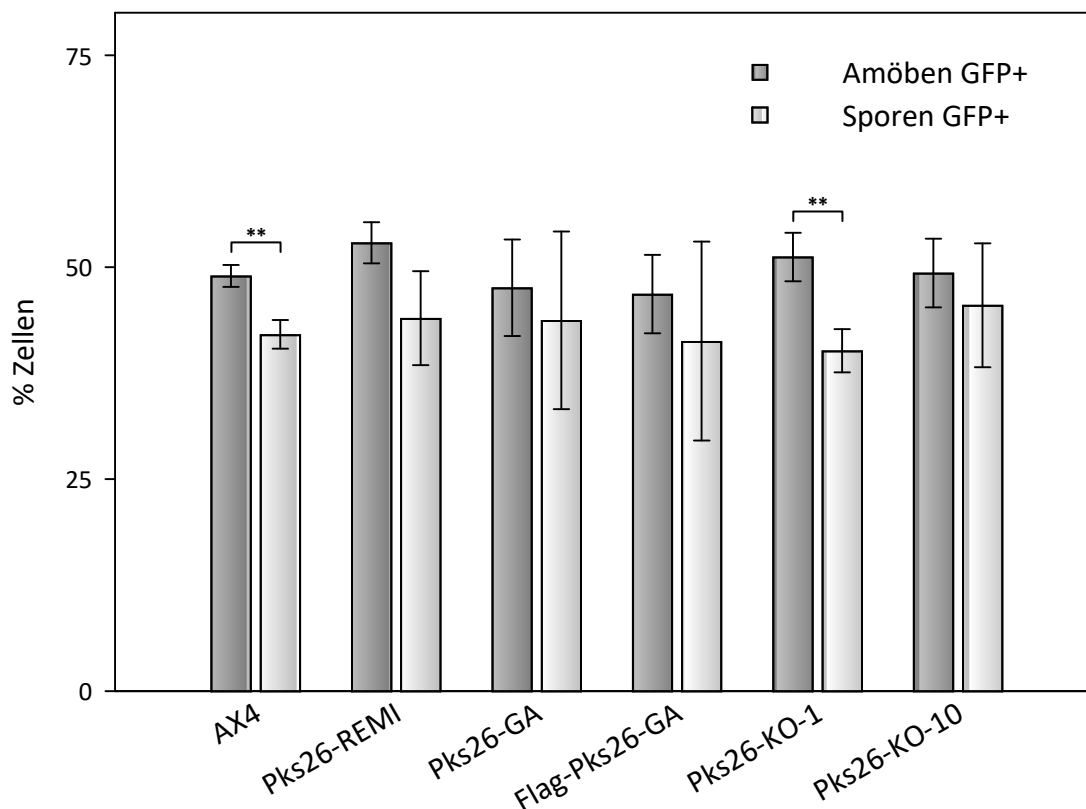
**Abbildung 28: Histogramme der durchflusszytometrischen Messungen des GFP-Signals von AX4 und AX4-GFP.** Zur Untersuchung der Differenzierbarkeit von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen wurde exemplarisch die GFP-Signalsstärke von Amöben (A) und Sporen (B) der Stämme AX4 und AX4-GFP durchflusszytometrisch bestimmt und die Histogramme fluoreszierender mit nicht-fluoreszierender Zellen miteinander verglichen.

Im *Cheating*-Assay wurden die Stämme Pks26-REMI, Pks26-GA, FLAG-Pks26-GA sowie die zwei *pks26*-Knock-Out-Mutanten Pks26-KO-1 und Pks26-KO-10 getestet. Die *pks26*-Mutanten wurden nach der Inokulation aus einem Glycerin-Stock für etwa 12 Generationen in blasticidinhaltigem HL5-Medium kultiviert (5 µg/ml). Danach schloss sich eine Kultivierung in reinem HL5-Medium an. Die Kultivierung der mit pDXA-GFP2 transformierten Stämme erfolgte in HL5-Medium, welches 8 µg/ml G418 enthielt. Die Verwendung von Antibiotika während des Assays war ausgeschlossen. Für jeden Stamm wurden sechs unabhängige Kulturen parallel untersucht und insgesamt drei biologische Replikate gemessen. Die Bestimmung des *Cheating*-Verhaltens der *pks26*-Mutanten erfolgte durch Untersuchungen reziproker Mischungen der *pks26*-Mutanten mit ihrem Elternstamm AX4, wobei jeweils ein Partner mit GFP markiert war. Die *pks26*-Mutante wurde mit AX4-GFP sowie die GFP-markierte *pks26*-Mutante mit AX4 im gleichen Verhältnis gemischt. Um zu überprüfen, ob die GFP-Markierung einen Einfluss auf das soziale Verhalten der Amöben hatte, wurden die GFP-markierten Stämme gemeinsam mit ihren unmarkierten Elternstämmen entwickelt. Zur Kontrolle des Anteils an tatsächlich fluoreszierenden Zellen erfolgte eine Untersuchung der GFP-markierten Stämme nach klonaler Differenzierung. Somit konnte für die Auswertung der auf unvollständige GFP-Markierung korrigierte Anteil an fluoreszierenden Zellen berechnet werden.

Um den Einfluss von GFP zu bestimmen, wurden die GFP-markierten Stämme mit den dazugehörigen unmarkierten Elternstämmen gemischt (Abbildung 29). Zur Auswertung

wurde der auf unvollständige GFP-Markierung korrigierte Anteil an fluoreszierenden Zellen vor sowie nach der Entwicklung dargestellt. Erkennbar war eine klare Tendenz zur Abnahme des Anteils des fluoreszierenden Stammes nach der gemeinsamen Entwicklung in allen untersuchten Chimären. Bei zwei Kombinationen war der Unterschied signifikant. In den Chimären AX4/AX4-GFP sowie Pks26-KO-1/Pks26-KO-1-GFP bildete jeweils der GFP-markierte Stamm signifikant weniger Sporen als der nicht fluoreszierende Elternstamm ( $p < 0,01$ ). Für die Chimäre AX4/AX4-GFP sank der Anteil fluoreszierender Zellen von 49,0 % (Amöben) auf 42 % (Sporen), für Pks26-KO-1/Pks26-KO-1-GFP von 51 % auf 40 %. Somit bildeten die GFP-markierten Stämme in einer Mischung mit ihrem Elternstamm tendenziell weniger Sporen, was bei der Interpretation der Ergebnisse des *Cheating*-Assays berücksichtigt werden musste.

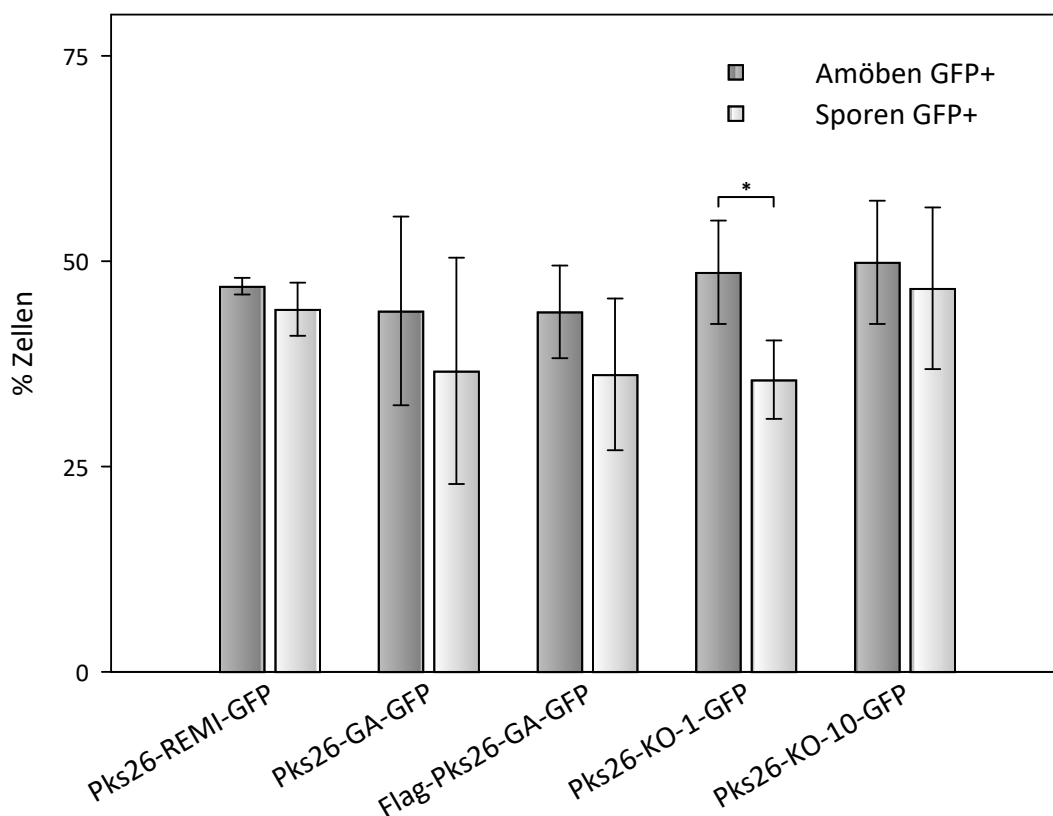




**Abbildung 29: Einfluss der GFP-Markierung auf das *Cheating*-Verhalten.** Zur Kontrolle des Effektes der GFP-Markierung auf das *Cheating*-Verhalten wurden die GFP-markierten Stämme jeweils mit ihren Elternstämmen im Verhältnis 50:50 gemischt und zur Entwicklung auf Phosphatagar-Platten inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil fluoreszierender Sporen in den Fruchtkörpern bestimmt. Als Ergebnis ist der auf unvollständige GFP-Markierung korrigierte Anteil an fluoreszierenden Amöben (dunkelgrau) sowie Sporen (hellgrau) je Mischung als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten dargestellt. (\*\* =  $p < 0,01$ ; Student's T-Test)

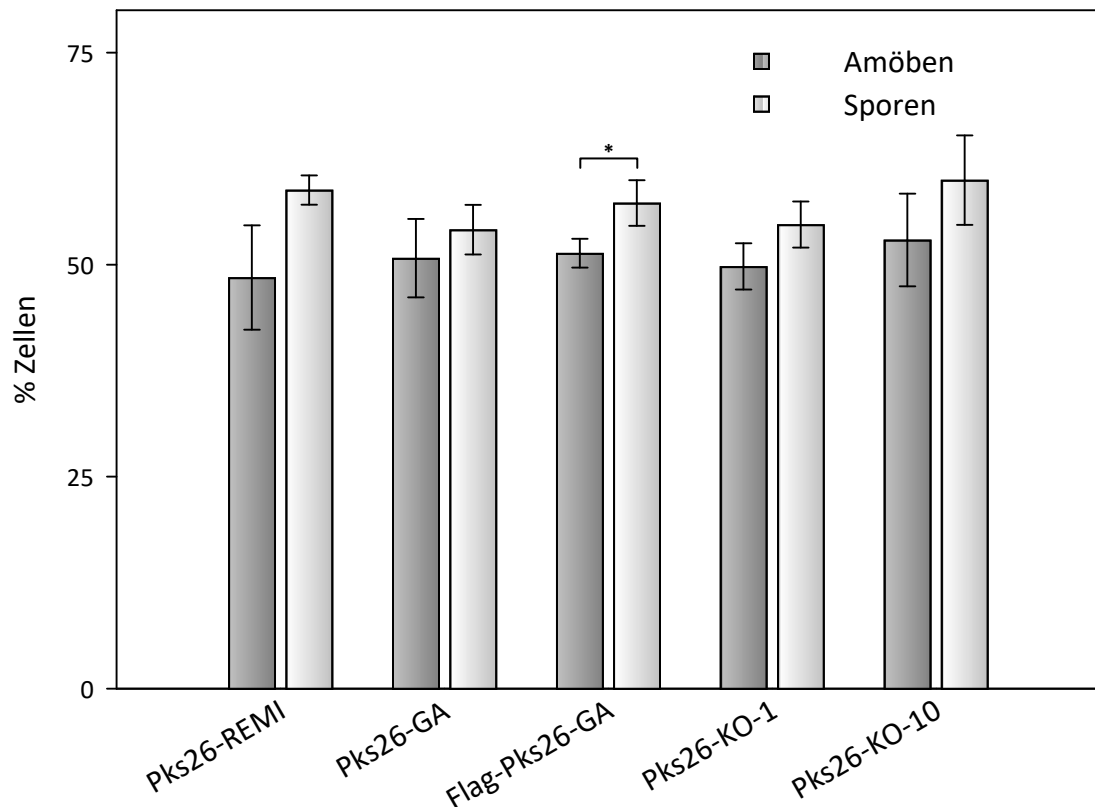
Bei der Untersuchung der Mischungen von AX4 mit den GFP-markierten *pks26*-Mutanten (AX4/*pks26*-Mutante-GFP) zeigte sich eine klare, jedoch *pks26*-unabhängige Tendenz (Abbildung 30). Der Anteil der GFP-markierten Zellen nahm stets nach der Entwicklung ab. In der Chimäre AX4/Pks26-REMI-GFP sank der Anteil der *pks26*-Mutante von 47,0 % vor der Entwicklung auf 44,2 % nach der Entwicklung, was einem *Loser*-Phänotyp entsprach. Die beiden GFP-markierten *pks26*-Knock-Out-Mutanten zeigten die gleiche Tendenz. Bei der Mischung AX4/Pks26-KO-1-GFP sank der Anteil von 48,7 % vor der Entwicklung auf 35,6 % in den Sporen, wobei der Anteil der *pks26*-Mutante in der Chimäre AX4/Pks26-KO-10-GFP nur um 3,1 % auf 46,7 % sank. Damit verhielt sich diese Mutante sehr vergleichbar zu Pks26-REMI-GFP, dessen Anteil ebenfalls um ca. 3 % abnahm. Die beiden GFP-markierten Genaktivierungsmutanten Pks26-GA und FLAG-Pks26GA zeigten in der Mischung mit AX4 ein ähnliches Verhalten wie die GFP-

markierten *pks26*-Knock-Out-Mutanten. Bei AX4/ Pks26-GA-GFP sank der Anteil der *pks26*-Mutante von 44,0 % auf 36,7 %, während er in der Mischung AX4/FLAG-Pks26-GA-GFP von 43,8 % auf 36,4 % abfiel. Damit betrug der Rückgang des Anteils der GFP-markierten *pks26*-Mutante jeweils etwa 7,5 % und war damit stärker als der Rückgang der fluoreszierenden *pks26*-Knock-Out-Mutanten. Der hier beobachtete Unterschied der Mittelwerte des Anteils an fluoreszierenden Zellen vor und nach der Entwicklung war lediglich im Fall von AX4/Pks26-KO-1-GFP signifikant ( $p < 0,05$ ), jedoch tendenziell in allen Experimenten sichtbar. Messungen an über zehn biologischen Replikaten von AX4/AX4-GFP zeigten jedoch, dass die nach drei Replikaten beobachtete Tendenz ein guter Schätzwert sein kann.



**Abbildung 30: Vergleich der GFP-markierten *pks26*-Mutanten mit AX4 im *Cheating*-Assay.** Um das *Cheating*-Verhalten der GFP-markierten *pks26*-Mutanten zu untersuchen, wurden diese im Verhältnis 50:50 mit AX4 gemischt und zur Entwicklung auf Phosphatagar-Platten inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil fluoreszierender Sporen in den Fruchtkörpern bestimmt. Als Ergebnis ist der auf unvollständige GFP-Markierung korrigierte Anteil an fluoreszierenden Amöben (dunkelgrau) sowie Sporen (hellgrau) je Mischung als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten dargestellt. (\* =  $p < 0,05$ ; Student's T-Test).

Bei der Untersuchung der reziproken Mischungen (AX4-GFP/*pks26*-Mutante) zeigte sich ebenso eine klare *pks26*-unabhängige Tendenz (Abbildung 31). Der Anteil an nicht fluoreszierender *pks26*-Mutante stieg nach der gemeinsamen Entwicklung mit AX4-GFP an.



**Abbildung 31: Vergleich der *pks26*-Mutanten mit dem GFP-markierten AX4 im *Cheating*-Assay.** Um das *Cheating*-Verhalten der *pks26*-Mutanten zu untersuchen, wurden diese mit AX4-GFP im Verhältnis 50:50 gemischt und zur Entwicklung auf Phosphatagar-Platten inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Anteil fluoreszierender Sporen in den Fruchtkörpern bestimmt. Als Ergebnis ist der auf unvollständige GFP-Markierung korrigierte Anteil an nicht fluoreszierenden Amöben (dunkelgrau) sowie Sporen (hellgrau) je Mischung als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten dargestellt. (\* =  $p < 0,05$ ; Student's T-Test).

Betrachtete man die drei *pks26*-Knock-Out-Mutanten, so zeigte der REMI-Knock-Out mit 10 % den größten prozentualen Anstieg von 48,5 % auf 58,8 %. Der Anteil von Pks26-KO-10 stieg um 7,0 % von 52,9 % in der Amöbensuspension auf 60,0 % in der Sporenmasse an, während der Anteil von Pks26-KO-1 lediglich von 49,8 % auf 54,7 % zunahm. Demnach könnte Pks26-REMI sowie die beiden *pks26*-Knock-Out Mutanten als *Cheater* bezeichnet werden, was jedoch im Widerspruch zu bereits publizierten Daten steht (Santorelli *et al.* 2008). In der Mischung AX4-GFP/Pks26-GA stieg der Pks26-GA-

Anteil von 50,7% auf 54,1 %. Für FLAG-Pks26-GA wurde ein Anstieg von 51,4 % auf 57,3 % bestimmt. Demnach könnten ebenfalls die *pks26*-Genaktivierungsstämme als *Cheater* bezeichnet werden, da sie einen höheren Anteil an Sporen bildeten als in der Ausgangsmischung vorhanden war. Der Unterschied der beschriebenen Mittelwerte ist lediglich bei AX4-GFP/FLAG-Pks26-GA signifikant ( $p < 0,05$ ). Dennoch können die Ergebnisse als Tendenz gewertet werden (siehe oben).

Als Fazit konnte festgestellt werden, dass in den Mischungsexperimenten der GFP-markierten Stämme mit ihren jeweiligen nicht markierten Elternstämmen ein Einfluss auf die Proportionen beider Stämme in der Sporenpopulation nachweisbar war. Bei allen reziproken Mischungen der *pks26*-Mutanten mit AX4 nahm der Anteil an GFP-markierten Zellen nach der gemeinsamen Entwicklung ab. Der Anteil an GFP-markierter *pks26*-Mutante reduzierte sich nach gemeinsamer Entwicklung mit AX4. Ebenso sank der Anteil an GFP-markiertem AX4 nach der gemeinsamen Entwicklung mit einer nicht fluoreszierenden *pks26*-Mutante. Die fluoreszierenden Stämme schienen demnach *Loser* zu sein.

Ein Einfluss der Überexpression bzw. des Knock-Outs von *pks26* auf das Kooperationsverhalten in einer Mischung mit AX4 war nicht nachweisbar. Betrachtete man die reziproken Mischungen der beiden *pks26*-Genaktivierungsmutanten mit AX4, waren die Ergebnisse nicht konsistent. Einerseits erhöhten die GFP-markierten GA-Stämme ihren Anteil gegenüber AX4 und könnten damit als *Cheater* betrachtet werden. Andererseits reduzierte sich der Anteil der nicht fluoreszierenden GA-Stämme in den Mischungen mit AX4-GFP, womit diese als *Loser* bezeichnet werden könnten. Die *pks26*-Knock-Out-Mutanten verhielten sich analog.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass der GFP-Effekt auf das *Cheating*-Verhalten einen möglichen Effekt der Aktivierung bzw. des Knock-Outs von *pks26* überstiegen hat. Die Pks26-REMI-Mutante zeigte keinen *Loser*-Phänotyp. Somit konnten die von Santorelli *et al.* publizierten Daten nicht bestätigt werden.

### 3.7 Untersuchungen zu *pks26*-abhängigem Einfluss auf die Fitness

Für verschiedene *Cheater*-Stämme der *Dictyostelidae* wurde eine mit diesem Phänotypen einhergehende negative Beeinflussung der Fitness beschrieben (Filosa 1962, Buss 1982, Ennis *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurden die erzeugten *pks26*-Mutanten auf einen

solchen Effekt hin geprüft. Insbesondere wurde dabei die Entwicklungsfähigkeit, die Sporenbildungs- und Keimfähigkeit der Sporen sowie das Wachstum in Flüssigmedium untersucht.

### 3.7.1 Einfluss der *pks26*-Expression auf die Entwicklungsfähigkeit

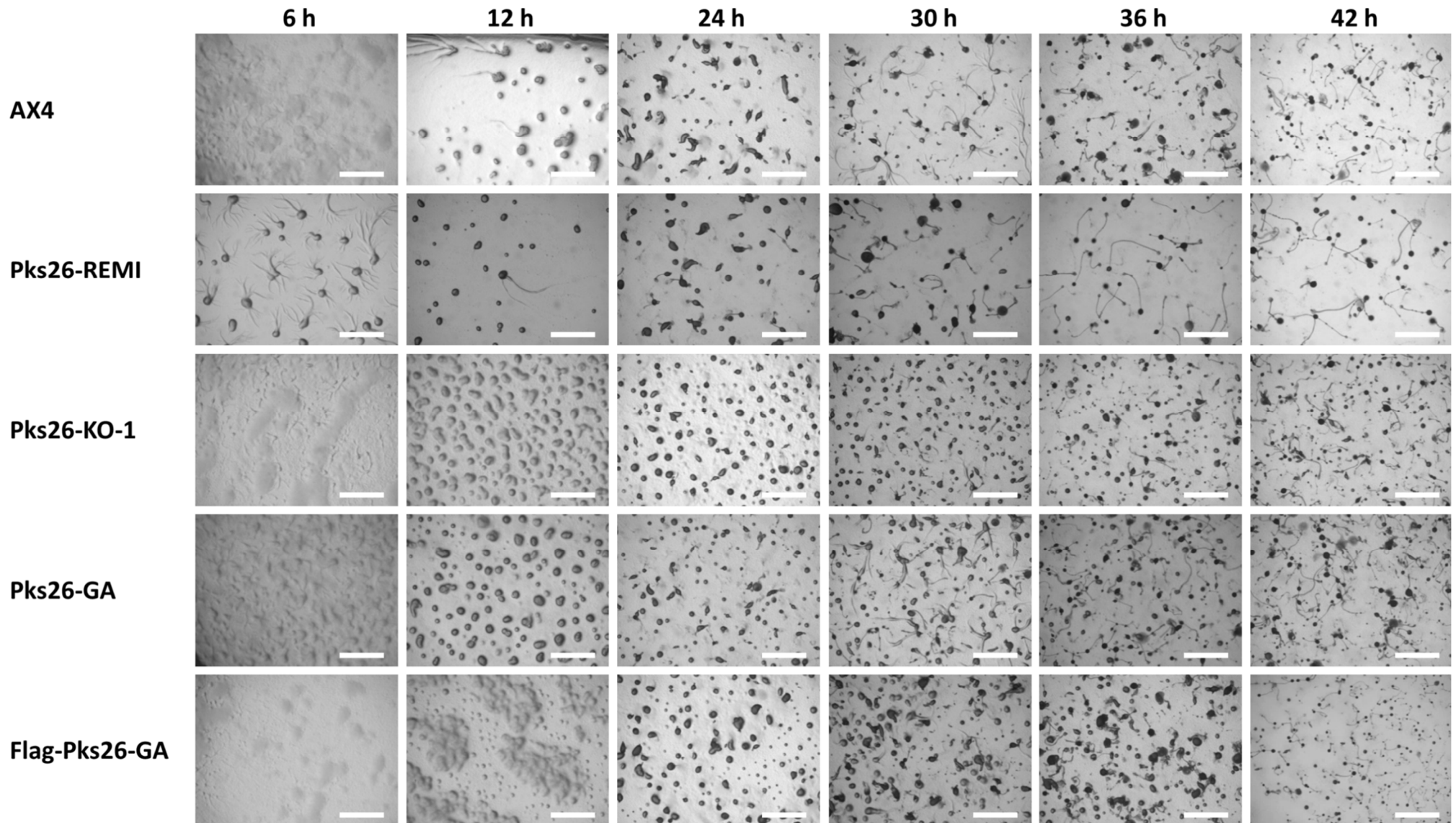
Um den Einfluss der Mutationen an *pks26* auf die Fähigkeit zur multizellulären Entwicklung zu bestimmen, wurden alle Stämme mit dem Wildtyp AX4 verglichen. Dafür wurden je Stamm  $1 \times 10^8$  exponentiell wachsende Zellen auf eine Phosphatagar-Platte ausgebracht und die Platten nach kurzem Trocknen bei 22°C inkubiert. Die Entwicklung der Zellen wurde im Abstand von sechs Stunden fotografisch dokumentiert (Abbildung 32).

Die Stämme Pks26-GA, FLAG-Pks26GA sowie Pks26-KO-1 verhielten sich in etwa wie der Elternstamm AX4. Nach sechs Stunden hatten diese Stämme Aggregationsströme gebildet. Nach 12 Stunden hatten sich die Zellen in lockeren Aggregaten zusammengefunden. Diese verdichteten sich nach 18 Stunden deutlich und es waren die ersten „mexican hat“ Strukturen sichtbar. Aufrichtende Finger konnten nach 24 Stunden beobachtet werden sowie zwischen 30 und 36 Stunden die ersten Fruchtkörper. Nach etwa 42 Stunden war die Fruchtkörperbildung abgeschlossen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *pks26*-Mutanten zeigten während der multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar-Platten keinen Unterschied zu ihrem Elternstamm AX4. Weder die Überregulation von *pks26* (Pks26-GA, FLAG-Pks26GA) noch der Knock-Out der Gens (Pks26-KO-1) zeigten einen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit auf Phosphatagar-Platten. Angesichts der zuvor beschriebenen strikten Entwicklungsregulation und cAMP-Abhängigkeit der Expression des *pks26*-Gens war diese Beobachtung unerwartet (vgl. 3.2.2).

Im Gegensatz dazu zeigte die von Santorelli *et al.* erzeugte *pks26*-REMI-Mutante auf Phosphatagar-Platten eine leicht beschleunigte Entwicklung. Nach sechsständiger Entwicklung waren bereits sehr deutliche Ströme zu beobachten, so dass sich die Zellen schon nach 12 Stunden zu festen Aggregaten zusammengeschlossen hatten. Nach 18 Stunden waren viele „mexican hat“ Strukturen sichtbar sowie bereits vereinzelt Finger-Stadien. Die ersten Fruchtkörper konnten nach 24 Stunden beobachtet werden. Nach 30 - 36 Stunden war die Entwicklung auf Phosphatagar-Platten abgeschlossen. Pks26-REMI zeigte im Vergleich zu AX4 auf Phosphatagar-Platten somit eine leicht

beschleunigte Entwicklung. Hier war allerdings zu bedenken, dass der beobachtete Effekt auf laborspezifischen Unterschieden des Vergleichsstammes AX4 zurückzuführen sein könnte. Der Elternstamm von Pks26-REMI (d.h. AX4 aus dem Labor von Gad Shaulsky) stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Alle generierten *pks26*-Mutanten beruhten auf einem im Jenaer Labor verfügbaren AX4-Stock.

In der Morphologie und Stabilität der Fruchtkörper konnten bei keinem der untersuchten Stämme Besonderheiten beobachtet werden. Die Fruchtkörper variierten innerhalb eines Stammes in ihrer Größe und bestanden typischerweise aus einem langen Stiel mit einem Sporenkopf an der Spitze.

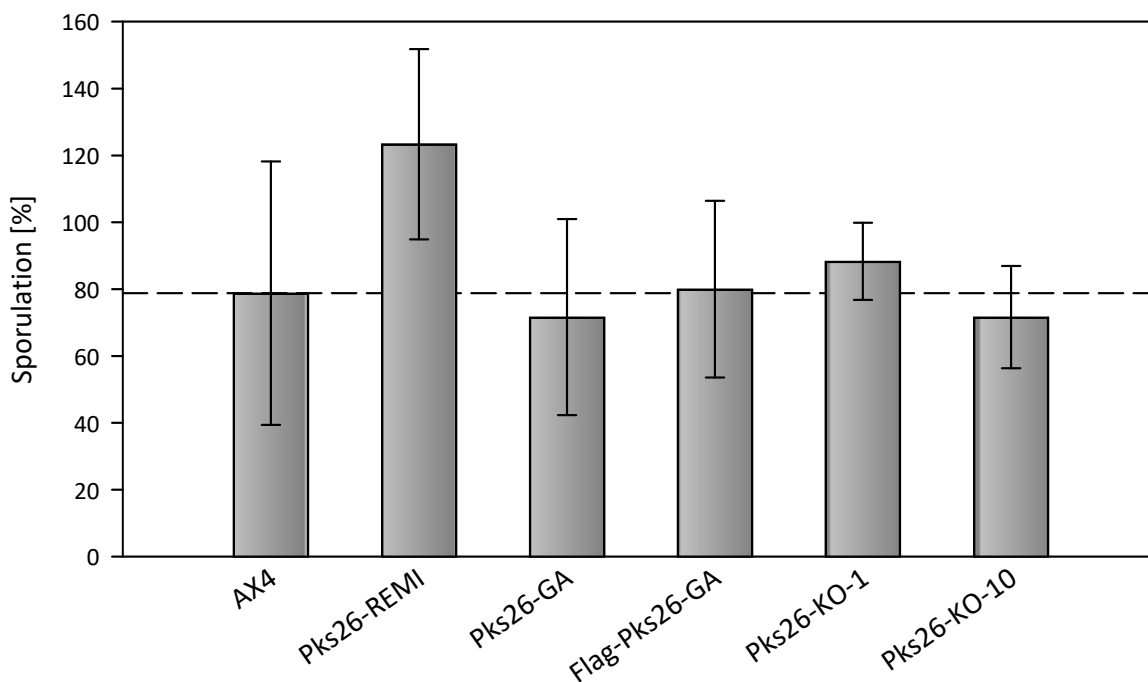


**Abbildung 32: Entwicklungsphänotypisierung der *pks26*-Mutanten im Vergleich zu AX4.** Je Stamm wurden  $1 \times 10^8$  logarithmisch wachsende Zellen auf eine Phosphatagar-Platte ausplattiert und die Entwicklung zu den angegebenen Zeiten fotografisch dokumentiert. Es wurden drei biologische Replikate untersucht. Der Maßstabsbalken entspricht 2 mm.

### 3.7.2 Effizienz der Sporenbildung und Sporenceimung

Um einen möglichen Einfluss von *pks26* auf die Sporenbildung zu untersuchen, wurden alle Stämme unter klonalen Bedingungen zur multizellulären Entwicklung auf Phosphatagar-Platten ausgebracht. Zur Bestimmung der Sporenbildungsfähigkeit wurde der Quotient aus der Anzahl entwickelter Sporen und der Anzahl initial ausplattierter Zellen gebildet.

Keine der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *pks26*-Mutanten hat signifikant mehr oder weniger Sporen gebildet als der Elternstamm AX4 mit  $78,8 \pm 39,4$  % (Abbildung 33). Die Genaktivierungsmutante Pks26-GA stellte mit  $71,7 \pm 29,3$  % den niedrigsten Wert dar, während für Pks26-KO-1 mit  $88,3 \pm 11,5$  % die höchste Sporenbildungsfähigkeit gemessen wurde. Für die Pks26-REMI-Mutante, welche auf einem anderen AX4-Stamm basiert, wurde eine deutlich höhere Sporenbildungsfähigkeit von  $123,3 \pm 28,4$  % bestimmt. Jedoch zeigte diese verglichen mit AX4 ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ , Student's t-Test).

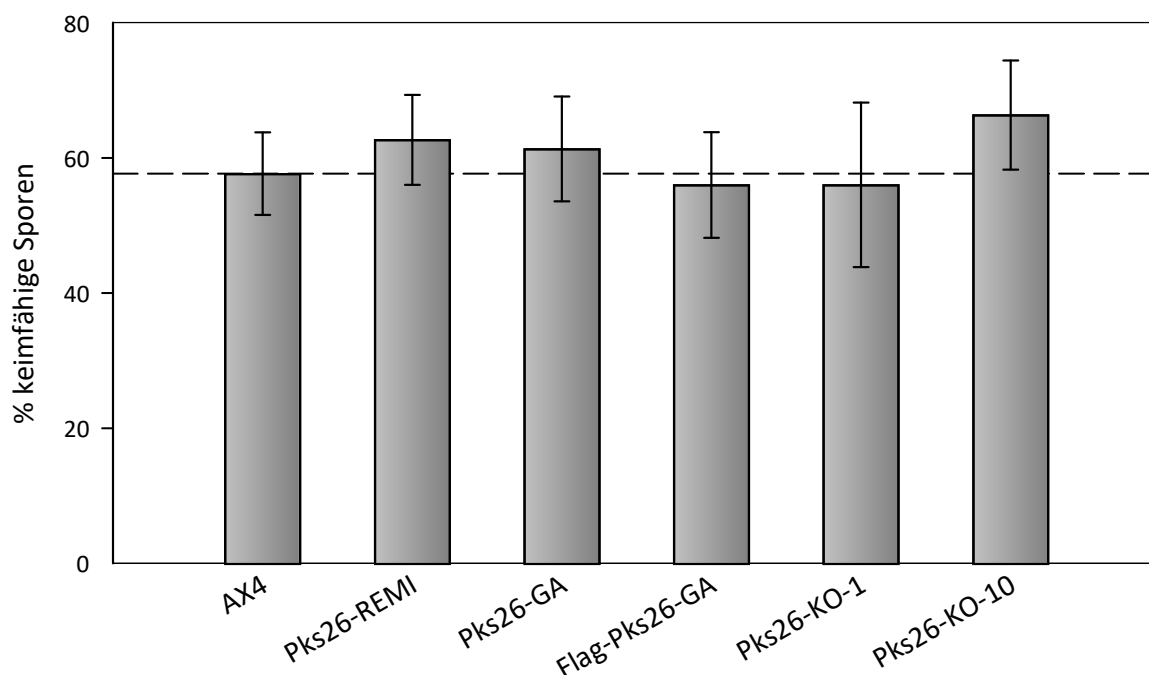


**Abbildung 33: Sporenbildung der *pks26*-Mutanten im Vergleich zu AX4.** Jeder Stamm wurde klonal entwickelt und die Anzahl der gebildeten Sporen gegen die Zahl der initial ausplattierten Amöben dividiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten. Die Sporenbildungsfähigkeit der *pks26*-Mutanten unterschied sich nicht signifikant von AX4 ( $p > 0,05$ , Student's t-Test).



Zusätzlich zur Sporulationsfähigkeit wurde die Keimfähigkeit der Sporen getestet. Eine geminderte Keimfähigkeit der gebildeten Sporen geht mit einer geminderten Fitness einher. Für die Bestimmung wurden 100 frische Sporen mit 1 ml einer Kultur von *R. planticola* gemischt und auf Agarplatten ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Tagen wurden die entstandenen Plaques ausgezählt, wobei jeder Plaque als Fresshof dem klonalen Wachstum der Amöben aus einer keimfähigen Spore entsprach. Der Anteil gezählter Plaques an der Anzahl ausplattierter Sporen zeigte die prozentuale Keimfähigkeit an.

In Abbildung 34 ist die Keimfähigkeit der Sporen der untersuchten Stämme dargestellt. Im Vergleich zu AX4 ( $57,7 \pm 6,1$  %) zeigte dabei keine der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *pks26*-Mutanten einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ , Student's t-Test). Die prozentuale Keimfähigkeit der Stämme schwankte im Bereich von  $56,0 \pm 12,2$  % (Pks26-KO-1) bis  $66,3 \pm 8,1$  % (Pks26-KO-10). Pks26-REMI zeigte mit  $62,7 \pm 6,7$  % einen Wert, welcher sich ebenfalls nicht signifikant von AX4 unterscheidet ( $p > 0,05$ , Student's t-Test).

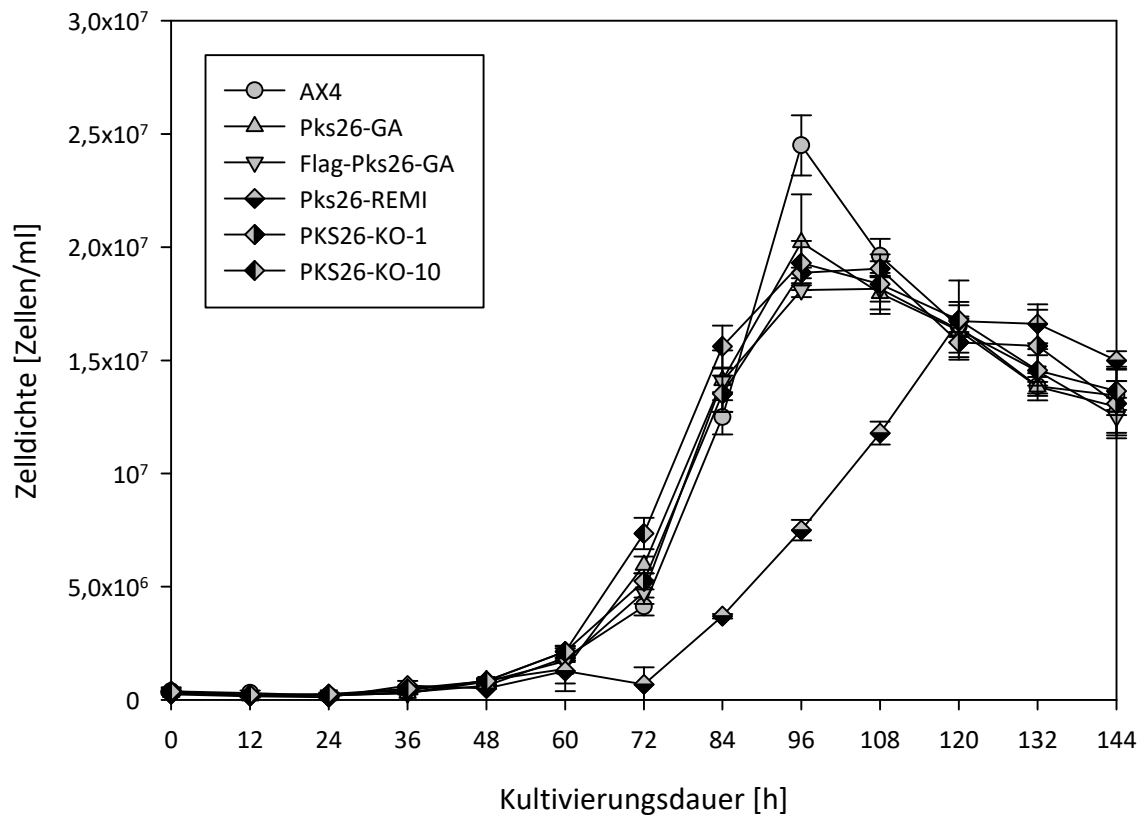


**Abbildung 34: Keimfähigkeit der Sporen der *pks26*-Mutanten im Vergleich zu AX4.** Je Stamm wurden 100 frische Sporen zusammen mit einer frischen Kultur von *R. planticola* auf einer 1/5-SM-Agarplatte ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die entstandenen Plaques ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten. Die Keimfähigkeit der Sporen der *pks26*-Mutanten unterschied sich nicht signifikant von AX4 ( $p > 0,05$ , Student's t-Test).

Weder die Überregulation noch der Knock-Out von *pks26* hatte einen signifikanten Einfluss auf die Sporulationsfähigkeit der Stämme bzw. die Keimfähigkeit der gebildeten Sporen. Darüber hinaus zeigte auch die Pks26-REMI-Mutante keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf diese Parameter.

### 3.7.3 Wachstum in Flüssigmedium

Um das Wachstum in Flüssigmedium zu untersuchen, wurden alle Stämme in HL5 Medium kultiviert, wobei mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml begonnen wurde. Dabei erreichte der Wildtyp AX4 nach etwa 54 Stunden die logarithmische Wachstumsphase und eine maximale Zelldichte von  $2,4 \times 10^7$  Zellen/ml nach 96 Stunden (Abbildung 35). Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *pks26*-Mutanten zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie AX4. Bei allen Stämmen begann die logarithmische Wachstumsphase ( $> 1 \times 10^6$  Zellen/ml) im Bereich von 50 – 57 Stunden. Die maximalen Zelldichten lagen bei ca.  $2 \times 10^7$  Zellen/ml und wurden nach etwa 96 Stunden erreicht. Somit konnte zwischen den im Rahmen dieser Arbeit erzeugten *pks26*-Mutanten und AX4 kein Unterschied im Wachstumsverhalten in Flüssigmedium festgestellt werden. Weder die Überregulation noch der Knock-Out von *pks26* zeigt einen Einfluss auf das Wachstum in HL5. Pks26-REMI hingegen erreichte die log-Phase nach etwa 75 Stunden und hatte damit eine deutlich längere lag-Phase. Die maximale Zelldichte von etwa  $1,7 \times 10^7$  Zellen/ml wurde nach 120 Stunden erreicht. Somit zeigte Pks26-REMI ein deutlich langsames Wachstum in HL5 als AX4 sowie die erzeugten *pks26*-Mutanten. Auch zu den beiden Pks26-Knock-Out-Mutanten ist der Unterschied deutlich. Die Ursache für das langsamere Wachstum der Pks26-REMI-Mutante könnte in einer zum Jenaer AX4-Stock geringeren Wachstumsrate des im Labor von Gad Shaulsky zur Herstellung der Pks26-REMI-Mutante verwendeten AX4-Stocks zu suchen sein, zumal während der vegetativen Wachstumsphase ohnehin keine Expression von *pks26* in AX4 nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 35: Wachstum der *pks26*-Mutanten in Flüssigmedium im Vergleich zu AX4.** Jeder Stamm wurde mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in frischem HL5 Medium inokuliert und im Abstand von 12 Stunden die Zelldichte bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.



## 4 Diskussion

Die sozialen Amöben – im Labor gewöhnlich vertreten durch die Modellspezies *D. discoideum* – besitzen das genetische Potential zur Biosynthese einer Vielzahl von Naturstoffen. Dazu gehören die Verbindungen DIF-1 und MPBD, welche als Differenzierungsfaktoren wichtige Funktionen während der multizellulären Entwicklung übernehmen. Trotz der Etablierung als genetisch gut zugänglicher Modellorganismus ist die Fähigkeit von *D. discoideum* zur Bildung von Sekundärmetaboliten bis heute wenig untersucht. Die Biosyntheseraten sind typischerweise sehr gering, was die Isolation, Strukturaufklärung sowie die weitere Charakterisierung erschwert. Zusätzlich ist ein „*upscaling*“ der multizellulären Entwicklungsphase extrem schwierig. Aus diesen Gründen war es für viele der bisher erfolgreich aus sozialen Amöben aufgeklärten Sekundärmetaboliten notwendig, zehntausende von Petrischalen zu kultivieren (Abe *et al.* 1976, Morris *et al.* 1988b, Kikuchi *et al.* 2012)

In der vorliegenden Arbeit wurde das biosynthetische Potential von *D. discoideum* untersucht. Durch die Variation der Kultivierungsparameter wurde versucht, stille Biosynthese-Gene bzw. Gencluster zu aktivieren. Insbesondere die Aktivierung des Gens *pks26* durch einen Promotortausch und die Analyse der resultierenden Änderungen im Exometabolismus stellte einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Der Knock-out von *pks26* verursacht vermeintlich eine Änderung der Kooperationsfähigkeit der Amöben während der multizellulären Entwicklung (Santorelli *et al.* 2008). Daher wurde in weiterführenden Bioassays der Einfluss des Knock-outs bzw. der Aktivierung von *pks26* auf das Kooperationsverhalten sowie die Fitness näher untersucht.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet sowie aufgetretene Probleme diskutiert und Lösungsmöglichkeiten aufgezeigt werden.

### 4.1 Induktion der Biosynthese von Naturstoffen

#### 4.1.1 Der OSMAC-Ansatz zur Induktion der Biosynthese von Sekundärmetaboliten

Mikroorganismen besitzen oft das genetische Potential für die Biosynthese verschiedener Sekundärmetaboliten, jedoch bleiben unter optimalen Kultivierungsbedingungen viele der verantwortlichen Biosynthese-Cluster inaktiv. Der in der Arbeitsgruppe von Axel Zeeck entwickelte OSMAC-Ansatz (vgl. 3.1) stellt eine einfache Methode dar, potenzielle

Kultivierungsparameter zur Aktivierung dieser so genannten „stillen Gencluster“ zu finden und im Anschluss deren Biosyntheseprodukte mittels LC-DAD oder LC-MS zu identifizieren (Bode *et al.* 2002). Daher fand diese Methode bereits bei einer Vielzahl von Mikroorganismen Anwendung (Almeida *et al.* 2019, Alves *et al.* 2020, Osvik *et al.* 2021) und wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die soziale Amöbe *D. discoideum* angewendet. Der Einfluss der  $Zn^{2+}$ -Konzentration auf die multizelluläre Entwicklung, sowie die Bildung neuer Entwicklungsfaktoren nach Zugabe von  $Cd^{2+}$ -Salzen zeigte bereits das Potential des OSMAC-Ansatzes bei den sozialen Amöben (Kubohara und Okamoto 1994, Serafimidis und Kay 2005).

Im Folgenden werden drei methodische Schritte im analytischen Workflow 1) Kultivierungsbedingungen 2) Extraktion, und 3) Detektion/Analytik näher diskutiert, von denen jeder für sich genommen einen entscheidenden Einfluss auf die Identifikation unbekannter Naturstoffe haben kann.

#### **4.1.1.1 Kultivierungsbedingungen**

Die Zusammensetzung des Kulturmediums hat nicht nur einen maßgeblichen Einfluss auf das Wachstum der Kultur, sondern ebenso auf den Metabolismus der Mikroorganismen. Entsprechend des OSMAC-Ansatzes wurde daher die Produktion des Sekundärmetabolismus in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturmedien untersucht. Auf Grundlage der Medien HL5 und FM wurden verschiedene Medienzusätze untersucht. Für jeden Zusatzstoff wurde die maximale tolerierte Konzentration ermittelt und Extraktionsversuche mit mindestens zwei Konzentrationen durchgeführt. Mit den verwendeten Techniken konnte dabei kein Einfluss auf den Metabolismus festgestellt werden. Unter Verwendung weiterer Veränderungen für die Extraktion und Analytik (vgl. 4.1.1.2; 4.1.1.3) wäre eine Überprüfung der bereits getesteten Bedingungen empfehlenswert. Ebenfalls finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Vielzahl weiterer erfolgversprechender Variationen, von denen einige im folgenden Abschnitt diskutiert werden sollen.

##### *Variation der Kohlenstoffquelle*

Hauptkomponenten eines Mediums sind die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Erstere beeinflusst als Energielieferant das Zellwachstum und stellt Kohlenstoffeinheiten für den Primär- und Sekundärmetabolismus bereit. Die Stickstoffquelle ist für die Synthese

essentieller Proteine und Nukleinsäuren notwendig und liefert zudem die notwendigen Stickstoffeinheiten für den Sekundärstoffwechsel.

Die Art der verwendeten Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle kann einen signifikanten Einfluss auf den mikrobiellen Sekundärmetabolismus haben (Ruiz *et al.* 2010, Singh *et al.* 2017). Beispielsweise kann die Verwendung bestimmter Aminosäuren in manchen Fällen die Biosynthese von Sekundärmetaboliten induzieren, in anderen Fälle aber auch deren Inhibition bewirken (Marwick *et al.* 1999). Darüber hinaus spielt ebenfalls das Kohlenstoff/Stickstoff –Verhältnis im Medium eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Sekundärstoffen (Brzonkalik *et al.* 2012).

Als „*carbon catabolite repression*“ (CCR) wird ein genregulatorisches Netzwerk bezeichnet, durch welches bei Vorhandensein einer bevorzugten Kohlenstoffquelle die Synthese von Enzymen gehemmt wird, die an der Nutzung sekundärer Kohlenstoffquellen beteiligt sind. Erstmals in *E. coli* beschrieben wurde CCR auch in filamentösen Pilzen nachgewiesen (Görke und Stülke 2008, Adnan *et al.* 2018). Dabei adressiert die transkriptionelle Kontrolle durch CCR nicht nur den Primär- sondern auch den Sekundärstoffwechsel und hat somit Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit bzw. Virulenzfaktoren der Zellen (Ruiz *et al.* 2010). Während die meisten Mikroorganismen als primäre Kohlenstoffquelle Glucose bevorzugen und diese somit den bekanntesten katabolischen Repressor darstellt, ist die inhibierende Wirkung anderer Kohlenstoffquellen ebenfalls beschrieben (Simpson-Lavy und Kupiec 2019). Im Hinblick auf die industrielle Wirkstoffproduktion spielt CCR und die dahingehende Optimierung der Medienzusammensetzung bzw. Produktionsstämme eine entscheidende Rolle (Sánchez *et al.* 2010, de Assis *et al.* 2021).

Die für die Kultivierung von *D. discoideum* üblicherweise verwendeten Medien enthalten als Kohlenstoffquelle lediglich Glucose oder Maltose (Lu *et al.* 2008). Darüber hinaus lassen sich in der Literatur keine Publikationen zu CCR-Effekten in den sozialen Amöben finden. Vor diesem Hintergrund ist es ein lohnenswerter Ansatz, den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das sekundäre Metabolom von *D. discoideum* zu untersuchen. Ausgehend von den definierten Medien FM und SIH, welche sich aus den Einzelkomponenten herstellen lassen, kann die Kohlenstoffquelle variiert werden. Als alternative C-Quellen könnten Monosaccharide (Glucose, Fructose, Galactose), Disaccharide (Maltose, Sucrose, Lactose, Mannose), Polysaccharide (Stärke) oder auch Glycerol untersucht werden (Singh *et al.* 2017). Zudem wäre eine flexible Variation jeder

Einzelkomponente möglich (Han *et al.* 2004, Lu *et al.* 2008). Bei der Herstellung von HL5 ist es möglich, die primäre Kohlenstoffquelle nach dem Autoklavieren zuzugeben. Somit besteht auch bei der Kultivierung mit diesem Medium eine Möglichkeit die Kohlenstoffquelle zu variieren.

#### *Variation weiterer Parameter*

Neben der Kohlenstoffquelle sind in der Literatur weitere Parameter beschrieben, deren Variation zu Änderungen in der Sekundärstoffbiosynthese führte, bspw. Salzgehalt, Temperatur, pH – Wert, Sauerstoffsättigung/Belüftung, Kultivierungsmethode (Stand-/Schüttelkultur), Co-Kultivierung mit anderen Stämmen, epigenetische Inhibitoren, biosynthetische Vorläufer (Pan *et al.* 2019). Für *D. discoideum* ist eine Induktion verschiedener Polyketidsynthasegene durch die Co-Kultivierung mit *K. aerogenes* bzw. *B. subtilis* auf SM-Agarplatten beschrieben (Akabane und Saito 2010).

#### **4.1.1.2 Extraktion**

Die Herstellung der Extrakte erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (Ethylacetat) bzw. Flüssig-Fest-Extraktion des lyophilisierten Kulturüberstands (Methanol). Hierbei wurden aus einem Kulturüberstand zwei Extrakte unterschiedlicher Lipophilie erhalten, wodurch ein breites Substanzspektrum abgebildet werden konnte. Nachteile dieser Methode sind insbesondere der hohe Zeitaufwand sowie die Gefahr von Verunreinigungen beim Verdampfen des Extraktionsmittels im Rotationsverdampfer. Letzteres stellt ein nicht zu vernachlässigendes Problem dar, da bei der vergleichenden Analyse der Chromatogramme selbst geringe Intensitätsunterschiede wichtige Indizien sein können.

Abhilfe kann hier eine Festphasenextraktion (SPE, engl.: „*solid phase extraction*“) schaffen. Hier werden die zu extrahierenden Substanzen an eine feste Matrix gebunden und im Anschluss mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert. Durch die Verfügbarkeit von Matrices mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften ist die Extraktion eines sehr großen Substanzspektrums möglich. Bei der SPE erfolgt die Extraktion und Aufkonzentrierung des Analyten in einem Schritt mit sehr hoher Reproduzierbarkeit. Zusätzlich wird durch die Verwendung von Einmalkartuschen das Risiko einer Kreuzkontamination reduziert. (Duca *et al.* 2014)



#### 4.1.1.3 Detektion/Analytik

Die unspezifische Suche nach Sekundärmetaboliten stellt die verwendete Analytik vor große Herausforderungen. Eine Kernfrage bei der Auswahl des analytischen Systems ist: Welche Substanzklasse soll nachgewiesen werden? Im Fall des PKS-Gen-reichen Genoms von *D. discoideum* könnte man sich auf Polyketide fokussieren (Eichinger *et al.* 2005, Zucko *et al.* 2007). Jedoch kann deren Struktur von Hydroxylgruppen-reichen aromatischen Systemen bis hin zu vollständig reduzierten fettsäureähnlichen Substanzen sehr vielfältig sein. Ein Großteil der PKS-Gene in *D. discoideum* gehört zu den iterativen Typ-1-PKS (Zucko *et al.* 2007). Aufgrund der mehrfachen Verwendung einzelner Domänen während der Biosynthese ist eine strukturelle Vorhersage der gebildeten Polyketide bisher nicht möglich. Durch das breite Vorhandensein von Reduktase-Domänen ist nicht von komplexen aromatischen Systemen auszugehen. Da somit die physikochemischen Eigenschaften der gesuchten Substanzen unbekannt sind, muss das verwendete analytische System ein möglichst breites Substanzspektrum detektieren können. Mit dem im Rahmen der OSMAC-Untersuchungen verwendeten HPLC-DAD-System konnten zwar UV/Vis-aktive Substanzen detektiert werden, jedoch blieben Substanzen ohne chromophores System unerkant. Da bei den durchgeführten Untersuchungen keine Unterschiede im chromatographischen Profil identifiziert wurden, welche auf potentielle neue Polyketide hinweisen, ist es hier dringend geboten, weitere analytische Techniken heranzuziehen. Beispielsweise könnten durch einen Lichtstreu-detektor (ELSD, engl.: „*evaporative light scattering detector*“) ebenfalls UV/Vis-inaktive Substanzen detektiert werden. Hierbei ist das Detektionssignal von der molaren Masse des Analyten abhängig und nicht von dessen chemischer Struktur. Um ein noch breiteres Substanzspektrum mit zusätzlich deutlich geringeren Nachweisgrenzen detektieren zu können, ist ein LC-System gekoppelt mit hochauflöser Massenspektrometrie geeignet. Durch ihre Robustheit und Vielseitigkeit ist diese Methode nicht nur für die Detektion geringster Substanzmengen sondern auch für die Generierung von strukturellen Informationen sehr gut geeignet (vgl. Kap 4.1.2.4.)

Wird jedoch kein signifikanter Unterschied in den Chromatogrammen detektiert, bleibt unklar, ob die getesteten Kultivierungsbedingungen nicht zu einer Induktion der Biosynthese-Cluster geführt haben oder aufgrund ungünstiger Bedingungen während Translation/Naturstoffbiosynthese bzw. Extraktion/analytischer Aufarbeitung das korrespondierende Signal nicht detektiert werden konnte. Im Falle der bekannten PKS-

Gene von *D. discoideum* könnte durch Bestimmung der Genexpression immerhin überprüft werden, ob die getesteten Kultivierungsbedingungen eine Geninduktion zur Folge hatten.

#### 4.1.2 Aktivierung von *pks26* durch Promotortausch

Unter optimalen Wachstumsbedingungen bleibt ein Großteil der bioinformatisch vorhergesagten Naturstoffgene inaktiv, was die Charakterisierung der korrespondierenden Metaboliten erheblich erschwert. (Gao *et al.* 2021, Tsunematsu 2021) Dies gilt auch für die Mehrheit der PKS-Gene von *D. discoideum*, deren Transkription unter Kultivierung in HL5 Medium praktisch nicht stattfindet (Akabane und Saito 2010). Jedoch zeigen einige der PKS-Gene eine entwicklungsabhängige Regulation (Zucko *et al.* 2007, Stajdohar *et al.* 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte *pks26* als stark entwicklungs- und cAMP-abhängiges Gen identifiziert werden, was auf eine entscheidende Rolle während der multizellulären Entwicklung schließen ließe (vgl. Kap 3.2.2). Zudem wurde die REMI-Mutante von *pks26* als fakultativer *Losser*-Phänotyp beschrieben (Santorelli *et al.* 2008), was eine Funktion während der Aufteilung der Zellen zwischen der Prästiel- und Präsporenregion im *Slug*-Stadium nahelegt. Dies machte *pks26* zu einem interessanten Kandidaten für die spezifische Untersuchung von *D. discoideum* Polyketiden. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation mittels homologer Rekombination ein Set an Knock-Out und Genaktivierungsmutanten von *pks26* erstellt, mit welchem das korrespondierende Polyketid identifiziert werden kann. Die Chromatogramme von Wildtyp, Knock-out- und GA-Mutanten zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede. Durch die XCMS gestützte metabolomische Auswertung der UHPLC-HRMS Daten konnten im Anschluss geringe Unterschiede festgestellt und die dafür verantwortlichen *m/z* identifiziert werden. Abschließend wurden 21 Kandidaten für Biosyntheseprodukt von PKS26 vorgeschlagen. Im Folgenden werden vier methodischen Schritte 1) Erstellung der *pks26*-Mutanten 2) Kultivierung 3) Extraktion, und 4) Detektion/Analytik näher diskutiert.

##### 4.1.2.1 Erstellung der *pks26*-Mutanten mittels homologer Rekombination

Die von Santorelli *et al.* erzeugte *pks26*-REMI-Mutante enthält eine Insertion des REMI-Plasmids in der ER-Domäne von *pks26*. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass oberhalb der Insertionsstelle liegende Bereiche des Gens noch exprimiert werden und

eine Aktivität aufweisen. Aus diesem Grund wurde mittels homologer Rekombination ein Knock-Out im vorderen Bereich des Gens erzeugt. Bei diesem kann lediglich eine unvollständige KS-Domäne exprimiert werden, von der keine Restaktivität zu erwarten ist.

Durch Austausch des nativen Promotors gegen den Aktin-15-Promotor wurde eine *pks26*-Genaktivierungsmutante erzeugt. Diese gewährleistete eine gleichmäßige und hohe Expression von *pks26* während des vegetativen Wachstums und sollte somit die Möglichkeit bieten, ausreichende Mengen des *pks26*-spezifischen Polyketids zu gewinnen. In analoger Weise wurde eine FLAG-markierte *pks26*-GA-Mutante erzeugt und geprüft. Hier war es darüber hinaus möglich die Genaktivierung neben DNA- und RNA- zusätzlich auf Protein-Ebene nachzuweisen.

Auf die Verifizierung der *pks26*-Mutante durch unabhängige Methoden wurde großer Wert gelegt. Weder in vegetativen noch klonal entwickelnden Zellen war ein spezifischer Phänotyp zu erwarten. Die von Santorelli *et al.* beschriebenen Änderungen im Kooperationsverhalten waren nur gering ausgeprägt und ihre Bestimmung mit hohen relativen Schwankungen verbunden.

Die korrekte Integration der Knock-Out Kasette wurde auf DNA-Ebene durch vier verschiedene PCR-Reaktionen an der Insertionsstelle sowie eine Southern Blot-Analyse bestätigt (vgl. Abbildung 15, Abbildung 16). Zur Überprüfung der Genexpression wurde ein Pulsexperiment durchgeführt, bei welchem in der Knock-Out-Mutante kein *pks26*-Transkript induziert werden konnte.

Die korrekte Integration der GA-Kasette im Stamm Pks26-GA wurde mittels PCR und Southern-Blot überprüft. Eine Integration des Vektorrückgrats stromaufwärts der SacI-Schnittstelle der 5'-homologe Region durch ein *single-crossover*-Ereignis konnte mittels PCR ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 19). Die vollständige Sequenzierung des Integrationsbereiches inklusive Transkriptionsstart und Übergang zur authentischen *pks26*-Sequenz bestätigte eine basengenaue Integration der GA-Kasette, so dass die Translation des nativen PKS26-Proteins gewährleistet war. Eine Punktmutation an Position 456 führte nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz und hatte damit keinen Einfluss auf die Funktionalität der Polyketidsynthese 26. Konventionelle RT-PCR zeigte eine starke Erhöhung der Transkriptmenge aller GA-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp. Jedoch kann von einem hohen RNA-Level nicht automatisch auf ein hohes Proteinlevel geschlossen werden. Transkription und Translation stehen nicht im

einfachen linearen Zusammenhang. Vielmehr beeinflussen nach der Transkription ansässige Faktoren die Expression von Proteinen. (Maier *et al.* 2009) Die hohe Transkriptmenge der GA-Mutanten konnte somit nur als Indiz für ein hohes Protein- oder Biosyntheselevel gewertet werden. Der Western Blot mit einem FLAG-spezifischen Antikörper zeigte jedoch deutliche Banden in der erwarteten Höhe des FLAG-PKS26-Proteins. Somit wurde die Aktivierung von *pks26* sowie das im vegetativen Stadium exprimierte Protein nachgewiesen.

Zwischen den *pks26*-Knock-Out- bzw. Genaktivierungsstämmen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der detektierbaren Naturstoffe festgestellt werden. Die Ursachen dafür können in allen am experimentellen Workflow beteiligten Prozessen gesucht werden. Die Strategie des Promotortausches ist eine in vielen Organismen etablierte Methode, welche erfolgreich zur Aktivierung stiller Naturstoffcluster und zur Isolierung neuer Naturstoffe genutzt wurde (Kennedy und Turner 1996, Chiang *et al.* 2009, Biggins *et al.* 2012, Luo *et al.* 2013). Häufig finden dabei induzierbare Promotoren Verwendung, welche eine Kontrolle über den Grad der Genexpression ermöglichen. Der in dieser Arbeit verwendete Aktin-15-Promotor bewirkt eine konstitutive Genexpression. Unter seiner Kontrolle wird *pks26* permanent mit hoher Intensität abgelesen, was unter Umständen zu Problemen bei der Translation und einem nicht funktionalen PKS26-Protein führen kann. In einem solchen Fall würde trotz positivem RNA und Proteinnachweis keine Biosynthese des aktiven Proteins stattfinden. Um dies zu umgehen, könnte mit einem induzierbaren Promotor gearbeitet werden. In *D. discoideum* stehen dafür ein Folat-abhängiger Promotor (Blusch *et al.* 1992) sowie ein Tetrazyklin-induzierbares System (Gossen und Bujard 1992, Blaauw *et al.* 2000) zur Verfügung. Letzteres gewährleistet eine Regulation der Expression über den Faktor 10.000 (Veltman *et al.* 2009). Für die Regulation von *pks26* muss neben dem induzierbaren Promotor TRE-P<sub>min</sub> zusätzlich das Gen für den Transaktivator rtTA-M2 ins Genom integriert werden. Mit diesem Ansatz könnten Translationsprobleme aufgrund zu starker Geninduktion vermieden werden. Darüber hinaus war zwar das FLAG-markierte PKS26-Protein im Western Blot nachweisbar, jedoch können keine Aussagen über dessen Funktionalität gemacht werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der N-terminale FLAG-Tag die Proteinfunktion von PKS26 beeinträchtigt. Weitergehende Untersuchungen sollten sich daher vorrangig auf Pks26-GA beziehen.

Bevor die Polyketid-Biosynthese stattfinden kann, ist eine Aktivierung der ACP-Domänen

notwendig. Katalysiert durch eine PPTase wird Coenzym A post-translational über eine Phosphodiesterbindung kovalent an die ACP-Domäne gebunden, wodurch diese von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form überführt wird. Erst dann kann der erste Schritt der Polyketid-Biosynthese, das Beladen von Acetyl-CoA auf das aktivierte ACP erfolgen (Fischbach und Walsh 2006). Durch Homologieuntersuchungen konnten in *D. discoideum* die zwei PPTasen Sfp und AcpS identifiziert werden. Sfp zeigt eine Spezifität für Typ-1-PKS und FAS. AcpS weist eine geringere Substratpromiskuität auf und konnte nur eine isolierte ACP aktivieren. Beide PPTasen werden während der gesamten multizellulären Entwicklung wie auch im vegetativen Stadium exprimiert. Der Knock-Out je eines der beiden Gene führte bisher zu nicht lebensfähigen Amöben, was nahelegt, dass es sich bei beiden PPTasen um essentielle Gene handelt (Nair *et al.* 2011). Prinzipiell kann ein negativer Einfluss des Promotortausches von *pks26* auf die Expression der PPTasen, bspw. durch unspezifische heterologe Rekombinationen oder epigenetische Effekte, nicht ausgeschlossen werden. Daher sollte die Expression der PPTasen in den *pks26*-Mutanten überprüft werden. Ferner ist es denkbar, dass eine geringe Expression der PPTasen einen limitierenden Faktor für die Polyketid-Biosynthese darstellt. Durch einen weiteren Promotortausch könnte eine *Pks26/Sfp-GA*-Mutante erstellt werden, in welcher die Expression beider Gene gewährleistet ist. Für die Generierung multipler Mutationen mit nur einem Selektionsmarker ist in *D. discoideum* das *Cre-loxP*-System etabliert (Faix *et al.* 2004, 2013). Ebenfalls stehen CRISPR/Cas9-basierte Methoden zur Verfügung (siehe unten).

Die klassischen Techniken für die Aktivierung stiller Naturstoffgene basieren auf dem Prinzip der homologen Rekombination. Darauf aufbauend wurden Methoden für den multiplen Austausch von Promotoren erfolgreich entwickelt, womit die Aktivierung ganzer Gencluster gelang (Luo *et al.* 2013, Montiel *et al.* 2015). Nach heutigen Maßstäben stellt insbesondere die geringe Effizienz sowie der daraus resultierende hohe Zeitaufwand einen erheblichen Nachteil dar (Leitão *et al.* 2017). Die Generierung von Doppelstrangbrüchen an spezifischen Loci durch programmierbare Nukleasen kann genutzt werden, um homologe Rekombinationsereignisse zu begünstigen und damit die Gesamteffizienz zu steigern (Ran *et al.* 2013). Neben den Zinkfinger-Nukleasen und TALENs (engl.: „*transcription activator-like effector nuclease*“) finden die nukleinsäuregesteuerten Nukleasen am häufigsten Einsatz, welche hauptsächlich durch CRISPR/Cas9 repräsentiert werden (Kim und Kim 2014). Die Nuklease Cas9 wird durch

ein *guide*-RNA-Molekül (gRNA) zum Ziel-Locus geführt, wo ein sequenzspezifischer Doppelstrangbruch erfolgt (Sternberg *et al.* 2014). Zelleigene DNA-Reparaturmechanismen wie *non-homologous end-joining* führen anschließend zum Einfügen von zufälligen Mutationen wie Deletionen, Insertionen und Substitutionen. Als Mechanismus des bakteriellen Immunsystems von *Streptococcus pyogenes* beschrieben, hat CRISPR/Cas9 (engl.: „*clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated (Cas) proteins*“) die Molekularbiologie revolutioniert und findet heute in einer Vielzahl der genetisch zugänglichen Organismen Anwendung (Jinek *et al.* 2012). Auch hat sich der Anwendungsbereich vom reinen „*genome editing*“ weiterentwickelt. So können Cas9-Proteine ohne Endonukleaseaktivität genutzt werden, um Effektorproteine an spezifische DNA Loci zu bringen um deren Transkription zu modulieren (CRISPRi) (Larson *et al.* 2013).

Für *D. discoideum* sind CRISPR-Vektoren beschrieben, mit denen spezifische Mutationen an multiplen Loci innerhalb weniger Wochen möglich sind (Sekine *et al.* 2018, Iriki *et al.* 2019), sowie eine Methode zur Identifizierung essentieller Gene (You *et al.* 2020). In dem sehr AT-reichen Genom von *D. discoideum* könnte das relativ seltene Vorkommen von PAM-Motiven (5'-NGG-3'), über welche der Cas9/gRNA-Komplex den Zielgenlocus findet (Muramoto *et al.* 2019), eine Limitation darstellen. Für „einfache“ Knock-Out-Strategien sollte das dennoch keine praktische Einschränkung darstellen. Durch das optimierte Design der gRNA mit Hilfe von webbasierte Werkzeuge wie E-CRISP oder Cas-Designer können off-target-Mutationen reduziert werden (Heigwer *et al.* 2014, Park *et al.* 2015). Der CRISPR/Cas9-basierte Austausch von längeren Promotorsequenzen zur Aktivierung stiller Naturstoffgene ist in *D. discoideum* bisher nicht möglich. Die aktuellen Entwicklungen in naturstoffproduzierenden Bakterien und filamentösen Pilzen zeigen die Vielseitigkeit dieses Systems und geben Grund zu Hoffnung auf zukünftig in *D. discoideum* einsetzbare Adaptationen (Wang und Cirino 2016, Tong *et al.* 2019, Roux *et al.* 2020, Heng *et al.* 2021).

Neben den molekularbiologischen Möglichkeiten spielen die physiologischen Rahmenbedingungen im Wirtsorganismus eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Viele der bisher in *D. discoideum* identifizierten Sekundärmetaboliten konnten meist nur in äußerst geringen Mengen bzw. durch Kultivierung großer Biomasse nachgewiesen werden (Takaya *et al.* 2000, 2014). Die heterologe Expression von Naturstoffclustern stellt dazu eine mögliche Alternative dar,

wie die Strukturaufklärung des Terpens Discoidol gezeigt hat (Chen *et al.* 2019). Sinkende Kosten für die Gensynthese sowie verbesserte Klonierungsverfahren machen diesen Ansatz noch attraktiver (Zhang *et al.* 2019, Lin *et al.* 2020).

#### 4.1.2.2 Kultivierungsbedingungen

Für die Extraktionsversuche wurden das Set an *pks26*-Mutanten sowie der Wildtyp AX4 in SIH-Medium bis zum Erreichen der stationären Entwicklungsphase kultiviert. Der Hersteller Formedium™ verspricht für SIH-Medium höhere maximale Zelldichten, was in Vorversuchen bestätigt werden konnte. Obwohl es sich bei SIH um ein synthetisches Medium handelt, zeigte es im Chromatogramm einen komplexen Hintergrund, was die Identifikation möglicher Sekundärmetaboliten erschwert. In der Literatur sind jedoch vielfältige Beispiele beschrieben, bei denen unbekannte Sekundärmetaboliten auch aus komplexen Medien durch vergleichende Untersuchungen identifiziert wurden (Pan *et al.* 2019). Daher ist dieser Ansatz prinzipiell nicht falsch, für den „schlechten“ Naturstoffproduzenten *D. discoideum* jedoch eventuell weniger geeignet. Ein alternativer Versuchsaufbau wäre, die Zellen in SIH- oder HL5-Medium bis zur exponentiellen Phase zu kultivieren, dann zu waschen und anschließend in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Phosphatpuffer für 24 Stunden weiter zu kultivieren. Aus der Kultur in Phosphatpuffer können dann die Extrakte in analoger Weise hergestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des PKS26-Biosyntheseprodukts trotz starker Geninduktion und leistungsfähiger Analytik könnte sein, dass *pks26* Teil eines größeren biosynthetischen Genclusters ist und als Startereinheit ein mutmaßliches Vorläuferprodukt eines anderen Enzyms benötigt. In dieser Situation hätte die alleinige Aktivierung von *pks26* keinen Effekt auf das sekundäre Metabolom. Jedoch würde der Knock-Out von *pks26* dennoch einen *Loser*-Phänotyp sichtbar werden lassen, da bei der Entwicklung auf Agarplatten das vollständige Gencluster aktiviert ist. In diesem Fall ist eine Extraktion von „conditioned Medium“ wie in Oohata *et al.* beschrieben sowie eine vergleichende Analyse des sekundären Metaboloms von Pks26-KO und AX4 sinnvoll (Oohata *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine cAMP-pulsabhängige Induktion von *pks26* in Schüttelkultur nachgewiesen werden (vgl. 3.2.2.). Unter der Annahme, dass hierbei das mutmaßliche vollständige Biosynthesecoluster induziert wird, könnte durch einen UHPLC-HRAM/MS gestützten metabolomischen Vergleich von Pks26-KO und AX4 das PKS26-Biosyntheseprodukt identifiziert werden. Abschließend besteht

im Falle der Existenz eines übergeordneten Regulatorgens die Möglichkeit, dieses zu aktivieren.

#### **4.1.2.3 Extraktion**

Für die Analyse des Sekundärmetabolismus der *pks26*-Mutanten wurden Extrakte der vollständigen Kulturen angefertigt. Somit wurden Substanzen aus Zellen sowie Kulturüberstand erfasst. Hierfür kam eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat zum Einsatz. Die Vor- und Nachteile dieser Extraktionsmethode sowie eine mögliche Alternative wurden bereits in Kapitel 4.1.1.2 diskutiert. An dieser Stelle sei lediglich darauf verwiesen, dass die Flüssig-Flüssig-Extraktion trotz ihrer Schwächen in Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate dennoch sehr erfolgversprechend ist und eine am häufigsten angewandte Extraktionsmethode in metabolischen Fragestellungen darstellt (Tulipani *et al.* 2013, Martin *et al.* 2014). Die Isolation drei neuer Macrolactame aus *Streptomyces griseus* nach Genaktivierung durch Promotortausch, Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und vergleichender chromatographischer Analyse bestätigt dies (Luo *et al.* 2013).

#### **4.1.2.4 Detektion/Analytik**

Die hergestellten Extrakte wurden mittels UHPLC-HRAM/MS analysiert. Die Kombination von UHPLC, welche zu den effizientesten und vielseitigsten Trennungsmethoden gehört, mit hochauflöser Massenspektrometrie ermöglicht die Detektion und Identifikation eines großen Spektrums an Analyten und stellt daher das am besten geeignete analytische System für die Identifikation unbekannter Sekundärmetaboliten wie das PKS26-Biosyntheseprodukt dar (López-Ruiz *et al.* 2019, Pezzatti *et al.* 2020). Dennoch konnten bei einer visuell-qualitativen Auswertung keine prominenten Unterschiede in den chromatographischen Profilen beobachtet werden. Eine Software-gestützte Auswertung der UHPLC-HRAM/MS Daten sowie eine anschließende Filterung der detektierten *features* führte zu 21 Kandidaten für das PKS26-Biosyntheseprodukt. Hervorzuheben sind an dieser Stelle *m/z* 379,1974 sowie 746,5883. Beide *features* weisen einen besonders hohen *fold change* im Vergleich zum Wildtyp AX4 sowie eine hohe statistische Signifikanz auf. Jedoch lässt die biosynthetische Vielfalt, zu der iterative Typ 1-PKS-Enzyme befähigt sind, an dieser Stelle keine weitere Strukturvorhersage zu. Die Massen der bisher aus *D. discoideum* isolierten Naturstoffe befinden sich hauptsächlich im Bereich von 200-



400 Da (vgl. Abbildung 6), was ein *feature* aus diesem Massenbereich erwarten lässt, obgleich ein weiter gefasster Massenbereich nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem sind mit Dictyopterin und DIF-1 auch Naturstoffe mit Stickstoff und für Polyketide eher untypischen Elementen wie Chlor beschrieben, so dass diese Möglichkeiten ebenfalls in Betracht gezogen werden müssen. Darüber hinaus sind keine PKS-typischen C/O-Verhältnisse bekannt, so dass hier keine weitere Bewertung stattfinden kann. Um die gefundenen *m/z* zu verifizieren bzw. die Liste weiter einzugrenzen, sind daher weiterführende Experimente unbedingt notwendig.

In der Massenspektrometrie werden abhängig von der verwendeten Ionisierungsmethode Metaboliten mit differentiellen physiko-chemischen Eigenschaften erfasst (Kondyli und Schrader 2020). Darüber hinaus lassen sich die meisten Metaboliten bevorzugt im positiven oder negativen Modus ionisieren. In der LC-MS zählt Elektrosprayionisierung (ESI) und Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI, engl.: „*atmospheric pressure chemical ionization*“), zu den gebräuchlichsten Ionisierungsverfahren. Die für die Analyse der *pks26*-Mutanten verwendete ESI zählt zu den schonenden Methoden der Ionenerzeugung, bei der wenig Fragmentierung auftritt und Quasimoleküle ( $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ) detektiert werden können. Mit ESI lassen sich moderat polare Analyten sicher erfassen (Tugizimana *et al.* 2018). Im Vergleich dazu generiert APCI mehr Fragmentierung und es können unpolare bis schwach polare Analyten, sowie Analyten sehr hoher Polarität gut ionisiert werden, insbesondere wenn wenig funktionelle Gruppe vorhanden sind (Commisso *et al.* 2017, Perez de Souza *et al.* 2021). Somit stellt APCI im Vergleich zu ESI eine nahezu komplementäre Methode dar. Um die Anzahl der in einer Probe detektierbaren Analyten zu erhöhen, sollten idealerweise beide Ionisierungsverfahren verwendet werden (Wolfender *et al.* 2015).

In LC-ESI-HRMS-Messungen werden üblicherweise Quasimoleküle erfasst. Somit werden neben der akkuraten Masse keine weiteren strukturellen Informationen gewonnen. Mit Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS, MS<sup>n</sup>) können spezifisch Ionen ausgewählt und fragmentiert werden. Die resultierenden (mehrstufigen) Fragmentierungsmuster geben wertvolle strukturelle Informationen (Kind und Fiehn 2010, Vaniya und Fiehn 2015). Über den Abgleich mit öffentlich zugänglichen (Smith *et al.* 2005, Horai *et al.* 2010) oder kommerziellen Referenzdatenbanken (Compound Discoverer 3.2 Thermo Scientific™) können bekannte Substanzen identifiziert werden. Jedoch sind diese Datenbanken sehr geräteabhängig und es finden sich vollständige

Datensätze von lediglich einem Bruchteil aller bekannten Sekundärmetaboliten. Die Lücke kann über den Abgleich mit *in silico* MS<sup>n</sup>-Datenbanken geschlossen werden (Ruttkies *et al.* 2016). Mit diesem Vorgehen können die Kandidaten für das PKS26-Biosyntheseprodukt weiter eingegrenzt werden (Dereplikation). Darüber hinaus können die hochaufgelösten Fragmentierungsdaten auch für die *de novo* Strukturvorhersage unbekannter Metaboliten genutzt werden (Dührkop *et al.* 2019, 2021).

Nach der Aktivierung eines stillen Biosynthesegens findet sich im Idealfall ein zusätzliches Signal im chromatographischen Profil. Ist dies nicht der Fall kann über einen geeigneten Bioassay nach der biologischen Aktivität im Extrakt gesucht und der korrespondierende Sekundärmetabolit in der aktiven Fraktion identifiziert werden. Steht jedoch kein praktikabler Bioassay zur Verfügung, stellen statistische Analysemethoden eine weitere Alternative dar. Die in dieser Arbeit durchgeführte Hauptkomponentenanalyse ist eine etablierte Methode zur Dimensionsreduktion. Mit ihr können Unterschiede in multidimensionalen Datensätzen in einem zweidimensionalen Koordinatensystem visualisiert werden, welches den Hauptteil der Gesamtvarianz abbildet (Bro und Smilde 2014). Biologische Replikate finden sich gruppiert im selben PCA-Raum wieder. LC-MS-PCA-Kopplungen wurden bereits sehr erfolgreich in vergleichenden Analysen des sekundären Metaboloms eingesetzt. Zur Darstellung von *fold change* und p-Wert bei binären Vergleichen und damit zur Identifizierung interessanter Metabolite ist der *Volcano Plot* eine häufig verwendete Visualisierungsmethode (Hur *et al.* 2013, Albright *et al.* 2015). Nach Co-Kultivierungsexperimenten mit einem *Nocardiosis*-Stamm konnten mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse geeignete Bedingungen für die Induktion stiller Biosynthesecluster gefunden und das bisher nicht beschriebene Polyketid Ciromicin identifiziert werden (Derewacz *et al.* 2015). Das von der Arbeitsgruppe Rolf Müller als „*gene-to-compound*“-Ansatz bezeichnete Vorgehen zeigt, wie durch vergleichende statistische Analysen des sekundären Metaboloms verschiedener *Myxococcus xanthus* Stämme drei neue *features* identifiziert werden konnten. (Cortina *et al.* 2012). Hier offenbart sich jedoch auch ein starker Einfluss der Datenvorbehandlung, wodurch die relevanten biologischen Informationen eines metabolomischen Datensatzes herausgestellt werden können, was die sinnvolle biologische Interpretation erleichtert (van den Berg *et al.* 2006). Bei weiteren Untersuchungen zum PKS26-Biosyntheseprodukt sollte hier ein stärkerer Fokus gesetzt werden.

### 4.1.3 Ausblick

In Anbetracht der vielen noch nicht untersuchten Einflussfaktoren auf das sekundäre Metabolom von *D. discoideum* sind ein systematisch durchgeführter OSMAC-Ansatz sowie molekularbiologische Methoden zur spezifischen Aktivierung stiller PKS-Gene ein erfolgversprechendes Konzept, um mindestens einige der 36 mutmaßlichen noch unbekanntem Polyketide zu identifizieren. Obwohl in dieser Arbeit bereits eine leistungsstarke Analytik und Datenauswertung herangezogen worden ist, können durch gezielte Änderung spezifischer Parameter wie z.B. der Ionisierungsmethode neue Analyten erschlossen werden.

## 4.2 Physiologische Funktion von *pks26*

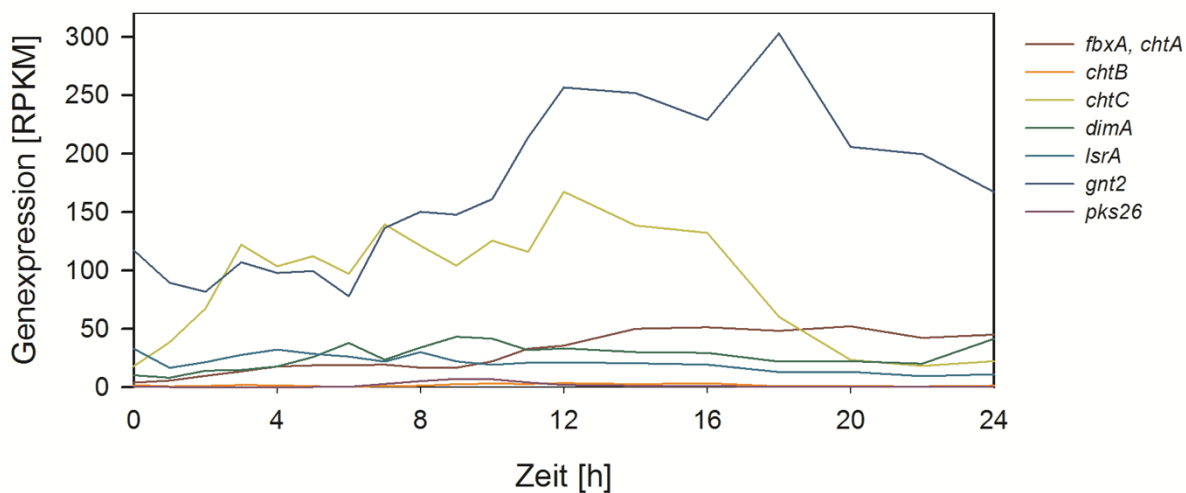
### 4.2.1 Mögliche Funktion von *pks26* als entwicklungs- und cAMP-pulsabhängiges Gen

In den durchgeführten Genexpressionsuntersuchungen wurden neun entwicklungs-regulierte PKS-Gene identifiziert. Um bekannte Probleme beim späteren Hochskalieren zu vermeiden, wurde dabei auf die Kultivierung in einer Schüttelkultur zurückgegriffen. Als stark entwicklungs- und cAMP-abhängiges Gen wurde *pks26* identifiziert, welches nach 7 Stunden in Phosphatpuffer und pulsativer Zugabe von cAMP eine 120-fach höhere Expression als in vegetativen Zellen zeigte.

Dieses Ergebnis stimmt mit später veröffentlichten Daten überein und spricht für eine Beteiligung des PKS26-Produktes an der komplexen Regulation der multizellulären Entwicklung von *D. discoideum*. (vgl. Abbildung 8) (Rosengarten *et al.* 2015). Die Daten von Rosengarten *et al.* zeigen bei der Entwicklung auf Nitrozellulose-Filtern ein Expressionsmaximum nach 9 Stunden, während das Pulsieren mit cAMP zu einem früheren Expressionsanstieg mit einem Maximum bei 5 und 8 Stunden führt (Rosengarten *et al.* 2015). Die zu Beginn dieser Arbeit vorgelegenen Daten von Parikh *et al.* geben bei Entwicklung auf Nitrozellulose-Filtern ein etwas früheres Expressionsmaximum nach 4 Stunden an (Parikh *et al.* 2010).

Nach neun Stunden Entwicklung befinden die *D. discoideum* Zellen in der späten Aggregationsphase bzw. im beginnenden Mound-Stadium. Wie kann eine Genaktivität in dieser Entwicklungsphase das Verhältnis von Sporen- und Stielzellen im fertigen Fruchtkörper beeinflussen? Beim Vergleich der Expression bekannter *Losser-* und *Cheater-*

Gene während der multizellulären klonalen Entwicklung, wird keine gruppentypische Tendenz deutlich (Abbildung 36). Sowohl bei *Cheatern* (*fbxA*, *chtB*, *chtC*) als auch *Losern* (*dimA*, *lsrA*, *modB*) finden sich mittel bis spät exprimierte Gene (*fbxA*, *dimA*, *gnt2*), sowie Gene, welche nur eine sehr geringe Entwicklungsabhängigkeit zeigen (*chtB*, *lsrA*) (Houle *et al.* 1989, Ennis *et al.* 2000, Foster *et al.* 2004, Parkinson *et al.* 2011, Santorelli *et al.* 2013). Mit einer Expression zwischen 3 und 16 Stunden ist *chtC* vor allem in der frühen Entwicklung aktiv (Khare und Shaulsky 2010).



**Abbildung 36: Expressionsprofile bekannter Cheater- und Loser-Gene während der multizellulären Entwicklung.** Dargestellt sind Gene, deren Knock-out einen Cheater-Phänotyp verursachen (*fbxA*, *chtB*, *chtC*) sowie mit einem Loser-Phänotyp assoziierte Gene (*dimA*, *lsrA*, *modB*). RPKM: Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads, Dargestellt ist RPKM als Maß für die auf die Genlänge und Sequenzieriefe normalisierte Expressionsstärke von Genen aus einer Probe. Je höher der RPKM-Wert, desto höher ist die Genexpression. Daten entnommen von <https://dictyexpress.research.bcm.edu>, Zugriffsdatum: 30.09.2021 Rosengarten *et al.* 2015, Stajdohar *et al.* 2015.

Genau wie die Genregulation sind auch die Mechanismen nach denen bekannte *Cheater*- und *Loser*-Stämme ihren Anteil an Sporen- und Stielzellen im Fruchtkörper variieren sehr vielfältig (vgl. 1.1.4.2). Der fakultative *Cheater* ChtB reduziert beispielsweise die Expression des Präsporengens *cotB* in den Wildtypzellen einer Chimäre, wodurch der *Cheater* einen höheren Anteil an Sporen im fertigen Fruchtkörper bilden kann (Santorelli *et al.* 2013). ChtC dagegen kann bei einer chimären Entwicklung die Differenzierung eigener Prästielzellen nicht aufrechterhalten. Prästielzellen, welche zunächst die typischen Prästielzellmarkergene *tagB* und *ecmA* exprimieren, transdifferenzieren in der weiteren Entwicklung zu Sporenzellen. In der Chimäre werden die fehlenden Zellen im Stiel durch den Wildtyp kompensiert (Khare und Shaulsky 2010). Nach einem Knock-Out von *dimA* sind die Amöben nicht mehr fähig, auf die stielzellinduzierende Wirkung von

DIF-1 zu reagieren und bilden in einer chimären *Slug* mehrheitlich Präsporenzellen. In diesem Entwicklungsstadium erscheinen *dimA*-Knock-Out-Zellen somit als *Cheater*. Jedoch offenbart sich im weiteren Verlauf der Entwicklung ein zweiter Phänotyp von *dimA*. Die Zellen werden bei der Bildung des Fruchtkörpers kompetitiv vom Sporenkopf ausgeschlossen und sind nach Abschluss der Entwicklung in der Sporenmasse deutlich unterrepräsentiert, was sie zu klaren *Losern* macht. (Foster *et al.* 2004). Der Knock-Out von *lrsA* führt zu einer geringeren Synthese stielzellinduzierender Faktoren wie DIF-1 sowie zu einer sensitiveren Antwort auf die stielzellinduzierenden Faktoren anderer Amöben, was einen *Loser*-Phänotyp auslöst (Parkinson *et al.* 2011). Ebenso löst der Knock-Out der Glycosyltransferase *Gnt2* einen *Loser*-Phänotyp aus. Durch eine reduzierte Adhäsion der Zellen in der *Slug*-Phase akkumulieren die Zellen in der Prästiellzellregion der *Slug* und bilden in der chimären Entwicklung einen deutlich geringeren Sporenanteil als Wildtypzellen.

Dies zeigt die Vielfalt der *Cheater*- oder *Loser*-Phänotyp auslösenden Mechanismen und auch die Unmöglichkeit allein aus Daten zur Genexpression eine mögliche Genfunktion abzuleiten. Wie eine Unterbrechung des DIF-1 Signalwegs das soziale Verhalten der Amöben verändern kann, veranschaulicht das Beispiel *dimA*. Auch für MPBD ist dies nicht ausgeschlossen, das für die volle Aktivierung der ACA notwendig ist, regulatorische Funktionen zeigt sowie die Sporenreifung beeinflusst (Anjard *et al.* 2011, Narita *et al.* 2014, Kondo *et al.* 2019). Den bekannten Sekundärmetaboliten von *D. discoideum* wird demnach in erster Linie eine Funktion als Signalmoleküle während der multizellulären Entwicklung zugeschrieben. Um die physiologische Funktion des PKS26-Produkts weiter zu untersuchen, könnte der Einfluss von *pks26* auf die Expression anderer entwicklungsrelevanter Gene neue Erkenntnisse liefern. Konkret sollten die *pks26*-Mutanten auf eine veränderte Expression der cAMP-abhängigen Gene sowie Prästiell- und Präsporenzellgenen untersucht werden. Da der *Loser*-Phänotyp nur während der chimären multizellulären Entwicklung von *pks26*-REMI nachweisbar ist, könnte ein Vergleich der Genexpression während klonaler und chimärer Entwicklung wichtige Erkenntnisse liefern. Darüber hinaus könnten Indizien für einen Einfluss auf den cAMP-Signalweg, welcher nach neueren Erkenntnissen auch noch während der *Slug*-Phase eine Rolle spielt, sowie auf die Bildung von Stiel- und Sporenzellen gesammelt werden (Singer *et al.* 2019).

#### 4.2.2 Einfluss von *pks26* auf das Kooperationsverhalten

In einem genomweiten Screening wurde der Einfluss von *pks26* auf die Kooperationsfähigkeit erstmals beschrieben (Santorelli *et al.* 2008). Eine REMI-Insertion am 3'-Ende des Gens verursachte einen *Loser*-Phänotyp. Während der klonalen Differenzierung zeigte die *pks*-REMI-Mutante allerdings keinen offensichtlichen Phänotyp. Nach der Erstellung einer *pks26*-Knock-Out-Mutante, in der das Gen im Bereich der KS-Domäne unterbrochen wurde, so dass keine Restaktivität zu erwarten ist (*Pks26*-KO), wurde das Kooperationsverhalten während der chimären Entwicklung im *Cheating*-Assay überprüft. Damit könnte der *Loser*-Phänotyp von *Pks26*-REMI verifiziert werden. Zusätzlich wurde der Effekt der Aktivierung von *pks26* auf das Kooperationsverhalten überprüft.

Um den Einfluss der GFP-Markierung auf das Kooperationsverhalten zu überprüfen, wurde jeder Stamm einer gemeinsamen Entwicklung mit seiner GFP-markierten Variante unterzogen und die jeweiligen Anteile an Amöben und Sporen vor und nach der Entwicklung ermittelt. Hier zeigte sich bei allen Stämmen eine Abnahme der GFP-markierten Stämme nach der Entwicklung. Somit verhalten sich die GFP-markierten Stämme nicht neutral, sondern als *Loser* gegenüber ihrem Elternstamm. Die Interpretation der Ergebnisse des *Cheating*-Assays ist dadurch deutlich erschwert.

Die Untersuchungen der *pks26*-Mutanten im Vergleich mit dem Wildtyp AX4 ergaben eine Abnahme des GFP-markierten Stammes nach der Entwicklung, unabhängig davon welcher Stamm die GFP-Markierung trug. Somit scheint die GFP-Markierung einen *Loser*-Phänotypen auszulösen, der einen vermeintlichen *pks26*-abhängigen Effekt auf das Kooperationsverhalten übersteigt, so dass dieser nicht messbar war. Auch wenn die Einzelmessungen in nur einigen Fällen statistisch signifikante Unterschiede ergaben, ist eine Tendenz zur Abnahme des GFP-Anteils deutlich. Mögliche Gründe werden im Folgenden kurz diskutiert.

Nach der Transformation der Stämme mit pDXA-GFP2 wurden Einzelklone für den *Cheating*-Assay anhand des höchsten Anteils an fluoreszierenden Zellen und Intensität der Fluoreszenz nach Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewählt. Eine Beurteilung des *Cheating*-Verhaltens erfolgte an dieser Stelle nicht. Hier hätte die Möglichkeit bestanden, einen im Vergleich zum Elternstamm „neutralen“ GFP-Stamm zu isolieren. Prinzipiell können durch die zusätzliche Expression von GFP Fitnessnachteile

entstehen, welche sich in einer geringeren Sporenzahl äußern. Zusätzlich finden sich in der Literatur Hinweise auf eine durch reaktive Sauerstoffspezies und Initiation von Apoptose vermittelte intrinsische Zytotoxizität von GFP, welche die generelle Abnahme des GFP-Anteils nach der Entwicklung erklären würde (Liu *et al.* 1999, Ansari *et al.* 2016). Ist dieser Faktor genau quantifizierbar, könnte der GFP-Effekt in die Datenauswertung einbezogen und das Problem umgangen werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, ob für die bereits publizierten *Cheater*-Studien ein Screening für einen neutralen Kontrollstamm durchgeführt werden musste, jedoch finden sich dazu keine Angaben (Ennis *et al.* 2000, Foster *et al.* 2004, Thompson *et al.* 2004, Santorelli *et al.* 2008, 2013, Khare und Shaulsky 2010). In seiner Dissertation schreibt Lorenzo Santorelli detaillierter zur Durchführung des Assays. Je Testreihe wurde eine Kontrolle AX4/AX4-GFP mitgeführt, bei der ein Sporenanteil von 50 % erwartet wurde. Bei einer Abweichung von mehr als 2 % wurde die gesamte Testreihe verworfen und das Experiment wiederholt. Darüber hinaus wurde der bekannte *Cheater* ChtA und *Loser* DimA als Kontrolle mitgeführt um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten (Santorelli 2007). Foster *et al.* 2004 geben für die Kontrollen AX4/AX4-GFP und dimA<sup>-</sup>/dimA<sup>-</sup>-GFP einen Anteil an GFP-Sporen von 52 % an. Zusätzlich wurden in der Studie von Foster auch reziproke Mischungen untersucht (siehe unten). Für diese Arbeit standen die Kontrollen für *Loser* und *Cheater* nicht zur Verfügung. Das Mitführen im Assay wurde nur als bedingt hilfreich eingeschätzt, da diese auf einem anderen Elternstamm basierten. Genetische Untersuchungen an *D. discoideum* Wildtyp-Laborstämmen haben viele bis dato unbekannte Duplikationen gezeigt, welche sich auch auf den Phänotyp auswirken und bei sensiblen Untersuchungen wie dem *Cheating*-Assay problematisch sein können (Bloomfield *et al.* 2008). Beispielsweise kann bereits die höhere Teilungsrate eines Stammes hier einen höheren Sporenanteil erzeugen und damit zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Vor diesem Hintergrund ist es unabdingbar, die *pks26*-Mutanten gegen ihren eigenen Elternstamm zu testen. Dies hat in dieser Arbeit zu der Erkenntnis eines unerwarteten GFP-Effekts geführt. Darüber hinaus sollten alle *pks26*-Mutanten auf dem AX4-Stamm aufbauen, auf dem auch Pks26-REMI, ChtA und DimA basieren.

Um auf jegliche Effekte der Markierung zu überprüfen, wird das Untersuchen reziproker Mischungen empfohlen (Buttery *et al.* 2013). Santorelli *et al.* 2008 testete lediglich die Mutanten gegen AX4-GFP. Als Kontrolle wurde AX4-GFP gegen AX4 getestet und verhielt sich neutral (50,1 % Sporen von AX4-GFP). Alternativ zur Markierung mit GFP stehen

fluoreszierende Zellfarbstoffe zur Verfügung, mit denen bei vielen Stämmen 100 % Markierung erreicht werden kann (CellTracker™ Green CMFDA – Invitrogen/Thermo Scientific). Möglicherweise haben diese keine Fitnesseffekte zur Folge, was mit der Untersuchung reziproker Mischungen überprüft werden kann. Nachteilig ist ein erhöhter Zeitaufwand und ein deutlicher Verlust der Fluoreszenz mit jeder Zellteilung, weswegen sie nur für genetisch nicht zugängliche Naturisolate empfohlen werden (Buttery *et al.* 2013). Darüber hinaus müssen für eine spezifische Charakterisierung von *Cheater/Loser*-Effekten Untersuchungen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (90:10 bis 10:90) durchgeführt werden. Je nachdem durch welchen Mechanismus der *Cheater*-Phänotyp ausgelöst wird, kann die alleinige Untersuchung von 50:50 Mischungen zu Fehlinterpretationen führen (Sathe und Nanjundiah 2018)

Bei der Auszählung der Zellen mit dem Durchflusszytometer besteht die Möglichkeit, dass ein Stamm nicht korrekt erfasst wurde und somit ein systematisch geringerer Anteil an GFP-Sporen gemessen wurde. Die Differenzierbarkeit von fluoreszierenden und nicht-fluoreszierenden Zellen wurde jedoch exemplarisch für die GFP-Signalstärke von Amöben und Sporen der Stämme AX4 und AX4-GFP gezeigt (vgl. Abbildung 28). Daher kann von einer Eignung dieser Methode ausgegangen werden. Ein großer Vorteil besteht in den hohen gemessenen Zellzahlen von ca. 30.000 Zellen je Einzelmessung. Was zu sehr sicheren Ergebnissen führt und durch manuelles Auszählen nicht erreicht werden kann. Foster *et al.* 2004 geben bspw. 1200 gezählte Zellen an, während Santorelli *et al.* 2008 lediglich 300 Zellen je Mischung ausgezählt haben. Ein systematischer Vergleich der durchflusszytometrischen Messungen mit der manuellen Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop würde hier Klarheit bringen.

Das Kooperationsverhalten während einer chimären Entwicklung kann durch zellzyklusabhängige Effekte beeinflusst werden. Zellen, welche die multizelluläre Entwicklung in der S- oder frühen G2-Phase begannen, differenzierten häufiger zu Stielzellen als Zellen aus der späten G2-Phase, welchen mehr Zeit zum Wachstum und Ressourcen zur Verfügung stand (Gomer und Firtel 1987, Araki *et al.* 1994, Azhar *et al.* 2001). Die Ausbildung eines *Cheater*-Phänotyps wird demnach durch die Phase im Zellzyklus und den damit einhergehenden Fitness-Unterschieden kontrolliert. Um Messfehler im Cheating-Assay gering zu halten, ist folglich strengstens auf eine Synchronisierung der Zellen innerhalb einer Kultur zu achten (Sussman 1987). Die teilweise hohe Anzahl an durchgeführten biologischen Replikaten (Foster *et al.* 2004)



n=12, (Santorelli *et al.* 2008) n=3-27 lässt auf die relativ hohen biologischen Schwankungen schließen.

Aufgrund des GFP-abhängigen Effektes auf die Sporenproduktion lässt sich der Einfluss von *pks26* nur bedingt aus den Daten des *Cheating*-Assays herauslesen. Untergruppenanalysen oder ein Herausrechnen des GFP-Effektes führen nicht zu robusten Ergebnissen. Eine Überprüfung der Daten des *Cheating*-Assays mit „neutralen“ GFP-Stämmen für AX4 sowie die *pks26*-Mutanten mit mindestens sechs biologischen Replikaten muss demnach unbedingt erfolgen. Nur so können reproduzierbare, quantitative Daten zu derart subtilen Phänotypen wie dem Verhalten während der chimären Entwicklung von *D. discoideum* erhoben werden.



## 5 Zusammenfassung

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Organismus *Dictyostelium discoideum* ist eine ubiquitär vorkommende Amöbe. Unter bestimmten Bedingungen wie z.B. bei Nahrungsmangel aggregieren tausende Amöben und können zu einem vielzelligen Fruchtkörper differenzieren. Als Modellorganismus gewann *D. discoideum* nicht nur in der klassischen Biologie und Medizin an Bedeutung, sondern auch im Feld der Naturstoffforschung. Bei der Sequenzierung und Annotation des Genoms von *D. discoideum* wurden 40 funktionale Gene für Polyketidsynthasen (PKS) beschrieben. Damit einhergehend wird ein großes Potential für die Biosynthese von Polyketiden vermutet, welches die bisher in *D. discoideum* beschriebenen Naturstoffe weit übersteigt. Aufgrund der iterativen Arbeitsweise der Typ 1-PKS in *D. discoideum* ist eine strukturelle Vorhersage der Biosyntheseprodukte nicht möglich.

Die bereits bekannten Polyketide *Differentiation inducing factor-1* und 4-Methyl-5-pentylbenzen-1,3-diol fungieren als Differenzierungsfaktoren in *D. discoideum*. Weitere noch unbekannte Polyketide können ebenfalls wichtige regulatorische Funktionen besitzen. Da aber die Biosynthese von Sekundärmetaboliten einen energieaufwändigen Prozess darstellt, werden diese häufig nur bei Notwendigkeit produziert. Aus diesem Grund unterliegen viele PKS-Gene einer komplexen Regulation mit der Folge, dass sie unter optimalen „Standard“-Kultivierungsbedingungen im Labor nicht exprimiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der OSMAC-Ansatz (*one strain-many compounds*) herangezogen um durch systematische Änderungen der Kultivierungsparameter die Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu aktivieren. Die Untersuchung von sowohl vegetativ wachsenden als auch differenzierenden Zellen bzw. Kulturüberständen unter Verwendung verschiedener Extraktionsmittel mittels HPLC-DAD konnte keine signifikanten Unterschiede und damit keine aktivierenden Bedingungen identifizieren.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Untersuchung der entwicklungsregulierten PKS-Gene. Dabei wurde *pks26* als entwicklungs- und cAMP-abhängig exprimiertes Gen identifiziert. Um das PKS26-Biosyntheseprodukt zu identifizieren, wurde mittels homologer Rekombination ein *pks26*-Knock-Out erzeugt. Der Vergleich von Knock-Out mit Wildtyp-Zellen offenbarte jedoch keine Hinweise auf die Biosynthese eines PKS26-Produktes. Dies legt die Vermutung nahe, dass

Sekundärmetaboliten von *D. discoideum* nur in sehr geringen, nicht nachweisbaren Mengen produziert und in das Medium freigesetzt werden.

Durch Tausch des nativen Promotors konnte *pks26* in vegetativ vermehrenden Zellen konstitutiv überexprimiert werden. Ein Vergleich der Gesamtkultur-Extrakte von Wildtyp, Knock-Out- und Genaktivierungsmutante mittels UHPLC-ESI-HRAM/MS und anschließender Hauptkomponentenanalyse des Gesamtmetaboloms führte zur Identifikation von 21 Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von PKS26.

Aus der Literatur war bekannt, dass eine REMI-Mutation (*restriction enzyme-mediated integration*) in *pks26* während einer chimären Entwicklung zu einem geringeren Anteil an Sporenzellen im Fruchtkörper führt. Im *Cheating*-Assay wurde das Verhalten der *pks26*-Mutanten während der chimären multizellulären Entwicklung untersucht. Dabei überstieg der Einfluss von GFP einen möglichen Einfluss von *pks26* auf das Kooperationsverhalten. Auf Grundlage der hier gesammelten Daten konnte der publizierte *Loser*-Phänotyp der *pks26*-REMI-Mutante nicht bestätigt werden.

Während der klonalen multizellulären Entwicklung verhielten sich die *pks26*-Mutanten wie ihr Elternstamm und zeigten in verschiedenen Fitnessstests keine Auffälligkeiten.

## 6 Summary

The organism studied in the present work, *Dictyostelium discoideum*, is a ubiquitous amoeba. Under certain conditions, such as food deprivation, thousands of amoebae aggregate and differentiate into a multicellular fruiting body, consisting of different cell types. As a model organism, *D. discoideum* gained importance not only in biology and medicine, but also in the field of natural product research. During the sequencing and annotation of the *D. discoideum* genome, 40 functional genes for polyketide synthases (PKS) were described. Hence, a great potential for the biosynthesis of polyketides is assumed, which far exceeds the natural products previously described in *D. discoideum*. Due to the iterative mode of operation of the type 1 PKS in *D. discoideum*, structure prediction of their biosynthetic products is not possible.

The known polyketides differentiation-inducing factor 1 and 4-methyl-5-pentylbenzen-1,3-diol act as differentiation factors in *D. discoideum*. Still unknown polyketides may also have important regulatory functions. However, since the biosynthesis of secondary metabolites is an energy-intensive process, their production occurs only when necessary. Therefore, many PKS genes are subject to complex regulation, which often results in poor expression under optimal "standard" cultivation conditions in the laboratory.

In the first part of this work, the one strain-many compounds (OSMAC) approach was used to activate the biosynthesis of secondary metabolites by systematic changes of cultivation parameters. By investigation of vegetatively growing and differentiating cells or culture supernatants using different extraction agents and HPLC-DAD, no significant differences and thus no activating conditions could be identified.

Another focus of the work was the investigation of developmentally regulated PKS genes. In particular, *pks26* was identified as a developmentally and cAMP-regulated gene. To identify the PKS26 biosynthetic product, a *pks26* knockout mutant was generated by homologous recombination. However, comparison of knockout and wildtype cells did not reveal any evidence of the biosynthetic product. This suggests that *D. discoideum* secondary metabolites may only be produced and released into the medium in very small, undetectable amounts.

By exchanging the native promoter, *pks26* could be constitutively overexpressed in vegetatively growing amoebae. A comparison of culture extracts from wild-type, knockout and gene activation mutants using UHPLC-ESI-HRAM/MS and subsequent

principal component analysis of the entire metabolome led to the identification of 21 candidates for the biosynthetic product of PKS26.

From previous studies it was known that a mutant obtained by restriction enzyme-mediated integration (REMI) in *pks26* revealed a reduced proportion of spore cells in the fruiting body after chimeric development. Therefore, the behavior during chimeric multicellular development of different *pks26* mutants was examined in the cheating assay. Surprisingly, the influence of GFP exceeded the observed influence of *pks26* on the cooperation behavior. Based on the data collected here, the published loser phenotype of the *pks26* REMI mutant could not be confirmed. During clonal multicellular development, all *pks26* mutants behaved like their parentel strain and did not show any abnormalities in different fitness tests.

## Literaturverzeichnis

- Abe H., Uchiyama M., Tanaka Y., Saitô H.** (1976). Structure of discadenine, a spore germination inhibitor from the cellular slime mold, dictyostelium discoideum. *Tetrahedron Lett*, 17(42):3807–3810.
- Adl S. M., Simpson A. G. B., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Gall L. Le, Lynn D. H., McManus H., Mitchell E. A. D., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C. L., Smirnov A., Spiegel F. W.** (2012). The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 59(5):429–493.
- Adnan M., Zheng W., Islam W., Arif M., Abubakar Y. S., Wang Z., Lu G.** (2018). Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. *Int J Mol Sci*, 19(1):1–23.
- Akabane K., Saito T.** (2010). Expression profile of Polyketide Synthase genes in Dictyostelium discoideum. Annual International Dictyostelium Meeting Dicty 2010 - Programme and Abstract Book. 82.
- Albright J. C., Henke M. T., Soukup A. A., McClure R. A., Thomson R. J., Keller N. P., Kelleher N. L.** (2015). Large-Scale Metabolomics Reveals a Complex Response of *Aspergillus nidulans* to Epigenetic Perturbation. *ACS Chem Biol*, 10(6):1535–1541.
- Almeida E., Kaur N., Jennings L., Carrillo Rincón A. F., Jackson S., Thomas O., Dobson A.** (2019). Genome Mining Coupled with OSMAC-Based Cultivation Reveal Differential Production of Surugamide A by the Marine Sponge Isolate *Streptomyces* sp. SM17 When Compared to Its Terrestrial Relative *S. albidoflavus* J1074. *Microorganisms*, 7(394):1–19.
- Alves M. A. P. M. S., Silva S. C., Silva S. Y. S., Pereira J. B., Marinho P. S. B., Kelly das Graças F. D., da Mota S. A. P., Amaral J. C., da Silva M. F. G. F., Oliveira M. N.** (2020). Biosorption potential of the *Aspergillus* sp. And insights into secondary metabolism in the presence of copper and lead. *J Braz Chem Soc*, 31(3):574–579.
- Anjard C., Su Y., Loomis W. F.** (2011). The polyketide MPBD initiates the SDF-1 signaling cascade that coordinates terminal differentiation in dictyostelium. *Eukaryot Cell*, 10(7):956–963.
- Annesley S. J., Fisher P. R.** (2009). Dictyostelium discoideum—a model for many reasons. *Mol Cell Biochem*, 329(1–2):73–91.
- Ansari A. M., Ahmed A. K., Matsangos A. E., Lay F., Born L. J., Marti G., Harmon J. W., Sun Z.** (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev Rep*, 12(5):553–559.
- Araki T., Saito T.** (2019). Small molecules and cell differentiation in Dictyostelium discoideum. *Int J Dev Biol*, 63(8–9–10):429–438.
- Araki T., Nakao H., Takeuchi I., Maeda Y.** (1994). Cell-Cycle-Dependent Sorting in the Development of Dictyostelium Cells. *Dev Biol*, 162(1):221–228.
- de Assis L. J., Silva L. P., Bayram O., Dowling P., Kniemeyer O., Krüger T., Brakhage A. A., Chen Y., Dong L., Tan K., Wong K. H., Ries L. N. A., Goldman G. H.** (2021). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi Is Regulated by Phosphorylation of the Transcription Factor CreA. *mBio*, 12(1):e03146-20.

- Aubry L., Firtel R.** (1999). Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:469–517.
- Austin M. B., Saito T., Bowman M. E., Haydock S., Kato A., Moore B. S., Kay R. R., Noel J. P.** (2006). Biosynthesis of *Dictyostelium discoideum* differentiation-inducing factor by a hybrid type I fatty acid-type III polyketide synthase. *Nat Chem Biol*, 2(9):494–502.
- Azhar M., Kennady P. K., Pande G., Espiritu M., Holloman W., Brazill D., Gomer R. H., Nanjundiah V.** (2001). Cell cycle phase, cellular Ca<sup>2+</sup> and development in *Dictyostelium discoideum*. *Int J Dev Biol*, 45(2):405–414.
- Bailey A. M., Cox R. J., Harley K., Lazarus C. M., Simpson T. J., Skellam E.** (2007). Characterisation of 3-methylorcinolaldehyde synthase (MOS) in *Acremonium strictum*: first observation of a reductive release mechanism during polyketide biosynthesis. *Chem Commun*, (39):4053.
- Baldauf S. L., Doolittle W. F.** (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22):12007–12012.
- Beld J., Sonnenschein E. C., Vickery C. R., Noel J. P., Burkart M. D.** (2014). The phosphopantetheinyl transferases: Catalysis of a post-translational modification crucial for life. *Nat Prod Rep*, 31(1):61–108.
- Benabentos R., Hirose S., Sugang R., Curk T., Katoh M., Ostrowski E. A., Strassmann J. E., Queller D. C., Zupan B., Shaulsky G., Kuspa A.** (2009). Polymorphic Members of the lag Gene Family Mediate Kin Discrimination in *Dictyostelium*. *Curr Biol*, 19(7):567–572.
- Bentley R., Bennett J. W.** (1999). Constructing polyketides: From collie to combinatorial biosynthesis. *Annu Rev Microbiol*, 53(1):411–446.
- van den Berg R. A., Hoefsloot H. C. J., Westerhuis J. A., Smilde A. K., van der Werf M. J.** (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1):142.
- Biggins J. B., Ternei M. A., Brady S. F.** (2012). Malleilactone, a polyketide synthase-derived virulence factor encoded by the cryptic secondary metabolome of *Burkholderia pseudomallei* group pathogens. *J Am Chem Soc*, 134(32):13192–13195.
- Birch A., Massy-Westropp R., Moye C.** (1955). Studies in relation to biosynthesis. VII. 2-Hydroxy-6-methylbenzoic acid in *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Aust J Chem*, 8(4):539–544.
- Birch A. J., Donovan F. W.** (1953). Studies in relation to biosynthesis: I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol. *Aust J Chem*, 6(4):360–368.
- Blaauw M., Linskens M. H. K., Van Haastert P. J. M.** (2000). Efficient control of gene expression by a tetracycline-dependent transactivator in single *Dictyostelium discoideum* cells. *Gene*, 252(1–2):71–82.
- Bloomfield G., Tanaka Y., Skelton J., Ivens A., Kay R. R.** (2008). Widespread duplications in the genomes of laboratory stocks of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Biol*, 9(4):R75.
- Blusch J., Morandini P., Nellen W.** (1992). Transcriptional regulation by folate: inducible gene expression in *Dictyostelium* transformants during growth and early development. *Nucleic Acids Res*, 20(23):6235–6238.



- Bode H. B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A.** (2002). Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7):619–627.
- Bonner J. T.** (2009). First signals: The evolution of multicellular development. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Brakhage A. A., Schroeckh V.** (2011). Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol*, 48(1):15–22.
- Brenton A. G., Godfrey A. R.** (2010). Accurate mass measurement: Terminology and treatment of data. *J Am Soc Mass Spectrom*, 21(11):1821–1835.
- Bro R., Smilde A. K.** (2014). Principal component analysis. *Anal Methods*, 6(9):2812–2831.
- Brock D. A., Gomer R. H.** (1999). A cell-counting factor regulating structure size in Dictyostelium. *Genes Dev*, 13(15):1960–1969.
- Brzonkalik K., Hümmer D., Sylatk C., Neumann A.** (2012). Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB Express*, 2(1):28.
- Buss L. W.** (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(17):5337–5341.
- Buttery N. J., Rozen D. E., Wolf J. B., Thompson C. R. L.** (2009). Quantification of Social Behavior in *D. discoideum* Reveals Complex Fixed and Facultative Strategies. *Curr Biol*, 19(16):1373–1377.
- Buttery N. J., Smith J., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2013). Measuring Cheating, Fitness, and Segregation in *Dictyostelium discoideum*. In: Eichinger L, Rivero F, Hrsg. *Dictyostelium discoideum* Protocols. Methods in Molecular Biology. 231–248, Totowa, NJ.: Humana Press;
- Cai H., Katoh-Kurasawa M., Muramoto T., Santhanam B., Long Y., Li L., Ueda M., Iglesias P. A., Shaulsky G., Devreotes P. N.** (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of a GATA transcription factor functions as a development timer. *Science*, 343(6177):1249531.
- Cappuccinelli P., Ashworth J. M., Hrsg.** (1977). Development and differentiation in the cellular slime moulds. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Castillo D. I., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2011). Cell condition, competition, and chimerism in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Ethol Ecol Evol*, 23(3):262–273.
- Cavalier-Smith T., Fiore-Donno A. M., Chao E., Kudryavtsev A., Berney C., Snell E. A., Lewis R.** (2015). Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol*, 83:293–304.
- Cavender J. C.** (1973). Geographical Distribution of Acrasieae. *Mycologia*, 65(5):1044–1054.
- Chen H., Du L.** (2016). Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(2):541–557.

- Chen X., Köllner T. G., Jia Q., Norris A., Santhanam B., Rabe P., Dickschat J. S., Shaulsky G., Gershenzon J., Chen F.** (2016). Terpene synthase genes in eukaryotes beyond plants and fungi: Occurrence in social amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(43):12132–12137.
- Chen X., Luck K., Rabe P., Dinh C. Q., Shaulsky G., Nelson D. R., Gershenzon J., Dickschat J. S., Köllner T. G., Chen F.** (2019). A terpene synthase-cytochrome P450 cluster in *Dictyostelium discoideum* produces a novel trisnorsesquiterpene. *Elife*, 8:e44352.
- Chiang Y. M., Szewczyk E., Davidson A. D., Keller N., Oakley B. R., Wang C. C. C.** (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*, 131(8):2965–2970.
- Clarke M., Gomer R. H.** (1995). PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia*, 51(12):1124–1134.
- Clarke M., Kayman S. C., Riley K.** (1987). Density-dependent induction of discoidin-I synthesis in exponentially growing cells of *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation*, 34(2):79–87.
- Collie J. N.** (1907). Derivatives of the multiple keten group. *J Chem Soc*, 91(0):1806–1813.
- Commisso M., Anesi A., Dal Santo S., Guzzo F.** (2017). Performance comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization in untargeted and targeted liquid chromatography/mass spectrometry based metabolomics analysis of grapeberry metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 31(3):292–300.
- Cortina N. S., Krug D., Plaza A., Revermann O., Müller R.** (2012). Myxoprincomide: A natural product from *myxococcus xanthus* discovered by comprehensive analysis of the secondary metabolome. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(3):811–816.
- Cosson P., Soldati T.** (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 11(3):271–276.
- Cox R. J.** (2007). Polyketides, proteins and genes in fungi: Programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org Biomol Chem*, 5(13):2010–2026.
- Dammann H., Traincard F., Anjard C., Van Bemmelen M. X. P., Reymond C., Véron M.** (1998). Functional analysis of the catalytic subunit of *Dictyostelium* PKA in vivo. *Mech Dev*, 72(1–2):149–157.
- Dao D. N., Kessin R. H., Ennis H. L.** (2000). Developmental cheating and the evolutionary biology of *Dictyostelium* and *Myxococcus*. *Microbiology*, 146(7):1505–1512.
- Deery W. J., Gomer R. H.** (1999). A putative receptor mediating cell-density sensing in *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 274(48):34476–34482.
- Derewacz D. K., Covington B. C., McLean J. A., Bachmann B. O.** (2015). Mapping Microbial Response Metabolomes for Induced Natural Product Discovery. *ACS Chem Biol*, 10(9):1998–2006.
- Du Q., Kawabe Y., Schilde C., Chen Z. H., Schaap P.** (2015). The Evolution of Aggregative Multicellularity and Cell-Cell Communication in the *Dictyostelia*. *J Mol Biol*, 427(23):3722–3733.

- Duca R.-C., Salquebre G., Hardy E., Appenzeller B. M. R.** (2014). Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis. *J Chromatogr B*, 955–956(1):98–107.
- Dührkop K., Fleischauer M., Ludwig M., Aksenov A. A., Melnik A. V., Meusel M., Dorrestein P. C., Rousu J., Böcker S.** (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat Methods*, 16(4):299–302.
- Dührkop K., Nothias L. F., Fleischauer M., Reher R., Ludwig M., Hoffmann M. A., Petras D., Gerwick W. H., Rousu J., Dorrestein P. C., Böcker S.** (2021). Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nat Biotechnol*, 39(4):462–471.
- Durston A. J.** (1974). Pacemaker activity during aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*, 37(2):225–235.
- Eichinger I., Pachebat J. A., Glöckner G., Rajandream M. A., Sugang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Kuspa A., et al.** (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435(7038):43–57.
- Eichinger L., Rivero F.** (2006). *Dictyostelium discoideum* protocols I.
- Eichinger L., Rivero F.** (2013). *Dictyostelium discoideum* protocols II. (L Eichinger und F Rivero, Hrsg). zweiter 2. London: Humana Press.
- Ennis H. L., Dao D. N., Pukatzi S. U., Kessin R. H.** (2000). *Dictyostelium* amoebae lacking an F-box protein form spores rather than stalk in chimeras with wild type. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3292–3297.
- Ennis H. L., Dao D. N., Wu M. Y., Kessin R. H.** (2003). Mutation of the *Dictyostelium* fbxA Gene Affects Cell-Fate Decisions and Spatial Patterning. *Protist*, 154(3–4):419–429.
- Escalante R., Vicente J. J.** (2000). *Dictyostelium discoideum*: A model system for differentiation and patterning. *Int J Dev Biol*, 44(8):819–835.
- Failla L. J., Niehaus W. G.** (1986). Cadmium ion stimulation of growth and versicolorin synthesis in a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Exp Mycol*, 10(2):144–149.
- Faix J., Kreppel L., Shaulsky G., Schleicher M., Kimmel A. R.** (2004). A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res*, 32(19):e143.
- Faix J., Linkner J., Nordholz B., Platt J. L., Liao X.-H., Kimmel A. R.** (2013). The Application of the Cre-loxP System for Generating Multiple Knock-out and Knock-in Targeted Loci. In: Eichinger L, Rivero F, Hrsg. *Dictyostelium discoideum* Protocols. Methods in Molecular Biology. 249–267, Totowa, NJ.: Humana Press;
- Fey P., Kowal A. S., Gaudet P., Pilcher K. E., Chisholm R. L.** (2007). Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nat Protoc*, 2(6):1307–1316.
- Filosa M. F.** (1962). Heterocytosis in Cellular Slime Molds. *Am Nat*, 96(887):79–91.
- Firn R. D., Jones C. G.** (2000). The evolution of secondary metabolism - A unifying model. *Mol Microbiol*, 37(5):989–994.

- Fischbach M. A., Walsh C. T.** (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms. *Chem Rev*, 106(8):3468–3496.
- Fortunato A., Strassmann J. E., Santorelli L., Queller D. C.** (2003). Co-occurrence in nature of different clones of the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*. *Mol Ecol*, 12(4):1031–1038.
- Foster K. R., Fortunato A., Strassmann J. E., Queller D. C.** (2002). The costs and benefits of being a chimera. *Proc R Soc B Biol Sci*, 269(1507):2357–2362.
- Foster K. R., Shaulsky G., Strassmann J. E., Queller D. C., Thompson C. R. L.** (2004). Pleiotropy as a mechanism to stabilize cooperation. *Nature*, 431(7009):693–696.
- Franke J., Kessin R. H.** (1981). The cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein of *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 256(14):7628–7637.
- Frankel S., Condeelis J., Leinwand L.** (1990). Expression of actin in *Escherichia coli*. Aggregation, solubilization, and functional analysis. *J Biol Chem*, 265(29):17980–17987.
- Galvin N. J., Stockhausen D., Meyers Hutchins B. L., Frazier W. A.** (1984). Association of the cyclic AMP chemotaxis receptor with the detergent-insoluble cytoskeleton of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol*, 98(2):584–595.
- Gao Y., Zhao Y., He X., Deng Z., Jiang M.** (2021). Challenges of functional expression of complex polyketide biosynthetic gene clusters. *Curr Opin Biotechnol*, 69:103–111.
- Garcia G. L., Parent C. A.** (2008). Signal relay during chemotaxis. *J Microsc*, 231(3):529–534.
- Gerisch G., Fromm H., Huesgen A., Wick U.** (1975). Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating *Dictyostelium* cells. *Nature*, 255(5509):547–549.
- Ghosh R., Chhabra A., Phatale P. A., Samrat S. K., Sharma J., Gosain A., Mohanty D., Saran S., Gokhale R. S.** (2008). Dissecting the functional role of polyketide synthases in *Dictyostelium discoideum*: Biosynthesis of the differentiation regulating factor 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol. *J Biol Chem*, 283(17):11348–11354.
- Gilbert O. M., Foster K. R., Mehdiabadi N. J., Strassmann J. E., Queller D. C.** (2007). High relatedness maintains multicellular cooperation in a social amoeba by controlling cheater mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(21):8913–8917.
- Glöckner G., Noegel A. A.** (2013). Comparative genomics in the Amoebozoa clade. *Biol Rev*, 88(1):215–225.
- Goidl E. A., Chassy B. M., Love L. L., Krichevsky M. I.** (1972). Inhibition of aggregation and differentiation of *Dictyostelium discoideum* by antibodies against adenosine 3':5'-cyclic monophosphate diesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(5):1128–1130.
- Goldbeter A.** (1975). Mechanism for oscillatory synthesis of cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 253(5492):540–542.
- Goldbeter A.** (2006). Oscillations and waves of cyclic AMP in *Dictyostelium*: A prototype for spatio-temporal organization and pulsatile intercellular communication. *Bull Math Biol*, 68(5):1095–1109.

- Gomer R. H., Firtel R. A.** (1987). Cell-autonomous determination of cell-type choice in Dictyostelium development by cell-cycle phase. *Science*, 237(4816):758–762.
- Gomer R. H., Yuen I. S., Firtel R. A.** (1991). A secreted  $80 \times 10^3$  Mr protein mediates sensing of cell density and the onset of development in Dictyostelium. *Development*, 112(1):269–278.
- Görke B., Stülke J.** (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*, 6(8):613–624.
- Gossen M., Bujard H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12):5547–5551.
- Gowda H., Ivanisevic J., Johnson C. H., Kurczyk M. E., Benton H. P., Rinehart D., Nguyen T., Ray J., Kuehl J., Arevalo B., Westenskow P. D., Wang J., Arkin A. P., Deutschbauer A. M., Patti G. J., Siuzdak G.** (2014). Interactive XCMS online: Simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. *Anal Chem*, 86(14):6931–6939.
- Gregor T., Fujimoto K., Masaki N., Sawai S.** (2010). The onset of collective behavior in social amoebae. *Science*, 328(5981):1021–1025.
- de Gunzburg J., Part D., Guiso N., Veron M.** (1984). An unusual adenosine cyclic 3',5'-phosphate-dependent protein kinase from Dictyostelium discoideum. *Biochemistry*, 23(17):3805–3812.
- Han S. I., Friehs K., Flaschel E.** (2004). Improvement of a synthetic medium for Dictyostelium discoideum. *Process Biochem*, 39(8):925–930.
- Hänsel R., Sticher O.** (2010). Pharmakognosie und Phytopharmazie. 9. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Hashimura H., Morimoto Y. V., Yasui M., Ueda M.** (2019). Collective cell migration of Dictyostelium without cAMP oscillations at multicellular stages. *Commun Biol*, 2(1):34.
- Heath R. J., Rock C. O.** (2002). The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep*, 19(5):581–596.
- Heidel A. J., Lawal H. M., Felder M., Schilde C., Helps N. R., Tunggal B., Rivero F., John U., Schleicher M., Eichinger L., Platzer M., Noegel A. A., Schaap P., Glöckner G.** (2011). Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res*, 21(11):1882–1891.
- Heigwer F., Kerr G., Boutros M.** (2014). E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*, 11(2):122–123.
- Heng E., Tan L. L., Zhang M. M., Wong F. T.** (2021). CRISPR-Cas strategies for natural product discovery and engineering in actinomycetes. *Process Biochem*, 102:261–268.
- Herbst D. A., Townsend C. A., Maier T.** (2018). The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Nat Prod Rep*, 35(10):1046–1069.
- Hertweck C.** (2009a). Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nat Chem Biol*, 5(7):450–452.
- Hertweck C.** (2009b). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(26):4688–4716.

- Hertweck C., Luzhetskyy A., Rebets Y., Bechthold A.** (2007). Type II polyketide synthases: Gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep*, 24(1):162–190.
- Hirose S., Benabentos R., Ho H. I., Kuspa A., Shaulsky G.** (2011). Self-recognition in social amoebae is mediated by allelic pairs of tiger genes. *Science*, 333(6041):467–470.
- Ho H. I., Hirose S., Kuspa A., Shaulsky G.** (2013). Kin recognition protects cooperators against cheaters. *Curr Biol*, 23(16):1590–1595.
- Hong H., Sun Y., Zhou Y., Stephens E., Samborskyy M., Leadlay P. F.** (2016). Evidence for an iterative module in chain elongation on the azalomycin polyketide synthase. *Beilstein J Org Chem*, 12:2164–2172.
- Hopwood D. A.** (1997). Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev*, 97(7):2465–2497.
- Horai H., Arita M., Kanaya S., Nihei Y., Ikeda T., Suwa K., Ojima Y., Tanaka K., Tanaka S., Aoshima K., Oda Y., Kakazu Y., Kusano M., Tohge T., Matsuda F., Sawada Y., Hirai M. Y., Nakanishi H., Ikeda K., Akimoto N., Maoka T., Takahashi H., Ara T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Neumann S., Iida T., Tanaka K., Funatsu K., Matsuura F., Soga T., Taguchi R., Saito K., Nishioka T.** (2010). MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J Mass Spectrom*, 45(7):703–714.
- Houle J., Balthazar J., West C. M.** (1989). A glycosylation mutation affects cell fate in chimeras of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(10):3679–3683.
- Hug L. A., Baker B. J., Anantharaman K., Brown C. T., Probst A. J., Castelle C. J., Butterfield C. N., Herndorf A. W., Amano Y., Ise K., Suzuki Y., Dudek N., Relman D. A., Finstad K. M., Amundson R., Thomas B. C., Banfield J. F.** (2016). A new view of the tree of life. *Nat Microbiol*, 1(5):1–6.
- Hur M., Campbell A. A., Almeida-De-Macedo M., Li L., Ransom N., Jose A., Crispin M., Nikolau B. J., Wurtele E. S.** (2013). A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. *Nat Prod Rep*, 30(4):565–583.
- Insall R. H., Soede R. D., Schaap P., Devreotes P. N.** (1994). Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell*, 5(6):703–11.
- Iranfar N., Fuller D., Loomis W. F.** (2003). Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot Cell*, 2(4):664–670.
- Iriki H., Kawata T., Muramoto T.** (2019). Generation of deletions and precise point mutations in *Dictyostelium discoideum* using the CRISPR nickase. *PLoS One*, 14(10):e0224128.
- Jain R., Gomer R. H.** (1994). A developmentally regulated cell surface receptor for a density-sensing factor in *Dictyostelium*. *J Biol Chem*, 269(12):9128–9136.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096):816–821.

- Kamino K., Kondo Y., Nakajima A., Honda-Kitahara M., Kaneko K., Sawai S.** (2017). Fold-change detection and scale invariance of cell–cell signaling in social amoeba. *Proc Natl Acad Sci*, 114(21):E4149–E4157.
- Kay R. R.** (1998). The biosynthesis of differentiation-inducing factor, a chlorinated signal molecule regulating Dictyostelium development. *J Biol Chem*, 273(5):2669–2675.
- Kennedy J., Turner G.** (1996).  $\delta$ (L- $\alpha$ -Amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valin synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 253(1–2):189–197.
- Kesbeke F., Van Haastert P. J. M.** (1988). Reduced cAMP secretion in Dictyostelium discoideum mutant HB3. *Dev Biol*, 130(2):464–470.
- Kessin R. H.** (2001). Dictyostelium - Evolution, cell biology, and the development of multicellularity. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- Kessin R. H., Orlow S. J., Shapiro R. I., Franke J.** (1979). Binding of inhibitor alters kinetic and physical properties of extracellular cyclic AMP phosphodiesterase from Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(11):5450–5454.
- Khare A., Shaulsky G.** (2010). Cheating by exploitation of developmental prestalk patterning in Dictyostelium discoideum. *PLoS Genet*, 6(2):e1000854.
- Khare A., Santorelli L. A., Strassmann J. E., Queller D. C., Kuspa A., Shaulsky G.** (2009). Cheater-resistance is not futile. *Nature*, 461(7266):980–982.
- Kikuchi H., Saito Y., Komiya J., Takaya Y., Honma S., Nakahata N., Ito A., Oshima Y.** (2001). Furanodictine A and B: Amino sugar analogues produced by cellular slime mold Dictyostelium discoideum showing neuronal differentiation activity. *J Org Chem*, 66(21):6982–6987.
- Kikuchi H., Komiya J., Saito Y., Sekiya J. I., Honma S., Nakahata N., Oshima Y.** (2002). The isolation and synthesis of two novel N-acetyl glucosamine derivatives from Dictyostelium cellular slime molds which exhibit neurite outgrowth activity. *Tetrahedron Lett*, 43(8):1477–1480.
- Kikuchi H., Oshima Y., Ichimura A., Gokan N., Hasegawa A., Hosaka K., Kubohara Y.** (2006). Anti-leukemic activities of Dictyostelium secondary metabolites: A novel aromatic metabolite, 4-methyl-5-n-pentylbenzene-1,3-diol, isolated from Dictyostelium mucoroides suppresses cell growth in human leukemia K562 and HL-60 cells. *Life Sci*, 80(2):160–165.
- Kikuchi H., Matsuo Y., Katou Y., Kubohara Y., Oshima Y.** (2012). Isolation, synthesis, and biological activity of biphenyl and m-terphenyl-type compounds from Dictyostelium cellular slime molds. *Tetrahedron*, 68(43):8884–8889.
- Kim H., Kim J. S.** (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 15(5):321–334.
- Kind T., Fiehn O.** (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev*, 2(1):23–60.
- Klein C.** (1976). Adenylate cyclase activity in Dictyostelium discoideum amoebae and its changes during differentiation. *FEBS Lett*, 68(1):125–128.
- Klein R., Thiery R., Tatischeff I.** (1990). Dictyopterin, 6-(d-threo-1,2-dihydroxy-propyl)-pterin, a new natural isomer of l-biopterin: Isolation from vegetative cells of Dictyostelium discoideum and identification. *Eur J Biochem*, 187(3):665–669.

- Knecht D. A., Cohen S. M., Loomis W. F., Lodish H. F.** (1986). Developmental regulation of Dictyostelium discoideum actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. *Mol Cell Biol*, 6(11):3973–3983.
- Kohli R. M., Walsh C. T.** (2003). Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem Commun*, 3(3):297–307.
- Koller B., Schramm C., Siebert S., Triebel J., Deland E., Pfefferkorn A. M., Rickerts V., Thewes S.** (2016). Dictyostelium discoideum as a novel host system to study the interaction between phagocytes and yeasts. *Front Microbiol*, 7(OCT):1–18.
- Kondo A. P., Narita T. B., Murata C., Ogura T., Mikagi A., Usuki T., Saito T.** (2019). 4-Methyl-5-Pentylbenzene-1,3-Diol Regulates Chemotactic Cell Aggregation and Spore Maturation Via Different Mechanisms in Dictyostelium discoideum. *Curr Microbiol*, 76(3):376–381.
- Kondyli A., Schrader W.** (2020). Evaluation of the combination of different atmospheric pressure ionization sources for the analysis of extremely complex mixtures. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 34(8):e8676.
- Kriebel P. W., Majumdar R., Jenkins L. M., Senoo H., Wang W., Ammu S., Chen S., Narayan K., Iijima M., Parent C. A.** (2018). Extracellular vesicles direct migration by synthesizing and releasing chemotactic signals. *J Cell Biol*, 217(8):2891–2910.
- Kubohara Y., Kikuchi H.** (2018). Dictyostelium: An Important Source of Structural and Functional Diversity in Drug Discovery. *Cells*, 8(1):6.
- Kubohara Y., Okamoto K.** (1994). Specific induction by zinc of Dictyostelium stalk cell differentiation. *Exp Cell Res*, 214(1):367–372.
- Kuburich N. A., Adhikari N., Hadwiger J. A.** (2019). Multiple phosphorylation sites on the RegA phosphodiesterase regulate Dictyostelium development. *Cell Signal*, 57:65–75.
- Kuhlisch C., Pohnert G.** (2015). Metabolomics in chemical ecology. *Nat Prod Rep*, 32(7):937–955.
- Kuspa A., Loomis W. F.** (1992). Tagging developmental genes in Dictyostelium by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(18):8803–8807.
- Kuzdzal-Fick J. J., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2010). An invitation to die: Initiators of sociality in a social amoeba become selfish spores. *Biol Lett*, 6(6):800–802.
- Kyhse-Andersen J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10(3–4):203–209.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Larson M. H., Gilbert L. A., Wang X., Lim W. A., Weissman J. S., Qi L. S.** (2013). CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc*, 8(11):2180–2196.
- Laub M. T., Loomis W. F.** (1998). A molecular network that produces spontaneous oscillations in excitable cells of Dictyostelium. *Mol Biol Cell*, 9(12):3521–3532.



- Leach C. K., Ashworth J. M., Garrod D. R.** (1973). Cell sorting out during the differentiation of mixtures of metabolically distinct populations of *Dictyostelium discoideum*. *J Embryol Exp Morphol*, 29(3):647–661.
- Lee K. A. W.** (1991). Transcriptional regulation by cAMP. *Curr Opin Cell Biol*, 3(6):953–959.
- Leitão A. L., Costa M. C., Enguita F. J.** (2017). Applications of genome editing by programmable nucleases to the metabolic engineering of secondary metabolites. *J Biotechnol*, 241:50–60.
- Levi S., Polyakov M., Egelhoff T. T.** (2000). Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, 44(3):231–238.
- Levin S. R., Brock D. A., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2015). Concurrent coevolution of intra-organismal cheaters and resisters. *J Evol Biol*, 28(4):756–765.
- Lin Z., Nielsen J., Liu Z.** (2020). Bioprospecting Through Cloning of Whole Natural Product Biosynthetic Gene Clusters. *Front Bioeng Biotechnol*, 8:526.
- Liu H. S., Jan M. S., Chou C. K., Chen P. H., Ke N. J.** (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 260(3):712–717.
- Loomis W. F.** (2014). Cell signaling during development of *dictyostelium*. *Dev Biol*, 391(1):1–16.
- López-Ruiz R., Romero-González R., Garrido Frenich A.** (2019). Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. *Trends Analyt Chem*, 118:170–181.
- Lu Y. H., Wang Y., Wu X. X., Xu Z. N., He N., Chen J.** (2008). Influence of medium components on growth kinetics of *Dictyostelium discoideum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24(4):491–499.
- Luo Y., Huang H., Liang J., Wang M., Lu L., Shao Z., Cobb R. E., Zhao H.** (2013). Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. *Nat Commun*, 4(1):2894.
- Maeda M., Lu S., Shaulsky G., Miyazaki Y., Kuwayama H., Tanaka Y., Kuspa A., Loomis W. F.** (2004). Periodic Signaling Controlled by an Oscillatory Circuit That Includes Protein Kinases ERK2 and PKA. *Science*, 304(5672):875–878.
- Mahieu N. G., Genenbacher J. L., Patti G. J.** (2016). A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. *Curr Opin Chem Biol*, 30(December 2015):87–93.
- Maier T., Güell M., Serrano L.** (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*, 583(24):3966–3973.
- Mann S. K. O., Brown J. M., Briscoe C., Parent C., Pitt G., Devreotes P. N., Firtel R. A.** (1997). Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in *dictyostelium*. *Dev Biol*, 183(2):208–221.
- Martin A. C., Pawlus A. D., Jewett E. M., Wyse D. L., Angerhofer C. K., Hegeman A. D.** (2014). Evaluating solvent extraction systems using metabolomics approaches. *RSC Adv*, 4(50):26325–26334.

- Marwick J. D., Wright P. C., Burgess J. G.** (1999). Bioprocess Intensification for Production of Novel Marine Bacterial Antibiotics Through Bioreactor Operation and Design. *Mar Biotechnol*, 1(5):495–507.
- McMains V. C., Liao X. H., Kimmel A. R.** (2008). Oscillatory signaling and network responses during the development of *Dictyostelium discoideum*. *Ageing Res Rev*, 7(3):234–248.
- Miranda E. R., Nam E. A., Kuspa A., Shaulsky G.** (2015). The ABC transporter, AbcB3, mediates cAMP export in *D. discoideum* development. *Dev Biol*, 397(2):203–211.
- Mizutani A., Yanagisawa K.** (1990). Cell-division inhibitor produced by a killer strain of cellular slime mold *Polysphondylium pallidum* cellular slime mold/*Polysphondylium pallidum*/cell-division inhibitor/killer strain. *Dev Growth Differ*, 32(4):397–402.
- Mizutani A., Hagiwara H., Yanagisawa K.** (1990). A killer factor produced by the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Arch Microbiol*, 153(5):413–416.
- Montiel D., Kang H. S., Chang F. Y., Charlop-Powers Z., Brady S. F.** (2015). Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(29):8953–8958.
- Moore B. S., Hopke J. N.** (2001). Discovery of a New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *ChemBioChem*, 2(1):35–38.
- Morris H. R., Masento M. S., Taylor G. W., Jermyn K. A., Kay R. R.** (1988a). Structure elucidation of two differentiation inducing factors (DIF-2 and DIF-3) from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J*, 249(3):903–906.
- Morris H. R., Taylor G. W., Masento M. S., Jermyn K. A., Kay R. R.** (1988b). Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 328(6133):811–814.
- Müller R.** (2004). Don't Classify Polyketide Synthases. *Chem Biol*, 11(1):4–6.
- Muramoto T., Iriki H., Watanabe J., Kawata T.** (2019). Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *Dictyostelium*. *Cells*, 8(1):46.
- Murata C., Ogura T., Narita S., Kondo A. P., Iwasaki N., Saito T., Usuki T.** (2016). Synthesis and SAR of 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol (MPBD), produced by *Dictyostelium discoideum*. *Bioorganic Med Chem Lett*, 26(5):1428–1433.
- Nair D. R., Ghosh R., Manocha A., Mohanty D., Saran S., Gokhale R. S.** (2011). Two functionally distinctive phosphopantetheinyl transferases from amoeba *dictyostelium discoideum*. *PLoS One*, 6(9):1–10.
- Narita T. B., Koide K., Morita N., Saito T.** (2011). *Dictyostelium* hybrid polyketide synthase, SteelyA, produces 4-methyl-5-pentylbenzene-1,3-diol and induces spore maturation. *FEMS Microbiol Lett*, 319(1):82–87.
- Narita T. B., Chen Z. H., Schaap P., Saito T.** (2014). The hybrid type polyketide synthase SteelyA is required for cAMP signalling in early *dictyostelium* development. *PLoS One*, 9(9):1–9.
- Nellen W., Silan C., Firtel R. A.** (1984). DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion. *Mol Cell Biol*, 4(12):2890–2898.

- Neumann C. S., Walsh C. T., Kay R. R.** (2010). A flavin-dependent halogenase catalyzes the chlorination step in the biosynthesis of Dictyostelium differentiation-inducing factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13):5798–5803.
- Nizak C., Fitzhenry R. J., Kessin R. H.** (2007). Exploitation of other social amoebae by Dictyostelium caveatum. *PLoS One*, 2(2):e212.
- O'Day D. H.** (1979). Aggregation during sexual development in Dictyostelium discoideum. *Can J Microbiol*, 25(12):1416–1426.
- O'Day D. H., Keszei A.** (2012). Signalling and sex in the social amoebozoans. *Biol Rev*, 87(2):313–329.
- O'Day D. H., McConachie D. R., Rivera J.** (1987). Appearance and developmental kinetics of a unique cell type in Dictyostelium discoideum: Is it the gamete phase of sexual development? *J Exp Zool*, 242(2):153–159.
- Obata Y., Abe H., Tanaka Y., Yanagisawa K., Uchiyama M.** (1973). Isolation of a spore germination inhibitor from a cellular slime mold dictyostelium discoideum. *Agric Biol Chem*, 37(8):1989–1990.
- Okada H., Hirota Y., Moriyama R., Saga Y., Yanagisawa K.** (1986). Nuclear fusion in multinucleated giant cells during the sexual development of Dictyostelium discoideum. *Dev Biol*, 118(1):95–102.
- Omura S.** (1976). The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol Rev*, 40(3):681–697.
- Oohata A. A., Fukuzawa M., Hotta R., Nakagawa M., Niwa M., Takaya Y.** (2009). Differentiation inducing factors in Dictyostelium discoideum: A novel low molecular factor functions at an early stage(s) of differentiation. *Dev Growth Differ*, 51(9):743–752.
- Orlow S. J., Shapiro R. I., Franke J., Kessin R. H.** (1981). The extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase of Dictyostelium discoideum. Purification and characterization. *J Biol Chem*, 256(14):7620–7627.
- Ostrowski E. A., Katoh M., Shaulsky G., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2008). Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PLoS Biol*, 6(11):2376–2382.
- Osvik R. D., Ingebrigtsen R. A., Norrbin M. F., Andersen J. H., Eilertsen H. C., Hansen E. H.** (2021). Adding Zooplankton to the OSMAC Toolkit: Effect of Grazing Stress on the Metabolic Profile and Bioactivity of a Diatom. *Mar Drugs*, 19(2):87.
- Pan R., Bai X., Chen J., Zhang H., Wang H.** (2019). Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Front Microbiol*, 10(FEB):1–20.
- Pandith S. A., Ramazan S., Khan M. I., Reshi Z. A., Shah M. A.** (2020). Chalcone synthases (CHSs): the symbolic type III polyketide synthases. *Planta*, 251(1):15.
- Paranagama P. A., Wijeratne E. M. K., Gunatilaka A. A. L.** (2007). Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: Effect of culture conditions on metabolite production by Paraphaeosphaeria quadrisepata and Chaetomium chiversii. *J Nat Prod*, 70(12):1939–1945.

- Parikh A., Miranda E. R., Katoh-Kurasawa M., Fuller D., Rot G., Zagar L., Curk T., Sucgang R., Chen R., Zupan B., Loomis W. F., Kuspa A., Shaulsky G.** (2010). Conserved developmental transcriptomes in evolutionarily divergent species. *Genome Biol*, 11(3):R35.
- Park J., Bae S., Kim J. S.** (2015). Cas-Designer: A web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*, 31(24):4014–4016.
- Parkinson K., Buttery N. J., Wolf J. B., Thompson C. R. L.** (2011). A Simple Mechanism for Complex Social Behavior. *PLoS Biol*, 9(3):e1001039.
- Patterson D. J.** (1999). The Diversity of Eukaryotes. *Am Nat*, 154(S4):S96–S124.
- Perez de Souza L., Alseekh S., Scossa F., Fernie A. R.** (2021). Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nat Methods*, 18(7):733–746.
- Pergolizzi B., Bozzaro S., Bracco E.** (2019). Dictyostelium as model for studying ubiquitination and deubiquitination. *Int J Dev Biol*, 63(9–10):529–539.
- Pezzatti J., Boccard J., Codesido S., Gagnebin Y., Joshi A., Picard D., González-Ruiz V., Rudaz S.** (2020). Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. *Anal Chim Acta*, 1105:28–44.
- Pfaffl M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):E45.
- Pfeifer V., Nicholson G. J., Ries J., Recktenwald J., Schefer A. B., Shawky R. M., Schröder J., Wohlleben W., Pelzer S.** (2001). A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis. The biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Biol Chem*, 276(42):38370–38377.
- Ran F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F.** (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11):2281–2308.
- Raper K. B.** (1935). Dictyostelium discoideum, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agric Res*, 50(2):135–147.
- Raper K. B.** (1940). Pseudoplasmodium formation and organisation in Dictyostelium discoideum. *J Elisha Mitchell Sci Soc*, 56(2):241–282.
- Raper K. B.** (1984). The Dictyostelids. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Raper K. B., Fennell D. I.** (1952). Stalk Formation in Dictyostelium. *Bull Torrey Bot Club*, 79(1):25.
- Raper K. B., Smith N. R.** (1939). The Growth of Dictyostelium discoideum upon Pathogenic Bacteria. *J Bacteriol*, 38(4):431–445.
- Rapley R., Williams I. J.** (2002). Southern blotting of agarose gels by capillary transfer. *Methods Mol Biol*, 187:23–27.
- Reymond C. D., Schaap P., Véron M., Williams J. G.** (1995). Dual role of cAMP during Dictyostelium development. *Experientia*, 51(12):1166–1174.
- Rix U., Fischer C., Remsing L. L., Rohr J.** (2002). Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep*, 19(5):542–580.
- Robinson R.** (1955). The Structural Relations of Natural Products. Oxford, UK: Clarendon Press.

- Romeralo M., Cavender J. C., Landolt J. C., Stephenson S. L., Baldauf S. L.** (2011). An expanded phylogeny of social amoebas (Dictyostelia) shows increasing diversity and new morphological patterns. *BMC Evol Biol*, 11(1):84.
- Romeralo M., Skiba A., Gonzalez-Voyer A., Schilde C., Lawal H., Kedziora S., Cavender J. C., Glöckner G., Urushihara H., Schaap P.** (2013). Analysis of phenotypic evolution in Dictyostelia highlights developmental plasticity as a likely consequence of colonial multicellularity. *Proc R Soc B Biol Sci*, 280(1764):20130976.
- Rosengarten R. D., Santhanam B., Fuller D., Katoh-Kurasawa M., Loomis W. F., Zupan B., Shaulsky G.** (2015). Leaps and lulls in the developmental transcriptome of Dictyostelium discoideum. *BMC Genomics*, 16(1):294.
- Rossier C., Franke J. ob, Mullens I. A., Kelly K. J., Kessin R. H.** (1983). Detection and Regulation of the mRNA for the Inhibitor of Extracellular cAMP Phosphodiesterase of Dictyostellum discoideum. *Eur J Biochem*, 133(2):383–391.
- Roux I., Woodcraft C., Hu J., Wolters R., Gilchrist C. L. M., Chooi Y.-H.** (2020). CRISPR-Mediated Activation of Biosynthetic Gene Clusters for Bioactive Molecule Discovery in Filamentous Fungi. *ACS Synth Biol*, 9(7):1843–1854.
- Ruiz B., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Snchez M., Rocha D., Snchez B., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Langley E.** (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit Rev Microbiol*, 36(2):146–167.
- Ruttkies C., Schymanski E. L., Wolf S., Hollender J., Neumann S.** (2016). MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J Cheminform*, 8(1):1–16.
- Saga Y., Yanagisawa K.** (1983). Macrocyst development in Dictyostelium discoideum. III. Cell-fusion inducing factor secreted by giant cells. *J Cell Sci*, Vol. 62(JUL):237–248.
- Saito T., Taylor G. W., Yang J. C., Neuhaus D., Stetsenko D., Kato A., Kay R. R.** (2006). Identification of new differentiation inducing factors from Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1760(5):754–761.
- Saito T., Kato A., Kay R. R.** (2008). DIF-1 induces the basal disc of the Dictyostelium fruiting body. *Dev Biol*, 317(2):444–453.
- Sánchez S., Chávez A., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Valos M., Guzmán-Trampe S., Rodríguez-Sanoja R., Langley E., Ruiz B.** (2010). Carbon source regulation of antibiotic production. *J Antibiot (Tokyo)*, 63(8):442–459.
- Santorelli L. A.** (2007). Mechanisms of cheating behavior in the social amoeba Dictyostelium discoideum. Rice University.
- Santorelli L. A., Thompson C. R. L., Villegas E., Svetz J., Dinh C., Parikh A., Sucgang R., Kuspa A., Strassmann J. E., Queller D. C., Shaulsky G.** (2008). Facultative cheater mutants reveal the genetic complexity of cooperation in social amoebae. *Nature*, 451(7182):1107–1110.
- Santorelli L. A., Kuspa A., Shaulsky G., Queller D. C., Strassmann J. E.** (2013). A new social gene in Dictyostelium discoideum, chtB. *BMC Evol Biol*, 13(1):4.
- Sathe S., Nanjundiah V.** (2018). Complex interactions underpin social behaviour in Dictyostelium giganteum. *Behav Ecol Sociobiol*, 72(10):167.

- Scavello M., Petlick A. R., Ramesh R., Thompson V. F., Lotfi P., Charest P. G.** (2017). Protein kinase A regulates the Ras, Rap1 and TORC2 pathways in response to the chemoattractant cAMP in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, 130(9):1545–1558.
- Schaap P., Winckler T., Nelson M., Alvarez-Curto E., Elgie B., Hagiwara H., Cavender J., Milano-Curto A., Rozen D. E., Dingermann T., Mutzel R., Baldauf S. L.** (2006). Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science*, 314(5799):661–663.
- Schaf J., Damstra-Oddy J., Williams R. S. B.** (2019). *Dictyostelium discoideum* as a pharmacological model system to study the mechanisms of medicinal drugs and natural products. *Int J Dev Biol*, 63(9–10):541–550.
- Schiestl R. H., Petes T. D.** (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17):7585–7589.
- Schilde C., Skiba A., Schaap P.** (2014). Evolutionary reconstruction of pattern formation in 98 *Dictyostelium* species reveals that cell-type specialization by lateral inhibition is a derived trait. *Evodevo*, 5(1):34.
- Schilde C., Lawal H. M., Kin K., Shibano-Hayakawa I., Inouye K., Schaap P.** (2019). A well supported multi gene phylogeny of 52 dictyostelia. *Mol Phylogenet Evol*, 134:66–73.
- Schmith A., Spaller T., Gaube F., Fransson Å., Boesler B., Ojha S., Nellen W., Hammann C., Söderbom F., Winckler T.** (2015). A host factor supports retrotransposition of the TRE5-A population in *Dictyostelium* cells by suppressing an Argonaute protein. *Mob DNA*, 6(1):14.
- Sekine R., Kawata T., Muramoto T.** (2018). CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in *Dictyostelium*. *Sci Rep*, 8(1):1–11.
- Serafimidis I., Kay R. R.** (2005). New prestalk and prespore inducing signals in *Dictyostelium*. *Dev Biol*, 282(2):432–441.
- Seshime Y., Juvvadi P. R., Fujii I., Kitamoto K.** (2005). Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(1):253–260.
- Shaulsky G., Fuller D., Loomis W. F.** (1998). A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development*, 125(4):691–699.
- Sheikh S., Gloeckner G., Kuwayama H., Schaap P., Urushihara H., Baldauf S. L.** (2015). Root of Dictyostelia based on 213 universal proteins. *Mol Phylogenet Evol*, 92:53–62.
- Shen B.** (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol*, 7(2):285–295.
- Simpson-Lavy K., Kupiec M.** (2019). Carbon catabolite repression: not only for glucose. *Curr Genet*, 65(6):1321–1323.
- Singer G., Araki T., Weijer C. J.** (2019). Oscillatory cAMP cell-cell signalling persists during multicellular *Dictyostelium* development. *Commun Biol*, 2(1):1–12.
- Singh R., Schilde C., Schaap P.** (2016). A core phylogeny of Dictyostelia inferred from genomes representative of the eight major and minor taxonomic divisions of the group. *BMC Evol Biol*, 16(1):251.

- Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi C. K. M.** (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Front Microbiol*, 7(JAN):2087.
- Smith C. A., O'Maille G., Want E. J., Qin C., Trauger S. A., Brandon T. R., Custodio D. E., Abagyan R., Siuzdak G.** (2005). METLIN: A metabolite mass spectral database. *The Drug Monit*, 27(6):747–751.
- Stajdohar M., Jeran L., Kokosar J., Blenkus D., Janez T., Kuspa A., Shaulsky G., Zupan B.** (2015). dictyExpress: visual analytics of NGS gene expression in Dictyostelium.
- Stajdohar M., Rosengarten R. D., Kokosar J., Jeran L., Blenkus D., Shaulsky G., Zupan B.** (2017). dictyExpress: a web-based platform for sequence data management and analytics in Dictyostelium and beyond. *BMC Bioinformatics*, 18(1):291.
- Staunton J., Weissman K. J.** (2001). Polyketide biosynthesis: A millennium review. *Nat Prod Rep*, 18(4):380–416.
- Stephenson S. L., Landolt J. C.** (1992). Vertebrates as vectors of cellular slime moulds in temperate forests. *Mycol Res*, 96(8):670–672.
- Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A.** (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490):62–67.
- Strassmann J. E., Queller D. C.** (2011). Evolution of cooperation and control of cheating in a social microbe. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(SUPPL. 2):10855–10862.
- Strassmann J. E., Zhu Y., Queller D. C.** (2000). Altruism and social cheating in the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature*, 408(6815):965–967.
- Sucgang R., Weijer C. J., Siegert F., Franke J., Kessin R. H.** (1997). Null mutations of the Dictyostelium cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Dev Biol*, 192(1):181–192.
- Sussman M.** (1987). Cultivation and Synchronous Morphogenesis of Dictyostelium under Controlled Experimental Conditions. *Methods in Cell Biology*. 9–29, Academic Press;
- Sussman R., Sussman M.** (1967). Cultivation of Dictyostelium discoideum in axenic medium. *Biochem Biophys Res Commun*, 29(1):53–55.
- Suthers H. B.** (1985). Ground-feeding migratory songbirds as cellular slime mold distribution vectors. *Oecologia*, 65(4):526–530.
- Swaney K. F., Huang C. H., Devreotes P. N.** (2010). Eukaryotic chemotaxis: A network of signaling pathways controls motility, directional sensing, and polarity. *Annu Rev Biophys*, 39(1):265–289.
- Swanson A. R., Vadell E. M., Cavender J. C.** (1999). Global distribution of forest soil dictyostelids. *J Biogeogr*, 26(1):133–148.
- Swanson A. R., Spiegel F. W., Cavender J. C.** (2002). Taxonomy, slime molds, and the questions we ask. *Mycologia*, 94(6):968–979.
- Takaya Y., Kikuchi H., Terui Y., Komiya J., Furukawa K. I., Seya K., Motomura S., Ito A., Oshima Y.** (2000). Novel acyl  $\alpha$ -pyronoids, dictyopyrone A, B, and C, from Dictyostelium cellular slime molds. *J Org Chem*, 65(4):985–989.

- Takaya Y., Hotta R., Fujiwara K., Otani R., Uchiyama Y., Sakakibara M., Fukuda E., Niwa M., Inouye K., Oohata A. A.** (2014). Alkylbenzoquinone involved in development of cellular slime molds. *Org Lett*, 16(14):3660–3663.
- Tautenhahn R., Patti G. J., Rinehart D., Siuzdak G.** (2012). XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem*, 84(11):5035–5039.
- Thomason P. A., Brazill D. T., Cox E. C.** (2006). A series of Dictyostelium expression vectors for recombination cloning. *Plasmid*, 56(3):145–152.
- Thompson C. R. L., Kay R. R.** (2000a). Cell-fate choice in Dictyostelium: Intrinsic biases modulate sensitivity to DIF signaling. *Dev Biol*, 227(1):56–64.
- Thompson C. R. L., Kay R. R.** (2000b). The role of DIF-1 signaling in Dictyostelium development. *Mol Cell*, 6(6):1509–1514.
- Thompson C. R. L., Fu Q., Buhay C., Kay R. R., Gad S.** (2004). A bZIP/bRLZ transcription factor required for DIF signaling in Dictyostelium. *Development*, 131(3):513–523.
- Tong Y., Weber T., Lee S. Y.** (2019). CRISPR/Cas-based genome engineering in natural product discovery. *Nat Prod Rep*, 36(9):1262–1280.
- Town C. D., Gross J. D., Kay R. R.** (1976). Cell differentiation without morphogenesis in Dictyostelium discoideum. *Nature*, 262(5570):717–719.
- Tsunematsu Y.** (2021). Genomics-directed activation of cryptic natural product pathways deciphers codes for biosynthesis and molecular function. *J Nat Med*, 75(2):261–274.
- Tugizimana F., Steenkamp P. A., Piater L. A., Dubery I. A.** (2018). Mass spectrometry in untargeted liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics: Electrospray ionisation parameters and global coverage of the metabolome. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 32(2):121–132.
- Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M., Andres-Lacueva C.** (2013). Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: When less is more. *Anal Chem*, 85(1):341–348.
- Vaniya A., Fiehn O.** (2015). Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics. *Trends Analyt Chem*, 69:52–61.
- Veltman D. M., Akar G., Bosgraaf L., Van Haastert P. J. M.** (2009). A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid*, 61(2):110–118.
- Veron M., Mutzel R., Lacombe M. -L., Simon M. -N., Wallet V.** (1988). cAMP-dependent protein kinase from Dictyostelium discoideum. *Dev Genet*, 9(4–5):247–258.
- Wang Z., Cirino P. C.** (2016). New and improved tools and methods for enhanced biosynthesis of natural products in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, 42:159–168.
- Watts D. J., Ashworth J. M.** (1970). Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem J*, 119(2):171–174.
- Weissman K. J.** (2005). Polyketide Synthases: Mechanisms and Models. In: Wohlleben W, Spelling T, Müller-Tiermann B, Hrsg. Biocombinatorial Approaches for Drug Finding. 51. 51. 43–78, Springer Berlin Heidelberg;



- Wilkinson B., Foster G., Rudd B. A. M., Taylor N. L., Blackaby A. P., Sidebottom P. J., Cooper D. J., Dawson M. J., Buss A. D., Gaisser S., Böhm I. U., Rowe C. J., Cortés J., Leadlay P. F., Staunton J.** (2000). Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase. *Chem Biol*, 7(2):111–117.
- Windhof I. M., Dubin M. J., Nellen W.** (2013). Chromatin organisation of transgenes in *Dictyostelium*. *Pharmazie*, 68(7):595–600.
- Wold S., Esbensen K., Geladi P.** (1987). Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Syst*, 2(1–3):37–52.
- Wolfender J. L., Marti G., Thomas A., Bertrand S.** (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *J Chromatogr A*, 1382:136–164.
- You Y., Ramachandra S. G., Jin T.** (2020). A CRISPR-based method for testing the essentiality of a gene. *Sci Rep*, 10(1):14779.
- Zhang J. J., Tang X., Moore B. S.** (2019). Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products. *Nat Prod Rep*, 36(9):1313–1332.
- Zhang X., Zhuchenko O., Kuspa A., Soldati T.** (2016). Social amoebae trap and kill bacteria by casting DNA nets. *Nat Commun*, 7(1):10938.
- Zucko J., Skunca N., Curk T., Zupan B., Long P. F., Cullum J., Kessin R. H., Hranueli D.** (2007). Polyketide synthase genes and the natural products potential of *Dictyostelium discoideum*. *Bioinformatics*, 23(19):2543–2549.



## Anhang

### A - Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 13: Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
acaA-04	CATTCTAGAGGCGGTATTGGCAGTATCACC
acaA-09	GGAGAAAATGTCTGATTTTCGCTTTGGATG
bsr-08	CGCTACTTCTACTAATTCTAGATCTTGTTG
bsr-11	GGATCAATTTAACATTTCTCAACAAG
csaA-05	GAAAGCTGGTATCTCAAATGTTGTCAC
csaA-06	GGAATCTGGAGCACAACTATATCAGTAG
DDB_G0288443-01	GAACATTTCTCGAGAAATTTACTGCC
DDB_G0288443-02	GAATTGAAATATCTTTTAAGTTTGGAC
DDB_G0288443-03	CACCTTAAGCAAGCTGCAAACCTATCC
DDB_G0288443-04	GCAGCGACTCTAATGAATTGAATACC
pks1-1	CCTCAAAGATTGGGGTGGTGACAAAG
pks1-2	GAAGTTGCAACCATTTGATCACCACC
pks2-1	TTGTGCTCATATTTTCCTATGAAGATAC
pks2-2	CAGGGAAGGTAAATGGAGTACGAAC
pks3-1	GATGAATACCAAGTTGGAATACCTTC
pks3-2	GTTTTTGACCAACAACCTTCATTAAG
pks5-1	AATTTTGTGATTTTCGTCATCAATTG
pks5-2	CATTATTTGAAAAGTTTAATGGATTA
pks6-1	TTTTTAGATGGCAATGGTATTATC
pks6-2	CTATTTGAAGGTAGGTATTTATTTG
pks7-1	AATTTTGTATGGCTTCTTCTGCAA
pks7-2	GATTATTTTTAAATTTTGAGGGTTTG
pks8-1	AATTTTGTATGGCTTCTTCTGCAC
pks8-2	GAATATTTTTAAATTTTGATGATATT
pks9-1	TTTTTAGACGGTGGTGGTTCCAT
pks9-2	AGGTAGGTCTTTATTATTGTCATC
pks10-1	GGAAATATATGTTAATGATAATTTTGG
pks10-2	CATCTTCATTATTTTCAATAACTATTG
pks13-1	TGATATGGAAAGTTTAAATGTATCTC
pks13-2	TTGAATTTGTAATCCAATGTACCC
pks14-1	GGAGATTTAACTAAAAAGAAGTTTGG
pks14-2	TACTTTACTTTGCATATAACCTGTTGG
pks15-1	CCATCAACAATGATAAGAATTCCTCC
pks15-2	CCAATCATTAATTCATCTGTTTAC
pks16-1	CTGGTGGTGTGGTTTAGCAAC
pks16-2	CTTTCTAAATCGATTGTACTGTAAGT
pks17-1	CTGGTGGTGTGGTTTAGCAAG
pks17-2	CTATCTAAATCTATTGTATTGTAGCC
pks18-1	GAGTCAAAACAAGTAAATGTAGTTGG
pks18-2	GCGACCCATGTTATTGGTGAACAAAG
pks19-1	GGTCATGATTCTGATTTCTTCCAAC

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
pks19-2	CCATGACCCAAGTTATAAACACC
pks21-1	GGTCATGATTCTGATTTCTTCCAAT
pks21-2	CCATTACCCAAGTTATAAATATT
pks22-1	CATTTCTTGGTTTGAAGCATCAATC
pks22-2	ATCCACACAAATCATTGAAAAACC
pks23-1	CATTTCTTGGTTTGAAGCATCACAA
pks23-2	ATCCACACAAATCATTGAAAAACT
pks24-1	CAGTAGTTTCAGTATTAGGTTTCATTTG
pks24-2	GATGATTGATTGGTATCATTTTCCATTG
pks25-1	GTGAACTTGTTGAAACTGTACTTAATG
pks25-2	GAACAGTAATTAATGAATCAGCACC
pks26-1	GGCATCATCAGCAGCGGGTCTTATTGG
pks26-2	CTTTAACAGGATTTTCACCTTGCTTGG
pks26-3	GAGCTCACAATAAATTTTGGAAATTAGAGATGCAG
pks26-4	GGATCCCGAATTGAAATATCTTTTAAGTTTTGG
pks26-5	AAGCTTAACAAAGAAAACAAATAAAATGGAAAC
pks26-6	GAATTCCTTCAACTTCAATTGGATCACCAGTG
pks26-7	CAAGCTTAAATAAAATGGAAACAAATAATAAAGAATATTCAAG
pks26-8	CTTATTTTTTAGTAAATGAACCAACTTTTA
pks26-9	GAAGTAACACCGGATGCTGCTTCCATGTG
pks26-10	CACCAGCTATACATAAATTAGATTTCC
pks26-11	GATCGAATTTCTTCCACTCTTTCAATGG
pks26-12	CAAGCTTAAAATGGATTATAAAGATGATGATGATAAGGGTGACTA CAAGGACGATGACGATAAAGAAACAAATAATAAAGAATATTC
pks26-13	AAGCTTATTACCATTGAAAGAGTGGAAAGAAATTCG
pks26-14	AAGCTTTACAACCTTAATATTCCATTCATCTAATTTG
pks26-15	CTGCAGCAATTGATTCTCTAATTTCTGAACCATC
pks26-16	GGATCCGTTTATATTCTAATGATGAAATTGATGG
pks26-17	GTGGTGTTGGTAAAACACTACTGAAAGATG
pks26-18	CCTGAAAATCCATTATTAATAGGTTCCC
pks26-19	GATCTTGATAAATCACTCATTCCACTTG
pks26-20	GTATTTCATAAAAGTATCATTTTCACC
pks26-21	CTGGTATATTTTGCGCAATGTTAGGTTT
pks26-22	ACCCAATGTATCCATCGGTGGACCTTG
pks26-23	GTGGAATGAGTGATTTATCAAGATCAG
pks26-24	GAAGCCCCACCAATTGATCGAATACACC
pks27-1	TTCAAATCACTCAATTCAGAATATG
pks27-2	GTTGATCTGATCCTAGAACTGATGC
pks28-1	TTCAAATCACTCAATTCAGAATATT
pks28-2	GTTGATCTGAACCAAATATTGATGA
pks29-1	TATCAAATGATAAATTAAGTAATATTG
pks29-2	TTGAAGTTTTTAATAAAAAGTGATAC
pks30-1	TATGTCAAATGATAAATTAATAGTAA
pks30-2	TTGAACTTTTAATAAAAAGTGATAC
pks30-3	GAGCTCTTCAATCAAATCGATATTGAAGATTC
pks30-4	GGATCCGTTAATAGTTTTTCATGGTGAATCACC
pks30-5	AAGCTTGAAAAAAGAAAAATGGTACAAAATACAG
pks30-6	GAATTCGGATGAAAATGTATGACATCTACCTG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>
pks31-1	GAACTATGGTAATGTGGATATCGAAG
pks31-2	CAATTGAATGGTTTGAATATTTGATTA
pks32-1	GTAATATATCAAATGATAAATTAAGT
pks32-2	TTGAAACTTTTAAAAAAAGTGATAT
pks33-1	TATCAAATGATAAATTATATGGTAATT
pks33-2	GAAAATAGTTATTGGAATATTATATAAGG
pks34-1	GAACAAAGGATCACCAAATCAAAGA
pks34-2	TCGAAGATTTTATTTAAAAGTGATAT
pks37-1	GGCAACCTGTATGAAATTC AATTTTCG
pks37-2	CCAGGTGAAAAGGCCATAGCCATACC
pks38-1	AAATTAAATAGTAGTAATTC AAACAG
pks38-2	TTGAAGCTTTGATTTAAAAGTGATAT
pks39-1	CATATCAAATGATAAATTAAATAGTA
pks39-2	TTGAAGCTTTGATTTAAAAGTGATAA
pks40-1	GACAAAGTTACTAAATTC AAATTC AA
pks40-2	TTGCAGAACTTGTTTTACTTGTTAT
pks41-1	CAAGGTAAAATTAATTAATAAGCTTG
pks41-2	TTGCTGTACTTGTTTTACTTGAAAC
pks42-1	GGTGTAACATCAACTGGTTTCGTATC
pks42-2	CAATTTTGATGGCTCAATTGATAAAAAG
pks44-1	TTTTTAAACGGTCTAGGTAATGCCC
pks44-2	GATTGAATTAATTGATTAATTGTAAT
pks45-1	TATGTACATGGTCTAGGTAATATTT
pks45-2	GATTGAATTAATTGATTAATTGTAAC
RSP	CGGATAACAATTCACACAGG
Q-GAPDH-01	GGTTGTCCCAATTGGTATTAATGG
Q-GAPDH-02	CCGTGGGTTGAATCATATTTGAAC

## B - Sequenzierter Bereich der *pks26*-Genaktivierungsmutante

```

1 TTTTTTTTTT TTTTCTTAT TTCTTAAAC AAATAAATTA AATTAAATAA
51 AAAATAAAAA TCAGATCCAA GCTTAACAAA GAAAACAAAT AAAATGGAAA
101 CAAATAATAA TAAGAATATT CAAGAAGATA TTGCTATAAT TGGTTTTAGA
151 ATCCAGGAT GTCAAGATAA TACCCCATCA GAGTTGTGGA ATAATTTAAT
201 GAATAAATTT AGTGGTGTG GTAAACTAC TGAAAGATGG AGTGACAATT
251 ATCATTTATC TGGTGATATT AATAATGGAA ATTCCGGTTT ATTACCATTG
301 AAAGAGTGGA AGAAATTCGA TCCTGCTTTT TTTGGTATTA ATCCTACCAT
351 GGTTCACACA ATTGATCCAC AACAACGTAT TCTATTAAAG TGTACATGGG
401 AAGCATTGGA AGATGCTGGA ATTGATCCAA TTAAATTACG TGGTTCAAAT
451 ACTTCGATTT TCATTGGTTG TTCAACTGGT GATTATCTAG ACATGGTTAA
501 GAGTAACAAT GAAATCCAGA CAAATCTATT TGGTTCAGTT AATCATTCAAT
551 TATCTAATAG AATTTCTTAT TGTTTTGATT TCCATGGTGC TTCAATGACT
601 ATTGATTCTG CATGTTCTTC TTCATTAAAC ACAGTTTTAT TAGGCTGTCA
651 ATCAATTAAT CAAGGGAAAT CTAATTTATG TATAGCTGGT GGTGTAAATT
701 TTATTTTAGg taaataagaa taaaaaaaaa aaataaaaaa aaaaaaaaaa
751 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaatt attaacaat aatctathtt
801 attttathtt ttaataataa aaatagATAC CACTATTCCA ACTGCATTTT
851 CATTTTTAAA TATATTAAGT AAAAATGGAA AATGTATGAC ATATGATGAA
901 GGTGCTGATG GATTTGTAAG AGGAGAGGGA GCAGGTTTGG TTGTTTTAAA
951 GAGTTTAAAA GATGCAATTA AAGATGGAAA TAATATTTAT TGTATAATTA
1001 AAGGTGGAAA TACAAATGTT GATGGTAATG GAAATGCTGA TAAAGCAAAC
1051 TTCTTTCAAC CATCCAACA ATCGCAGTCA GATAATATTA AATTAGCATT
1101 GGAATCTATT AAAAAGAAAA GTATGCTTGA TATCGATATT GACTATGTTG
1151 AAACATCATG TACAGGTACA CCCACTGGTG ATCCAATTGA AGTTGAAGGT
1201 ATATCAAAGG TTTTTAAAGA AAATCATTCA CCTGAAAATC CATTATTAAT
1251 AGGTTCCCTT AAATCAAATA TTGGTCACAT GGAAGCAGCA TCCGGTGTTA
1301 CTTC

```

**Abbildung 37: Sequenzierter Bereich der *pks26*-Genaktivierungsmutante.** Dargestellt ist der sequenzierte Bereich des *pks26*-Locus der Genaktivierungsmutante Pks26-GA. blau: Aktin 15-Promotor; schwarz: Linkerregion; orange: rekombinierte *pks26*-Sequenz; grün unterlegt: authentische *pks26*-Sequenz; rot unterlegt: Punktmutation; A: Adenin; T: Thymin; G: Guanin; C: Cytosin; Kleinbuchstaben: Intronsequenz.

## C - PKS26-assoziierte features

**Tabelle 14: Liste der PKS26-assoziierten features.** Nach Analyse der Gesamtkulturextrakte von AX4, Pks26-GA, FLAG-Pks26-GA und Pks26-KO isolierte Kandidaten für das Biosyntheseprodukt von *pks26*. *Fold change* und *p*-Wert resultieren aus dem Vergleich AX4 und Pks26-GA.

m/z [M+H] <sup>+</sup>	p-Wert	fold change
229,5728	0,0334	1,51
264,1023	0,0041	1,69
264,6039	0,0079	1,68
374,0783	0,0025	3,08
379,1974	0,0054	201,90
405,0995	0,0377	2,06
430,3307	0,0167	8,48
470,8190	0,0191	107,86
493,3329	0,0059	30,04
505,2329	0,0284	5,20

<b>m/z [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>p-Wert</b>	<b>fold change</b>
520,8932	0,0114	4,36
535,8900	0,0041	6,85
541,2075	0,0087	25,92
545,3655	0,0112	1,52
556,4792	0,0056	7,18
556,8843	0,0122	25,09
557,2243	0,0233	1,78
573,2010	0,0069	1,58
574,2046	0,0320	1,75
594,8972	0,0026	13,67
600,4170	0,0004	8,02
603,9038	0,0065	10,43
630,5153	0,0088	2,39
651,4198	0,0362	3,69
654,5386	0,0397	224,80
661,4500	0,0026	1,67
672,5010	0,0090	53,48
698,5677	0,0403	30,29
705,4666	0,0166	16,49
718,5731	0,0307	3,90
746,5883	0,0058	125,04

## D - Hergestellte Plasmide

**Tabelle 15: Liste der hergestellten Plasmide.** Die Plasmid Nr. bezieht sich auf die Datenbank des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie.

<b>Plasmid Name</b>	<b>Plasmid Nr.</b>	<b>Inserts, Art der Klonierung</b>
pGEM7-GA	20601	als BamHI/BglII Fragment aus pDM326 (20582) in BamHI geschnittenen pGEM7zf(-) (11755) (BglII-Site wurde zerstört)
pGEM-pks26HR1	20618	PCR mit pks26-3 und pks26-4 an <i>D. discoideum</i> genomischer DNA und in pGEMT kloniert
pGEM-pks26HR2	20619	PCR mit pks26-5 und pks26-6 an <i>D. discoideum</i> genomischer DNA und in pGEMT kloniert
pGEM-pks30HR1	20620	PCR mit pks30-3 und pks30-4 an <i>D. discoideum</i> genomischer DNA und in pGEMT kloniert
pGEM-pks30HR2	20621	PCR mit pks30-5 und pks30-6 an <i>D. discoideum</i> genomischer DNA und in pGEMT kloniert
pGEM7-HR1_pks26GA	20631	als BamHIHF/SacI Fragment aus pGEM-pks26HR1 (20618) in BamHIHF/SacI geschnittenen pGEM7-GA (20601)

<b>Plasmid Name</b>	<b>Plasmid Nr.</b>	<b>Inserts, Art der Klonierung</b>
pGEM7-pks26GA_HR2	20632	als EcoRIHF/HindIII Fragment aus pGEM-pks26HR2 (20619) in EcoRIHF/HindIII geschnittenen pGEM7-GA (20601)
pCR8/GW/TOPO-pks26	20648	PCR mit Primern pks26-7 und pks26-8 an <i>D. discoideum</i> genomischer DNA; PCR-Produkt in pCR8/GW/TOPO ligiert
pGEM7-pks26GA	20649	als BamHIHF/SacI Fragment aus pGEM7-HR1_pks26GA (20631) in BamHIHF/SacI geschnittenen pGEM7-pks26GA_HR2 (20632)
pGEM-pks26HR2_neu	20676	PCR mit pks26-5 und pks26-6 an AX4 genomischer DNA und in pGEMT kloniert
pGEM7-pks26GA_neu	20677	als EcoRIHF/HindIII Fragment aus pGEM-pks26HR2_neu (20676) in EcoRIHF/HindIII geschnittenen pGEM7-HR1_pks26GA (20631)
pGEMT-FLAG-pks26HR2	20791	PCR mit pks26-12 und pks26-6 an 20676 in pGEMT kloniert
pGEM7-FLAG-pks26GA	20792	als EcoRIHF/HindIII Fragment aus pGEMT-FLAG-pks26HR2 (20791) in EcoRIHF/HindIII geschnittenen pGEM7-HR1_pks26GA (20631)
pGEMT-pks26KO-5'Arm	20794	PCR mit pks26-13 und pks26-14 an 20648 und in pGEMT kloniert
pGEMT-pks26KO-3'Arm	20795	PCR mit pks26-15 und pks26-16 an 20648 und in pGEMT kloniert
pLPBLP-pks26KO-5'Arm	20796	als HindIII Fragment aus pGEMT-pks26KO-5'Arm (20794) in HindIII geschnittenen pLPBLP (11916)
pLPBLP-pks26KO-3'Arm	20797	als BamHIHF/PstI Fragment aus pGEMT-pks26KO-3'Arm (20795) in BamHIHF/PstI geschnittenen pLPBLP (11916)
pLPBLP-pks26KO	20798	als BamHIHF/PstI Fragment aus pGEMT-pks26KO-3'Arm (20795) in BamHIHF/PstI geschnittenen pLPBLP-pks25KO-5'Arm (20796)



---

## Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Hillmann F., Novohradská S., Mattern D. J., **Forberger T.**, Heinekamp T., Westermann M., Winckler T., Brakhage A. A. (2015). Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. *Environ Microbiol*, 17(8):2858–2869.



## **Lebenslauf**



## Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Fakultät für Biowissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zu Polyketidsynthesen aus *Dictyostelium discoideum*“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend geholfen haben.

Mir ist die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 23. September 2019 bekannt.

Die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde

---

Tilman Forberger

Jena, den 12.09.2022



## Danksagung

Diese Dissertation wurde am Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Herr Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas sowie des Arbeits- und Forschungsplatzes. Insbesondere die jederzeit offene Tür, welche oft eine unkomplizierte Problemlösung ermöglichte, sowie die lehrreichen Gespräche von alltäglichen Laborproblemen bis zu den Tiefen der Dicty-Physiologie waren eine große Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pierre Stallforth und Herrn Prof. Dr. Ludwig Eichinger für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ohne die konstruktive und freundliche Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen wären wesentliche Teile dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Prof. Dr. Dirk Hoffmeister danke ich für die Möglichkeit zur HPLC-Analytik sowie die konstruktiven Diskurse. Ein großer Dank geht in diesem Zusammenhang an Markus Bohnert, Julia Pauly und Daniel Schwenk für die logistische und technische Unterstützung. Vielen Dank an Andrea Perner für die immer zeitnah aufgenommenen HRMS-Daten.

Prof. Dr. Oliver Kurzai und Antje Häder danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei den durchflusszytometrischen Messungen.

Einen besonderen Dank richte ich an Michael Deicke für die Unterstützung bei der UHPLC-Analytik, die motivierenden Diskussionen nach der oftmals ausufernden Datenauswertung sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Den lieben Kollegen am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie Angela, Anika, Bärbel, Daniel, Doreen, Eva, Friedemann, Heidi, Michael, Ralf, Robert, Sigrid, Sven, Thomas und Uwe möchte ich für die immer wunderbar positive Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung bei den Fragen des täglichen Laborwahnsinns danken. Ihr habt mich vor so manchem Forschungsfrust bewahrt. Ob Schwimmen, Radfahren, Laufen oder der fehlende Kniff bei einer nicht gelingenden Klonierung - Team Semmel ist da! Insbesondere Ralf Carl danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung, ohne die ich es nicht bis hierher geschafft hätte. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Ein letzter und unendlich großer Dank gilt Sandy und meinen Kindern Emil und Albert. Ihr habt mich in allen Höhen und Tiefen geduldig unterstützt und mir auch während der langen Schreibphase den nötigen Raum gegeben. Danke!