



Technische Universität München  
Fakultät für Chemie



Biosystemchemie

## **Untersuchung oxidativer Funktionalisierungsreaktionen in der Biosynthese mikrobieller Peptidnaturstoffe**

René Richarz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Tobias A.M. Gulder

2. Prof. Dr. Stephan A. Sieber

Die Dissertation wurde am 06.12.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 08.02.2018 angenommen.



*Für meine Eltern*



“Seit meiner Kindheit träume ich davon,  
den Nordpol zu erreichen,  
nun stehe ich auf dem Südpol.“

Roald Amundsen (1872 - 1928)



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder für das spannende und anspruchsvolle Thema meiner Promotion, die ständige Diskussionsbereitschaft, das fortlaufende Engagement für seine Doktoranden und die hervorragende Zeit in seiner Arbeitsgruppe, auch außerhalb des Labors, danken.

Bei Prof. Dr. Stephan A. Sieber bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie bei Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Hülya Aldemir, Dr. Françoise Schaefers, Dr. Paul D'Agostino, Anna Glöckle und Anna Sib für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Dr. Sabine Schneider von der TU München danke ich für die Hilfe und Zusammenarbeit bei der Proteinkristallisation und der Masseabteilung der Universität Bonn für die Durchführung von LC-MS-Messungen.

Darüber hinaus möchte ich ganz besonders Dr. Hülya Aldemir für die intensive, aber immer angenehme Zusammenarbeit danken sowie dafür, dass ich sie stets mit allen möglichen Fragen bezüglich Analytik, Auswertung von Daten oder sonstigem Kleinkram nerven konnte. Auch Dr. Françoise Schaefers verdient gesonderten Dank, da sie es mir immer wieder gesagt hat, obwohl ich nie verstanden habe was sie meint. Außerdem hat sie den Lurch ertragen, maaaaaaahh.

Auch dem restlichen Arbeitskreis TAMGulder gilt mein Dank für jegliche Unterstützung sowie eine schöne Zeit in Bonn und München. Unter anderem danke ich Hanna und Jana für das Entdecken der Berge, Schluggi, Paul und Anna G. für das Teilen von Freude, Leid und Schoki, Christian für seine stets guten Ratschläge und Elke für die Einführung in die tieferen Geheimnisse des Schafkopfs.

Für zahlreiche Feierabendbierchen und „außerschulische“ Aktivitäten möchte ich außerdem den Mitgliedern der Arbeitskreise von Prof. Katrin Lang und Prof. Eva Herzig danken. Allen voran Marko Cigler, Susanne Mayer, Marie von Wrisberg, Lurchi Filonik, Jenny Lebert, Stephan Pröller und Michi Čorić. Letztere sollen wissen, dass der FC SchluggSchlugkSchlukk immer für eine Revanche bereitsteht. Doch nur wir sind heiß und schnell wie die Vogelspinne, vergesst das nicht!

Auch allen anderen, die mich nicht nur während dieses schwierigen Abschnitts meines Lebens sondern auch darüber hinaus begleitetet und unterstützt haben, möchte ich von ganzem Herzen danken. Hierzu zählen natürlich die Bagage (Maria, Christoph, Katrin, Max, Lisa, Peter, Petra, Frank, Sarah, Moritz), Ursel, Annette, Mike, Brandon und jeder den ich zu meinen Freunden zählen darf (und der Fuchs).

Am meisten danke ich jedoch meinen Eltern, die mich immer unterstützt und mir in jeder schwierigen Situation meines Lebens geholfen haben. Ohne euch wäre dies hier nicht möglich gewesen.





## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis.....	14
1 Einleitung.....	17
1.1 Peptidnaturstoffe .....	22
1.1.1 Nicht-ribosomale Peptide .....	22
1.1.2 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide .....	29
1.2 Cytochrom P450-Enzyme .....	31
1.2.1 Allgemeines.....	31
1.2.2 Cytochrom P450-Enzyme in biotechnischen Anwendungen .....	33
2 Hintergrund und Zielsetzung.....	37
2.1 Complestatin ( <b>37</b> ) .....	37
2.1.1 Hintergrund.....	37
2.1.2 Ziele.....	40
2.2 Biarylhaltige Peptide mit unbekannter Biosynthese .....	42
2.2.1 Die Biphenomycin-Familie ( <b>43 - 46</b> ), Hintergrund und Ziele.....	42
2.2.2 Cittilin A ( <b>47</b> ), Hintergrund und Ziele .....	44
2.3 JBIR-34 ( <b>52</b> ) und JBIR-35 ( <b>53</b> ), nicht-ribosomale Peptide mit 4-Methyloxazolinring.....	45
2.3.1 Hintergrund.....	45
2.3.2 Ziele.....	48
3 Ergebnisse und Diskussion .....	51
3.1 Complestatin ( <b>37</b> ) .....	51
3.1.1 Enzymatische Systeme zur Reduktion von ComI und ComJ.....	51
3.1.2 Die akzessorischen Proteine Sfp und Gdh .....	61
3.1.3 ComI und ComJ, die Cytochrom P450-Enzyme der Complestatin-Biosynthese.....	63
3.1.4 Die PCP-Domänen von ComC und ComD.....	68
3.1.5 Die potentielle X-Domäne von ComD .....	72
3.1.6 Die chemo-enzymatische Synthese von Complestatin ( <b>37</b> ) und entsprechender Derivate .....	78
3.1.7 Kristallographie der CYP450s ComI und ComJ .....	83

## Inhaltsverzeichnis

3.2	Die Biphenomycin-Familie ( <b>43 - 46</b> ).....	88
3.2.1	Homologie-basierte Genomuntersuchung zur Detektion des Biphenomycin-Genclusters.....	88
3.2.2	Vergleichende Genomanalyse von <i>Streptomyces griseorubiginosus</i> No. 43708 und <i>Streptomyces filipinensis</i> NRRL 3217 .....	90
3.2.3	Struktur potentieller Biphenomycin-Gencluster und ein möglicher Biosyntheseweg .....	95
3.2.4	Untersuchungen zur Biosynthese der Biphenomycin-Familie ( <b>43 - 46</b> ).....	109
3.3	Cittilin A ( <b>47</b> ) .....	113
3.4	Nicht-ribosomale Peptide mit 4-Methyloxazolinring .....	118
3.4.1	Aufbau und Merkmale des JBIR-Genclusters aus <i>S. filipinensis</i> NRRL 3217 .....	118
3.4.2	Fermentationen zur Extraktion von JBIR-34 und -35 ( <b>52 - 53</b> ) oder entsprechender Derivate	122
3.4.3	Untersuchung der Biosynthese von $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan ( <b>56</b> ).....	131
3.5	Zusammenfassung .....	141
3.6	Abstract .....	148
4	Material und Methoden .....	154
4.1	Chemikalien, Geräte, Materialien und Software .....	154
4.1.1	Chemikalien, Gase und Lösungsmittel .....	154
4.1.2	Enzyme und Proteine .....	154
4.1.3	Kits .....	154
4.1.4	Verwendete Apparaturen und Messgeräte .....	155
4.1.5	Software.....	157
4.2	Organismen, Plasmide und Primer .....	157
4.2.1	Organismen.....	157
4.2.2	Plasmide und Vektoren.....	158
4.2.3	Primer .....	161
4.3	Nährmedien, Zellanzucht und Puffer.....	166
4.3.1	Kultivierung von Bakterien.....	166
4.3.2	Stammhaltung.....	167
4.3.3	Reinheitskontrolle.....	167
4.3.4	Medien .....	167
4.3.5	Antibiotika.....	170
4.3.6	Weitere Medienzusätze .....	171

## Inhaltsverzeichnis

4.3.7	Puffer .....	171
4.4	Molekularbiologische Methoden .....	176
4.4.1	Behandlung von Geräten und Lösungen.....	176
4.4.2	Isolierung chromosomaler DNA.....	177
4.4.3	Präparation von Plasmid-DNA .....	177
4.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	177
4.4.5	Visualisierung von DNA.....	183
4.4.6	Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit .....	184
4.4.7	Präparation von PCR-Produkten .....	184
4.4.8	Enzymatische DNA-Modifikationen .....	184
4.4.9	DNA-Sequenzierung .....	188
4.4.10	Sequenzierung chromosomaler DNA von Streptomycceten und Genom-Analyse .....	188
4.5	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	189
4.5.1	Präparation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	189
4.5.2	Präparation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen .....	189
4.5.3	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock.....	190
4.5.4	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroschock .....	190
4.6	Heterologe Proteinüberproduktion in <i>Escherichia coli</i> .....	190
4.6.1	Testexpression zur Überprüfung der Expressionsbedingungen .....	190
4.6.2	Proteinüberproduktion .....	191
4.6.3	Zellaufschluss .....	192
4.6.4	Standardaufreinigung von Proteinen mit His-Tag.....	193
4.6.5	Aufreinigung von CYP450s unter Rekonstitution mittels Häminchlorid .....	193
4.6.6	Entsalzung und Aufkonzentration von aufgereinigten Proteinen.....	194
4.6.7	Aufkonzentration .....	195
4.6.8	Abspaltung von Polyhistidin-Tags mittels TEV-Protease.....	195
4.6.9	Aufreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) .....	196
4.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	196
4.7.1	Photometrisch.....	196
4.7.2	Bradford .....	198

## Inhaltsverzeichnis

4.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	199
4.9	Spektralanalyse von Proteinen .....	201
4.10	Charakterisierung von Cytochrom P450-Enzymen .....	201
4.10.1	Charakterisierung mittels Reduktion und CO-Bindung.....	201
4.10.2	Charakterisierung mittels Differenzspektroskopie nach Imidazol-Zugabe .....	202
4.11	Bindungstests von CYP450s mit der X-Domäne von ComD .....	202
4.12	Kristallisation von ComJ-m17AS .....	203
4.13	Enzymatische Assays im Rahmen des Complestatin-Projekts .....	204
4.13.1	Test von Redoxsystemen mit Cytochrom C (CytC) als terminalem Elektronenakzeptor .....	204
4.13.2	Test der Glucose-Dehydrogenase (Gdh) aus <i>Bacillus megaterium</i> .....	205
4.13.3	Aktivierung der Apo-PCP-Domänen ComC-PCP1 und ComD-PCP mittels Sfp .....	205
4.13.4	Beladung von ComD-PCP+X mit dem CoA-Derivat der linearen Complestatinkette ( <b>39</b> ) .....	206
4.13.5	Enzymatische Biarylkupplung der linearen Complestatinkette mittels ComI und ComJ .....	206
4.14	Enzymatische Biarylkupplung linearer Vorläufer von Citalin A ( <b>47</b> ) .....	207
4.15	Enzymatische Assays im Rahmen des JBIR-Projekts .....	208
4.15.1	Enzymatische Halogenierung von Trp ( <b>26</b> ) mittels FmoD und FmoE .....	208
4.15.2	Hydroxylierung von Trp ( <b>26</b> ) oder 6-Cl-Trp ( <b>55</b> ) mittels FmoC .....	209
4.16	Expression von Naturstoff-Genclustern .....	210
4.16.1	Naturstoffexpression durch <i>S. filipinensis</i> NRRL 3217 .....	210
4.16.2	Expression potentieller Biphenomycin-Gencluster in <i>E. coli</i> .....	210
4.17	Extraktion von Bakterienkulturen.....	211
4.17.1	Extraktion von <i>S. filipinensis</i> NRRL 3217-Kulturen .....	211
4.17.2	Extraktion von <i>E. coli</i> mit potentiellen Biphenomycin-Genclustern .....	212
4.18	Isolierung potentieller JBIR-Derivate mittels semi-präparativer HPLC .....	213
4.19	Chromatographische Methoden .....	213
4.20	HPLC-Methoden .....	214
4.20.1	„Complestatin“ .....	215
4.20.2	„Biarylkupplung“ .....	215
4.20.3	„Biphenomycin“ .....	216
4.20.4	„Trp-Halogenierung“ .....	216

## Inhaltsverzeichnis

4.20.5	,Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung'	217
5	Literaturverzeichnis	218

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
Abs	Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge
ACN	Acetonitril
AcS	Acyl-CoA-Synthetase
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	„Basic local alignment search tool“
blastp	Abgleich einer Aminosäuresequenz mit einer anderen Aminosäuresequenz oder einer Proteindatenbank mittels BLAST
bp	Basenpaar
BSA	„Bovine serum albumin“ / Rinderalbumin
CDS	„Coding DNA sequence“ / Kodierende DNA-Sequenz
CO	Kohlenmonoxid
CoA / S-CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
Cyc-Domäne	Cyclisierungsdomäne
CYP450	Cytochrom P450-Enzym
CytC	Cytochrom C
dAdo	5'-Desoxyadenosin
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser / Demineralisiertes Wasser / Mili-Q-Wasser
DegPri	Degenerierter Primer
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ / Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fd	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel
FIRed	Flavinreduktase
FMN	Flavinmononukleotid

## Abkürzungsverzeichnis

FPLC	„Fast protein liquid chromatography“ / Schnelle Proteinflüssigchromatographie
Gdh	Glucose-Dehydrogenase
GYM	„Glucose-Yeast extract-Malt extract“ / Glucose-Hefeextrakt-Malzextrakt
gDNA	Genomische DNA
Hal	Halogenase
His6-Tag	Hexahistidin-Tag
His8-Tag	Octahistidin-Tag
HPLC	„High performance liquid chromatography“ / Hochleistungsflüssigchromatographie
ID	Identifikationsnummer (in der entsprechenden Datenbank)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase (= 1.000 Basenpaare)
LB	Luria-Bertani
LC-MS	„Liquid chromatography-Mass spectrometry“ / Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LCHR	„Linear-circular homologous recombination“ / Lineare-Zirkuläre homologe Rekombination
LIC	„Ligase independent cloning“ / Ligase-unabhängige Klonierung
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MCS	„Multiple cloning site“ / Multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
MFS	„Major Facilitator“-Superfamilie
MTHF	5,10-Methylentetrahydrofolat
MW	„Molecular weight“ / Molekulargewicht
MWCO	„Molecular weight cut-off“ / (Molekulare) Ausschlussgröße
NMR	„Nuclear magnetic resonance“ / Kernspinresonanz
NRP	Nicht-ribosomales Peptid
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OE-PCR	„Overlap extension-PCR“ / Überhang-Extension-Polymerasekettenreaktion
P450BM3	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>
PCR	„Polymerase chain reaction“ / Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphodiesterase
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PFOR	Phthalate-Familie-Oxygenase-Reduktase
Ppant	Phosphopantethein / Phosphopantetheinyl-...
PQQ	„Pyrroloquinoline quinone“ / Pyrrolochinolinchinon
Red	NAD(P)H-Ferredoxin-Oxidoreduktase
RED-Domäne	C-terminale Reduktase-Domäne von P450RhF aus <i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 9784
rH <sub>2</sub> O	Reinstwasser (autoklaviertes doppelt destilliertes Wasser)

## Abkürzungsverzeichnis

RiPP	Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide
RNA	„Ribonucleic acid“ / Ribonukleinsäure
RP	Ribosomales Peptid
rpm	„Rotations per minute“ / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS-PAGE	Natrium („Sodium“) -dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Seq	Sequenzierung
Sfp	Surfactin-Phosphopantetheinyltransferase
SLIM	„Site-directed, ligase-independent mutagenesis“ / Gerichtete, Ligase-unabhängige Mutagenese
SPE	„Solid phase extraction“ / Festphasenextraktion
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tblastn	Abgleich einer Proteinsequenz mit einer Nukleotidbank mittels BLAST
TEV	„Tobacco etch virus“ / Tabakätzvirus
TFA	„Trifluoroacetic acid“ / Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofolat
TIC	„Total ion current“ / Total-Ionenstrom
TK	Thymidinkinase
TPR	„Tetratricopeptide repeat“ / Tetratricopeptid-Wiederholung
UPF	„Uncharacterized protein family“ / Uncharakterisierte Proteinfamilie
ü. N.	über Nacht



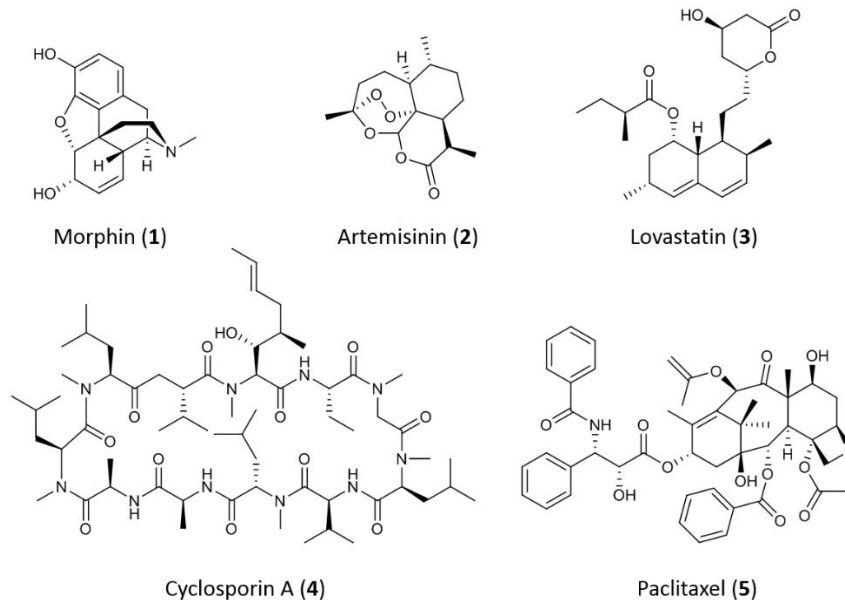
### 1 Einleitung

Bereits seit Jahrtausenden bedient sich der Mensch am reichhaltigen Fundus der Natur, wenn es darum geht sich das Leben einfacher und angenehmer zu gestalten.<sup>1</sup> Als Beispiele seien hier nur die Verwendung des Sekrets von Purpurschnecken genannt, um von der Antike bis zum Mittelalter kostbar gefärbte Stoffe herzustellen,<sup>2</sup> die Jagd durch südamerikanische Indianerstämme mit Pfeilen, welche unter Zuhilfenahme des Pflanzenextrakts Curare vergiftet wurden,<sup>3</sup> oder die Nutzung der Schwarzen Tollkirsche (*Atropa belladonna*) oder der Früchte des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) für berauschende, medizinische oder kosmetische Zwecke in Europa und Asien.<sup>4,5</sup> Zur damaligen Zeit war natürlich in keiner Weise bekannt, welche Substanzen auf molekularer Ebene für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Erst mit dem 20. Jahrhundert sollte ihre systematische Erforschung beginnen. Aufgrund ihrer Biosynthese durch in der Natur vorkommende Organismen werden diese Verbindungen heutzutage als Naturstoffe bezeichnet. Aus nachvollziehbaren Gründen führte das Verständnis von molekularen Strukturen und Wirkmechanismen zu einem erheblichen Interesse an einem gezielten Einsatz von Naturstoffen, welche in der Lage sind Schmerzen zu lindern, die Symptome von Krankheiten zu bekämpfen, oder diese gar zu heilen. Heutzutage ist eine Vielzahl solcher Stoffe aus unterschiedlichen Organismen bekannt und hat es bis zur klinischen Anwendung gebracht (Abb. 1). Dazu gehören so bekannte Beispiele wie das als Schmerzmittel eingesetzte Morphin (**1**), welches ursprünglich aus Schlafmohn gewonnen wurde,<sup>5</sup> sowie das zur Behandlung von Malaria eingesetzte Artemisinin (**2**) aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*),<sup>6</sup> für dessen Entdeckung und Wirkstoffuntersuchung die chinesische Forscherin Tu Youyou 2015 sogar mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt wurde.<sup>7</sup> Aber auch das von verschiedenen Pilzen produzierte Lovastatin (**3**), aus der häufig zur Behandlung von Hypercholesterinämie verschriebenen Gruppe der Statine, gehört hierzu.<sup>8</sup> Ebenso Cyclosporin A (**4**) aus den Pilzen *Cylindrocarpon lucidum* Booth und *Tolypocladium inflatum* Gams, das zur Immunsuppression nach Organtransplantationen eingesetzt wird,<sup>9</sup> während das aus der Pazifischen Eibe gewonnene Paclitaxel (**5**) als Chemotherapeutikum Verwendung findet.<sup>10</sup>

Unter den medizinisch relevanten Naturstoffen gilt jenen, welche in der Lage sind mikrobielle Infektionen zu bekämpfen, gerade heute ein besonderes Interesse. Dies liegt daran, dass bakteriell verursachte Infektionen seit Beginn des 20. Jahrhunderts zu den häufigsten Todesursachen weltweit zählen.<sup>11</sup> Substanzen, die in der Lage sind das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen oder diese abzutöten, werden unter dem Begriff Antibiotika zusammengefasst.<sup>12</sup> Nach der klassischen Definition werden sie von anderen Mikroorganismen produziert. Im Laufe der letzten 70 Jahre wurden mittels chemischer Synthese jedoch auch zahlreiche halb- oder vollsynthetische Antibiotika und Antibiotikaderivate entwickelt.<sup>13</sup> Die Verfügbarkeit von Wirkstoffen mit antimikrobieller Wirkung hat

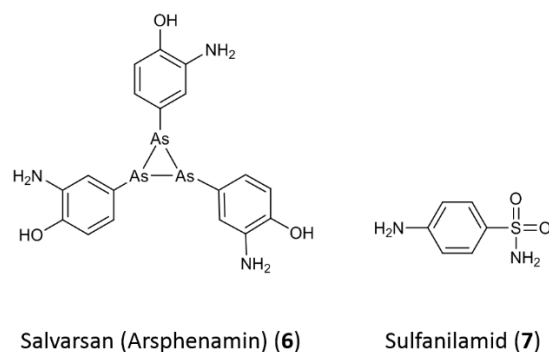
## Einleitung

dabei entscheidend dazu beigetragen, die durchschnittliche Lebenserwartung zu heben. So stieg sie zum Beispiel in den USA zwischen 1900 und 2000 von 47 Jahren auf 74 Jahre für Männer und 80 Jahre für Frauen.<sup>14</sup>



**Abb. 1.** Verschiedene Naturstoffe mit medizinischer Verwendung.

Bei den ersten als Medikament zugelassenen Antibiotika, Salvarsan (6) und Sulfanilamid (7), handelte es sich noch um rein chemisch-synthetische Substanzen, die aus Untersuchungen an synthetisierten Farbstoffen hervorgingen (Abb. 2). Die neuartige Wirksamkeit dieser Stoffe gegen Mikroorganismen führte in der Folge zu einer weiten Verbreitung und Anwendung. Aufgrund von Nebenwirkungen bei der Verabreichung waren jedoch Alternativen gefragt.<sup>15-17</sup>

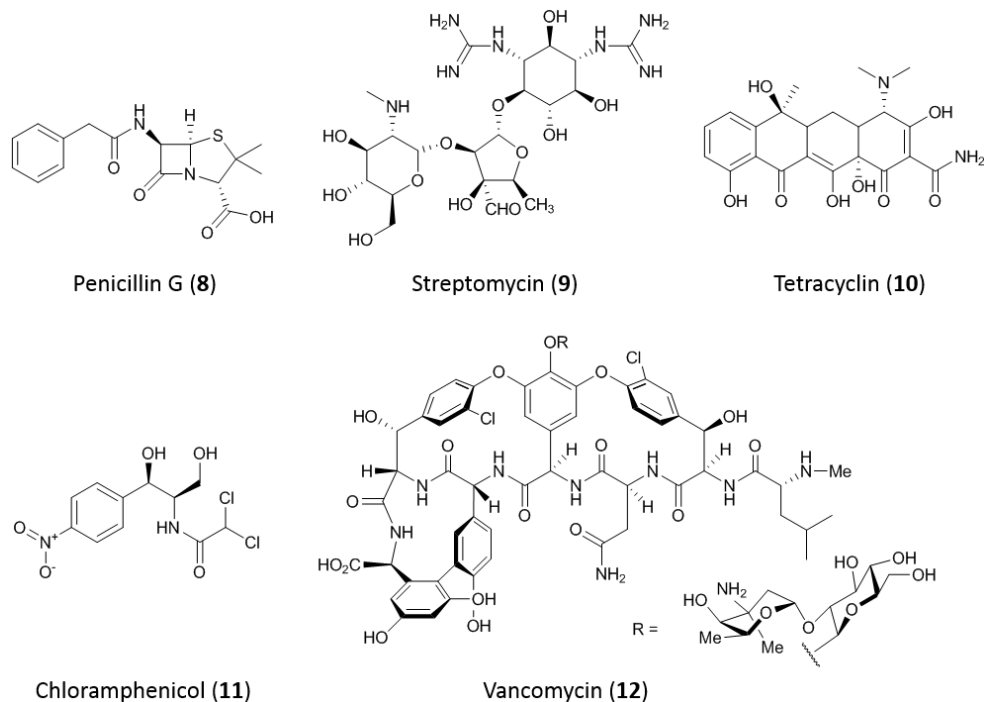


**Abb. 2.** Die ersten zugelassenen Antibiotika Salvarsan (6) und Sulfanilamid (7).

Dies geschah mit der Entdeckung von Penicillin (8) aus *Penicillium notatum* im Jahre 1928 durch Sir Alexander Fleming und Streptomycin (9) aus *Streptomyces griseus* durch Albert Schatz im Jahre 1943

## Einleitung

sowie der Einführung beider Substanzen als Therapeutikum zu Beginn der 1940er.<sup>15,18,19</sup> Hierdurch wurde nicht nur die Tür in das Zeitalter der (Naturstoff-) Antibiotika geöffnet, es begann zugleich eine Phase der Antibiotikaforschung, welche heute als „goldene Ära“ bezeichnet wird und die bis zum Beginn der 1960er Jahre andauern sollte. Sie ist gekennzeichnet durch die Entdeckung einer Vielzahl von antibiotisch wirksamer Substanzen mit unterschiedlichen chemischen Grundgerüsten und zellulären Zielstrukturen, die zu Medikamenten entwickelt werden konnten. Hierzu zählen z. B. Tetracyclin (**10**) (Polyketid), Chloramphenicol (**11**) (Phenylpropanoid) oder Vancomycin (**12**) (Glycopeptid) (Abb. 3).<sup>20,21</sup>



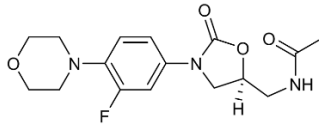
**Abb. 3.** Verschiedene Antibiotika, die während der goldenen Ära der Antibiotikaforschung entdeckt wurden.

Verantwortlich für die große Zahl an neu entdeckten und zur klinischen Anwendung gebrachten Strukturen waren dabei mehrere Faktoren. Zum einen führte die Entdeckung von Mikroorganismen als Produzenten von Antibiotika zu einer leichten Zugänglichkeit der Substanzen in großen Mengen, wenn die entsprechenden Stämme in Reinkultur gebracht werden konnten. Außerdem verbesserten sich Testmethoden um Stämme und Rohextrakte mit antibiotisch wirksamen Stoffen zu identifizieren, die später als Reinsubstanzen isoliert werden konnten.<sup>22,23</sup> Zum anderen waren fast alle neu entdeckten Klassen von Antibiotika und damit auch ihre chemischen Grundgerüste, die für die Wirkung dieser Substanzen verantwortlich sind, schlicht unbekannt.<sup>24</sup>

Mit fortschreitender Zeit konnten jedoch immer weniger unbekanntes Grundstrukturen identifiziert werden. Als Folge stiegen Aufwand und Kosten, um neue und interessante Moleküle zu isolieren, und

## Einleitung

die Zahl an Substanzen, die zu kommerziellen Antibiotika entwickelt werden konnten, sank.<sup>11</sup> Dies führte zur sogenannten Innovationslücke, die sich deutlich darin zeigt, dass zwischen den Chinolonen (1962) und dem Oxazolidinon Linezolid (**13**) (2000) (Abb. 4) für fast 40 Jahre keine neuen Klassen von antibiotischen Verbindungen in die klinische Verwendung eingebracht wurden.<sup>20</sup>



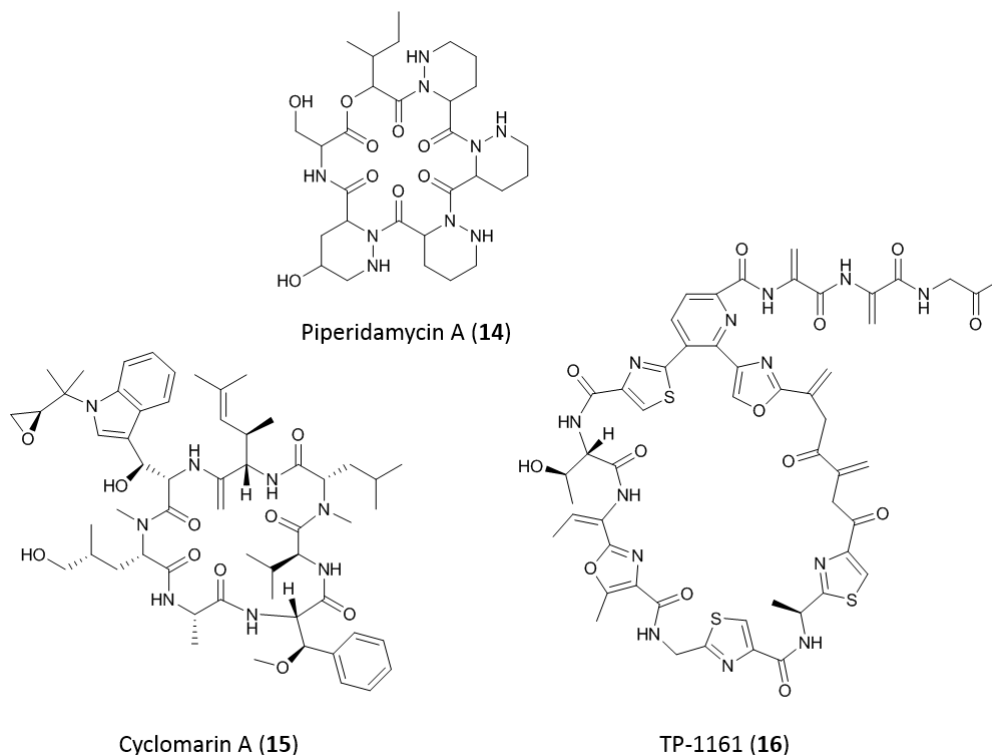
Linezolid (**13**)

**Abb. 4.** Strukturformel von Linezolid (**13**).

Obwohl heutzutage verschiedene neue Ansätze verfolgt werden, um bisher unbekannte Leitstrukturen für die Entwicklung von Antibiotika zu identifizieren,<sup>25,26</sup> sind die Auswirkungen der Innovationslücke bis heute spürbar. So ging die Anzahl der in den USA von der Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. „Food and Drug Administration“, FDA) neu zugelassenen Antibiotika von 16 zwischen 1983 und 1987 auf zwei zwischen 2008 und 2012 zurück.<sup>27</sup> Verschlimmert wird das Problem einer fehlenden Innovation im Bereich der Antibiotikaentwicklung durch die Bildung von Resistenzen gegen bekannte Antibiotikaklassen. Die Entstehung von Resistenzen beruht dabei auf verschiedenen Faktoren, wie der Menge des verwendeten Antibiotikums, wie weit verbreitet seine Verschreibung ist, der Häufigkeit mit der sub-therapeutische Dosen angewandt werden, der Pool an vorhandenen Resistenzmechanismen und die Anzahl an Mutationen, die nötig sind die Zielstruktur unempfindlich gegen das Antibiotikum zu machen.<sup>28,29</sup> Die Ausbildung von Resistenzen erscheint dabei jedoch gewiss. So waren erste klinische Resistenzen gegen jede seit 1960 neu eingeführte Hauptklasse von Antibiotika innerhalb von zwölf Jahren oder weniger nach Ersteinsatz zu beobachten. Hierbei nahmen die Zeitspannen bis zur Resistenzbildung in deutlichem Maße ab.<sup>20,25</sup> Die zunehmende Entwicklung von Resistenzen, gepaart mit dem Fehlen neuer Substanzen, um resistente Keime zu therapieren, entwickelte sich dabei im Laufe der Zeit zu einer ernststen Bedrohung für unsere Gesundheitssysteme. So waren Infektionskrankheiten 2004 die zweithäufigste Todesursache weltweit.<sup>11</sup> Weiterhin wird davon ausgegangen, dass sich jährlich ca. zwei Millionen Menschen in US-Krankenhäusern mit nosokomialen Keimen infizieren von denen über 70% wahrscheinlich gegen ein oder mehr Antibiotika resistent sind.<sup>30,31</sup> Aufgrund dieser erschreckenden Entwicklung ist die anhaltende Erforschung von Naturstoffen zur Identifizierung neuer Leitstrukturen sowie deren Weiterentwicklung zu klinisch anwendbaren Therapeutika unablässig.<sup>32,33</sup>

## Einleitung

Ein Großteil aller bekannten Naturstoffe, darunter auch viele Substanzen, die in der medizinischen Behandlung von Menschen und Tieren oder der Landwirtschaft Anwendung finden, werden von Pilzen und Bakterien produziert.<sup>34</sup> So wurden bis zum Jahr 2002 allein 22.500 bioaktive Substanzen mikrobiellen Ursprungs beschrieben, von denen wiederum ein nicht unerheblicher Teil (10.100 = 45%) von Actinomyceten stammte.<sup>11</sup> Diese filamentösen, grampositiven Mikroorganismen produzieren dabei so wichtige Substanzen, wie die bereits erwähnten Antibiotika Streptomycin (**9**), Tetracyclin (**10**) und Vancomycin (**12**) (Abb. 3),<sup>35</sup> aber auch eine stetig wachsende Zahl an neu entdeckten Molekülen mit antibiotischer Wirksamkeit, wie Piperidamycin A (**14**), Cyclomarin A (**15**) oder TP-1161 (**16**).<sup>36</sup>



**Abb. 5.** Drei Naturstoffe aus Actinomyceten mit antibiotischer Aktivität, die seit 2009 entdeckt wurden.

Die enorme Zahl an bioaktiven Naturstoffen, die bisher aus Mikroorganismen isoliert wurde, sowie die stetig wachsende Zahl neu beschriebener Verbindungen, illustrieren nicht nur den bisherigen Einfluss dieser Organismengruppen auf die Naturstoffforschung. Sie zeigen auch welches Potential ihnen, im Angesicht neuer und verbesserter Techniken zur Kultivierung und Analyse, zukünftig innewohnt.<sup>37-39</sup> Die Häufigkeit mit der Peptide, wie Vancomycin (**12**) (Abb. 3), Cyclomarin A (**15**) oder TP-1161 (**16**) (Abb. 5), bei der Suche nach neuen, bioaktiven Molekülen isoliert werden, unterstreicht die Bedeutung dieser Naturstoffgruppe für ihre Produzenten. Die beiden bekanntesten Arten von Peptidnaturstoffen sowie ihre Biosynthese sollen daher im Folgenden kurz erläutert werden. Hierbei handelt es sich um

## Einleitung

die nicht-ribosomalen Peptide (NRPs) und die ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptide (RiPPs).

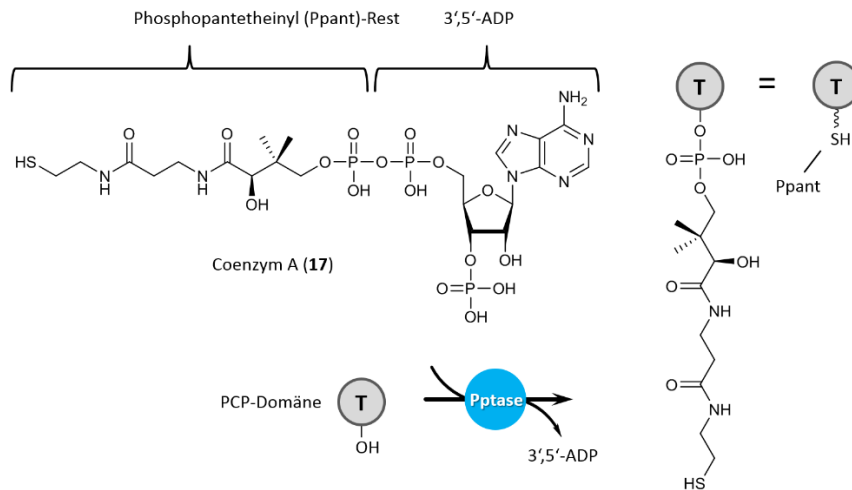
### **1.1 Peptidnaturstoffe**

#### **1.1.1 Nicht-ribosomale Peptide**

Proteine sind essentiell für Aufbau und Funktion von ein- oder mehrzelligen Organismen. So sind sie unter anderem an lebensnotwendigen Prozessen wie dem Metabolismus, der DNA-Replikation, dem intrazellulären Transport oder der Ausbildung zellulärer Strukturen beteiligt. Gemein ist ihnen, dass sie über die ribosomale Peptidsynthese bereitgestellt werden. Hierbei wird laut klassischem Postulat die Information innerhalb der genomischen DNA (gDNA) über mRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt, welche aus 20 proteinogenen Aminosäuren (AS) gebildet wird. Im Unterschied hierzu werden viele Peptidnaturstoffe über Multienzymkomplexe, die sogenannten nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), geformt. Diese verwenden neben den bekannten proteinogenen Aminosäuren über 500 weitere, häufig stark modifizierte Aminosäurebausteine. Deren Biosynthese ist dabei fast immer in den entsprechenden biosynthetischen Genclustern kodiert.<sup>40-42</sup> Im grundlegenden Unterschied zur ribosomalen Peptidsynthese katalysieren NRPS die Biosynthese und bedingen gleichzeitig durch ihren Aufbau und die Abfolge der beteiligten katalytischen Untereinheiten die finale Aminosäuresequenz. Eine NRPS besteht dabei aus einer unterschiedlichen Anzahl von Modulen. Jedes Modul ist für den Einbau eines bestimmten Aminosäurebausteins verantwortlich. Aufgrund der direkten Korrelation von NRPS-Struktur und NRP-Sequenz spricht man hierbei auch von der sogenannten Kollinearitätsregel. Ein Modul selbst besteht seinerseits aus mehreren katalytischen Domänen. Drei Typen von Domänen sind essentiell für die Funktionalität jedes Moduls: Die Kondensationsdomäne (engl. „Condensation domain“, C-Domäne), die Adenylierungsdomäne (engl. „Adenylation domain“, A-Domäne) und die Peptidylträgerdomäne (engl. „Peptidyl carrier protein domain“, PCP-Domäne oder PCP, alternativ auch Thiolierungsdomäne, T-Domäne). Die Domänen sind dabei in der Reihenfolge C-A-T angeordnet.<sup>43</sup>

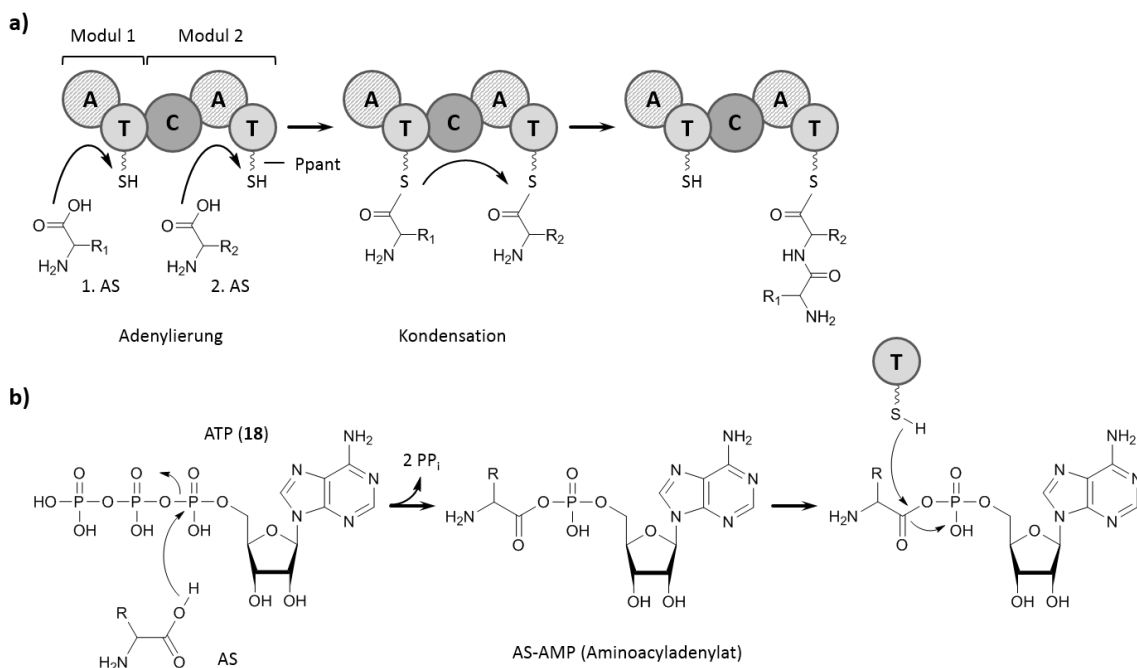
Bevor eine NRPS biosynthetisch aktiv werden kann muss die inaktive Apo-Form der PCP-Domänen in die aktive Holo-Form überführt werden. Hierbei überträgt eine Phosphopantetheinyl-Transferase (Pptase) den Phosphopantetheinyl (Ppant)-Rest von Coenzym A (CoA) (**17**) auf einen konservierten Serinrest der PCP-Domänen (Schema 1). Der Ppant-Rest der Holo-PCP-Domänen dient in der Folge als Anker für die kovalente Bindung der verschiedenen Aminosäurebausteine an die NRPS.<sup>44</sup>

## Einleitung



**Schema 1.** Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe von Coenzym A (17) auf eine PCP-Domäne (T) mittels Pptase.

Die Bildung eines Peptids mittels NRPS erfolgt anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (Schema 2a). Zuerst erkennt die A-Domäne des ersten Moduls (Modul 1) spezifisch einen Aminosäurebaustein und überträgt ihn auf den Ppant-Arm der nachfolgenden PCP-Domäne (Adenylierung).

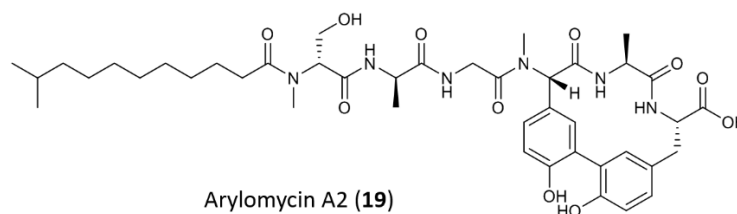


**Schema 2. a)** Aufbau eines NRPS-Minimalmoduls (Modul 2) aus Kondensations- (C), Adenylierungs- (A) & PCP-Domäne (T). Außerdem ist die spezifische Aktivierung verschiedener Aminosäurebausteine (1. AS / 2. AS) durch unterschiedliche A-Domänen sowie die Kondensation dieser Aminosäuren durch eine C-Domäne zur Verlängerung der Peptidkette dargestellt. **b)** Mechanismus der Aktivierung einer Aminosäure durch die A-Domäne und Übertragung auf die Thiolgruppe der nachfolgenden PCP-Domäne. AS = Aminosäure, R = Beliebige Aminosäureseitenkette.

## Einleitung

Die C-Domäne des nachfolgenden Moduls (Modul 2) erkennt nun diesen Baustein und kondensiert ihn mit der Aminosäure, welche von der A-Domäne desselben Moduls zuvor in identischer Art und Weise wie für Modul 1 beschrieben erkannt, aktiviert und auf die zugehörige PCP-Domäne übertragen wurde (Kondensation). Durch Aneinanderreihung weiterer Module kann so eine stetig wachsende Peptidkette gebildet werden. Die A-Domänen-katalysierte Beladung einer PCP-Domäne setzt dabei eine vorhergehende Aktivierung der Aminosäure voraus (Schema 2b). Unter Spaltung von Adenosin triphosphat (ATP) (**18**) wird ein Aminoacyladenylat aus Aminosäure und Adenosinmonophosphat (AMP) gebildet. Aus diesem kann die Aminosäure dann auf die Thiolgruppe des Ppant-Arms der PCP-Domäne übertragen werden, während AMP freigesetzt wird.<sup>41-43</sup>

Das Initiationsmodul einer NRPS besteht häufig nur aus A- und T-Domäne, da in diesem Fall noch keine Kondensation mit einer vorhergehenden Aminosäure nötig ist. Eine Ausnahme bilden NRPs mit acyliertem *N*-Terminus. Die Acylgruppe wird in diesen Verbindungen typischerweise durch eine sogenannte Starter-C-Domäne auf die Aminosäure übertragen.<sup>45</sup> Ein Beispiel für eine NRPS-basierte Biosynthese mit Starter-C-Domäne findet sich bei Arylomycin A2 (**19**) (Abb. 6),<sup>46</sup> einem Lipopeptid mit Biarylbindung, das antibiotischer Aktivität besitzt.<sup>47,48</sup> Diese beruht auf der Hemmung der bakteriellen Typ I Signalpeptidase,<sup>49</sup> die an der Translokation von Proteinen ins Periplasma beteiligt ist.<sup>50</sup> Länge und Struktur des *N*-terminalen Acylrests haben dabei Einfluss auf die Wirksamkeit des Lipopeptids.<sup>51</sup>

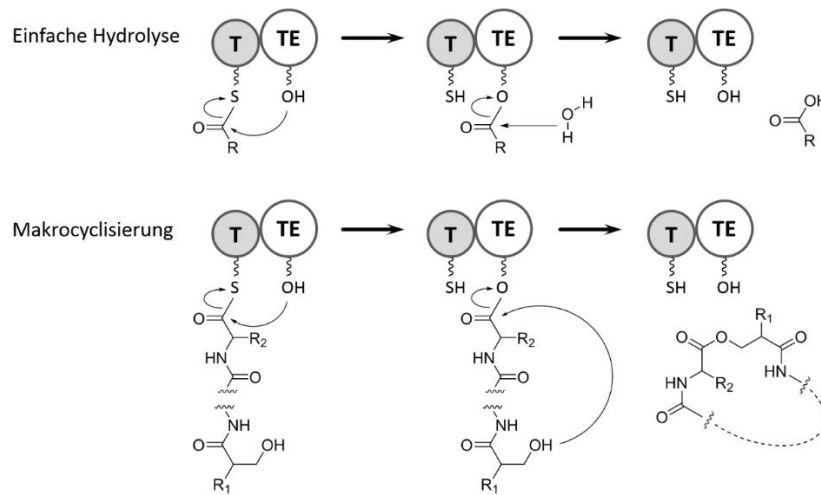


**Abb. 6.** Strukturformel von Arylomycin A2 (**19**).

Neben den drei oben beschriebenen Domärentypen (C, A, T) ist eine Thioesterasedomäne (TE-Domäne) essentiell für die Synthese von NRPs. Diese findet sich häufig als letzte Domäne im finalen Modul von bakteriellen NRPS. Ihre Aufgabe ist es, die Peptidkette nach Einbau des letzten Aminosäurebausteins von der terminalen Trägerdomäne abzuspalten und so das NRP in vollständiger Länge freizusetzen.<sup>52</sup> Hierbei wird die Peptidkette auf einen konservierten Serinrest übertragen und es entsteht das sogenannte Acyl-*O*-TE-Intermediat. Die Abspaltung selbst kann dann, abhängig von der Art des Substrats und der TE selbst, auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (Schema 3). Im ersten Fall kommt es zu einer simplen Hydrolyse des Esters und so zur Freisetzung eines linearen Peptids. Der zweite Weg beinhaltet die intramolekulare Reaktion mit dem nukleophilen Rest einer Aminosäureseitenkette. Hierdurch wird ein makrocyclisches Peptid freigesetzt.<sup>53,54</sup>

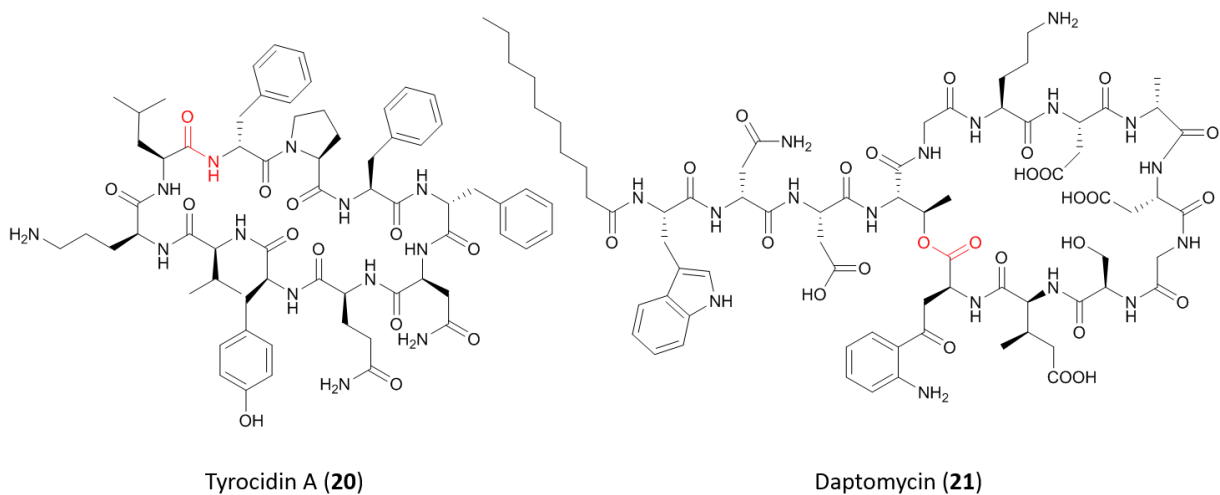


## Einleitung



**Schema 3.** Zwei Arten der Freisetzung von nicht-ribosomalen Peptiden durch eine TE-Domäne: Hydrolyse oder Makrocyclisierung. Die Makrocyclisierung wird am Beispiel von Serin demonstriert, kann aber auch mit der Seitenkette anderen Aminosäuren, wie z. B. Cystein oder Threonin, erfolgen. R<sub>1</sub> = Peptidkette, R<sub>2</sub> = Beliebige Aminosäureseitenkette.

Welche Aminosäurebausteine hierbei verknüpft werden, und wie groß der so gebildete Zyklus wird, hängt von der Struktur der gebundenen Peptidkette ab. So sind Peptide mit Lactamring, wie bei Tyrocidin A (**20**), der durch Verknüpfung von *N*- und *C*-Terminus entsteht, oder mit Lactonring, wie bei Daptomycin (**21**), der durch Cyclisierung zwischen *C*-Terminus und der Hydroxygruppe einer Threonin-Seitenkette entsteht, bekannt (Abb. 7).<sup>52,53</sup>



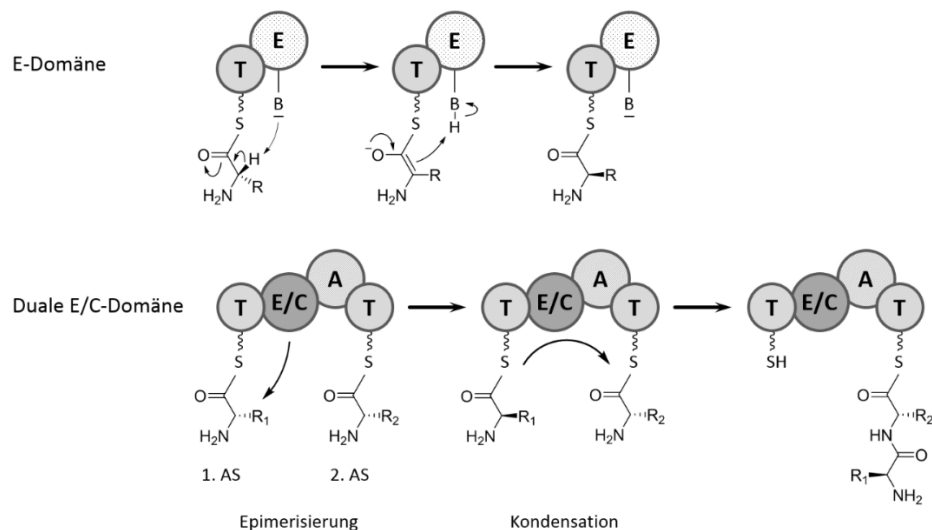
**Abb. 7.** Strukturformeln der cyclischen NRPs Tyrocidin A (**20**) und Daptomycin (**21**). Die Positionen der Cyclisierung, welche während der Freisetzung durch die jeweiligen Thioesterasedomänen eingebracht werden, sind rot markiert.

TE-Domänen mit der oben beschriebenen katalytischen Reaktivität werden zum Typ I gezählt. Neben ihnen gibt es einen zweiten Typ, der eine Kontrollfunktion während der Biosynthese übernimmt. Kommt es zur Aktivierung einer falschen Aminosäure durch eine A-Domäne, oder der Generierung

## Einleitung

einer Holo-PCP-Domäne unter Verwendung von acetyliertem Coenzym A, können Typ II-Thioesterasen die betroffene PCP-Domäne durch Abspaltung der ungewünschten Substrate wieder regenerieren. Ohne diese Korrekturfunktion würde ein entsprechendes Ereignis die jeweilige NRPS dauerhaft funktionsunfähig zurücklassen.<sup>43,55</sup>

Neben den essentiellen Domänen einer NRPS (C, A, T, TE) gibt es noch weitere Domänen, die an der Modifikation der wachsenden Peptidkette beteiligt sein können. Hierzu zählen unter anderem Methylierungs- (MT) oder Epimerisierungsdomänen (E). MT-Domänen vermitteln die *N*-Methylierung einzelner Aminosäurebausteine unter Verwendung von SAM (*S*-Adenosylmethionin) als Methylgruppendonor.<sup>43</sup> Dabei können mehrere Peptidbindungen eines NRP methyliert sein. So tragen sieben der elf Peptidbindungen von Cyclosporin A (**4**) *N*-Methylierungen (Abb. 1).<sup>56</sup> Auch *C*- und *O*-Methylierungen sind bekannt. Während *N*-Methylierungen meist durch die erwähnten MT-Domänen an NRPS-gebundenen Substraten stattfinden, werden bei *C*-Methylierungen meist freie Aminosäuren modifiziert, die erst nachfolgend von A-Domänen aktiviert werden.<sup>41,44</sup> Der Zeitpunkt, zu dem *O*-Methylierungen durchgeführt werden, ist bisher nicht umfassend bekannt.<sup>41</sup> E-Domänen wiederum katalysieren die Umwandlung von proteinogenen L-Aminosäuren in D-Aminosäuren. Wie im Falle der MT-Domänen wirken E-Domänen nur auf NRPS-gebundene Aminosäuren. Die Umwandlung verläuft über die Abstraktion eines Protons vom  $\alpha$ -C-Atom unter Bildung eines Enolats gefolgt von einer Reptonierung des dann planaren Systems von der gegenüberliegenden Seite (Schema 4).<sup>41</sup>



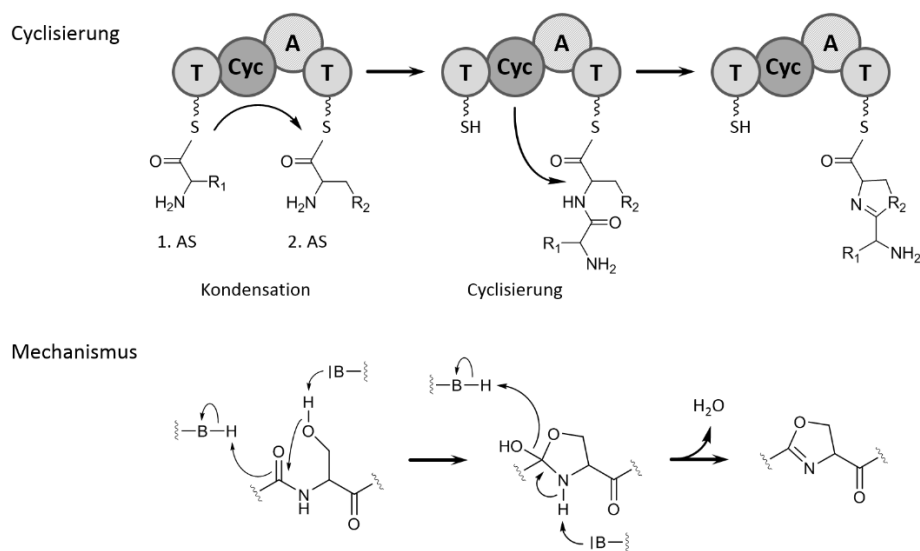
**Schema 4.** Epimerisierung von L-Aminosäuren durch E-Domänen und duale E/C-Domänen. R = R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = Beliebige Aminosäuresseitenkette.

Epimerisierungen können nicht nur durch separate E-Domänen erfolgen. Auch ein spezieller Typ von C-Domänen ist hierzu in der Lage. Da diese Domänen die Umwandlung einer L-Aminosäure in eine

## Einleitung

D-Aminosäure vermittelt und sie gleichzeitig auf die Aminosäure überträgt, die an die nachfolgende A-Domäne gebunden ist (Schema 4), wird sie auch als duale E/C-Domäne bezeichnet.<sup>45</sup> Die Konformation von NRPs, die sich aus dem Einbau von D-Aminosäuren ergibt, kann dabei, wie im Falle von Penicillin (**8**) oder Vancomycin (**12**), Einfluss auf weitere Modifikationen haben.<sup>44</sup> Neben einer Epimerisierung ist auch die direkte Aktivierung von D-Aminosäuren, welche durch externe Racemasen gebildet wurden, durch A-Domänen möglich.<sup>41,44</sup>

Eine weitere Art von C-Domänen bildet die Cyclisierungsdomäne (Cyc-Domäne). Diese vermittelt, wie normale C-Domänen oder die dualen E/C-Domänen, die Kondensation von zwei Aminosäuren. Eine Besonderheit dabei ist jedoch, dass es sich bei der Aminosäure an nachfolgender Position um Serin, Cystein oder Threonin handelt. Nach erfolgter Kondensation wird aus dem nukleophilen Teil der Seitenkette dieser Aminosäuren (Serin/Threonin = OH; Cystein = SH) und der Peptidbindung zwischen beiden Aminosäuren ein fünfgliedriger Heterozyklus gebildet (Schema 5).<sup>43</sup>



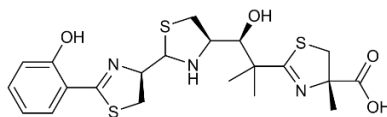
**Schema 5.** Funktion und Mechanismus von Cyclisierungsdomänen. Der Mechanismus der Cyclisierung wird am Beispiel von Serin demonstriert, kann aber auch mit der Seitenkette von Cystein oder Threonin erfolgen. R<sub>1</sub> = Beliebige Aminosäureseitenkette, R<sub>2</sub> = OH (Serin) oder SH (Cystein).

Mechanistisch erfolgt die Ringbildung durch einen intramolekularen Angriff des Nucleophils (O/S) auf die Amidbindung (Schema 5). Der Heterozyklus unterläuft dann eine Dehydratisierung was zur Bildung eines Thiazolin- (Cystein), Oxazolin- (Serin) oder Methyloxazolinrings (Threonin) führt. Durch weitere Redoxreaktionen kann dieser weiter oxidiert oder reduziert werden.<sup>44,52</sup>

Die so gebildeten Heterozyklen dienen häufig der Bindung von Metallen oder der Interaktion mit Proteinen, DNA oder RNA.<sup>45</sup> Ein bekanntes Beispiel für einen Naturstoff mit solch einem Strukturmotiv ist das PK-NRP-Hybrid Yersiniabactin (**22**) (Abb. 8). Dieses ist in *Yersinia pestis* und einer Reihe anderer

## Einleitung

Bakterien an der Aufnahme von Eisen und der Ausbildung der Pathogenität beteiligt.<sup>57</sup> Der entsprechende Biosyntheseweg enthält drei Cyc-Domänen, die an der Ausbildung von drei Thiazolinringen beteiligt sind. Einer der Ringe wird dabei nachfolgend durch die Reduktase YbtU zu einem Thiazolidinring reduziert.<sup>58</sup>



Yersiniabactin (**22**)

**Abb. 8.** Strukturformel des Siderophors Yersiniabactin (**22**).

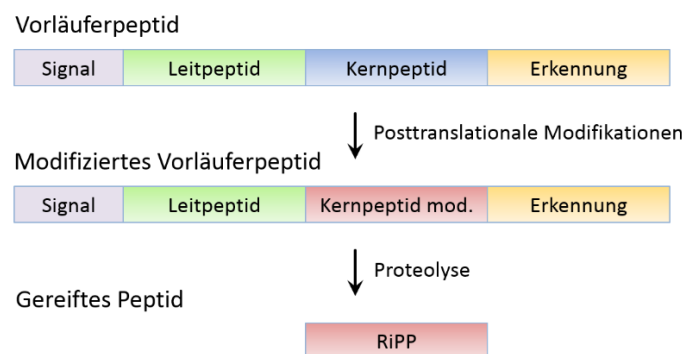
Neben den besprochenen Modifikationen gibt es eine Reihe weiterer struktureller Veränderungen von NRPs, welche nicht durch NRPS-Domänen, sondern durch *in trans*-agierende Enzyme katalysiert werden. Die entsprechenden Gene sind dabei meist zusammen mit den NRPS-kodierenden Genen in einem gemeinsamen Cluster kodiert.<sup>40,41</sup> Häufig wiederkehrende Strukturmodule sind dabei Glykosylierungen, Halogenierungen, Hydroxylierungen oder die oxidative Quervernetzung.<sup>42,44,59</sup> So sind zum Beispiel mittlerweile allein über 4000 halogenierte Naturstoffe bekannt.<sup>60</sup> Viele Enzyme, die an der Installation dieser funktionellen Gruppen beteiligt sind, gehören zu weit verbreiteten und gut untersuchten Familien. So werden Chlorierungen, Bromierungen, oder Iodierungen von einer Vielfalt unterschiedlicher Halogenasen, wie Flavin-abhängige oder Nicht-Eisen-abhängige Halogenasen, durchgeführt,<sup>61</sup> während Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450s) häufig an Hydroxylierung oder der oxidativen Quervernetzung beteiligt sind.<sup>62-64</sup>

Vor allem im Falle von nicht-ribosomalen Peptiden, wie den bereits erwähnten Vancomycin (**12**) und Arylomycin (**19**), sind CYP450s nachweislich oder mutmaßlich an der Installation der strukturegebenden Biaryl- und Biaryletherbindungen beteiligt.<sup>63</sup> Weitere Beispiele umfassen die Glycopeptide A47934, Teicoplanin oder Balhimycin, die aufgrund struktureller Ähnlichkeiten auch zur sogenannten Vancomycin-Gruppe gezählt werden.<sup>65</sup> Die Bestimmung von Zeitpunkt und Ablauf der CYP450-katalysierten Biarylkupplung in unterschiedlichen Glycopeptiden war hierbei Gegenstand zahlreicher Untersuchungen durch verschiedene Arbeitsgruppen.<sup>66-79</sup> Da die Resultate dieser Arbeiten im Kontext der vorliegenden Arbeit in den entsprechenden Kapiteln näher diskutiert werden, soll hier noch nicht näher auf sie eingegangen werden.

### 1.1.2 Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide

Eine Gruppe innerhalb der Naturstoffe, neben den Großfamilien der Polyketide und der nicht-ribosomalen Peptide, welcher erst in den letzten Jahren wieder vermehrte Aufmerksamkeit zuteilgeworden ist, sind die ribosomal kodierten Peptide. Mittlerweile sind eine Vielzahl ribosomal kodierter Peptidnaturstoffe bekannt. Diese reichen von kleinen Molekülen, wie den Microcinen, bis zu Peptiden, wie den Proteusinen, mit einer Länge von mehr als 40 AS.<sup>80,81</sup> Die strukturelle Vielfalt dieser Gruppe wird dabei nicht, wie bei den NRPs, über den Einbau von stark modifizierten Bausteinen durch Multienzymkomplexe hergestellt, sondern durch zahlreichen und weitreichende posttranslationale Modifikationen der proteinogenen Aminosäuren. Diese ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptide tragen dabei viele Veränderungen die auch bei NRPS-basierten Biosynthesen eingebracht werden. So finden sich unter anderem Methylierungen, Hydroxylierungen, Glykosylierungen oder C-C-Verknüpfungen. Aber auch die Bildung von Makrozyklen, Dehydroaminosäuren oder Peptiden mit heterocyclischen Fünfringen, wie Thiazoline oder Oxazoline, ist zu beobachten.<sup>82,83</sup> Abhängig von den Strukturmotiven, welche durch eine Modifikation erzeugt werden, sowie den dabei beteiligten Enzymen, werden mittlerweile über 20 verschiedenen Unterfamilien von RiPPs unterschieden.<sup>83,84</sup>

Gemeinsam ist RiPPs, dass sie als Vorläuferpeptid bestehend aus einem Kern- und einem Leitpeptid synthetisiert werden. Das meist *N*-terminal gelegenen Leitpeptid wird in der Folge vor oder nach der vollständigen Reifung des Kernpeptids zum RiPP proteolytisch abgespalten (Schema 6).<sup>84</sup>



**Schema 6.** Aufbau und Reifung von Vorläuferpeptiden zu fertigen RiPPs, nach Arnison *et al.* (2013).<sup>84</sup> Signal = Signalsequenz, Erkennung = Erkennungssequenz, Kernpeptid mod. = Posttranslational modifiziertes Kernpeptid.

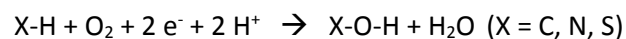
Verschiedene Funktionen des Leitpeptids wurden bisher diskutiert. Untersuchungen aus den letzten Jahren legen die Vermutung nahe, dass es seine Funktion ist als allosterischer Effektor auf Enzyme der Biosynthese zu wirken, um diese in eine aktive Form zu versetzen, und diese Enzyme zu der zu modifizierenden Stelle des Kernpeptids zu leiten.<sup>83</sup> In einigen Fällen wird während der Biosynthese



## 1.2 Cytochrom P450-Enzyme

### 1.2.1 Allgemeines

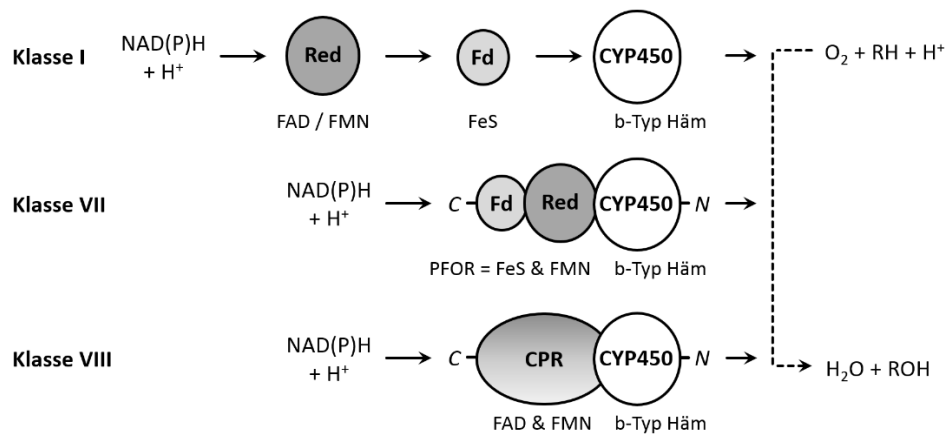
Cytochrom P450-Enzyme bilden eine große Enzymfamilie, deren Mitglieder in allen drei Domänen des Lebens zu finden sind.<sup>99</sup> Zu Beginn dieses Jahrzehnts waren bereits über 18.000 unterschiedliche Mitglieder dieser Familie beschrieben.<sup>100</sup> Funktionell gesehen handelt es sich bei ihnen um Monoxygenasen, die ein b-Typ Häm als prosthetische Gruppe besitzen. Diese verleiht den Enzymen im oxidierten Zustand ein Absorptionsspektrum mit einer charakteristischen Bande bei 420 nm, dem sogenannten Soret-Peak. Wird das zentrale Eisenatom reduziert, ist es in der Lage irreversibel CO zu binden. Aufgrund der Thiolgruppe eines Cysteins, welche einen fünften Liganden des Eisenatoms bildet, verschiebt sich hierbei der Soret-Peak von 420 nm zu den namensgebenden 450 nm.<sup>101</sup> CYP450s sind an verschiedensten Prozessen, wie der Assimilierung von Kohlenstoffen, der Biosynthese von Hormonen und zellulären Strukturelementen, Karzinogenese oder dem Abbau von Xenobiotika, beteiligt. Die katalysierten Reaktionen reichen dabei von Dehalogenierung, *N*-Oxidation, *N*-/*O*-/*S*-Dealkylierung, Desaminierung, Epoxidierung von C-Doppelbindungen bis hin zur Hydroxylierung von Aromaten. Auch atypische Reaktionen, wie Baeyer-Villiger-Oxidationen, C-C oder C-O-Phenolkupplungen (Biarylkupplung), die Spaltung von C-C-Bindungen, oder Umlagerungsreaktionen (Ringbildung oder Arylmigration), können unter passenden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden.<sup>99</sup> Die generelle durch CYP450s katalysierte Reaktionsgleichung lautet dabei:<sup>101,102</sup>



Die beiden für die Reduktion eines Sauerstoffatoms zu Wasser benötigten Elektronen werden dabei durch ein enzymatisches Elektronentransfersystem geliefert. Abhängig von Anzahl und Beschaffenheit der Proteine des assoziierten Systems können hierdurch zehn verschiedene Klassen von CYP450s unterschieden werden.<sup>101</sup> Die meisten bakteriellen CYP450-Systeme gehören der Klasse I an und bestehen aus drei Proteinen, einer NAD(P)H-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Red), einem Ferredoxin (Fd) und dem katalytisch aktiven CYP450 (Schema 7). Erwähnenswert sind auch die Klassen VII und VIII in denen die CYP450s mit Partnern, die den Elektronentransfer bewerkstelligen, fusioniert sind (Schema 7). In Klasse VII ist dies die PFOR (Phthalat-Familie-Oxygenase-Reduktase)-Domäne, welche ein Flavinmononukleotid (FMN) und ein Eisen-Schwefel (FeS)-Cluster als Cofaktoren bindet. In Klasse VIII wird die Reduktion über eine CPR (Cytochrom P450-Reduktase)-Domäne, die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und FMN besitzt, ermöglicht. Bekannte Repräsentanten dieser beiden Klassen sind

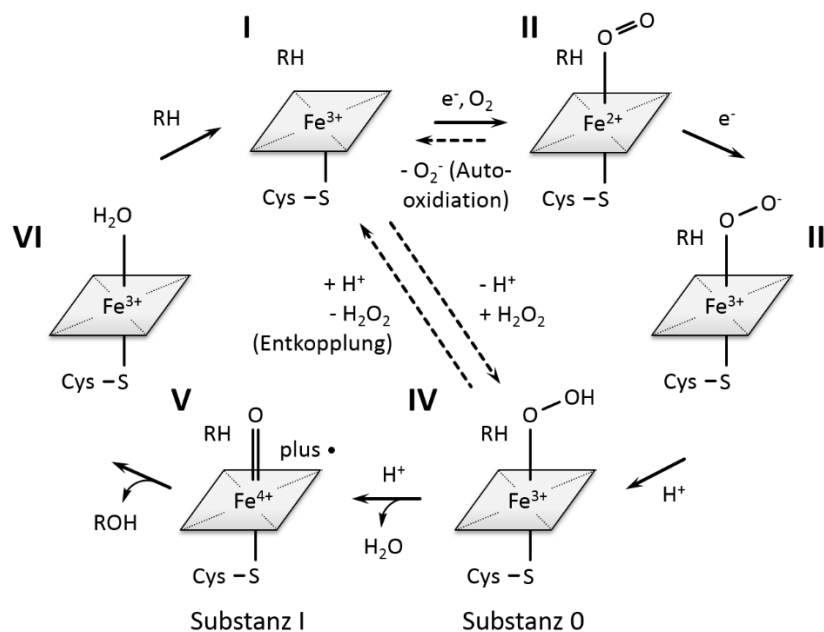
## Einleitung

P450rhF (CYP116B2) aus *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784 (Klasse VII) und P450BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium* (Klasse VIII).<sup>103-106</sup>



**Schema 7.** Aufbau von drei beispielhaften CYP450-Klassen basierend auf dem assoziierten Elektronentransfersystem (Details siehe Text). Die durch die jeweiligen Proteine gebundenen Cofaktoren sind angegeben, *N/C* = *N*- oder *C*-Terminus von Fusionsproteinen, *R* = Substrat.

Der katalytische Zyklus, der hinter der oben genannten Reaktionsgleichung steht, kann in sechs aufeinanderfolgende Schritte unterteilt werden (Schema 8).<sup>62,107</sup>



**Schema 8.** Schematische Repräsentation des katalytischen Zyklus im aktiven Zentrum von Cytochrom P450-Enzymen, modifiziert nach Podust und Sherman (2012) (Details siehe Text).<sup>62</sup>

Im ersten Schritt (I) tritt das Substrat in das aktive Zentrum ein und verdrängt  $\text{H}_2\text{O}$  als axialen Liganden des Häm-Eisenatoms. Daraufhin erfolgen die erste Elektronenübertragung und die Aufnahme eines



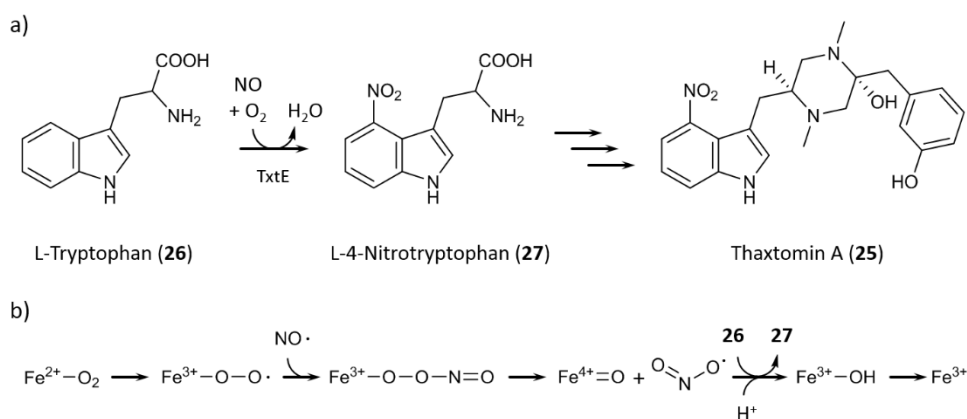
## Einleitung

Sauerstoffmoleküls (II), wobei Eisendioxid entsteht. Der zweiten Elektronenübertragung (III), welche den Sauerstoff zu einem Peroxid reduziert, folgt die Übertragung eines Protons (IV) und Hydroperoxid entsteht. An die zweite Protonierung (V) schließt sich die heterolytische Spaltung der Peroxidbindung an. Es entstehen H<sub>2</sub>O und ein hochreaktives Ferryl-Oxo-Intermediat, das als Substanz I (engl. „Compound I“) bezeichnet wird. Im letzten Schritt (VI) führen die Abstraktion eines Wasserstoffatoms und eine anschließende radikalische Rekombination zur Monooxygenierung des Substrats. Das Reaktionsprodukt wird freigesetzt und das katalytische Zentrum kehrt in seinen Ursprungszustand zurück. Die Bildung von Superoxid ausgehend von Eisendioxid (II) (Autooxidation) oder von Wasserstoffperoxid ausgehend von Hydroperoxid (IV) (Entkopplung) können den katalytischen Zyklus unterbrechen. Ebenso kann die Bindung von Wasserstoffperoxid aber auch dazu führen, dass die ersten drei katalytischen Schritte (I - IV) umgangen werden.<sup>62</sup>

### 1.2.2 Cytochrom P450-Enzyme in biotechnischen Anwendungen

Neben den natürlichen Vorteilen von Enzymen, wie Regio- und Stereoselektivität, hoher katalytischer Effizienz und einer Aktivität in wässrigem Milieu unter milden Bedingungen (pH, Temperatur, Druck),<sup>108</sup> gibt es weitere Eigenschaften, aufgrund derer sich Cytochrom-P450-Enzyme für eine Nutzung in biotechnischen Anwendungen eignen. Hierzu zählen unter anderem, dass sie in der Lage sind das leicht zugängliche Cosubstrat O<sub>2</sub> zu aktivieren und damit die Oxidationen von ansonsten inerten C-Atomen zu katalysieren. Auch das große Substratspektrum und die Vielfalt von katalysierten Reaktionen ist dabei ein Plus von CYP450-basierten Biosynthesen.<sup>109</sup> Hinzu kommt, dass regelmäßig neue Varianten von CYP450s, assoziierten Proteinen und CYP450-katalysierte Reaktionen entdeckt werden.<sup>110,111</sup> Als Beispiel sei hier TxtE genannt, das an der Synthese des Phytotoxins Thaxtomin A (**25**) aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Streptomyces turgidiscabies* beteiligt ist (Schema 9a). Hier katalysiert es eine für CYP450s höchst ungewöhnliche Nitrierung von L-Tryptophan (**26**) zu L-4-Nitrotryptophan (**27**), welche essentiell für die Ausbildung der Phytotoxizität ist.<sup>112,113</sup> Ausgehend von der Fe<sup>2+</sup>O<sub>2</sub>-Form des Enzyms (Schema 8, II), die mit NO reagiert, wird hierbei ein Eisen (III)-Peroxynitrit-Komplex gebildet (Schema 9b). Homolytische Spaltung dieses Komplexes erzeugt ein NO<sub>2</sub>-Radikal und die Fe<sup>4+</sup>O-Form des CYP450 (Schema 8, V). Letztere abstrahiert nun ein Wasserstoffatom vom Substrat, was zur Addition des NO-Radikals und der Bildung einer Fe<sup>3+</sup>OH-Form führt, die durch eine weitere Protonierung wieder in den Fe<sup>3+</sup>-Grundzustand (Schema 8, I) überführt werden kann.<sup>113</sup>

## Einleitung

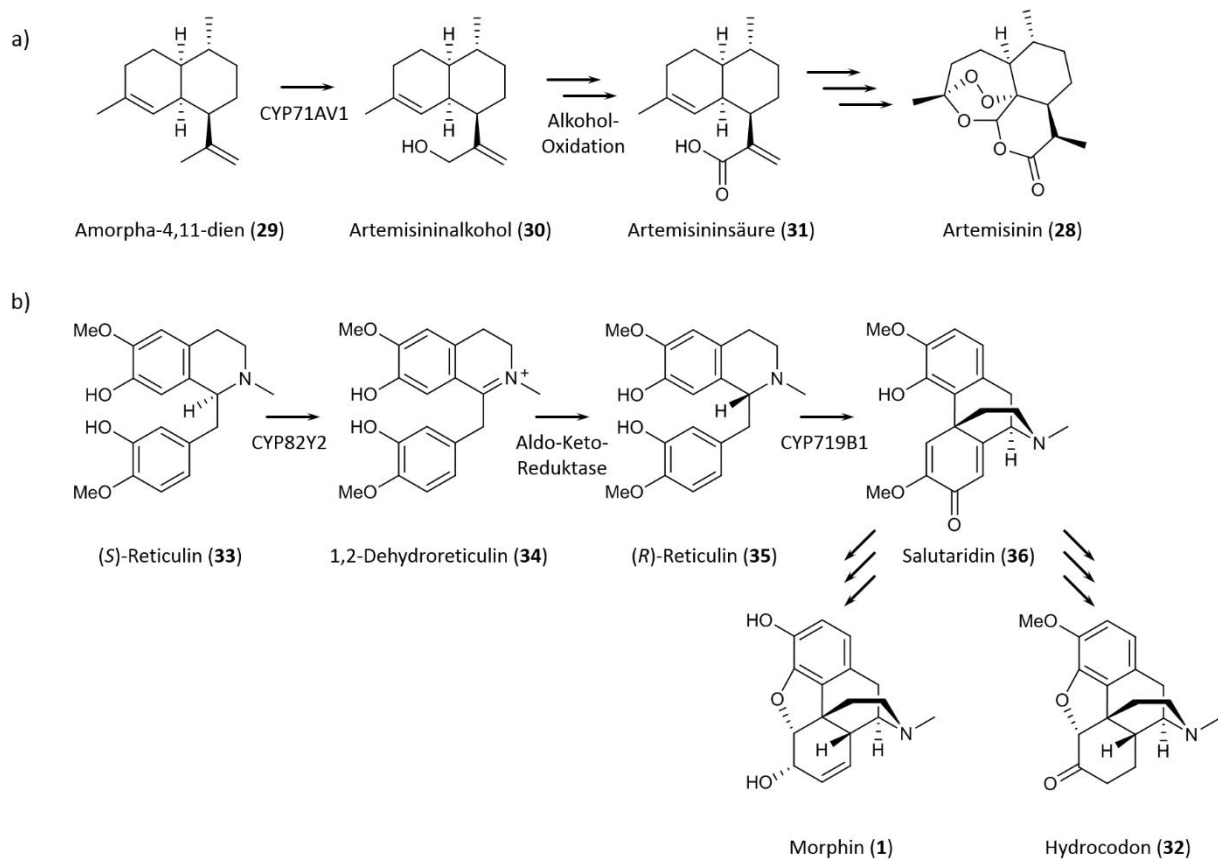


**Schema 9.** a) Durch das CYP450 TxE katalysierte Nitrierung während der Biosynthese von Thaxtomin A (**25**). b) Detail der zugrundeliegenden Reaktion im aktiven Zentrum von TxE, modifiziert nach Guengerich und Munro (2013).<sup>111</sup>

All dies hat zur erfolgreichen Verwendung einer Vielzahl von CYP450s in industriellen Prozessen und synthetischer Biologie geführt und macht sie auch weiterhin zu interessanten Kandidaten für eine Weiterentwicklung zu Biokatalysatoren.<sup>109,114,115</sup> So wird seit kurzem das Antimalariamittel Artemisinin (**28**) (Abb. 1) unter Nutzung eines genetisch veränderten Hefestamms durch die Firma Sanofi produziert.<sup>109</sup> Hierbei wird unter anderem das pflanzliche Enzym CYP71AV1 aus dem Artemisinin-Produzenten *Artemisia annua* überproduziert, welches den ersten Schritt einer dreistufigen Oxidation des Artemisinin-Vorläufers Amorpha-4,11-dien (**29**) an C12-Position katalysiert (Schema 10). Hierdurch entsteht erst Artemisininalkohol (**30**) und in der Folge Artemisininsäure (**31**), welche zur chemischen Synthese von Artemisinin (**28**) verwendet werden kann.<sup>116</sup> Ebenso kann Hydrocodon (**32**), ein Derivat des Opiats Morphin (**1**) (Abb. 1), mittels einer optimierten Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae* gebildet werden.<sup>117</sup> Hierbei finden zwei CYP450s Verwendung, die auch in *Papaver somniferum* an der Synthese von Morphin (**1**) beteiligt sind. Das erste CYP450 (CYP82Y2) ist dabei Teil des Fusionsproteins Reticulin-Epimerase und katalysiert die Umwandlung von (*S*)-Reticulin (**33**) zu 1,2-Dehydroreticulिन (**34**) (Schema 10). Eine Aldo-Keto-Reduktase, welche den zweiten Teil der Reticulin-Epimerase bildet, ist dann für die Bildung von (*R*)-Reticulin (**35**) verantwortlich.<sup>118</sup> Aus diesem wird anschließend durch das zweite CYP450 (CYP719B1) unter oxidativer C-C-Verknüpfung der beiden Aromaten Salutaridin (**36**) gebildet.<sup>119</sup> Weitere enzymatische Schritte führen in der Folge zur Bildung von Hydrocodon (**32**), Morphin (**1**) oder anderer Morphin-Derivate.<sup>117,120</sup>

Weitere bekannte Beispiele, bei denen CYP450s an der Synthese von industriell oder kommerziell relevanten Substanzen beteiligt sind, beinhalten die Biotransformation von Compactin zum cholesterinsenkenenden Pravastatin in *Streptomyces carbophilus* (Fa. Daiichi Sankyo, Inc., USA und Bristol-Myers Squibb, USA) oder die Produktion der Steroidhormone Cortison mittels *Rhizopus* sp. (Fa. Pfizer) oder Cortisol (Hydrocortison) mittels *Curvularia* sp. (Fa. Bayer).<sup>109</sup>

## Einleitung



**Schema 10.** CYP450-basierte Synthesen von **a)** Artemisinin (28) und **b)** Hydrocodon (32) bzw. Morphine (1).

Neben den oben erwähnten Vorteilen gibt es auch viele Herausforderungen, die bei der Verwendung CYP450-basierter Biosynthesen auftreten können. Hierzu zählen eine zum Teil niedrige Aktivität der Enzyme, die Abhängigkeit von Partnerproteinen für die Bereitstellung von Elektronen und dem kostenintensiven Cofaktor NADPH, die Möglichkeit der Entkopplung des katalytischen Zyklus sowie die schlechte Löslichkeit potentieller Substrate, bzw. die geringe Toleranz von CYP450s gegenüber organischen Lösungsmitteln.<sup>109,121</sup>

Eine Lösung dieser Probleme kann über Veränderung und Entwicklung der Proteinstruktur erfolgen. Wie bei vielen anderen Enzymen auch, sind gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign hierbei die Mittel der Wahl für CYP450s.<sup>99,121</sup> Rationales Proteindesign basiert auf Veränderungen von Proteinstruktur und -eigenschaften, welche aufgrund bereits vorhandener Daten geplant und durchgeführt werden. Gerichtete Evolution wiederum beruht auf der zufälligen Mutation der kodierenden Gene, gefolgt von einer spezifischen und sensitiven Durchmusterung der so erzeugten Enzymbibliotheken, um Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften zu identifizieren. Hierbei werden keine näheren Informationen über die Eigenschaften der jeweiligen Proteine benötigt.<sup>108</sup> Gerade für CYP450s ist dies von Vorteil, da nur wenige der bekannten Mitglieder dieser Familie bislang detaillierten strukturellen Untersuchungen unterzogen wurden. Sind wiederum Strukturen

## Einleitung

vorhanden, erschweren die große Anzahl an möglichen Resten, die mit dem Substrat interagieren, sowie die schwankende Zuverlässigkeit von 3D-Modellen, die eine CYP450-Substrat-Interaktion simulieren, ein rationales Proteindesign.<sup>99,109,121</sup>

Eines der CYP450, das wahrscheinlich am häufigsten und weitreichendsten Veränderungen unterzogen wurde, ist dabei P450BM3 aus *Bacillus megaterium* (auch CYP102A1).<sup>99,103</sup> P450BM3 katalysiert unter natürlichen Umständen die Hydroxylierung von C<sub>12</sub>- bis C<sub>18</sub>-Fettsäuren.<sup>122,123</sup> Eine Verwendung dieses Enzyms in biotechnologischen Anwendungen ist besonders interessant, da es zur bereits erwähnten CYP450-Klasse VIII (Schema 7) gehört, wodurch die Notwendigkeit weiterer Elektronenlieferanten entfällt.<sup>124</sup> Außerdem besitzt es mit einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von 17.000 min<sup>-1</sup> bei Verwendung des Substrats Arachidonsäure eine der höchsten Aktivitäten aller bekannten CYP450s.<sup>125</sup>

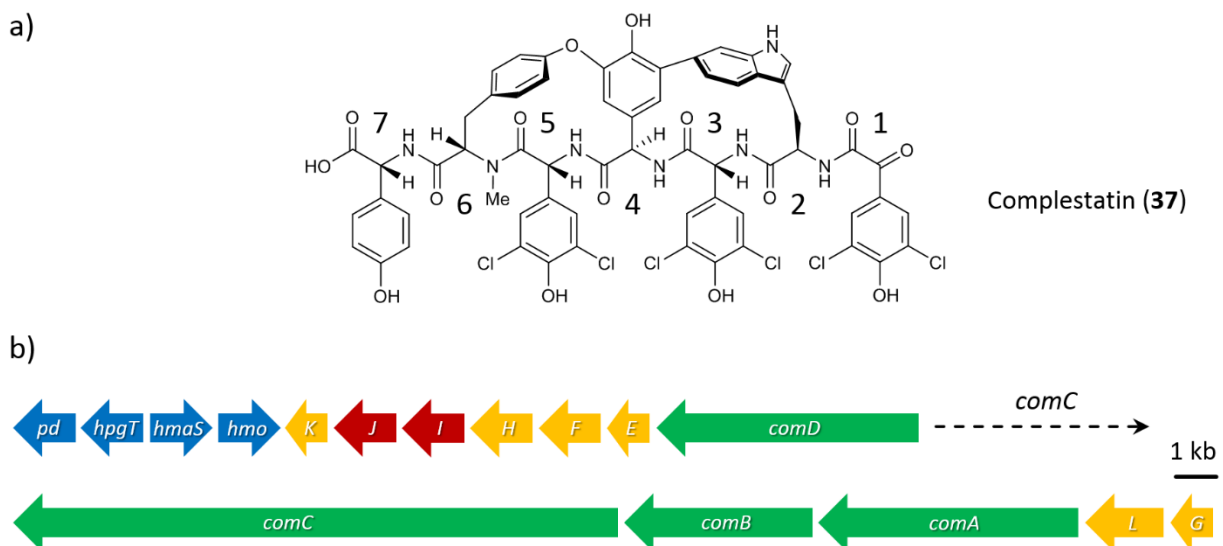
Im Lauf der letzten beiden Jahrzehnte wurden die beiden oben beschriebenen Ansätze verwendet, um sowohl Aktivität als auch das Substratspektrum von P450BM3 zu verändern. Die Fettsäurehydroxylase wurde dabei so modifiziert, dass sie neben den ursprünglichen Substraten auch Alkane, Terpene, Heteroaromaten, Alkaloide, Steroide und weitere Substanzklassen oxidiert. Die dabei katalysierten Reaktionen beinhalten Hydroxylierungen, Epoxidierungen und Demethylierungen.<sup>99,115</sup>

## 2 Hintergrund und Zielsetzung

### 2.1 Complestatin (37)

#### 2.1.1 Hintergrund

Das Heptapeptid Complestatin (**37**), welches auch unter dem Namen Chloropeptin II bekannt ist, wird von dem Actinomyceten *Streptomyces lavendulae* produziert und ist in der Lage das menschliche Komplementsystem zu inhibieren.<sup>126</sup> Es besteht aus den proteinogenen Aminosäuren Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) sowie der nicht-proteinogenen Aminosäure *para*-Hydroxyphenylglycin (*p*-Hpg) und dessen Derivat *para*-Hydroxybenzoylformiat (*p*-Hbf) (Abb. 10a). Hierbei sind die Startereinheit *p*-Hbf und zwei der vier *p*-Hpg-Bausteine an zwei Positionen chloriert. Gekennzeichnet ist das Peptid durch eine Biarylbindung zwischen den Positionen zwei (Trp) und vier (*p*-Hpg) der Peptidkette und eine Biaryletherbindung zwischen den Positionen vier (*p*-Hpg) und sechs (Tyr).



**Abb. 10. a)** Strukturformel von Complestatin (**37**). Die Nummerierung zeigt die Reihenfolge an in der die Bausteine in die wachsende Peptidkette integriert werden. **b)** Biosynthetisches Complestatin-Gencluster von *S. lavendulae*. Einzelne Buchstaben indizieren die jeweiligen Complestatin-Gene. Die Darstellung von *comE* (222 bp) und *comK* (219 bp) ist nicht maßstabsgerecht.

Die Biosynthese von Complestatin (**37**) ist NRPS-basiert. Die 16 kodierende DNA-Sequenzen (engl. „Coding DNA sequence“, CDS) der beteiligten Proteine liegen in einem einzigen Gencluster (Abb. 10b).<sup>127</sup> Die Funktionen der im Cluster kodierten Proteine kann über bioinformatische Analysen vorhergesagt werden (Tab. 1). So wird die Biosynthese des Heptapeptids durch vier NRPS (ComABCD) und ein Mbth-ähnliches Protein (ComE) katalysiert (Schema 11). Die terminale NRPS ComD besitzt dabei eine X-Domäne an vorletzter Position.<sup>45</sup>

## Hintergrund und Zielsetzung

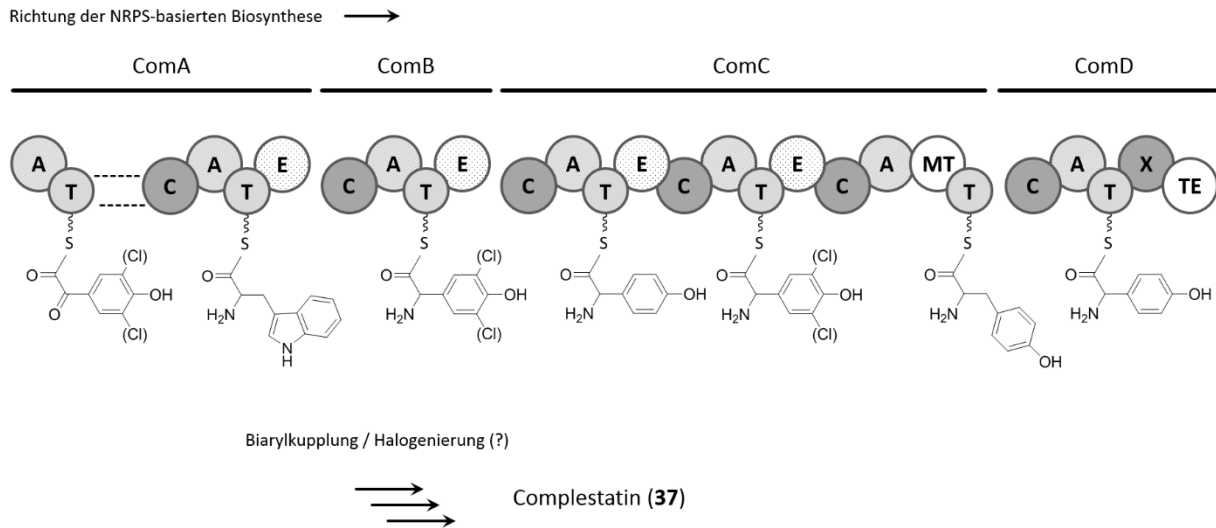
**Tab. 1.** Im Complestatin-Gencluster von *S. lavendulae* kodierte Proteine, modifiziert nach Chiu *et al.* (2001).<sup>127</sup>

CDS-Nummer	Protein	Vorhergesagte Funktion (NRPS-Domänen)	Anzahl AS	GenBank / NCBI-ID
1	ComG	Transkriptionsregulator	348	AAK81822
2	ComL	ABC-Transporter	708	AAK81823
3	ComA	NRPS (A-T-C-A-T-E)	2.116	AAK81824
4	ComB	NRPS (C-A-T-E)	1.531	AAK81825
5	ComC	NRPS (C-A-T-E-C-A-T-E-C-A-MT-T)	4.898	AAK81826
6	ComD	NRPS (C-A-T-X-TE)	2.164	AAK81827
7	ComE	Hypothetisches / MbtH-ähnliches Protein	73	AAK81828
8	ComF	Integraler Membran-Ionen-Antiporter	425	AAK81829
9	ComH	Nicht-Häm-abhängige Halogenase	497	AAK81830
10	ComI	Cytochrom P450-abhängige Oxidase	397	AAK81831
11	ComJ	Cytochrom P450-abhängige Oxidase	423	AAK81832
12	ComK	Ferredoxin	72	AAK81833
13	Hmo	<i>p</i> -Hydroxymandelat-Oxidase	372	AAK81834
14	HmaS	<i>p</i> -Hydroxymandelat-Synthase	338	AAK81835
15	HpgT	<i>p</i> -Hydroxyphenylglycin-Aminotransferase	448	AAK81836
16	PD	Prephenat-Dehydrogenase	382	AAK81837

Domänen dieses Typs sind während der NRPS-basierten Biosynthese verschiedener Glycopeptide an der Rekrutierung der biarylkupplenden CYP450s und damit der Installation von Biaryl- und Biaryletherbindungen beteiligt.<sup>74,75,77,79</sup> Vier weitere Enzyme dienen der Bildung von *p*-Hpg und *p*-Hbf (Hmo, HmaS, HpgT, PD) und vier Proteine sind an Modifikationen der Peptidkette beteiligt. Hierbei handelt es sich um die nicht-Häm-abhängige Halogenase ComH, welche mutmaßlich die Chlorierung von *p*-Hpg und *p*-Hbf bewerkstelligt, sowie die CYP450s ComI und ComJ, die mit dem Ferredoxin ComK als Elektronendonator, die Installation der Biarylbindungen katalysieren. Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass ComI die Biaryl- und ComJ die Biaryletherbindung in das Peptidrückgrat einbringt. Dafür wurde das Complestatin-Gencluster heterolog in *S. lividans* TK24 exprimiert, wobei je eines der beiden CYP450-Gene deletiert wurde. Die Analyse der so gebildeten Produkte erlaubte anschließend einen Rückschluss auf die jeweiligen Reaktionen, welche die beiden CYP450s katalysieren. Weiterhin lassen diese Experimente vermuten, dass die Ausbildung der Biarylbindung von einer vorherigen Installation des Biarylethers abhängt.<sup>128</sup> Der genaue Zeitpunkt der Biarylkupplung und eine mögliche Beteiligung der X-Domäne von ComD wurden noch nicht näher untersucht. Auch im Falle von ComH ist noch nicht genau geklärt, wann eine Halogenierung erfolgt. Bisher wurde vermutet, dass dies vor einer Aktivierung der *p*-Hpg und *p*-Hbf-Bausteine durch die jeweiligen A-Domänen geschieht.<sup>127</sup> Kürzlich

## Hintergrund und Zielsetzung

veröffentlichte Ergebnisse zur Halogenierung während der Glycopeptid-Biosynthese zeigen allerdings, dass das Substrat hier eine PCP-gebundene Aminosäure ist. Freie Aminosäuren oder PCP-gebundene Peptide werden nicht halogeniert.<sup>129</sup> Weitere im Complestatin-Cluster kodierte Proteine sind vermutlich an Regulation der Biosynthese (ComG) oder am Transport/Export (ComLF) beteiligt.

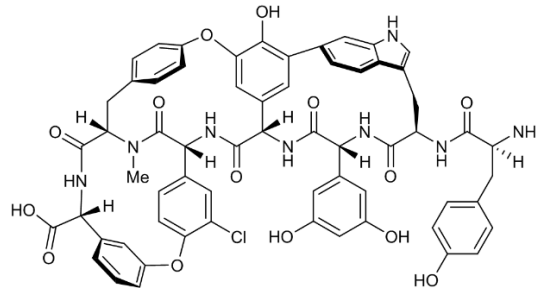


**Schema 11.** Biosynthese von Complestatin (37) durch die vier NRPS ComABCD. Der exakte Zeitpunkt der Halogenierung ist noch unklar, daher sind die Chloratome in Klammern dargestellt.

Der Naturstoff Complestatin (37) ist von besonderem Interesse, da er eine Vielzahl biologischer Aktivitäten aufweist. So zeigte sich in verschiedenen Untersuchungen, dass Complestatin (37) in der Lage ist, apoptotischen Zelltod zu verhindern und Nervenzellen vor induzierter Neurotoxizität zu schützen.<sup>130-132</sup> Complestatin (37) besitzt zudem antivirale Eigenschaften. So verhindert es die Infektion von MT-4-Zellen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ohne gesteigerte Zytotoxizität.<sup>133</sup> Die Wirkung beruht dabei auf einer Inhibition der Bindung zwischen dem Oberflächenprotein Gp120 des HI-Virus und dem humanen CD4-Rezeptor, was unter normalen Umständen eine Verschmelzung von Virus und Zielzelle ermöglicht.<sup>134-136</sup> Strukturelle Varianten von 37, wie Chloropeptin I oder Isocomplestatin, scheinen außerdem das Enzym HIV-1-Integrase, welches für die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom verantwortlich ist, zu hemmen.<sup>137,138</sup> Neuere Untersuchungen zeigen, dass Complestatin (37) auch antibiotische Aktivität besitzt, welche auf einer Inhibition der bakteriellen Fettsäurebiosynthese beruht.<sup>139</sup> Die strukturgebenden Biarylbindungen scheinen dabei für die Aktivität eine besondere Rolle zu spielen. So zeigten die Untersuchungen zur Hemmung der HIV-1-Integraseaktivität, dass auch kürzere Fragmente von Chloropeptin I, in denen beide Ringsysteme intakt waren, eine ähnliche Aktivität wie das vollständige Peptid besaßen. Wurde jedoch der Ring geöffnet, der durch die Knüpfung der Biaryletherbindung zwischen den Positionen vier und sechs entsteht, ging diese Aktivität zu signifikanten Teilen verloren.<sup>137,138</sup>

## Hintergrund und Zielsetzung

Ein strukturell eng zu Complestatin (**37**) verwandter Naturstoff, der ebenfalls antivirale Eigenschaften zeigt, ist Kistamicin A (**38**) (Abb. 11).<sup>136</sup> Kürzlich wurde die Entdeckung des Kistamicin-Genclusters in den Actinomyceten *Nonomuraea* sp. ATCC 55076 und *Actinomadura parvosata* subsp. *kistnae* beschrieben.<sup>140,141</sup> Interessanterweise kodiert dieses nur zwei Cytochrom P450-Enzyme, welche potentiell die Ausbildung einer Biarylbindung und zweier Biaryletherbindungen katalysieren.



Kistamicin A (**38**)

Abb. 11. Strukturformel von Kistamicin A (**38**).

Verschiedene chemische Totalsynthesen von Complestatin (**37**) wurden bereits durchgeführt.<sup>142-144</sup> Aufgrund umfangreicher Schutzgruppenchemie, insbesondere in Zusammenhang mit der Installation der beiden Biarylbindungen, resultieren diese jedoch in langen, linearen Syntheserouten mit geringen Ausbeuten. Eine chemo-enzymatische Synthese unter Verwendung der biarylkuppelnden Enzyme ComI und ComJ zur Verbesserung von Ausbeute und gleichzeitiger Verkürzung der Synthese wäre daher von Interesse. Dies könnte eine weitere Erforschung von Complestatin (**37**) als vielversprechendem, medizinischem Wirkstoff ermöglichen.

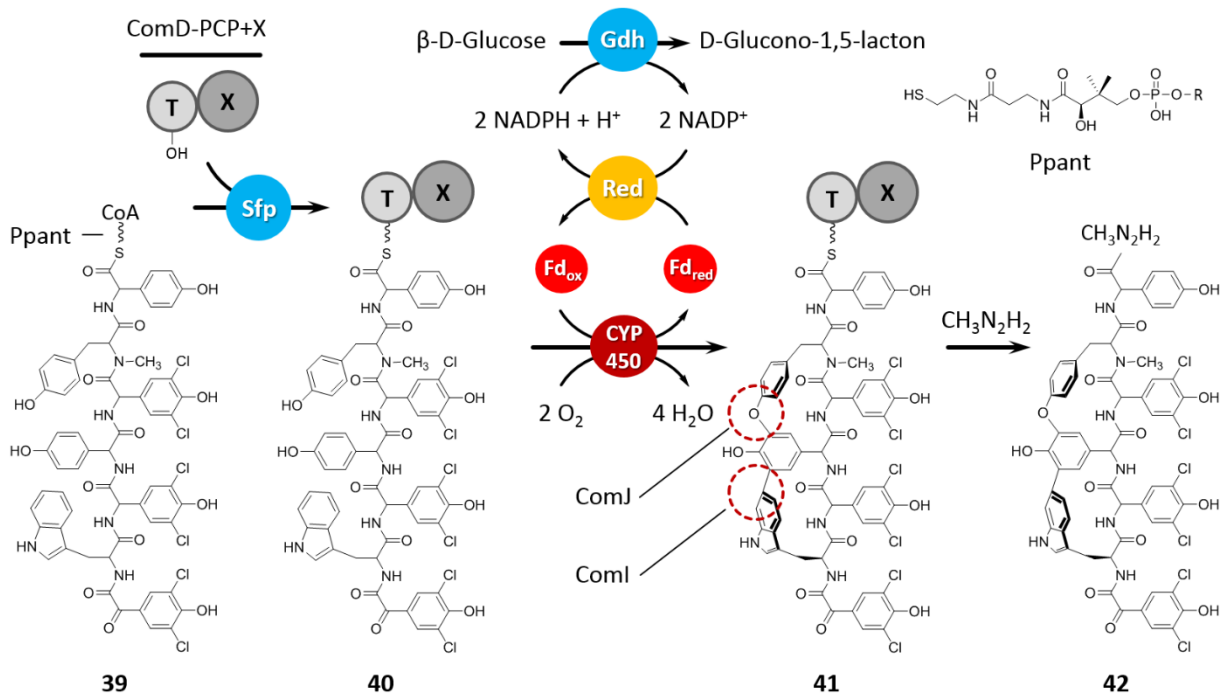
### 2.1.2 Ziele

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, ein enzymatisches System zur chemo-enzymatischen Totalsynthese von Complestatin (**37**) zu etablieren. Dabei soll das lineare Complestatin-Heptapeptid in Form eines aktivierten Coenzym A-Thioesters (**39**), welcher in der Arbeitsgruppe Gulder von Frau Dr. Aldemir synthetisiert wird, als Ausgangspunkt für eine Reihe enzymatischer Reaktionsschritte dienen (Schema 12). In einem ersten Schritt werden das Heptapeptid und der Ppant-Arm des Substrats **39** unter Abspaltung der 3',5'-ADP-Gruppe von Coenzym A (**17**) auf die PCP-Domäne von ComD übertragen (ComD-PCP). Diese Domäne befindet sich in der nativen Complestatin-Biosynthese in *Streptomyces lavendulae* am C-Terminus der terminalen NRPS ComD und trägt auch hier das Heptapeptid. ComD-PCP sollte erst als freistehendes Protein verwendet werden. Nachdem jedoch die Beteiligung einer



## Hintergrund und Zielsetzung

X-Domäne an der Biarylkupplung von Glycopeptiden bekannt wurde,<sup>75</sup> sollte auch unser System um die X-Domäne von ComD ergänzt und die entsprechende Didomäne (ComD-PCP+X) genutzt werden. Für die Übertragung wird die gut etablierte Surfactin-Phosphopantetheinyltransferase (Sfp) aus *Bacillus subtilis* verwendet.<sup>145-148</sup> Das auf diese Weise generierte, PCP-gebundene Substrat **40** wird dann dem eigentlichen enzymatischen Assay zugeführt, das die Cytochrom P450-Enzyme ComI und ComJ (beide aus *S. lavendulae*) für die oxidative Kupplung des Heptapeptids und ein System zur Bereitstellung von Elektronen beinhaltet. Dieses System besteht aus einer Reduktase (Red), die in der Lage ist, Elektronen von NADPH auf oxidiertes Ferredoxin (Fd<sub>ox</sub>) zu übertragen. Das so erzeugte reduzierte Ferredoxin (Fd<sub>red</sub>) dient nun als Elektronendonator für ComI und ComJ, welche unter Reduktion von Sauerstoff zu Wasser (vgl. auch den katalytischen Zyklus im aktiven Zentrum von CYP450s, Schema 8) die oxidative Quervernetzung der linearen Complestatinkette bewerkstelligen. Hierbei entsteht Complestatin in PCP-gebundener Form (**41**).



**Schema 12.** Darstellung des enzymatischen Assays zur Installation von Biaryl- und Biaryletherbindung an einem linearen, PCP-gebundenen Vorläuferpeptid von Complestatin (**40**) mittel der Cytochrom P450-Enzyme ComI und ComJ, modifiziert nach Aldemir (2015) (Details siehe Text).<sup>149</sup>

Für die Assays sollen dabei unterschiedliche Elektronendonorsysteme getestet werden, um das geeignetste für eine Reduktion von ComI und ComJ zu identifizieren. Hierbei handelt es sich um das Fpr/PetF-System, bestehend aus der flavinabhängigen NADPH-Fd-Oxidoreduktase (Fpr) aus *E. coli* und Spinat-Ferredoxin (PetF),<sup>69</sup> und das AdR/Adx-System aus Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und Adrenodoxin (Adx) des Rinds.<sup>150</sup> Die Reduktasen beider Systeme sollen weiterhin in Kombination mit

## Hintergrund und Zielsetzung

dem im Complestatin-Gencluster kodierten Ferredoxin ComK getestet werden, welches vermutlich der native Elektronendonator für ComI und ComJ ist. Eine Regeneration des eigentlichen Elektronendonors für diese Systeme, NADPH, soll unter Oxidation von Glucose zu Glucono-1,5-lacton durch die Glucose-Dehydrogenase (Gdh) aus *Bacillus megaterium* erfolgen,<sup>151</sup> um den Verbrauch dieses kostenintensiven Coenzym zu begrenzen. Durch Zugabe von Methylhydrazin (CH<sub>3</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) kann abschließend zu analytischen Zwecken der Complestatin-Rest von der Didomäne ComD-PCP+X abgespalten werden, um das entsprechende Derivat **42** zu generieren.

Für das geplante enzymatische System (Schema 12) ist es notwendig, alle beteiligten Proteine heterolog zu exprimieren. Da dies in rekombinanter Form geschieht, sollen sie auf Funktionalität und die Fähigkeit zur Interaktion (z. B. Sfp mit neuen PCP-Domänen) überprüft werden. Die Proteine der Complestatin-Biosynthese sollten außerdem durch weitere Analysen, wie die UV/VIS-Spektroskopie, näher charakterisiert werden. Bei erfolgreicher Durchführung der enzymatischen Assays soll versucht werden, diese weiter zu optimieren. Dies könnte durch Veränderung der Reaktionsbedingungen, wie Temperatur oder pH-Wert, oder einzelner Assay-Bestandteile, z. B. durch Verwendung von Fusionsproteinen aus CYP450, Red und Fd, erreicht werden.

Zum besseren Verständnis des Prozesses von Biarylkupplungen im Allgemeinen und der Kupplungen von Complestatin (**37**) im Speziellen sollten außerdem die beiden beteiligten CYP450s ComI und ComJ kristallisiert und strukturell analysiert werden.

## **2.2 Biarylhaltige Peptide mit unbekannter Biosynthese**

### **2.2.1 Die Biphenomycin-Familie (43 - 46), Hintergrund und Ziele**

Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind bei der Suche nach unbekanntem Naturstoffverbindungen eine Vielzahl neuartiger Substanzen entdeckt worden.<sup>34</sup> Die Bestimmung von Struktur, Konfiguration und biologischer Aktivität waren dabei obligatorisch. In Zeiten der ‚Prä-Genom Ära‘ blieben die entsprechenden Biosynthesewege jedoch häufig unerforscht. Erst mit einer leichteren Zugänglichkeit von genomischen Informationen durch fortschrittlichere und erschwinglichere Sequenziermethoden war es möglich, viele Naturstoffe einem entsprechenden Gencluster zuzuordnen. Ein besseres Verständnis der beteiligten enzymatischen Reaktionen bestimmter Naturstoffklassen ermöglichte es außerdem, konservierte Gene für eine Identifizierung der jeweiligen Gencluster heranzuziehen.<sup>40,152-154</sup> Auch die Biphenomycine A, B und C (**43 - 45**) aus *Streptomyces griseorubiginosus* sowie das Molekül LL-AF283β (**46**) aus *Streptomyces filipinensis* gehören zu den Naturstoffen, deren Biosynthese noch unbekannt ist.<sup>155-159</sup> Sie scheinen jedoch gemeinsamen Ursprungs zu sein. Neben ihrer engen strukturellen Verwandtschaft (Abb. 12) ist ein Hinweis hierauf die Tatsache, dass

## Hintergrund und Zielsetzung

*S. filipinensis* in der Lage ist, neben LL-AF283 $\beta$  (**46**) auch Biphenomycin A (**43**) zu bilden.<sup>158</sup> Ebenso geht die Synthese von Biphenomycin A (**43**) in *S. griseorubiginosus* mit der Bildung von Biphenomycin C (**45**) einher. Hierbei ist zu beobachten, dass **45** in **43** umgewandelt werden kann, wodurch die antibiotische Aktivität des Moleküls zunimmt. Biphenomycin C (**45**) könnte demzufolge ein Vorläufer von Biphenomycin A (**43**) sein.<sup>159,160</sup> Die vier Moleküle **43** - **46** lassen sich somit zur Biphenomycin-Familie zusammenfassen. Im Detail handelt es sich bei ihnen um kleine Peptide, die aus drei bis fünf, teils nicht proteinogenen Aminosäuren bestehen (Abb. 12).

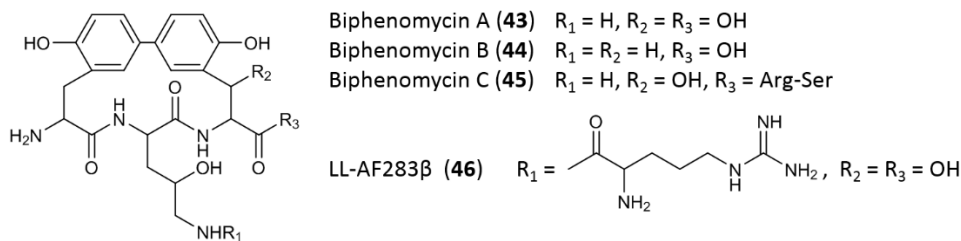


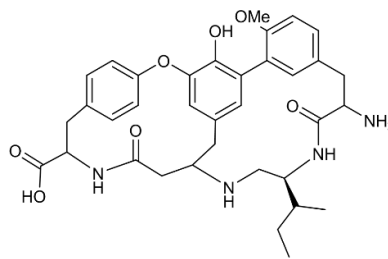
Abb. 12. Strukturformeln von Biphenomycin A, B und C (**43** - **45**) und LL-AF283 $\beta$  (**46**).

Der Einbau von Ornithin, *ortho*-Tyrosin oder  $\beta$ -Hydroxy-*ortho*-Tyrosin lässt dabei eine NRPS-basierte Biosynthese vermuten, da die Verwendung stark modifizierter Aminosäurebausteine charakteristisch für nicht-ribosomale Peptide ist.<sup>40-42</sup> Alle Mitglieder der Biphenomycin-Familie (**43** - **46**) besitzen außerdem eine strukturgebende Biarylbindung zwischen den aromatischen Seitenketten der Tyrosinbausteine. Intramolekulare Biaryl- oder Biaryletherbindungen in Peptiden werden in allen bislang bekannten Fällen durch Cytochrom P450-Enzyme installiert.<sup>63,66,68,128</sup> Dies legt nahe, dass auch die Ausbildung der Biarylbindungen in **43** - **46** durch CYP450s katalysiert wird.

Neben ungewöhnlichen Strukturmotiven, wie der Biarylbindung oder den beiden *ortho*-Tyrosinen, sind die Peptide **43** - **46** der Biphenomycin-Familie auch aufgrund ihrer antibiotischen Aktivität interessant.<sup>156,158,159</sup> Ein Ziel im Rahmen dieser Arbeit sollte es daher sein, das Gencluster, welches für die entsprechende Biosynthesemaschinerie kodiert, zu identifizieren. Die genomische Information könnte dann als Grundlage für weitere Versuche, wie die heterologe Expressionen des Clusters, dienen. Weiterhin könnten die beteiligten Enzyme durch *in vitro*-Experimente näher charakterisiert werden, um den Ablauf der Biosynthese und die Art und Weise der eingebrachten, strukturellen Modifikationen besser zu verstehen. Von besonderem Interesse wäre dabei das CYP450, welches mutmaßlich an der Ausbildung der Biarylbindung beteiligt ist.

### 2.2.2 Cittilin A (47), Hintergrund und Ziele

Neben den bereits erwähnten NRPs mit Biaryl- und/oder Biaryletherbindungen, wie Vancomycin (**12**) oder Complestatin (**37**), finden sich im reichhaltigen Fundus der Natur noch weitere Peptide mit diesen Strukturmotiven. Ein Beispiel hierfür ist Cittilin A (**47**) aus *Myxococcus xanthus* DK1622, welches aus einem Isoleucin- und drei Tyrosinbausteinen besteht. Cittilin A (**47**) ist durch eine *O*-Methylierung des ersten Tyrosinrests sowie je eine Biaryl- und eine Biaryletherbindung gekennzeichnet (Abb. 13).<sup>161,162</sup>



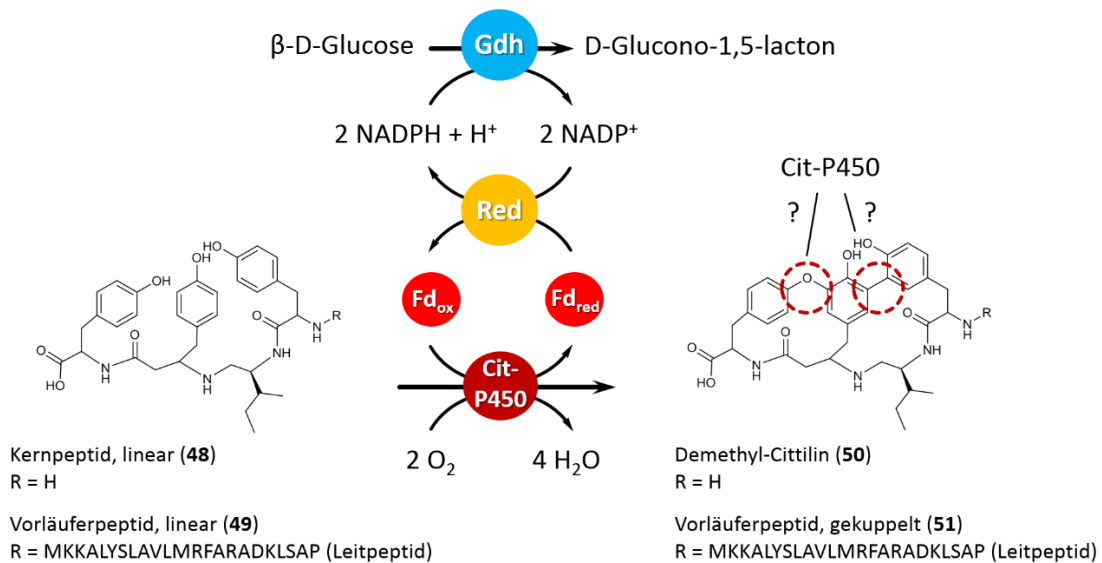
Cittilin A (**47**)

Abb. 13. Strukturformel von Cittilin A (**47**).

Bisherige Untersuchungen der Biosynthese von **47** haben gezeigt, dass es sich überraschenderweise um ein RiPP handelt. Angrenzend an das Gen, welches für das entsprechende Vorläuferpeptid kodiert, finden sich hierbei die Gene einer Methyltransferase und eines CYP450. Für die Methyltransferase wurde bereits eine Beteiligung an der Methylierung des ersten Tyrosinrests von Cittilin (**47**) nachgewiesen (Prof. Rolf Müller, Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Saarbrücken; unpublizierte Ergebnisse). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass auch das CYP450 bei der Modifizierung des Cittilin-Kernpeptids eine Rolle spielt. Die Ausbildung welcher Biarylbindungen dieses Cytochrom P450-Enzym (in der Folge als Cit-P450 bezeichnet) dabei katalysiert, ist noch völlig unklar. Um dies näher zu untersuchen, sollte das für Cit-P450 kodierende Gen heterolog exprimiert und in einem enzymatischen Assay, wie er auch für Complestatin (**37**) verwendet wurde, genutzt werden (Schema 13). Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Cittilin A (**47**) um ein RiPP handelt, entfällt hierbei die Notwendigkeit eventuelle Substrate durch Bindung an Trägerproteine zu aktivieren. Vielmehr können das aus vier Aminosäuren bestehende, lineare Kernpeptid (**48**) und das lineare Cittilin A-Vorläuferpeptid (**49**) direkt eingesetzt werden.

## Hintergrund und Zielsetzung

Falls Cit-P450 tatsächlich die Ausbildung beider Biarylbindungen katalysiert, sollten hierbei Demethyl-Cittilin (**50**) oder das gekoppelte Vorläuferpeptid (**51**) entstehen.



**Schema 13.** Variante des enzymatischen Assays für eine mögliche Biarylkupplung der linearen Peptide **48** und **49** zur Generierung von Demethyl-Cittilin (**50**) oder des Cittilin A-Vorläuferpeptids mit Biarylbindungen (**51**).

Bei einer erfolgreichen Durchführung der enzymatischen Assays soll auch hier versucht werden, die Substratumsetzung durch Cit-P450 zu optimieren. Mögliche Ansatzpunkte sind dabei die verwendeten Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH) oder die Generierung von Fusionsproteinen aus CYP450 und Elektronentransferproteinen.

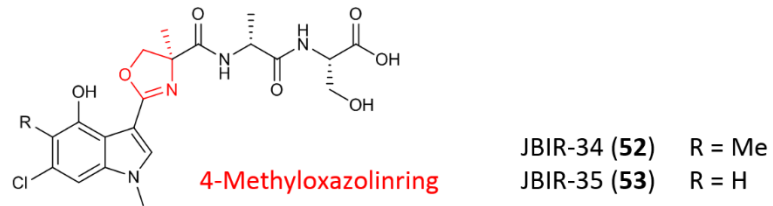
## 2.3 JBIR-34 (**52**) und JBIR-35 (**53**), nicht-ribosomale Peptide mit 4-Methyloxazolinring

### 2.3.1 Hintergrund

Bei den Molekülen JBIR-34 (**52**) und JBIR-35 (**53**) (abgeleitet von „Japan Biological Information Research Center“) handelt es sich um Peptide aus je vier Aminosäurebausteinen, welche sich durch einen ungewöhnlichen 4-Methyloxazolinring auszeichnen (Abb. 14a). Sie werden von einem Schwamm-assoziierten Actinomyceten, *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23, gebildet und besitzen eine schwache Aktivität als Radikalfänger.<sup>163</sup> Kürzlich wurde das zugehörige biosynthetische Gencluster beschrieben (Abb. 14b).<sup>164</sup> Dieses umfasst 20 Gene, denen eine Rolle bei der Synthese von JBIR-34 (**52**) und JBIR-35 (**53**) zugesprochen wird (vgl. Tab. 8 in Kapitel 3.4.1).

## Hintergrund und Zielsetzung

a)



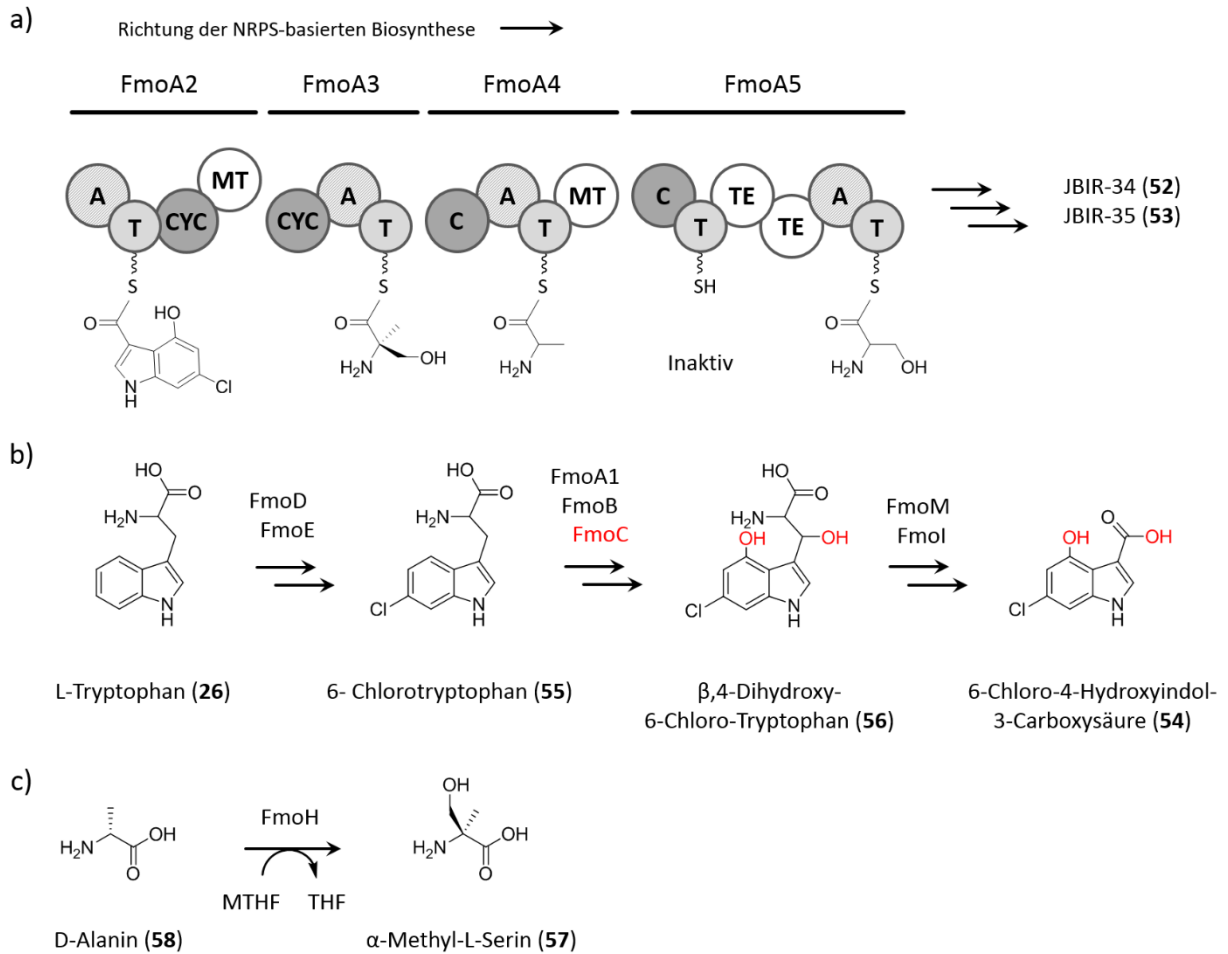
b)



**Abb. 14. a)** Struktur der NRP JBIR-34 (**52**) und JBIR-35 (**53**). **b)** Biosynthetisches Gencluster von JBIR-34 (**52**) / JBIR-35 (**53**) aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. Einzelne Buchstaben indizieren das jeweilige JBIR-Gen.

Die Biosynthese beider Naturstoffe wird durch die fünf NRPS FmoA1, FmoA2, FmoA3, FmoA4 und FmoA5 katalysiert. Während FmoA2-5 die Bildung des JBIR-Tetrapeptids bewerkstelligen (Schema 14a) ist FmoA1 mutmaßlich an der Bildung der NRP-Startereinheit 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure (**54**) aus L-Tryptophan (**26**) beteiligt (Schema 14b).<sup>164</sup> Hierbei wird L-Tryptophan (**26**) vermutlich durch die Halogenase FmoD und die zugehörige Flavinreduktase FmoE zu 6-Chlorotryptophan (**55**) umgesetzt. Dieses wird dann an FmoA1 gebunden, über das CYP450 FmoC am  $\beta$ -C-Atom und Position 4 des Indolrings hydroxyliert und anschließend durch die freistehende TE-Domäne FmoB als  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) freigesetzt. Die Spaltung von **56** durch die Threonin-Aldolase FmoM und die Oxidation über die Aldehyd-Dehydrogenase FmoI liefern in der Folge die 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure (**54**). Bei der Biosynthese dieses ungewöhnlichen NRP-Bausteins ist besonders die zweifache Hydroxylierung, welche durch FmoC katalysiert werden soll, hervorzuheben. So wurden zwar bereits einige CYP450s beschrieben, die in der Lage sind ein Aminosäuresubstrat am  $\beta$ -C-Atom zu hydroxylieren,<sup>165-167</sup> die multiple Hydroxylierung durch ein einziges CYP450 stellt jedoch immer noch eine seltene und bislang wenig untersuchte Art von Reaktion dar.<sup>168</sup> 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure (**54**) ist in der Folge an einer internen Cyclisierung mittels Cyc-Domäne beteiligt (vgl. Kapitel 1.1.1). Hierbei bilden **54** und der Baustein  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) den 4-Methyloxazolinring, ein in Naturstoffen selten anzutreffendes Strukturmotiv. Noch ist unklar, ob die Cyclisierungsreaktion durch die Cyc-Domäne von FmoA2 oder die Cyc-Domäne von FmoA3 katalysiert wird.<sup>164</sup>

## Hintergrund und Zielsetzung



**Schema 14 a)** Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) durch die NRPS FmoA2, FmoA3 und FmoA4. **b)** Postulierte Biosynthese der NRP-Startereinheit 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxylic acid (**54**) unter Beteiligung von FmoA1BCDE. Die mutmaßlich durch FmoC eingebrachten Hydroxygruppen sind rot markiert. **c)** FmoH-katalysierte Bildung von  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) aus D-Alanin (**58**).

Welche Enzyme an der Bildung von  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) beteiligt sind, war bis vor kurzem völlig unbekannt. Erst durch Untersuchungen im Rahmen der JBIR-Biosynthese konnte gezeigt werden, dass die Alanin- /  $\alpha$ -Methylserin-Hydroxymethyltransferase FmoH D-Alanin (**58**) zu  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) umwandelt (Schema 14c). Hierbei wird das Coenzym 5,10-Methylen tetrahydrofolat (MTHF) verbraucht und es entsteht Tetrahydrofolat (THF).<sup>164</sup> Bisher beschränkt sich die Zahl an Naturstoffen, die ebenfalls einen  $\alpha$ -Methyl-L-Serinbaustein besitzen, auf wenige Vertreter. Bei zwei kürzlich beschriebenen Beispielen handelt es sich um die cyclischen Depsipeptide Gerumycin A, B und C (**59 - 61**), welche von zwei Ameisensymbionten der Gattung *Pseudonocardia* produziert werden,<sup>169</sup> und das strukturell eng mit JBIR-34 (**52**) und JBIR-35 (**53**) verwandte Tambromycin (**62**), das antiproliferative Aktivität gegen kanzeröse B- und T-Zelllinien zeigt (Abb. 15).<sup>170</sup>

## Hintergrund und Zielsetzung

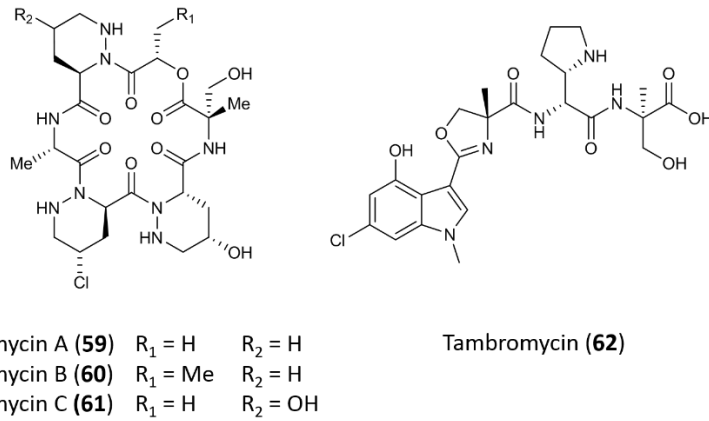


Abb. 15. Strukturformeln von Gerumycin A, B und C (**59 - 61**) und Tambromycin (**62**).

Weitere Proteine, die im JBIR-Gencluster kodiert sind, besitzen bislang unbekannte Funktionen (FmoFJL) bzw. fungieren im Rahmen der Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) mutmaßlich als Transporter (FmoGK) oder Regulator (FmoR1-3) (vgl. Tab. 8 in Kapitel 3.4.1).<sup>164</sup>

### 2.3.2 Ziele

Im Laufe der Arbeiten zur Biosynthese der Biphenomycin-Familie (**43 - 46**) wurde ein Gencluster innerhalb des Genoms von *S. filipinensis* NRRL 3217 entdeckt, welches Homologien zu dem bereits bekannten biosynthetischen Gencluster von JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) aufweist. Als ergänzendes Ziel wurde daher beschlossen, das als Sf-JBIR bezeichnete Gencluster über bioinformatische Analysen näher zu charakterisieren und mit dem ursprünglichen JBIR-Cluster zu vergleichen. Ebenso sollten JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) oder entsprechende Derivate, deren Biosynthese eventuell im Sf-JBIR-Cluster kodiert ist, identifiziert werden. Hierbei wurde geplant, entsprechende Naturstoffe über eine chemische Extraktion aus *S. filipinensis* zu isolieren. Als Ergänzung dieses klassischen Ansatzes sollte eine heterologe Expression des Sf-JBIR-Clusters in geeigneten Wirtsorganismen durchgeführt werden. Um das Sf-JBIR-Cluster hierfür zugänglich zu machen, könnte die bereits im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit generierte gDNA-Bibliothek von *S. filipinensis* NRRL 3217 dienen.<sup>171</sup>

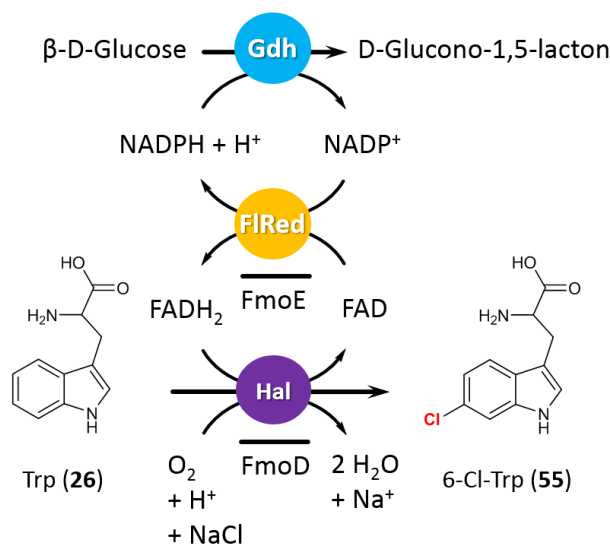
Unabhängig von den Analysen des Sf-JBIR-Clusters und der Struktur der kodierten Moleküle, sollte die Biosynthese des ungewöhnlichen Aminosäurebausteins  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) untersucht werden. Enzymatische Assays mit FmoA1BCDE, welche mutmaßlich an der Bildung von **56** beteiligt sind,<sup>164</sup> könnten dabei nähere Erkenntnisse über Ablauf und Reihenfolge der postulierten Teilschritte liefern. Bei diesen handelt es sich zum einen um die Halogenierung des Indolrings und zum anderen um die Hydroxylierung von Indolring und  $\beta$ -C-Atom. Gerade die Installation der beiden



## Hintergrund und Zielsetzung

Hydroxygruppen ist dabei von besonderem Interesse, da sie vermutlich von nur einem CYP450 (FmoC) durchgeführt wird.

Zur Untersuchung der Chlorierung während der Biosynthese von **56** sollte getestet werden, ob die Halogenase FmoD in der Lage ist, freies Tryptophan (Trp) (**26**) unter Verwendung von NaCl und FADH<sub>2</sub> zu 6-Chlorotryptophan (6-Cl-Trp) (**55**) umzusetzen (Schema 15). Der Cofaktor FADH<sub>2</sub> wird dabei durch die Flavinreduktase FmoE unter Oxidation von NADPH aus FAD erzeugt. Das bereits für die Biarylkupplungsassays verwendete System aus Gdh und Glucose dient zur Regeneration des kostenintensiven Elektronendonors NADPH.

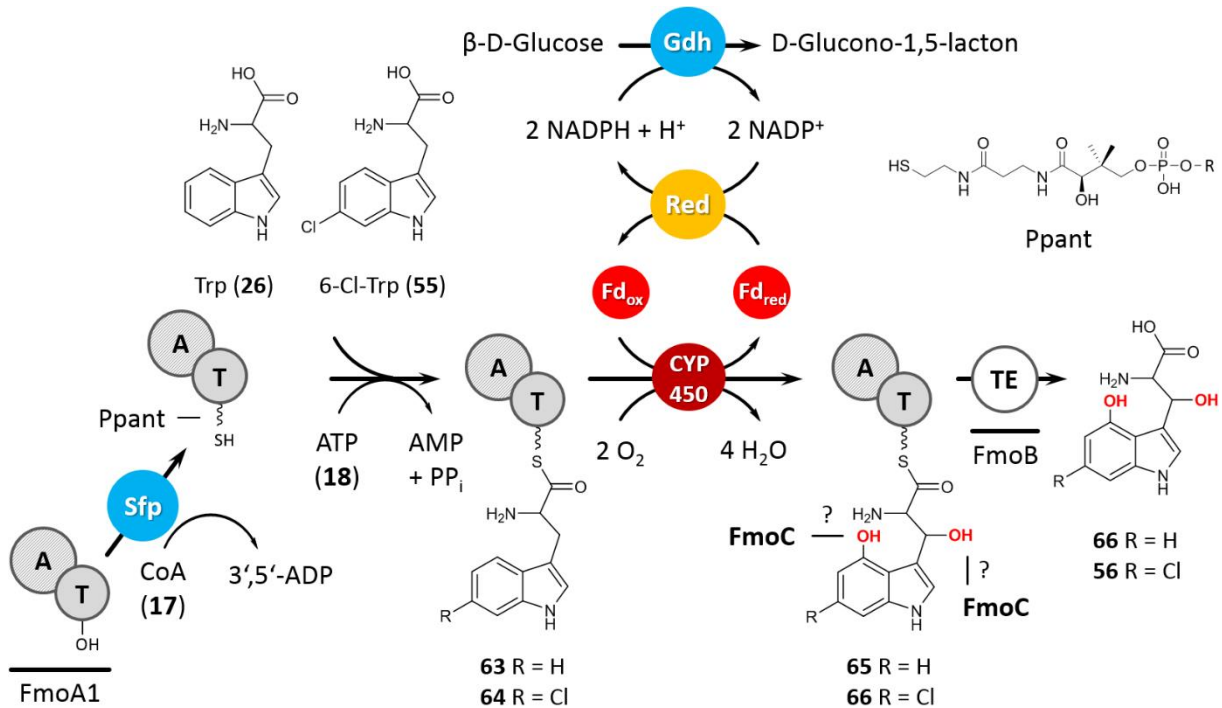


**Schema 15.** Enzymatischen Assays zur Chlorierung von Tryptophan (**26**) über die Flavinreduktase (FIRed) FmoE und die Halogenase (Hal) FmoD (Details siehe Text).

Das zweite Assay dient der näheren Betrachtung der durch FmoC katalysierten Reaktion. Hierdurch soll geklärt werden, ob das CYP450 beide Hydroxylierungen von **56** vermittelt und ob es sich bei dem entsprechenden Substrat um **26** oder **55** handelt. Tryptophan (**26**) und 6-Chlorotryptophan (**55**) können dabei über die NRPS FmoA1, welche mittels Sfp und CoA (**17**) in seine Holoform überführt wird, geladen und aktiviert werden (Schema 16). Das hierfür benötigte 6-Cl-Trp (**55**) wird von Frau Dr. Schaefers aus unserer Arbeitsgruppe synthetisiert. Die so gebildeten, PCP-gebundenen Derivate **63** und **64** können dann als Substrate für FmoC verwendet werden. Im Falle einer Hydroxylierung am β-C-Atom und an Position vier des Indolrings sollten die Produkte **65** bzw. **66** entstehen. Unter Verwendung der Cluster-eigenen Thioesterase FmoB, welche potentiell an der Freisetzung einer FmoA1-gebundenen Aminosäure beteiligt ist, könnte dann eine Hydrolyse des Thioesters erfolgen. Dies würde β,4-Dihydroxy-Tryptophan (**67**) oder β,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) freisetzen. Die für eine CYP450-katalysierte Hydroxylierung benötigten Elektronen sollen, wie bei den Versuchen

## Hintergrund und Zielsetzung

zur enzymatischen Biarylkupplung von Complestatin (**37**) und Cittilin A (**50**), über entsprechende Reduktase/Ferredoxin-Systeme (Fpr/PetF, AdR/Adx; vgl. Kapitel 2.1.2) bereitgestellt werden. Die Regeneration des Elektronendonors NADPH soll auch hier, wie schon bei den Halogenierungs-Assays, unter Glucose-Verbrauch durch Gdh erfolgen.



**Schema 16.** Enzymatischen Assays zur Hydroxylierung der PCP-gebundenen Aminosäuren Tryptophan (**26**) oder 6-Chlorotryptophan (**55**) durch das Cytochrom P450-Enzym FmoC (Variante der Biarylkupplungs-Assays; Details siehe Text).

Zur Generierung der in Schema 15 und Schema 16 dargestellten enzymatischen Systeme ist es nötig, die Proteine FmoA1BCDE heterolog zu exprimieren und aufzureinigen. Die Cofaktor-haltigen Proteine FmoC und FmoE sollen außerdem über UV/VIS-Spektroskopie näher charakterisiert werden.

Im Falle eines erfolgreichen Verlaufs dieser Assays soll weiterhin versucht werden, beide Assays zu kombinieren. Dies würde es ermöglichen,  $\beta,4$ -Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) mittels eines einzigen Reaktionsansatzes aus L-Tryptophan (**26**) zu synthetisieren. Sowohl die einzelnen Assays, als auch der kombinierte Assay könnten dann bzgl. ihrer Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert, Temperatur oder Konzentration der verwendeten Cofaktoren, optimiert werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Complestatin (37)

Im Folgenden sind die Ergebnisse in Bezug auf die chemo-enzymatische Synthese von Complestatin (37) zusammengefasst. Dazu gehören die heterologe Expression der beteiligten Proteine, ihre Charakterisierung durch bioinformatische und/oder molekularbiologische Methoden sowie der Test ihrer Funktionalität. Ebenfalls beschrieben werden erste Resultate der enzymatischen Assays, welche unter Zuhilfenahme dieser Proteine durchgeführt wurden. Abschließend wird die Kristallisation der Cytochrom P450-Enzyme ComI und ComJ behandelt.

##### 3.1.1 Enzymatische Systeme zur Reduktion von ComI und ComJ

###### 3.1.1.1 Die Standard-Elektronendonorsysteme Fpr/PetF und AdR/Adx

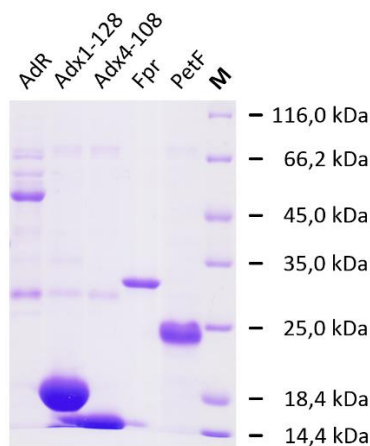
Zur Bereitstellung der benötigten Elektronen für eine CYP450-katalysierte Reaktion bei Fehlen von natürlichen Redoxpartnern wurden bereits verschiedenste Donorsysteme untersucht und etabliert.<sup>101</sup> In dieser Arbeit sollten zwei dieser Systeme verwendet werden, um Elektronen entsprechend Schema 12 bereitzustellen. Dazu zählt das Fpr/PetF-System, welches bereits für die Untersuchung der OxyB-katalysierten Biaryletherkupplung in der Biosynthese von Vancomycin (12) verwendet wurde.<sup>69</sup> Bei dem anderen System handelt es sich um das mitochondriale AdR/Adx-System, das trotz seines eukaryotischen Ursprungs bereits erfolgreich zur Reduktion einer Vielzahl bakterieller CYP450s verwendet wurde.<sup>150</sup>

Die Gene *fpr*, *adR* und *adx* wurden per PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pHis8 kloniert. Als Template dienen dabei die gDNA von *E. coli* DH5 $\alpha$  (*fpr*) oder die Plasmide pBAR1607 (*adR*) und pKKAdx (*adx*) (beide wurden durch Prof. Rita Bernhardt der Universität des Saarlands, Saarbrücken zur Verfügung gestellt).<sup>172,173</sup> Die resultierenden Vektoren wurden anschließend per Testverdau und Sequenzierung verifiziert und in die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) (*fpr* und *adx*) oder *E. coli* SoluBL21™ (*adR*) transformiert. Für Adx wurden hierbei zwei Genvarianten kloniert. Die erste kodiert für ein Protein vollständiger Länge (AS 1 - 128, in der Folge ‚Adx1-128‘), die zweite für eine an N- und C-Terminus gekürzte Version (AS 4 - 108, in der Folge ‚Adx4-108‘). Dies resultiert in einem zwei Kilodalton (kDa) kleineren Protein mit zum Wildtyp Adx1-128 identischen Absorptionsspektrum.<sup>174</sup> Durch die Verkürzung verringert sich jedoch das Redoxpotential des Adrenodoxins von -274 mV auf -344 mV. Dies führt, wie vermutet wird, zu einem effizienteren Elektronentransport, der sich wiederum in einer verbesserten Substratumsetzung durch viele CYP450s widerspiegelt.<sup>150,175</sup> Das für das Spinat-

## Ergebnisse und Diskussion

Ferredoxin kodierende *petF* wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Dr. Schaefers unter Verwendung der Überhang-Extension-Polymerasekettenreaktion (engl. „Overlap extension-PCR“, OE-PCR) erzeugt, in pHis8 kloniert und die Expression in *E. coli* BL21(DE3) mit pRKISC etabliert.<sup>176</sup> Das Plasmid pRKISC unterstützt dabei den Einbau von Eisen-Schwefel (FeS)-Clustern in Ferredoxine bei einer Überproduktion mittels *E. coli*.<sup>177</sup>

Die fünf Proteine wurden über Nacht (ü. N.) in TB-Medium bei 22 °C (Fpr, PetF) oder 16 °C (AdR, Adx1-128, Adx4-108) überproduziert. Dabei erfolgte die sterile Zugabe von 5 µg/L Riboflavin zu den Kulturen der Reduktasen und 1 mM Eisen(III)-EDTA oder Eisen(II)-sulfat zu den Kulturen der Ferredoxine in der logarithmischen Wachstumsphase vor Induktion mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Anschließend erfolgten Aufreinigung, Entsalzung und Aufkonzentration der Proteine unter Standardbedingungen. Dies lieferte, wie erwartet, gelblich gefärbte Konzentrate für die Reduktasen Fpr und AdR mit Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Cofaktor und Konzentrate roter Farbe für die [2Fe-2S]-Cluster-Ferredoxine PetF, Adx1-128 und Adx4-108.<sup>69,173,174</sup> Die Reinheit der resultierenden Proteinlösungen wurde mittels SDS-PAGE (Natrium [engl. „Sodium“] -dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) überprüft (Abb. 16).

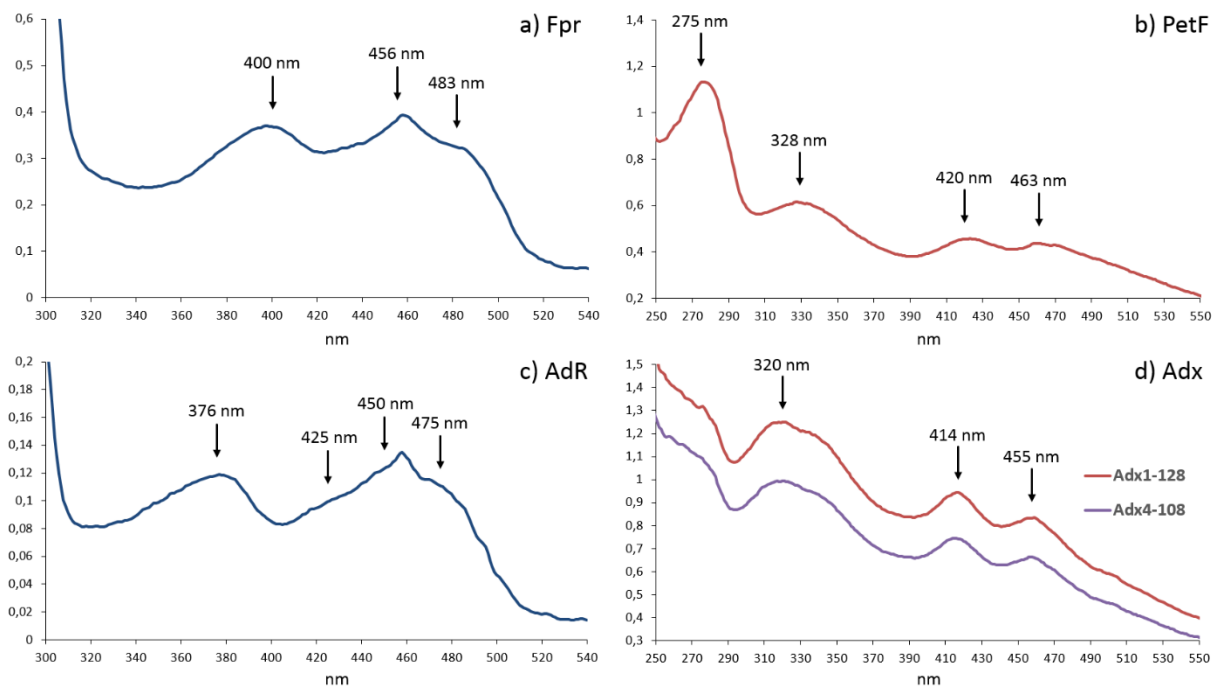


**Abb. 16.** SDS-PAGE (12%) von je 3,4 µg der aufgereinigten, entsalzten und aufkonzentrierten Proteine Fpr (30,17 kDa), PetF (12,9 kDa), AdR (52,99 kDa), Adx1-128 (16,44 kDa) und Adx4-108 (14,07 kDa). M = „Unstained Protein MW Marker“.

Die auf dem Gel sichtbaren Banden entsprachen dabei dem erwarteten Molekulargewicht (Tab. 52), das über den „Protein Calculator“ bestimmt wurde. Eine Ausnahme bildete PetF, das scheinbar als Dimer aufgereinigt wurde, da sich die auf dem SDS-Gel sichtbare Bande bei der doppelten Größe (ca. 25,8 kDa) befand. Die Proteinlösungen von AdR, Adx1-128 und Adx4-108 waren nicht komplett rein. Dies macht bei zukünftigen Aufreinigungen mittels Nickel-Affinitätschromatographie eine Optimierung der Waschschrte notwendig.

## Ergebnisse und Diskussion

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigten Proteine intakt waren und die entsprechenden Cofaktoren korrekt gebunden wurden, sollten ihre spektralen Eigenschaften mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht werden (Kapitel 4.9). Diese zeigten charakteristische Verläufe für die Proteine des Fpr/PetF- oder des AdR/Adx-Systems (Abb. 17). So lagen in Übereinstimmung mit den Literaturwerten die Maxima des PetF-Spektrums bei 275, 328, 420 und 463 nm und des Fpr-Spektrums bei 400, 456 und 483 nm.<sup>69</sup> Die beiden Spektren von Adx (Adx1-128 und Adx4-108) zeigten Maxima bei 320, 414 und 455 nm und das AdR-Absorptionsspektrum zeigte zwei Maxima bei 376 und 450 nm und zwei Schultern bei 425 und 475 nm.<sup>173,174</sup>



**Abb. 17.** UV/VIS-Absorptionsspektren der getesteten, elektronenübertragenden Proteine. Charakteristische Maxima innerhalb der Spektren wurden markiert (Details siehe Text). **a)** Fpr aus *E. coli* DH5 $\alpha$  (0,52 mM) **b)** PetF aus Spinat (*Spinacia oleracea*; 0,51 mM) **c)** AdR aus dem Rind (*Bos taurus*; 0,11 mM) **d)** Adx1-128 und Adx4-108 aus dem Rind (*Bos taurus*; Adx1-128 = 0,85 mM, Adx4-108 = 0,68 mM).

Die Konzentrationen der Lösungen von Fpr, PetF, AdR und Adx1-128 oder Adx4-108 wurden über die aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten bestimmt (Kapitel 4.7.1).

### 3.1.1.2 ComK

Ferredoxine und Cytochrom P450-Enzyme, welche durch aneinandergrenzenden Gene kodiert werden, sind potentiell spezifisch interagierende Redoxpartner.<sup>178-180</sup> Daher wird vermutet, dass auch das Ferredoxin ComK als Elektronendonator für die beiden CYP450s ComI und ComJ fungiert.<sup>127</sup> Das

## Ergebnisse und Diskussion

Vorhandensein von *comK* innerhalb des Complestatin-Clusters ist eine Besonderheit, da Gencluster anderer biarylhaltiger NRPs keine Ferredoxine kodieren, welche als native Elektronendonatoren dienen könnten.<sup>46,181,182</sup> Lediglich in *Amycolatopsis balhimycina*, dem Produzenten des strukturell eng zu Vancomycin (**12**) verwandten Balhimycin, wurden mit balFd-V und balFd-VII zwei Ferredoxine entdeckt, die zwar nicht im Balhimycin-Cluster kodiert sind, aber in der Lage waren, das nativ an der Biosynthese beteiligte CYP450 OxyB mit Elektronen zu versorgen.<sup>183</sup>

Da sich ComK als potentiell nativer Elektronendonator für die beiden CYP450s ComI und ComJ in enzymatischen Systemen anbietet, sollte die Möglichkeit einer heterologen Expression näher untersucht werden. Im Erfolgsfall könnte das Protein dann näher charakterisiert und seine Fähigkeit getestet werden, Elektronen von den beiden Reduktasen Fpr oder AdR (Kapitel 3.1.1.2) zu akzeptieren.

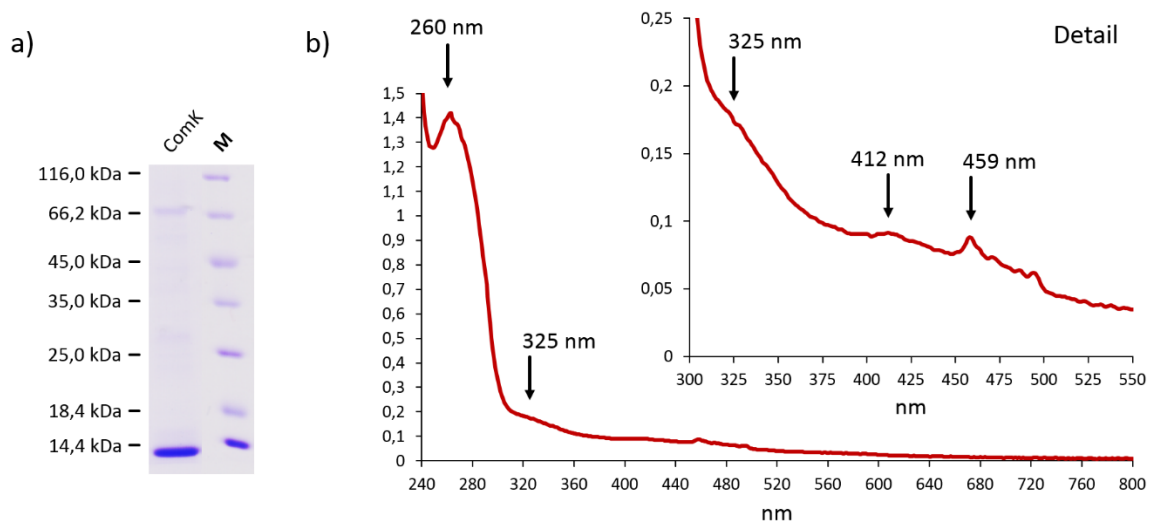
Eine nähere Betrachtung der AS-Sequenz zeigt, dass ComK drei Cysteine besitzt, die an der Ausbildung eines FeS-Clusters beteiligt sein könnten (Abb. 19). Ein Abgleich der ComK-Sequenz mit der über NCBI verfügbaren UniProtKB/SwissProt-Datenbank (in der Folge ‚SwissProt-Datenbank‘) mittels BLAST (Abgleich einer Aminosäuresequenz mit einer anderen Aminosäuresequenz oder einer Proteindatenbank mittels BLAST = blastp) lieferte unter den drei Proteinen mit der größten Homologie die Ferredoxine Fd-1 (SwissProt-ID: P18324.3; Cover = 87%, E-value = 1e-07, Identität = 41%, Gemeinsamkeit = 54%) und Fd-2 (SwissProt-ID: P18325.1; Cover = 87%, E-value = 1e-09, Identität = 41%, Gemeinsamkeit = 60%) aus *Streptomyces griseolus*. Beide sind am Metabolismus von Sulfonylharnstoff-Herbiziden beteiligt und besitzen ein [3Fe-4S]-Cluster, das über drei Cysteine koordiniert wird.<sup>178</sup> Das resultierende Bindemotiv der FeS-Cluster in Fd-1 und Fd-2 (CxxxxxC<sub>n</sub>C), welches sich vom Motiv der [4Fe-4S]-Cluster (CxxCxxC<sub>n</sub>C) ableitet, ist dabei identisch zu dem von ComK (Abb. 19).<sup>184</sup> Dies lässt vermuten, dass auch ComK in seiner aktiven Form ein [3Fe-4S]-Cluster besitzt.

	1	10	20	30	40	50	60	70
ComK	MEIRIDRDKC	VSGGV	CAMFAPQV	FDQDDEGM	GVVDNSAPAE	EIAAAVRSV	VWR	CPGHAISVHEQEVERGGRR
Fd-1	MTMRVSADRT	VCGAGL	CALTAPGV	FDQDDDGIV	TVLTAEPAA	DDDRRTARE	AAGHL	--CPSGAVRVVEDTE
Fd-2	MRIHVDQDK	CCGAGS	CVLAAPDV	FDQREEDG	IVLLDTAP	PAALHDAV	REAATI	----CPAAAITVTD

**Abb. 18.** AS-Sequenzen von ComK aus *S. lavendulae* sowie Fd-1 und Fd-2 aus *S. griseolus*. Die Nummerierung der AS bezieht sich auf ComK. Die Anordnung der Sequenzen veranschaulicht die FeS-Cluster-Bindemotive und spiegelt keinen Abgleich bzgl. der AS-Identität (Clustal Omega) wieder. Cysteine (C), welche an der Ausbildung eines FeS-Clusters beteiligt sein könnten (ComK) oder sind (Fd-1 / Fd-2), wurden grau hinterlegt.

## Ergebnisse und Diskussion

Um ComK im Hinblick auf die Art des gebundenen FeS-Clusters und als potentiellen und tendenziell bevorzugten Elektronendonator für ComI und ComJ weiter zu untersuchen, sollte es heterolog exprimiert werden. Aufgrund fehlender gDNA von *S. lavendulae* wurde ein Templat, wie bei *petF*, durch OE-PCR generiert (Kapitel 4.4.4.4). Von diesem wurde *comK* per PCR amplifiziert, in den Expressionsvektor pHis8 kloniert und der resultierende Vektor durch Testverdau und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde der Vektor in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) plus pRKISC (Kapitel 3.1.1.1) transformiert. Die Überproduktion von ComK erfolgte dann ü. N. bei 16 °C in TB-Medium. Vor Induktion mit IPTG wurde der Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase, wie im Falle der anderen Ferredoxine, 1 mM Eisen(III)-EDTA oder Eisen(II)-sulfat steril zugesetzt. Das Protein wurde anschließend unter Standardbedingungen aufgereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Dies lieferte eine Lösung von leicht rötlicher/bräunlicher Färbung, wie sie bei Einbau eines FeS-Clusters in das Protein zu erwarten war. Eine Überprüfung mittels SDS-PAGE (Abb. 19a) zeigte eine Bande der erwarteten Größe von 10,26 kDa (Tab. 52). Weiterhin wurde das UV/VIS-Spektrum mittels Nanophotometer aufgezeichnet. Dieses (Abb. 19b) zeigte zwei breite Absorptionsmaxima bei 325 nm und 412 nm, die typisch für oxidierte [3Fe-4S]-Cluster, wie in Fd-1, Fd-2, balFd-V und balFd-VII, oder [4Fe-4S]-Cluster sind.<sup>178,183</sup> Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei ComK um ein Ferredoxin des [3Fe-4S]-Cluster-Typs handelt. Zwei weitere Maxima finden sich bei 260 nm und 459 nm. Diese sind untypisch für Ferredoxine und könnten auf eine Co-Aufreinigung von DNA bzw. RNA (260 nm)<sup>185</sup> oder Messfragmente (459 nm) zurückzuführen sein.



**Abb. 19. a)** SDS-PAGE (12%) des aufgereinigten, entsalzten und aufkonzentrierten Ferredoxins ComK (10,26 kDa) aus *S. lavendulae*. M = „Unstained Protein MW Marker“. **b)** UV/VIS-Absorptionsspektrum von ComK (1,96 mM) mit Detailansicht des Bereichs zwischen 300 - 550 nm. Maxima wurden markiert (Details siehe Text).

Anders als für Fpr, PetF, AdR oder Adx war im Falle von ComK keine Konzentrationsbestimmung über den Extinktionskoeffizienten des gebundenen Cofaktors möglich. Hierfür wurde der über den ‚Protein Calculator‘ bestimmte Wert des Apoproteins verwendet.

### **3.1.1.3 Testuntersuchungen möglicher Systeme zur Reduktion von ComI und ComJ**

Um die Funktionalität der neu klonierten und heterolog überproduzierten Elektronentransfersysteme Fpr/PetF und AdR/Adx (Kapitel 3.1.1.1) zu garantieren und deren Zusammenspiel mit dem Ferredoxin ComK (Kapitel 3.1.1.2) zu testen, wurden Assays mit NADPH als Elektronendonator und Cytochrom C (CytC) als terminalem Akzeptor durchgeführt (Kapitel 0). Der Nachweis eines erfolgreichen Elektronentransfers von NADPH über das jeweils zugegebene Reduktase/Ferredoxin-System auf CytC erfolgte durch Messung einer Zunahme der Absorption bei 550 nm.<sup>186</sup> Zwei Komponenten des Assays (standardmäßig NADPH, 200  $\mu$ M und CytC, 50  $\mu$ M, wenn nicht anders angegeben) wurden vorgelegt, die anderen Bestandteile sukzessive zugegeben. Reihenfolge und Konzentration der zugegebenen Komponenten wurde dabei teilweise variiert, um ein besseres Verständnis für das Zusammenspiel der beteiligten Proteine zu bekommen.

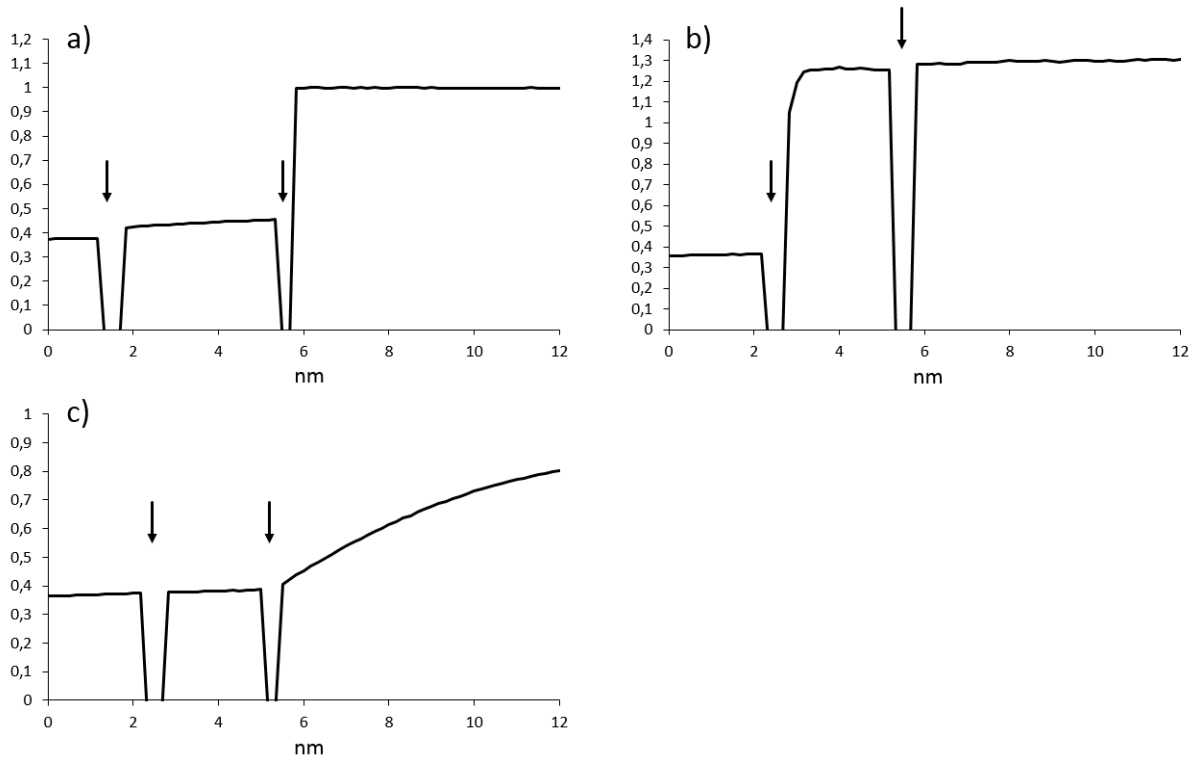
Als erstes wurde das Fpr/PetF-System untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von PetF zu NADPH und CytC nicht ausreicht, um Elektronen auf CytC zu übertragen (Abb. 20a). Erst die Zugabe der NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase Fpr ermöglichte dies. Eine vollständige Reduktion von CytC erfolgte dabei mit den gewählten Konzentrationen von Fpr und PetF innerhalb weniger Sekunden. Veränderte man die Reihenfolge der Zugabe und setzte dem Assay als erstes Fpr zu zeigte sich überraschenderweise, dass eine Reduktion von CytC auch ohne PetF ablief (Abb. 20b). Diese war ebenfalls nach wenigen Sekunden vollständig. Eine nachfolgende Zugabe von PetF hatte keinen Einfluss mehr auf die Reaktion. Um sicherzustellen, dass die hierbei beobachtete CytC-Reduktion von der Verfügbarkeit von NADPH abhing und nicht durch eventuelle Verunreinigungen der Fpr-Lösung zustande kam, wurden in einem letzten Assay CytC und PetF vorgelegt und zu diesen als erstes Fpr gegeben. Um einer möglichen Absorptionsänderung besser folgen zu können, wurden die Lösungen von Fpr und PetF dabei vor der Verwendung 1:100 verdünnt. Die Zugabe von Fpr bewirkte in diesem Fall keine Veränderung (Abb. 20c). Erst die Vervollständigung des Assays mit NADPH resultierte in einer Übertragung von Elektronen auf CytC. Dies zeigte, dass die beobachtete CytC-Reduktion tatsächlich auf einer Elektronenübertragung ausgehend von NADPH beruhte und kein unbekannter Faktor der Fpr-Lösung Elektronen bereitstellte.

Als Erklärung für die in Abb. 20b beobachtete PetF-unabhängige Zunahme der Absorption blieb damit noch die Co-Aufreinigung des *E. coli*-eigenen Fpr mit einem nativ assoziierten Ferredoxin aus dem



## Ergebnisse und Diskussion

Expressionsstamm, das als Elektronendonator für CytC fungierte. Die Menge des aufgereinigten Ferredoxins scheint dabei gering zu sein, da es über die bereits mit Fpr durchgeführten Untersuchungen (vgl. Abb. 16 und Abb. 17) nicht nachgewiesen wurde.



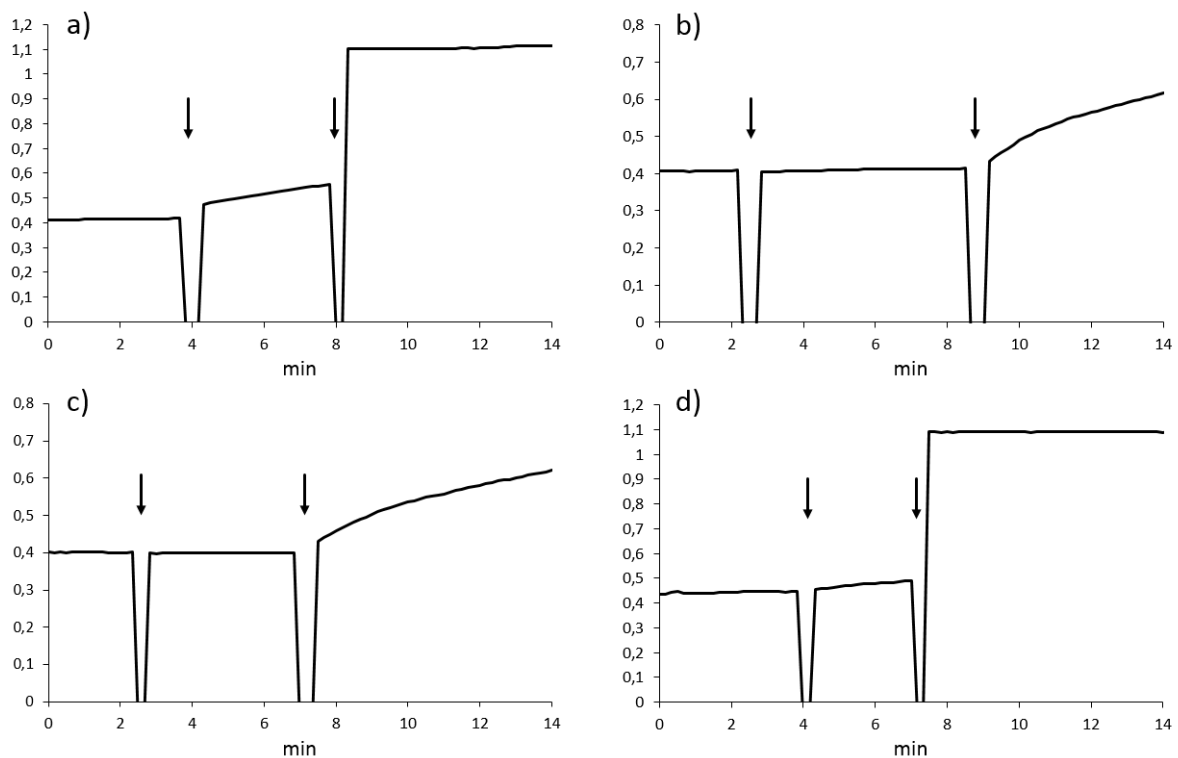
**Abb. 20.** Test des Redoxsystems aus NADPH, CytC, Fpr und PetF. Die Pfeile zeigen die jeweils erste und zweite Zugabe von Komponenten zum Assay an (alle anderen Bestandteile wurden vorgelegt). **a)** 1. Zugabe: PetF, 10  $\mu$ M; 2. Zugabe: Fpr, 10  $\mu$ M **b)** 1. Zugabe: Fpr, 10  $\mu$ M; 2. Zugabe: PetF, 10  $\mu$ M **c)** PetF (10  $\mu$ M) vorgelegt. 1. Zugabe: Fpr, 0,1  $\mu$ M; 2. Zugabe: NADPH, 200  $\mu$ M.

So eine Co-Aufreinigung von funktionell eng verbundenen Proteinen wurde bereits in anderen Fällen beschrieben und bildet auch die Grundlage gut etablierter Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, wie der Tandem-Affinitätschromatographie.<sup>187</sup> Um eventuell vorhandenes *E. coli*-Ferredoxin zu entfernen, könnte der Versuch unternommen werden, eine zweite Aufreinigung mit schneller Proteinflüssigchromatographie (engl. „Fast protein liquid chromatography“, FPLC) im Anschluss an die Nickel-Affinitätschromatographie durchzuführen.

Auch das AdR/Adx-System wurde getestet. Hier wurde in einem ersten Assay Adx1-128 zu einer Lösung aus NADPH und CytC gegeben (Abb. 21a). Dies resultierte in einer geringfügigen Zunahme der Absorption bei 550 nm, was eventuell dadurch erklärt werden kann, dass das Ferredoxin nach seiner Aufreinigung geringfügig in reduziertem Zustand vorlag. Durch Zugabe der Reduktase AdR erfolgte dann, wie erwartet, eine unmittelbare und vollständige Reduktion von CytC. Wurde AdR als erstes

## Ergebnisse und Diskussion

zugegeben (Abb. 21b), war, anders als nach der Zugabe der Reduktase Fpr des Fpr/PetF-Systems, keine Reduktion von CytC zu beobachten. Dies unterstützt die Annahme, dass die PetF-unabhängige Reduktion von CytC nach Fpr-Zugabe (Abb. 20b) auf Verunreinigungen mit *E. coli*-Ferredoxin beruht, da AdR keinen natürlichen Interaktionspartner im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) besitzt, der an dieses binden könnte. Nach Zugabe von Adx1-128 erfolgte dann eine Reduktion von CytC. Diese verlief langsamer als im ersten Assay, da auch hier, wie beim Fpr/PetF-System, die Konzentration von AdR und Adx1-128 um das Hundertfache verringert wurde. Auch im Falle des AdR/Adx-Systems war die beobachtete Reduktion von CytC vom Vorhandensein des Elektronendonors abhängig, da diese erst nach abschließender Zugabe von NADPH zu beobachten war (Abb. 21c). Ein Wechsel des Ferredoxins zu Adx4-108 zeigte einen identischen Reaktionsverlauf wie bei Verwendung von Adx1-128 (Abb. 21d). So war nach Zugabe von Adx4-108 ein leichter Anstieg der Absorption zu beobachten, der wahrscheinlich auf einen geringen Anteil an reduziertem Ferredoxin zurückging. Mit Zugabe der Reduktase erfolgte dann eine sofortige und vollständige Reduktion von CytC.



**Abb. 21.** Test des Redoxsystems aus NADPH, CytC, AdR und Adx1-128 (a - c) oder Adx4-108 (d). Die Pfeile zeigen die jeweils erste und zweite Zugabe von Komponenten zum Assay an (alle anderen Bestandteile wurden vorgelegt). **a)** 1. Zugabe: Adx1-128, 10  $\mu$ M; 2. Zugabe: AdR, 1  $\mu$ M **b)** 1. Zugabe: AdR, 0,01  $\mu$ M; 2. Zugabe: Adx1-128, 0,1  $\mu$ M **c)** Adx1-128 (0,1  $\mu$ M) vorgelegt. 1. Zugabe: AdR, 0,01  $\mu$ M; 2. Zugabe: NADPH, 200  $\mu$ M **d)** 1. Zugabe: Adx4-108, 1,35  $\mu$ M; 2. Zugabe: AdR, 0,5  $\mu$ M.

Generell zeigte die Überprüfung der Redoxsysteme Fpr/PetF und AdR/Adx, dass beide mit den neu klonierten und heterolog exprimierten Proteinen funktionell sind. Aufgrund der unspezifischen

## Ergebnisse und Diskussion

Reduktion, die durch die Fpr-Proteinlösung in Abwesenheit des Ferredoxins PetF katalysiert wurde, wäre die Verwendung des AdR/Adx-Systems aber tendenziell zu bevorzugen. Dabei funktionieren beide Varianten von Adx (Adx1-128, Adx4-108) mit der gleichen Effizienz. Da aber eine bessere Elektronenübertragung durch das geringere Redoxpotential von Adx4-108 zu erwarten ist,<sup>150,175</sup> sollte dieses bevorzugt verwendet werden.

Abschließend sollte die Interaktion von ComK mit den etablierten Reduktasen überprüft werden. Bei Aktivität des Ferredoxins in diesen Systemen, könnte ComK als potentiell nativer Elektronendonator für ComI und ComJ verwendet werden. ComK/ComI bzw. ComK/ComJ-Systeme hätten dabei vermutlich einen förderlichen Effekt auf die Umsetzung potentieller Substrate, da CYP450s meist besser mit nativen Ferredoxinen interagieren, als mit artifiziellen Systemen.<sup>178,179,183</sup> Gerade im Hinblick auf eine mögliche Entkopplung des katalytischen Zyklus von Cytochrom P450-Enzymen (Schema 8) aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines zweiten Elektrons ist dies ein wichtiger Aspekt.<sup>102</sup>

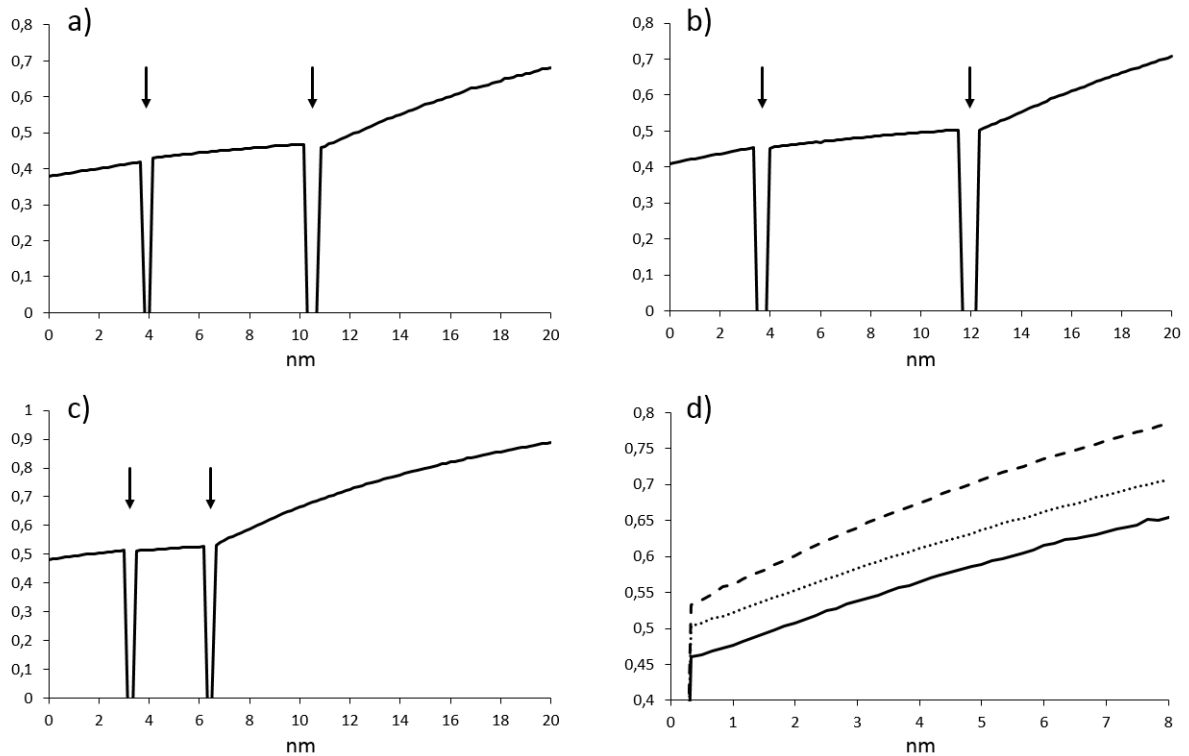
Aufgrund der Tatsache, dass Fpr in der Lage war, ohne weitere Zugabe eines Ferredoxins CytC zu reduzieren (Abb. 20b), wurde dieses in der Folge jedoch nicht mehr berücksichtigt, da keine belastbare Aussage über eine Fpr-basierte Reduktion von ComK getroffen werden könnte. Für mögliche Tests stand somit lediglich AdR zur Verfügung. Da eine hohe Proteinkonzentration von ComK über dem Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (Tab. 52) bestimmt wurde, die entsprechende Lösung aber nur eine schwache Färbung zeigte, ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Teil als aktive Holoform vorliegt. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen relativ große Mengen ComK eingesetzt, um dies zu kompensieren. Für weitere Verwendungen könnte es sich jedoch empfehlen, wie bei anderen Ferredoxinen, den Extinktionskoeffizienten mit gebundenem Cofaktor zu bestimmen und das rekombinante ComK nach der Aufreinigung zu rekonstituieren.

In einem ersten Assay zeigte sich bereits in einer Lösung aus ComK und CytC ein leichter Anstieg in der Absorption bei 550 nm (Abb. 22a). Dies entsprach den Beobachtungen bei Zugabe von PetF (Abb. 20a), Adx1-128 (Abb. 21a) oder Adx4-108 (Abb. 21d) zu einer identischen Lösung und beruht wohl auf einem geringfügigen Anteil an reduziertem Ferredoxin in der verwendeten Proteinlösung. Während die Zugabe der Reduktase AdR keinen Einfluss auf die Veränderung der Absorption hatte, war nach Zugabe des Elektronendonors NADPH eine verstärkte Reduktion von CytC zu verzeichnen (Abb. 22a). Ein ähnlicher Kurvenverlauf zeigte sich, wenn die Assay-Komponenten in identischer Reihenfolge aber mit den doppelten Konzentrationen von AdR (0,04  $\mu$ M; Abb. 22b) oder ComK (45,8  $\mu$ M; Abb. 22c) zugesetzt wurden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, das ComK durch AdR reduziert werden konnte und anschließend in der Lage war Elektronen an Cytochrom C zu liefern.

Interessanterweise zeigte ein Vergleich der Steigungen nach Zugabe von NADPH zu den Adx4-108-Reaktionen, dass die CytC-Reduktion bei doppelter ComK-Konzentration geringfügig schneller abließ

## Ergebnisse und Diskussion

(Abb. 22d). Der Elektronentransfer von ComK auf CytC schien daher unter den verwendeten Bedingungen der limitierende Faktor zu sein. Durch eine Erhöhung der ComK-Konzentration könnte er eventuell weiter gesteigert werden. In Anbetracht der jedoch bereits recht hohen Mengen von ComK, die teilweise eingesetzt wurden (Maximum 45,8  $\mu\text{M}$ ), scheint dies aber auch die Annahme zu unterstützen, dass das verwendete Ferredoxin zu nicht unerheblichen Teilen in Apoforn vorlag.



**Abb. 22.** Test des Redoxsystems aus NADPH, CytC, AdR und ComK. Die Pfeile zeigen die jeweils erste und zweite Zugabe von Komponenten zum Assay an (alle anderen Bestandteile wurden vorgelegt). **a)** ComK (22,9  $\mu\text{M}$ ) vorgelegt. 1. Zugabe: AdR, 0,02  $\mu\text{M}$ ; 2. Zugabe: NADPH, 200  $\mu\text{M}$  **b)** ComK (22,9  $\mu\text{M}$ ) vorgelegt. 1. Zugabe: AdR, 0,04  $\mu\text{M}$ ; 2. Zugabe: NADPH, 200  $\mu\text{M}$  **c)** ComK (45,8  $\mu\text{M}$ ) vorgelegt. 1. Zugabe: AdR, 0,02  $\mu\text{M}$ ; 2. Zugabe: NADPH, 200  $\mu\text{M}$  **d)** Vergleich der ersten acht Minuten nach NADPH-Zugabe (zweite Zugabe) von a) (durchgezogene Linie, unten), b) (gepunktete Linie, mittig) und c) (gestrichelte Linie, oben).

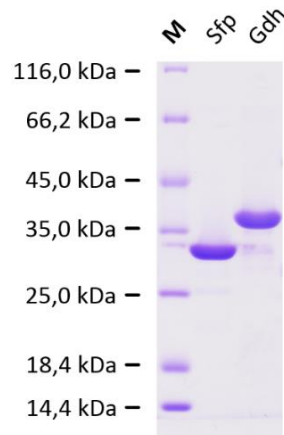
Basierend auf den vorliegenden Untersuchungen ist ComK generell zum AdR-katalysierten Elektronentransfer von NADPH auf CytC in der Lage. Daher scheint es auch als Ersatz für PetF oder Adx in enzymatischen Assays mit ComI oder ComJ geeignet zu sein. Bei erfolgreicher Durchführung der entsprechenden Reaktionen wäre ComK damit das erste, an einer chemo-enzymatischen *in vitro*-Biarylkupplung beteiligte Ferredoxin, welches im Gencluster des biarylhaltigen Naturstoffs selbst kodiert ist.

### **3.1.2 Die akzessorischen Proteine Sfp und Gdh**

Für die Durchführung enzymatischer *in vitro*-Assays mit heterolog exprimierten PCP-Domänen müssen diese am konservierten Serinrest des aktiven Zentrums mit Coenzym A (**17**) oder einem CoA-verknüpften Substrat beladen werden.<sup>69,188</sup> Hierfür sollte in unserem System (Schema 12) die Surfactin-Phosphopantetheinyltransferase aus *Bacillus subtilis* genutzt werden, die in der Lage ist, eine Vielzahl verschiedener PCP- und ACP-Domänen durch posttranslationale Modifikation *in vivo* und *in vitro* mit CoA (**17**) oder CoA-Derivaten zu aktivieren (vgl. Schema 1).<sup>145-148</sup> Die Glucose-Dehydrogenase wiederum, ein Enzym das in einer Reihe unterschiedlicher Bakterienarten vorkommt, soll der Regeneration des in den Assays verbrauchten NADPH dienen (Schema 12). Die dafür notwendigen Elektronen werden durch Oxidation von  $\beta$ -D-Glucose zu  $\beta$ -D-Glucono-1,5-lacton generiert.<sup>151</sup> Dies soll in der Folge dazu dienen, die Menge des kostenintensiven Coenzym NADPH zu reduzieren.

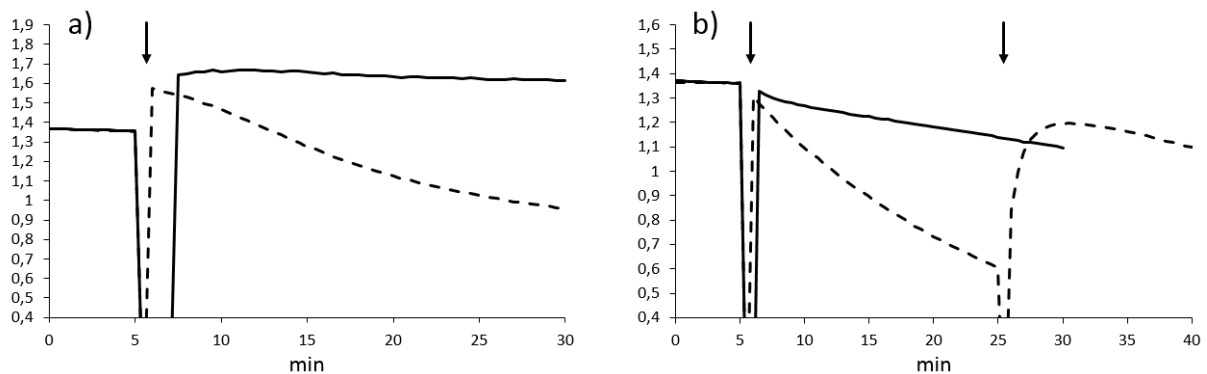
Ein Vektor für die heterologe Überproduktion und Aufreinigung von Sfp (pET-29a(+):*sfp*) befand sich bereits in unserer Arbeitsgruppe. Daher wurde lediglich das Gen *gdh-BM3* aus *Bacillus megaterium* vom Vektor pACYCDuet-1::*gdh-BM3* (zur Verfügung gestellt durch Prof. Frank Schulz der Ruhr-Universität Bochum) amplifiziert und in den Expressionsvektor pHis8 kloniert. Das resultierende Plasmid pHis8::*gdh-BM3* wurde anschließend per Testverdau und Sequenzierung verifiziert. Die beiden Expressionsvektoren wurden dann in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Überproduktion der Proteine erfolgte ü. N. bei 17 °C (TB-Medium) für Sfp und 18 °C (TB-Medium) für Gdh-BM3 (in der Folge nur noch ‚Gdh‘). Anschließend wurden sie unter Standardbedingungen mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Die Identität und Reinheit der resultierenden, farblosen Proteinlösungen wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Das Gel (Abb. 23) zeigte eine Bande der erwarteten Größe (27,2 kDa; vgl. Tab. 52) für das rekombinante Sfp-Protein. Die Lösung von Gdh lieferte hingegen eine Bande bei ca. 38 kDa. Dies ist größer als die erwarteten 30,57 kDa. Eine ähnliche Abweichung wurde für die Glucose-Dehydrogenase GlcDH-IV aus *Bacillus megaterium* IAM1030 beschrieben, die in ihrer Aminosäuresequenz identisch zum hier überproduzierten Gdh ist. Auch GlcDH-IV zeigte bei der Überprüfung mittels SDS-PAGE ein Molekulargewicht, das größer als das erwartete war. Als Grund wurden hier konformative Eigenheiten des Proteins vermutet.<sup>189</sup> Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mittels Nanophotometer bestimmt.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 23.** SDS-PAGE (12%) von je 3,4  $\mu\text{g}$  der aufgereinigten, entsalzten und aufkonzentrierten Proteine Sfp (27,2 kDa) und Gdh (erwartete Größe: 30,57 kDa). M = ‚Unstained Protein MW Marker‘.

Um die Funktionalität der neu klonierten Dehydrogenase zu testen, wurde Gdh (10  $\mu\text{M}$ ) in einem Assay mit Fpr (2,5  $\mu\text{M}$ ), PetF (5  $\mu\text{M}$ ), NADPH (250  $\mu\text{M}$ ) und Glucose (250  $\mu\text{M}$ ) getestet (Kapitel 4.13.2). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Fpr gestartet und der Verbrauch oder die Regeneration von NADPH über das charakteristische Absorptionsmaximum bei 340 nm bestimmt. Mit HEPES (25 mM, pH 7,0) und Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) wurden zwei unterschiedliche Puffer verwendet, die auch bei zukünftigen Biarylkupplungsassays zum Einsatz kommen sollten. Die Ansätze in HEPES-Puffer (Abb. 24a) zeigten dabei ohne Zugabe von Gdh eine rasche Abnahme der Absorption, welche einen Verbrauch von NADPH anzeigt. Diese war bei Anwesenheit von Gdh nicht zu beobachten. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Verwendung des Tris-HCl-Puffers (Abb. 24b). Hier konnte die Abnahme der Absorption durch Zugabe von Gdh jedoch nicht ganz gestoppt werden. Eine Komplettierung des Reaktionsansatzes ohne Gdh nach 25 min führte zu einem sprunghaften Anstieg der Absorption auf ca. 88% des Ausgangswertes. Danach fiel die Absorption wieder ab.



**Abb. 24.** Test der Regeneration von NADPH durch Gdh bei 340 nm. Gestrichelte Linie: Assays mit Glucose aber ohne Gdh; Durchgezogene Linie: Assays mit Glucose und Gdh. Der erste Pfeil markiert die Zugaben von Fpr (a und b), der zweite Pfeil eine nachträgliche Zugabe von Gdh (b). **a)** HEPES 25 mM, pH 7,0 **b)** Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Resultate der Assays zeigten, dass das von uns überproduzierte Gdh in der Lage war, in beiden Puffersystemen NADPH zu regenerieren, was in einer konstanten (Abb. 24a) oder langsam abfallenden Absorption (Abb. 24b) bei 340 nm resultierte. Fehlte Gdh, wurde NADPH schnell durch Fpr zu NADP<sup>+</sup> oxidiert und die Absorption sank rasch ab. Die Elektronen wurden dabei vermutlich durch Fpr auf das co-aufgereinigte Ferredoxin übertragen (vgl. Kapitel 3.1.1.3). Eine nachträgliche Zugabe von Gdh war in der Lage, einen gewissen Teil des gebildeten NADP<sup>+</sup> wieder zu reduzieren (Abb. 24b).

Generell verlief die Regeneration von NADPH in Tris-HCl-Puffer langsamer als der Verbrauch. Somit sank die gemessene Absorption trotz Anwesenheit von Gdh weiter ab. Dabei war es egal, ob die Gdh-Zugabe zu Beginn oder während der Assays erfolgte. Im Unterschied hierzu war die Absorption bei Verwendung von HEPES konstant. Der NADPH-Verbrauch verlief somit gleich schnell oder langsamer als die Regeneration. Dies ließ sich mit dem durchgeführten Assay nicht genau untersuchen. Die Unterschiede zwischen beiden Puffersystemen lassen sich möglicherweise auf eine gesteigerte Aktivität von Fpr in Tris-HCl zurückführen, da das pH-Optimum von Gdh bei 8,0 liegt und das Enzym somit bei pH 7,5 (Tris-HCl) eigentlich eine höhere Aktivität als bei pH 7,0 (HEPES) zeigen sollte.<sup>151</sup>

### **3.1.3 ComI und ComJ, die Cytochrom P450-Enzyme der Complestatin-Biosynthese**

Die beiden im biosynthetischen Gencluster von Complestatin (**37**) kodierten CYP450s ComI und ComJ sind für das Einbringen der Biaryl- und Biaryletherbindung in **37** verantwortlich.<sup>127,128</sup> Beide Enzyme sollten heterolog überproduziert und in einem *in vitro*-Testsystem (Schema 12) genutzt werden, wie es in ähnlicher Form bereits für die Untersuchung der an der Biosynthese von Vancomycin (**12**), A47934 und Teicoplanin beteiligten CYP450s OxyB, StaH oder OxyE verwendet wurde.<sup>69-71,76,79</sup>

Die Gene *comI* und *comJ* wurden in Codon-optimierter Form für eine Expression in *E. coli* (*comI-opt* und *comJ-opt*) über die Firma GenScript bezogen. Diese wurden dann über vorhandene Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI und *Not*I für *comI-opt*, *Eco*RI und *Not*I für *comJ-opt*) aus den erhaltenen Plasmiden pUC57::*comI-opt* und pUC57::*comJ-opt* ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pHis8 kloniert. Die resultierenden Vektoren pHis8::*comI-opt* und pHis8::*comJ-opt* wurden dann in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression fand ü. N. bei 20 °C (TB-Medium) statt. Nach Aufreinigung unter Standardbedingungen mit Rekonstitution durch Häminchlorid-Zugabe (Kapitel 4.6.5) wurden die Proteine entsalzt und aufkonzentriert. Dies lieferte eine dunkelrote Lösung für ComJ und eine rot-bräunliche Lösung für ComI (Abb. 25a). Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurde mittels Nanophotometer bestimmt und ihre Reinheit per SDS-PAGE analysiert (Abb. 25b). Dies zeigte für beide Enzyme Banden im vorher bestimmten Größenbereich (Tab. 52). Die Bande von ComJ (erwartete Größe: 50,1 kDa) lief dabei allerdings, anders als erwartet, bei einer

## Ergebnisse und Diskussion

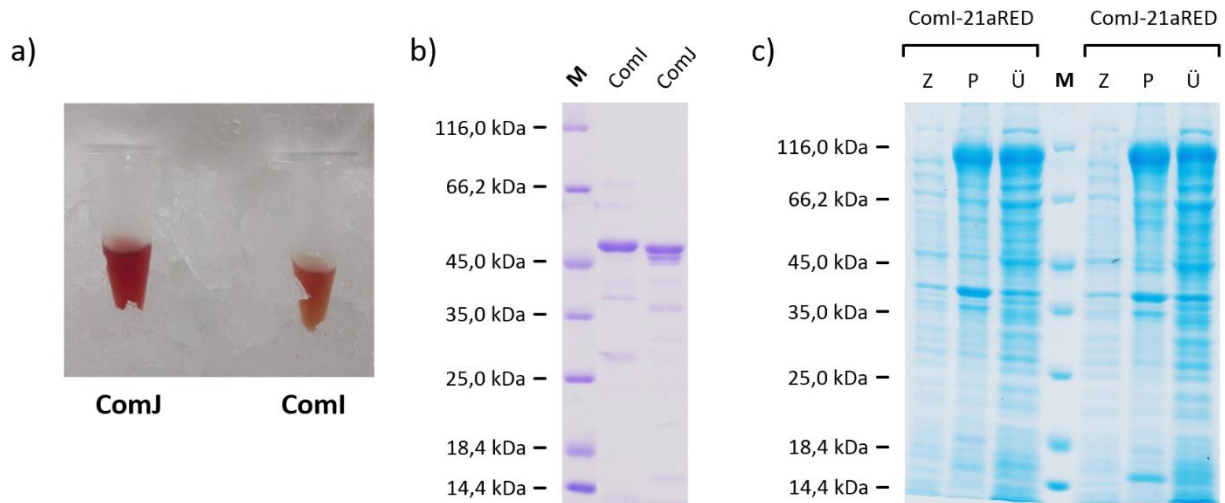
niedrigeren Größe als ComI (47,2 kDa) was sich eventuell, wie bei Gdh (Kapitel 3.1.2), über einen Unterschied in der Konformation erklären lässt.<sup>189</sup>

Zusätzlich sollten *comI-opt* und *comJ-opt* in den LICRED-Vektor kloniert werden. Dieser basiert auf dem Cytochrom P450-Enzym P450RhF aus *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784,<sup>190</sup> welches der Klasse VII angehört (Schema 7). CYP450s dieser Klasse sind an ihrem C-Terminus mit einer PFOR-Domäne fusioniert, die bei P450RhF auch als Reduktase-Domäne (RED-Domäne) bezeichnet wird. Die RED-Domäne ist in der Lage, über entsprechende Motive Flavinmononukleotid (FMN), NAD(P)H und ein [2Fe-2S]-Cluster zu binden und den katalytisch aktiven CYP450-Teil des Proteins mit Elektronen zu versorgen.<sup>104-106</sup> Durch Austausch dieser Häm-haltigen CYP450-Domäne gegen die anderer CYP450s können Fusionsproteine erzeugt werden, die in der Lage sind, Reaktionen unabhängig von externen Redoxsystemen nur unter Zugabe von NADPH zu katalysieren.<sup>190</sup> Dies ist vorteilhaft, da durch eine engere und somit schnellere Interaktion der beteiligten Redoxpartner die Elektronenübertragung verbessert wird, was der Entkopplung des katalytischen Cytochrom P450-Zyklus (Schema 8) durch das Fehlen benötigter Elektronen vorbeugt. Dies wiederum resultiert in einer verbesserten Substratumsetzung.<sup>190,191</sup> Falls die geplante Umsetzung eines linearen Complestatin-Vorläufers mit den Einzelenzymen ComI und ComJ erfolgreich wäre, sollten weitere Tests mit den Fusionsproteinen durchgeführt werden, um das enzymatische System zu vereinfachen und eventuell die Effizienz zu erhöhen.

Daher wurden die *comI-opt* und *comJ-opt* mit den Plasmiden pUC57::*comI-opt* und pUC57::*comJ-opt* als Templat und entsprechenden Überhängen für eine Ligase-unabhängige Klonierung (engl. „Ligase independent cloning“, LIC) amplifiziert und mittels LIC in den LICRED-Vektor eingebracht.<sup>190,192</sup> Testverdau und Sequenzierung bestätigten die Identität der resultierenden Konstrukte LICRED::*comI-opt* und LICRED::*comJ-opt* sowie eine mutationsfreie Klonierung. Die Vektoren wurden dann zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) und einige andere Stämme transformiert, die in unserem Labor routinemäßig zur Überproduktion von Proteinen eingesetzt werden. Testexpressionen der LICRED-Fusionsproteine (ComI-RED, ComJ-RED) in kleinem Maßstab unter Standardbedingungen zeigten dabei jedoch, dass diese schlecht löslich waren (Daten nicht dargestellt). Daher wurden die kodierenden Gene mit den LICRED-Vektoren als Templat amplifiziert und mittels klassischer Klonierung über die T4-DNA-Ligase in pGS-21a (Fa. GenScript) eingebracht. Dieser Vektor wurde genutzt, da er durch das kodierte Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag) geeignet ist, die Löslichkeit von Proteinen zu verbessern.<sup>193</sup> Die resultierenden Konstrukte pGS-21a::*comI-opt-RED* und pGS-21a::*comJ-opt-RED* wurden ebenfalls mittels Testverdau und DNA-Sequenzierung überprüft und anschließend in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Testexpression in LB-Medium bei 16 °C ü. N. (Abb. 25c) zeigte dabei, dass sich ein guter Anteil der Proteine ComI-21aRED (109,8 kDa) und ComJ-21aRED (112,4 kDa) in löslicher Form im Überstand der Zellysate befand. Aus diesem Grund wurde ihnen in der Folge der Vorzug vor den LICRED-Derivaten gegeben.

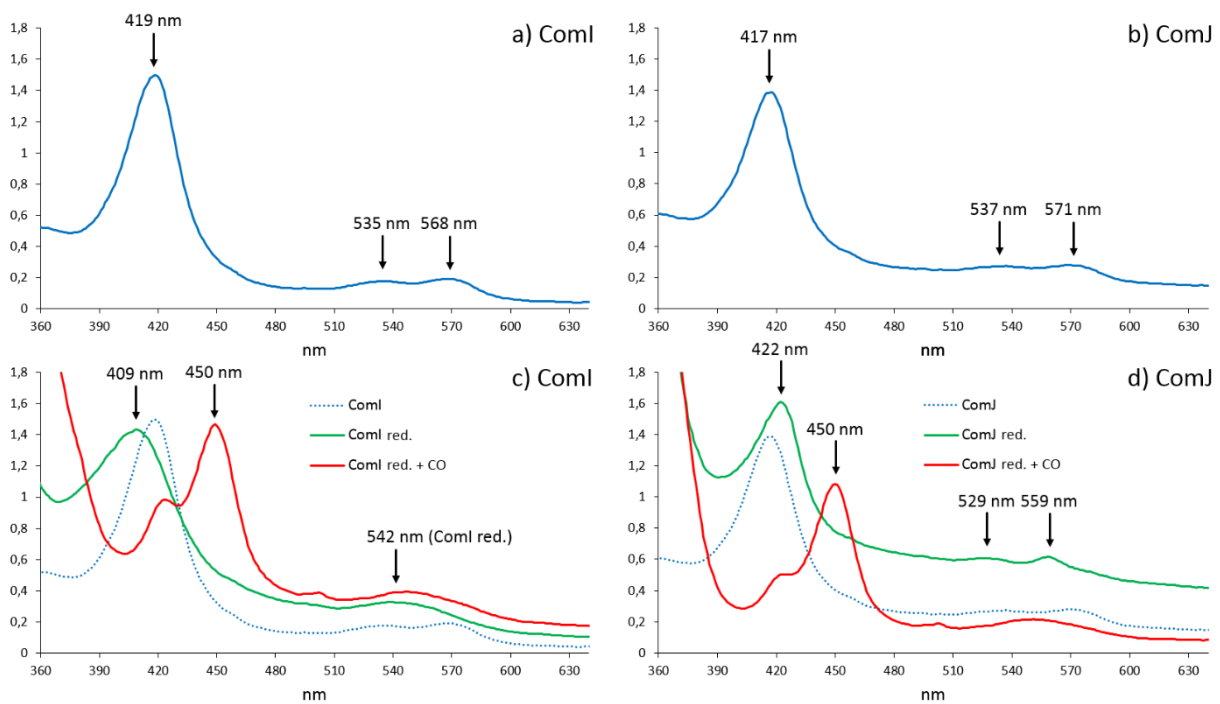


## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 25.** **a)** Aufgereinigte und aufkonzentrierte Proteinlösungen von ComJ (links) und ComI (rechts). **b)** SDS-Gel (12%) der CYP450s ComI (47,2 kDa) und ComJ (50,1 kDa) nach vollständiger Aufreinigung. **c)** SDS-Gel (12%) einer Testexpression der Fusionsproteine ComI-21aRED (109,8 kDa) und ComJ-21aRED (112,4 kDa). M = ‚Unstained Protein MW Marker‘, Z = Uninduzierte Zellen, P = Pellet des Zellysats nach Induktion Ü = Überstand des Zellysats nach Induktion.

Zur näheren Charakterisierung von ComI und ComJ und zum Test der Funktionalität wurden UV/VIS-Spektren der konzentrierten Proteinlösungen aufgezeichnet. Dies erfolgte mit unbehandeltem Enzym (Abb. 26a und b), nach Reduktion mit Natriumdithionit und durchgasen mit Kohlenmonoxid (Abb. 26c und d) oder nach der Zugabe variabler Imidazol-Konzentrationen (Abb. 27).

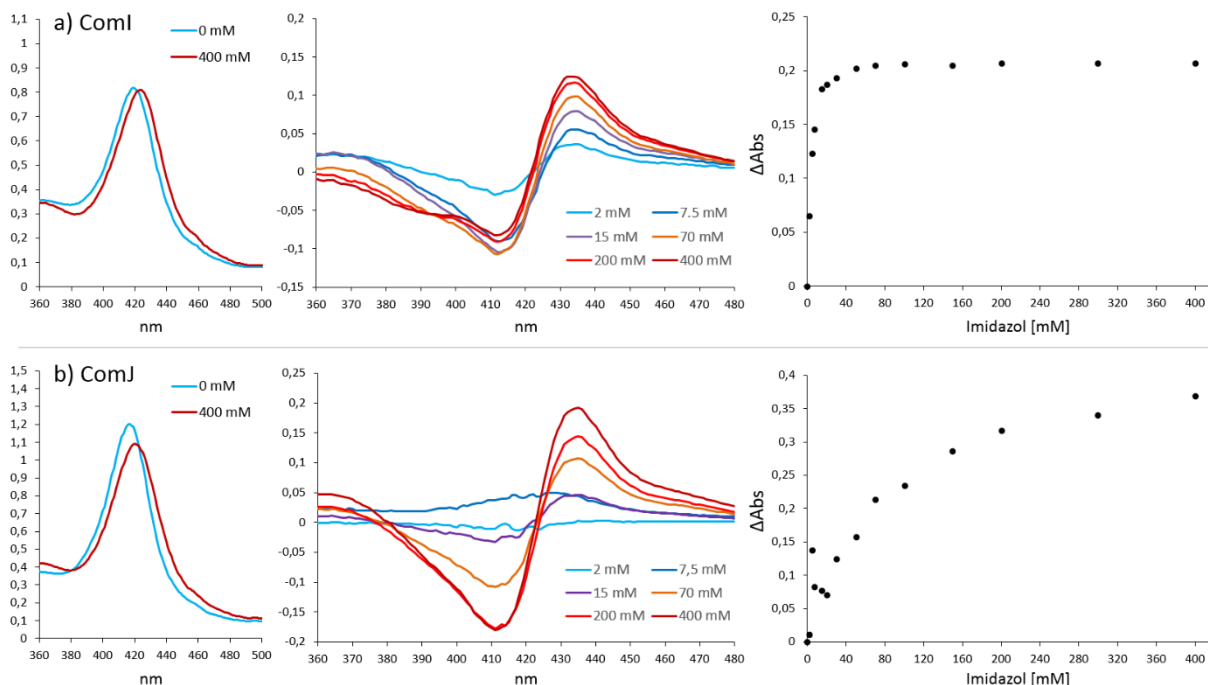


**Abb. 26.** UV-Spektren der aufgereinigten Cytochrom P450-Enzyme ComI (**a**) und ComJ (**b**) in oxidiert Form und nach Reduktion mit Natriumdithionit (red.) und durchgasen der reduzierten Lösung mit CO (red. + CO), (**c** = ComI, **d** = ComJ). Charakteristische Maxima innerhalb der Spektren wurden markiert (Details siehe Text).

## Ergebnisse und Diskussion

Die oxidierten Formen der Proteine zeigten typische UV-Absorptionsspektren für „Low spin“-Cytochrom P450-Enzyme mit einer Soret-Bande bei 419 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peaks bei 535 nm bzw. 568 nm für ComI (Abb. 26a) sowie einer Soret-Bande bei 417 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peaks bei 537 nm bzw. 571 nm für ComJ (Abb. 26b). Nach Reduktion mit Natriumdithionit verschob sich das Maximum der Soret-Bande von ComI zu 409 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peak gingen in einem Peak bei 542 nm auf (Abb. 26c) während sich die Soret-Bande von ComJ zu 422 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peak zu 529 bzw. 559 nm verschoben (Abb. 26d). Durchgasen der reduzierten Lösungen von ComI und ComJ mit CO resultiert in beiden Fällen in der charakteristischen Verschiebung der Soret-Banden zu 450 nm für CYP450s mit reduziertem Häm-Eisen an das ein CO-Ligand gebunden ist (Abb. 26c und d).<sup>194-196</sup> Dies zeigte, dass beide Enzyme in oxidierten Form mit aktivem Häm-Cofaktor aufgereinigt werden konnten.

Eine Zugabe von Imidazol (400 mM) zu beiden Proteinen bewirkte eine typische Verschiebung der Soret-Banden (ComI = 423 nm, ComJ = 420 nm) in Richtung des roten Bereichs des UV/VIS-Spektrums (Abb. 27a und b, linke Seite). Hierdurch wurde die Bindung von Imidazol als axialem Liganden des oxidierten Häm-Eisens angezeigt und so eine Zugänglichkeit des Häms und damit des aktiven Zentrums bestätigt.<sup>73,194,195</sup> Im Falle von ComI scheint diese hoch zu sein, da ab einer Konzentration von 15 mM Imidazol keine nennenswerte Veränderung der Absorption im UV-Differenzspektrum mehr zu beobachten war (Abb. 27a, rechte Seite).

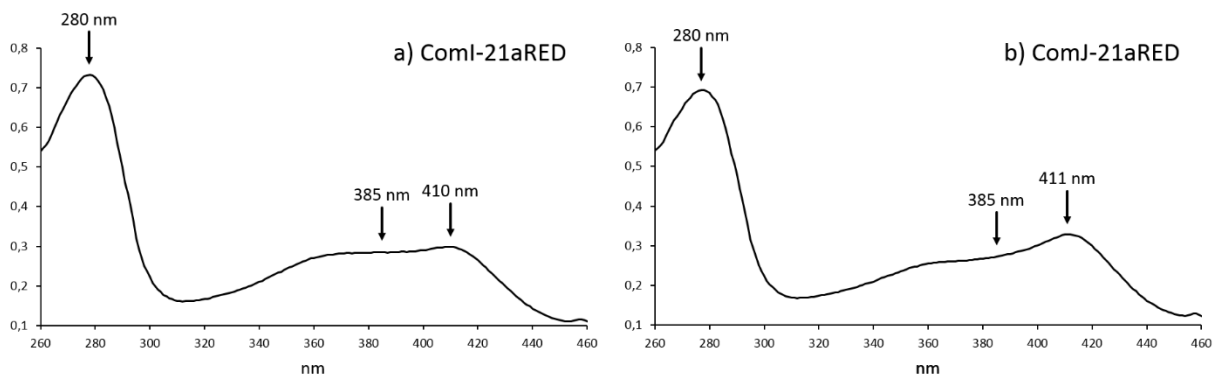


**Abb. 27.** Verschiebung der Soret-Bande von ComI (100  $\mu$ M) (a) und ComJ (100  $\mu$ M) (b) durch Zugabe von 400 mM Imidazol sowie Änderung im Bereich der Soret-Bande beider CYP450s (Spektrum mit ‚X‘ mM Imidazol minus Spektrum ohne Imidazol) nach Zugabe verschiedener Imidazol-Konzentrationen (Auswahl). Außerdem graphische Darstellung der Absorptionsänderung ( $\Delta$ Abs) bei steigenden Imidazol-Konzentrationen (ComI:  $\Delta$ Abs 433 nm zu 412 nm; ComJ:  $\Delta$ Abs 434 nm zu 410 nm).

## Ergebnisse und Diskussion

Dies stimmt mit den Werten von anderen CYP450s überein, bei denen die Affinität für Imidazol ebenfalls im unteren millimolaren Bereich lag ( $< 40 \text{ mM}$ ).<sup>73,194,197</sup> Für ComJ hingegen war auch bei Zugabe von  $400 \text{ mM}$  eine ansteigende Veränderung zu beobachten (Abb. 27b, rechte Seite), was darauf hinwies, dass Imidazol deutlich schlechter vom aktiven Zentrum aufgenommen wird.<sup>73</sup>

Auch die Spektren der Fusionsproteine ComI-21aRED und ComJ-21aRED sollten aufgezeichnet werden. Dafür wurde eine Überproduktion in *E. coli* BL21(DE3) (TB-Medium,  $16 \text{ }^\circ\text{C}$ , ü. N.), gefolgt von einer Aufreinigung mit Rekonstitution der CYP450s über Nacht, Entsalzung und Aufkonzentration, durchgeführt. Dies lieferte in beiden Fällen Proteinlösungen, die leicht rötlich/bräunlich gefärbt waren und mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht wurden.



**Abb. 28.** Spektren der Fusionsproteine ComI-21aRED ( $59,5 \mu\text{M}$ ) (a) und ComJ-21aRED ( $47,9 \mu\text{M}$ ) (b).

Die hierbei beobachteten Spektren (Abb. 28) zeigten Absorptionsmaxima bei  $410 \text{ nm}$  (ComI-21aRED) oder  $411 \text{ nm}$  (ComJ-21aRED) sowie eine Schulter bei jeweils  $350 - 385 \text{ nm}$ . Diese deutet auf Reste von Häminchlorid ( $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ und } 385 \text{ nm}$ )<sup>198</sup> als Folge der Rekonstitution hin, während die Peaks bei  $410$  bzw.  $411 \text{ nm}$  die Soret-Banden repräsentieren. Die Maxima, welche von denen der einzeln vorliegenden CYP450s abweichen (vgl. Abb. 26a und b), lassen sich dabei eventuell über die trotz Rekonstitution schwache Ausprägung der Banden erklären. Durch weitere Optimierung der Expressionsbedingungen oder Zugabe höherer Häminchlorid-Konzentrationen während der Rekonstitution könnte wahrscheinlich eine bessere Beladung beider CYP450s mit dem essentiellen Hämin-Cofaktor erreicht werden. Aufgrund der Untersuchungen anderer Proteine kann aber generell davon ausgegangen werden, dass eine Addition der RED-Domäne an CYP450s weder die spektralen Eigenschaften (Reduzierbarkeit, CO-Bindung) wesentlich verändert, noch die Fähigkeit zur Bindung und katalytischen Umsetzung des nativen Substrats verschlechtert.<sup>190</sup>

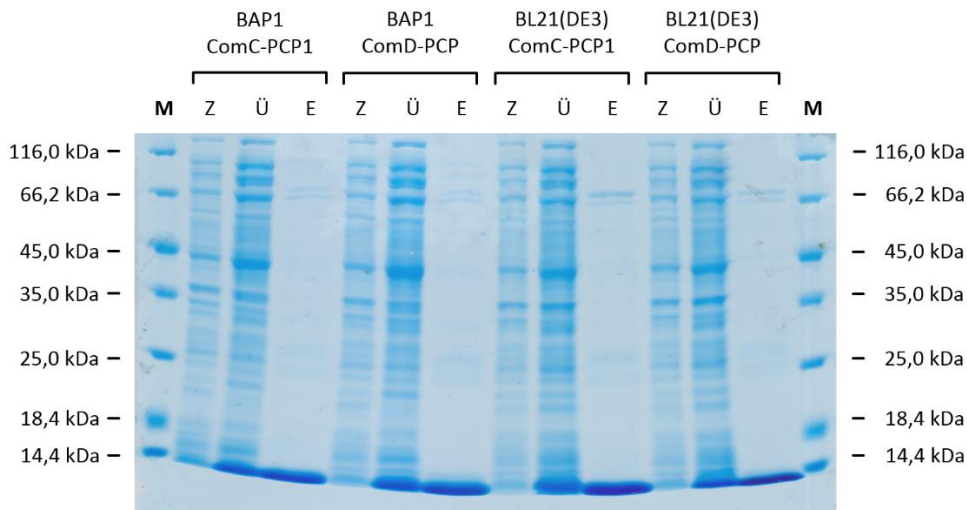
### **3.1.4 Die PCP-Domänen von ComC und ComD**

Peptidylträgerdomänen sind essentielle Bestandteile der NRPS-Maschinerie.<sup>43</sup> Auch für die Aktivität NRPS-assoziiertes Enzyme, wie biaryl-kuppelnder CYP450s, ist eine Bindung der Substrate an die PCPs oft entscheidend. So zeigte sich, dass OxyB aus der Biosynthese von Vancomycin (**12**) zwar in der Lage war, ein freies Hexapeptid in das entsprechende, monocyclische Produkt umzusetzen (5 - 10% Ausbeute), sich die Produktmenge jedoch deutlich verbesserte, je ähnlicher das Substrat der nativen Form wurde. Bei Bindung an die terminale PCP-Domäne der Biosynthese von **12** konnten so bis zu 90% monocyclisches Peptid erhalten werden.<sup>69</sup> Für die geplanten Biaryl-kuppelungsassays sollten daher auch die zu verwendenden, linearen Vorläuferpeptide von Complestatin (**37**) auf die nativen PCP-Domänen übertragen werden. Dies kann in Form von CoA-Derivaten, wie **39**, mittels Sfp (Kapitel 3.1.2) geschehen (Schema 12).<sup>147</sup>

Für eine Klonierung und heterologe Expression wurden die Grenzen und AS-Sequenzen der PCP-Domänen von ComC (ComC-PCP1, ComC-PCP2, ComC-PCP3) und ComD (ComD-PCP) über das Programm ‚PKS/NRPS Analysis‘ vorhergesagt. Da, wie im Falle von *comK* (Kapitel 3.1.1.2), keine gDNA von *S. filipinensis* als PCR-Templat vorhanden war, wurden diese mittels OE-PCR generiert, in pBluescript II SK (Fa. Agilent Technologies) kloniert und die resultierenden Plasmide mittels Testverdau und Sequenzierung überprüft. An die DNA-Sequenzen der PCP-Domänen wurden dabei insgesamt zwischen 60 und 96 bp stromauf- und abwärts angefügt. Dies diente dazu, verlängerte Varianten der kodierenden Sequenzen (plus 36 bp stromaufwärts, plus 9 bp stromabwärts), ähnlich wie sie von Cryle und seinen Mitarbeitern verwendet wurden,<sup>199,200</sup> per PCR zu amplifizieren. Die kodierende DNA der PCP-Konstrukte wurde anschließend in pHis8 kloniert. Identität und Sequenz der so generierten Vektoren (pHis8::*comC-PCP1*, pHis8::*comC-PCP2*, pHis8::*comC-PCP3* und pHis8::*comD-PCP*) wurden überprüft und diese in *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* BAP1 transformiert. Der Stamm *E. coli* BAP1 besitzt eine in das Genom integrierte Kopie des für Sfp kodierenden Gens.<sup>201</sup> Bei erfolgreicher Expression in beiden Stämmen könnten somit Apo- (*E. coli* BL21(DE3)) oder Holoform (*E. coli* BAP1) der PCP-Domänen isoliert werden. Abhängig vom Substrat würde dies in zukünftigen Assays die Beladung von Apo-PCP-Domänen mit CoA-Derivaten (CoA plus Peptidkette) oder die Übertragung von aktivierten Peptiden auf den Ppant-Arm von Holo-PCP-Domänen ermöglichen.

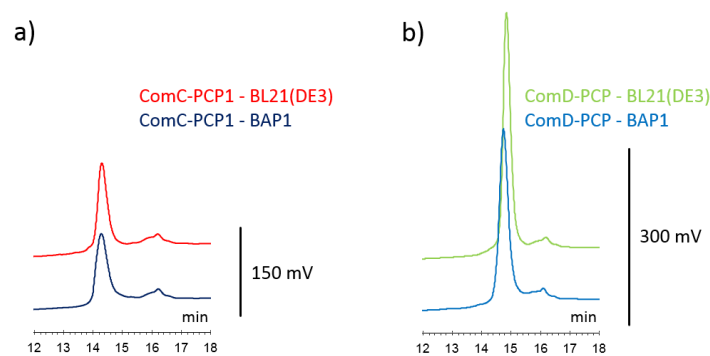
Eine Expression von ComC-PCP1 und ComD-PCP erfolgte ü. N. bei 18 °C in LB-Medium. In der Folge wurden die rekombinanten Proteine aufgereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Dies lieferte farblose Proteinlösungen deren Konzentrationen über die Methode nach Bradford mittels Roti®-Nanoquant-Lösung bestimmt wurde. Die Homogenität der Lösungen wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 29).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 29.** SDS-PAGE (12%) verschiedener Schritte der Aufreinigung von ComC-PCP1 (Apoform: 11,12 kDa; Holoform: 11,46 kDa) und ComD-PCP (Apoform: 11,03 kDa; Holoform: 11,37 kDa) aus *E. coli* BAP1 oder *E. coli* BL21(DE3). M = ‚Unstained Protein MW Marker‘, Z = Uninduzierte Zellen, Ü = Überstand des Zelllysats nach Induktion, E = Eluat vor Entsalzung und Aufkonzentration.

Weiterhin wurden LC-MS-Messungen durchgeführt, um zu ermitteln, ob die aufgereinigten PCP-Domänen aus *E. coli* BL21(DE3) als Apoproteine und die aus *E. coli* BAP1 als Holoenzyme vorliegen. Hierbei wurden 50 µL der verdünnten Proteinlösungen (Endkonzentration: 1,8 - 2,5 mM) analysiert (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘). Die resultierenden HPLC-Chromatogramme zeigten spezifische Peaks bei 14 min 20 s für ComC-PCP1 (Abb. 30a) und bei 14 min 50 s für ComD-PCP (Abb. 31b). Die Retentionszeit der Proteine aus beiden Stämmen war dabei jeweils identisch.

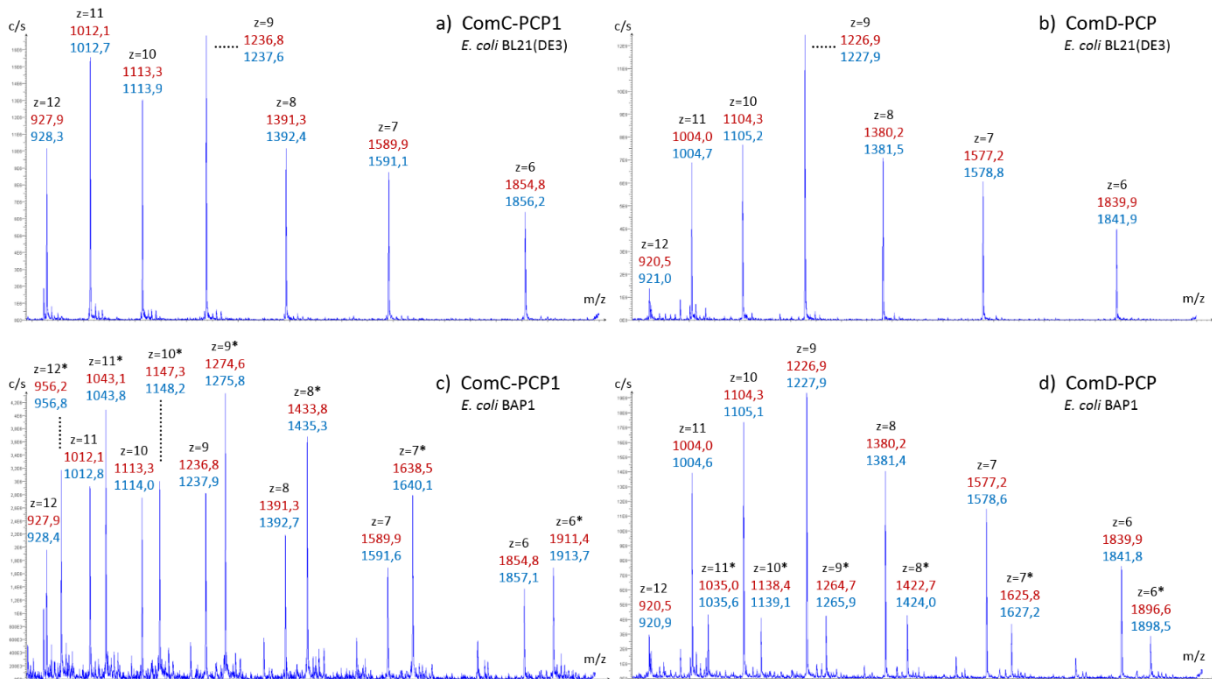


**Abb. 30.** Ausschnitte der HPLC-Chromatogramme von ComC-PCP1 (a) und ComD-PCP (b), welche die Peaks der aus *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* BAP1 aufgereinigten PCP-Domänen zeigen.

Die Massenspektren dieser Peaks entsprachen den mehrfach positiv geladenen Proteinen (Abb. 31). Im Falle der Produktion von ComC-PCP1 und ComD-PCP in *E. coli* BL21(DE3) stimmten die gemessenen Ionenpeaks (blaue Werte) im Rahmen der Abweichung, die aufgrund von Messungenauigkeiten bei

## Ergebnisse und Diskussion

solch großen Molekülen mit multipler Ladung zu erwarten ist, mit den errechneten Massen der Apoproteine (rote Werte) überein (Abb. 31a und b). Die PCP-Domänen wurden also nicht durch *E. coli*-eigene Enzyme modifiziert. Im Falle der Aufreinigung von ComC-PCP1 und ComD-PCP aus *E. coli* BAP1 waren Ionenpeaks sichtbar, die sowohl der Apo- als auch der Holoform entsprachen. Die quantitative Verteilung lag hierbei für ComC-PCP1 geringfügig auf Seiten der Holoform und für ComD-PCP deutlich auf Seiten der Apoform (Abb. 31c und d). Dies zeigte, dass beide Proteine sich *in vivo* durch Sfp aktivieren ließen, wenn auch unvollständig. Dass eine Umsetzung zum Holoprotein in beiden Fällen nicht komplett abließ, kann eventuell mit der Expressionstemperatur von 16 °C erklärt werden, welche deutlich unter der normalerweise bei *in vitro*-Beladungen mit Sfp verwendeten Temperatur von 37 °C liegt.<sup>69,146</sup> Dies verringert die Sfp-Aktivität scheinbar zu sehr, so dass eine vollständige Beladung der überproduzierten PCP-Domänen nicht mehr möglich war.

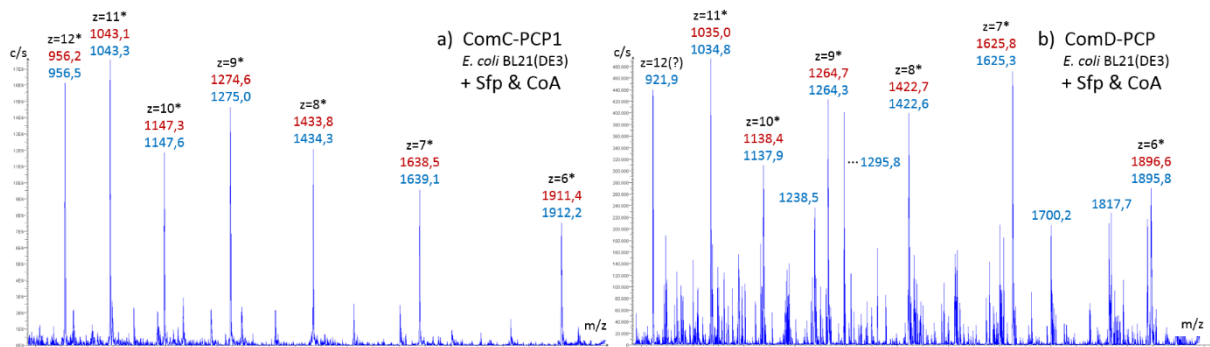


**Abb. 31.** Massenspektren der mit den PCP-Domänen korrelierenden HPLC-Peaks aus Abb. 30. **a)** ComC-PCP1 aus *E. coli* BL21(DE3). **b)** ComD-PCP aus *E. coli* BL21(DE3). **c)** ComC-PCP1 aus *E. coli* BAP1. **d)** ComD-PCP aus *E. coli* BAP1. z = ‚X‘: Ionenpeaks mehrfach positiv geladener Moleküle mit Ladung X; \*: Ionenpeaks phosphopantetheinlierter PCP-Domänen; Rote Werte: Errechnete Massen, Blaue Werte: Gemessene Massen.

Um zu testen, ob eine vollständige Aktivierung der Apoformen von ComC-PCP1 und ComD-PCP aus *E. coli* BL21(DE3) möglich ist, wurden *in vitro*-Untersuchungen mit Sfp durchgeführt (Kapitel 3.1.2). Hierfür wurde eine der PCP-Domänen (2 mM ComC-PCP1 oder 2,5 mM ComD-PCP) mit Sfp (17,5 µM) und CoA (Trilithium-Salz, 500 µM) (**17**) in Tris-HCl-Puffer (50 mM, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5,) auf Eis gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Sfp. Alle Proben wurden anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min, 10 °C) und 50 µL (ComC-PCP1-Assay),

## Ergebnisse und Diskussion

25 µL (Negativkontrollen) oder 12,5 µL (ComD-PCP-Assay) der Überstände mittels LC-MS (Säule: ‚Europher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘) analysiert.



**Abb. 32.** Massenspektren der mit den PCP-Domänen (aufgereinigt aus *E. coli* BL21(DE3)) korrelierenden HPLC-Peaks nach Beladungstests mit Sfp und CoA (17). **a)** ComC-PCP1. **b)** ComD-PCP. z = ‚X‘: Ionenpeaks mehrfach positiv geladener Moleküle mit Ladung X; \*: Ionenpeaks phosphopantetheinylierter PCP-Domänen; Rote Werte: Errechnete Massen, Blaue Werte: Gemessene Massen.

Dies zeigte, dass ComC-PCP1 komplett in Holoform vorlag und somit vollständig beladen wurde (Abb. 32a). Auch ComD-PCP schien komplett aktiviert zu werden, da fast ausschließlich Massensignale mit signifikanter Intensität identifiziert werden konnten, welche den Massen der phosphopantetheinylierten PCP-Variante entsprachen (Abb. 32b). Die einzige Ausnahme bildete hier der Peak mit 921,9 m/z, welche dem Apo-PCP entsprechen könnte. Diese Masse wich jedoch vom vorher gemessenen Wert (Abb. 31b; 921,0 m/z bei 12-facher Ladung) und deutlich vom errechneten Wert (920,5 m/z bei 12-facher Ladung) von ComD-PCP mit Ppant-Arm ab. Aufgrund dessen und wegen des Fehlens weiterer Ionenpeaks der Apoform ist somit davon auszugehen, dass es sich bei dieser Masse um ein Messartefakt handelte. Die Massenspektren der Negativkontrollen (Daten nicht dargestellt) entsprachen denen der Apoform, welche aus *E. coli* BL21(DE) aufgereinigt wurden (Abb. 31a und b).

Da ComC-PCP1 und ComD-PCP sich heterolog exprimieren ließen, stehen diese für zukünftige enzymatische Umsetzungen mit ComI und ComJ, wie in Schema 12 dargestellt, zur Verfügung. Eine Expression in *E. coli* BAP1 lieferte dabei lediglich eine Mischform aus Apo- und Holoform, während die Apoformen aus *E. coli* BL21(DE) komplett mit Sfp aktiviert werden konnten. Daher wurde entschieden, in der Folge nur noch Aufreinigungen der Apo-PCP-Domänen aus *E. coli* BL21(DE), gefolgt von einer anschließenden *in vitro*-Aktivierung durchzuführen.

ComC-PCP1 wurde bereits in ersten enzymatischen Biarylkupplungsassays von Frau Dr. Aldemir genutzt. Hierbei wurde eine Peptidkette bestehend aus den ersten vier Aminosäuren der Complestatin-Biosynthese, welche an die PCP-Domäne gebunden war, als natives Substrat verwendet.

Die lineare Kette wurde in Form eines mit Thiophenol aktivierten Esters eingesetzt was die Übertragung auf die bereits mit CoA (**17**) und Sfp aktivierte PCP-Domäne ermöglichte.<sup>149</sup> Vergleichbare Untersuchungen wurden von Frau Dr. Aldemir auch mit ComC-PCP1 und dem CoA-Derivat des Tetrapeptids durchgeführt (unveröffentlichte Ergebnisse). In beiden Fällen blieb eine Umsetzung zum monocyclischen Produkt jedoch aus. Diese Untersuchungen unterstützen somit die Annahme, dass eine Biarylkupplung nur an einem PCP-gebundenen Peptid vollständiger Länge (**40**) abläuft. Weiterhin ließen spätere Publikationen vermuten, dass die Installation der Biarylbindung von **37** in der zeitlichen Abfolge nach der Knüpfung des Biarylethers erfolgt und von dessen Vorhandensein abhängt.<sup>128</sup> Eine enzymatische Installation der entsprechenden Bindung innerhalb des Tetrapeptids wäre somit benachteiligt.

### **3.1.5 Die potentielle X-Domäne von ComD**

Neuere Untersuchungen der Biosynthese von Glycopeptid-Antibiotika zeigen die Beteiligung einer sogenannten X-Domäne an der Ausbildung von Biaryl- und Biaryletherbindungen. Diese wurde bislang als C- oder E-Domäne klassifiziert und befindet sich in der NRPS strukturell vor der terminalen TE-Domäne.<sup>45,75,202</sup> Ihre genaue Funktion besteht in der sequentiellen Rekrutierung der notwendigen CYP450s über eine gemeinsam genutzte Bindestelle. Die Rekrutierung verläuft hierbei scheinbar über einen als ‚Substratabtastung‘ (engl. „Substrate scanning“) bezeichneten Prozess, in dem die unterschiedlichen CYP450s der Biosynthese um die Bindestelle konkurrieren. Abhängig von Art und Anzahl der bereits eingebrachten Biarylbindungen können sie dann entsprechend ihrer Position im Ablauf der Biosynthese binden und katalytisch aktiv werden.<sup>74,77</sup>

Auch ComD, die abschließende NRPS der Complestatin-Biosynthese, besitzt vermutlich eine solche Domäne,<sup>45</sup> für die fälschlicherweise zuerst eine Funktion als E-Domäne angenommen wurde.<sup>127</sup> Ebenso liefert eine Analyse der Primärstruktur von ComD mittels ‚PKS/NRPS Analysis‘ oder ‚InterPro‘ (beide Kapitel 4.1.5) mit der funktionellen Zuordnung als C-Domäne eine abweichende Vorhersage. Dies war jedoch nicht weiter verwunderlich, da X-Domänen eine strukturelle Verwandtschaft zu Kondensationsdomänen aufweisen.<sup>75</sup>

Wurden die über ‚PKS/NRPS Analysis‘ vorhergesagten X-Domänen von ComD (ComD-X; Complestatin; GenBank-ID ComD: AAK81827), Tcp12 (Tei-X; Teicoplanin; GenBank-ID Tcp12: CAE53353) und PCZA363.5 (Chl-X; Chloroerymomycin; GenBank-ID PCZA363.5: CAA11796) mittels Clustal Omega (Abb. 33) und blastp verglichen, so zeigte sich eine hohe Sequenzübereinstimmung von ComD-X zu den anderen beiden Domänen (ComD-X zu Chl-X: Cover = 100%, E-value = 1e-154, Identität = 54%,



## Ergebnisse und Diskussion

Gemeinsamkeit = 66%; ComD-X zu Tei-X: Cover = 100%, E-value = 7e-138, Identität = 53%,  
Gemeinsamkeit = 66%).

```

ComD-X      PDPLPLTAGQLRTWLLDRLDGDGTPAHHALALRVGGALDRDALTAALGDVADRHEILRRT
Tei-X       PERVPLTARQLRAWLLARPSEETRGRHLSVALRLRGRLDVAALEALRDVAARHEILRRT
Chl-X       PDRVPLTARQLRAWLLARPGEDTADQHVSITLRLGGKLNVPALAAAIGDVAARHEILRRT
* : :**** * : :*** * . : * : :*** : * * : ** * : *** *****

ComD-X      FPGTGRSVHQVLEPEAGRPELRLTEAGEEELPALLRQATAHTFDLTREVPWNHTLFLALS
Tei-X       FPGDAQTVHQHIHDAAP--VRLTPVPATEEDLPARLAERGEQLFDLTRDMPWRCELFALS
Chl-X       FPGDAQSVHQVHVDALA--IELTPVPATEEDLPGLLAERRESVFDLTQEVWPWRCDLFQLS
*** . : :*** : : * . * ** : * . * : **** : : ** . ** **

ComD-X      DTDHVLHLLVHRIAADAQSTGVLMRDLAAAYGARRRGRAPERAPLPLQFADYALWERELL
Tei-X       EKEHVLSVTVHRIAADDSDMDVFFRDLLAAAYGARRRGRAPERAPLALQFADYAIWEQRL
Chl-X       EKDHVLQVKIHRILADDSDMDVFFRDLLAAAYGARREGRVPERAPLALQFADFAIWEHRL
. : :*** : :*** * : * . : :***** * . ***** ***** : : * : . **

ComD-X      NGEQDRETLAWDEIQYWRGALDNAPEGLELPTDRERPVLPTRRAGSVFVGLGAEAHARLT
Tei-X       DGEREQDSLINDQITFWRNHLAGIDQETVLPFDRARPAIPSRAGTVALRLDAGPHARLA
Chl-X       EDEQELDSLINQIVFWRDNLAGIDGETVLPFDRPRSAVPSRRAGTVALRLDADPHARLT
. : * : : * : : * : * . * * * * . : : * * * : * : * * * :

ComD-X      AAAEPSGASAF TVVQTALALLLGRIGATDDVTVGTVLPRSDDEVELEGLIGAFERPLALR
Tei-X       EAVESAGADMPQLVQAALAMLLTRYGAGTDLVIGTTLPRDEDLIDLEPMIGPFARPFVVR
Chl-X       AVAEPVGADTLQMVHAALAMLLAKFGAGHDVVIGTTLPRDEELFDLEPMIGPFTRPLALR
. . * ** . : : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * *

ComD-X      TDLSGDPTFTELLGRAHDAGREARRRQDVPFARLLEALDLPPTPDRHPVFQVALDVHDEG
Tei-X       TDLSADPTFLEVVARVQEAVREARQHLDPFEKIPPELLALPGSLSRHPVYQVGLQVREED
Chl-X       TDVSGDPTFLEVVRVQEAQAAGEHLDPFERIVELLDLPASLSRHPVFQVGLQVDEED
* : * . * * * * * : : * : : * : * . * * * : * * * : * * * : * *

ComD-X      EDPWDAWQLPGLNTSPVDLGTDAMEFDLSLHLDLDELDGAPGGLAGELRYATDLDFDPTT
Tei-X       NGAWDAAELPALRTSVEPTGVEAIELDLAFALTERRNDDEDEDGIEGALHYAADLFDHDT
Chl-X       IDGWDAELPALRTSVEPPGTEAMELDLAVKLTERRFDDDDNSGGIEGALHYATDLDFDEAT
. * * * : * * . * * * * . : : * * * : * . . * : * * * : * * * *

ComD-X      AAAFAARLVRVLEQVADDPPELVRGVDV
Tei-X       AASLARRLVRVLEQVAEDPGRRISDL
Chl-X       AESVARRLVRVLEQVAEDPQRRISDL
* . : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Abb. 33.** Clustal Omega-Alignment der X-Domänen aus den Biosynthesewegen von Complestatin (ComD-X), Teicoplanin (Tei-X) und Chloroerymomylin (Chl-X). Konservierte AS-Positionen des aktiven Zentrums von C-Domänen sind grau hinterlegt. Mutation im Vergleich zur kanonischen Sequenz sind fett markiert. (Asterisk „\*“: Konservierte Position; Doppelpunkt „:“: Position mit stark ähnlicher Eigenschaft; Punkt „.“: Position mit schwach ähnlicher Eigenschaft)

Auch zeigte sich, dass ComD-X Reste eines aktiven Zentrums von C-Domänen besitzt (Abb. 33). Dieses scheint, wie im Falle von Tei-X, durch Mutationen der konservierten Aminosäuresequenz HHxxxDG an den Positionen zwei und sieben (ComD-X: HRxxxDA; Tei-X: HRxxxDD) inaktiv geworden zu sein.<sup>75</sup>

Neben der hohen Sequenzüberstimmung zu bekannten X-Domänen spricht das Vorhandensein der Aminosäuresequenz PRDD in ComI und ComJ (Kapitel 3.1.3), die entscheidend für eine Interaktion von X-Domäne und CYP450s ist,<sup>75</sup> für das Vorhandensein einer Domäne diesen Typs in der Complestatin-Biosynthese.

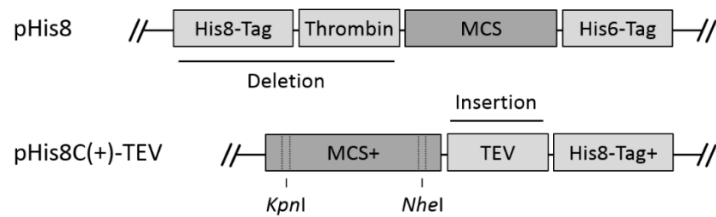
## Ergebnisse und Diskussion

Bereits in früheren Arbeiten unserer Gruppe wurden Assays zur Generierung quervernetzter Complestatin-Derivate durchgeführt. Hierbei ging man aufgrund des damaligen Wissenstandes davon aus, dass das in Schema 12 dargestellte enzymatische System bereits ohne X-Domäne vollständig sei.<sup>149</sup> Da eine Didomäne aus PCP und X-Domäne aber entscheidend für den Erfolg der enzymatischen Biarylkupplung zu sein scheint, sollten zukünftige Assays um diese Komponente ergänzt werden. Aufgrund fehlender gDNA als Templat wurde der für die Didomäne kodierende Bereich von *comD* (*comD-PCP+X-opt*) in Codon-optimierter Form für eine Expression in *E. coli* über die Firma GenScript bezogen. Vom erhaltenen Vektor pUC57::*comD-PCP+X-opt* wurde dann *comD-PCP+X-opt* plus 36 bp stromaufwärts der PCP-Sequenz amplifiziert. Hierdurch wurden, wie bereits bei den einfachen PCP-Domänen (Kapitel 3.1.4), zwölf Aminosäuren an den N-Terminus der über ‚PKS/NRPS Analysis‘ vorhergesagten Aminosäuresequenz des PCP angefügt. Außerdem wurde der Abschnitt amplifiziert, welcher lediglich für die X-Domäne kodiert (*comD-X-opt*). Beide Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pHis8 kloniert und nach einer Überprüfung mittels Testverdau und Sequenzierung in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Expression erfolgte bei 20 °C ü. N. in TB-Medium. Nach einer Aufreinigung der Proteine über Nickel-Affinitätschromatographie wurden diese bei Bedarf entsalzt und aufkonzentriert. Die Reinheit der resultierenden, farblosen Lösungen wurde per SDS-PAGE überprüft. Diese zeigte Banden der erwarteten Größe (vgl. Tab. 52) für die aufgereinigte und entsalzte X-Domäne ComD-X (53,67 kDa; Abb. 35a) und das Eluat der aufgereinigten Didomäne ComD-PCP+X (62,26 kDa; Abb. 35b). Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mittels Nanophotometer bestimmt.

Um eine Affinität von ComI und ComJ zur X-Domäne zu testen, sollten Bindungstests der beiden CYP450s mit der ComD-PCP+X Didomäne durchgeführt werden. Diese basieren auf der Annahme, dass sich ComI und ComJ (ohne Polyhistidin-Tag) bei einer Inkubation mit ComD-PCP+X (plus Polyhistidin-Tag) an die Bindestelle der X-Domäne anlagern. In einer nachfolgenden Nickel-Affinitätschromatographie wäre dann eine Co-Elution beider Proteine zu beobachten.

Für eine heterologe Expression von Proteinen ohne Polyhistidin-Tag wurde der Vektor pHis8C(+)-TEV auf Grundlage von pHis8 nach dem Protokoll von Chiu *et al.* (2008) konstruiert (Kapitel 4.4.4.5).<sup>203,204</sup> pHis8C(+)-TEV (Abb. 34) zeichnet sich durch die Deletion der kodierenden Bereiche des N-terminalen Octahistidin-Tags (His8-Tag) und der Thrombinschnittstelle aus. C-terminal wurde die Sequenz des vorhandenen Hexahistidin-Tags (His6-Tag) zu der eines His8-Tags verlängert. Dabei wurde diese durch das Einbringen von vier CAT-Codons geringfügig für eine Expression mittels *E. coli* optimiert. Weiterhin wurde die Multiple Klonierungsstelle (engl. „Multiple cloning site“, MCS) um die Restriktionsschnittstellen von *KpnI* und *NheI* erweitert und eine Sequenz für die Schnittstelle der Tabakäzvirus-Protease (engl. „Tobacco etch virus“, TEV) zwischen MCS und neuem His8-Tag eingebracht.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 34.** Änderungen bei der Konstruktion von pHis8C(+)-TEV im Vergleich zum Ursprungsvektor pHis8. Thrombin / TEV: Protease-Schnittstellen; MCS+: Multiple Klonierungsstelle von pHis8 erweitert um Erkennungssequenzen für *KpnI* und *NheI*; His8-Tag+: His6-Tag von pHis8 umgewandelt in teilweise (für *E. coli*) Codon-optimierten His8-Tag.

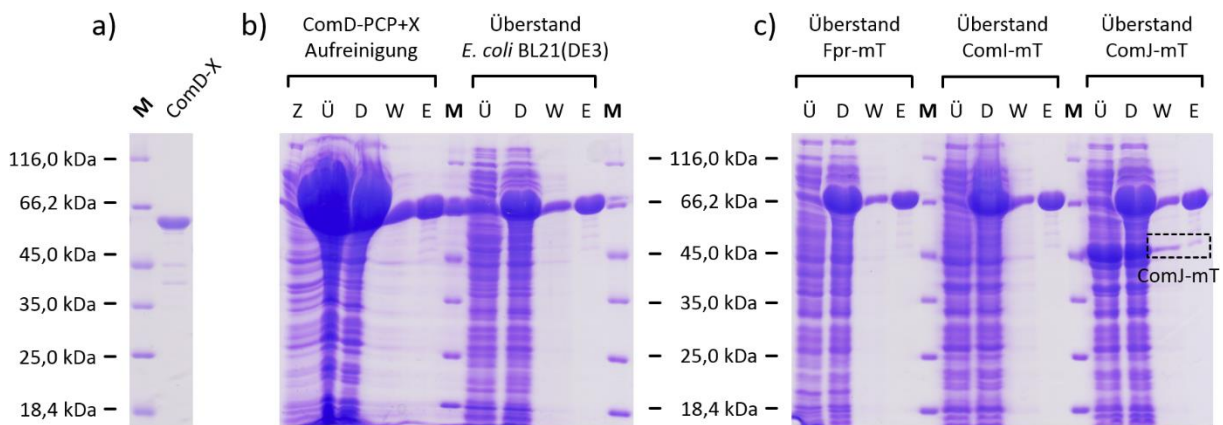
Über die Klonierung von Genen mit Stopcodon in die MCS des neuen Vektors war es nun möglich Proteine ohne Histidin-Tag für die oben erwähnten Bindungsstudien zu produzieren. Werden Gene ohne Stopcodon kloniert ist pHis8C(+)-TEV weiterhin für die Überproduktion von Proteinen mit einem C-terminalen Octahistidin-Tag geeignet. Hierfür wurde der Vektor bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe verwendet.<sup>188</sup>

Neben ComI und ComJ sollten für die Bindungsuntersuchungen die beiden CYP450s aus dem Gencluster von Kistamicin (**38**), welches strukturell eng mit Complestatin (**37**) verwandt ist (Abb. 11),<sup>136</sup> sowie Fpr (Kapitel 3.1.1.1) als Negativkontrolle verwendet werden. Hierfür wurden die fünf kodierenden Gene plus Stopcodon mit geeigneten Restriktionsenzymen aus bereits erzeugten Vektoren ausgeschnitten und in pHis8C(+)-TEV kloniert. Als Ausgangsvektoren dienten hierbei pHis8::*fpr* (*Bam*HI und *Xho*I), pHis8::*comI-opt* (*Bam*HI und *Not*I) und pHis8::*comJ-opt* (*Eco*RI und *Not*I) (siehe Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.3) oder pHis8-TEV::*kis-P450-1* und pHis8-TEV::*kis-P450-2* (beide *Eco*RI und *Bam*HI), welche durch Frau Kalina Kusserow aus unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurden (Konstruktion pHis8-TEV, siehe Kapitel 3.1.7). Die resultierenden Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Eine Überproduktion der Proteine ohne Tag (in der Folge gekennzeichnet durch ...-mT = minus Tag) erfolgte bei 22 °C ü. N. in LB-Medium. Als weitere Negativkontrolle wurde eine Kultur von *E. coli* BL21(DE3) ohne Insert unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

Für die ersten Bindungstests wurden die Zellysat-Überstände der *E. coli*-Kulturen mit Fpr-mT, ComI-mT und ComJ-mT sowie ohne Insert verwendet. Diese wurden mit bereits an Nickelharz gebundenem ComD-PCP+X (62,26 kDa) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Standardaufreinigung mit einem Waschschrift (20 mM Imidazol) und Elution der Proteine. Die Lysat-Überstände und Aufreinigungen wurden dann mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 35b und c). Dies zeigte, dass von den drei Proteinen ohne Histidin-Tag nur ComJ-mT (48,17 kDa) gut exprimiert wurde und scheinbar in geringem Maße an die Didomäne band, da es im Wasch- und Elutionsschritt mit dieser co-eluierte. Dies wird von der Beobachtung unterstützt, dass das Harz nach der Inkubation mit dem Lysat-Überstand die für CYP450s

## Ergebnisse und Diskussion

charakteristische rötliche Färbung aufwies. Auch der erste Teil der Elutionsfraktion war rötlich gefärbt. Aufgrund fehlender Produktion von löslichem Fpr-mT (28,26 kDa) und ComI-mT (45,25 kDa) konnten hier keine Aussagen über die Bindeaffinität zu ComD-PCP+X getroffen werden. Die misslungene Überproduktion ging dabei vermutlich auf die Verwendung fehlerhafter Klone zurück, da eine Expression von *fpr* und *comI-opt* mittels pHis8 bereits erfolgreich war (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.3). Der Verlust des Polyhistidin-Tags dürfte nicht zu einer Behinderung dieser führen. Eine erneute Transformation der Plasmide und Überprüfung der resultierenden Klone mittels PCR sollte hier Abhilfe schaffen. Eine zusätzliche Inkubation des Nickel-gebundenen ComD-PCP+X mit Lysat-Überstand der Kultur ohne Insert hatte im Vergleich zur normalen Expression und Aufreinigung keine veränderten, unspezifischen Bindungen von *E. coli*-Proteinen zur Folge (Abb. 35b).



**Abb. 35.** SDS-PAGE (12%) zur Überprüfung des **a)** aufgereinigten, entsalzten und aufkonzentrierten Proteins ComD-X (53,67 kDa; 1,6 µg Protein aufgetragen) und der **b)** (Linke Seite) Aufreinigung von ComD-PCP+X (62,26 kDa; Eluat mit 2,7 µg Protein aufgetragen). Außerdem Analyse der Bindungstests von ComD-PCP+X mit den Lysaten einer **b)** (Rechte Seite) *E. coli* BL21(DE3)-Kultur ohne Insert oder **c)** mit Fpr-mT, ComI-mT oder ComJ-mT. M = ‚Unstained Protein MW Marker‘, Z = Uninduzierte Zellen, Ü = Überstand des Zellysats nach Induktion, D = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Eluat vor Entsalzung und Aufkonzentration.

Generell deuten diese ersten Ergebnisse darauf hin, dass eine starke Affinität der X-Domäne von ComD zu ComJ der Complestatin-Biosynthese besteht. Aufgrund des Fehlens einer verlässlichen Negativkontrolle in Form von Fpr-mT könnte es sich bei der beobachteten Bindung von ComJ-mT an ComD-PCP+X jedoch auch um ein Artefakt aufgrund einer zu großen Menge des CYP450, oder um mangelnde Reinigung des Harzes von unspezifisch gebundenen Proteinen handeln. Um dies auszuschließen sollte der Bindungstest mit einer funktionellen Negativkontrolle wiederholt werden. Weiterhin sollte das Nickel-Harz mit gebundenem ComD-PCP+X erst mit Imidazol-haltigem Puffer gewaschen und dann mit den Lysat-Überständen inkubiert werden. Ein anschließender zweiter Waschschrift sollte dann mit Puffer ohne Imidazol erfolgen. Dies könnte den Verlust von gebundenem Protein ohne Tag durch Ablösung der Didomäne vom Nickel-Harz verhindern.

## Ergebnisse und Diskussion

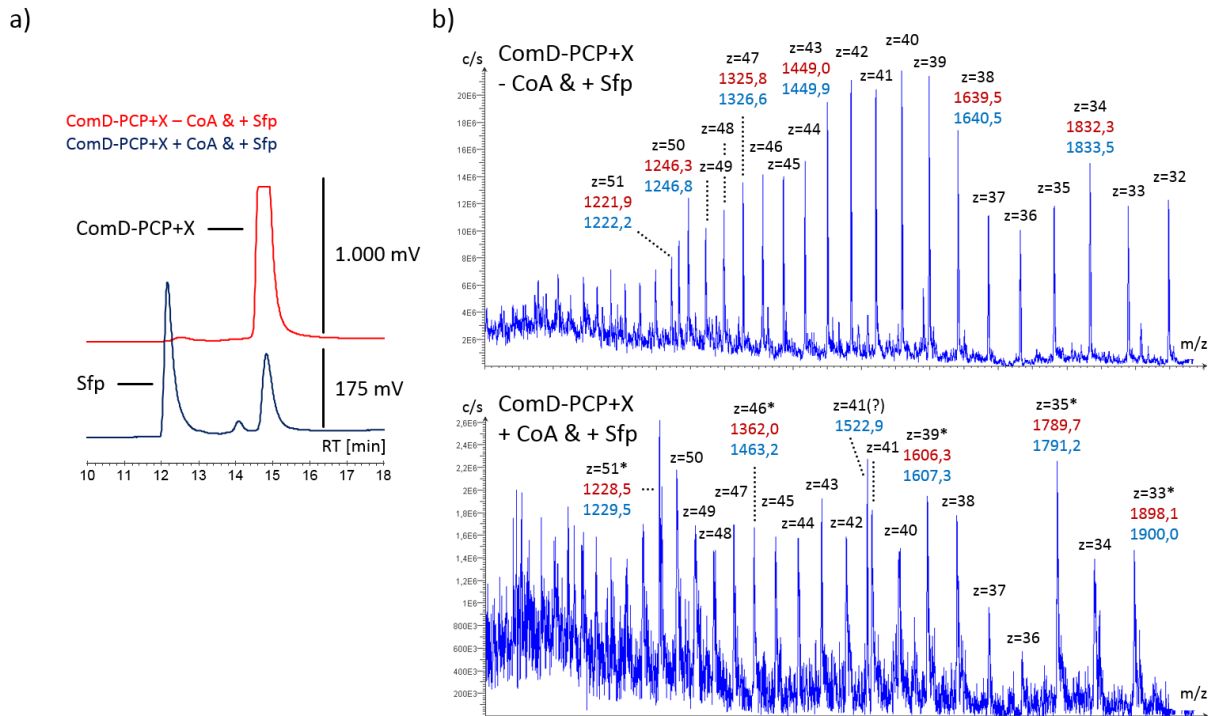
Weiterhin wurde in anderen Untersuchungen eine höhere Affinität von CYP450s zu X-Domänen beobachtet, wenn die X-Domäne alleine exprimiert wurde und nicht an eine PCP-Domäne ohne mögliches Peptidsubstrat gebunden ist.<sup>77</sup> Daher könnte eine Verwendung des ebenfalls heterolog exprimierten ComD-X (Abb. 35) anstelle von ComD-PCP+X für Bindungstests von Vorteil sein.

Neben der oben beschriebenen Methode über Co-Elution und SDS-PAGE könnte die Analyse dabei auch, wie von Haslinger *et al.* (2015) erwähnt, mittels veränderter Retentionszeiten während einer Größenausschluss-Chromatographie oder verringerter Mobilität der Proteine bei einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgen.<sup>75</sup>

Aus zeitlichen Gründen war eine Wiederholung der Bindungstest mit den vorgeschlagenen Änderungen nicht mehr möglich. Die Konstrukte der Kistamicin-CYP450s ohne Histidin-Tag konnten aus demselben Grund nicht mehr getestet werden.

Als abschließende Untersuchung zu ComD-PCP+X sollte überprüft werden, ob sich der PCP-Teil der aus *E. coli* BL21(DE3) aufgereinigten Didomäne entsprechend der alleinstehenden Domänen ComC-PCP1 und ComD-PCP (Kapitel 3.1.4) mittels Sfp (Kapitel 3.1.2) und **17** aktivieren lässt. Hierfür wurde ComD-PCP+X (120 µM) mit Sfp (5 µM) und CoA (Trilithium-Salz, 100 µM) (**17**) in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) auf Eis gemischt und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Ein identischer Ansatz ohne Zugabe von CoA diente als Negativkontrolle. Die Analyse der Proben erfolgte anschließend nach Zentrifugation (13.500 rpm, 10 min) bei Raumtemperatur (RT) indem 60 µL der Überstände mittels LC-MS (Säule: ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4, 250 x 4 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Biarylkupplung‘) analysiert wurden. Dabei zeigte der mit ComD-PCP+X korrelierende HPLC-Peak (Abb. 36a) bei Zugabe von CoA (**17**) nur Massen der mehrfach geladenen, phosphopantetheinylierten Didomäne (Abb. 36b; rote Werte: errechnete Massen, blaue Werte: gemessene Massen). Der entsprechende HPLC-Peak des Ansatzes ohne **17** (Abb. 36a) wies hingegen nur Ionenpeaks des mehrfach geladenen Proteins ohne Ppant-Arm auf (Abb. 36b). Einzige Ausnahme war der Ionenpeak mit einer Masse von 1522,9 m/z, welcher der unbeladenen Didomäne entsprechen könnte (errechnete Masse: 1519,7 m/z). Da sich jedoch keine weiteren Peaks des Apoproteins finden, scheint dieser Messwert ein Artefakt zu sein. In beiden Fällen wichen errechnete und gemessene Massen aufgrund der hohen Ladungen, die detektiert wurden, geringfügig voneinander ab. Die Retentionszeit der HPLC-Peaks von Apo- und Holoform lag in beiden Fällen bei 14 min 50 s.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 36. a)** HPLC-Peaks der Apo- (Ansatz ohne **17**) und Holoform (Ansatz mit **17**) von ComD-PCP+X aus den entsprechenden Chromatogrammen. **b)** Massenspektren der beiden Peaks von ComD-PCP+X. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ionen.  $z = ,X'$ : Ionenpeaks mehrfach positiv geladener Moleküle mit Ladung X; \*: Ionenpeaks phosphopantetheinlyierter PCP-Domänen; Rote Werte: Errechnete Massen, Blaue Werte: Gemessene Massen.

Die vollständige Umsetzung zum Holoprotein bestätigte dabei, dass eine Verwendung der Didomäne keine Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit der PCP-Domäne (= ComD-PCP) hatte. Dies war auch nicht zu erwarten, da das Protein durch Anfügen der X-Domäne lediglich um einen nativen Teil der ursprünglichen NRPS erweitert wurde. ComD-PCP+X ist somit für kommende Assays verfügbar, da es heterolog exprimiert werden kann und sich *in vitro* durch Sfp aktivieren lässt.

### 3.1.6 Die chemo-enzymatische Synthese von Complestatin (**37**) und entsprechender Derivate

Die Assays zur Biarylkupplung wurden wie in Schema 12 dargestellt durchgeführt. Dabei wurden das bereits beschriebene Fpr/PetF-Elektronentransfersystem (Kapitel 3.1.1.1) sowie die akzessorischen Proteine Sfp und Gdh (Kapitel 3.1.2), die Cytochrom P450-Enzyme ComI und ComJ (Kapitel 3.1.3) und die Didomäne ComD-PCP+X (Kapitel 3.1.5) verwendet.

Zuerst wurde die Didomäne mit der CoA-gebundenen, linearen Complestatin-Kette (**39**), welche von Frau Dr. Aldemir aus unserer Arbeitsgruppe synthetisiert und bereitgestellt wurde, analog zu Vitali *et al.* (2003) beladen.<sup>147</sup> Hierfür inkubierte man **39** (100  $\mu$ M; 1:1 gelöst in H<sub>2</sub>O und ACN) und ComD-PCP+X (120  $\mu$ M) 1 Stunde lang unter dreimaliger Zugabe von Sfp (5  $\mu$ M alle 20 min) bei 30 °C in Tris-HCl

## Ergebnisse und Diskussion

(50 mM, pH 7,5). Für eine spätere Negativkontrolle der Assays wurde eine weitere Reaktion ohne Zugabe von CoA-gebundenem Heptapeptid (**39**) hergestellt. Ansatz und Durchführung waren dabei identisch zu den regulären Beladungen.

Da Voruntersuchungen zur Beladung von ComD-PCP mit **39** und Sfp durch Frau Dr. Aldemir bereits erfolgreich verliefen (Daten nicht gezeigt) und auch ComD-PCP+X mit einem Ppant-Arm beladen werden konnte (Kapitel 3.1.5), wurde davon ausgegangen, dass auch ComD-PCP+X über Sfp mit **39** aktiviert werden kann. Die dreimalige Zugabe von Sfp sollte dabei zusätzlich eine vollständige Beladung garantieren. Eine anschließende Aufreinigung der aktivierten Didomäne erfolgte nicht, da Versuche dieser Art mit einer Substrat-gebundenen PCP-Domäne aus der Biosynthese von Arylomycin (**19**) bereits erfolglos waren.<sup>205</sup> Vielmehr wurden die Biarylkupplungsassay unter direkter Zugabe der benötigten Komponenten zur **40**-haltigen Lösung durchgeführt.<sup>149,205</sup> Mit einer Beeinträchtigung der folgenden Reaktionen war dabei nicht zu rechnen, da die Funktionsweise von Sfp definiert ist (Kapitel 3.1.2) und auch eventuell noch vorhandenes, freies CoA-Substrat (**39**) durch die beteiligten CYP450s umgesetzt werden kann, wenn auch mit geringerer Affinität.<sup>69</sup>

Eine Zugabe der weiteren Assay-Komponenten (Tab. 2) erfolgte auf Grundlage der Untersuchungen von Woithe *et al.* (2007) mit OxyB der Vancomycin-Biosynthese.<sup>69</sup>

**Tab. 2:** Bestandteile des enzymatischen Biarylkupplungsassays, die der Lösung des Substrats **40** zugesetzt wurden.

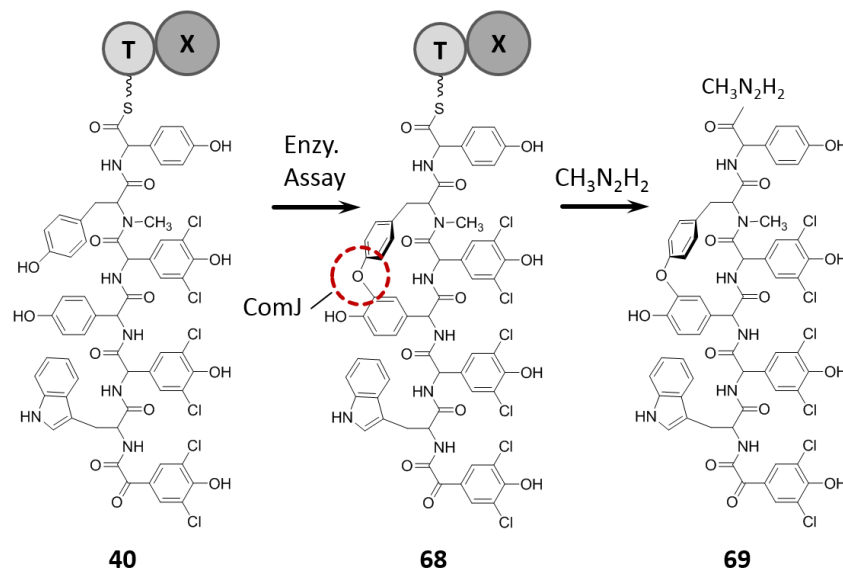
<b>Funktion</b>	Biaryl- / Biaryletherkupplung		Elektronendonorsystem			NADPH-Regeneration	
<b>Komponente</b>	ComI	ComJ	Fpr	PetF	NADPH	Gdh	Glucose
<b>Endkonzentration</b>	8 $\mu$ M	8 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	1 mM	20 $\mu$ M	1 mM

Hierbei wurde einem Ansatz zuerst ComJ, welches vermutlich die erste Kupplung in die lineare Complestatin-Kette einbringt,<sup>128</sup> zugegeben und bei 30 °C inkubiert. Nach 30 min erfolgte die Zugabe des zweiten CYP450 ComI und eine weitere Inkubation für 30 min bei 30 °C. Analog zu den Ergebnissen mit OxyB der Teicoplanin-Biosynthese wurde hierbei erwartet, dass eine sequentielle Zugabe der CYP450s die Ausbeute des ersten Kupplungsschritts verbessert, da so der Wettbewerb der CYP450s um die Bindestelle der X-Domäne für eine gewisse Zeit vermieden wird.<sup>77</sup> Zu Vergleichszwecken wurde ein zweiter Ansatz hergestellt, bei dem die Zugabe von ComI und ComJ gleichzeitig stattfand. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 30 °C. Die Herstellung der Negativkontrolle erfolgte ebenfalls mit gleichzeitiger Zugabe der beiden CYP450s. Hierbei wurde jedoch die oben erwähnte Reaktion zur PCP-Beladung ohne **39** mit den Assay-Komponenten komplettiert. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls für 60 min bei 30 °C inkubiert.

## Ergebnisse und Diskussion

Die drei Ansätze wurden anschließend mit einer wässrigen Methylhydrazin ( $\text{CH}_3\text{N}_2\text{H}_2$ ) -Lösung (50% v/v) versetzt und bei 30 °C (30 min, 800 rpm) inkubiert, um den Thioester zwischen Ppant-Arm und der gebundenen Peptidkette zu spalten.<sup>69,76,200</sup> Dies sollte die nachfolgende Analyse möglicher Biarylverknüpfungen erleichtert werden, da die Unterschiede zwischen der linearen Complestatin-Kette zur Complestatin-Kette mit Biaryletherbindung (ComJ) lediglich  $m/z = 2$  und zur Complestatin-Kette mit Biaryl- und Biaryletherbindung (ComI und ComJ) nur  $m/z = 4$  betragen. Der eindeutige Nachweis dieser an ComD-PCP+X gebundenen Complestatin-Ketten allein über eine Veränderung des Massenspektrums wäre aufgrund der Messungenauigkeiten bei der Detektion eines mehrfach geladenen Proteins dieser Größe (62,26 kDa) nur schwer möglich (vgl. Kapitel 3.1.4 und 3.1.5).

Bei der Abspaltung der enzymatisch modifizierten Complestatinkette war mit zwei Produkten zu rechnen. Zum einen konnte das durch ComI und ComJ an beiden Positionen gekoppelte Peptid (**41**) entstehen und als Methylhydrazinderivat (**42**) freigesetzt werden (Schema 12). Zum anderen war eine unvollständige Umsetzung von **40** möglich. Hierbei würde das lediglich durch ComJ an einer Position gekoppelte Peptid (**68**) gebildet und mittels Methylhydrazin abgespalten werden (**69**) (Schema 17). Da die ComJ-katalysierte Installation des Biarylethers einer nachfolgende Biarylkupplung durch ComI vorausgeht,<sup>128</sup> war nicht mit der Bildung der einfach gekoppelten Kette mit Biarylbindung zu rechnen.



**Schema 17.** Syntheseweg der einfach durch ComJ quervernetzten Complestatin-Kette, als mögliches Nebenprodukt des enzymatischen Assays (= Enzy. Assay),  $\text{CH}_3\text{N}_2\text{H}_2$  = Methylhydrazin.

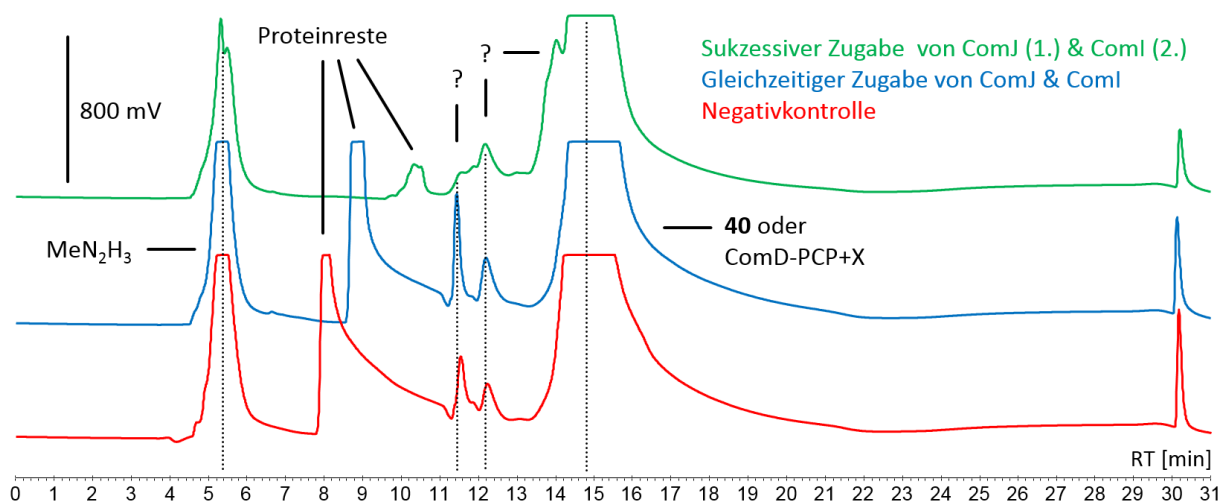
Nach der Spaltung mittels Methylhydrazin wurden die Proteine des Assays durch Zugabe von 2% (v/v) TFA gefällt und mittels Zentrifugation (13.500 rpm, 10 min, RT) entfernt. Der lösliche Überstand wurde anschließend per LC-MS mit einer ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) und



## Ergebnisse und Diskussion

dem Programm ‚Biarylkupplung‘ analysiert. Die resultierenden Chromatogramme (Abb. 37) zeigten fast ausschließlich Signale, die aufgrund der Messung von Referenzen zugeordnet werden konnten (Methylhydrazin, Proteine, **40** bzw. ComD-PCP+X) oder die auch in der Negativkontrolle zu finden waren (11 min 25 s oder 12 min 15 s) und daher nicht einem der gesuchten Produkte **42** oder **69** entsprechen können. Die einzige Ausnahme bildete hierbei eine Schulter des Peaks von **40** bzw. ComD-PCP+X bei aufeinanderfolgender Zugabe der CYP450s (14 min). Dieser war bei gleichzeitiger Zugabe von ComI und ComJ zum Assay nicht sichtbar. Eine Umsetzung wäre aber auch hier, trotz einer Konkurrenzsituation der beiden CYP450s, zu erwarten. Die Ausbeute könnte dabei zwar leicht vermindert sein,<sup>77</sup> ausgehend von der Intensität des Peaks sollte dies aber immer noch ausreichen, um im Chromatogramm erkennbar zu sein. Aufgrund des geringen Molekulargewichts von **42** oder **69** wäre aufgrund der verwendeten Säule auch eine deutlich veränderte Retentionszeit der Hydrazin-gebundenen Produkte im Vergleich zum Substrat **40** zu erwarten. Weiterhin zeigte der Peak nicht die erwarteten Massen von **42** ( $m/z = 1354,15 [M+H^+]$ ) oder **69** ( $m/z = 1356,17 [M+H^+]$ ). Zusammenfassend lässt dies vermuten, dass es sich bei dem Peak bei Minute 14 um ein Messfragment oder ein Derivat der Didomäne handelt.

Die Massen von **42** und **68** fanden sich auch nicht an anderer Stelle der Chromatogramme. Jedoch war auch die Masse des Hydrazinderivats der linearen Complestatinkette ( $m/z = 1358,18 [M+H^+]$ ) nicht detektierbar.



**Abb. 37.** Analyse der enzymatischen Biarylkupplung über ComI und ComJ nach Zugabe von Methylhydrazin ( $\text{CH}_3\text{N}_2\text{H}_2$ ) mittels HPLC (Details siehe Text). Gestrichelte Linien zeigen identische Peaks an.

Mit dem hier verwendeten Assay war keine Umsetzung der linearen Complestatinkette zur einfach oder zweifach gekuppelten Form nachzuweisen. Hierfür kann es mehrere Erklärungen geben. Zum einen könnte eine weitere Optimierung verschiedene Teilschritte des Assays und der nachfolgenden

## Ergebnisse und Diskussion

Analyse vorteilhaft sein. So könnte die mit dem linearen Heptapeptid beladenen Didomäne (**40**) mittels Festphasenextraktion (engl. „Solid phase extraction“, SPE) von anderen Bestandteilen der Beladungslösung (**39**, Sfp) getrennt werden. Dies würde es auch ermöglichen, dem Puffer der Beladungslösung Magnesium als Cofaktor für Sfp zuzusetzen und es später über SPE zu entfernen. Eine mehrmalige Gabe von Sfp wäre somit nicht mehr nötig. Der SPE-Ansatz wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich durch Frau Dr. Aldemir getestet. Auch eine veränderte Vorbereitung möglicher Produkte für eine Analyse mittels LC-MS könnte der Detektion quervernetzter Complestatinketten zuträglich sein. So könnte eine veränderte Spaltung des Heptapeptids von ComD-PCP+X unter basischen Bedingungen erfolgen.<sup>206</sup> Dies würde die Retentionszeit des Heptapeptids im Vergleich zum entsprechenden Methylhydrazinderivat verändern, was eine bessere Trennung von Peptid und eventuell noch vorhandenen Verunreinigungen mittels HPLC ermöglichen könnte. Auch wäre es möglich die abgespaltene Complestatinketten nach Fällung der Proteine durch geeignete Lösungsmittel aus dem wässrigen Überstand des Assays extrahieren. Über einen Vakuumkonzentrator können die Proben dann eingeeengt und anschließend per LC-MS analysiert werden. Dies würde zum einen helfen Verunreinigungen, wie sie in Abb. 37 noch sichtbar sind, zu entfernen, zum anderen ließen sich konzentrierte Proben aufgrund intensiverer Signale besser analysieren.

Eine weitere Erklärung dafür, dass keine gekuppelten Formen der Complestatinkette detektiert werden konnten, könnte in der Störanfälligkeit des komplexen enzymatischen Systems liegen, welches auf dem Wechselspiel einer Vielzahl von Enzymen und Proteinen aus unterschiedlichsten Organismen beruht. So ist trotz der bereits durchgeführten Untersuchungen nicht vollkommen klar, ob und zu welchem Grad die beiden CYP450s ComI und ComJ durch das verwendete Fpr/PetF-System reduziert werden können. Vor allem im Hinblick auf die mögliche Assoziation von Fpr mit einem unbekanntem Ferredoxin aus *E. coli* (Kapitel 3.1.1.3) ist die Verwendung des anderen etablierten Systems zum Elektronentransfer bestehend aus AdR und Adx (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3) erstrebenswert.<sup>150,175</sup> Ansonsten könnte das ganze System an einer zentralen Stelle entkoppelt werden, wenn Fpr Elektronen auf das *E. coli*-Ferredoxin überträgt und dieses nicht in der Lage ist, die Elektronen an ComI oder ComJ weiterzuleiten. Dies könnte auch im vorliegenden Versuch ein Problem gewesen sein. Neben dem klassischen AdR/Adx-System sollte in parallelen Versuchsansätzen auch ein System aus AdR und dem Ferredoxin ComK verwendet werden. Dieses ließ sich durch AdR reduzieren und war anschließend in der Lage die Elektronen für eine Reduktion von Cytochrom C bereitzustellen (Kapitel 3.1.1.3). Da ComK der mutmaßlich native Elektronendonator von ComI und ComJ ist, sollte dies eine Elektronenübertragung auf die beiden CYP450s ermöglichen oder verbessern. Generell könnte auch die Reduzierbarkeit von ComI und ComJ über die verwendeten Redoxsysteme durch CO-Bindung nachgewiesen werden.<sup>183,194</sup> Falls dies zeigt, dass alle hier vorgeschlagenen Möglichkeiten nicht in der

Lage sind, eine effektive Übertragung von Elektronen zu garantieren, könnten auch weitere Systeme, wie das aus Putidaredoxin-Reduktase und Putidaredoxin,<sup>207,208</sup> getestet werden. Auch der zusätzliche Test einer Interaktion von ComI oder ComJ mit der freien, linearen Complestatin-Kette, dem CoA-gebundenen Derivat (**39**) oder dem mutmaßlich, an ComD-PCP+X gebundenen Substrat (**40**) über Differenzspektroskopie (vgl. Kapitel 3.1.3), wie in ähnlicher Form bereits für andere biaryl-kuppelnde CYP450s durchgeführt,<sup>69,74,77,194,195</sup> könnte dabei helfen, die Eigenschaften beider Enzyme besser zu verstehen und die Bedingungen des Assays weiter zu verbessern.

Im Falle einer erfolgreichen enzymatischen Installation des Biarylethers oder von beiden Biarylbindungen, kann dies natürlich als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen der Reaktionsbedingungen, wie der Test weiterer Puffersysteme, oder die Verwendung der Fusionsproteine ComI-21aRED und ComJ-21aRED (Kapitel 3.1.7) dienen.

Weiterer Untersuchungen zur chemo-enzymatischen Synthese von Complestatin (**37**) waren aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit des Substrats **39** zum Ende dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

### **3.1.7 Kristallographie der CYP450s ComI und ComJ**

In den letzten Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen zu Enzymen durchgeführt, welche die Ausbildung von Biaryl- oder Biaryletherbindungen während der Produktion von Glycopeptiden katalysieren.<sup>66-79</sup> Über die Enzyme aus den Biosynthesewegen anderer biarylhaltiger Naturstoffe, wie Arylomycin (**19**) oder Complestatin (**37**), ist hingegen wenig bekannt.<sup>46,127,128</sup> Daher wäre eine Kristallisation der entsprechenden Enzyme von Interesse, um sie mit Kristallstrukturen anderer biaryl-kuppelnder CYP450s zu vergleichen.<sup>78,79,194,195,209,210</sup> Hierdurch könnten bessere Vorhersagen über die Art der eingebrachten Biarylbindung (,C-C'- oder ,C-O-C'-Kupplung) oder Bindemotive für Interaktionspartner, wie im Fall der erwähnten X-Domäne,<sup>75</sup> getroffen werden. Auch für die Identifizierung unbekannter CYP450s, die Biaryl- oder Biaryletherbindungen katalysieren, durch vergleichende Datenbankanalysen könnte die Generierung neuer Kristallstrukturen nützlich sein.

Aus diesen Gründen sollte der Versuch unternommen werden, die Kristallstrukturen der beiden an der Complestatin-Biosynthese beteiligten CYP450s ComI und ComJ aufzuklären. Da das Anfügen eines Tags verschiedenste Eigenschaften eines Proteins negativ beeinflussen kann,<sup>211-213</sup> wurde beschlossen, den für die Aufreinigung angefügten His8-Tag zu entfernen. Um dies einfach und spezifisch bewerkstelligen zu können, sollte die Thrombinschnittstelle (LVPRGS) von pHis8 durch eine TEV-Schnittstelle (ENLYFQG) ersetzt werden.<sup>214</sup> Die Konstruktion dieses pHis8-TEV-Expressionsvektors wurde, wie im Falle von pHis8C(+)-TEV (Kapitel 3.1.5), nach dem Protokoll von Chiu *et al.* (2008) auf der Basis von

## Ergebnisse und Diskussion

pHis8 durchgeführt (Kapitel 4.4.4.5).<sup>203,204</sup> Dabei wurde die kodierende Sequenz der Thrombinschnittstelle (vgl. Abb. 34) durch die Sequenz für die Schnittstelle der TEV-Protease ersetzt.

Für die folgende Klonierung wurde *comJ-opt* mit pUC57::*comJ-opt* als Templat amplifiziert. Hierbei wurde der kodierende DNA-Abschnitt für die ersten 17 Aminosäuren hinter dem Startcodon (AS 2 - 18) entfernt, um die verkürzte Variante *comJ-opt-m17AS* (m17AS = minus 17 Aminosäuren) zu generieren. Dies war nötig, da die entsprechende Aminosäuresequenz reich an Prolin (P) und Glutamin (Q) ist (Abb. 38), was zur Bildung einer unstrukturierten Region führen kann,<sup>215</sup> welche in der Lage ist, Kristallisationsvorhaben negativ zu beeinflussen.<sup>216</sup> Das Gen *comI-opt* wurde über Verdau des Vektors pUC57::*comI-opt* mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Not*I gewonnen. Beide Gene wurden dann in den neuen Vektor pHis8-TEV eingebracht und die Inserts der resultierenden Plasmide pHis8-TEV::*comI-opt* und pHis8-TEV::*comJ-opt-m17AS* wurden per Testverdau auf ihre Identität und durch Sequenzierung auf eventuelle Mutationen untersucht. In beiden Fällen entsprachen die Inserts der erwarteten Sequenz. Die Vektoren wurden anschließend in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

1	<b>MPQQAQRQAP</b>	<b>QQQPRAQQAY</b>	PELLYTRRTR	FDPADDLRAA	PPLSRVIGP	50
51	NESDEWVWLA	TGYTEVRRIL	GDHTNFSTRR	<b>RWGAEGP</b> NWR	PPELVGHLM	100
101	YDPPEHTRLR	QMLTPEFTVR	RLRRLEPDIT	AIIEEHLDTV	EATGPGADLM	150
151	PLFAQPVPGE	VLCELIGVPR	DDRPEFLRHC	HRHLDFSRSR	KVRAADGAAF	200
201	SRYLVSMVAR	QRKDPDDGFI	GALVREHGDD	FTDEEMRGVC	VLLILAGIDN	250
251	IEGMIGLGVL	AMLENPDQLP	LLGERDSTG	GPGAGKGDGG	RLASDRALDE	300
301	LIRYMSVANA	PTPRTAVNDV	RIGDQLIKAG	ETVICSLTMA	NRDPALTDGP	350
351	DRLDLAREPV	AHVAFGHGVH	HCLGAALART	ELRIAYKALW	RRFPELRLAV	400
401	PVEEVRFYNR	ALAHGVHRLP	VAW			450

**Abb. 38.** Vorhersage von unstrukturierten Regionen in der Aminosäuresequenz der Oxidase ComJ mittels PrDOS („Prediction false positive rate“: 2,0%). Rot = Unstrukturierte Region, Schwarz = Strukturierte Region. Zahlen geben die Position der jeweiligen Aminosäurereste an.

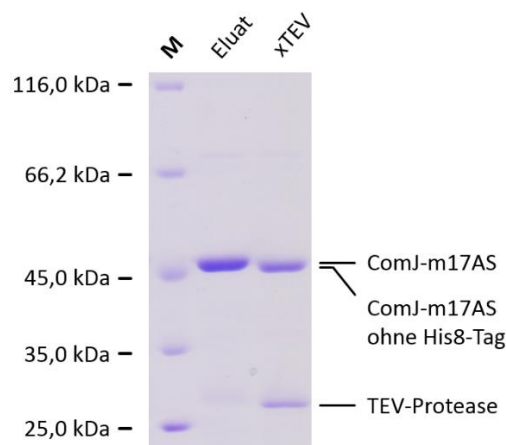
Erste Kristallisationsversuche wurden lediglich mit ComJ-m17AS durchgeführt, da bei den Überproduktionen von ComJ (pHis8) im Durchschnitt 130% mehr Protein erhalten wurde als im Falle von ComI (pHis8) (Ausbeute ComJ: 1,07 mM pro Liter TB-Medium; Ausbeute ComI: 0,46 mM pro Liter TB-Medium). Hierdurch sollte der Aufwand für die Generierung von genügend Ausgangsmaterial für Prozessoptimierungen und die eigentliche Kristallisation minimiert werden.

Die Überproduktion von ComJ-m17AS erfolgte ü. N. bei 20 °C in TB-Medium. Eine anschließende Aufreinigung des CYP450 über Nickel-Affinitätschromatographie erfolgte unter Standardbedingungen mit Rekonstitution durch Hämchlorid-Zugabe (Kapitel 4.6.5). Eine Entsalzung der resultierenden Proteinlösung erfolgte mittels Dialyseschlauch (10 kDa Ausschlussgröße, engl. „Molecular weight cut-off“, MWCO) für zunächst drei Stunden bei 4 °C gegen Tris-HCl (20 mM, pH 7,5). Dieser Puffer

## Ergebnisse und Diskussion

wurde statt des üblichen Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, 10% v/v Glycerol) verwendet. Hierdurch sollte eine Beeinträchtigung der geplanten Kristallisationsversuche vermieden werden, da jegliches Additiv der Proteinlösung die zu testenden Kristallisationslösungen verändern kann. Hohe Konzentrationen der Puffersubstanz Tris würden dabei ihren pH-Wert verschieben, während der Zusatz von Glycerol die Proteinlöslichkeit beeinflusst. Beides könnte einer möglichen Kristallbildung entgegenwirken.

Im Anschluss an diesen Schritt wurde die Konzentration von ComJ-m17AS photometrisch bestimmt. Der Lösung wurde dann TEV-Protease (Expressionsvektor zur Verfügung gestellt durch Frau Dr. Sabine Schneider, TU München; Expression durch verschiedene Mitglieder unserer Arbeitsgruppe) im Konzentrationsverhältnis (mg/mL) TEV-Protease zu ComJ-m17AS, 1:3 zugegeben, um den N-terminalen Octahistidin-Tag des rekombinanten Proteins zu entfernen. Die proteolytische Abspaltung des Tags erfolgte unter fortlaufender Dialyse über Nacht. Eine erfolgreiche Entfernung des Tags konnte per SDS-PAGE (Abb. 39) bestätigt werden, die eine Bande geringerer Größe für ComJ-m17AS nach Entfernung des Tags (45,9 kDa) im Vergleich zu ComJ-m17AS mit Tag (48,16 kDa) zeigte. Die Bande bei 26,85 kDa war auf die TEV-Protease zurückzuführen.

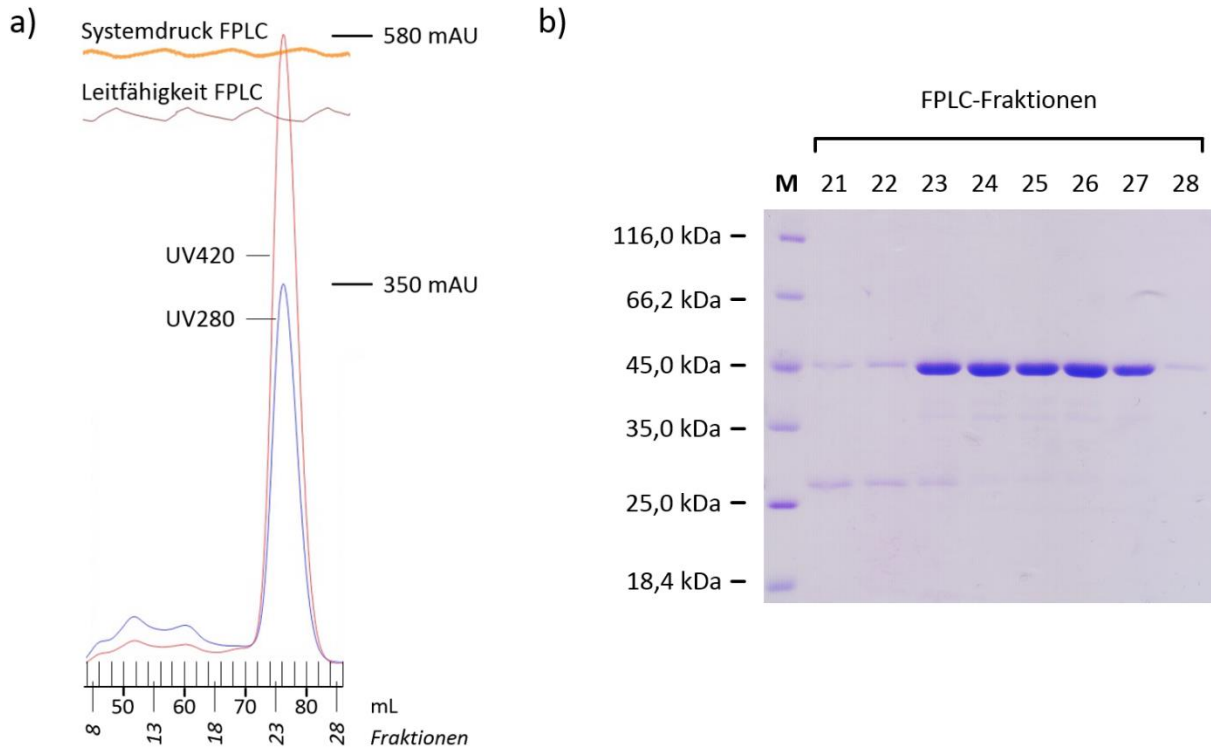


**Abb. 39.** SDS-PAGE (10%) zur Überprüfung der proteolytischen Spaltung von ComJ-m17AS mittels TEV-Protease. Eluat = Eluat der Aufreinigung von ComJ-m17AS (48,16 kDa; 1,6 µg Protein aufgetragen); xTEV = ComJ-m17AS proteolytisch verdaut (kein His8-Tag: 45,9 kDa) mit TEV-Protease (26,85 kDa; 1,75 µg Protein aufgetragen); M = ‚Unstained Protein MW Marker‘.

Nach Entsalzung und Abspaltung des His8-Tags ü. N. wurde die Proteinlösung über einen ‚Vivaspin®20‘-Membranfilter (30 kDa MWCO, PES) eingeeengt. Das Konzentrat wurde auf einem ‚ÄKTA pure 25 M1‘-FPLC-System (Fa. GE Healthcare) mit ‚HiLoad 16/600 Superdex 200 pg‘-Säule gegeben, welches vorher mit Tris-HCl (20 mM, pH 7,5) äquilibriert wurde. Dies sollte dazu dienen, die TEV-Protease und den abgespaltene Octahistidin-Tag von ComJ-m17AS zu trennen. Die Aufreinigung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL/min und wurde bei den Wellenlängen 280 nm (charakteristisch für Proteine) und 420 nm (charakteristisch für CYP450s) kontrolliert. Dies zeigte einen starken Anstieg der Intensität bei beiden Wellenlängen, nachdem ein Volumen von 70 mL über die Säule geleitet wurde (Abb. 40a), was

## Ergebnisse und Diskussion

auf das CYP450 ComJ-m17AS zurückzuführen war. Die Fraktionen 21 - 28, welche unter dem resultierenden Detektionsmaximum lagen, wurden anschließend per SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abb. 40b).



**Abb. 40. a)** Aufreinigung des entsalzten und aufkonzentrierten Ansatzes von ComJ-m17AS und TEV-Protease mittels FPLC. Detektion bei 420 nm (UV420) in Rot, Detektion bei 280 nm (UV280) in Blau. Die maximale Intensität (in mAU) beider Wellenlängen wurde gekennzeichnet. **b)** Überprüfung der FPLC-Fraktionen, welche dem CYP450 ComJ-m17AS zugeordnet wurden, mittels SDS-PAGE (12%).

ComJ-m17AS war in allen Fraktionen zu finden. Die Fraktionen 21 - 23 zeigten jedoch noch Spuren von TEV-Protease und wurden daher verworfen. Die restlichen Fraktionen (24 - 28) wurden vereinigt und auf eine Konzentration von 9,65 mg/mL eingengt („Vivaspin® 2“, 30 kDa MWCO, HY). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt und die restliche Lösung für Ansätze zur Untersuchung der Kristallisationsbedingungen verwendet. Diese wurden von Frau Elke Duell aus unserer Arbeitsgruppe mit den vorgefertigten Sammlungen von Kristallisationslösungen ‚Classic Suite‘, ‚JCSG+ Suite‘, ‚PEGs Suite‘ (alle Fa. Quiagen) und ‚Wizard Classic 1 & 2‘ (Fa. Emerald BioSystems / Rigaku) nach dem „Sitting drop“-Verfahren (0,2 µL Proteinelösung. + 0,2 µL Kristallisationslösung, Reservoir 40 µL) in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen („96 well“-Platte) hergestellt. Die Platten wurden für einige Wochen bei 20 °C inkubiert und regelmäßig optisch überprüft. Hierdurch wurden einige Lösungen identifiziert, in denen sich Kristalle gebildet hatten (Tab. 3).

## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.** Ansätze der vorgefertigten Lösungssammlungen, welche die Bildung von Kristallen zeigten.

Lösungssammlung	Lösung Nr. ...	Erscheinungsbild	Puffer
„Classics Suite“	61	Zu Kugeln zusammengeballt, ohne klare Kanten / Form	0,2 M Magnesiumformiat
„JCSG+ Suite“	90	Sphärolithe	0,1 M Ammoniumacetat; 0,1 M Bis-Tris, pH 5,5; 17% w/v PEG 10000
	41	Sphärolithe	0,1 M Natrium-HEPES, pH 7,5; 20% w/v PEG 10000
	47	Sphärolithe	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; 20% w/v PEG 10000
„PEGs Suite“	48	Sphärolithe	0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; 15% w/v PEG 20000
	70	Längliche Kristallstruktur, rötlich, ohne klare Kanten / Form	0,2 M Kaliumformiat; 20% w/v PEG 3350
	76	Kleine rautenförmige Kristalle, rötlich	0,2 M Calciumacetat; 20% w/v PEG 3350
„Wizard Classic 1 & 2“	82	Sphärolithe, rötlich	0,2 M MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M Imidazol, pH 8,0 mit HCl; 15% v/v EtOH

Von diesen erschienen die mit den „PEGs Suite“-Lösungen 70 und 76 erhaltenen am vielversprechendsten zu sein, da es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Proteinkristalle handelte. Die Strukturen in beiden Lösungen waren außerdem rötlich gefärbt, wie es für CYP450s mit Häm-Cofaktor zu erwarten wäre. Die Sphärolithe in „Wizard Classic 1 & 2“-Lösung 82 wiesen ebenfalls eine rötliche Färbung auf. Auch dies könnte dafür sprechen, dass sie aus ComJ-m17AS gebildet wurden und nicht auf Salzen basieren. Die Entstehung von Sphärolithen kann auf die Bestrebung von Proteinen hindeuten, Kristalle zu formen, ohne dass dies unter den gegebenen Umständen gelingt. Sie ist damit ein guter Ausgangspunkt für weitere Optimierungen.<sup>217</sup> Daher sollten in diesem und in den anderen Fällen, in denen Sphärolithbildung zu beobachten war (Tab. 3), weitere Kristallisationsbedingungen getestet werden. Hierfür empfehlen sich kommerziell erhältliche Sammlungen mit Lösungen ähnlicher Zusammensetzung, wie sie bei den Sphärolithen verwendet wurden.

Da die Qualität der Kristalle aus den „PEGs Suite“-Lösungen 70 und 76 für weitere Untersuchungen noch nicht ausreichte, sollten Feinscreenings mit geringfügigen Änderungen der Lösungszusammensetzung durchgeführt werden, um die Kristallisationsbedingungen und damit die Eignung der resultierenden Kristalle für Strukturanalysen zu optimieren.

### 3.2 Die Biphenomycin-Familie (43 - 46)

Die Substanzen der Biphenomycin-Familie, die Biphenomycine A, B und C (43 - 45) sowie LL-AF283β (46), sind bereits seit einigen Jahrzehnten bekannt, dennoch wurden bisher keine Untersuchungen bezüglich ihrer Biosynthese veröffentlicht. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, das potentielle, biosynthetische Gencluster dieser Substanzen zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

#### 3.2.1 Homologie-basierte Genomuntersuchung zur Detektion des Biphenomycin-Genclusters

Bei den Substanzen 43 - 46 handelt es sich um stark modifizierte Peptide mit jeweils einer Biarylbindung.<sup>156-159</sup> Klassischerweise erfolgt die Biosynthese solcher Moleküle über NRPS, welche in der Lage sind, eine Vielzahl stark modifizierter Aminosäuren zu verknüpfen, und über Cytochrom P450-Enzyme, welche die intramolekulare Biarylkupplung katalysieren, weiter zu modifizieren.<sup>40,63,66,68,128</sup> Ausgehend von dieser Überlegung sollte der Ansatz von Banik und Brady (2008) genutzt werden, um aufgrund von Homologien zu bekannten, biarylkuppelnden CYP450s ein entsprechendes Enzym aus der Biosynthese von 43 - 46 zu detektieren.<sup>218</sup>

Hierzu wurden die Primärstrukturen von CYP450s aus verschiedenen Genclustern, welche die Biosynthese von nicht-ribosomalen Peptiden mit Biaryl- und Biaryletherbindung kodieren, identifiziert (Tab. 4). Für diese Enzyme wurde entweder nachgewiesen, dass sie den Einbau entsprechenden Bindungen katalysieren, oder es ist aufgrund ihrer Lage innerhalb der jeweiligen biosynthetischen Gencluster davon auszugehen.

**Tab. 4.** CYP450s aus den biosynthetischen Genclustern von nicht-ribosomalen Peptiden mit Biaryl- und Biaryletherbindungen, deren Aminosäuresequenz für die Konstruktion von degenerierten Primern verwendet wurde.

Stamm	Substanz	CYP450	GenBank-ID	Quelle
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 3217	Arylomycin (19)	AryC	EFE78221	Liu <i>et al.</i> , 2011. <sup>46</sup>
<i>Streptomyces lavendulae</i>	Complestatin (37)	ComI	AAK81831	Chiu <i>et al.</i> , 2001. <sup>127</sup> / Park <i>et al.</i> , 2016. <sup>128</sup>
		ComJ	AAK81832	
<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 5908	Balhimycin	OxyC_Bal	CAA76549	Pelzer <i>et al.</i> , 1999. <sup>219</sup> / Bischoff <i>et al.</i> , 2001. <sup>66</sup>
<i>Nonomuraea</i> species ATCC 39727	A40926	OxyC_A40926	CAD91206	Sosio <i>et al.</i> , 2003. <sup>220</sup>
<i>Streptomyces toyocaensis</i> NRRL 15009	A47934	Staj	KES08712	Pootoolal <i>et al.</i> , 2002. <sup>221</sup> / Hadatsch <i>et al.</i> , 2007. <sup>68</sup>
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Teicoplanin	OxyC_Tei	CAG15021	Li <i>et al.</i> , 2004. <sup>222</sup>



## Ergebnisse und Diskussion

Die entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden anschließend mittels Clustal Omega verglichen, um konservierte Bereiche zu identifizieren, die sich zur Generierung degenerierter Primer eignen (Abb. 41). Um die Spezifität der Primersequenzen zu prüfen, wurde SalD (GenBank-ID: ABP73648) verwendet (nicht dargestellt). Dieses Enzym diente als Gegenprobe, da es der CYP450-Familie angehört, aber nicht an der Ausbildung von Biaryl- oder Biaryletherbindungen beteiligt ist.<sup>223</sup>

### Region 1

		→ → → →	
AryC	... 63	VGI <b>DP</b> <b>PP</b> <b>DHT</b> <b>QLR</b> GLV SQAFSPRVTAAL EPRIGRLAEQLLDDIVA ERGDKASC DLVGEFAG	122 ...
ComI	... 86	LH <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>KMLN</b> <b>PE</b> <b>FT</b> MRRLRRLQPRIDAVVEECLDAMEQ---AGAPADLMQHFAW	142 ...
ComJ	... 99	MD <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>QMLT</b> <b>PE</b> <b>FT</b> VRRRLRLEPDITAIIEEHLDTVEA---TGPGADLMPLFAQ	155 ...
OxyC_Bal	... 98	ST <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>KMLT</b> <b>PE</b> <b>FT</b> VRRIRRM EPAIQALVDDR LDRVAA---EGPPADLQALFAD	154 ...
OxyC_A40926	... 112	SV <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>GMLT</b> <b>PE</b> <b>FT</b> TARRIRRLEPAMQDLIDDRIDELEA---AGPPADVQALFAD	168 ...
StaJ	... 84	SI <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>RMLT</b> <b>PE</b> <b>FT</b> VRRIRRLEPAIEGII E EHLDALEG---AGPPADLQVLFAD	140 ...
OxyC_Tei	... 106	ST <b>YD</b> <b>PP</b> <b>EH</b> <b>TR</b> <b>LR</b> <b>RMLT</b> <b>PE</b> <b>FT</b> VRRVRRLEPAIQELIDDRIDAMEA---AGPPVDVQTVFAD	162 ...
		*:*:*:*:* :.: * : * : : * : : : : * : : * : *	

### Region 2

		← ← / → →	
AryC	... 183	HHITERRAR PQDDLTSRLATTEVDGKRLDDEEIVGVIGMFLIAGYLPASVLTANTVMALD	242 ...
ComI	... 193	QLTARQRDPGDDLLGMLV <b>R</b> --- <b>EY</b> <b>GD</b> <b>EIT</b> <b>DEE</b> <b>LE</b> <b>GLA</b> <b>AS</b> <b>LS</b> <b>SAG</b> <b>IE</b> <b>N</b> <b>V</b> <b>AS</b> <b>ML</b> <b>GL</b> <b>GT</b> <b>LV</b> <b>LL</b>	250 ...
ComJ	... 206	SMVARQRKDPDDGFIGALV <b>R</b> --- <b>EH</b> <b>GD</b> <b>DF</b> <b>TDE</b> <b>EM</b> <b>RG</b> <b>VC</b> <b>VL</b> <b>LIL</b> <b>AG</b> <b>ID</b> <b>NI</b> <b>EG</b> <b>MI</b> <b>GL</b> <b>GV</b> <b>LAM</b> <b>L</b>	263 ...
OxyC_Bal	... 205	NLIARQRDADDGFLGMI <b>V</b> --- <b>EH</b> <b>GD</b> <b>TV</b> <b>TDE</b> <b>EL</b> <b>KG</b> <b>LCT</b> <b>AL</b> <b>LIL</b> <b>GG</b> <b>VET</b> <b>VAG</b> <b>MI</b> <b>GF</b> <b>GV</b> <b>LAL</b> <b>L</b>	262 ...
OxyC_A40926	... 219	GLIIRQRKDPDEGFIGMLV <b>R</b> --- <b>EH</b> <b>GD</b> <b>DVT</b> <b>DE</b> <b>EL</b> <b>KG</b> <b>VLT</b> <b>AL</b> <b>LIL</b> <b>GG</b> <b>VET</b> <b>VAG</b> <b>SI</b> <b>GF</b> <b>GV</b> <b>LAL</b> <b>L</b>	276 ...
StaJ	... 191	TLITRQRKDPDEGFIGMLV <b>R</b> --- <b>EH</b> <b>GD</b> <b>RIT</b> <b>DE</b> <b>EL</b> <b>KG</b> <b>VCT</b> <b>AL</b> <b>LIL</b> <b>GG</b> <b>VES</b> <b>VAG</b> <b>MI</b> <b>GF</b> <b>GV</b> <b>LAL</b> <b>L</b>	248 ...
OxyC_Tei	... 213	SLITRQRKDPDEGFIGMLV <b>R</b> --- <b>DH</b> <b>GD</b> <b>IT</b> <b>DE</b> <b>EL</b> <b>KG</b> <b>VCT</b> <b>AL</b> <b>LIL</b> <b>GG</b> <b>VET</b> <b>VAG</b> <b>ML</b> <b>GF</b> <b>GV</b> <b>LAL</b> <b>L</b>	270 ...
		.:* :.: . :. * . . *:* : * : : . * . . :.:	

### Region 3

		← ←	
AryC	... 287	GRTVPAGSMVCVWLASAHDRPFRF-ENPDLFDIHRNAGRHLA <b>FG</b> <b>KG</b> <b>I</b> <b>HY</b> <b>C</b> LGAPLARLEA	345 Ende
ComI	... 296	GHVVPKGERVICSAFAANRIATPGDLEDGFDTIREPAPHMA <b>FG</b> <b>H</b> <b>GV</b> <b>HH</b> <b>C</b> LGAPLARMQL	355 Ende
ComJ	... 324	DQLIKAGETVICSLTMANRDPALTD-GPDRDLAREPVAHV <b>A</b> <b>FG</b> <b>H</b> <b>GV</b> <b>HH</b> <b>C</b> LGAALARTEL	382 Ende
OxyC_Bal	... 308	GQLIKAGDYVLCSVLMANRDEALTP-NPNVFDANRAAVSDV <b>G</b> <b>FG</b> <b>H</b> <b>I</b> <b>HY</b> <b>C</b> VGAALARSML	366 Ende
OxyC_A40926	... 322	GQLIKAGDYVLC SILMANRDEALTP-NANVLDVRRDCGSHV <b>G</b> <b>FG</b> <b>H</b> <b>I</b> <b>HY</b> <b>C</b> IGAAIARTLL	380 Ende
StaJ	... 294	GQLIKAGEYVLC SILMANRDEGLTS-DSHLLDANREPLPHV <b>A</b> <b>FG</b> <b>H</b> <b>I</b> <b>HH</b> <b>C</b> IGAAVARAVL	352 Ende
OxyC_Tei	... 316	GQITRAGEYVLC SILMANRDEALTP-HPNVLDAEREPAPHI <b>G</b> <b>FG</b> <b>H</b> <b>I</b> <b>HH</b> <b>C</b> IGAAVARTVL	374 Ende
		.: : * . * * : * . : * * : . : * * : * : * : * : * : *	

**Abb. 41.** Drei Regionen eines Alignments verschiedener CYP450s mittels Clustal Omega, die zur Generierung degenerierter Primer für bestimmte Bereiche (farbig hinterlegt) verwendet wurden. Pfeile indizieren den DNA-Strang, an den die Primer binden, Zahlen geben die jeweilige Position der Regionen innerhalb der vollständigen Aminosäuresequenzen an. Asterisk „\*“: Konservierte Position; Doppelpunkt „:“: Position mit stark ähnlicher Eigenschaft; Punkt „.“: Position mit schwach ähnlicher Eigenschaft.

Verschiedene Primervarianten mit unterschiedlichen Bindestellen, Längen und Orientierungen wurden ausgewählt (Abb. 41), die genomische DNA des putativen Biphenomycin-Produzenten *Streptomyces griseorubiginosus* DSMZ 40469 extrahiert und mittels dieser Primer untersucht. Verschiedene Primerkombinationen lieferten dabei PCR-Produkte im Bereich der erwarteten Größen. Diese Größen basierten auf der Sequenzlänge zwischen den Primer-Bindestellen der Referenzenzyme (Tab. 4). Die PCR-Produkte wurden extrahiert und mittels TA-Klonierung in den entsprechend präparierten Vektor pBluescript II SK (Fa. Agilent Technologies) eingebracht. Nach einer Sequenzierung der Inserts wurden die erhaltenen DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit der

NCBI-Datenbank von nicht-redundanten Proteinsequenzen (in der Folge ‚NCBI-Datenbank‘) abgeglichen. Dies zeigte, dass es sich bei den PCR-Produkten in der Tat um Fragmente von CYP450-kodierenden Genen handelte. Es war jedoch keine signifikante Übereinstimmung mit einem der bekannten und potentiell an einer Biaryl- oder Biaryletherbindung beteiligten Enzyme erkennbar. Dies warf die Frage auf, ob der untersuchte Stamm überhaupt ein entsprechendes Cluster trägt, da die Fähigkeit zur Produktion bestimmter Sekundärmetaboliten in verschiedenen Stämmen durchaus variieren kann.<sup>224,225</sup> Um in der Folge sicherzugehen, dass der untersuchte Stamm die Fähigkeit zur Biphenomycin-Biosynthese besitzt, wurde der Stamm *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708 aus der Originalliteratur verwendet (bereitgestellt durch das ‚International Patent Organism Depositary‘ des ‚National Institute of Advanced Industrial Science and Technology‘ (AIST), Japan; Zugangs-ID: FERM BP-669).<sup>156,157</sup> Zusätzlich wurde der Stamm *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217 (bereitgestellt durch den ‚Agricultural Research Service‘ des ‚United States Department of Agriculture‘, USA; Zugangs-ID: NRRL 3217) in die Untersuchungen miteinbezogen, welcher in der Lage ist, neben LL-AF283 $\alpha$  (Biphenomycin A; **43**) auch die verwandte Substanz LL-AF283 $\beta$  (**46**) zu produzieren.<sup>155,158</sup> Dies sollte die Identifizierung eines potentiellen Genclusters erleichtern, da dieses in beiden Stämmen eine ähnliche Anzahl, Organisation und kodierte Funktion von Genen aufweisen sollte. Durch einen direkten Vergleich könnten mögliche Funde somit umgehend verifiziert werden.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Frau Catharina Seel wurden beide Stämme weiteren Untersuchungen unterzogen. So erfolgte die Herstellung einer Bibliothek der gDNA von *S. filipinensis* NRRL 3217, um mögliche Amplikons einer PCR mit degenerierten Primer durch Reduzierung der Gesamt-DNA-Menge besser identifizieren und isolieren zu können. Eine Durchmusterung der Bibliothek mit Primern für die oben dargestellten CYP450-Bereiche (Abb. 41) oder anderer Zielsequenzen, wie A-Domänen, gab dabei jedoch keinen weiteren Hinweis auf einen möglichen Biosyntheseweg von **43** oder **46** in diesem Bakterium.<sup>171</sup>

### **3.2.2 Vergleichende Genomanalyse von *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708 und *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217**

Da die Untersuchungen der gDNA von *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217, oder der gDNA-Bibliothek von *S. filipinensis* mit degenerierten Primern erfolglos verliefen, wurde beschlossen, die Genome beider Stämme zu sequenzieren. Dies sollte es schnell ermöglichen, einen NRPS- und CYP450-basierten Biosyntheseweg über bioinformatische Analysen zu identifizieren. Die Sequenzierung beider Genome wurde von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Hierzu wurde gDNA beider Stämme isoliert und die Qualität mittels Photometrie bestimmt. Bei ausreichender

## Ergebnisse und Diskussion

Menge und Reinheit der DNA wurde diese an die GATC Biotech AG übergeben. Zur Sequenzierung der Stämme wurden die SMRT („Single molecule real time“)-Methode (*S. griseorubiginosus* No. 43708) und das Illumina-Sequenzierungsverfahren (*S. filipinensis* NRRL 3217) gewählt.<sup>226,227</sup> Sequenzierung und anschließende Assemblierung der erhaltenen DNA-Abschnitte lieferten ein Genom mit einer Größe von 9.371.351 bp auf zwei Contigs für *S. griseorubiginosus* No. 43708 und ein Genom von insgesamt 7.785.545 bp auf 345 Contigs (Tab. 5) für *S. filipinensis* NRRL 3217. Der GC-Gehalt der gDNA lag in beiden Fällen, wie für Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt charakteristisch, über 55%.<sup>228,229</sup> Im Falle von *S. filipinensis* betrug er im Durchschnitt 72,4%. Bei *S. griseorubiginosus* unterschieden sich der GC-Gehalt des größeren der beiden Contigs (9.264.360 bp, 71%) und des kleineren Contigs (106.991 bp, 67,8%). Der Durchschnittswert des Genoms lag somit bei 69,4%.

Die Unterschiede in GC-Gehalt und Größe der beiden Contigs von *S. griseorubiginosus* legten dabei in Anbetracht einer ansonsten vollständigen Assemblierung nahe, dass es sich um ein Chromosom (größeres Contig) und um ein Plasmid (kleineres Contig) handeln könnte. Eine Annotierung der kodierenden DNA-Sequenzen mittels ‚RAST‘ zeigte weiterhin, dass sich die statistische Verteilung von Codons in diesen CDS auf beiden Contigs stark unterscheidet. Während auf dem potentiellen Chromosom 52 der 64 Codons (= 81%) mit einer annähernden Häufigkeit (maximal 2% Abweichung), wie von Wright und Bibb (1992) für Streptomycceten bestimmt, verwendet werden, sind es auf dem Plasmid nur 14 von 64 (= 22%).<sup>230</sup> Da eine unterschiedliche Codon-Nutzung häufig bei Chromosomen und Plasmiden vorkommt,<sup>231</sup> unterstützt dies die vorherige Annahme. Auch besitzen beide Contigs Kopien der Gene *parA* und *parB*, die sich auf einer Vielzahl von bakteriellen Plasmiden mit geringer Kopienzahl und Chromosomen finden. Die Gene kodieren dabei das ParA/ParB-System (Typ I-System bei Plasmiden), welches für eine Verteilung dieser genetischen Elemente auf eventuelle Tochterzellen notwendig ist.<sup>232,233</sup>

Auch die CDS des Genoms von *S. filipinensis* NRRL 3217 wurden, soweit dies aufgrund der Fragmentierung möglich war, mittels ‚RAST‘ vorhergesagt. Zusätzlich wurden die Genome beider Streptomycceten-Stämme über die Online-Anwendung ‚antiSMASH 3.0‘ zur Vorhersage potentieller Naturstoff-Gencluster analysiert (mit folgenden Einstellungen; „ClusterFinder algorithm“: Aus; „Gene finding options“: Prodigal, „Run secondary metabolite detection on all possible ORFs“: Ein; „BLAST comparisons to other gene cluster“: Alle ein; „Additional annotations“: Alle ein; „Optional analyses“: „Whole-genome PFAM analysis“; Homology based metabolic modeling pipeline against template model“: Aus). Die Anzahl der vorhergesagten Gencluster war dabei in beiden Fällen überraschend gering (Tab. 5). Vor allem konnten nur wenige Gencluster des NRPS-Typs detektiert werden. Dabei zeigten die kodierten NRPS weder in der ‚antiSMASH‘-Vorhersage noch bei Analyse über das Programm ‚PKS/NRPS Analysis‘ die Anzahl und Anordnung von Domänen, welche man aufgrund der Kollinearitätsregel für Substanzen der Biphenomycin-Gruppe erwarten würde. Auch die so

## Ergebnisse und Diskussion

vorhergesagte Aminosäurespezifität der A-Domänen deckte sich nicht oder nur teilweise mit den Aminosäuren Ornithin, Arginin, Serin und Phenylalanin oder Tyrosin, die das Grundgerüst von Substanzen der Biphenomycin-Familie (**43** - **46**) bilden. Zusätzliche Analysen der stromauf- und stromabwärts-liegenden DNA-Regionen der NRPS-Gencluster zeigten außerdem keine CYP450s kodierenden Gene in deren unmittelbarer Umgebung.

**Tab. 5.** Statistische Auswertung der Genomsequenzierungen von *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708 und *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217 sowie der weiteren Analysen mittels ‚RAST‘ und ‚antiSMASH 3.0‘.

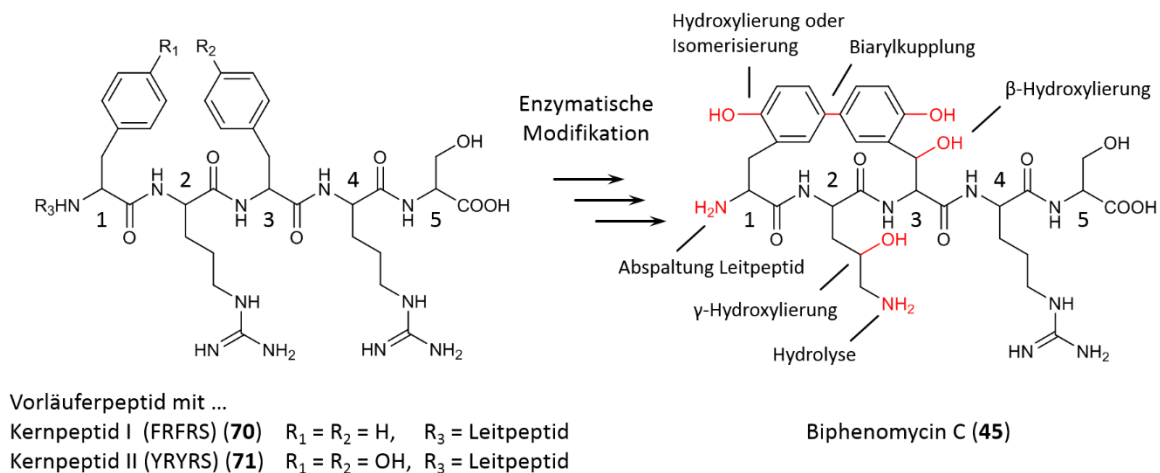
	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> No. 43708	<i>Streptomyces filipinensis</i> NRRL 3217
Sequenzierung	GATC Biotech AG	GATC Biotech AG
Sequenzierungsmethode	SMRT („Single molecule real time“)	Illumina
Assemblierung der Sequenzdaten	GATC Biotech AG	BaseClear B. V.
Zahl der finalen Contigs	2	345
Anzahl der bp	9.371.351 (9.264.360; 106.991)	7.785.545
GC-Gehalt [%]	69,4 (71,0; 67,8)	72,4
Anzahl der CDS (vorhergesagt mittels RAST)	8460	6977
rRNA	18	2
tRNA	70	59
Potentielle Naturstoff-Gencluster der folgenden Typen ...	27*	29
NRPS	2	2
NRPS-PKS	-	3
PKS	5	5
Typ I	3	3
Typ II	2	1
Typ III	-	1
Terpen	5	4
Siderophor	3	1
Ectoin	1	-
RiPPs	4	8
Lanthipeptid	1	3
Lassozeptid	1	1
Bacteriocin	2	4
Indol	1	-
Melanin	2	2
Andere	4	4

\* Alle potentiellen Gencluster befinden sich auf dem vermuteten Chromosom.

## Ergebnisse und Diskussion

Diese Funde führten zur der Annahme, dass die Biphenomycine A, B und C (**43** - **45**) sowie das Molekül LL-AF283 $\beta$  (**46**) möglicherweise nicht über einen NRPS-basierten Weg gebildet werden. Eine alternative Biosynthese könnte dabei, wie bereits in der Bachelorarbeit von Frau Seel diskutiert, über RiPPs verlaufen.<sup>171</sup> Diese Klasse von Naturstoffen hat in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit erfahren, da sie eine wachsende Zahl divers strukturierter Peptide enthält, die aus unterschiedlichsten Quellen isoliert wurden. Die Peptide bestehen dabei aus Aminosäuren, welche eine Vielzahl unterschiedlichster Modifikationen besitzen können.<sup>84,234</sup>

Sollte es sich bei **43** - **46** tatsächlich um RiPPs handeln, war davon auszugehen, dass Biphenomycin C (**45**), welches mit fünf Aminosäuren die längste Peptidkette innerhalb der Familie aufweist, den Aufbau eines entsprechenden Kernpeptids widerspiegelte. Basierend auf dessen Struktur und den proteinogenen Aminosäuren waren zwei Peptide denkbar, die durch enzymatische Modifikationen in **45** umgewandelt werden könnten (Schema 18).



**Schema 18.** Übersicht der enzymatischen Modifikationen, die ein RiPP mit Kernpeptid I (FRFRS) (**70**) oder II (YRYRS) (**71**) in Biphenomycin C (**45**) umwandeln könnten.

Diese Vorläuferpeptide besitzen die Kernpeptide Phe-Arg-Phe-Arg-Ser (FRFRS; Kernpeptid I) (**70**) oder Tyr-Arg-Tyr-Arg-Ser (YRYRS; Kernpeptid II) (**71**). Die weitreichendste und komplizierteste Modifikation wäre dabei mit Sicherheit das Einbringen der Biarylbindung zwischen den aromatischen Aminosäuren an Position 1 und 3 des Peptids (Nummerierung von Vorläuferpeptiden in der Folge wie von Arnison *et al.* (2013) vorgeschlagen,<sup>84</sup> siehe auch Abb. 42). Weiterhin müsste eine Hydrolyse des Argininrests an Position 2 zu Ornithin und Harnstoff erfolgen, wie sie durch Arginasen katalysiert wird, sowie eine Hydroxylierung dieser Aminosäure am  $\gamma$ -C-Atom. Eine weitere Hydroxylierung ist am  $\beta$ -C-Atom der Aminosäure an dritter Position des Peptids notwendig. Während beide möglichen Kernpeptide alle oben erwähnten Veränderungen durchlaufen müssten, würden sie sich bezüglich der Installation der OH-Gruppen an den Benzolringen unterscheiden. Im Fall von Kernpeptid I (FRFRS) wären zwei weitere

## Ergebnisse und Diskussion

Hydroxylierungsreaktionen vonnöten, wohingegen bei Kernpeptid II (YRYRS), zum Beispiel durch eine Isomerase, die intramolekulare Umlagerung der bestehenden Tyrosin-Hydroxygruppen von *para*- in *ortho*-Position katalysiert werden müsste. Eine solche Reaktion ist allerdings noch nicht beschrieben worden.

Für die Suche nach DNA-Sequenzen, welche für Kernpeptid I oder II kodieren, wurde das Genom von *S. griseorubiginosus* No. 43708 ausgewählt. Dieses erschien besser für die Identifikation kurzer DNA-Abschnitte geeignet, da es lediglich auf zwei Contigs verteilt war. Im stark fragmentierten Genom von *S. filipinensis* NRRL 3217 hingegen könnten entsprechende Bereiche fehlen, wenn sie in den nicht-sequenzierten Abschnitten zwischen den Contigs oder an deren Rand lägen. Eine entsprechende Analyse mittels einfacherer Suche über ‚Geneious‘ zeigte, dass das Genom von *S. griseorubiginosus* No. 43708 acht FRFRS und vier YRYRS-Sequenzen enthält. Von diesen war nur eine (FRFRS) Bestandteil einer CDS, welche mittels ‚RAST‘-Annotierung vorhergesagt wurde und für ein 41 Aminosäuren langes hypothetisches Protein kodierte (Abb. 42). Die Sequenz des potentiellen Kernpeptids I lag dabei am C-Terminus des Proteins und wurde von einem Stopcodon abgeschlossen. Die geringe Größe des Proteins sowie die Lage der FRFRS-Sequenz an dessen Ende entsprachen dabei dem erwarteten Schema eines RiPP-Vorläuferpeptids mit kurzem, C-terminalem Kernpeptid und einem längeren, N-terminalen Leitpeptid.<sup>84</sup> Um zu überprüfen, ob ein entsprechendes Peptid in beiden Stämmen kodiert ist, wurde die Aminosäuresequenz aus *S. griseorubiginosus* No. 43708 unter Verwendung von ‚Geneious‘ mit dem Genom von *S. filipinensis* NRRL 3217 abgeglichen. Dies lieferte einen Treffer mit hoher Sequenzübereinstimmung für ein Peptid auf Contig 116 (E-Value = 2,08e-18) (Abb. 42).

	-36	-30	-20	-10	1	5
<i>S. griseorubiginosus</i> No. 43708	M	R	E	S	N	D
	█	█	█	█	█	█
	Q	K	I	L	E	E
	I	E	I	E	D	L
	D	S	L	E	V	L
	E	A	E	D	L	D
	D	S	V	A	F	H
	A	F	H	A	F	R
	F	R	F	R	S	
<i>S. filipinensis</i> NRRL 3217	M	G	E	S	N	D
	█	█	█	█	█	█
	Q	K	I	L	E	E
	I	E	I	E	D	L
	D	S	L	E	V	L
	E	A	E	D	L	D
	D	S	V	A	F	H
	A	F	H	A	F	R
	F	R	F	R	S	

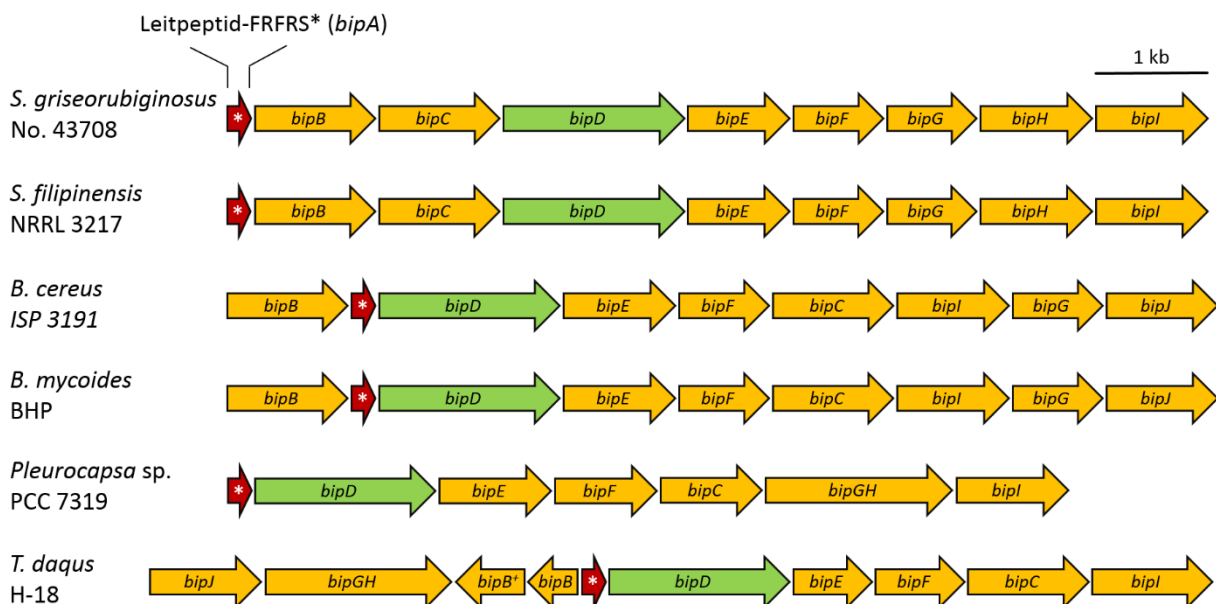
**Abb. 42.** Mögliche ribosomale Vorläuferpeptide für die Moleküle der Biphenomycin-Familie (43 - 46) aus *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217. Das potentielle Kernpeptid ist fett markiert; Abweichung in der Aminosäuresequenz zwischen beiden Peptiden sind grau hinterlegt. Die Positionen des Vorläuferpeptids wurden in Übereinstimmung mit Arnison *et al.* (2013) nummeriert.<sup>84</sup>

Die Spezifität des Fundes sollte anschließend über einen weiteren Abgleich beider Peptidsequenzen mit der NCBI-Datenbank für nicht-redundanten Proteinsequenzen (blastp) verifiziert werden. Dies lieferte in beiden Fällen nur zwei Resultate, ein hypothetisches Protein aus *Bacillus mycoides* BHP (GenBank-ID: KFN01084) und ein hypothetisches Protein aus *Bacillus cereus* ISP 3191 (GenBank-ID: EIQ86903).<sup>235,236</sup> Auch ein Abgleich der nicht-redundanten Proteinsequenz-Datenbank mit beiden

Proteinen aus den entsprechenden *Bacillus*-Stämmen liefert wiederum nur zwei homologe Sequenzen. Diese stammen aus den Stämmen *Thermoactinomyces daqus* H-18 (NCBI-ID: WP\_033099486) und *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 (NCBI-ID: WP\_019503197).<sup>237-239</sup> Da es sich bei den vier Stämmen um drei Vertreter der Firmicuten (*B. mycooides*, *B. cereus* & *T. daqus*) und eine Art aus dem Phyla der Cyanobacteria (*Pleurocapsa* sp.) handelte, konnte kein homologes Protein aus einem Streptomyceten oder einem anderen Mitglied der Actinobakterien identifiziert werden. Der Fund der in Abb. 42 dargestellten Aminosäuresequenzen mit Kernpeptid I (FRFRS) in den beiden untersuchten Streptomyceten-Stämmen schien somit sehr spezifisch zu sein. Dies unterstützte die Annahme, dass es sich tatsächlich um das potentielle Vorläuferpeptid einer RiPP-basierten Biphenomycin-Biosynthese handelte. Da auch die Biosynthese von RiPPs häufig in Clustern kodiert ist,<sup>84</sup> sollten Analyse und Vergleich der CDS, welche die kodierenden Sequenzen der Vorläuferpeptide umgeben, weitere Anhaltspunkte zu Größe und Aufbau eines potentiellen Biphenomycin-Genclusters liefern.

### 3.2.3 Struktur potentieller Biphenomycin-Gencluster und ein möglicher Biosyntheseweg

Für eine Analyse der DNA-Regionen, welche ein Vorläuferpeptid-kodierendes Gen (*bipA*) beinhalteten, sollte eine möglichst große Anzahl an Vergleichssequenzen zur Verfügung stehen.



**Abb. 43.** Organisation und Zusammensetzung der sechs potentiellen Biphenomycin (*bip*)-Cluster. Identische Bezeichnungen markieren homologe Gene (*bipB* entspricht in *T. daqus* H-18 den zwei homologe Genen *bipB* und *bipB\**). Potentielle Vorläuferpeptide mit der Kernpeptid I-Sequenz FRFRS (*bipA*) sind mit \* markiert. Das Gen *bipD*, welches ein Radikal-SAM-Enzym kodiert, ist grün hinterlegt.

## Ergebnisse und Diskussion

Deshalb wurden auch die Genome der beiden *Bacillus*-Stämme (GenBank-ID Genom *Bacillus mycoides* BHP: JMQC00000000.1; GenBank-ID Genom *Bacillus cereus* ISP 3191: AHEK00000000.1) und von *Thermoactinomyces daqus* H-18 (NCBI-ID Genom: NZ\_JPST00000000.1) und *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 (NCBI-ID Genom: NZ\_ALVL00000000.1) miteinbezogen. Ein Vergleich von Lage und Größe der CDS im Umkreis von 10 - 20 kb um *bipA* sowie eine Untersuchung der kodierten Proteine (blastp gegen die NCBI- und SwissProt-Datenbanken) ermöglichte es, in den sechs Stämmen sechs bis neun konservierte Gene zu identifizieren, die an einer Biphenomycin-Biosynthese beteiligt sein könnten. Diese als *bipB* bis *bipJ* bezeichneten Gene der potentiellen Cluster (*bip*-Gencluster) unterscheiden sich zwischen Organismen verschiedener Gattungen geringfügig in Organisation und Aufbau (Abb. 43).

Über Homologien der entsprechenden Proteine BipB bis BipJ zu in den NCBI- und SwissProt-Datenbanken hinterlegten Proteinen konnten auch konservierte AS-Sequenzen und Motive identifiziert werden. Dies ermöglichte es, in Abhängigkeit vom Stand der Forschung, Vorhersagen über eine mögliche Funktion zu treffen (Tab. 6).

**Tab. 6.** Übersicht über die Gene und die mögliche Funktion der kodierten Proteine der potentiellen Biphenomycin-Gencluster aus den Stämmen *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708, *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217, *Bacillus cereus* ISP 3191, *Bacillus mycoides* BHP, *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 und *Thermoactinomyces daqus* H-18.

Protein	Vermutete Funktion	Vorhanden in Stamm ... / Länge (AS)					
		<i>S. griseo-rubiginosus</i> No. 43708	<i>S. filipinensis</i> NRRL 3217	<i>B. cereus</i> ISP 3191	<i>B. mycoides</i> BHP	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319	<i>Thermoactinomyces daqus</i> H-18
BipA (70)	RiPP-Vorläuferpeptid	41	41	42	42	98	63
BipB	Membrantransporter	438	432	462	462	486 (AC)	2 Gene: bipB / bipB <sup>+</sup> ; 136 / 281
BipC	Arginase (UPF0489 / TPR-haltiges Protein)	414	413	414	414	409	414
BipD	Radikal-SAM-Enzym	640	637	650	648	674	647
BipE	DNA-bindendes Protein (AP2Ec Superfamilie)	312	312	321	321	322	220
BipF	DNA-bindendes Protein	255	263	263	263	292	273
BipG	Arginin-Hydroxylase (Cupin-Superfamilie)	271	288	237	237	Fusionsprotein; 733	Fusionsprotein; 718
BipH	Metalloprotease (HExxH-Motiv-Familie)	349	351	x	x		
BipI	Zink-abhängige Protease	346	347	336	336	375	392
BipJ	M42-Peptidase	x	x	358	358	364 (AC)	359

X: Kein Homolog im Genom enthalten (Geneious; tblastn); AC: Homolog außerhalb des Clusters gefunden.



## Ergebnisse und Diskussion

Da den Proteinen eine mögliche Rolle während der Biosynthese von **43 - 46** ausgehend von der Aminosäuresequenz des Kernpeptids I zugeordnet wird (vgl. Schema 18), sollte die postulierte Funktion in diesem Kontext Sinn ergeben. Für einige der Proteine wurde eine konkrete Vorhersage jedoch erschwert, da wenig über entsprechende Proteinfamilien bekannt war. Auch sollten rein bioinformatischen Analysen eines RiPP-Genclusters mit Vorsicht betrachtet werden. So müssen Enzyme, die durch Gene in der Nähe der Vorläuferpeptid-CDS kodiert sind, nicht zwangsläufig an der Reifung des Vorläuferpeptids beteiligt sein. Umgekehrt können Enzyme, welche für die Prozessierung eines RiPP-Vorläufers notwendig sind, an weit entfernten Stellen im Genom kodiert sein.<sup>84</sup>

Im Folgenden soll eine erste Übersicht über die in den Clustern kodierten Proteine und ihre möglichen Funktionen während der Biphenomycin-Biosynthese gegeben werden. Auch aufgrund fehlender experimenteller Daten konnte zum jetzigen Stand keine detailliertere Analyse bezüglich Struktur und Funktion erfolgen.

### **3.2.3.1 BipA (70), das Vorläuferpeptid der Biphenomycin-Familie (43 - 46)?**

Das zentrale Element des Genclusters ist *bipA*, welches für das potentielle Vorläuferpeptid einer RiPP-Biosynthese der Biphenomycine kodiert. In allen sechs Genclustern findet man eine entsprechende, homologe CDS (Abb. 43, Tab. 6). Ein Vergleich der kodierten AS-Sequenzen mittels ‚Clustal Omega‘ zeigte konservierte Abschnitte der Peptide auf (Abb. 44). Hierzu zählten auch die ersten drei AS des mutmaßlichen Kernpeptids (FRF). Die letzten beiden AS hingegen unterschieden sich teilweise (2-mal RS, 2-mal SS, 1-mal KA, 1-mal SA). Auch die Sequenzen des Leitpeptids wiesen einige konservierte AS auf, wobei die Sequenz FHA am augenscheinlichsten war, da sie direkt vor dem potentiellen Kernpeptid lag. Die C-terminalen AS-Sequenzen, sofern vorhanden, wiesen keine konservierten Bereiche auf.

```
S. filipinensis NRRL 3217      --MGESNTDQKILEEIEDLDSLEVLEAEDLDDSVAFHAFRFRS-----
S. griseorubiginosus No. 43708 --MRESNDEQKILEEIEDLDSLEVLEAEDLDDSVAFHAFRFRS-----
Pleurocapsa sp. PCC 7319      --MSEGN-----DRLSELEELDVIARELNVGNSFHAFRFKA VEPVDEVTRSLIDKAAA
T. daqus H-18                 MSKEIKK-----ELKNELEQLTVVEAKELQVGNAFHAFRFS SAIEELD VVEAN----EL
B. cereus ISP 3191            ----MEN-----KNEKLELDLEVIEAKELEVGNAFHAFRFS A APEAKEDEK-----
B. mycooides Stamm BHP        ----MEN-----KNEKLELDLEVIEAKELEVGNAFHAFRFS SAPEAKEEEK-----
                               :      .      *:. * *:*:*.:*:. : :***** :

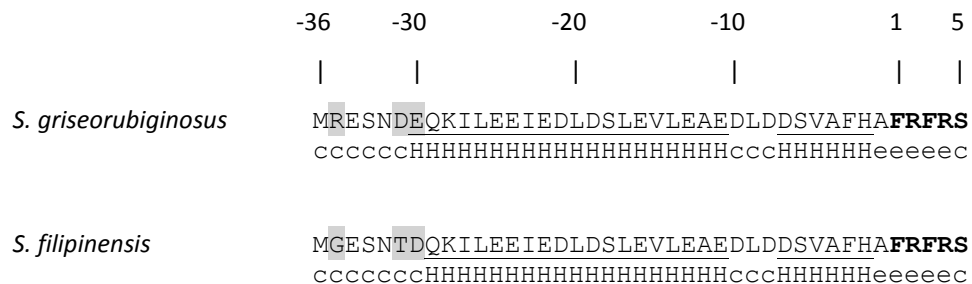
S. filipinensis NRRL 3217      -----
S. griseorubiginosus No. 43708 -----
Pleurocapsa sp. PCC 7319      TLGMTYEQFSEMVDNEAVEDNPHANFARGVLSSVRTLAALQLKLE
T. daqus H-18                 KVGNAFHAFRFNA-----
B. cereus ISP 3191            -----
B. mycooides Stamm BHP        -----
```

**Abb. 44.** Alignment des potentiellen Biphenomycin-Vorläuferpeptids BipA (70) aus den sechs untersuchten Stämmen mittels ‚Clustal Omega‘. Das vermutete Kernpeptid ist fett markiert. Asterisk „\*“: Konservierte Position; Doppelpunkt „:“: Position mit stark ähnlicher Eigenschaft; Punkt „.“: Position mit schwach ähnlicher Eigenschaft.

## Ergebnisse und Diskussion

Die Sequenz des Kernpeptids innerhalb einer RiPP-Klasse kann sehr variabel sein, da bei der RiPP-Biosynthese häufig das Leitpeptid für die Rekrutierung einer Vielzahl modifizierender Enzyme verantwortlich ist. Dies zeigt sich auch anhand der ausgeprägten Substanztoleranz vieler Enzyme, die an der Biosynthese von RiPPs beteiligt sind.<sup>85</sup> Die Sequenz des potentiellen Kernpeptids von BipA (**70**) war ebenfalls recht variabel (Abb. 44), wobei sie sich teilweise sogar innerhalb von Organismen derselben Gattung unterschied (FRFSA in *B. cereus*, FRFSS in *B. mycooides*). Somit könnte auch das BipA-Kernpeptid keinen oder keinen großen Einfluss auf die Rekrutierung assoziierter Enzyme besitzen. Im Umkehrschluss war jedoch davon auszugehen, dass konservierte Bereiche der Leitpeptide wichtig für eine Biphenomycin-Biosynthese sind, wobei verschiedene Bereiche diverse Enzyme rekrutieren könnten.<sup>83,85</sup> Ohne weitere Untersuchungen, wie die Mutation bestimmter Aminosäurereste, kann allerdings keine Vorhersage über die Funktion spezifischer Sequenzen innerhalb des Leitpeptids erfolgen.

Obwohl kürzlich ein konserviertes RiPP-Vorläuferpeptid-Erkennungselement (engl. „RiPP precursor peptide recognition element“, RRE) in Enzymen der RiPP-Biosynthese gefunden wurde, sind die genauen Grundlagen einer Interaktion von Vorläuferpeptiden und modifizierenden Enzymen noch größtenteils unverstanden.<sup>83,240</sup> Auffällig ist jedoch, dass viele Leitpeptide die Neigung zeigen, in Lösung oder gebunden an assoziierte Proteine  $\alpha$ -Helices zu bilden.<sup>84</sup> Auch im Falle der BipA-Homologe aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* wurde durch ‚GOR IV Secondary Structure Prediction Method‘ eine  $\alpha$ -Helixstruktur für den Großteil der Leitpeptide vorhergesagt (Abb. 45).



Warf man einen genaueren Blick auf die Sequenzen der Vorläuferpeptide aus den sechs Stämmen, ließ sich feststellen, dass die zwischen allen BipA-Homologen konservierte Sequenz FHAFRF zweimal im *T. daqus* H-18-Peptid auftrat (Abb. 44). Die beiden Aminosäuren an Position 4 und 5 eines potentiellen Kernpeptids waren dabei, wie in den meisten anderen BipA-Homologen, zueinander verschieden (1-mal SS, 1-mal NA). Weiterhin war die Sequenz zwischen den beiden FHAFRF-Motiven zu großen Teilen identisch mit dem vermuteten Leitpeptid vor dem ersten Motiv. Eine multiple Anzahl des Kernpeptids in Vorläuferpeptiden ist auch aus anderen RiPPs bekannt. So findet sich die Kernsequenz YAIG gar 16-mal in UstA, dem Vorläuferpeptid von Ustiloxin B aus dem Pilz *Aspergillus flavus*. Die Vervielfältigung des Kernpeptids dient dabei wahrscheinlich dazu, die Anzahl an RiPPs, die mit einem Schritt produziert werden, zu erhöhen.<sup>241</sup> Auch *Linum usitatissimum*, *Phomopsis leptostromiformis* und *Prochloron* spp., der cyanobakterielle Symbiont von Seescheiden, produzieren RiPPs deren Vorläuferpeptide mehrere Kernpeptide besitzen. Interessanterweise variieren auch deren Sequenzen leicht, so dass mithilfe eines Vorläuferpeptids unterschiedliche Varianten eines Naturstoffs gebildet werden. So produziert *L. usitatissimum* über einen Vorläufer mit drei unterschiedlichen Kernpeptidvarianten die Cyclolinopeptide G (drei Kopien im Vorläuferpeptid), D (eine Kopie) und F (eine Kopie). In *P. leptostromiformis* beinhaltet PhomA acht Kernpeptide von denen fünf Kopien die Vorläufer für Phomopsin A, B oder E und drei Kopien die Vorläufer für Phomopsin P, Q oder R bilden.<sup>84,242,243</sup> Die beiden potentiellen Kernpeptide FRFSS und FRFNA von BipA (70) aus *T. daqus* H-18 könnten somit ebenfalls auf bislang unbekannte, alternative Biphenomycin-Moleküle hindeuten, die mittels eines Vorläuferpeptids gebildet werden.

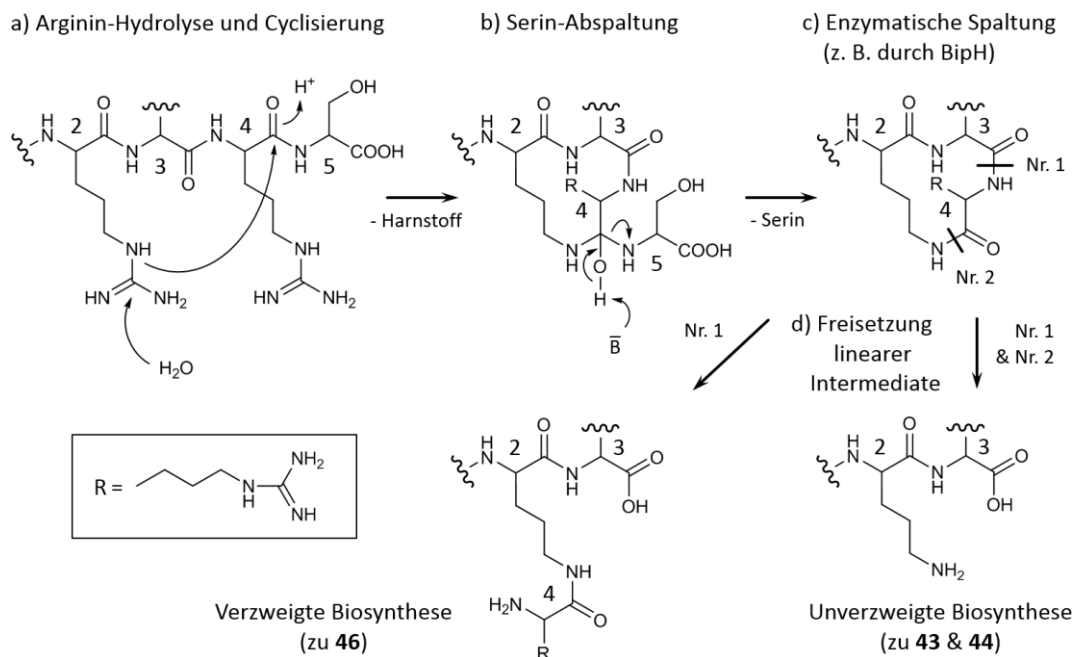
### **3.2.3.2 BipC**

Eine Untersuchung der BipC-Homologe aus *B. cereus*, *B. mycooides*, *T. daqus* und *Pleurocapsa* sp. ließ vermuten, dass diese eine mögliche UPF0489-Domäne (UPF = engl. „Uncharacterized protein family“, deutsch: uncharakterisierte Proteinfamilie) an ihrem N-Terminus aufweisen (NCBI-ID: pfam12640; *B. cereus*: AS = 7 - 174, E-value = 2,39e-05; *B. mycooides*: AS = 7 - 174, E-value = 2,99e-05; *T. daqus*: AS = 7 - 174, E-value = 7,02e-08; *Pleurocapsa* sp.: AS = 4 - 171, E-value = 2,59e-04). Entsprechende Regionen am N-Terminus von BipC aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* konnten in der Folge über einen Abgleich mit den potentiellen UPF0489-Domänen der anderen vier Homologe identifiziert werden („Clustal Omega“). Alle BipC-Regionen wiesen dabei im Vergleich zur Konsensussequenz der UPF0489-Domäne (entnommen von der „NCBI Conserved Domain Database“) ein ähnliches Muster konservierter Aminosäuren auf (Abb. 46).<sup>244</sup> Die Vorhersage einer solchen Domäne war von besonderem Interesse, da Proteinen dieser Familie eine Verwandtschaft zur Arginase-Familie



## Ergebnisse und Diskussion

von TPR-Motiven und der Cyclase-Familie war auch im Fall der beiden BipC-Homologe aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* zu beobachten, da hier ebenfalls TPR-Motive für den C-Terminus vorhergesagt wurden (*S. griseorubiginosus*: ,TPR\_2', NCBI-ID: pfam07719, AS = 302 - 331, E-value = 8,53e-03; *S. filipinensis*: ,TPR', NCBI-ID: COG0457, AS = 260 - 398, E-value = 1,31e-03). Im Umkehrschluss konnte allerdings auch angenommen werden, dass die TPR-Motive in den anderen BipC-Homologen (exklusive BipC aus *Pleurocapsa* sp.) für Bereiche stehen, die eine Cyclase-Aktivität aufweisen.



**Schema 19.** Mögliche Modifizierung des BipA-Kernpeptids durch BipC. **a)** In einem ersten Schritt wird der zweiten Argininrest zu Ornithin umgewandelt. Auf dessen freie Aminogruppe wird dann über eine temporäre Cyclisierung der zweite Argininrest übertragen. **b)** Eine Deprotonierung führt zur Wiederherstellung der Ketofunktion und Abspaltung des Serins. **c)** Eine mit dem Biphenomycin-Gencluster assoziierte Protease, z. B. BipH, vermittelt die finale Spaltung des Zyklus an einer (Nr. 1) oder zwei Positionen (Nr. 1 & Nr. 2). **d)** Dies führt zu zwei linearen Grundgerüsten, die in der Folge zu **43** und **44** oder **46** prozessiert werden können.

Das Vorhandensein einer Cyclase-Funktion würde eine mögliche Rolle von BipC während der Biphenomycin-Biosynthese erweitern. So könnte in einer zweistufigen Reaktion zuerst die Hydrolyse des Argininrests an Position 2 zu Ornithin erfolgen. Dies würde in der Folge zu einer durch BipC unterstützten Cyclisierung mit dem Arginin an Position 4 führen (Schema 19a). Über eine Deprotonierung und Wiederherstellung der Ketofunktion könnte es dann zum Abgang des terminalen Serins (Position 5) kommen (Schema 19b). In einer nachfolgenden Reaktion spaltet dann eine Protease, wie z. B. BipH, den Lactamring an einer oder zwei Positionen (Schema 19c), wodurch es zur Bildung einer unverzweigten Ornithin-Seitenkette, wie bei **43** und **44**, oder einer mit Arginin

verzweigten Ornithin-Seitenkette, wie bei **46**, käme (Schema 19d). Eine detailliertere Betrachtung von BipH erfolgt später im Kontext von BipG bzw. der BipGH-Fusionsproteine.

### **3.2.3.3 BipG und BipH**

BipG wurde der Cupin-Familie ( ‚Cupin\_4‘, NCBI-ID: pfam08007 oder ‚Cupin\_8‘, NCBI-ID: pfam13621) zugeordnet. Proteine dieser Familie können eine enorme Bandbreite an Funktionen besitzen, von Speicherproteinen über Decarboxylasen bis hin zu Dioxygenasen.<sup>248</sup> Sie finden sich auch in einigen anderen RiPP-Clustern, in denen ihre Funktion aber noch nicht näher untersucht wurde.<sup>243,249</sup> Ein Vergleich der AS-Sequenzen von BipG aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* mit der SwissProt-Datenbank zeigte eine Ähnlichkeit zur Oxygenase YcfD aus *E. coli*, die ebenfalls eine Cupin-Domäne besitzt (SwissProt-ID: P27431.2; *S. griseorubiginosus*: Cover = 63%, E-value = 1e-06, Identität = 27%, Gemeinsamkeit = 37%; *S. filipinensis*: Cover = 66%, E-value = 7e-09, Identität = 27%, Gemeinsamkeit = 38%). Diese katalysiert die  $\beta$ -Hydroxylierung eines Argininrests (Arg81) des ribosomalen Proteins L-16 (RL-16) zu regulatorischen Zwecken.<sup>250,251</sup> Dies legt nahe, dass BipG an der  $\gamma$ -Hydroxylierung des Arginin- / Ornithinrests, die in **43** - **46** zu finden ist, beteiligt sein könnte.

Für BipH aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* wurde eine Domäne mit HExxH-Motiv ( ‚mod\_HExxH‘, NCBI-ID: TIGR04267) in der C-terminalen Hälfte des Proteins vorhergesagt. Es wird generell davon ausgegangen, dass Proteine mit diesem Motiv an der posttranslationalen Modifizierung und Reifung von Peptiden beteiligt sind. Im speziellen wird dabei von einer Funktion als Metalloprotease ausgegangen. In Abhängigkeit von Lage und eventuellen Variationen des HExxH-Motivs sowie der generellen Proteinstruktur kann es sich dabei um Exo- oder Endoproteasen handeln, die ihre Substrate entweder am N- oder C-Terminus oder in der Mitte spalten.<sup>252-254</sup> Generell legen diese Informationen nahe, dass auch BipH eine proteolytische Reaktion katalysiert, wie sie unter anderem für die Entfernung des Leitpeptids bei der Prozessierung von RiPPs stattfindet.<sup>83</sup>

Interessanterweise fanden sich in zwei der von uns untersuchten, potentiellen *bip*-Cluster kein *bipH*-Homolog, genauer gesagt in den Clustern von *B. cereus* und *B. mycooides* (Tab. 6). In *T. daqus* und *Pleurocapsa* sp. hingegen schien eine homologe Sequenz am C-Terminus eines Fusionsgens mit *bipG* vorzuliegen (*bipGH*) (Tab. 6 und Abb. 43). Eine Überprüfung des NCBI ‚Conserved Domain Architecture Retrieval Tool‘ zeigte nur fünf vermutliche Proteine dieses Typs, im Vergleich zu 433 Radikal-SAM-Hybriden. Von diesen handelte es sich in zwei Fällen um die bereits oben erwähnten BipGH-Proteine aus *T. daqus* H-18 und *Pleurocapsa* sp. PCC 7319. Zwei weitere Homologe stammen wiederum aus dem Stamm *Streptomyces* sp. JHA19.<sup>255,256</sup> Eine Überprüfung dessen Genoms zeigte, dass beide *bipGH*-

## Ergebnisse und Diskussion

Homologe (BipGH-1 = 676 AS, BipGH-2 = 683 AS) in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und zu einem bei den bisherigen Analysen unentdeckten *bipA*-Homolog (BipA = 42 AS) liegen. Neben diesem finden sich auch Gene, welche für Homologe von BipB (427 AS), BipC (406 AS), BipD (620 AS), BipE (298 AS), BipI (319 AS) und ein hypothetisches Protein (254 AS) kodieren. Die Existenz der BipGH-Fusionsproteine aus *T. daqus*, *Pleurocapsa* sp. und *Streptomyces* sp. JHA19 ließ eine enge funktionelle Beziehung zwischen beiden Proteinen vermuten.<sup>257-259</sup> Das fast ausschließliche Vorkommen von Proteinen mit Cupin-Domäne und HExxH-Motiv in potentiellen *bip*-Clustern deutet auf einen höchst spezialisierten katalytischen Mechanismus in Zusammenhang mit dem vermutlichen Vorläuferpeptid BipA (**70**) hin.

Da nicht alle untersuchten Genome eine Kopie von *bipH* besaßen, spielt die kodierte Protease höchstwahrscheinlich keine Rolle bei der Abspaltung des Leitpeptids. Diese Funktion könnte eher von BipI übernommen werden, das in allen *bip*-Genclustern kodiert war und weiter unten besprochen wird. Die in *T. daqus* und *Pleurocapsa* sp. beobachtete Fusion mit BipG, welches eventuell die  $\gamma$ -Hydroxylierung der Aminosäure an Position 2 des Kernpeptids katalysiert, deutet jedoch auf eine mögliche Beteiligung an der Modifizierung des Kernpeptids hin. Dabei wäre BipH ein guter Kandidat für die proteolytische Spaltung des Lactamrings, der in dem für BipC postulierten Mechanismus (Schema 19) gebildet würde. Hierfür würde ebenfalls sprechen, dass Proteine mit HExxH-Motiv Endoprotease-Aktivität besitzen können, wie sie für die Hydrolyse der Bindung zwischen den Aminosäuren an Position 3 und 4 nötig wäre. Auch war eine Kopie von *bipH* in *S. filipinensis* NRRL 3217, dem Produzenten von **46**, vorhanden. BipH könnte also bei der Biosynthese dieses Moleküls eine Reaktion nach dem oben postulierten Mechanismus katalysieren, um die verzweigte Ornithin-Arginin-Seitenkette zu generieren. Auch bei Ausbleiben einer Cyclisierung könnte BipH die Hydrolyse zwischen den Aminosäuren an Position 3 und 4 des Kernpeptids vermitteln. Hierbei würde das terminale Dipeptid aus Arginin und Serin von **70** entfernt werden, wie es bei **43** oder **44** der Fall ist.

Das Vorkommen von BipGH-Fusionsproteinen legte weiterhin nahe, dass die  $\gamma$ -Hydroxylierung an Position 2 des Kernpeptids und die hydrolytische Spaltung in enger zeitlicher Abfolge stattfinden. Da eine BipH-katalysierte Reaktion teilweise vom Einbringen eines Makrozyklus in das Kernpeptid über BipC abhinge, könnte das Kernpeptid unter Berücksichtigung der Strukturen von **43** - **46** in folgender Reihenfolge modifiziert werden (vgl. Schema 21): 1. Hydrolyse des Argininrests (Position 2) zu Ornithin; 2.  $\gamma$ -Hydroxylierung des Aminosäurerests an Position 2; 3. (Optional) Cyclisierung zum Lactam (Positionen 2 bis 4) und Abgang des terminalen Serins (Position 5); 4. proteolytische Spaltung der Bindung zwischen den Aminosäuren an Position 3 und 4 (Spaltung des Lactamrings oder Abspaltung des terminalen Dipeptids). Das Fehlen von BipH-Homologen in *B. cereus* und *B. mycooides* würde

außerdem bedeuten, dass hier keine Spaltung eines potentiellen Lactamrings erfolgen könnte. Entsprechend wären makrocyclische Biphenomycin-Derivate zu erwarten.

### **3.2.3.4 Das Radikal-SAM-Enzym BipD**

Das Fehlen einer Cytochrom P450-Oxygenase innerhalb des vermutlichen *bip*-Clusters oder seiner näheren genomischen Umgebung war ungewöhnlich, da Enzyme dieser Familie normalerweise für das Einbringen von Biaryl- oder Biaryletherbindungen in Peptidnaturstoffe verantwortlich sind.<sup>66,68,128</sup> Dies ließ vermuten, dass ein entsprechendes CYP450 entweder an anderer Stelle im Genom kodiert wird und durch weitere biochemische Studien identifiziert werden müsste, oder die Reaktion durch eine Enzymfamilie katalysiert wird, die bisher nicht mit Biarylkupplungen assoziiert wurde.

Die eigentliche Knüpfung von Biaryl- oder Biaryletherbindung verläuft in allen bekannten Fällen über einen radikalischen Mechanismus.<sup>63</sup> Daher war anzunehmen, dass dies auch bei **43 - 46** der Fall ist. Mit BipD findet sich ein Enzym der Radikal-SAM-Familie innerhalb des *bip*-Clusters. Radikal-SAM-Enzyme (Radikal-SAM) katalysieren eine Vielzahl von oft ungewöhnlichen Reaktionen in verschiedenen biologischen Prozessen über die Generierung eines reaktiven, radikalischen Intermediats.<sup>260,261</sup> Dies entsteht durch Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms vom jeweiligen Substrat mittels des aus *S*-Adenosylmethionin gebildeten 5'-Desoxyadenosin (dAdo)-Radikals. Hierfür ist ein [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster nötig, welches mithilfe des konservierten Motivs CxxxCxxC, das drei der vier Eisenatome koordiniert, gebunden wird. Über das freie Eisenatom erfolgt dann die Bindung von SAM und die Spaltung in Methionin und dAdo-Radikal bei gleichzeitiger Oxidation des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters (Schema 20, Kasten).<sup>261-263</sup> Dies machte BipD zu einem guten Kandidaten für das Einbringen der Biarylbindung in **70**. Unter anderem auch, da bereits Radikal-SAM-vermittelte C-C-Quervernetzungen von Glutamat mit Tyrosin oder Lysin mit Tryptophan (**26**) sowie der Thiolgruppe von Cystein mit verschiedensten Positionen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -C-Atom, Tryptophan-Indolring) einer ganzen Reihe weiterer Aminosäuren während der Biosynthese von RiPPs beschrieben wurden.<sup>264-269</sup>

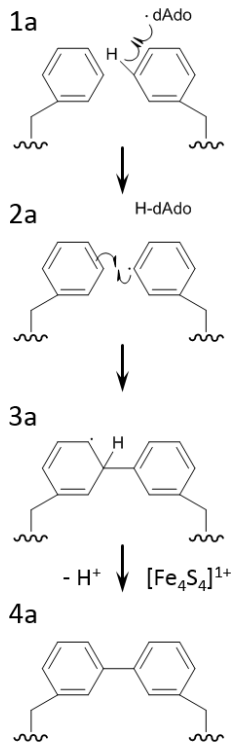
Ein neu postulierter Mechanismus zur Generierung der Biarylbindung in **43 - 46** mittels Radikal-SAM könnte über zwei mögliche Routen verlaufen (Schema 20). In Route 1 (Schema 20a) erfolgt die Abstraktion eines Wasserstoffatoms in *meta*-Position mittels eines dAdo-Radikals (1a). Dies kann an beiden Phenylalaninresten (Position 1 oder 3) gleichermaßen erfolgen. Eine anschließende radikalische Kupplung (2a) zwischen den Aromaten und eine Rearomatisierung (3a - 4a) führen zur Installation der Biarylbindung. Das dAdo-Radikal wird hierbei verbraucht während das [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Cluster durch Reduktion in seine ursprüngliche Oxidationsstufe zurückgebracht wird. Weitere



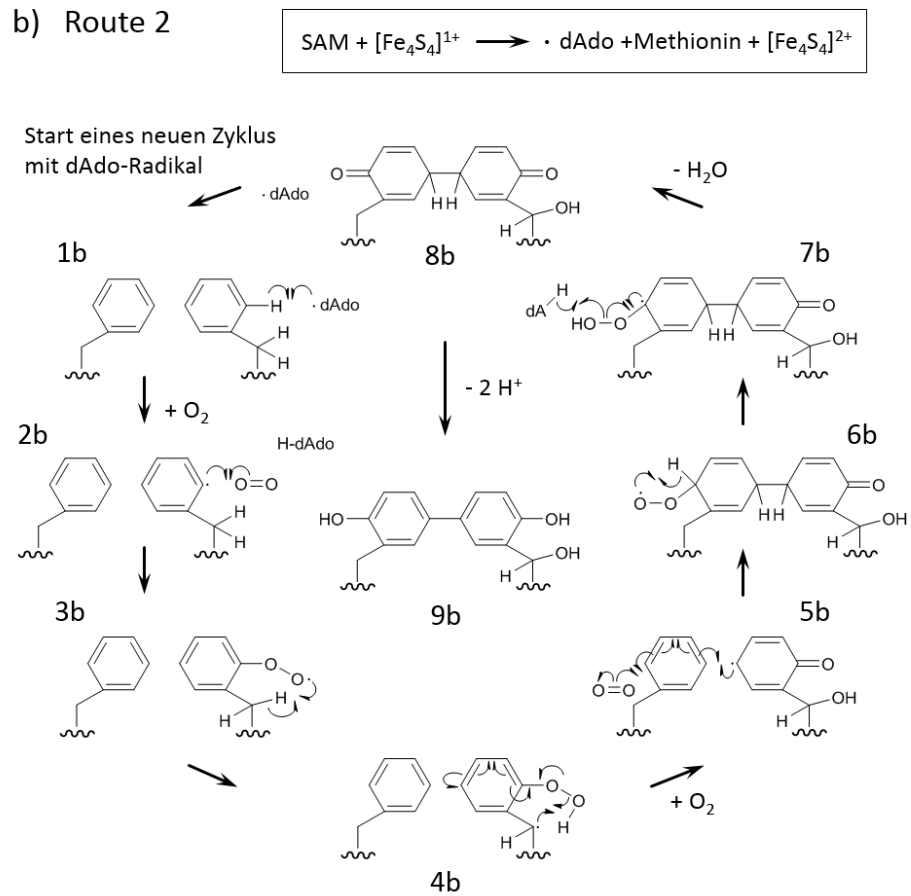
## Ergebnisse und Diskussion

Hydroxylierungen der aromatischen Reste und des  $\beta$ -C-Atoms müssten auf anderem Weg eingebracht werden. Dabei bleibt offen, ob dies vor oder nach der Biarylkupplung erfolgt.

### a) Route 1



### b) Route 2



**Schema 20.** Postulierte Mechanismen zur Biarylkupplung innerhalb eines Biphenomycin-Vorläufers mittels BipD (Details siehe Text). **a)** Biosynthese über Abstraktion eines Wasserstoffatoms in *meta*-Position von einem der beiden Phenylalaninreste (Position 1 oder 3). Es wird nur die Ausbildung der Biarylbindung katalysiert. **b)** Biosynthese über Abstraktion eines Wasserstoffatoms in *ortho*-Position des zweiten Phenylalaninrests (Position 3). Folgende Umlagerungsreaktionen führen zur Bildung des dreifach hydroxylierten Kernpeptids mit Biarylbindung.

Route 2 (Schema 20b) startet ebenfalls mit der Abstraktion eines Wasserstoffatoms mittels dAdo-Radikal. Hierbei wird spezifisch der Phenylalaninrest an Position 3 des Kernpeptids in *ortho*-Position angegriffen (1b). Das so gebildete C-Radikal aktiviert nun molekularen Sauerstoff (2b). Die folgenden Umlagerungsreaktionen führen zur Hydroxylierung des  $\beta$ -C-Atoms sowie der Bildung einer Ketofunktion in *ortho*- und eines neuen C-Radikals in *meta*-Position (3b - 5b). Das neue Radikal greift anschließend den zweiten Phenylalaninrest (Position 1) an. Dies generiert die Biarylbindung und leitet den Angriff auf ein weiteres  $\text{O}_2$ -Molekül ein (5b - 6b). Unter direkter oder indirekter Regeneration des ursprünglichen dAdo-Radikals, wie sie auch bei den Radikal-SAM-Enzymen LAM (Lysin-2,3-Aminomutase) und SPL (Sporen-Photoprodukt-Lyase) beobachtet werden kann,<sup>261,270</sup> wird damit auch in *ortho*-Position des zweiten Phenylalanins eine Ketogruppe eingebracht (7b - 8b). Eine

Rearomatisierung der beiden Benzolringe bildet abschließend das dreifach hydroxylierte Kernpeptid mit Biarylbindung (9b). Das wiederhergestellte dAdo-Radikal kann nun einen neuen katalytischen Zyklus einleiten oder zur Regeneration von SAM unter Reduktion des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clusters verwendet werden (Umkehr der Reaktion in Schema 20, Kasten).<sup>261</sup> Die über diesen Weg installierte Hydroxygruppe am β-C-Atom des Phenylalanins an Position 3 müsste im Falle von Biphenomycin B (**44**) mittels Dehydratase und Reduktase, welche nicht im *bip*-Cluster kodiert sind, wieder entfernt werden.

Beide Routen würden einen bislang unbekanntem Reaktionsmechanismus repräsentieren, da die Ausbildung einer Radikal-SAM katalysierten Biarylbindung bislang nicht beschrieben wurde. Eine Biosynthese unter Verwendung von Route 2 bietet überdies eine Erklärung für die verschiedenen Hydroxylierungen der Phenylalaninreste (Positionen 1 und 3). Sie entspricht damit der Beobachtung, dass keine weiteren Hydroxylasen im potentiellen *bip*-Cluster kodiert sind.

Generell sind beide Biosyntheserouten allerdings hoch spekulativ. Auch muss die Anfälligkeit von Radikal-SAM-Enzymen gegenüber Sauerstoff durch Oxidation der Eisen-Schwefel-Cluster in Betracht gezogen werden. Zwar wurde erst kürzlich mit PqqE aus *Methylobacterium extorquens* AM1 ein Radikal-SAM mit ungewöhnlicher Toleranz gegenüber Sauerstoff beschrieben,<sup>271</sup> dieses Enzym stellt bisher jedoch eine unerwartete Ausnahme dar. Erst weitere Untersuchungen durch Gendelektionsstudien oder heterologe Expression können nähere Informationen zur eigentlichen Funktion von BipD liefern.

### **3.2.3.5 Weitere Proteine, die im *bip*-Clustern kodiert sind**

Neben BipA (**70**) und BipD fanden sich weitere Proteine in den Clustern, welche aufgrund von Homologien gut untersuchten Familien zugeordnet werden konnten. So zeigte BipB starke Ähnlichkeit zu Membrantransportern der „Major Facilitator“-Superfamilie (MFS). Diese ermöglichen den Transport einer Vielzahl kleiner Moleküle über die Zellmembran mittels erleichterter Diffusion, Symport oder Antiport. Sie sind dabei an Prozessen wie der Nährstoffaufnahme, der Abgabe von Metaboliten, oder der Vermittlung von Resistenzen beteiligt.<sup>272</sup> Vor allem in Grampositiven Bakterien ist die Entfernung von toxischen oder antibiotischen Substanzen über Transport aus der Zelle ein gängiger Mechanismus.<sup>273</sup> Häufig wird dabei über den Transport eine Resistenz gegen selbst hergestellte Antibiotika vermittelt.<sup>274</sup> Auch Biphenomycin A, B und C (**43 - 45**) sowie LL-AF283β (**46**) besitzen antibiotische Aktivität.<sup>156,158,159</sup> Daher kann angenommen werden, dass auch sie exportiert und an das umgebende Medium abgegeben werden, um den Produzenten zu schützen. Ein MFS-Transporter, wie er auch im Gencluster des RiPP Botromycin D und von anderen Antibiotika zu finden

ist, könnte diese Funktion übernehmen.<sup>97,274</sup> Dies machte BipB zu einem guten Kandidaten für Export und Resistenzvermittlung gegenüber den durch die potentiellen *bip*-Cluster gebildeten Substanzen. Alle homologen Cluster enthielten neben dem RiPP-Vorläuferpeptid (BipA, **70**) eine Zink-abhängige Protease (BipI). Proteasen sind, wie bereits erwähnt, für die Reifung vieler RiPPs notwendig, da sie das modifizierte Kernpeptid freisetzen.<sup>83</sup> Auch im Cluster des RiPPs Pyrrolochinolinchinon (**23**) findet sich mit PqqF eine Zink-abhängige Protease. Zwar ist diese für die PQQ-Biosynthese nicht essentiell, dennoch wird davon ausgegangen, dass sie an der proteolytischen Prozessierung beteiligt sein könnte.<sup>84</sup>

BipJ, die Protease der M42-Familie, war nur in den Clustern bzw. Genomen von Stämmen mit BipA-Homologen zu finden, welche über eine C-terminal zum Kernpeptid gelegene Aminosäuresequenz verfügen (Tab. 6 und Abb. 44). *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis*, bei denen dies nicht der Fall ist, besitzen keine Kopie des entsprechenden Gens. Dies legte die Vermutung nahe, dass BipJ an der Entfernung des C-Terminus der Vorläuferpeptide, wie es bereits für andere RiPPs beschrieben wurde, beteiligt sein könnte.<sup>83,84</sup>

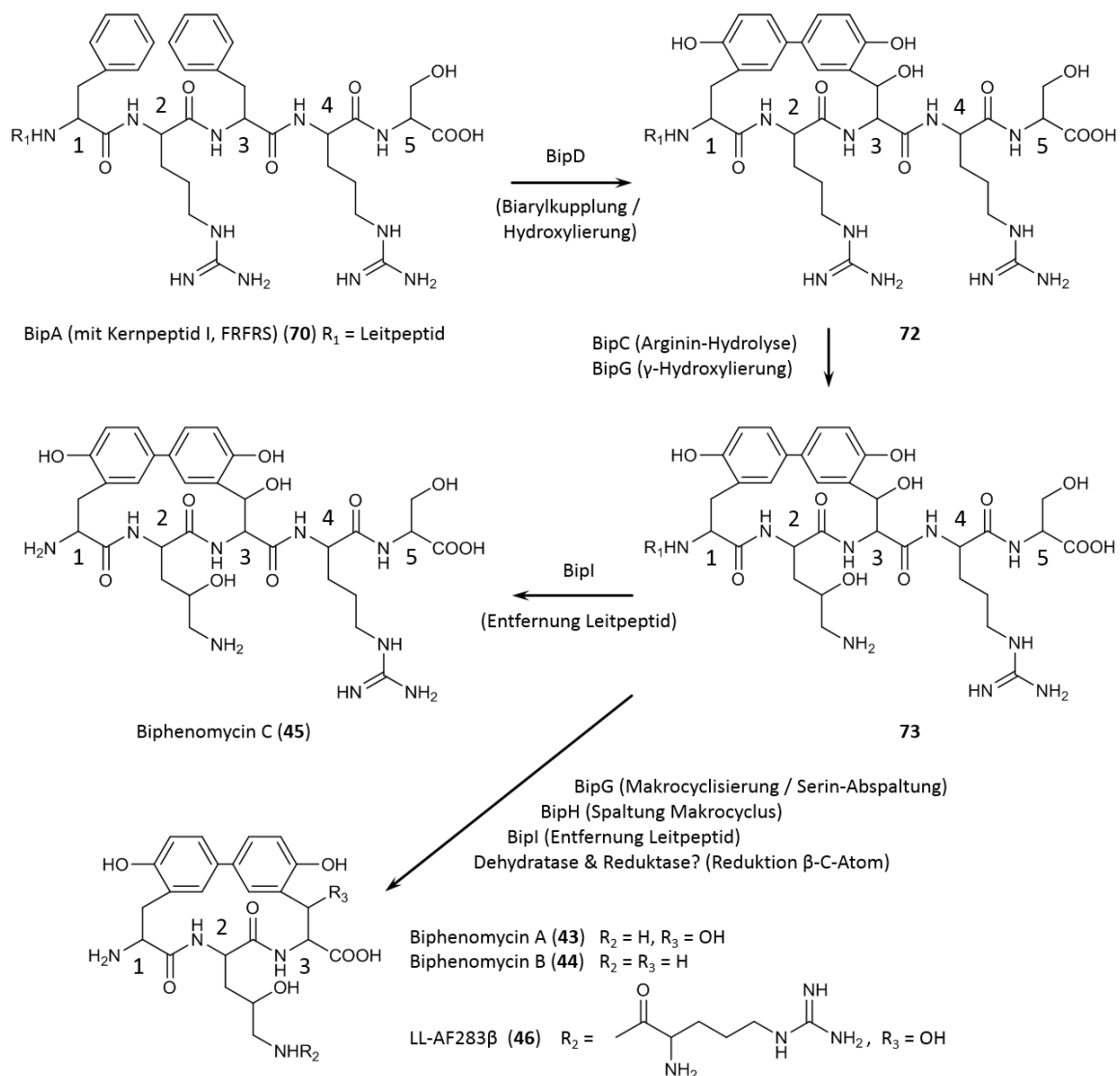
Eine Untersuchung der BipF-Homologe ergab keine konservierten Bereiche oder Domänen, die Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion zulassen würden. Es fanden sich jedoch einige schwache Übereinstimmungen mit verschiedenen DNA-assoziierte Proteinen aus der NCBI-Datenbank. Eventuell könnte es sich daher auch bei BipF um ein DNA-bindendes Protein handeln. Möglicherweise ist BipF mit BipE assoziiert, da für dessen Homologe eine konservierte Region der AP2Ec („AP endonuclease family 2“-Superfamilie (NCBI-ID: cl23721) vorhergesagt wurde. Zu den Mitgliedern dieser Familie gehören unter anderem an der DNA-Reparatur beteiligte Endonukleasen.<sup>275</sup> Somit könnte auch BipE DNA-bindenden Eigenschaften besitzen. Im Zusammenspiel könnten BipF und BipE etwa eine Art regulatorische Funktion der Biphenomycin-Biosynthese übernehmen.

### **3.2.3.6 Ein möglicher Biosyntheseweg der Biphenomycin-Familie (43 - 46)**

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein potentielles Gencluster für die Biosynthese der Biphenomycin-Familie (**43 - 46**) über ein ribosomal synthetisiertes und posttranslational modifiziertes Peptid (BipA, **70**) in *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217 identifiziert werden konnte. BipA (**70**) ist in beiden Stämmen gekennzeichnet durch das Vorhandensein des vermuteten Kernpeptids FRFRS, einer von zwei möglichen Sequenzen zur Synthese der Biphenomycine A, B und C (**43 - 45**) sowie LL-AF283 $\beta$  (**46**) aus proteinogenen Aminosäuren. Neben den Produzenten von **43 - 46** waren BipA-Homologe in den Genomen von nur fünf anderen Bakterienstämmen, welche in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind, zu identifizieren. Dies veranschaulicht die Spezifität dieses Fundes. Neben

## Ergebnisse und Diskussion

**70** fanden sich in den potentiellen *bip*-Clustern aller Organsimen sechs bis neun weitere konservierte Gene (*bipB* - *bipJ*). Die entsprechenden kodierten Proteine wurden mittels verschiedener Web-basierter Programme analysiert, um konservierte Motive und Homologe mit bekannter Funktion zu identifizieren. Auf Grundlage dieser bioinformatischen Methoden konnten verschiedene potentielle Funktionen für BipB bis BipJ postuliert werden. Neben einem Membrantransporter (BipB) fanden sich zwei DNA-bindende Proteine (BipE, BipF) und drei Proteasen / Peptidasen (BipH, BipI, BipJ). Am interessantesten waren jedoch ein Radikal-SAM-Enzym (BipD), welches ein potentieller Kandidat für die Installation der Biarylbindung wäre, sowie zwei Enzyme, die an der Hydroxylierung von Arginin (BipG) und seiner Spaltung zu Ornithin und Harnstoff (BipC) beteiligt sein könnten.



**Schema 21.** Möglicher Biosyntheseweg von Molekülen der Biphenomycin-Familie (**43** - **46**) aus *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217 ausgehend von BipA (**70**). Die postulierte Funktion der im Cluster kodierten Proteine beruht auf bioinformatischen Analysen (Details siehe Text). Die Positionen des Kernpeptids von **70** sind entsprechend nummeriert.

Gerade die möglichen Funktionen der Proteine BipD, BipG und BipC unterstreichen die Wahrscheinlichkeit, dass das beschriebene Cluster tatsächlich die Biosynthese von **43 - 46** kodiert. Eine potentielle Biosyntheseroute, welche ebenfalls auf Basis der *in silico*-Resultate erstellt wurde und diese zusammenfasst, ist in Schema 21 dargestellt.

Der Aufbau des potentiellen Biphenomycin-Genclusters und die postulierte Biosynthese waren dabei vollkommen verschieden zu den Annahmen zu Beginn des Projekts. Weder beinhalteten sie einen NRPS-Multienzymkomplex, noch ein Cytochrom P450-Enzym. Weitere Untersuchungen der hier beschriebenen Gencluster sollten die Expression in heterologen Wirten und die damit verbundene Identifikation und Isolierung neu gebildeter Substanzen beinhalten. Wenn diese eine Beteiligung der Cluster an der Biosynthese von **43 - 46** zeigen, könnten Gendeletionsstudien der weiteren Charakterisierung der involvierten Enzyme dienen. Interessante Ziele wären hierbei vor allem BipC, BipG bzw. BipGH und BipD, welches eine neuartige Art der Biarylkupplung katalysieren würde.

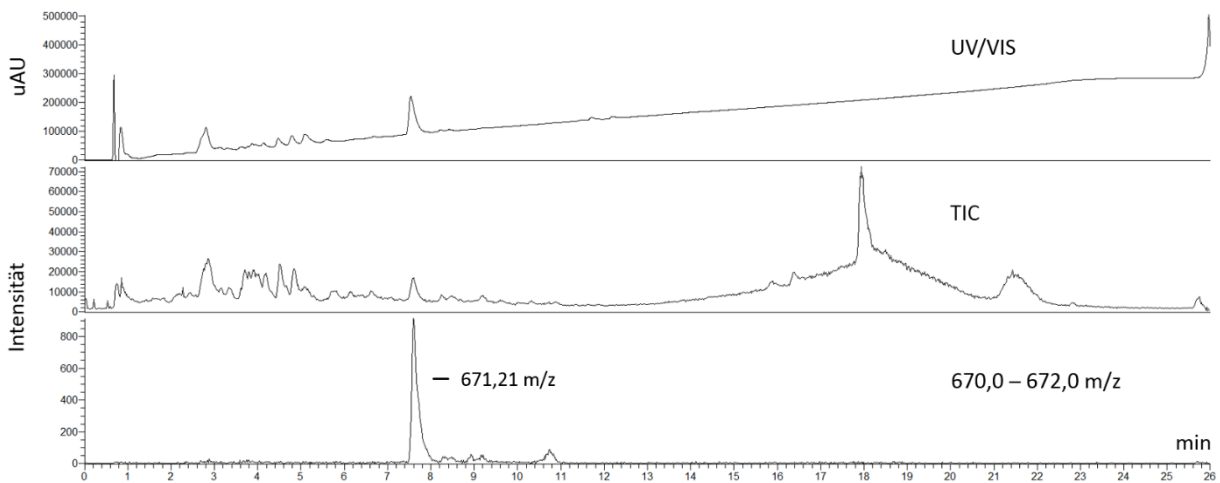
### **3.2.4 Untersuchungen zur Biosynthese der Biphenomycin-Familie (43 - 46)**

Zur Überprüfung des postulierten Biosynthesewegs der Biphenomycin-Familie (**43 - 46**) durch die im *bip*-Cluster kodierten Proteine (Schema 21) sollten die Cluster aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* heterolog exprimiert werden. Hierfür wurden die Cluster mittels Q5-Polymerase amplifiziert und unter Verwendung entsprechender Überhänge über Gibson-Assemblierung in den Vektor pET-28b-SUMO kloniert. Die klonierten DNA-Abschnitte wurden dabei so erweitert, dass sie neben den Genen *bipA* bis *bipI* auch die CDS eines jeweils stromaufwärts liegenden, potentiellen Transkriptionsregulators enthielten (*S. griseorubiginosus*: LysR-Familie, *S. filipinensis*: TetR-Familie). Dies geschah für den Fall, dass diese an der Regulation der Expression der *bip*-Cluster beteiligt sind. Die Identität der resultierenden Konstrukte (pET-28b-SUMO::*S.fil-bip*-Cluster, pET-28b-SUMO::*S.gri-bip*-Cluster) wurde per Testverdau und Endsequenzierung der Inserts verifiziert. Die Vektoren wurden dann in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Als Negativkontrolle wurde pET-28b-SUMO ohne Insert transformiert. Kulturen der drei Stämme wurden anschließend angezogen ( $OD_{600} = 0,8$  bis  $1,2$ ), mittels IPTG ( $0,1$  mM) induziert und für  $2 \frac{1}{2}$  Tage bei  $16$  °C inkubiert. Die Zellpellets und Überstände dieser Kulturen wurden in der Folge mittels Ethylacetat (EtOAc) (Überstände) oder einer Mischung ( $50$  % v/v) aus Methanol (MeOH) und Aceton (Pellets) extrahiert. Lösungen der Extrakte ( $1$  mg/mL in MeOH) wurden dann per LC-MS analysiert (Säule: ‚Hypersil GOLD™ aQ C18,  $150 \times 2,1$  mm,  $3 \mu\text{m}'$ , Programm: ‚Biphenomycin‘). Dies lieferte im Falle der Kultur mit dem *S. filipinensis bip*-Cluster ein UV-Signal im Extrakt des Überstands bei  $7$  min  $40$  s, welches in der Negativkontrolle nicht

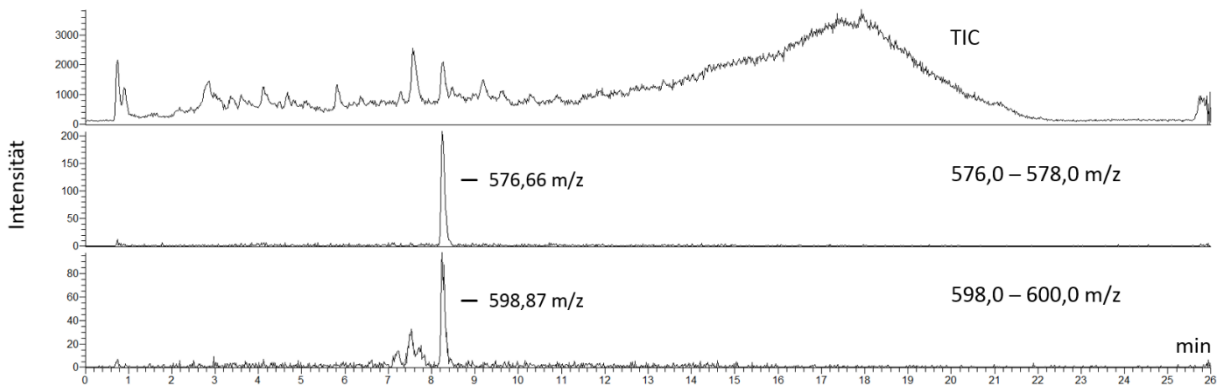
## Ergebnisse und Diskussion

sichtbar war (Abb. 47a). Dieser Peak enthielt die spezifische Masse 671,21 m/z (positiver Modus), welche sich in der Negativkontrolle ebenfalls nicht detektieren ließ. Weiterhin zeigten sich im Vergleich zur Negativkontrolle die spezifischen Massen 576,66 m/z und 598,77 m/z bei 8 min 18 s (negativer Modus) (Abb. 47 b), die jedoch nicht von einem UV-Signal begleitet wurden. Im Extrakt des Überstands der Kultur mit den *S. griseorubiginosus bip*-Cluster war der UV-Peak bei 7 min 40 s zwar nicht zu sehen, jedoch zeigte sich auch hier die Masse von 671,2 m/z (positiver Modus), wenn auch mit weitaus geringerer Intensität (Abb. 48a). Auch die Masse von 576,67 m/z (negativer Modus) bei 8 min 18 s war auffindbar, ebenfalls mit geringerer Intensität (Abb. 48 b). Eine Masse von 598,42 m/z hingegen war zwar detektierbar, fand sich jedoch nicht spezifisch bei der entsprechenden Retentionszeit.

### a) Positiver Modus



### b) Negativer Modus



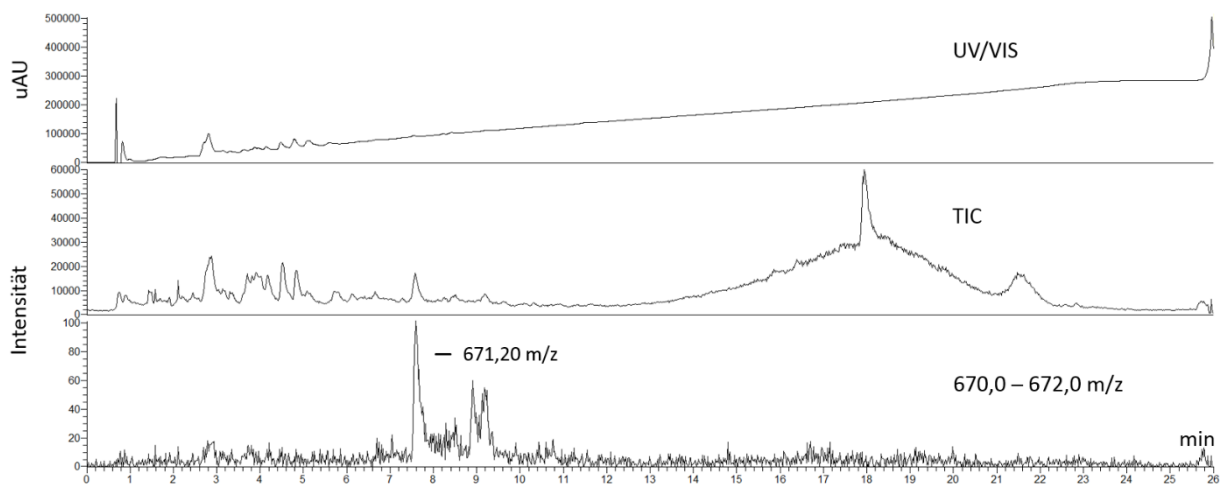
**Abb. 47.** LC-MS-Chromatogramm des Überstandsextrakts von *E. coli* BL21(DE3) mit dem *bip*-Cluster aus *S. filipinensis* NRRL 3217. Neben dem UV/VIS-Spektrum und der Gesamtheit der gemessenen Massen (TIC = „Total ion current“, deutsch: Totalionenstrom) sind die Bereiche der neu entdeckten, spezifischen Massen dargestellt. **a)** Detektion der Massen im positiven Modus. **b)** Detektion der Massen im negativen Modus.

Das Pelletextrakt der Kultur mit dem *S. filipinensis bip*-Cluster zeigte ebenfalls ein minimales UV-Signal bei 7 min 40 s, das eine spezifische Masse von 671,21 m/z beinhaltete (positiver Modus). Die Intensität

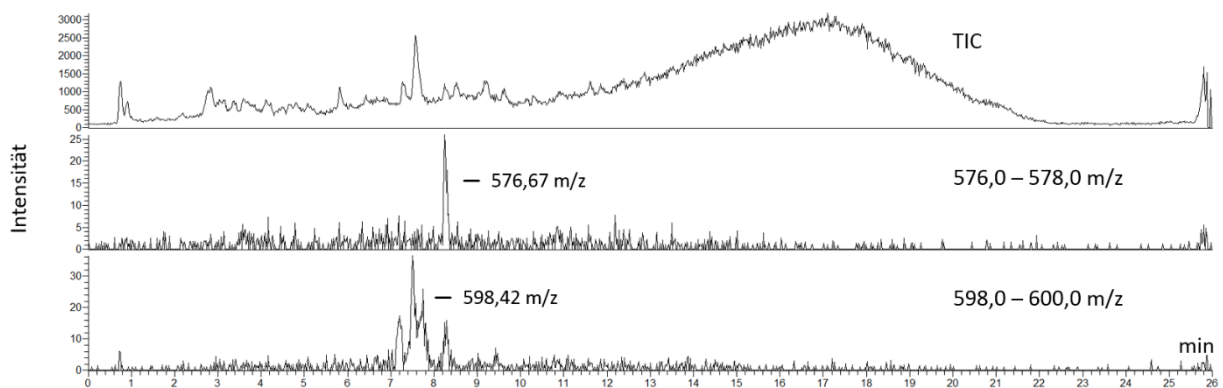
## Ergebnisse und Diskussion

dieser Masse betrug jedoch nur 40% der Intensität im Extrakt des entsprechenden Überstands (Daten nicht gezeigt). Das Extrakt des Pellets der Kultur mit den *S. griseorubiginosus bip*-Cluster zeigte hingegen kein UV-Signal bei 7 min 40 s. Jedoch fand sich auch hier eine spezifische Masse von 671,12 m/z. Die Intensität lag auch hier unter der Intensität im Extrakt des entsprechenden Überstandes (ca. 50%). Ein Vergleich der Massen, welche durch die Integration der beiden potentiellen Biphenomycin-Cluster in *E. coli* BL21(DE3) gebildet wurden, mit der postulierten Biosynthese zeigte, dass es sich um das bereits erwähnte, durch BipC gebildete cyclische Intermediat (**74**) (Exakte Masse: 669,36 Da) und einen lineares, aber mit Arginin verzweigtes Tripeptid (**75**) (Exakte Masse: 598,32 Da) handeln könnte, dessen Ornithinrest am  $\gamma$ -C-Atom hydroxyliert wurde (Abb. 49).

### a) Positiver Modus



### b) Negativer Modus



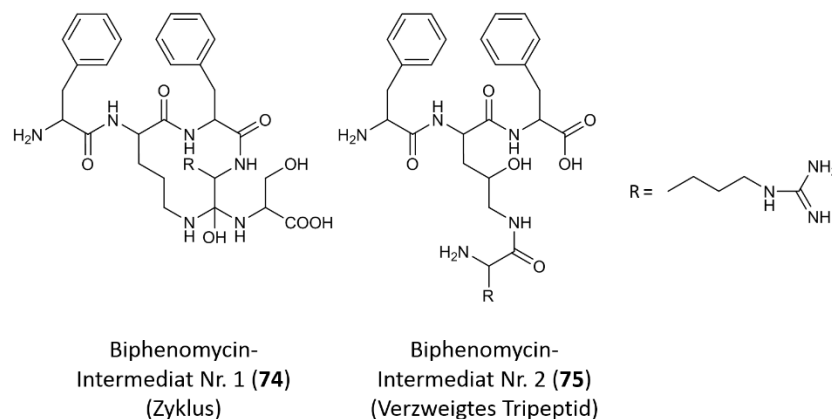
**Abb. 48.** LC-MS-Chromatogramm des Überstandsextrakts von *E. coli* BL21(DE3) mit dem *bip*-Cluster aus *S. griseorubiginosus* No. 43708. Neben dem UV/VIS-Spektrum und der Gesamtheit der gemessenen Massen (TIC) sind die Bereiche der neu entdeckten, spezifischen Massen dargestellt. **a)** Detektion der Massen im positiven Modus. **b)** Detektion der Massen im negativen Modus.

Dies unterstützt sowohl die Annahme, dass die Biosynthese der Biphenomycin-Familie (**43 - 46**) durch die beschriebenen Gencluster kodiert wird als auch, dass dies über die Bildung eines cyclischen

## Ergebnisse und Diskussion

Intermediats (**74**) verläuft. Interessanterweise findet sich das potentielle Intermediat **75** bisher nur bei heterologer Expression des Genclusters aus *S. filipinensis*. Dieser Fund stimmt mit der Tatsache überein, dass nur *S. filipinensis* das verzweigt-kettige **46** produziert, dessen Vorläufer **75** darstellen würde. Bei heterologer Expression des Genclusters aus *S. griseorubiginosus*, der **46** nicht produziert, war dieser mutmaßliche Vorläufer hingegen nicht nachweisbar. Die vermutliche Hydroxylierung an  $\gamma$ -Position würde dabei, wie in Kapitel 3.2.3.3 besprochen, durch BipG eingebracht werden. Da sie sich dabei nach Auflösung eines potentiellen Zyklus (bei **75**) aber nicht vorher (bei **74**) zeigt, bekräftigt dies die Theorie einer Interaktion von BipG und der Protease BipH, die ein Kandidat für die Spaltung des cyclischen Intermediats **75** an einer oder zwei Positionen wäre (vgl. Schema 19).

Die geringfügige Abweichung der detektierten Massen beider Moleküle (ca. plus eins) zu den errechneten Massen, könnte auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sein. Hierfür spricht, dass die beobachtete Differenz in allen Fällen eine annähernd gleiche Größe besitzt. Auf die Identität der Substanz mit der Masse 576,6 m/z konnten in Bezug auf die Biphenomycin-Biosynthese keine Rückschlüsse gezogen werden.



**Abb. 49.** Mögliche Intermediate der Biphenomycin-Biosynthese, welche über die heterologe Expression der *bip*-Cluster aus *S. griseorubiginosus* No. 43708 und/oder *S. filipinensis* NRRL 3217 in *E. coli* BL21(DE3) gebildet wurden.

Da über die verwendeten *bip*-Cluster keines der erwarteten Endprodukte (**43** - **46**) gebildet wurde, könnte ein Teil der Proteine unter den gewählten Bedingungen unlöslich oder inaktiv sein. Die Klonierung der entsprechenden Cluster in weitere heterologe Wirte, wie *S. coelicolor*, *S. lividans* und *S. albus*, welche die Ursprungsorganismen besser repräsentieren, könnte helfen ein solches Problem zu umgehen. Falls dies zur Bildung derselben oder anderer, unvollständig prozessierter Intermediate führt, ist die Beteiligung weiterer Proteine zu vermuten, die nicht im *bip*-Cluster selbst kodiert sind. Diese müssten über weitere bioinformatische und molekularbiologische Methoden identifiziert und auf ihre Beteiligung an der Biosynthese getestet werden.



### 3.3 Cittilin A (47)

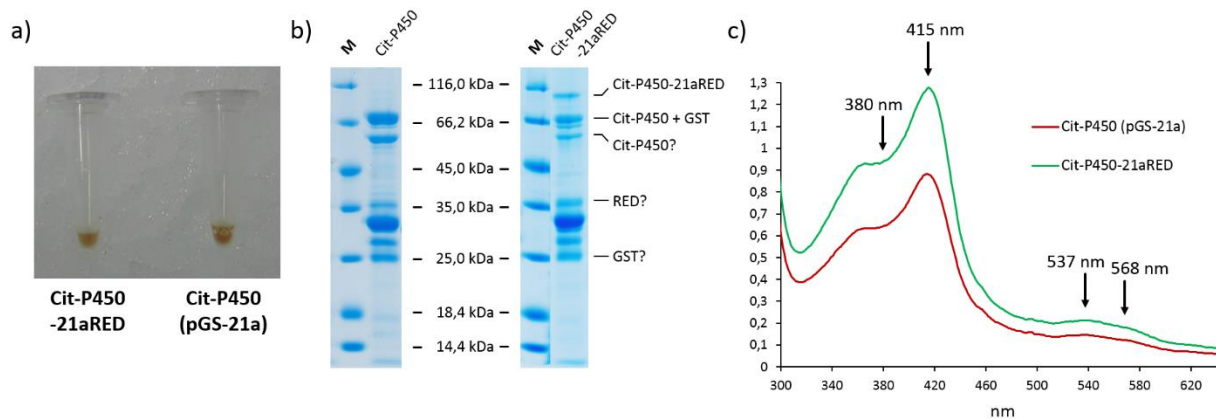
Parallel zur chemo-enzymatischen Synthese von Complestatin (**37**) sollte die Biosynthese von Cittilin A (**47**) aus *Myxococcus xanthus* DK1622 (GenBank-ID des vollständigen Genoms: CP000113) näher untersucht werden. Um dabei die Rolle des Cytochrom-P450-Enzyms Cit-P450 mittels eines entsprechenden Assays zu testen (Schema 13), war eine Überproduktion dieses Proteins notwendig. Hierfür wurde das Gen *cit-P450* mit dem Vektor pJET1.2::*cit-P450+met* als Template amplifiziert (zur Verfügung gestellt durch Prof. Rolf Müller, Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Saarbrücken), der zusätzlich das für die Methyltransferase kodierende Gen trägt. Das resultierende PCR-Produkt wurde in die Expressionsvektoren pHis8 und pGS-21a kloniert und die resultierenden Vektoren pHis8::*cit-P450* und pGS-21a::*cit-P450* über Testverdau und Sequenzierung überprüft. Zur Generierung eines Fusionsproteins aus Cit-P450 und RED-Domäne, welche bereits im Zusammenhang mit ComI und ComJ angesprochen wurde (vgl. Kapitel 3.1.3), sollte ein separat amplifiziertes PCR-Produkt mittels LIC in den LICRED-Vektor kloniert werden.<sup>190,192</sup> Auch das Plasmid LICRED::*cit-P450* wurde durch Testverdau und Sequenzierung verifiziert.

Alle drei Vektoren wurden dann in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) und im Falle von LICRED::*cit-P450* in einige andere Stämme, welche routinemäßig Verwendung bei Expressionen finden, transformiert. Folgende Testexpressionen zeigten hier, dass die Konstrukte aus den Stämmen mit LICRED::*cit-P450* schlecht löslich waren (Daten nicht dargestellt). Im Falle von pHis8::*cit-P450* und pGS-21a::*cit-P450* waren beide rekombinanten Proteine löslich. Erste Aufreinigungen zeigten jedoch, dass die Ausbeute bei Verwendung von pHis8::*cit-P450* im Durchschnitt geringerer war (115,8 µM pro Liter TB-Medium) als bei Verwendung von pGS-21a::*cit-P450* (179 µM pro Liter TB-Medium = plus 54,5%). Daher wurde entschieden, weitere Expressionen nur mit dem Vektor pGS-21a::*cit-P450* durchzuführen. Außerdem wurde das Fusionsgen aus LICRED::*cit-P450* amplifiziert, in pGS-21a kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Durch das Anfügen eines N-terminalen GST-Tags konnte dabei, wie schon im Falle von ComI-RED und ComJ-RED (vgl. Kapitel 3.1.3), die Löslichkeit des kodierten Proteins verbessert werden (Daten nicht dargestellt). Die Proteine Cit-P450 und Cit-P450-21aRED wurden anschließend in größerem Maßstab bei 20 °C (TB-Medium, ü. N.) überproduziert, unter Rekonstitution aufgereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Dies lieferte rot-bräunlich gefärbte Lösungen (Abb. 50a), die mittels SDS-PAGE und UV/VIS-Spektroskopie untersucht wurden. Die Gele (Abb. 50b) zeigten dabei in beiden Fällen Banden der erwarteten Größe (vgl. Tab. 52). Es zeigten sich auch andere Banden, bei denen es wahrscheinlich um Fragmente der Proteine vollständiger Länge handelt. Diese könnten durch Spaltung während Aufreinigung und Probenvorbereitung für die SDS-Page entstanden sein. So entsprächen Banden bei ca. 25 kDa dem freien GST-Tag (25,7 kDa) und bei ca. 35 kDa der freien RED-Domäne (34,95 kDa). Andere Banden wären damit folglich auf CYP450s ohne

## Ergebnisse und Diskussion

GST-Tag (Cit-P450: 50,4 kDa; Cit-P450 plus RED-Domäne: 85,9 kDa), ohne RED-Domäne (Cit-P450 plus GST-Tag: 79,8 kDa) oder ohne GST-Tag und RED-Domäne (Cit-P450: 50,4 kDa) zurückzuführen (Abb. 50b). Da die Bandenmuster beider Proteinlösungen allerdings nahezu identisch sind und einige Proteine zeigen, die nicht den oben beschriebenen Bruchstücken entsprechen, scheint es wahrscheinlicher, dass zusätzliche Banden durch Abbruch der Translation gebildet wurden. So entstandene Fragmente mit *N*-terminalem Polyhistidin-Tag wären über Nickel-Affinitätschromatographie nicht entfernbar. Um die Aufreinigung unvollständiger Cit-P450-Derivate in Zukunft zu vermeiden, wäre es sinnvoll, die Gene in die Vektoren pED1 oder pED2 einzubringen (hergestellt durch Frau Elke Duell aus unserer Arbeitsgruppe), die sich durch einen GST-Tag und einen C-terminalen Polyhistidin-Tag auszeichnen.

Die Spektren beider Proteine (Abb. 50c) entsprachen denen von „Low spin“-Cytochrom P450-Enzymen in oxidiertem Zustand und zeigten eine Soret-Bande bei 415 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peaks bei 537 nm bzw. 568 nm.<sup>194-196</sup> Die bei 350 - 385 nm sichtbare Schulter deutet, wie schon bei ComI-21aRED und ComJ-21aRED (vgl. Kapitel 3.1.3), auf Reste von Hämchlorid ( $\lambda_{\text{max}} = 365$  und 385 nm)<sup>198</sup> aufgrund der Rekonstitution hin. Generell zeigten SDS-PAGE und UV/VIS-Spektroskopie, dass beide Enzyme mit Häm-Cofaktor in potentiell aktiver Form aufgereinigt werden konnten.



**Abb. 50.** a) Aufgereinigte und aufkonzentrierte Proteinlösungen von Cit-P450-21aRED (links) und Cit-P450 (pGS-21a; rechts). b) SDS-Gel (12%) von Cit-P450 (pGS21a; 79,8 kDa) und Cit-P450-21aRED (115,5 kDa). M = „Unstained Protein MW Marker“, GST = GST-Tag, RED = RED-Domäne. c) Spektren von Cit-P450 (pGS-21a; 180  $\mu$ M) und Cit-P450-21aRED (130  $\mu$ M). Charakteristische Maxima innerhalb der Spektren wurden markiert (Details siehe Text).

Cit-P450 (aus pGS-21a) und Cit-P450-21aRED wurden dann mit den beiden potentiellen Substraten **48** und **49** (ebenfalls durch Prof. Rolf Müller zur Verfügung gestellt) in einem enzymatischen Assay nach Schema 13 verwendet. Für die Bereitstellung von Elektronen an Cit-P450 und die Regeneration des Donors NADPH wurden Fpr und PetF (Kapitel 3.1.1.1) sowie Gdh (Kapitel 3.1.2) genutzt. Die Konzentrationen der verwendeten Assay-Komponenten (Tab. 7) in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7,0,

## Ergebnisse und Diskussion

50 mM NaCl) richteten sich dabei nach den Untersuchungen von Woithe *et al.* (2007) mit OxyB der Vancomycin-Biosynthese.<sup>69</sup>

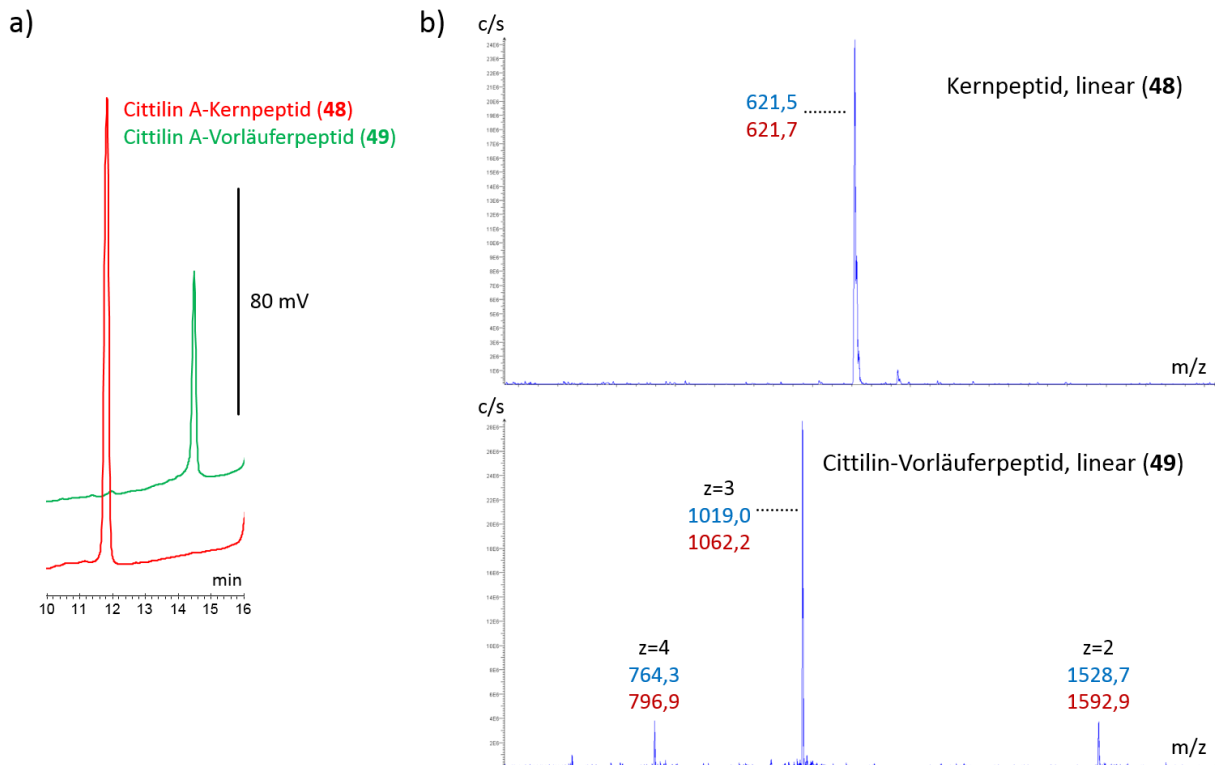
**Tab. 7:** Bestandteile der enzymatischen Biarylkupplungsassays mit Cit-P450 (pGS-21a) oder Cit-P450-21aRED.

<b>Funktion</b>	Biaryl- / Biaryletherkupplung	Substrat	Elektronendonorsystem			NADPH-Regeneration	
<b>Komponente</b>	Cit-P450 oder Cit-P450-21aRED	<b>48</b> oder <b>49</b>	Fpr	PetF	NADPH	Gdh	Glucose
<b>Endkonzentration</b>	8 $\mu$ M	80 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	1 mM	20 $\mu$ M	1 mM

Alle Bestandteile wurden auf Eis pipettiert und die Reaktionen durch Zugabe des CYP450 gestartet. Eine Negativkontrolle erfolgte jeweils ohne Zugabe eines CYP450. Nach Inkubation für 2,5 Stunden bei 30 °C (300 rpm) wurden die Reaktionen durch Inkubation für 10 min auf Eis gestoppt. Die Ansätze wurden dann zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min bei 10 °C) und 25  $\mu$ L der Überstände mittels LC-MS (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘) analysiert. Die einzelnen Assay-Bestandteile in den verwendeten Konzentrationen wurden auf dieselbe Art untersucht. Hierbei wurden Retentionszeit und Massenspektren als Referenz für die Auswertung der Reaktionen bestimmt. Dies zeigte im Falle der linearen Peptide **48** und **49** eine Retentionszeit von 14 min 30 s bzw. 11 min 48 s (Abb. 51a). Die Masse von **48** (620,5 Da) betrug, wie erwartet, 621,7 m/z [M+H<sup>+</sup>] während **49** (3183,8 Da) ein abweichendes Massenspektrum zeigte (Abb. 51b). Die gemessenen Werte (blau) des mehrfach positiv geladenen Peptids waren dabei durchweg niedriger als die errechneten Werte (rot). Eine Überprüfung zeigte, dass die detektierten Massen scheinbar einer kürzeren Variante von **49** ohne N-terminales Methionin (3052,7 Da) entsprachen, welche vom Arbeitskreis Müller anstelle von **49** zur Verfügung gestellt wurde. Das Molekulargewicht dieses kürzeren Vorläuferpeptids wurde somit für alle zukünftigen Analysen verwendet.

Die HPLC-Chromatogramme der vier Reaktionsansätze zeigten verschiedene Peaks. Diese wurden, wenn möglich, auf Basis der gemessenen Referenzen identifiziert (Abb. 52). Dabei waren in allen vier Ansätzen Signale der Substrate **48** bzw. **49** sichtbar. Es konnten jedoch keine Peaks mit den Massen der erwarteten Produkte **50** (617,3 m/z [M+H<sup>+</sup>]) oder **51** (3049,7 m/z [M+H<sup>+</sup>]) identifiziert werden. Auch die Massen der einfach gekuppelten Peptide (619,3 m/z [M+H<sup>+</sup>] bzw. 3051,7 m/z [M+H<sup>+</sup>]) waren nicht auffindbar. Die Analyse der Ansätze mit **48** gestaltete sich hierbei schwierig, da die Massen trotz sichtbarem HPLC-Peak schlecht detektierbar waren. Auch ist die Analyse einer geringen Änderung des Molekulargewichts (minus 2 oder 4 m/z) bei Molekülen kompliziert, die aufgrund ihrer Größe in mehrfach geladener Form detektiert werden.

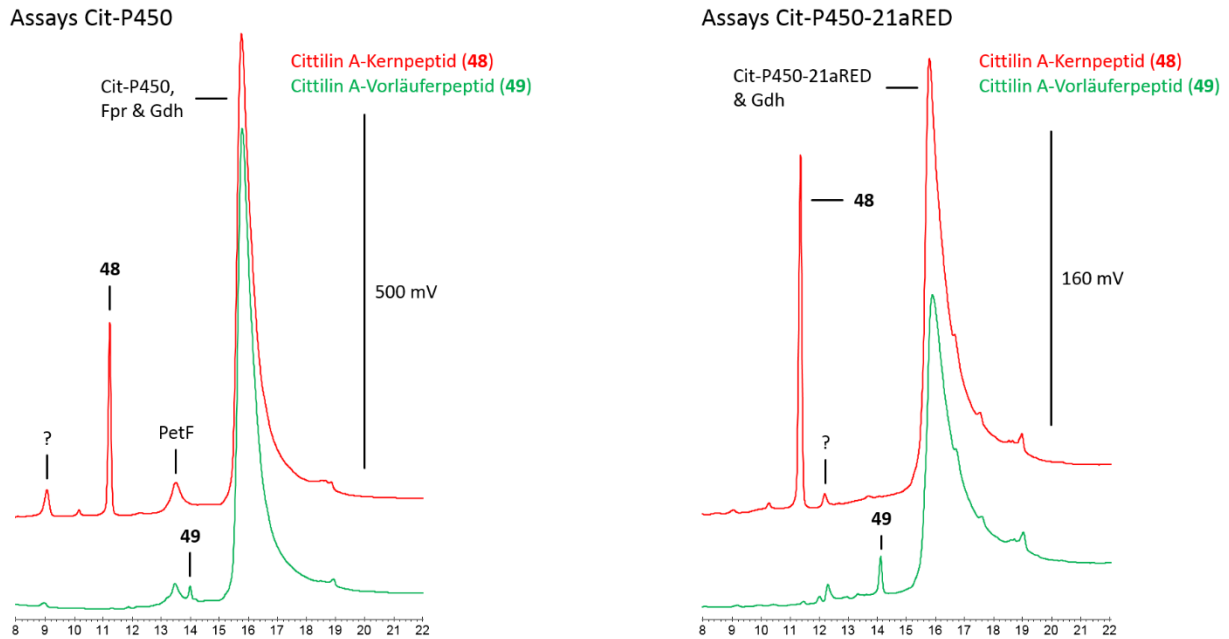
## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 51.** a) HPLC-Chromatogramme des Cittilin A-Kernpeptids (**48**) und des Cittilin A-Vorläuferpeptids (**49**). b) Massenspektren der mit **48** und **49** korrelierenden HPLC-Peaks.  $z = ,X'$ : Ionenpeaks mehrfach positiv geladener Moleküle mit Ladung  $X$ ; Rote Werte: Errechnete Massen; Blaue Werte: Gemessene Massen.

Für das Ausbleiben einer Kupplung von **48** oder **49** durch Cit-P450 kann es verschiedene Gründe geben. So könnte, wie bereits im Falle von Complestatin (**37**) diskutiert (Kapitel 3.1.6), eine Optimierung des enzymatischen Systems und der Reaktionsbedingungen notwendig sein. Beispiele hierfür wären ein Austausch des Fpr/PetF-Systems zur Bereitstellung von Elektronen durch das etablierte AdR/Adx-System (Kapitel 3.1.1.1) oder die Verwendung weiterer Reaktionspuffer. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Cit-P450 nicht an der Biosynthese von Cittilin A (**47**) beteiligt ist, oder nur eine der Biarylbindungen installiert. Hierbei könnte es sich in der zeitlichen Abfolge sowohl um die erste als auch die zweite Kupplung handeln. In diesem Zusammenhang wurde bereits für diverse biarylkuppelnde CYP450s aus NRPS-basierten Biosynthesewegen gezeigt, dass ihre Aktivität von vorangegangenen Cyclisierungen abhängt.<sup>66,68,77,128</sup> Wenn auch Cit-P450 die chronologisch zweite Biarylkupplung katalysiert, könnte das Ausbleiben der ersten Ringbildung das Enzym unwirksam machen. In diesem Fall wäre auch über das verwendete Assay keine Biarylverknüpfung zu beobachten. Um die Substratpräferenz von Cit-P450 näher zu untersuchen, könnte die Affinität zu **48** und **49** über Differenzspektren mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide bestimmt werden.<sup>69,194,195</sup> Sollte dies die Beteiligung eines zweiten CYP450 nahelegen, müsste dieses über zusätzliche bioinformatische Analysen des Genoms von *M. xanthus* DK1622 und molekularbiologische Untersuchungen, wie Gendelektionen, identifiziert werden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 52.** HPLC-Chromatogramme (Ausschnitt) der enzymatischen Assays von Cit-P450 mit den Substraten **49** oder **48** sowie von Cit-P450-21aRED mit **49** oder **48**. Peaks wurden entsprechend von Retentionszeit und Massenspektrum zugeordnet.

Auch eine weitere Charakterisierung von Cit-P450 und Cit-P450-21aRED in anderen Bereichen könnte für eine erfolgreiche Durchführung der enzymatischen Assays von Vorteil sein. So sollte die Reduzierbarkeit mittels Natriumdithionit gefolgt von einer Durchgasung mit CO getestet werden oder die Messung von Differenzspektren nach Zugabe von Imidazol (vgl. Kapitel 3.1.3) erfolgen. Im Falle von Cit-P450-21aRED könnte ebenfalls untersucht werden, ob die RED-Domäne in der Lage ist, den Häm-Cofaktor des Cit-P450-Teils zu reduzieren. Unter geeigneten Messbedingungen kann dies durch NADPH-Zugabe zum gereinigten Enzym mit anschließender CO-Durchgasung getestet werden.<sup>183,194</sup>

### 3.4 Nicht-ribosomale Peptide mit 4-Methyloxazolinring

Im Folgenden sind die Resultate der bioinformatischen Untersuchung eines Genclusters (Sf-JBIR) aus *S. filipinensis* NRRL 3217, welches große Ähnlichkeit zum biosynthetischen Cluster von JBIR-34 und -35 (**52** - **53**) aufweist,<sup>164</sup> zusammengefasst. Ebenso werden die Versuche zur Identifizierung potentieller Produkte dieses Clusters über Fermentation von *S. filipinensis* NRRL 3217 und heterologen Expression besprochen. Abschließend sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Biosynthese von 6-Chlorotryptophan (**55**) und  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) dargestellt. Hierzu zählen die heterologe Expression von FmoA1BCDE und ihre Charakterisierung durch molekularbiologische Methoden, sowie die enzymatischen Assays, welche mit diesen Proteinen durchgeführt wurden.

#### 3.4.1 Aufbau und Merkmale des JBIR-Genclusters aus *S. filipinensis* NRRL 3217

Für Contig 11 des *S. filipinensis*-Genoms wurde durch das Programm ‚antiSMASH 3.0‘ ein Gencluster vorhersagt, welches potentiell zum JBIR-Cluster verwandt ist.<sup>164</sup> Um die entsprechende DNA-Region näher zu untersuchen, wurden die vorhergesagten CDS („Glimmer Plug-in“ von ‚Geneious‘) in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt („Expasy Translate tool“) und mittels blastp analysiert. Über Homologien zu den an der Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52** - **53**) beteiligten Proteinen sollten dabei Zusammensetzung, Aufbau und die vermutlichen Grenzen dieses Clusters identifiziert werden. Es zeigte sich, dass das *S. filipinensis*-Cluster fast alle Proteine kodiert, denen eine Rolle bei der Biosynthese von **52** und **53** zugeschrieben wird (Tab. 8). Größe und Organisation der Gene innerhalb des Clusters entsprachen dabei weitestgehend denen von *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 (Tab. 8 und Abb. 53).<sup>164</sup>

Es zeigten sich jedoch an vier Stellen Unterschiede zwischen den beiden Clustern. Diese betrafen unter anderem *fmoM* und *fmoR3*, welche für eine L-Threonin-Aldolase bzw. einen Regulator der LysR-Familie kodieren. In *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 liegen beide Gene stromabwärts von *fmoA5*. Im Sf-JBIR-Cluster hingegen liegt das zu *fmoM* homologe Gen stromaufwärts von *fmoR1* und damit am gegenüberliegenden Ende des Clusters (vgl. Abb. 53). Ein *fmoR3*-Homolog wiederum fand sich in *S. filipinensis* weder innerhalb des Clusters noch in dessen näherer Umgebung (150 kb stromauf- oder stromabwärts). Die Neuordnung oder Deletion von Genen innerhalb biosynthetischer Gencluster ist generell nicht selten und repräsentiert einen schnell ablaufenden, evolutionären Prozess der zur Bildung neuer Naturstoffderivate oder -familien führt.<sup>276,277</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 8.** Übersicht über Größe und vermutete Funktion der durch das JBIR-Cluster aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 kodierten Proteine. Im Vergleich dazu sind Vorkommen, Größe und die über blastp ermittelte Sequenzübereinstimmung von homologen Proteinen aus *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217 dargestellt.

<i>Streptomyces</i> sp. Sp080513GE-23				<i>Streptomyces filipinensis</i> NRRL 3217	
Protein	Vorhergesagte Funktion (NRPS-Domänen)	Anzahl AS	GenBank / NCBI-ID	Anzahl AS	AS-Identität (%) [blastp]
<b>FmoA1</b>	NRPS (A-T)	588	BAP16684	595	468/586 (80%)
<b>FmoA2</b>	NRPS (A-T-CYC-MT)	1496	BAP16689	1499	1284/1498 (86%)
<b>FmoA3</b>	NRPS (CYC-A-T)	1127	BAP16693	1610 *	925/1116 (83%)
<b>FmoA4</b>	NRPS (C-A-T-MT)	1459	BAP16697	1456	1239/1461 (85%)
<b>FmoA5</b>	NRPS (C-T-TE-TE-A-T)	1868	BAP16699	1838	1500/1867 (80%)
<b>FmoB</b>	Thioesterase	246	BAP16685	246	192/246 (78%)
<b>FmoC</b>	Cytochrom P450-Monooxygenase	398	BAP16686	398	361/398 (91%)
<b>FmoD</b>	Tryptophan 6-Halogenase	550	BAP16687	544	484/542 (89%)
<b>FmoE</b>	Flavinreduktase	177	BAP16688	184	150/177 (84%)
<b>FmoF</b>	Hypothetisches Protein	218	BAP16690	216	175/213 (82%)
<b>FmoG</b>	Integraler Membran-Ionen-Antiporter	423	BAP16691	423	332/423 (78%)
<b>FmoH</b>	Alanin- / $\alpha$ -Methylserin-Hydroxymethyltransferase	407	BAP16692	Genfusion mit <i>fmoA3</i> (s.o.) *	
<b>FmoI</b>	Aldehyd-Dehydrogenase	490	BAP16694	500	423/489(87%)
<b>FmoJ</b>	Esterase	246	BAP16695	246	206/246 (84%)
<b>FmoK</b>	Transmembran-Transporter	487	BAP16698	487	418/489 (85%)
<b>FmoL</b>	Hypothetisches Protein	390	BAP16700	381	295/389 (76%)
<b>FmoM</b>	L-Threonin-Aldolase	364	BAP16701	344	278/343 (81%)
<b>FmoR1</b>	Transkriptionsregulator, SARP-Familie	289	BAP16683	278	223/271 (82%)
<b>FmoR2</b>	Transkriptionsregulator	323	BAP16696	322	247/322 (77%)
<b>FmoR3</b>	Transkriptionsregulator, LysR-Familie	306	BAP16702	X	
<b>Zusätzliche CDS im Sf-JBIR-Cluster ohne Entsprechung im JBIR-Cluster von <i>Streptomyces</i> sp. Sp080513GE-23</b>					
<b>FmoN</b>	Zwei-Komponenten Antwort-Regulator	219	WP_014739809 ( <i>M. marinus</i> )	221	113/202 (56%)
<b>FmoO</b>	Zwei-Komponenten Sensor-Histidinkinase	339	WP_014739808 ( <i>M. marinus</i> )	342	110/270 (41%)

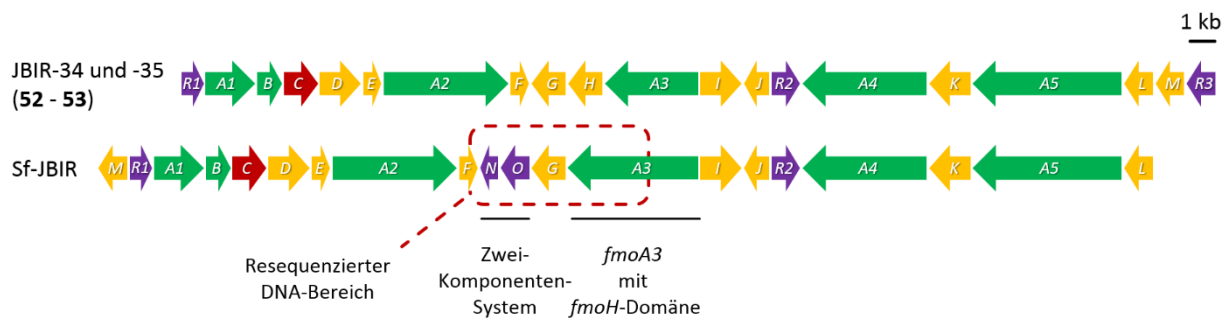
X: Kein Homolog im Sf-JBIR-Cluster oder der näheren genomischen Umgebung enthalten (Geneious; tblastn);

\*: *fmoA3* aus *S. filipinensis* kodiert eine NRPS mit der vermuteten Domänenorganisation CYC-A-T-HMT.

Eine erweiterte Erklärung für die Abwesenheit eines FmoR3-Regulators könnte in einem anderen Unterschied zwischen den Clustern zu finden sein. So enthält das Sf-JBIR-Cluster zwei zusätzliche, als

## Ergebnisse und Diskussion

*fmoN* und *fmoO* bezeichnete Gene. Diese kodieren Proteine, welche Homologien zu einem Antwort-Regulator (FmoN) und einer Sensor-Histidinkinase (FmoO) aus *Modestobacter marinus* zeigen. Beide Proteintypen sind gut untersucht und bilden sogenannte Zwei-Komponenten-Systeme, welche vor allem in Prokaryoten einen wichtigen Bestandteil der Signaltransduktion bilden.<sup>278,279</sup> Sie regulieren unterschiedlichste zelluläre Vorgänge als spezifische Antwort auf eine große Bandbreite von Umweltsignalen, wie die Veränderung der verfügbaren Nährstoffe.<sup>280,281</sup> Die Stimuli werden in diesem Fall über die membrangebundene Histidinkinase wahrgenommen, was zu einer Aktivierung des zugehörigen Antwort-Regulators führt, der eine zelluläre Antwort auslöst, die in der Mehrzahl der Fälle auf einer Regulation der Genexpression beruht.<sup>278,279</sup> Auch im Zusammenhang mit der Produktion von Sekundärmetaboliten wurden diese Systeme bereits beschrieben.<sup>282-284</sup> Die Proteine FmoN und FmoO wären somit Kandidaten, um eventuell die Funktion des fehlenden Regulator FmoR3 in *S. filipinensis* zu kompensieren.



**Abb. 53.** Vergleich des Aufbaus der Gencluster aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 (JBIR) und *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217 (Sf-JBIR). Die zur Verifizierung der Abweichungen im *S. filipinensis*-Cluster erneut sequenzierte Region ist entsprechend markiert. Grün: NRPS; Rot: CYP450; Gelb: Modifizierende Enzyme oder Proteine unbekannter Funktion; Lila: (Potentielle) Regulatoren.

Die interessanteste Abweichung zwischen dem von Muliandi *et al.* (2014) beschriebenen Gencluster und dem Sf-JBIR-Cluster lag allerdings in einer Genfusion zwischen *fmoA3* und dem stromabwärts gelegenen *fmoH* (Abb. 53).<sup>164</sup> Dies würde die Hydroxymethyltransferase (HMT) FmoH von einem eigenständigen Enzym in *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 zu einem Teil der NRPS FmoA3 in *S. filipinensis* NRRL 3217 machen. Eine weiterführende Analyse (blastp) von FmoH aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 mittels der NCBI-Datenbank zeigte, dass diese Form der Fusion zwischen einer NRPS und einem zu FmoH homologen Protein kein Einzelfall ist. So fand sich die größte Übereinstimmung zu FmoH überraschenderweise nicht bei anderen, eigenständigen Proteinen, die potentielle Serin-Hydroxymethyltransferasen repräsentieren, sondern bei zwei NRPS. Diese sind in den Genomen von *Streptomyces* sp. MUSC136T (auch *Streptomyces malaysiense*; Cover = 99%, E-value = 0.0, Identität = 89%, Gemeinsamkeit = 93%, NCBI-ID: WP\_053055449) und *Streptomyces puniscabiei* NRRL B-24456 (Cover = 99%, E-value = 0.0, Identität = 88%, Gemeinsamkeit = 92%, NCBI-ID:



WP\_055705528) kodiert. Auch hier bildet das FmoH-Homolog als Folge einer Genfusion den C-terminalen Teil der NRPS. Abgesehen davon sind sie in Anzahl, Funktion und Organisation der restlichen Domänen identisch zu FmoA3 aus *S. filipinensis* oder *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 (,PKS/NRPS Analysis'). Interessanterweise sind auch sie Bestandteil von Genclustern, welche homolog zum JBIR-Cluster zu sein scheinen.<sup>285-287</sup>

Wie bereits im Zusammenhang mit den Proteinen BipG und BipH (Kapitel 3.2.3.3) der potentiellen Biphenomycin-Biosynthese besprochen, ist die Fusion von Genen, welche an der gleichen Biosynthese beteiligt sind, nichts Ungewöhnliches. Vielmehr deutet sie auf eine enge funktionelle Beziehung der kodierten Proteine während der jeweiligen Synthese hin.<sup>257-259</sup> Aus diesem Grund ist auch nicht davon auszugehen, dass die Bildung eines Fusionsproteins zu einem Aktivitätsverlust von FmoH führt. Vielmehr scheint die NRPS FmoA3 hierdurch um eine potentiell neuartige HMT-Domäne erweitert zu werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass FmoH mit der Umwandlung von D-Alanin (**58**) zu  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) eine Schlüsselreaktion bei der Bildung des strukturgebenden 4-Methyloxazolinrings und somit bei der Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) katalysiert.<sup>164</sup>

Die Bildung eines Fusionsproteins hat allerdings durchaus Implikationen auf die zeitliche Abfolge der einzelnen Reaktionen während einer NRPS-basierten Biosynthese. So scheint es naheliegend, dass es sich bei dem Substrat einer HMT-Domäne, wie im Falle anderer modifizierender NRPS-Domänen (Methylierung, Epimerisierung, etc.), um eine PCP-gebundene Aminosäure handelt.<sup>43</sup> Die A-Domäne von FmoA3 aus *S. filipinensis* könnte dabei, anders als für die entsprechende A-Domäne aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 postuliert, nicht  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**), sondern D-Alanin (**58**) aktivieren. Eine Umwandlung zu **57** durch die HMT-Domäne würde erst nachfolgend stattfinden. Bei der Vorhersage der Substratspezifität wurde im Falle der FmoA3 A-Domäne des ursprünglichen JBIR-Clusters auf eine Untersuchung der Aktivität gegenüber **58** verzichtet. Unter den getesteten Substraten befand sich lediglich L-Alanin, welches nicht aktiviert wurde.<sup>164</sup> Im Hinblick auf das Fusionsprotein muss daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese A-Domäne in der Lage sein könnte, neben **58** auch **57** zu aktivieren. Eine Umsetzung von **58** würde dann in PCP-gebundener Form erfolgen. Die Substratpräferenz von FmoH gibt hierbei keine weiteren Anhaltspunkte, da die durch FmoH katalysierte Reaktion lediglich über die Untersuchung der Rückreaktion verifiziert wurde.<sup>164</sup>

Der Umsetzung von PCP-gebundenem **58** stünde ein Model gegenüber in dem die HMT-Domäne freies D-Alanin (**58**) zu  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) umwandelt. Dieses würde erst in der Folge durch die A-Domäne von FmoA3 aktiviert und auf die entsprechende PCP-Domäne geladen werden.

Die Fusion von *fmoH* und *fmoA3* und das Vorhandensein eines Zwei-Komponenten-Regulatorsystems sind wichtige Änderungen im Aufbau des Sf-JBIR-Clusters. Für weitere Untersuchungen der

Biosynthese sowie für die heterologe Expression des Sf-JBIR-Clusters könnte dies von Bedeutung sein. Daher wurde das Resultat der Illumina-Sequenzierung durch einen zweiten Sequenzierungsschritt der entsprechenden DNA-Region verifiziert. Hierdurch sollten Ereignisse, wie die Insertionen oder Deletionen einzelner Basen während der ersten Sequenzierung, ausgeschlossen werden. So könnten zusätzliche oder fehlende Basen eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge gehabt haben, die in einer Pseudofusion von *fmoH* und *fmoA3* resultiert. Für die erneute Sequenzierung wurde ein 6,3 kb großer DNA-Bereich (Abb. 53) mit den Genen *fmoN*, *fmoO* und der DNA-Region von *fmoA3*, welche für die potentiellen HMT-Domäne kodiert, in fünf Abschnitte (1,4 bis 1,6 kb) unterteilt. Diese wurden mittels PCR (Q5-Polymerase) amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Für eine vollständige Abdeckung der Region wurden die Abschnitte so gewählt, dass sie sich an ihren Enden überlappen (170 - 660 bp). Ein Alignment der resultierenden Sequenzen mit der über die Genomsequenzierung erhaltenen Sequenz zeigte dabei keinerlei Abweichungen innerhalb der untersuchten Region. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Größe von *fmoN* und *fmoO* und die Funktion der kodierten Proteine korrekt vorhergesagt wurden. Auch das Fusionsereignis zwischen *fmoH* und *fmoA3* wurde bestätigt. Die NRPS FmoA3 enthält somit einen bislang unbekanntem Typ von Domäne mit neuartiger Funktion. Diese leitet sich von der Alanin- /  $\alpha$ -Methylserin-Hydroxymethyltransferase FmoH ab. Unter der Annahme, dass sie dieselbe Reaktion katalysiert, sollte sie daher als HMT-Domäne bezeichnet werden.

Abschließend kann also davon ausgegangen werden, dass auch das Sf-JBIR-Cluster in der Lage ist, die Substanzen **52** und **53** oder eng verwandte Substanzen zu synthetisieren. Die spezifischen Unterschiede während der Biosynthese aufgrund des alternativen Clusteraufbaus verlangen dabei nähere Untersuchungen durch *in vivo* (Erzeugung von Deletionsmutanten) oder *in vitro* (heterologe Proteinproduktion und enzymatische Assays) Experimente.

### **3.4.2 Fermentationen zur Extraktion von JBIR-34 und -35 (52 - 53) oder entsprechender Derivate**

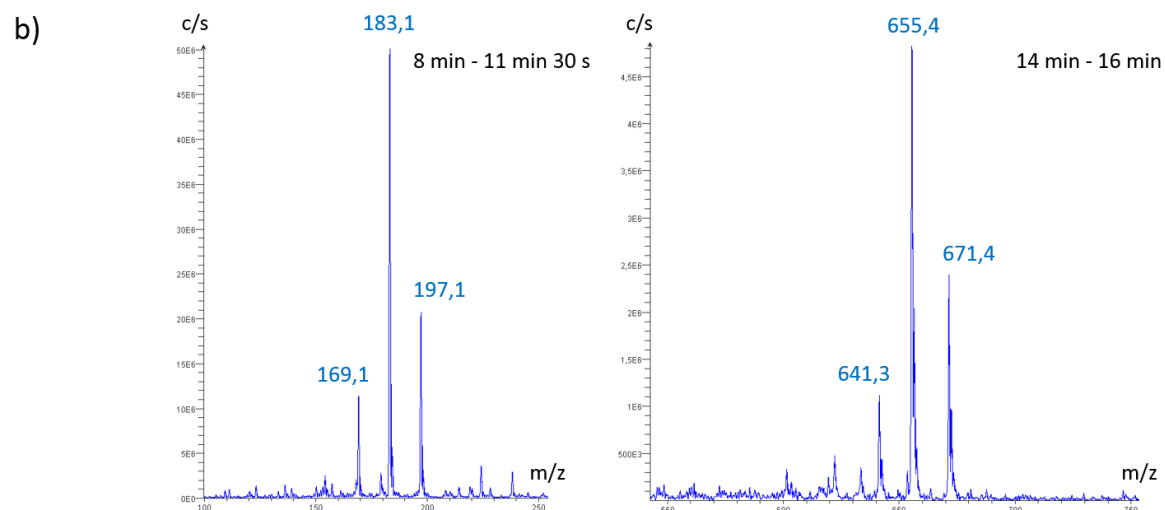
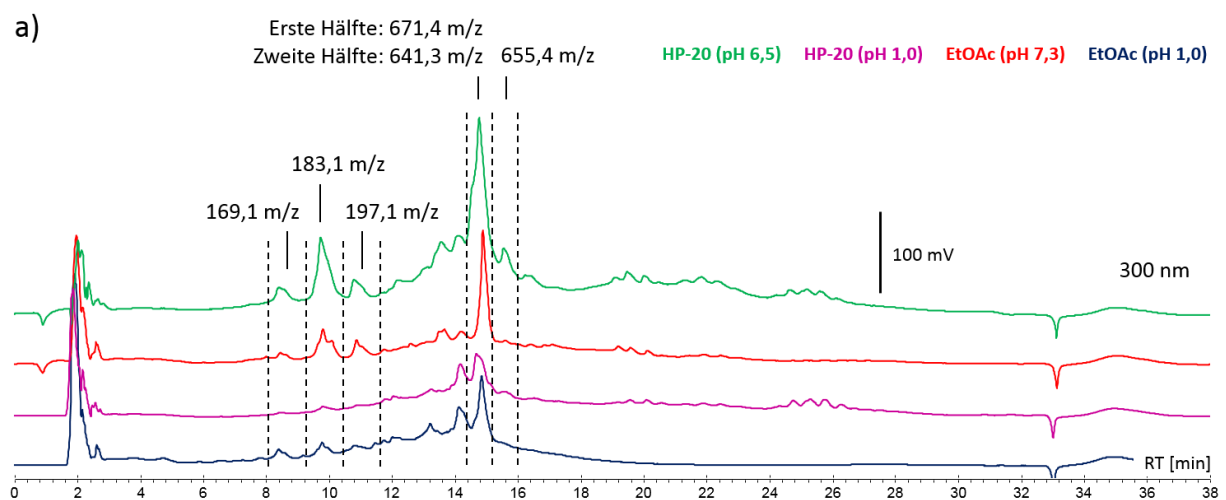
#### **3.4.2.1 Fermentation von *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217**

Zur Überprüfung, ob das Sf-JBIR-Gencluster ebenfalls die Biosynthese der NRPs JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) kodiert, oder ob *S. filipinensis* NRRL 3217 Variationen beider Moleküle produziert, die z. B. Modifikationen durch nicht im Cluster kodierte Enzyme erfahren haben, sollten die Substanzen durch Fermentation und Extraktion von *S. filipinensis* isoliert werden.

Dies geschah auf zwei Arten. Zum einen sollten potentielle JBIR-Moleküle über ein Ionenaustauschharz (Diaion® HP-20), wie es auch bereits während der Untersuchungen zur Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52 - 53**) verwendet wurde,<sup>164</sup> aus einer fünf Tage alten *S. filipinensis*-Kultur in ISP-2-Medium (2 L)

## Ergebnisse und Diskussion

isoliert werden. Gebundene Substanzen wurden in MeOH gelöst und getrocknet. Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion der erhaltenen Substanzen mit EtOAc. Eine alternative Aufreinigung sollte mittels einer Standardextraktion des Überstands einer Kultur, die sieben Tage in ISP-2 (250 mL) inkubiert wurde, durch EtOAc erfolgen. In beiden Fällen wurden die Lösungen (MeOH-Extrakt oder Kulturüberstand) neutral (pH 6,5 - 7,3) oder angesäuert (pH 1,0) mit EtOAc extrahiert. Eine nachfolgende Analyse von 50  $\mu$ L der in MeOH resuspendierten Extrakte (1 mg/mL) mittels LC-MS (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘, Detektion bei 300 nm) lieferte verschiedene Signale (Abb. 54a). Diese besaßen im HP-20-Extrakt (pH 6,5) generell die größte Intensität. Der distinkte Peak zeigte sich in allen Extrakten bei 14 min 50 s.



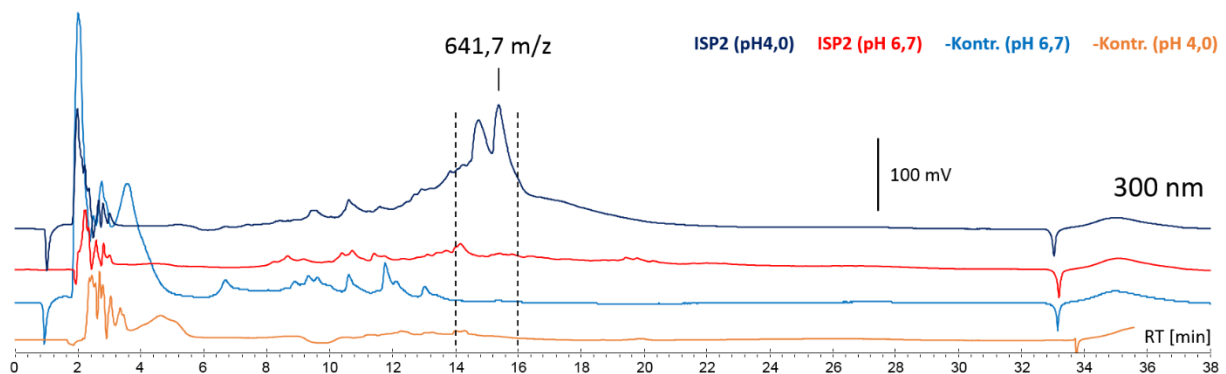
**Abb. 54. a)** Vergleich der Extraktionen von *S. filipinensis*-Kulturen über ein Ionenaustauscharz (HP-20) oder mittels EtOAc bei 300 nm. **b)** Spezifische Massen (positiver Modus) im HP-20-Extrakt (pH 6,5) bei den entsprechenden Retentionszeiten.

Dieser zeigte in den HP-20-Extrakten spezifisch die Massen 641,3 m/z und 671,4 m/z (positiver Modus). Die Masse 671,4 m/z fand sich dabei in der vorderen Schulter des Peaks, während die Masse 641,3 m/z

## Ergebnisse und Diskussion

in der zweiten Hälfte zu finden war (Abb. 54b). Die entsprechenden Peaks der EtOAc-Extrakte zeigten nur die Masse von 641,3 m/z. Im HP-20-Extrakt mit pH 6,5 zeigte sich außerdem ein Ausläufer der Masse 655,4 m/z (positiver Modus), die sich spezifisch im Peak bei 15 min 35 s fand (Abb. 54a und b). Weitere intensive Peaks mit spezifischen Massen (positiver Modus) fanden sich im HP-20-Extrakt (pH 6,5) bei 8 min 30 s (169,1 m/z), 9 min 45 s (183,1 m/z) und 10 min 50 s (197,1 m/z) (Abb. 54a und b). Auch in den anderen drei Extrakten waren diese spezifisch bei den entsprechenden Retentionszeiten zu identifizieren. Die erwarteten Massen von **52** (m/z = 481,1 [M+H<sup>+</sup>]) oder **53** (m/z = 467,1 [M+H<sup>+</sup>]) waren jedoch in keinem der vier hergestellten Extrakte enthalten.

Weitere Extraktionen von in ISP-2-Medium angezogenen Kulturen und nicht induziertem Medium zeigten, dass die beobachteten Peaks (300 nm) nur bei Inkubation mit *S. filipinensis* sichtbar waren. Auch schien eine Ansäuerung des Kulturüberstandes entgegen den in Abb. 54 dargestellten Chromatogrammen bei einer Extraktion mit EtOAc notwendig zu sein, um die unbekannte Substanz mit einer Masse von ca. 641,3 m/z isolieren zu können. So waren in folgenden Extraktionen weder ein Peak im UV/VIS-Spektrum (300 nm) sichtbar, noch konnte die Masse bei der entsprechenden Retentionszeit identifiziert werden (Abb. 55), wenn der pH-Wert nicht angeglichen wurde (pH 4,0).



**Abb. 55.** Vergleich der Extraktion von unbeimpftem ISP-2-Medium (= -Kontrolle; 250 mL, pH 6,7 oder pH 4,0) sowie den EtOAc-Extrakten des Überstandes einer *S. filipinensis*-Kultur (1 L, sieben Tage inkubiert) mit pH 6,7 und pH 4,0 bei 300 nm.

Das Vorhandensein von homologen Genclustern bedeutet nicht automatisch, dass auch das selbe Molekül als Endprodukt der Biosynthese gebildet wird. Eine Vielzahl von neuen, wirtsspezifischen Modifikationen, wie die veränderte Aktivität bestimmter NRPS-Domänen, das Verschmelzen kleinerer Subcluster, Rekombinationen sowie das Hinzugewinnen, der Verlust oder die Duplikation beteiligter Gene können zur strukturellen Diversifizierung der gebildeten Naturstoffe beitragen.<sup>153,276,277</sup>

Die Substanzen mit den Massen 641,3 m/z, 655,4 m/z und 671,4 m/z zeigten, wie die JBIR-Moleküle **52** und **53**, intensive Peaks im UV/VIS-Spektrum bei 300 nm. Außerdem wurden sie über einen Aufreinigungsprozess gewonnen, wie er auch von Muliandi *et al.* (2014) verwendet wurde.<sup>164</sup> Dies legt

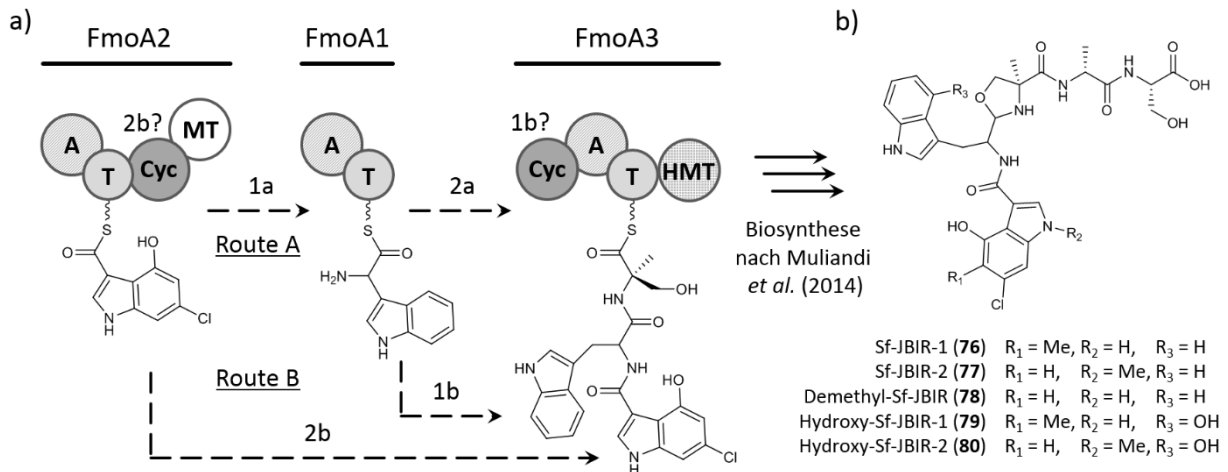
nahe, dass es sich bei den entsprechenden Molekülen um modifizierte Varianten von **52** oder **53** handeln könnte. Einen Hinweis darauf, um welcher Art von Modifikationen es sich handelt, kann dabei der Massenunterschied zwischen dem bekannten Molekül und der gefundenen Masse liefern. Von den drei neuen Massen war 655,4 m/z die dominierende (Abb. 54b). Geht man von der Annahme aus, dass es sich hierbei um das einfach protonierte Molekül handelt  $[M+H^+]$  und subtrahiert von dieser die Massen von JBIR-34 (**52**; m/z = 481,1  $[M+H^+]$ ) und -35 (**53**; m/z = 466,1  $[M+H^+]$ ) erhält man mit 174,3 Da und 188,3 Da recht hohe Differenzen. Diese lassen sich durch die Addition größerer Bausteine, wie z. B. zusätzliche Aminosäuren, erklären. Die Größenordnung der Massenunterschiede und die NRP-Natur von **52** und **53** unterstützen diese Vermutung. Da die Ausbildung einer neuen Peptidbindung mit dem Verlust einer Hydroxygruppe und eines Wasserstoffatoms einhergeht, würde sich zu den errechneten Differenzen noch eine Masse von 18,0 Da addieren. Dies liefert Werte von 192,3 Da (für **52**) und 206,3 Da (für **53**). Ein Vergleich mit dem Molekulargewicht der proteinogenen Aminosäuren zeigt, dass lediglich die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (181,2 Da) und Tryptophan (**26**; 204,2 Da) eine ähnliche Größe aufweisen. Tryptophan (**26**) ist dabei von besonderem Interesse. Zum einen weicht seine Masse lediglich um zwei Dalton von der Differenz zwischen **53** und der unbekanntem Substanz mit einer Masse von 655,4 m/z ab, ein Unterschied der zum Beispiel durch den Verlust einer Doppelbindung im finalen Molekül erklärt werden kann. Zum anderen findet sich mit FmoA1 eine NRPS in der Biosynthese, welche in der Lage ist, neben 6-Chlorotryptophan (**55**) auch Tryptophan (**26**) spezifisch zu erkennen und zu aktivieren.<sup>164</sup>

Dies könnte bedeuten, dass das Grundgerüst der Sf-JBIR-Derivate um einen über FmoA1 eingebrachten Tryptophanbaustein (**26**) erweitert wurde. Ein Einbau dieser zusätzlichen Aminosäure macht mit Hinblick auf die Gesamtstruktur der NRPS-Maschinerie (vgl. Schema 14a) nur an zweiter Position des Moleküls Sinn, da sowohl die Starter-NRPS FmoA2 als auch die folgende NRPS FmoA3 eine Cyclisierungsdomäne besitzen. Im Falle der postulierten Biosynthese wäre aber lediglich eine dieser Domänen für die Verknüpfung der Bausteine **54** und **57** und die folgende Cyclisierung zum 4-Methyloxazolinring nötig. Dies bedeutet, dass die Cyc-Domäne von FmoA2 bei einer Positionierung von FmoA1 an zweiter Stelle der Biosynthesemaschinerie (Schema 22a) die Kondensation der Startereinheit **54** und **26** katalysieren könnte (Route A, Teilschritt 1a).

In Anbetracht der strukturellen Verwandtschaft von Kondensations- und Cyclisierungsdomänen, die ebenfalls in der Lage sind die Kondensation zwischen aufeinanderfolgenden Aminosäuren zu katalysieren, erscheint dies denkbar.<sup>44,45</sup> Aufgrund struktureller Veränderungen der Cyc-Domäne von FmoA2 könnte dabei die Fähigkeit zur Cyclisierung verloren gegangen sein. Dennoch können die beiden Domänen aus FmoA2 und FmoA3 aus *S. filipinensis* aufgrund des konservierten Motivs DxxxxDxxS, welches das katalytische HHxxxDG-Motiv aus C-Domänen ersetzt,<sup>44</sup> eindeutig als Cyclisierungsdomäne identifiziert werden (FmoA2: DFLVADAWS, FmoA3: DLQLMDAS).

## Ergebnisse und Diskussion

Das so gebildete Dipeptid könnte dann von der FmoA3-Cyc-Domäne auf das PCP-gebundene gebundene  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) übertragen werden (Route A, Teilschritt 2a). Die Ausbildung des 4-Methyloxazolinrings würde in diesem Fall analog zu **52** und **53** zwischen dem Dipeptid und **57** erfolgen.



**Schema 22. a)** Variante der Biosynthese von JBIR-34 und -35 (**52** - **53**) unter multipler Verwendung der NRPS FmoA1 des Sf-JBIR-Clusters. **b)** Mögliche Produkte einer Biosynthese bei multipler Verwendung von FmoA1 in *S. filipinensis* NRRL 3217: Sf-JBIR-1 und -2 (**76** - **77**), Demethyl-Sf-JBIR (**78**) und Hydroxy-Sf-JBIR-1 und -2 (**79** - **80**). Zusätzliche Modifikationen an der wachsenden Peptidkette durch entsprechende Domänen, wie Methylierungen oder Cyclisierungen, sind nicht dargestellt.

Eine weitere Biosynthese würde entsprechend zu JBIR-34 und -35 (**52** - **53**) verlaufen und abhängig vom Ort der Methylierung in Sf-JBIR-1 (**76**) oder -2 (**77**) resultieren (Schema 22b). Diese besäßen beide eine exakte Masse von 654,22 Da. Zusätzliche Modifikation der ersten beiden Bausteine des neuen Sf-JBIR-Grundgerüsts oder ihr Ausbleiben könnten außerdem zu weiteren Derivaten führen. So entspricht eine exakte Masse von 640,2 Da Demethyl-Sf-JBIR (**78**; Schema 22b), welches durch das Fehlen jeglicher Methylierung entstände. Weiterhin könnte eine zusätzliche Hydroxylierung am Indolring des zusätzlichen Tryptophanrests erfolgen, die wie bei der postulierten Synthese von **56** über FmoC verlaufen könnte. Die so gebildeten Moleküle Hydroxy-Sf-JBIR-1 (**79**) und -2 (**80**) (Schema 22b) besäßen eine exakte Masse von 670,22 Da. Somit wären auf diesem Weg alle beobachteten Massensignale erklärbar. Über den Zeitpunkt der Modifikationen und die Art der entsprechenden Substrate kann dabei keine Vermutung getroffen werden. Auch im Falle von **52** und **53** ist teils noch nicht genauer geklärt, wann diese eingebracht werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die beiden Cyc-Domänen nacheinander Tryptophan (**26**) und 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure (**54**) auf FmoA3 übertragen (Schema 22a, Route B). Hierbei würde die Cyc-Domäne von FmoA3 zuerst **26** oder ein entsprechend modifiziertes Derivat, welches an FmoA1 gebunden ist, auf das FmoA3-gebundene  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) übertragen (Route B, Teilschritt

1b). Die Cyc-Domäne von FmoA2 könnte dann **54**, das an die vorangehende PCP-Domäne gebunden ist, auf das so gebildete Dipeptid übertragen (Route B, Teilschritt 2b). Dies würde ebenfalls zur Bildung des in Schema 22b dargestellten Tripeptids führen.

Beide Synthesewege für **76 - 80** setzen eine multiple Verwendung von FmoA1 voraus. Zum einen wäre die NRPS an der Biosynthese der 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure-Startereinheit (**54**) beteiligt. Zum anderen integriert sie einen zusätzlichen Tryptophanbaustein in der eigentlichen Sf-JBIR-Biosynthese. Bisher sind einige Biosynthesen von nicht-ribosomalen Peptiden bekannt, die vom linearen Syntheseweg (Typ A), wie er bereits beschrieben wurde (Kapitel 1.1.1), abweichen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass Domänen oder Module mehrfach verwendet werden (iterative NRPS, Typ B) oder die Organisation der Domänen innerhalb eines oder mehrerer Module von klassischen C-A-T-Aufbau abweicht (nicht-lineare NRPS, Typ C), wobei bestimmte Domänen mehrfach während der Biosynthese aktiv sein können.<sup>288,289</sup> So findet sich in der Biosynthese des NRP Fungisporin aus dem Pilz *Penicillium chrysogenum* eine *trans*-agierende A-Domäne. Zusätzlich zeigen alle beteiligten A-Domänen eine Akzeptanz für mehrere Aminosäuren, deren Einbau zur Bildung von Derivaten des cyclischen Fungisporins führt.<sup>290</sup> Weitere Beispiele für Domänen mit ungewöhnlicher Aktivität sind die *trans*-agierende A-Domäne von Modul zwei der Yersiniabactin-Biosynthese, welche Cystein aktiviert und in der Lage ist, drei nachfolgende PCP-Domänen damit zu beladen, oder die C-Domäne der NRPS MxcG, die an der Bildung von Myxochelin beteiligt ist. Letztere katalysiert mutmaßlich die zweifache Acylierung des Lysinrests, der an die PCP-Domäne von MxcG gebunden ist, an  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Position mit je einer Dihydroxybenzoylgruppe.<sup>288</sup>

Die alternative Aktivität von FmoA1 könnte durch das Zusammenspiel mit anderen NRPS der Sf-JBIR-Biosynthese reguliert werden. Eine Interaktion mit FmoA2 und FmoA3 könnte in der Aktivierung und Einbau von Tryptophan bzw. Hydroxytryptophan in die wachsende Peptidkette resultieren. Eine freistehende FmoA1-NRPS hingegen könnte an der Biosynthese von **54** beteiligt sein.

Ein vergleichbarer Effekt, bei dem die Bindung eines Proteins Einfluss auf die Aktivität von A-Domänen zeigt, ist von MbtH-ähnlichen Proteinen bekannt. Diese sind für die Löslichkeit oder Aktivität bestimmter A-Domänen notwendig. Erst bei Anwesenheit des entsprechenden MbtH-ähnlichen Proteins sind sie in der Lage, Aminosäuren zu aktivieren, wodurch die jeweilige NRP-Biosynthese ungehindert ablaufen kann. Dabei interagieren die MbtH-ähnliche Proteine mit einer Bindestelle der A-Domänen, die abseits vom aktiven Zentrum liegt. Aufgrund dessen wird vermutet, dass sie die Aktivität der Domänen über einen allosterischen Effekt regulieren.<sup>291</sup>

Eine mehrfache Verwendung einer einzelnen NRPS, wie sie hier für FmoA1 vermutet wird, ist dabei bisher noch nicht bekannt. Generell können aber nur weitere *in vitro* und *in vivo*-Experimente klären, welche Funktion FmoA2 genau während der Biosynthese der JBIR-Moleküle aus *S. filipinensis* einnimmt.

Um die Hypothese der Sf-JBIR-Biosynthese zu verifizieren, wurde versucht, den Peak bei 14 min 50 s mittels präparativer HPLC zu isolieren und die Struktur der enthaltenen Substanz basierend auf unserer Hypothese mittels Kernspinresonanz (engl. „Nuclear magnetic resonance“, NMR) -Spektroskopie zu analysieren. Aufgrund von wenig Ausgangsextrakt und der daraus resultierenden geringen Menge an aufgereinigter Substanz (< 1 mg) konnte jedoch trotz Langzeitmessung kein  $^1\text{H}$ -Spektrum mit ausreichender Signalintensität erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit minimaler Signale im aromatischen Bereich des NMR-Spektrums legte dabei jedoch nahe, dass die Substanz höchstwahrscheinlich mehrere aromatische Systeme beinhaltet.

Für weitere Strukturanalysen wären somit eine erneute Fermentation von *S. filipinensis* NRRL 3217 und Aufreinigung des Peaks bei 14 min 50 s notwendig. Ergänzt werden könnte dies durch die heterologe Expression des Sf-JBIR-Clusters (siehe Kapitel 3.4.2.2) und damit einhergehende Deletionsexperimente. Die Kombination beider Ansätze sollte zeigen, ob die beobachteten, spezifischen Massen den Molekülen **76 - 80** zugeordnet werden können und welche Rolle FmoA1 ggf. bei deren Biosynthese spielt. Auch über die genaue Funktion der neuartigen HMT-Domäne bei einer Bildung von **76 - 80** kann ohne weitere Untersuchungen keine detaillierte Aussage getroffen werden. So wäre es denkbar, dass die neue Domäne an weiteren Reaktionen, wie die Reduktion des neu gebildeten Oxazolinrings, beteiligt ist. Solch eine Funktion würde zu den beobachteten Massen passen.

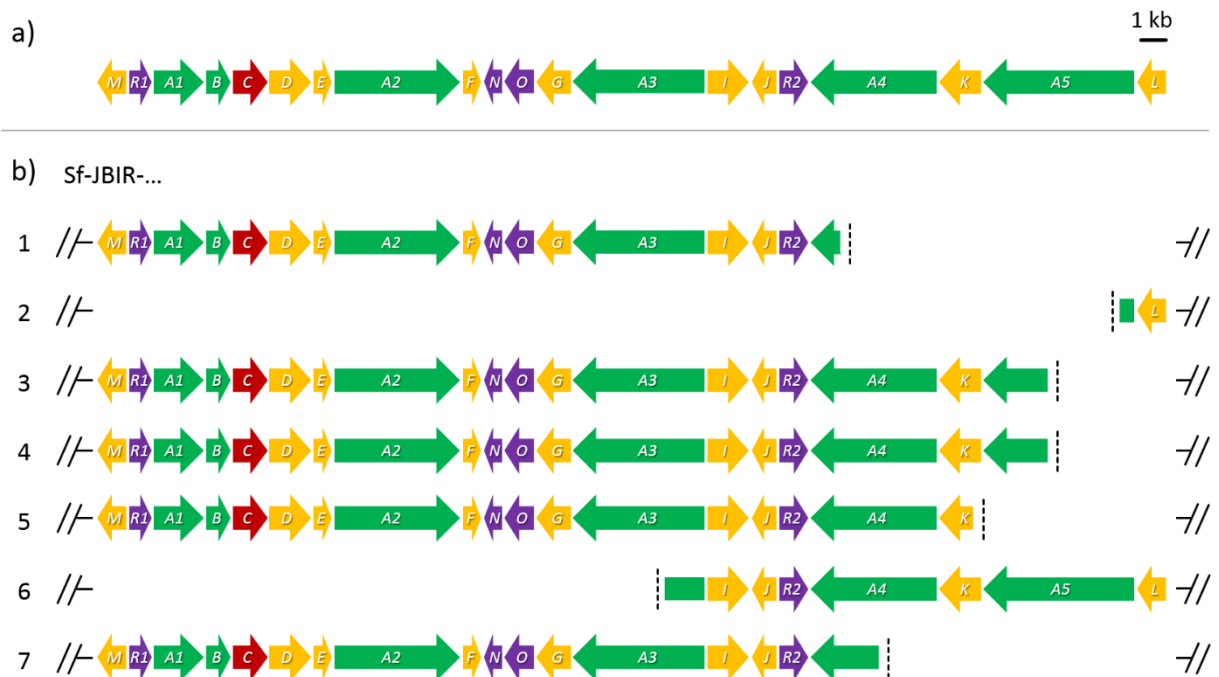
### **3.4.2.2 Heterologe Expression des JBIR-Genclusters aus *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217**

Zur besseren Identifizierung der durch *S. filipinensis* produzierten JBIR-Moleküle sollte das entsprechende Gencluster über geeignete Shuttle-Vektoren in andere Wirte, wie *E. coli* oder die Streptomyceten-Arten *S. coelicolor*, *S. lividans* und *S. albus*, die schon bei der Expression diverser Naturstoffe Verwendung fanden,<sup>292</sup> eingebracht und heterolog exprimiert werden. Um das 38 kb große Sf-JBIR-Cluster möglichst intakt aus der gDNA zu bergen, sollte die von Frau Catharina Seel hergestellte gDNA-Bibliothek von *S. filipinensis* NRRL 3217, die bereits bei der Identifizierung des Biphenomycin-Genclusters Verwendung fand (Kapitel 3.2.1), durchmustert werden.<sup>171</sup> Hierbei wurden spezifische Primer für die Gene *fmoB*, *fmoD*, *fmoL* oder das 3'-Ende von *fmoA4* mit PCR-Amplifikation durch die Polymerasen Q5 und Taq genutzt. Positive Einzelklone wurden dann für eine Plasmidaufreinigung verwendet. Die Endsequenzierung der Inserts und ein Vergleich der resultierenden DNA-Sequenzen mit dem Teilgenom von *S. filipinensis* NRRL 3217 (Kapitel 3.2.2) dienten anschließend dazu, die Identität der beinhalteten gDNA-Fragmente zu bestimmen. Auf diese Weise konnten sieben Klone der Bibliothek identifiziert werden, die ein Teilstück des Sf-JBIR-Clusters



## Ergebnisse und Diskussion

trugen (Abb. 56). Die Klone sowie die entsprechenden Vektoren (pCC1Fos::Sf-JBIR) wurden dabei in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert.



**Abb. 56.** Übersicht und Vergleich des vollständigen JBIR-Genclusters aus *S. filipinensis* NRRL 3217 (a) mit den sieben Klonen der *S. filipinensis* gDNA-Bibliothek, die Teile des JBIR-Genclusters als Insert der pCC1Fos-Vektoren enthalten (b).

Die Gesamtgröße der unterschiedlichen Inserts reichte von 31 kb bis 41,5 kb. Hiervon entfielen je nach Fosmid zwischen 1,2 kb (Klon 2) bis 33,1 kb (Klon 3 und 4) auf Teile des Sf-JBIR-Clusters. Fünf der Klone (1, 3, 4, 5 und 7) enthielten den stromaufwärts liegenden Teil des Clusters, zwei der Klone (2 und 6) enthielten den stromabwärts liegenden Bereich. Hierbei trug Klon 2 lediglich 75 bp des 5'-Endes von *fmoA5* und *fmoL*, das letzte Gen des Clusters. Die Klone 3 und 4 enthielten ein identisches Teilstück der gDNA und damit des Sf-JBIR-Clusters. Auf keinem der sieben Fosmide war jedoch das Sf-JBIR-Cluster in vollständiger Länge enthalten. Daher sollte der Versuch unternommen werden, das Cluster über homologe Rekombination zu komplettieren.<sup>293</sup> Diese gut etablierte Methode wurde bereits in einer Vielzahl von Fällen verwendet, um die biosynthetischen Gencluster diverser Naturstoffe zu vervollständigen oder in andere Vektoren einzubringen.<sup>294-297</sup>

Für eine Komplettierung des Sf-JBIR-Clusters mittels homologer Rekombination wurden die Konstrukte pCC1Fos::Sf-JBIR-3, pCC1Fos::Sf-JBIR-5 und pCC1Fos::Sf-JBIR-6 ausgewählt (Abb. 56). Als erstes sollte der auf pCC1Fos::Sf-JBIR-6 befindliche, stromabwärts liegende Teil des Sf-JBIR-Clusters mittels Q5-PCR amplifiziert werden (Schema 23a). Dies würde zwei unterschiedliche Konstrukte generieren: Ein langes Fragment, welches ein Teilstück von *fmoK* sowie *fmoA5* und *fmoL* beinhaltet, und ein kurzes Fragment,

## Ergebnisse und Diskussion

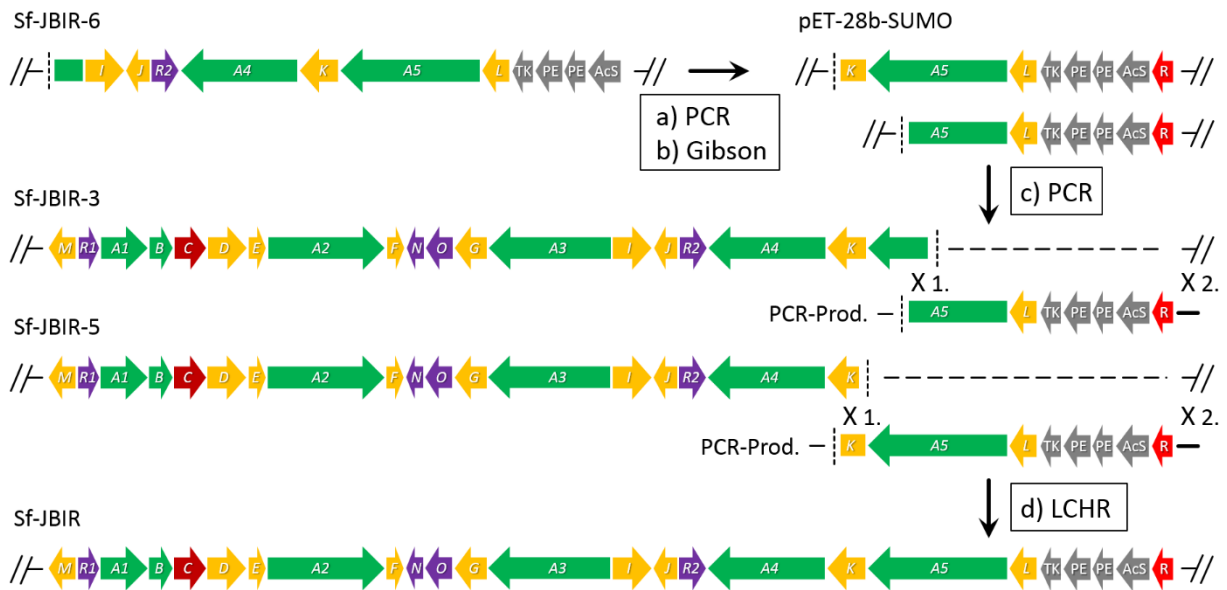
welches nur ein Teilstück von *fmoA5* und *fmoL* besitzt. Beide Fragmente sollten außerdem die vier Gene tragen, welche stromabwärts des Sf-JBIR-Clusters liegen und die laut Vorhersage für eine Thymidinkinase (TK), zwei Phosphodiesterasen (PE) und eine Acyl-CoA-Synthetase (AcS) kodieren. Diese Gene fanden sich ebenfalls auf dem Sf-JBIR-6-Insert und sollten übertragen werden, falls sie unerwarteter Weise an einer erweiterten Biosynthese beteiligt sind. Das kurze Fragment hätte somit eine Länge von 8,7 kb, das lange Fragment eine Länge von 11,7 kb. Zusätzliche Überhänge, die bei der PCR angefügt werden, ermöglichen dann das Einbringen der beiden Fragmente mittels Gibson-Assemblierung in einen entsprechend präparierten pET-28b-SUMO-Vektor (Schema 23b).<sup>298</sup> Hierdurch würde die vektoreigene Kanamycin-Resistenzkassette (R) in unmittelbare Nachbarschaft der beiden Fragmente gelangen. In einer zweiten Amplifikation könnte die Resistenzkassette dann an die beiden PCR-Produkte angefügt werden (Schema 23c). Im stromabwärts liegenden Teil der Resistenzkassette sollte dabei über einen der verwendeten Primer eine 50 bp lange DNA-Sequenz des pCC1Fos-Vektorrückgrats eingebracht werden. Diese und die stromaufwärts-liegenden Teilstücke von *fmoK* (200 bp; langes Fragment) oder *fmoA5* (223 bp; kurzes Fragment) könnten im letzten Schritt für eine lineare-zirkuläre homologe Rekombination (engl. „Linear-circular homologous recombination“, LCHR) zwischen dem kurzen Fragment und pCC1Fos::Sf-JBIR-3 oder dem langen Fragment und pCC1Fos::Sf-JBIR-5 verwendet werden (Schema 23d). Dabei sollte das vollständige Sf-JBIR-Gencluster entstehen.

In ersten Versuchen konnte das kürzere der beiden Fragmente (8,7 kb) mittels Q5-Polymerase amplifiziert werden. Die Ausbeute des gewünschten PCR-Produkts war jedoch gering und wurde von einigen unspezifischen Banden begleitet. Nach einer Gelaufreinigung des DNA-Fragments konnte es für eine Gibson-Assemblierung mit linearisiertem pET-28b-SUMO (verdaut mit *Bam*HI) verwendet werden. Diese verlief allerdings erfolglos.

Aufgrund der Tatsache, dass sich das lange Fragment nicht amplifizieren lies und das kurze Fragment nur in geringen Ausbeuten erhalten wurde, sollte parallel zum im Schema 23 dargestellten Vorgehen ein zweiter Ansatz zur Komplettierung des Sf-JBIR-Clusters verfolgt werden. Dieser basierte darauf ein 8,2 kb großes Fragment bestehend aus einem Teilstück von *fmoK* (761 bp), *fmoA5*, *fmoL* und einem Teilstück des TK-Gens (593 bp) durch Restriktionsverdau aus pCC1Fos::Sf-JBIR-6 zu entfernen und über Gibson-Assemblierung in den Vektor pBluescript II SK einzubringen.

Dieses Konstrukt könnte dann zusammen mit pCC1Fos::Sf-JBIR-3, welches den restlichen Teil des Sf-JBIR-Clusters trägt, für eine heterologe Expression in einem geeigneten Wirt, wie *E. coli* BAP1, genutzt werden. Das entsprechende Fragment des Sf-JBIR-Clusters wurde durch Verdau des Vektors pCC1Fos::Sf-JBIR-6 mit dem Restriktionsenzym *Pst*I und einer anschließenden Gelaufreinigung erhalten. pBluescript II SK wurde dann mittels Q5-PCR amplifiziert und dabei mit geeigneten Überhängen für eine Gibson-Assemblierung versehen.

## Ergebnisse und Diskussion



**Schema 23.** Schema der geplanten Kompletierung des Sf-JBIR-Clusters mittels homologer Rekombination. (Details siehe Text). Sf-JBIR und Varianten (-3, -5 und -6) in pCC1Fos; Gestrichelte Linien markieren Genfragmente; X: Rekombination zwischen homologen DNA-Sequenzen des Sf-JBIR-Clusters (1.) und des pCC1Fos-Rückgrats (2.).

Eine nachfolgende Integration des 8,2 kb großen Fragments in pBluescript II SK verlief erfolgreich und resultierte in dem Vektor pBluescript::Sf-JBIR-6\_8kb-Frag. Die Identität des Inserts wurde mittels Testverdau und Endsequenzierung bestätigt. Eine Co-Transformation und Expression waren jedoch aufgrund fehlender Zeit im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

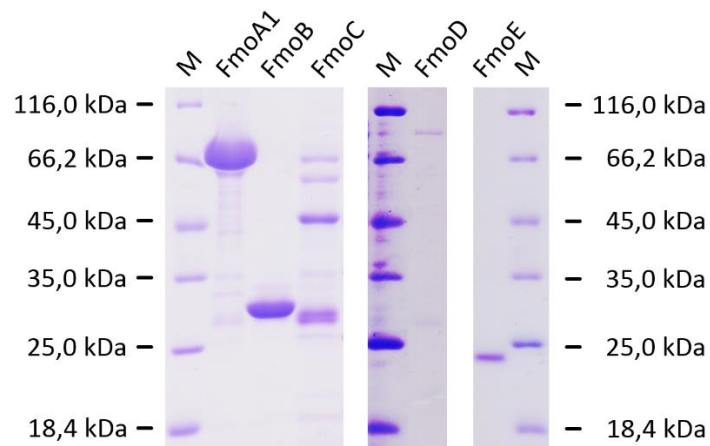
### 3.4.3 Untersuchung der Biosynthese von $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (56)

Die postulierte Biosynthese von **56** (Schema 14) sollte näher untersucht und die katalysierten Reaktionen der beteiligten Enzyme sowie deren zeitliche Abfolge nach Möglichkeit bestimmt werden.<sup>164</sup> Hierfür war es nötig *fmoA1BCDE* heterolog zu exprimieren und aufzureinigen. Die Proteine sollten dann in enzymatische Assays mit den vermuteten Substraten (**26** für die Halogenase *FmoD*, **26** oder **55** für das CYP450 *FmoC*) Verwendung finden.

Die einzelnen Gene *fmoA1BCDE* wurden mittels PCR aus der gDNA von *S. filipinensis* NRRL 3217 amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Klonierung in die Standardexpressionsvektoren pHis8 bzw. pHis8-TEV (Kapitel 3.1.7) sowie pGS-21a. Die Identität der so generierten Vektoren und eine mutationsfreie Klonierung wurden durch Testverdau und eine abschließende Sequenzierung garantiert. Für die heterologe Expression wurden sie in *E. coli* SoluBL21™ transformiert.

## Ergebnisse und Diskussion

Eine Testexpression der verschiedenen Konstrukte zeigte eine ausreichende Löslichkeit der Proteine unter Verwendung der Vektoren pHis8-TEV (*fmoA1*, *fmoC*, *fmoE*) bzw. pHis8 (*fmoB*). Lediglich die Löslichkeit von FmoD konnte durch das mittels pGS-21a angefügte GST-Tag verbessert werden (Daten nicht gezeigt). In der Folge wurde daher nur noch pGS-21a::*fmoD* für alle Expressionen verwendet. Die Produktion der fünf Proteine in größerem Maßstab erfolgte bei 16 °C über Nacht in TB-Medium. Im Falle von FmoE wurde während der logarithmischen Wachstumsphase vor Induktion mit IPTG 5 µg/L Riboflavin steril zugegeben. Eine Aufreinigung von FmoA1BCDE fand anschließend unter Standardbedingungen über Nickel-Affinitätschromatographie statt. FmoC wurde dabei zusätzlich mittels Häminchlorid rekonstituiert. Die resultierenden Proteinlösungen wurden mittels PD-10-Säulen entsalzt und über einen Konzentrator geeigneter Porengröße eingeeengt. Dies lieferte in der Folge farblose Konzentrate für FmoA1, FmoB und FmoD. Die Lösung von FmoC erschien, wie für ein Mitglied der CYP450-Familie erwartet, rot-bräunlich, die von FmoE war schwach gelblich gefärbt. Identität und Reinheit der rekombinanten Proteine wurden mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 57). Dies zeigte in allen Fällen Banden der erwarteten Größe (vgl. Tab. 52). FmoA1 und FmoC wiesen dabei noch einige Verunreinigungen auf, die eventuell durch weitere Optimierungen des Aufreinigungsprotokolls oder die Verwendung eines C-terminalen Affinitäts-Tags entfernt werden könnten. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mittels Nanophotometer bestimmt.

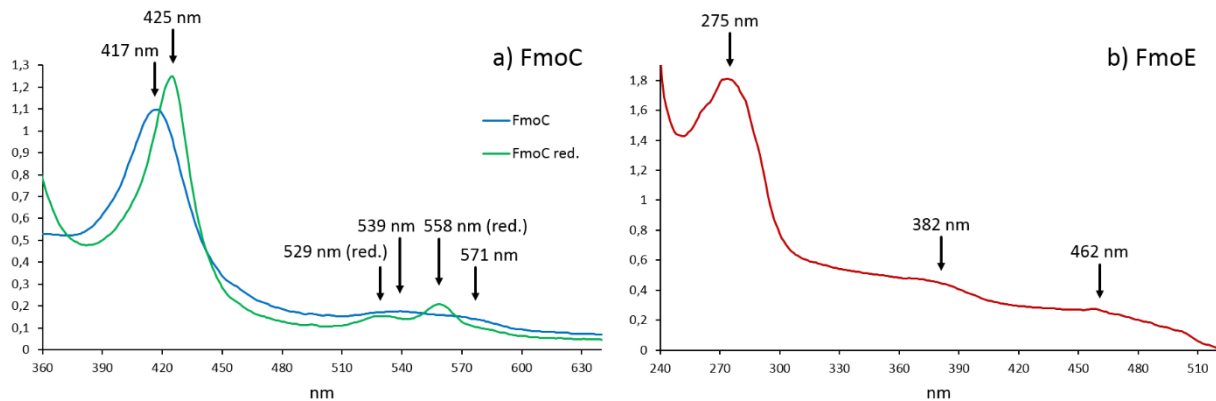


**Abb. 57.** SDS-PAGE (12%) der aufgereinigten, entsalzten und aufkonzentrierten Proteine FmoA1 (63,8 kDa), FmoB (28,6 kDa), FmoC (46,4 kDa), FmoD (90,2 kDa) und FmoE (21,8 kDa). M = ‚Unstained Protein MW Marker‘.

Weiterhin wurden FmoC und FmoE durch Aufzeichnung der UV/VIS-Spektren näher charakterisiert. Dies erfolgte mit unbehandelten Proteinen oder im Falle von FmoC nach chemischer Reduktion mit Natriumdithionit (Abb. 58). Das Spektrum der oxidierten Form von FmoC wies dabei eine Soret-Bande bei 417 nm und  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peaks bei 539 nm bzw. 571 nm auf (Abb. 58a). Eine Reduktion verschob das Maximum der Soret-Bande zu 425 nm und die Maxima von  $\beta$ - und  $\alpha$ -Peak zu 529 bzw. 558 nm. Diese

## Ergebnisse und Diskussion

charakteristische Veränderung zeigte, dass es sich bei FmoC um ein „Low spin“-Cytochrom P450-Enzym handelt.<sup>194-196</sup> Das Spektrum von FmoE hingegen besaß drei Maxima bei 275 nm, 382 nm und 462 nm (Abb. 58b), welche charakteristisch für Flavoproteine sind.<sup>299,300</sup> Dies entsprach der vorhergesagten Funktion als Flavinreduktase. Die geringe Intensität der beiden Peaks bei 382 nm und 462 nm zusammen mit der schwachen Färbung der aufkonzentrierten Proteinlösung ließ jedoch vermuten, dass ein gewisser Anteil von FmoE in Apoform vorlag.



**Abb. 58.** UV-Spektren des aufgereinigten Cytochrom P450-Enzyms FmoC (a) (70,6  $\mu$ M) in oxidierte Form und nach Reduktion mit Natriumdithionit (red.) sowie der Flavinreduktase FmoE (b) (50  $\mu$ M). Charakteristische Maxima innerhalb der Spektren wurden markiert (Details siehe Text).

Generell zeigten diese Untersuchungen, dass FmoC und FmoE zumindest anteilig mit aktivem Cofaktor in oxidierte Form aufgereinigt werden konnten.

### 3.4.3.1 Halogenierung von Tryptophan (26) mittels FmoD und FmoE

Die Fähigkeit der Halogenase FmoD Tryptophan (26) zu 6-Chlortryptophan (55) umzusetzen sollte, wie in Schema 15 dargestellt, untersucht werden. Neben FmoD fanden hierbei die Flavinreduktase FmoE aus dem JBIR-Gencluster von *S. filipinensis* NRRL 3217 und das Helferprotein Gdh (Kapitel 3.1.2) Verwendung.

Für die enzymatischen Assays wurden hierbei, wie bei Zehner *et al.* (2005),<sup>301</sup> zwei geringfügig unterschiedliche Assay-Ansätze gewählt. Während einer sich der überproduzierten und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteine bedient, werden im zweiten Ansatz lediglich die Überstände der entsprechenden Zellysate verwendet. Hierdurch sollte getestet werden, ob eine Verwendung des Lysats ausreichend oder sogar förderlich für eine mögliche Halogenierung wäre. Gründe hierfür könnten verbesserte Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Osmolarität) oder die

## Ergebnisse und Diskussion

zusätzliche Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten sein. Weiterhin würde es eine langwierigere Aufreinigung der Proteine ersparen, die im Falle von FmoD lediglich in sehr geringen Ausbeuten resultierte (durchschnittliche Ausbeute FmoD: 9,7 µM pro Liter TB-Medium).

Die Zusammensetzung der Assays mit den gereinigten Proteinen richtete sich nach vergleichbaren Untersuchungen mit anderen Halogenasen.<sup>301-303</sup> Ergänzt wurden sie durch das Gdh-System zur Regeneration des NADPH-Cofaktors (Kapitel 3.1.2). Die einzelnen Bestandteile (Tab. 9) wurden auf Eis in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) gemischt (1 mL-Maßstab) und die Reaktion durch Zugabe von FmoD gestartet. Eine Inkubation der Assays erfolgte über Nacht bei 30 °C (300 rpm), wobei der Zugang von Luftsauerstoff gewährleistet wurde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne FmoD-Zugabe. In der Folge wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 90 °C für 5 min gestoppt und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 16 °C) entfernt. Tryptophan (**26**) besitzt bei 90 °C für 5 min ausreichende Hitzestabilität.<sup>304</sup> Daher sollten **26** und/oder **55** nach Inaktivierung der Proteine im Überstand verbleiben.

**Tab. 9.** Bestandteile des enzymatischen Assays, um die potentielle Halogenierung von **26** zu untersuchen, unter Verwendung der aufgereinigten Proteine FmoD und FmoE.

<b>Funktion</b>	Halogenierung	Elektronendonorsystem			NADPH-Regeneration		Substrate	
<b>Komponente</b>	FmoD	FmoE	FAD	NADPH	Gdh	Glucose	Trp ( <b>26</b> )	NaCl
<b>Endkonzentration</b>	0,32 µM / 1,94 µM*	10 µM	100 µM	1 mM	10 µM	2 mM	80 µM	100 mM

\*: Die Konzentrationen des aufgereinigten Enzyms waren zu gering, um die gewünschte Endkonzentration von 5 - 20 µM zu erreichen. Daher wurden 200 µl des Proteinkonzentrats eingesetzt was in den dargestellten Konzentrationen resultierte.

Die Assays mit den Überständen der Zellysate von FmoD und FmoE folgten in ihrer Zusammensetzung weitestgehend den Reaktionsansätzen mit den aufgereinigten Proteinen (Tab. 10). Es wurde jedoch weniger FAD verwendet, da dieser Cofaktor in gewisser Menge auch in den Lysaten enthalten sein sollte. Die Menge an NADPH und Glucose für dessen Regeneration durch Gdh wurde hingegen verdoppelt, um einen möglichen Verbrauch durch *E. coli*-eigene Proteine zu kompensieren. Die einzelnen Komponenten wurden auf Eis in Phosphatpuffern (10 mM) mit drei unterschiedlichen pH-Werten (pH 6,0 / 6,6 / 7,2) gemischt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des FmoD-haltigen Überstands gestartet und bei 30 °C (300 rpm, ü. N.) inkubiert. Auch hier wurde der Zugang von Luftsauerstoff zu den Assays ermöglicht. Ein Reaktionsstopp und die Fällung der Proteine erfolgte analog zu den Assays mit den aufgereinigten Proteinen.

## Ergebnisse und Diskussion

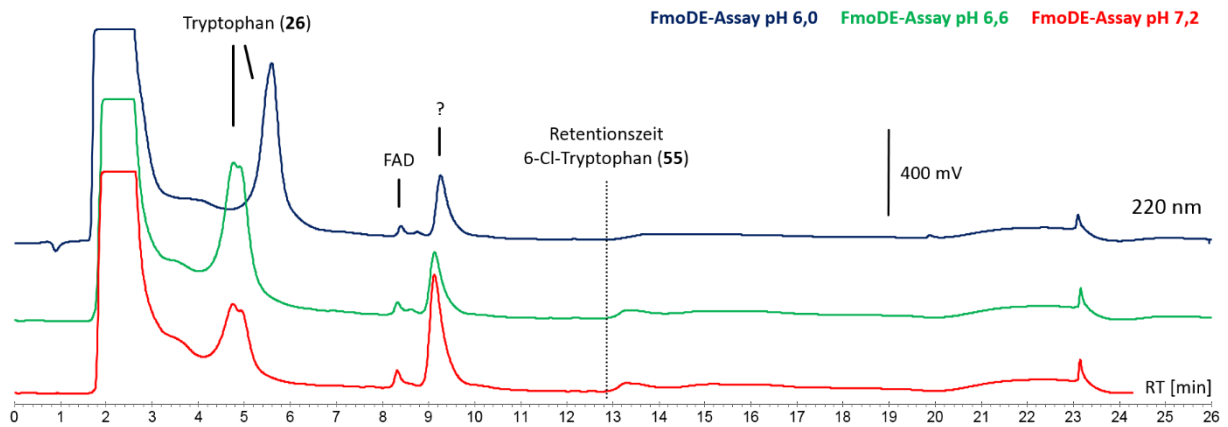
**Tab. 10.** Bestandteile des enzymatischen Assays, um die potentielle Halogenierung von **26** zu untersuchen, unter Verwendung der Überstände von Zelllysaten.

<b>Funktion</b>	Halogenierung	Elektronendonorsystem			NADPH-Regeneration		Substrate	
<b>Komponente</b>	FmoD	FmoE	FAD	NADPH	Gdh	Glucose	Trp ( <b>26</b> )	NaCl
<b>Endkonzentration</b>	50% (v/v)	15% (v/v)	10 $\mu$ M	2 mM	10 $\mu$ M	4 mM	0,6 mM	100 mM

Je 50  $\mu$ L der Überstände der inaktivierten Assays wurden mittels LC-MS analysiert. Dabei wurde im Fall der Assays mit aufgereinigten Proteinen eine ‚Eurosphere II 100-3 C18A‘-Säule (150 x 4,6 mm mit Vorsäule) verwendet (Programm: ‚Complestatin‘). Bei den Assays mit den Zelllysate-Überständen fand eine ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) Verwendung (Programm: ‚Tryptophan‘). Zusätzlich erfolgte in beiden Fällen die Analyse der einzelnen Assay-Bestandteile in den verwendeten Konzentrationen. Auf der ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule wurde weiterhin das potentielle Produkt **55** gemessen, welches von Frau Dr. Schaefers als Standard und für folgende Untersuchungen der Hydroxylierung durch FmoC synthetisiert wurde.<sup>205</sup> Die so bestimmten Retentionszeiten und Massenspektren sollten als Referenz für die Auswertung der Reaktionen dienen. Die daraus resultierenden UV/VIS-Spektren der Assays mit den aufgereinigten Proteinen zeigten keine Peaks die dem Substrat, dem Produkt oder anderen Assay-Komponenten zugeordnet werden konnten (Daten nicht dargestellt). Ein Grund hierfür war die geringe Retentionszeit der Bestandteile des Assays auf der verwendeten HPLC-Säule. Die Peaks fanden sich somit alle zu Beginn der Messung und überlagerten sich gegenseitig.

Die Resultate der Messungen der Assays mit den Überständen der Zelllysate bei einer Inkubation bei 30 °C sind in Abb. 59 zusammengefasst. In beiden Fällen waren die Messungen mit dem ‚Advion Expression CMS‘ jedoch nicht ausreichend, um Massen von **26** oder **55** zu detektieren. Dies lag vermutlich daran, dass die entsprechenden Moleküle nicht ausreichend ionisiert wurden. Die Retentionszeit betrug dabei 4 min 50 s im Fall von Tryptophan (**26**) bzw. 12 min 52 s für 6-Chlorotryptophan (**55**). Die spätere Retentionszeit von **55** im Vergleich zu **26** stimmt dabei mit der Erwartung aufgrund anderer Untersuchungen chlorierter Tryptophan-Derivate mittels einer HPLC-Säule mit reverser Phase überein.<sup>301,302</sup> Hierbei zeigte sich, dass in keinem der drei Reaktionsansätze ein neuer Peak bei der Retentionszeit des erwarteten Produkts 6-Chlorotryptophan (**55**) entstand. Jedoch war eine geringfügige Änderung der Intensität und Retentionszeit des Substratpeaks zu erkennen. Dies könnte auf eine Umsetzung von **26** schließen lassen. Ob dies in Zusammenhang mit der veränderten Intensität des Peaks bei 9 min 16 s (pH 6,0) bzw. 9 min 6 s (pH 6,6 / 7,2) steht, lässt sich dabei nicht feststellen. Dieser Peak ließ sich keiner der Referenzmessungen zuordnen.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 59.** Vergleich der UV/VIS-Spektren der drei Reaktionsansätze (pH 6,0 / 6,6 / 7,2) mit den Überständen der Zellysate von FmoDE.

Das Ausbleiben einer Umsetzung von Tryptophan (**26**) zu 6-Chlorotryptophan (**55**) könnte verschiedene Ursachen haben. So zeigten Untersuchungen von STTH, einer Tryptophan-6-Halogenase aus *Streptomyces toxytricini*, dass pH-Wert und Temperatur deutlichen Einfluss auf die Menge des umgesetzten Substrats haben.<sup>302</sup> Die Verwendung weiterer pH-Werte und Reaktionstemperaturen könnten somit zu einer detektierbaren Umsetzung von **26** zu **55** durch FmoDE führen.

Eine weitere Änderung, die für eine Halogenierungsreaktion förderlich sein könnte, ist der Austausch des Reduktionsäquivalents NADPH durch NADH. So wurde NADPH zwar bereits erfolgreich bei der Chlorierung eines linearen, PCP-gebundenen Vancomycin-Hexapeptids mittels der Flavinreduktase SsuE aus *E. coli* und der Halogenase VhaA aus *A. orientalis* verwendet.<sup>303</sup> Die Flavinreduktase RebF, welche an der Chlorierung von Rebeccamycin durch die Halogenase RebH beteiligt ist, war hingegen nicht in der Lage NADPH als Elektronendonator zu akzeptieren.<sup>305</sup>

Neben den angesprochenen Änderungen sollten die Assays mit aufgereinigtem FmoD und FmoE wiederholt werden. Geringfügige Änderungen der Analyse, wie die Verwendung einer C4-Säule sowie eines Massenspektrometers mit besserer Ionisation kleiner Moleküle, könnten dabei die Auswertbarkeit der Ergebnisse verbessern. Durch die Verwendung gereinigter Proteine könnte auch ein Einfluss von Faktoren der *E. coli*-Lysate auf den Ablauf der Reaktion ausgeschlossen werden. Hierzu müssten jedoch größere Mengen FmoD hergestellt werden, um die für die Assays gewünschten Konzentration zu erreichen.

### 3.4.3.2 Hydroxylierung von Tryptophan (**26**) und 6-Chlorotryptophan (**55**) mittels FmoA1BC

Die Untersuchung der Aktivität von FmoC wurde, wie in Schema 16 dargestellt, durchgeführt. Dafür wurden die Proteine FmoA1, FmoB und FmoC aus dem JBIR-Gencluster von *S. filipinensis* NRRL 3217,



## Ergebnisse und Diskussion

das AdR/Adx-Elektronentransfersystem (Kapitel 3.1.1.1) und die Helferproteine Sfp und Gdh (Kapitel 3.1.2) verwendet. Das vermutliche FmoC-Substrat 6-Chlortryptophan (**55**) wurde im Rahmen anderer Arbeiten synthetisiert.<sup>205</sup> Dabei musste beachtet werden, dass es sich aufgrund der Synthese von **55** um ein racemisches Gemisch handelte. Auch bei einer erfolgreichen Durchführung der Assays war somit keine vollständige Umsetzung zu erwarten, da Enzyme in der überwiegenden Mehrzahl regio- und stereoselektiv in Bezug auf ihr jeweiliges Substrat sind. Neben **55** sollte auch Tryptophan (**26**) in den Assays getestet werden, da die A-Domäne von FmoA1 bei Untersuchungen ihrer Selektivität auch für diese Aminosäure eine Affinität zeigte (ca. 50% der Aktivität im Vergleich zu **55**).<sup>164</sup> Sfp sollte dabei die PCP-Domäne von FmoA1 nach dem in Schema 1 dargestellten Mechanismus aktivieren. Die A-Domäne könnte dann **26** oder **55** unter ATP-Verbrauch laden und auf den Ppant-Arm übertragen. Eine vorangehende Aktivierung der potentiellen Substrate durch Anbindung von CoA, wie im Falle von Complestatin (**37**) (vgl. Kapitel 3.1.2 und 3.1.6), wäre somit nicht nötig. Eine Nutzung der Systeme für Elektronentransfer und NADPH-Regeneration erfolgte mit geringfügigen Änderungen analog zu den Untersuchungen zur Biarylkupplung (Kapitel 3.1.6 und Kapitel 3.3). Die verwendeten Konzentrationen der restlichen Assay-Bestandteile basierten auf vergleichbaren Untersuchungen zur Ikarugamycin-Biosynthese durch Greunke *et al.* (2017).<sup>188</sup> Alle Bestandteile wurden in einem 200  $\mu$ L-Maßstab in Tris-HCl-Puffer (75 mM, pH 7,5) zusammengefügt (Tab. 11). Neben Reaktionen mit **26** oder **55** unter Zugabe aller drei *S. filipinensis*-Proteine (FmoA1BC), wurden weitere Ansätze ohne Zugabe von FmoC oder FmoA1 hergestellt. Diese sollten als Negativkontrolle (FmoA1B) oder zum Test der Substratpräferenz von FmoC (FmoBC) dienen. Die Lösungen wurden auf Eis hergestellt und die Reaktion durch Zugabe von AdR gestartet. Eine Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C (800 rpm), wobei ein ständiger Gasaustausch zwischen den Reaktionslösungen und der Luft ermöglicht wurde.

**Tab. 11:** Bestandteile des enzymatischen Assays, um die potentielle Hydroxylierung von **26** oder **55** zu untersuchen.

<b>Proteine</b>							
<b>Funktion</b>	Aktivierung, Umsetzung und Freisetzung der Substrate				Elektronentransfer und NADPH-Regeneration		
<b>Komponente</b>	FmoA1	FmoB	FmoC	Sfp	AdR	Adx4-108	Gdh
<b>Endkonzentration</b>	40 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	10 $\mu$ M
<b>Weitere Assay-Komponenten</b>							
<b>Komponente</b>	Trp ( <b>26</b> ) oder 6-Cl-Trp ( <b>55</b> )		ATP	NADPH	CoA ( <b>17</b> )	MgCl <sub>2</sub>	Glucose
<b>Endkonzentration</b>	5 mM		15 mM	15 mM	2 mM	7,5 mM	30 mM

Nach der Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von MeOH im Verhältnis 1:1 (v/v) und intensives Vortexen gestoppt. Bereits vor Zugabe des Alkohols konnte beobachtet werden, dass ein Großteil der Proteine ausgefallen war. Die Entfernung aller unlöslichen Bestandteile erfolgte durch

## Ergebnisse und Diskussion

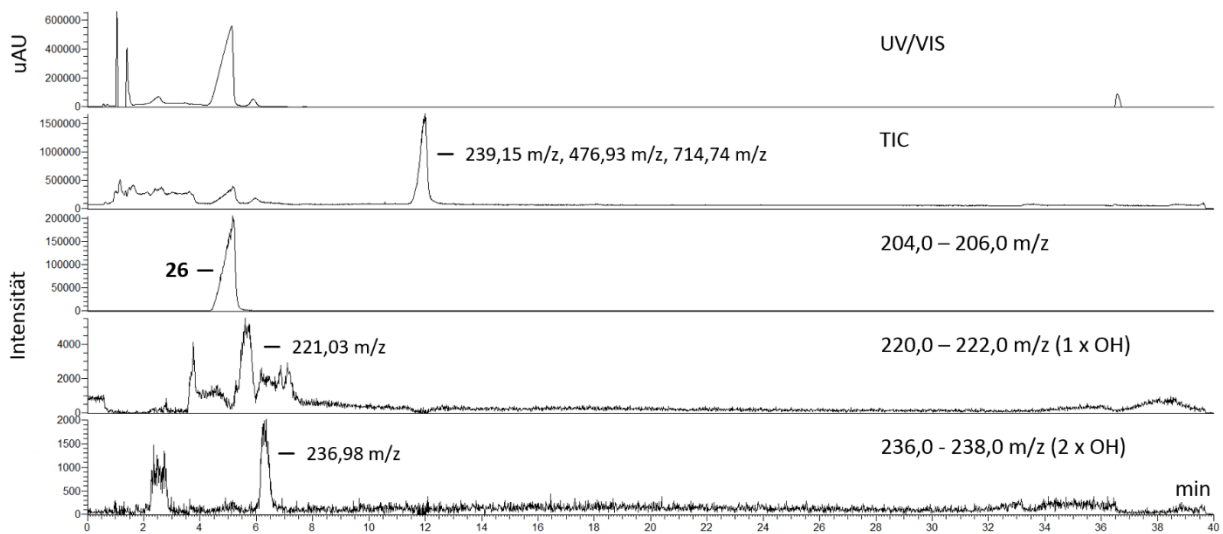
Zentrifugation (14.000 rpm, RT für 10 min) und anschließende Filtration. Ein Teil der Überstände wurde entnommen und ausgehend von der Substratkonzentration (5 mM) so mit MeOH verdünnt, dass die kombinierte Konzentration von **26** oder **55** und ihrer eventuellen Produkte 1,6 mM betrug. Von diesen Lösungen wurden 10 µL über LC-MS (Säule: ‚Synchronis™ Amino, 150 × 2,1 mm, 5 µm‘, Programm: ‚Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung‘) analysiert. Als Standards wurden zwei Proben der Substrate Tryptophan (**26**) und 6-Chlorotryptophan (**55**) (0,8 mM, 10 µL) unter identischen Bedingungen gemessen.

Eine nähere Betrachtung der Ansätze mit FmoA1BC (Abb. 60) zeigte dabei neben der Masse der Substrate **26** ( $m/z = 205,1$  [ $M+H^+$ ]) bzw. **55** ( $m/z = 239,06$  [ $M+H^+$ ]) auch die Massen potentiell einfach hydroxylierter (Hydroxytryptophan:  $m/z = 221,09$  [ $M+H^+$ ]; Hydroxy-6-Chlorotryptophan:  $m/z = 255,05$  [ $M+H^+$ ]) oder zweifach hydroxylierter Addukte (**67**:  $m/z = 237,09$  [ $M+H^+$ ]; **56**:  $m/z = 271,05$  [ $M+H^+$ ]) bei verschiedenen Retentionszeiten. Diese konnten jedoch auch unspezifisch in den Proben der anderen Ansätze (FmoBC, FmoA1B) mit den jeweiligen Substraten identifiziert werden. Ebenso zeigten sie sich im Falle von **55** in der Kontrollmessung des Substrats. In der Probe von **26** fand sich keine Masse die einer hydroxylierten Variante zugeordnet werden könnte. Natriumaddukte der Substrate oder potentieller Produkte waren nicht zu detektieren. In allen Assay-Ansätzen zeigte sich außerdem ein Peak mit den spezifischen Massen 239,15  $m/z$ , 476,93  $m/z$  und 714,74  $m/z$  bei einer Retentionszeit von 12 min. Dieser zeigte keine Absorption im UV/VIS-Spektrum und konnte keiner der eingesetzten Komponenten zugeordnet werden. Der Ursprung und die Identität des Peaks sind somit unbekannt.

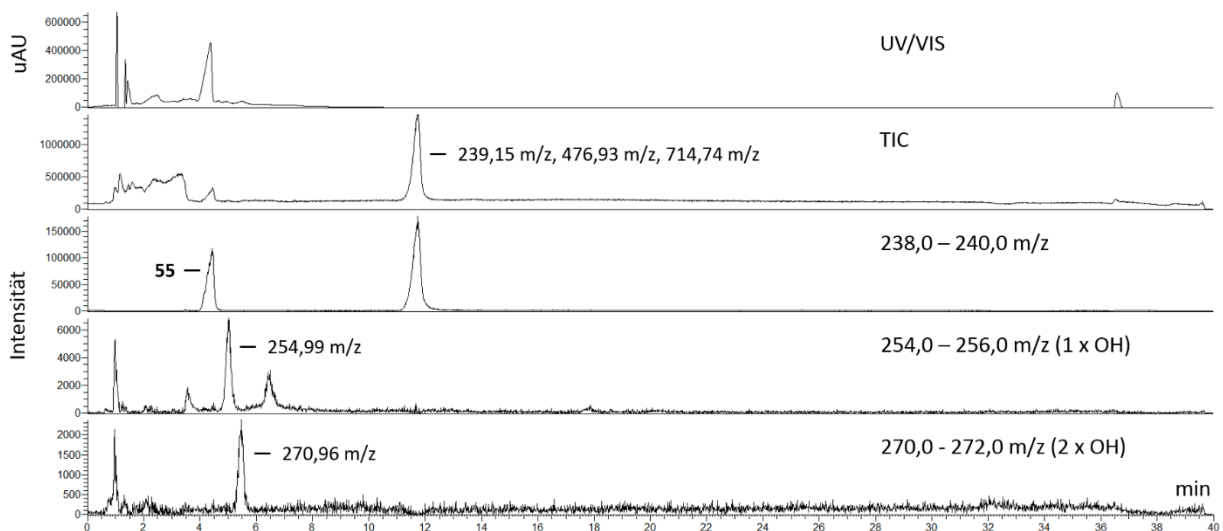
Generell deutet das Vorkommen potentieller Produktmassen in allen Reaktionsansätzen, auch den Negativkontrollen ohne FmoC-Zugabe, sowie der Substratlösung von **55** darauf hin, dass keine Hydroxylierungen stattgefunden haben. Das Ausbleiben einer FmoC-katalysierten Reaktion kann auch hier, wie im Falle der Reaktionen mit ComI und ComJ oder Cit-P450, verschiedene Ursachen haben. So deutet die Tatsache, dass nach der Inkubation der Hydroxylierungsreaktion scheinbar ein Großteil der Proteine ausgefallen war, auf eine unzureichende Reaktionsumgebung hin. Da keine regelmäßige optische Überprüfung der Reaktionsansätze im Laufe der Inkubation über Nacht durchgeführt wurde, kann nicht genau festgestellt werden, wann die Präzipitation stattfand. Aufgrund der anfänglichen Verwendung einer unaktivierten PCP-Domäne ist es möglich, dass die Umsetzung von **26** oder **55** zu Beginn langsam verläuft. Auch die geringere Affinität der FmoA1 A-Domäne zu Tryptophan (**26**) im Vergleich zu 6-Chlorotryptophan (**55**) muss hierbei in Betracht gezogen werden. Sollte es aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen zu einer frühzeitigen Inaktivität der entscheidenden Enzyme, wie FmoA1 oder FmoC, kommen, könnte dies zum Ausbleiben der erwarteten Reaktion führen.

## Ergebnisse und Diskussion

### a) FmoA1BC mit Trp (26)



### b) FmoA1BC mit 6-Cl-Trp (55)



**Abb. 60.** LC-MS-Chromatogramme (positiver Modus) der Assays von **a)** FmoA1BC mit Tryptophan (**26**) und **b)** FmoA1BC mit 6-Chlortryptophan (**55**). Neben den UV/VIS-Spektren und der Gesamtheit der gemessenen Massen (TIC) sind die Bereiche mit den erwarteten Massen der Substrate sowie der einfach oder zweifach hydroxylierten Produkte dargestellt.

Ebenso wurde noch nicht getestet, ob Sfp in der Lage ist, den Ppant-Arms von CoA (**17**) auf die PCP-Domäne von FmoA1 zu übertragen. Eine Aktivierung der NRPS ist jedoch essentiell für die geplante enzymatische Umsetzung. Ein entsprechender Nachweis könnte jedoch, wie im Falle der ComC- und ComD-PCP-Domänen oder der ComD-PCP+X-Domäne (Kapitel 3.1.4 und 3.1.5), durch *in vitro*-Assays zur Beladung und deren anschließende Analyse über Massenspektrometrie erfolgen. Auf ähnliche Art und Weise könnte die Übertragung von **26** und/oder **55** auf den Ppant-Arm der A-Domäne von FmoA1 untersucht werden. Hierbei wären der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der Übertragung unter den verwendeten Reaktionsbedingungen interessant, da dies eine Abschätzung von Reaktionsdauer und Ausbeute der Assays ermöglichen könnte.

## Ergebnisse und Diskussion

Auch eine Inaktivierung der Proteine des Elektronentransfersystems, oder die Unfähigkeit dieses Systems Elektronen an FmoC zu liefern, könnte eine Umsetzung von **26** oder **55** zu **67** bzw. **56** behindern. Eine weitere Überprüfung der Reduzierbarkeit durch das verwendete AdR/Adx-System mittels proteinbasierter Reduktion und anschließende CO-Bindung könnte dies als Fehlerquelle ausschließen.<sup>183,194</sup>

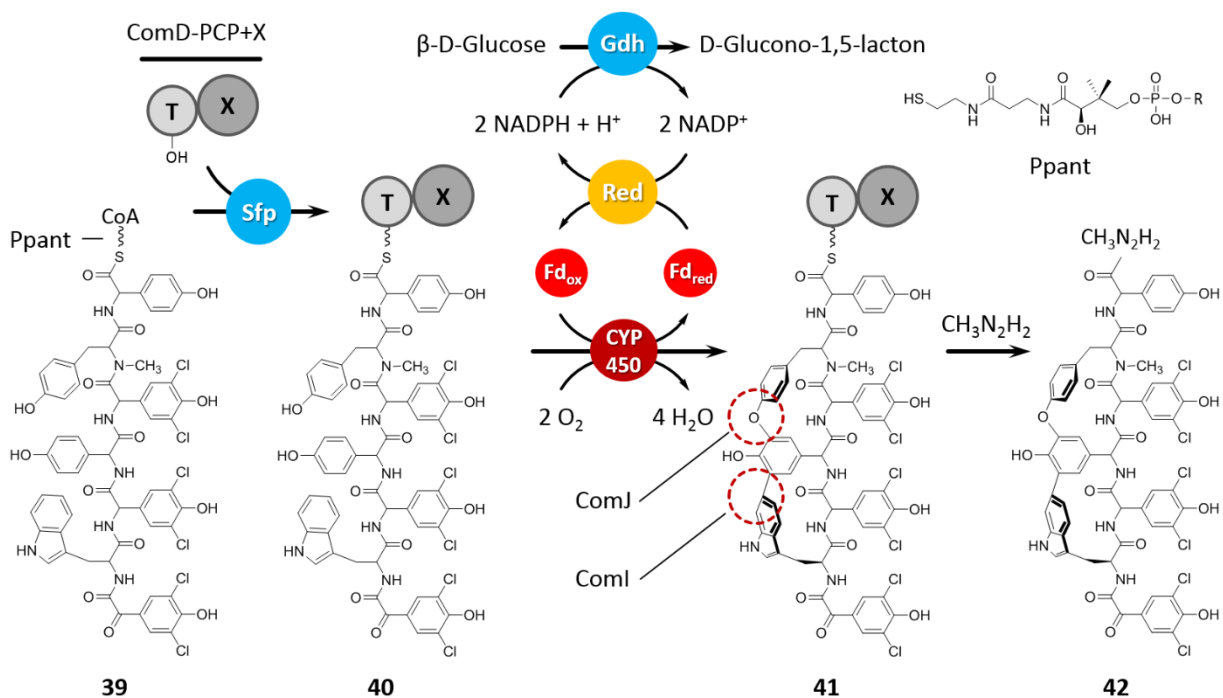
Weitere Versuche zur Aktivierung und Beladung von FmoA1 mit Tryptophan (**26**) oder 6-Chlorotryptophan (**55**), zur Elektronenübertragung auf FmoC sowie zur FmoA1BC-basierten Synthese von  $\beta$ ,4-Dihydroxy-Tryptophan (**67**) oder  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) mit anderen Puffersystemen konnten aus Zeitmangel im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Zusätzliche Untersuchungen zur Aktivität von FmoC und FmoD könnten durch Klonierung und heterologe Expression des gesamten DNA-Abschnitts mit den Genen *fmoA1BCDE* erfolgen. Hierbei müssten die jeweiligen Proteine nicht aufgereinigt werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob die fünf kodierten Proteine ausreichend sind, um den Aminosäurebaustein  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) zu bilden. Die Abfolge und Art der durch FmoC und FmoD eingebrachten Modifikationen könnte dabei über Deletionsexperimente ermittelt werden.

### 3.5 Zusammenfassung

Naturstoffe, wie nicht-ribosomale Peptide oder Polyketide, sind eine reichhaltige Quelle für die Entwicklung pharmazeutischer Substanzen mit Wirksamkeit gegen Krebszellen, Viren oder Bakterien sowie einer Vielzahl weiterer Funktionen. Die entsprechende Bioaktivität resultiert dabei aus spezifischen Interaktionen der häufig komplexen Strukturen mit ihren molekularen Targets. Gerade diese strukturelle Komplexität der Verbindungen erschwert jedoch oft deren chemische Totalsynthese im industriellen Maßstab. Die Verwendung bestimmter Enzyme der natürlichen Biosynthesewege als Ergänzung der chemischen Synthese kann jedoch helfen den Ablauf dieser Synthesen zu verbessern und somit Kosten und Zeitaufwand zu verringern. Ein interessantes Ziel für die Anwendung eines solchen chemo-enzymatischen Ansatzes sind dabei Moleküle mit Biaryl- und Biaryletherbindungen, da die chemische Installation dieser ungewöhnlichen Strukturelemente mit langen linearen Syntheserouten und niedrigen Ausbeuten einhergeht.

Das antivirale, nicht-ribosomale Peptid Complestatin (**37**) ist durch je eine Biaryl- und eine Biaryletherbindung gekennzeichnet. Diese werden durch die beiden Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450) ComI und ComJ eingebracht, welche im biosynthetischen Gencluster von Complestatin (**37**) kodiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein enzymatisches System etabliert werden, um ein lineares Derivat von **37** mittels von ComI und ComJ in die gekuppelte Form zu überführen (Schema 24).



**Schema 24.** Enzymatischen Assays zur Installation von Biaryl- und Biaryletherbindung an einem linearen, PCP-gebundenen Vorläuferpeptid von Complestatin (**40**) mittel der Cytochrom P450-Enzyme ComI und ComJ, modifiziert nach Aldemir (2015).

## Ergebnisse und Diskussion

Neben den CYP450s sollte hierfür ein Elektronentransfersystem bestehend aus NADPH, Ferredoxin und NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Fpr/PetF oder AdR/Adx) sowie Glucose und Glucose-Dehydrogenase zur Regeneration von NADPH verwendet werden. Ebenfalls wurden die PCP-Domänen benötigt, welche während der Complestatin-Biosynthese das lineare Tetra- (ComC-PCP1) oder Heptapeptid (ComD-PCP) tragen, als auch die Phosphopantetheinyltransferase Sfp zur Übertragung einer aktiven Coenzym A (CoA)-Form der linearen Complestatin-Peptide auf das entsprechende Trägerprotein. Weiterhin sollte ComK, ein im Complestatin-Gencluster kodiertes Ferredoxin, verfügbar gemacht werden, da es sich bei diesem mutmaßlich um den nativen Elektronendonator von ComI und ComJ handelt.

Alle oben genannten Proteine wurden kloniert und in löslicher Form überproduziert. Adx wurde in vollständiger Länge (Adx1-128) und kürzerer Form (Adx4-108), welche tendenziell ein niedrigeres Redoxpotential besitzt, generiert. Die Cofaktor-haltigen Proteine ComI, ComJ, Cit-P450, Fpr, PetF, AdR, Adx und ComK wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert. Dies zeigte, dass es sich bei ComI und ComJ um CYP450s des „Low spin“-Typs handelt. Die Spektren von ComI und ComJ konnte darüber hinaus in reduzierter Form und als CO-Komplex dokumentiert werden, was das Vorhandensein eines aktiven Zentrums mit funktionellem Häm-Cofaktor anzeigt. Ebenso wurde die Zugänglichkeit der aktiven Zentren von ComI und ComJ mittels Differenzspektroskopie bestätigt und näher bestimmt. Die Spektren von Fpr, PetF, AdR und Adx entsprachen den literaturbekannten Werten. Das Spektrum von ComK ließ, wie aufgrund von drei Cysteinen innerhalb der Aminosäuresequenz vermutet, auf ein Ferredoxin mit [3Fe-4S]-Cluster schließen. Die Funktion der Proteine des Elektronentransfersystems wurde mittels eines CytC-basierten Testsystems verifiziert. In allen Fällen, auch bei der Verwendung von ComK mit AdR, resultierte dies in einer erfolgreichen Elektronenübertragung. Lediglich bei Verwendung des Fpr/PetF-Systems war eine unspezifische Elektronenübertragung zu beobachten, die vermutlich auf eine Co-Aufreinigung von Fpr mit *E. coli*-eigenem Ferredoxin zurückgeht. Weiterhin wurde gezeigt, dass die PCP-Domänen ComC-PCP1 und ComD-PCP nach einer Aufreinigung in Apoform vorliegen, durch Inkubation mit CoA und Sfp jedoch in die aktive Holoform überführt werden können. Im Laufe dieser Arbeit zeigten Haslinger *et al.* (2015), dass im Falle verschiedener Glycopeptid-Antibiotika, wie Teicoplanin, eine X-Domäne für die erfolgreiche Installation der Biarylbindungen notwendig ist. Da auch die terminale NRPS der Complestatin-Biosynthese ComD eine solche Domäne besitzt, sollte das geplante enzymatische System um diese ergänzt werden. Hierfür wurden die alleinstehende Domäne ComD-X und die Didomäne die ComD-PCP+X als lösliche Proteine überproduziert. Auch ComD-PCP+X wurde dabei in Apoform aufgereinigt und durch die Verwendung von CoA und Sfp in die aktive Holoform überführt.

## Ergebnisse und Diskussion

ComD-PCP+X wurde anschließend mit einem linearen CoA-Derivat der Complestatinkette (**39**), welches rein chemisch durch Frau Dr. Aldemir synthetisiert wurde, beladen und das resultierende Konstrukt **40** als Substrat für die vollständigen Assay-Systeme (Glucose, Gdh, Fpr/PetF-System, ComI, ComJ) verwendet. Eine einfache oder zweifache Kupplung des linearen Peptids war dabei in der nachfolgenden Analyse leider noch nicht zu beobachten. Eine Verbesserung der Reaktionsbedingungen (Puffersubstanz, pH-Wert) und/oder die Verwendung eines anderen Elektronentransfersystems (AdR/Adx4-108 oder AdR/ComK) könnte dabei in zukünftigen Assays zu einer Umsetzung von **39** zum gekuppelten Produkt führen.

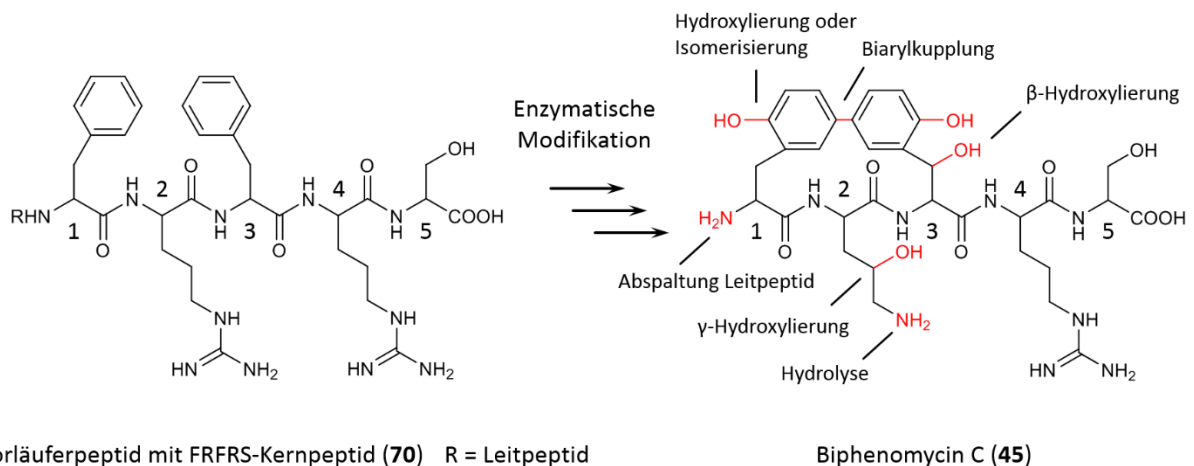
Um die an die an den Biarylkupplungen von Complestatin (**37**) beteiligten CYP450s ComI und ComJ weiter zu charakterisieren, sollten diese kristallisiert werden. Erste Untersuchungen mit einem ComJ-Derivat ohne die ersten 17 N-terminalen Aminosäuren (ComJ-m17AS) verliefen dabei erfolgversprechend. Die unter Verwendung der ‚PEGs Suite‘-Lösungen 70 und 76 erzeugten Kristalle von ComJ-m17AS besaßen jedoch keine ausreichende Qualität, weshalb weitere Feinscreenings nötig sind.

Das ribosomal synthetisierte, posttranslational modifizierte Peptid (RiPP) Cittilin A (**47**) besitzt, wie **37**, je eine Biaryl- und Biaryletherbindung. Bei der Installation beider Bindungen wird die Beteiligung eines als Cit-P450 bezeichneten Enzyms der CYP450-Familie vermutet, das in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gen des ribosomalen Vorläuferpeptids von **47** kodiert ist. Cit-P450 wurde in rekombinanter Form überproduziert und aufgereinigt. Dies lieferte ein CYP450 des „Low spin“-Typs, welches analog zu Complestatin (**37**) in enzymatischen Assays mit einem linearen Cittilin A-Kernpeptid (**48**) oder Cittilin A-Vorläuferpeptid (**49**) (beide nicht-methyliert) verwendet wurde. Aufgrund der ribosomalen Identität von Cittilin A (**47**) war eine vorhergehende Übertragung auf eine PCP-Domäne nicht nötig. Die Assays lieferten jedoch bislang weder Produkte mit einfacher oder zweifacher Kupplung von **48** oder **49**.

Zusammenfassend konnten in diesem Teilprojekt alle für die enzymatische Kupplung linearer Vorläuferpeptide von Complestatin (**37**) und Cittilin A (**47**) benötigten Proteine überproduziert, charakterisiert und in ihrer Funktionalität bestätigt werden. Die Assays zur Installation der Biaryl- und Biaryletherbindungen verliefen zwar erfolglos, jedoch konnte eine Reihe von Methodiken zur Vorbereitung und Analyse der Assays etabliert oder weiter verfeinert werden. Dies liefert eine hervorragende Ausgangsbasis für eine erfolgreiche enzymatischen Biarylkupplung der chemisch synthetisierten, linearen Vorläuferpeptide sowie die weitere Optimierung der jeweiligen Assays.

## Ergebnisse und Diskussion

Bei Biphenomycin A, B und C (**43** - **45**) und dem eng verwandten LL-AF283 $\beta$  (**46**) handelt es sich um weitere biarylhaltige Naturstoffe, welche die sogenannte Biphenomycin-Familie bilden. Sie werden durch *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708 bzw. *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217 produziert und besitzen antibiotische Wirksamkeit. Die Biosynthese dieser Substanzen ist bisher unbekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Basierend auf den Strukturen von **43** - **46** wurde die Beteiligung einer oder mehrerer NRPS und eines CYP450 zur Installation der Biarylbindung vermutet. Nach Sequenzierung der Genome beider Stämme konnte jedoch kein entsprechender Biosyntheseweg identifiziert werden. Es fand sich jedoch ein Gen, welches für das kurze Peptid BipA (41 AS) mit der C-terminalen Sequenz FRFRS kodiert, die den Peptidsequenzen von **43** - **46** ähnelt. BipA könnte dabei einen RiPP-Vorläufer darstellen dessen Kernpeptid FRFRS durch eine Reihe umfangreicher Modifikationen erst zum gemeinsamen Vorläufer Biphenomycin C (**45**) (Schema 25) und später zu **43**, **44** oder **46** umgewandelt wird. In der Nähe von *bipA* waren sieben weitere Gene (*bipB* - *bipI*) konserviert. Laut Sequenzhomologie-basierter Vorhersagen kodieren diese für einen Transporter (*bipB*), ein Arginase-ähnliches Protein (*bipC*), ein Radikal-SAM-Enzym (*bipD*), zwei DNA-bindende Proteine (*bipE*, *bipF*), eine Arginin-Hydroxylase (*bipG*) und zwei Proteasen (*bipH*, *bipI*). Neben *bipA*, welches das potentielle Vorläuferpeptid mit der FRFRS-Kernsequenz kodiert, ließen auch die beiden Arginin-modifizierenden Enzyme (BipC, BipG) vermuten, dass es sich hierbei tatsächlich um das Biphenomycin-Cluster handelt. Diese könnten den Argininrest an Position 2 des Kernpeptids zu Ornithin hydrolysieren (BipC) und an  $\gamma$ -Position hydroxylieren (BipG). Beide Modifikationen sind in **43** - **46** zu finden.



**Schema 25.** Übersicht der enzymatischen Modifikationen, die ein RiPP mit dem Kernpeptid FRFRS (**70**) in Biphenomycin C (**45**) umwandeln könnten.

BipC könnte aufgrund einer potentiellen Peptidcyclasedomäne am C-Terminus weiterhin an einer Cyclisierung des Kernpeptids beteiligt sein. Dies könnte unter Beteiligung einer Protease (z. B. BipH) zur Eliminierung von Arginin und Serin an Position 4 bzw. 5 des Kernpeptids (bei **43** - **44**) oder zur



Generierung einer mir Arginin verzweigten Ornithin-Seitenkette an Position 2 (bei **46**) genutzt werden. Ein CYP450 zur Katalyse der Biarylbindung war weder im Cluster noch seiner näheren Umgebung kodiert. Aufgrund der radikalischen Natur einer CYP450-katalysierten Biarylverknüpfung könnte eine solche Funktion jedoch eventuell vom Radikal-SAM-Enzym BipD übernommen werden. Dies würde einen komplett neuartigen Reaktionstyp eines Radikal-SAM-Enzyms darstellen.

Vergleichende Datenbankanalysen zeigten zudem vier weitere *bipA*-Homologe in den Organismen *B. mycoides* BHP, *B. cereus* ISP 3191, *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 und *T. daqus* H-18. Diese sind Bestandteil potentiell homologer *bip*-Gencluster, welche für die Biosynthese von **43** - **46** oder entsprechender Analoga kodieren. Die Tatsache, dass ein *bipA*-Homolog nur in einer geringen Zahl anderer Organismen zu identifizieren war, von denen keiner der Gattung *Streptomyces* angehörte, unterstrich dabei die Spezifität unseres Fundes.

Eine erste heterologe Expression der oben beschriebenen *bip*-Cluster aus *S. griseorubiginosus* und *S. filipinensis* in *E. coli* BL21(DE3) lieferte im Falle des *S. filipinensis* *bip*-Genclusters zwei spezifische Massen (positiver Modus:  $m/z = 671,2$ ; negativer Modus:  $m/z = 576,6$ ). Diese könnten ein durch BipC erzeugtes, cyclisches Intermediat (**74**) oder ein daraus resultierendes Tripeptid, welches mit Arginin verzweigt ist (**75**) repräsentieren

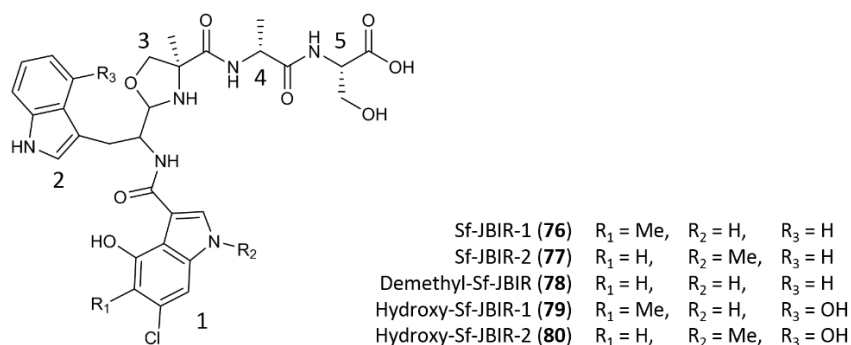
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Biosynthese von **43** - **46** aus *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217 nicht, wie zuvor vermutet, NRPS-basiert ist. Vielmehr deuten die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate auf eine RiPP-Identität hin. Das beschriebene *bip*-Cluster könnte dabei ein ribosomales Vorläuferpeptid (BipA) sowie eine Reihe von Enzymen kodieren, welche für eine Modifikation der proteinogenen Aminosäuren und der Struktur des Kernpeptids nötig wären (BipC, BipD, BipG). Die vorläufigen Ergebnisse einer heterologen Expression der *bip*-Cluster beider Stämme scheinen dies zu bestätigen.

Während der Analyse des Genoms von *S. filipinensis* NRRL 3217 wurde auch ein Gencluster entdeckt, welches homolog zum Gencluster der schwachen Radikalfänger JBIR-34 und -35 (**52** und **53**) aus *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 ist. Die nicht-ribosomalen Peptide **52** und **53** sind gekennzeichnet durch einen ungewöhnlichen 4-Methyloxazolinring, der aus der Startereinheit 6-Chloro-4-Hydroxyindol-3-Carboxysäure (**54**) und  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) gebildet wird. Die Biosynthese von **54** verläuft dabei mutmaßlich ausgehend von L-Tryptophan (**26**) über einen unabhängigen, NRPS-basierten Biosyntheseweg an dem unter anderem die im Cluster kodierte Halogenase FmoD und das CYP450 FmoC beteiligt sind. FmoD soll dabei **26** zu 6-Chlorotryptophan (**55**) umwandeln, während FmoC mutmaßlich die Installation von zwei Hydroxygruppen katalysiert, wodurch aus **55**  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) gebildet wird. Das JBIR-Cluster aus *S. filipinensis* (Sf-JBIR)

## Ergebnisse und Diskussion

wurde über bioinformatische Methoden näher charakterisiert und zeigte dabei drei Unterschiede zum Originalcluster. Diese bestanden im Verlust des potentiellen Regulators FmoR3, der Insertion eines potentiellen Zwei-Komponenten-Systems (FmoN und FmoO) und einer Genfusion zwischen *fmoA3* und *fmoH*. Gerade die letzte Änderung ist von Bedeutung, da dies FmoH, welches die Bildung von  $\alpha$ -Methyl-L-Serin (**57**) aus D-Alanin (**58**) katalysiert, von einem unabhängigen Enzym zu einem neuartigen Typ von NRPS-Domäne macht. Es wird vermutet, dass seine Funktion durch diesen Vorgang nicht beeinflusst wird. Die genauen Implikationen für die JBIR-Biosynthese und den Zeitpunkt der Bildung von **57** sind jedoch noch unbekannt und müssen durch zukünftige Arbeiten näher bestimmt werden.

Um zu überprüfen, ob *S. filipinensis* NRRL 3217 ebenfalls **52** und **53** oder Derivate hiervon produziert, wurde Kulturen dieses Stamms mittels EtOAc oder Ionenaustauschharz (Diaion® HP-20) extrahiert. Dies lieferte statt der für **52** oder **53** erwarteten Massen drei Substanzen mit den Massen 641,3 m/z, 655,4 m/z und 671,4 m/z, welche, wie **52** und **53**, stark bei 300 nm absorbieren. Hierbei könnte es sich um Sf-JBIR-1 oder -2 (655,4 m/z; **76** und **77**) handeln, ein Derivat von **53** (m/z = 466,1 [M+H<sup>+</sup>]) mit einem zusätzlichen Tryptophanrest, bzw. um Demethyl-Sf-JBIR (641,3 m/z; **78**) sowie Hydroxy-Sf-JBIR-1 oder -2 (671,4 m/z; **79** und **80**). Die Biosynthese würde dabei über eine multiple Verwendung der NRPS FmoA1 erfolgen (Abb. 61). Diese ist normalerweise an der Bildung von **54** beteiligt wofür sie 6-Chlortryptophan (**55**) lädt, zeigt jedoch auch eine gewisse Spezifität für Tryptophan (**26**). Daher könnte sie auch für die Integration des Tryptophanbausteins an Position 2 der Sf-JBIR-Moleküle verantwortlich sein.



**Abb. 61.** Mögliche Produkte der JBIR-Biosynthese in *S. filipinensis* NRRL 3217 unter multipler Verwendung der NRPS FmoA1.

Weiterhin sollte durch enzymatische Assays getestet werden, ob FmoD und vor allem FmoC die jeweils postulierten Reaktionen während der Biosynthese von  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlortryptophan (**56**) katalysieren. Hierfür wurden die Proteine FmoDE, die an der Halogenierung beteiligt sind, und FmoA1BC, die für die zweifache Hydroxylierung notwendig sind, kloniert und in löslicher Form überproduziert. Die Cofaktor-haltigen Proteine FmoE und FmoC wurden über UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert. Dies zeigte charakteristische Spektren für die Flavinreduktase FmoE und für das

## Ergebnisse und Diskussion

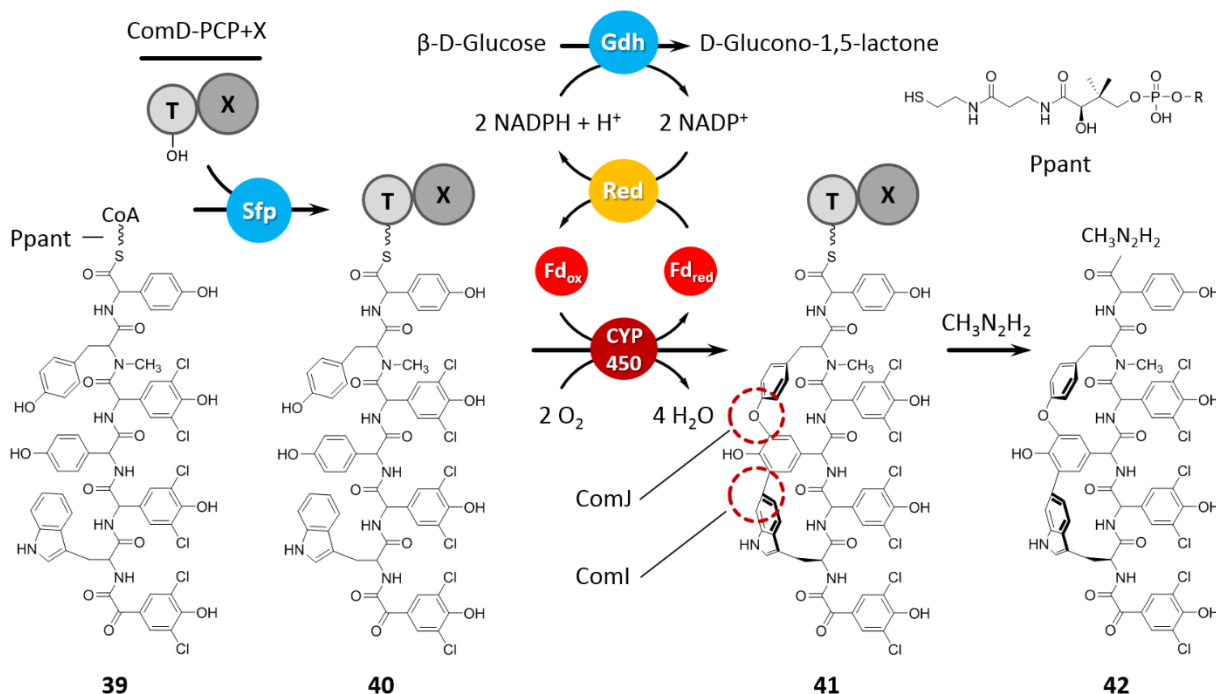
CYP450 FmoC („Low spin“-Typ). Enzymatische Assays mit aufgereinigtem FmoD und FmoE sowie mit Überständen der Zellysate von Kulturen zur Überexpression beider Proteine zeigten keine Umsetzung Substrats L-Tryptophan (**26**) zu 6-Chlorotryptophan (**55**). Auch die Verwendung von FmoA1BC in einem Assay mit ähnlichem Aufbau, wie für die Untersuchung der Biarylkupplung von Complestatin (**37**), lieferte keine hydroxylierten Produkte bei Einsatz von Tryptophan (**26**) oder des durch Frau Dr. Schaefers synthetisierten 6-Chlorotryptophan (**55**) als Substrat.

Die Identifizierung eines neuartigen Typs von NRPS-Domäne und potentieller JBIR-Derivate, welche vermutlich durch die nicht-lineare Verwendung einer NRPS generiert werden, erweitern das Verständnis NRPS-basierter Biosynthesen. Sie bilden auch die Grundlage weiterer Untersuchungen der JBIR-Biosynthese durch *S. filipinensis* NRRL 3217 und der strukturellen Aufklärung der mutmaßlichen JBIR-Derivate. Auch wenn die enzymatischen Assays mit den Proteinen FmoA1BCDE ohne die gewünschten Resultate verliefen, bildet die erfolgreiche Überproduktion dieser Proteine eine gute Grundlage für eine weitere Optimierung dieser Systeme. Damit wird die Basis für eine zukünftige, detaillierte Untersuchung der Biosynthese von  $\beta$ ,4-Dihydroxy-6-Chlorotryptophan (**56**) ermöglicht.

### 3.6 Abstract

Natural products, such as non-ribosomal peptides and polyketides, are a rich source for the development of pharmaceutical substances with activity against cancer cells, viruses, bacteria as well as a multitude of additional functionalities. The respective bioactivities result from specific interactions of these often complex structures with their molecular targets. However, the structural complexity of the compounds often hinders their chemical total synthesis at the industrial scale. The use of certain enzymes from the natural biosynthetic pathways can help to supplement and improve chemical synthesis yields, thereby reducing costs and increasing efficiency. An interesting target for this type of chemo-enzymatic approach are molecules containing biaryl and biaryl ether bonds, as the chemical installation of this unusual structural element is accompanied by long linear synthetic routes and low yields.

The antiviral non-ribosomal peptide complestatin (**37**) is characterized by one biaryl and one biaryl ether bond. Those are introduced by the two cytochrome P450 enzymes (CYP450) ComI and ComJ, which are encoded in the biosynthetic gene cluster of complestatin (**37**). During the course of this work we attempted to establish an enzymatic system to convert a linear derivative of **37** to its cross-coupled form by usage of ComI and ComJ (Scheme 1).



**Scheme 1.** Enzymatic assay for the installation of biaryl and biaryl ether bonds on a linear, PCP bound precursor peptide of complestatin (**40**) by the cytochrome P450 enzymes ComI and ComJ, modified from Aldemir (2015).

## Ergebnisse und Diskussion

Beside the two CYP450s, an electron transfer system consisting of NADPH, ferredoxin and a NADPH-ferredoxin-oxidoreductase (Fpr/PetF or AdR/Adx) as well as glucose and a glucose dehydrogenase for NADPH regeneration needs to be used. In addition, the PCP domains carrying the linear tetra- (ComC-PCP1) or heptapeptide (ComD-PCP) during complestatin biosynthesis were needed. Also, the phosphopantetheinyl transferase Sfp was employed to transfer an active coenzyme A (CoA) form of the linear complestatin peptides to the corresponding carrier protein. Finally, we wanted to make the ferredoxin ComK available, which is encoded in the complestatin gene cluster and is the putative native electron donor for ComI and ComJ.

All proteins were cloned and overproduced in a soluble form. Adx was generated in a full length (Adx1-128) and a shortened form (Adx4-108), which possesses a lower redox potential. The cofactor containing proteins ComI, ComJ, Cit-P450, Fpr, PetF, AdR, Adx and ComK were characterized by UV/VIS spectroscopy. This indicated that ComI and ComJ belong to the 'low spin' type of CYP450s. In addition, the spectra of ComI and ComJ were detected in their reduced forms and as CO complexes. This confirmed the presence of a functional active center with a functional heme cofactor. Also, the accessibility of the active centers was determined and confirmed by difference spectroscopy. The spectra of Fpr, PetF, AdR und Adx matched previously reported data. ComK contains three cysteine residues, which might be involved in the binding of a [3Fe-4S] cluster. The detected spectrum seems to confirm this assumption. The function of the proteins representing the electron transfer system were confirmed using a CytC-based test system. In all cases, also when using ComK together with AdR, a successful electron transfer was observed. Only the Fpr/PetF system showed unspecific electron transfer, which might result from co-purification of Fpr with *E. coli* ferredoxin. It was shown that the PCP domains ComC-PCP1 and ComD-PCP were purified in apo form. Incubation with CoA and Sfp transferred them into their respective holo form. During the time of this work Haslinger *et al.* (2015) showed that a so called X domain is involved in the formation of biaryl and biaryl ether bonds of glycopeptide antibiotics like teicoplanin. As such a domain is also present in ComD, the terminal NRPS of the complestatin assembly line, our enzymatic system was complemented with this domain. Therefore, a single domain (ComD-X) and a didomain (ComD-PCP+X) were overproduced in soluble form. Expression of the didomain resulted in apo protein, which was converted to its holo form by incubation with CoA and Sfp.

Biochemical assays of ComD-PCP+X were loaded with a linear CoA-derivative of the complestatin chain (**39**) that was chemically synthesized by Dr. Hülya Aldemir. The resulting construct **40** was then used as substrate in the complete assay system (Glucose, Gdh, Fpr/PetF system, ComI, ComJ). A single or double biaryl coupling of the linear peptide was not yet visible in the following analysis. Further optimization of the reaction conditions (buffer substance, pH value) and/or the application of another

electron transfer system (AdR/Adx4-108 or AdR/ComK) might lead to conversion of **39** to a cross-coupled product in the future.

For an additional characterization of the two CYP450s, ComI and ComJ, involved in biaryl coupling of complestatin (**37**), these proteins were to be crystallized. First attempts with a ComJ-derivative lacking the first 17 *N*-terminal amino acids (ComJ-m17AA) were promising, as they resulted in crystals when using the ‚PEGs Suite‘ solutions 70 and 76. Because of the rather low quality of these crystals further fine screenings are necessary.

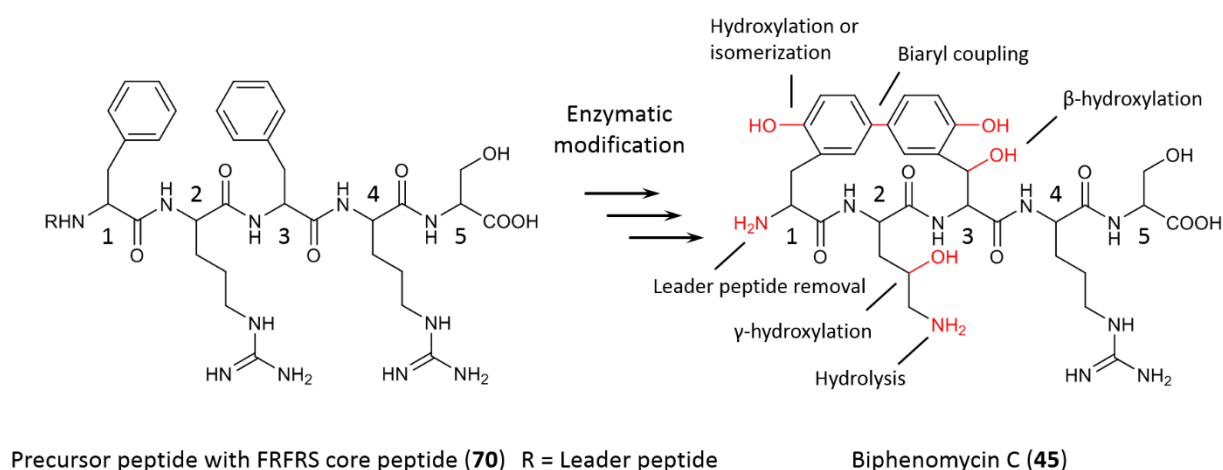
The ribosomally synthesized, post-translational modified peptide (RiPP) cittilin A (**47**), possesses one biaryl and one biaryl ether bond like **37**. It is assumed that installation of these bonds is catalyzed by Cit-P450, a member of the CYP450 family of enzymes, which is encoded in near vicinity to the gene encoding the precursor peptide of **47**. Cit-P450 was overproduced and purified in recombinant form. This resulted in a CYP450 of the ‘low spin’ type, which was used in enzymatic assays performed in analogy of those for complestatin (**37**). The substrates were a linear cittilin A core peptide (**48**) or a cittilin A precursor peptide (**49**) (both non-methylated). Because of the ribosomal identity of cittilin A (**47**) the transfer to a PCP domain was not necessary. The assays did not yet result in a single or double cross-coupled product of **48** or **49**.

In summary of this subproject, all proteins necessary for the enzymatic biaryl-coupling of linear precursor peptides of complestatin (**37**) and cittilin A (**47**) were successfully overproduced, characterized and their functionality was confirmed. Although the assays for the installation of the biaryl and biaryl ether moieties did not result in the desired products, a series of methods for the assay preparation and analysis was established and refined. This provides an excellent platform for the successful enzymatic biaryl-coupling of the chemically synthesized, linear precursor peptides, as well as for further optimizations of the assay itself.

Biphenomycin A, B and C (**43** - **45**) as well as the closely related LL-AF283 $\beta$  (**46**) are biaryl-containing natural products that comprise the biphenomycin family. They are produced by *Streptomyces griseorubiginosus* No. 43708 and *Streptomyces filipinensis* NRRL 3217, respectively and possess antibiotic activity. The biosyntheses of these molecules are currently unknown and were investigated during this work. Based on the structures of **43** - **46**, the involvement of one or more NRPS and a CYP450 for the installation of the biaryl bond were hypothesized. After sequencing the genomes of both strains a candidate NRPS pathway could not be identified. Instead, a gene encoding the short peptide BipA (41 AA) with the *C*-terminal sequence FRFRS matching the **43** - **46** peptide sequence was

## Ergebnisse und Diskussion

found. BipA might represent a RiPP precursor whose core peptide FRFRS undergoes a series of extensive modifications to be transformed to the common precursor Biphenomycin C (**45**) (Scheme 2) and later to **43**, **44** or **46**. Seven conserved genes (*bipB* - *bipI*) were identified adjacent to *bipA*. According to sequence homology based predictions they encode for a transporter (*bipB*), an arginase-like protein (*bipC*), a radical SAM enzyme (*bipD*), two DNA-binding proteins (*bipE*, *bipF*), an arginine hydroxylase (*bipG*) and two proteases (*bipH*, *bipI*). Besides *bipA*, encoding a potential precursor peptide with the FRFRS core sequence, the presence of two arginine modifying enzymes (BipC, BipG) further supported our hypothesis that these genes represent the biphenomycin cluster. BipC could hydrolyze the arginine residue at position 2 of the core peptide generating ornithine whereas BipG catalyzes its hydroxylation at the  $\gamma$ -position. Both modifications can be found in **43** - **46**.



**Scheme 2.** Overview of the enzymatic modifications, which could transform a RiPP with the core peptide FRFRS (**70**) to Biphenomycin C (**45**).

Because of a peptide cyclase domain at its C-terminus, BipC might additionally be involved in cyclizing the core peptide. A protease induced hydrolysis of the cycle (e. g. by BipH) then might lead to the elimination of arginine and serine at position 4 and 5 of the core peptide (for **43** - **44**) or to the formation of an ornithine residue branched with arginine at position 2 (for **46**).

A CYP450 catalyzing the biaryl bond formation is neither encoded in the cluster nor in its close vicinity. As the CYP450 induced biaryl bridging is of radical nature, such a function might be taken over by the radical SAM enzyme BipD. This would represent a completely new type of reaction for a radical SAM enzyme.

Comparative databank analysis showed four additional *bipA* homologues in the organisms *B. mycooides* BHP, *B. cereus* ISP 3191, *Pleurocapsa* sp. PCC 7319 and *T. daqus* H-18. These genes are part of putative homologues *bip* gene clusters responsible for biosynthesis of **43** - **46** or corresponding analogues. The

fact that only a small number of *bipA* homologues were found in other organisms, none of which belonged to the *Streptomyces* genus, highlights the specificity of our findings.

First heterologous expressions of the aforementioned *bip* clusters from *S. griseorubiginosus* and *S. filipinensis* in *E. coli* BL21(DE3) resulted in two specific masses with the *S. filipinensis bip* cluster (positive mode:  $m/z = 671.2$ ; negative mode:  $m/z = 576.6$ ). These might represent a cyclic intermediate (**74**) generated by BipC and arginine-branched tripeptide (**75**) derived from this.

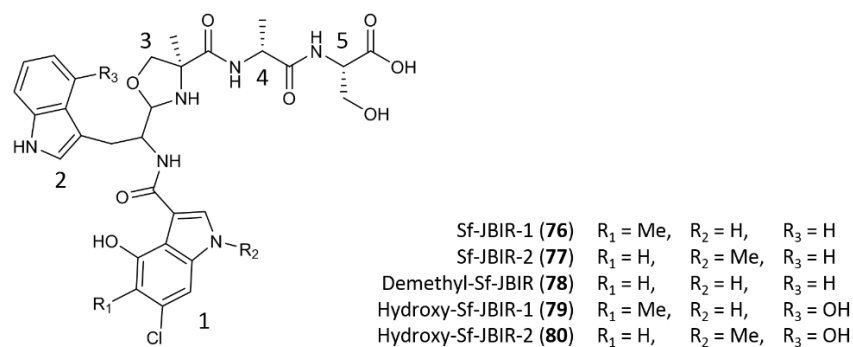
In summary, the biosynthesis of **43** - **46** from *S. griseorubiginosus* No. 43708 and *S. filipinensis* NRRL 3217 is likely not NRPS-based as previously hypothesized. The results obtained during this work rather suggest a RiPP identity. In this context, the described *bip* cluster could encode a ribosomal precursor peptide (BipA) as well as enzymes necessary for the modification of the proteinogenic amino acids as well as the core peptide structure (BipC, BipD, BipG). Preliminary results from the heterologous expression of both gene clusters appear to confirm this theory.

The analysis of the *S. filipinensis* NRRL 3217 genome also yielded a gene cluster homologous to the weak radical scavengers JBIR-34 and -35 (**52** and **53**) from *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. The non-ribosomal peptides **52** and **53** are characterized by an unusual 4-methyloxazoline moiety. This is formed by the starter unit 6-chloro-4-hydroxyindole-3-carboxylic acid (**54**) and  $\alpha$ -methyl-L-serine (**57**). It is postulated that **54** originates from L-tryptophan (**26**) by an independent NRPS-based biosynthesis involving the halogenase FmoD and the CYP450 FmoC of the JBIR-cluster. FmoD is thought to catalyze the conversion of **26** to 6-chlorotryptophan (**55**) whereas FmoC might hydroxylate **55** at two positions, thereby forming  $\beta$ ,4-dihydroxy-6-chlorotryptophan (**56**). The JBIR gene cluster from *S. filipinensis* (Sf-JBIR) was further characterized by bioinformatic analysis. This showed differences at three positions in comparison to the original gene cluster: the potential regulator FmoR3 was missing, a potential two-component-system (FmoN and FmoO) was inserted, the genes *fmoA3* and *fmoH* were fused. The last change is significant since it turns FmoH, responsible for the formation of  $\alpha$ -methyl-L-serine (**57**) from D-alanine (**58**), from an independent enzyme into a new type of NRPS domain. It is proposed that its function is not altered by this process. However, possible implications for the JBIR biosynthesis as well as the moment of **57** formation are currently unknown and need to be clarified in future work.

To test if *S. filipinensis* NRRL 3217 produces **52** and **53** or derivatives thereof, cultures of this strain were extracted by EtOAc and ion exchange resin (Diaion® HP-20). Analysis of the extracts showed that **52** and **53** could not be detected. Instead, three specific substances with the masses 641.3  $m/z$ , 655.4  $m/z$  und 671.4  $m/z$  were found. Those showed strong absorption maxima at 300 nm, which has been reported for **52** and **53**. These substances could represent Sf-JBIR-1 or -2 (655,4  $m/z$ ; **76** and **77**), a derivative of **53** ( $m/z = 466,1 [M+H^+]$ ) with an additional tryptophan residue, demethyl-Sf-JBIR (641,3  $m/z$ ; **78**) and hydroxy-Sf-JBIR-1 or -2 (671,4  $m/z$ ; **79** and **80**) respectively (Figure 1). Biosynthesis of



these compounds would occur by multiple use of the NRPS FmoA1. FmoA1 is supposedly involved in the formation of **54** by loading 6-chlorotryptophan (**55**), but also shows a certain specificity for tryptophan (**26**). Therefore, it could also be responsible for the incorporation of the tryptophan residue at position 2 of the Sf-JBIR molecules.



**Figure 1.** Possible products of JBIR biosynthesis in *S. filipinensis* NRRL 3217 by multiple usage of the NRPS FmoA1.

In addition, the reactions proposed to be catalyzed by FmoD and FmoC during the biosynthesis of  $\beta$ ,4-dihydroxy-6-chlorotryptophan (**56**) should be verified by enzymatic assays. To achieve this goal, the proteins FmoDE, involved in the halogenation, and FmoA1BC, performing the two hydroxylations, were cloned and overproduced in soluble form. The cofactor containing proteins FmoE and FmoC were characterized by UV/VIS spectroscopy. This showed typical spectra for the flavin reductase FmoE and the CYP450 FmoC ('low spin' type). Enzymatic assays with purified FmoD and FmoE as well as with cell lysate supernatant from expression cultures of both proteins did not show a turnover of L-tryptophan (**26**) to 6-chlorotryptophan (**55**). Also, an assay similar to the one used for the biaryl-coupling of complestatin (**37**) with FmoA1BC did not yield hydroxylated products when using tryptophan (**26**) or 6-chlorotryptophan (**55**), which was synthesized by Dr. Françoise Schaefer, as substrates.

A new type of NRPS domain as well as potential JBIR derivatives formed by a non-linear NRPS assembly line, which were identified during this subproject, expand our understanding of NRPS-based biosynthesis. They also form a good basis for further investigations of the JBIR biosynthesis in *S. filipinensis* NRRL 3217 and the structural elucidation of the potential JBIR derivatives formed thereby. Even with the negative outcome of the enzymatic assays, the successful overproduction of the corresponding proteins is a good starting point for further optimizations of this systems. This will allow detailed analysis of  $\beta$ ,4-dihydroxy-6-chlorotryptophan (**56**) biosynthesis in the near future.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Chemikalien, Geräte, Materialien und Software**

#### **4.1.1 Chemikalien, Gase und Lösungsmittel**

Chemikalien: Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, VWR, Sigma Aldrich, Fisher Scientific, AppliChem oder bezogen und hatten, sofern es sich nicht um die Bestandteile von Komplexmedien handelte, mindestens einen p.a. Reinheitsgrad.

Gase: Die verwendeten Gase stammen von den Firmen Praxair oder Westfalen.

Lösungsmittel: Als Lösungsmittel für die HPLC- und MS-Untersuchungen wurden HPLC-grade und HPLC-MS-grade Acetonitril von Fisher Scientific Deutschland und VWR sowie HPLC-grade Methanol von VWR verwendet. Das HPLC-Wasser wurde über ein TKA-GenPure-Wasseraufbereitungssystem gereinigt und entionisiert. Als Puffer wurde Trifluoressigsäure (TFA, für Peptidsynthese) der Fa. Carl Roth benutzt. Weitere Lösungsmittel, wie Methanol, Ethylacetat oder Aceton, wurden über die Zentrale Chemikalienversorgung der TU München oder der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn bezogen und bei Bedarf über Destillation gereinigt.

#### **4.1.2 Enzyme und Proteine**

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Proteine oder enzymatischen Reaktionsmixturen wurden standardmäßig von den Firmen New England Biolabs GmbH (NEB) und/oder Jena Bioscience bezogen.

#### **4.1.3 Kits**

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits, z. B. für die Aufreinigung von Plasmid-DNA oder genomischer DNA, wurden sofern nicht anders erwähnt von den Firmen Promega, Jena Bioscience oder Peqlab bezogen.

### **4.1.4 Verwendete Apparaturen und Messgeräte**

Autoklav: Zum Sterilisieren von Medien und Verbrauchsmitteln wurden der ‚Autoklav V65‘ der Fa. Systec (Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) oder der ‚Autoklav 3170 ELV‘ der Fa. Biomedis (Technische Universität München) verwendet.

Elektrophorese: Die elektrische Spannung für die Gelelektrophorese wurde mithilfe eines ‚Electrophoresis Power Supply EV243‘ der Fa. Consort angelegt. Die SDS-PAGE wurde in Bio-Rad ‚Mini Protean® Tetra System‘ Gelkammern durchgeführt.

Elektroporator: Ein ‚MicroPulser‘ der Fa. Bio-Rad wurde für die Elektroporation von elektrokompetenten Zellen verwendet.

FPLC: Zur Aufreinigung von Proteinen mittels FPLC wurde ein ‚ÄKTA pure 25 M1‘-FPLC-System (Fa. GE Healthcare) mit ‚HiLoad 16/600 Superdex 200 pg‘-Säule (Fa. GE Healthcare) und 5 mL „Loop“ verwendet.

Gefriertrocknung: Produkte in wässrigen Phasen wurden mit dem Gerät ‚Alpha 2-4‘ von Christ, das an eine ‚Chemistry-Hybrid-Pump-RC6‘-Pumpe von Vacuubrand angeschlossen war, getrocknet.

Geldokumentation: Für die Dokumentation von Agarosegelen wurde das ‚Bio-Imaging-System Gene Genius‘ von SynGene benutzt. Das Gerät wurde über die ‚GeneSnap‘-Software derselben Firma gesteuert. SDS-Polyacrylamidgele wurden mittels eines handelsüblichen Flachbettscanners, der an einen PC (Windows 7) angeschlossen war, dokumentiert.

Heizblock / Wasserbad: Zur Erwärmung von kleinen Probenmengen wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, der ‚ThermoMixer C‘ von Eppendorf oder das Wasserbad ‚FBH 604‘ von Fischerbrand verwendet.

Inkubationsschüttler: Es wurden die Inkubationsschüttler ‚Multitron Standard‘ und ‚Ecotron‘ der Fa. Infors HT verwendet.

Kernresonanzspektroskopie (NMR): An der Technischen Universität München (TUM) wurden die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren bei Raumtemperatur an einem ‚AVHD 500‘ (500 MHz) der Fa. Bruker gemessen.

Kristallisationsroboter: Zum Aliquotieren von Proteinen in Mikrotiterplatten des Typs INTELLI („96 well sitting drop vapor diffusion crystallography plates“, Fa. Art Robbins Instruments) wurde ein ‚Phoenix Robot System‘ der Fa. Art Robbins Instruments benutzt.

## Material und Methoden

Massenspektroskopie (MS): Die Massenspektren, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gemessen wurden, wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie unter der Leitung von Frau Dr. Engeser aufgenommen. Die Aufnahme der Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESIMS) und der High-Resolution-Massenspektren (HRMS) erfolgte an einem Time-of-Flight-Massenspektrometer („micrOTOF-Q“, Bruker Daltonics). Für die Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) wurde das Sektorfeld-Massenspektrometer „MAT 95 XL“ der Fa. Thermo Finnigan mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV verwendet. An der Technischen Universität München wurden die ESI-MS entweder an einem „Advion Expression CMS“-Gerät mit „Single-quadrupole mass analyzer“, das zusammen mit einem „Peak Scientific N118LA“-Stickstoffgenerator, einer „Edwards RV12“-Hochvakuumpumpe, einem „Camag TLC-MS“-Interface und einer „Jasco PU-1580 Intelligent“-HPLC-Pumpe betrieben wurde, oder an einem „LCQ Fleet Ion Trap“-Massenspektrometer gekoppelt an ein „UltiMate 3000 HPLC“-System (beides von Thermo Scientific) aufgenommen. Das Letztere wurde mittels „Xcalibur“-Software gesteuert und die Ergebnisse der Messungen wurden mittels „Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48“-Software ausgewertet. Das Advion-MS-System wurde mithilfe der „Mass Express“-Software gesteuert und die Auswertungen wurden mittels „Data Express“-Software (beides von Advion) durchgeführt. Die Aufnahme von hochauflösenden ESI-MS erfolgte an dem Massenspektrometer „Thermo LTQ FT Ultra“. Die Massenspektrometer der HR-ESI-MS wurden ebenfalls mittels „Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48“-Software ausgewertet.

Mikroskopie: Zur Analyse der Kristallisationsansätze wurde ein „SZX10“-Mikroskop der Fa. Olympus verwendet.

Photometer: Zur Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm wurde ein Photometer der Fa. Eppendorf benutzt.

PCR: Die Amplifikation von DNA erfolgte entweder mittels „Life Eco-PCR“-Geräten der Fa. Bioer oder an einem „TC-5000-PCR“-Gerät der Fa. Techne.

Protein- und DNA-Konzentrationsbestimmung: Protein- und DNA-Konzentrationen wurden mithilfe des „Nanophotometer P330“ von Implen bestimmt.

Zellaufschluss: Bakterienzellen wurden mit einem Ultraschallhomogenisator „Sonopuls HD2070“ von Bandelin aufgeschlossen.

Zentrifugation: Es wurden die Zentrifugen „Heraeus Multifuge X3R Centrifuge“ der Fa. Thermo Scientific, „24/6“ der Fa. VWR und „Centrifuge 5418R“ der Fa. Eppendorf verwendet.

## Material und Methoden

### 4.1.5 Software

#### Eigenständige Programme

<u>Software</u>	<u>Version</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verwendungszweck</u>
Geneious	5.6.7 (64-bit) & 8.1.8 (64-bit)	Biomatters Ltd.	Analyse von DNA und AS-Sequenzen
Microsoft® Excel	Home and Student 2010	Microsoft®	Datenverarbeitung
Microsoft® Word	Home and Student 2010	Microsoft®	Datenverarbeitung
PVC	5.11.1.3	Implen	Aufzeichnung von Daten gemessen über das Implen Nanophotometer P330
Unicorn	6.4.1	GE Healthcare	Steuerung der ‚ÄKTA pure 25 M1‘
Data Express	3.1.21.1	Advion	Auswertung von MS-Spektren
Xcalibur™ Qual Browser	2.2 SP1.48	Thermo Fisher Scientific	Auswertung von MS-Spektren

#### Internet-basierte Anwendungen

<u>Software</u>	<u>Webseite</u>	<u>Stand</u>	<u>Verwendungszweck</u>
antiSMASH 3.0	<a href="http://antismash.secondarymetabolites.org/">http://antismash.secondarymetabolites.org/</a>	15.02.2017	Cluster-Vorhersage
Clustal Omega	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>	09.03.2017	Sequenz-Alignment
ExPASy Translate tool	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>	21.04.2017	Übersetzung DNA/RNA zu AS
InterPro	<a href="https://www.ebi.ac.uk/interpro/">https://www.ebi.ac.uk/interpro/</a>	31.05.2017	Proteinsequenzanalyse
GOR IV	<a href="https://prabi.ibcp.fr/htm/site/web/home">https://prabi.ibcp.fr/htm/site/web/home</a>	09.03.2017	Sekundärstruktur-Vorhersage
NCBI BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	18.02.2014	Sequenzanalyse
NCBI PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>	18.02.2014	Literaturrecherche
NEBuilder	<a href="http://nebuilder.neb.com/">http://nebuilder.neb.com/</a>	v.1.12.16	Primerkonstruktion
PKS/NRPS Analysis	<a href="http://nrps.igs.umaryland.edu/">http://nrps.igs.umaryland.edu/</a>	14.02.2017	Proteinsequenzanalyse
PrDOS	<a href="http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi">http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi</a>	10.07.2014	Vorhersage unstrukturierter Proteinbereiche
Protein Calculator	<a href="http://protcalc.sourceforge.net/">http://protcalc.sourceforge.net/</a>	v.3.4	Proteineigenschaften
RAST	<a href="http://rast.nmpdr.org/">http://rast.nmpdr.org/</a>	15.02.2017	CDS-Vorhersage und -Annotierung

## 4.2 Organismen, Plasmide und Primer

### 4.2.1 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tab. 12 zusammengefassten Organismen und Stämme verwendet. *E. coli* DH5 $\alpha$  diente dabei zur Klonierung und Lagerung von Plasmiden/Vektoren. *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* SoluBL21™ wurden zur heterologen Proteinproduktion verwendet. Der Stamm *E. coli* BAP1 diente der heterologen Produktion von PCP-Domänen. Der Stamm *E. coli* EPI300™ enthielt

## Material und Methoden

Fosmide der gDNA-Bibliothek von *S. filipinensis* NRRL 3217. Die gDNA der Stämme *S. griseorubiginosus* DSMZ 40469, *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217 diente als PCR-Templat oder bei Bedarf zur Sequenzierung des jeweiligen Genoms.

**Tab. 12.** Verwendete Organismen und Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), $\lambda$ <sup>-</sup>	Laborstock
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) (DE3)	Laborstock / Studier und Moffatt, 1986. <sup>306</sup>
<i>E. coli</i> BAP1	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) (DE3) $\Delta$ <i>prpRBCD</i> ::T7 <sub>prom</sub> - <i>sfp</i> -T7 <sub>prom</sub> - <i>prpE</i>	Pfeifer <i>et al.</i> , 2001. <sup>201</sup>
<i>E. coli</i> SoluBL21™	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) (DE3);  Der Stamm trägt außerdem uncharakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektions-kriterien erzeugt wurden. Diese Mutationen ermöglichen es in den meisten Fällen unlösliche Proteine in teilweise oder vollständig löslicher Form zu produzieren.	Fa. Genlantis  (Bestellnr.: C700200 / C700210)
<i>E. coli</i> EPI300™	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL nupG trfA dhfr</i>	Fa. Epicentre
<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSMZ 40469	Wildtyp	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> No. 43708	Wildtyp	International Patent Organism Depository des ‚National Institute of Advanced Industrial Science and Technology‘ (AIST), Japan; Zugangs-ID: FERM BP-669
<i>Streptomyces filipinensis</i> NRRL 3217	Wildtyp	‚Agricultural Research Service‘ des ‚United States Department of Agriculture‘, USA; Zugangs-ID: NRRL 3217

### 4.2.2 Plasmide und Vektoren

Die folgenden Plasmide und Vektoren fanden im Rahmen dieser Arbeit Verwendung (Tab. 13). Sie wurden kommerziell erworben, von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt oder im Laufe der Arbeit generiert.

**Tab. 13.** Verwendete Plasmide und Vektoren (Resistenzgene: *ampR* = Ampicillin, *kanR* = Kanamycin, *camR* = Chloramphenicol, *tetR* = Tetracyclin).

Plasmid / Vektor	Größe [bp]	Eigenschaften / Funktion	Herkunft / Referenz
pUC57:: <i>comD-PCP+X-opt</i>	4.357	<i>comD-PCP+X-opt</i> (Codon-optimiert) integriert in pUC57	Fa. GenScript
pUC57:: <i>comI-opt</i>	3.918	<i>comI-opt</i> (Codon-optimiert) integriert in pUC57	Fa. GenScript
pUC57:: <i>comJ-opt</i>	3.996	<i>comJ-opt</i> (Codon-optimiert) integriert in pUC57	Fa. GenScript

## Material und Methoden

pBluescript II SK (-)	2.961	<i>ampR</i> , pMB1-Replikationsursprung / Klonierungsvektor	Agilent Technologies
pBluescript:: <i>comC-PCP1+60bp</i>	3.168	Kodierende Region der ersten ComC-PCP-Domäne und zusätzliche Basen integriert in pBluescript II SK (-)	Diese Arbeit
pBluescript:: <i>comC-PCP2+78bp</i>	3.186	Kodierende Region der zweiten ComC-PCP-Domäne und zusätzliche Basen integriert in pBluescript II SK (-)	Diese Arbeit
pBluescript:: <i>comC-PCP3+78bp</i>	3.186	Kodierende Region der dritten ComC-PCP-Domäne und zusätzliche Basen integriert in pBluescript II SK (-)	Diese Arbeit
pBluescript:: <i>comD-PCP+96bp</i>	3.207	Kodierende Region der ComD-PCP-Domäne und zusätzliche Basen integriert in pBluescript II SK (-)	Diese Arbeit
pBluescript::Sf-JBIR-6_8kb-Frag	11.188	8 kb Fragment des Inserts von pCC1FOS::JBIR-6 ( <i>fmoK</i> -Teil [761 bp], <i>fmoA5</i> , <i>fmoL</i> , Teil des TK-Gens [593 bp]) integriert in pBluescript II SK (-) (Gibson-Assemblierung)	Diese Arbeit
pHis8	5.333	<i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , His8-Tag (N-terminal) & His6-Tag (C-terminal), Thrombin-Schnittstelle / Expressionsvektor (T7)	Jez <i>et al.</i> , 2000. <sup>203</sup>
pHis8-TEV	5.330	<i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , His8-Tag (N-terminal) & His6-Tag (C-terminal), TEV-Protease-Schnittstelle / Expressionsvektor (T7)	Diese Arbeit
pHis8C(+)-TEV	5.323	<i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , Codon-optimiertes His8-Tag (C-terminal), TEV-Protease-Schnittstelle / Expressionsvektor (T7)	Diese Arbeit
pHis8:: <i>adR</i>	6.713	<i>adR</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>adx1-128</i>	5.686	<i>adx1-128</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>adx4-108</i>	5.617	<i>adx4-108</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>cit-P450</i>	6.652	<i>cit-P450</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comC-PCP1</i>	5.539	<i>comC-PCP1</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comC-PCP2</i>	5.539	<i>comC-PCP2</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comC-PCP3</i>	5.539	<i>comC-PCP3</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comD-PCP</i>	5.542	<i>comD-PCP</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comD-PCP+X-opt</i>	6.949	<i>comD-PCP+X-opt</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comD-X-opt</i>	6.709	<i>comD-X-opt</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comI-opt</i>	6.502	<i>comI-opt</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comJ-opt</i>	6.586	<i>comJ-opt</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>comI-opt</i>	6.499	<i>comI-opt</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>comJ-opt-m17AS</i>	6.532	<i>comJ-opt-m17AS</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>kis-P450-1</i>	6.472	<i>kis-P450-1</i> integriert in pHis8-TEV	Frau Kalina Kusserow, AK Prof. T.A.M. Gulder
pHis8-TEV:: <i>kis-P450-2</i>	6.646	<i>kis-P450-2</i> integriert in pHis8-TEV	Frau Kalina Kusserow, AK Prof. T.A.M. Gulder
pHis8-TEV:: <i>fmoA1</i>	7.084	<i>fmoA1</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit
pHis8:: <i>fmoB</i>	6.040	<i>fmoB</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>fmoC</i>	6.493	<i>fmoC</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>fmoD</i>	6.931	<i>fmoD</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit
pHis8-TEV:: <i>fmoE</i>	5.851	<i>fmoE</i> integriert in pHis8-TEV	Diese Arbeit

## Material und Methoden

pHis8C(+)-TEV:: <i>fpr-mT</i>	6.031	<i>fpr</i> mit Stopcodon integriert in pHis8C(+)-TEV	Diese Arbeit
pHis8C(+)-TEV:: <i>comI-opt-mT</i>	6.493	<i>comI-opt</i> mit Stopcodon integriert in pHis8C(+)-TEV	Diese Arbeit
pHis8C(+)-TEV:: <i>comJ-opt-mT</i>	6.577	<i>comJ-opt</i> mit Stopcodon integriert in pHis8C(+)-TEV	Diese Arbeit
pHis8C(+)-TEV:: <i>kis-P450-1</i>	6.466	<i>kis-P450-1</i> mit Stopcodon integriert in pHis8C(+)-TEV	Diese Arbeit
pHis8C(+)-TEV:: <i>kis-P450-2</i>	6.640	<i>kis-P450-2</i> mit Stopcodon integriert in pHis8C(+)-TEV	Diese Arbeit
pHis8:: <i>fpr</i>	6.046	<i>fpr</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>gdh-BM3</i>	6.085	<i>gdh-BM3</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>comK</i>	5.518	<i>comK</i> integriert in pHis8	Diese Arbeit
pHis8:: <i>petF</i>	5.614	<i>petF</i> integriert in pHis8	Schaefers, 2011. <sup>176</sup>
pRKISC	18.291	<i>tetR</i> , <i>oriV</i> -Replikationsursprung, <i>isc</i> -Gencluster / Co-Expressionsvektor für Proteine mit FeS-Clustern	Nakamura <i>et al.</i> , 1999. <sup>177</sup>
LICRED	6.371	<i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , His6-Tag (N-terminal), LIC-Sequenz, RED-Domäne / Expressionsvektor (T7)	Sabbadin <i>et al.</i> , 2010. <sup>190</sup>
LICRED:: <i>cit-P450</i>	7.718	<i>cit-P450</i> integriert in LICRED	Diese Arbeit
LICRED:: <i>comI-opt</i>	7.559	<i>comI-opt</i> integriert in LICRED	Diese Arbeit
LICRED:: <i>comJ-opt</i>	7.637	<i>comJ-opt</i> integriert in LICRED	Diese Arbeit
pGS-21a	6.169	<i>ampR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , His6-Tag (N-terminal und C-terminal), GST-Tag (N-terminal) / Expressionsvektor (T7)	Fa. GenScript (Bestellnr.: SD0121)
pGS-21a:: <i>cit-P450</i>	7.489	<i>cit-P450</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>cit-P450-RED</i>	8.497	<i>cit-P450-RED</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>comI-opt-RED</i>	8.338	<i>comI-opt-RED</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>comJ-opt-RED</i>	8.416	<i>comJ-opt-RED</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>fmoA1</i>	7.924	<i>fmoA1</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>fmoB</i>	6.877	<i>fmoB</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>fmoC</i>	7.333	<i>fmoC</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>fmoD</i>	7.771	<i>fmoD</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pGS-21a:: <i>fmoE</i>	6.691	<i>fmoE</i> integriert in pGS-21a	Diese Arbeit
pBAR1607	6.388	<i>ampR</i> , pMB1-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , <i>adr</i>	Sagara <i>et al.</i> , 1993. <sup>173</sup>
pKKAdx	2.930	<i>ampR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>adx1-128</i>	Uhlmann <i>et al.</i> , 1992. <sup>172</sup>
pCC1FOS	8.139	<i>camR</i> , <i>ori2</i> , <i>oriV</i> , <i>parABC</i> , <i>cos</i> , <i>loxP</i> , <i>redF</i> / Klonierungsvektor für die Erzeugung von Fosmid-Bibliotheken mit kontrollierbarer Kopienzahl	Fa. Epicentre
pCC1FOS::Sf-JBIR-1 bis -7	Variabel	Teilstücke des Sf-JBIR-Genclusters integriert in pCC1Fos (Fosmide der <i>S. filipinensis</i> NRRL 3217 gDNA-Bibliothek)	Seel, 2012. <sup>171</sup> / Diese Arbeit
pET-28b-SUMO	5.650	<i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , <i>rop</i> , His6-Tag (N-terminal und C-terminal), SUMO-Tag (N-terminal) / Expressionsvektor (T7)	AK Prof. T.A.M. Gulder
pET-28b-SUMO::S.fil- <i>bip</i> -Cluster	17.606	Potentiell <i>bip</i> -Gencluster aus <i>S. filipinensis</i> NRRL 3217 integriert in pET-28b-SUMO	Diese Arbeit
pET-28b-SUMO::S.gri- <i>bip</i> -Cluster	16.336	Potentiell <i>bip</i> -Gencluster aus <i>S. griseorubiginosus</i> No. 43708 integriert in pET-28b-SUMO	Diese Arbeit



## Material und Methoden

pET-29a(+):: <i>sfp</i>	5.910	<i>sfp</i> integriert in pET-29a(+) ( <i>kanR</i> , pBR322-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , His6-Tag [C-terminal] / Expressionsvektor [T7])	AK Prof. T.A.M. Gulder
pACYCDuet-1:: <i>gdh-BM3</i>	4.435	<i>gdh-BM3</i> integriert in pACYC-Duet-1 ( <i>camR</i> , p15a-Replikationsursprung, <i>lacI</i> , 2 x MCS / Expressionsvektor [T7]; Fa. Novagen)	AK Prof. Frank Schulz
pJET1.2:: <i>cit-P450+met</i>	4.949	<i>cit-P450</i> und Gen der Cittilin A-Methyltransferase ( <i>met</i> ) integriert in pJET1.2 ( <i>ampR</i> , pMB1-Replikationsursprung, <i>eco47IR</i> / Klonierungsvektor; Fa. Thermo Fisher Scientific)	AK Prof. Rolf Müller

### 4.2.3 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tab. 14) wurden von den Firmen Invitrogen oder Sigma-Aldrich bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden dabei in sterilem, doppelt destilierten Wasser resuspendiert, um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µM oder nach Bedarf zu generieren. Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei -20 ° C.

**Tab. 14.** In dieser Arbeit verwendete Primer für Klonierungen und Sequenzierung (Seq). Unterstrichene Sequenzen markieren Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder DNA-Regionen für eine Gibson-Assemblierungen bzw. homologe Rekombination. Fett markierte Sequenzen zeigen Basen an, welche im Vergleich zur Originalsequenz über die Primer verändert wurden. Die kodierte Aminosäuresequenz degenerierter Primer (DegPri) ist angegeben.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Verwendung / Besonderheiten
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-	Sequenzierung / Screening
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	-	Sequenzierung
pGEX-5	CTGGCAAGCCACGTTTGG	-	Sequenzierung / Screening
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	-	Sequenzierung / Screening
pRSET-RPnew	GGGTTATGCTAGTTATTGC	-	Sequenzierung
M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT	-	Sequenzierung
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC	-	Sequenzierung
pBAR1607-seq1	TCCGCTTCTCCGAAGC	-	Sequenzierung
lacI-seq	ATCAACTGGGTGCCAGC	-	Sequenzierung
kanR-seq	AACTCACCGAGGCAGTTC	-	Sequenzierung
SL_comJ-opt_for-17AA	CGCGGAATTCATGGCGTACCCGGAAGTCTG	<i>EcoRI</i>	<i>comJ-opt-m17AS</i> -Klonierung
SL_comJ_rev	ATATAGCGGCCGCTTACCAGGCGACCGGCAG	<i>NotI</i>	<i>comJ-opt-m17AS</i> -Klonierung
comI-opt-LICRED_for	<u>CCAGGGACCAGCAATGGCTTCGCGTGATGTGC</u>	-	<i>comI-opt</i> -Klonierung LICRED
comI-opt-LICRED_rev	<u>GAGGAGAAGGCGCGTTTGCGCACCGGCAGAGC</u>	-	<i>comI-opt</i> -Klonierung LICRED

## Material und Methoden

comJ-opt-LICRED_for	<u>CCAGGGACCAGCAATGCCGCAACAAGCTCAAC</u>	-	<i>comJ-opt</i> -Klonierung LICRED
comJ-opt-LICRED_rev	<u>GAGGAGAAGGCGCGTTTGCGCACCGGCAGACG</u>	-	<i>comJ-opt</i> -Klonierung LICRED
LICRED-Insert-seq_rev	GTGGGTAATGTCTTTCCG	-	Sequenzierung
SL_Fd-OverlapEx1	ATGGTA <u>GGATCC</u> ATGGAGATCCGATCGACCGCACAAAGTGCCTGAGCGGCGGCGTCTGCGGATGTTCCGCGCCCAAG	<i>Bam</i> HI	<i>comK</i> Overlap extension-PCR
SL_Fd-OverlapEx2 (rev)	GGCCGGTGCAGGAGTTGTCGACGACGCCATTCTTCGTCGCTCTGGTCGAA CACCTGGGGCGCGAACATCGCGCAC	-	<i>comK</i> Overlap extension-PCR
SL_Fd-OverlapEx3	GTCGACAACTCCGACCGGCCGAGGAAATCGCCGCGGCCGTACGGTCGGT CGTCTGGCGCTGCCGGGACACGCC	-	<i>comK</i> Overlap extension-PCR
SL_Fd-OverlapEx4 (rev)	ATGGTA <u>CTCGAGT</u> CAGCGGCCCTCCCCGCTCCACTCTGCTCATGGACC GAGATGGCGTGTCCCGGGCAGCGCCAAG	<i>Xho</i> I	<i>comK</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-1st-PCP_Primer-1_for	ATTGTA <u>GGATCC</u> ACGGGTGCGGAGCCGCGACCGACGCGGAGCGGACGCT GTGCGAGATCTTCGCGCGGGTGTGGGCTGGAG	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP1</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-1st-PCP_Primer-2_rev	CGACCTGCATCGAGGTGATCGAGTCCCGCCAGGTGGAAGAAGTCGTCC TCGGTGCCGACCCGCTCCAGGCCAGACCGCCG	-	<i>comC-PCP1</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-1st-PCP_Primer-3_for	GATCACCTCGATGCAGGTGTCGCGCAGGGCAGGACGGGCGGATCTGGTGC TGACCCCGCGCCAGGTCTTCGACCTGCGCACACC	-	<i>comC-PCP1</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-1st-PCP_Primer-4_rev	ATCATA <u>CTCGAGT</u> GTGGTCTGCTGCTCGCGGCCGGTTCGGGCGGCGT GCGCGAGCCTCTCGGGTGTGCGCAGGTGGAAGAC	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP1</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-2nd-PCP_Primer-1_for	ATTGTA <u>GGATCC</u> ACGGCCACGGCGAGCCGTGAGCCCGGACGCGCTGCGGA GAAGTTGGTGTGTGAGCTCTTCGCGGATGTCCTCAATC	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP2</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-2nd-PCP_Primer-2_rev	CGAGCTGCATCGACATGATGGAGTCCCGCCAGCTCGAAGAAGCTGTCC GCCACGCCGACCTGCTCCAGATTGAGGACATCGGCGAAG	-	<i>comC-PCP2</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-2nd-PCP_Primer-3_for	CATCATGTCGATGCAGCTCGCCGCGCGGGCAACCGAAGGGCATGCTCT CAGCGCACAGGACGTCTTCGAGCACGAGACGCCCGCC	-	<i>comC-PCP2</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-2nd-PCP_Primer-4_rev	ATCATA <u>CTCGAGC</u> CGCTCGCGGTTCTCGGACCGGTGTCGTCGCGGAGGC GGGCCACGGCGCGATGGCGCGGGCGTCTCGTCTCG	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP2</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-3rd-PCP_Primer-1_for	ATTGTA <u>GGATCC</u> GGCCGCGCGGGCGGACGCGACCCCGTACCCCTGCCGA GGCACTGCTGTGCCGGCTCTTCGCTGAAGTCTGGGGC	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP3</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-3rd-PCP_Primer-2_rev	CGAGCTGCATCGAGGTGATCGAGTCCGCTCCGAGCGCAAGAAGAGTGC TCGGCGCCACCCGTTCCAGCCCGAGACTTCAGCGAAG	-	<i>comC-PCP3</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-3rd-PCP_Primer-3_for	GATCACCTCGATGCAGCTCGCGTCCGCGGCCCGCGCGAGGGCGTTGTGC TCACGCCCGCGCAGGTCTTCGTCGAGAAGACGCCCGAGC	-	<i>comC-PCP3</i> Overlap extension-PCR
SL_comC-3rd-PCP_Primer-4_rev	ATCATA <u>CTCGAGC</u> ACCTCACCGGTTGCCGCTCTCGGCGCGGCCGCTTC GCGGAGCAGGGCGAGCCGCTCGGGCGTCTTCGACG	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP3</i> Overlap extension-PCR
SL_PCP+96bp-OverlapEx1	ATGGTA <u>GGATCC</u> GGCAAGGTGACCGCAATGCCTCCCCGCCCGACTTC GTCTCGCGGGTCCCGGACGCGCCCGGAGAGCGAGACCGAGCAAC	<i>Bam</i> HI	<i>comD-PCP</i> Overlap extension-PCR
SL_PCP+96bp-OverlapEx2 (rev)	CCGAGCTCGAAGAAGTTGCTCTCGGCGCCGACCTCGTCGAGTGCAGACAC CTCGGCGAAGAGCGTGCACATCTGTTGCTCGGTCTCGCTCTCCGG	-	<i>comD-PCP</i> Overlap extension-PCR
SL_PCP+96bp-OverlapEx3	GAGGACAACTTCTTCGAGCTCGGTGGCGACTCCGGCTCGGAATGCGCCTC GCCCGCCGATCCGGGAGGAACTCGGCGTCGACTGCCATCCG	-	<i>comD-PCP</i> Overlap extension-PCR
SL_PCP+96bp-OverlapEx4 (rev)	ATGGTA <u>CTCGAGC</u> GGCGGACCTTGCGCGGAGCACTCGTCCACACCGGCCG GCGTGGGCGCGGAGAACAGCTGCCGATGGCGAGTTCGACGCCGAG	<i>Xho</i> I	<i>comD-PCP</i> Overlap extension-PCR
SL_comK_for	AGTAGGATCCATGGAGATCCGGATCGACC	<i>Bam</i> HI	<i>comK</i> -Klonierung
SL_comK_rev	AGTAAAGCTTTCAGCGGCCCTCC	<i>Hind</i> III	<i>comK</i> -Klonierung

## Material und Methoden

comC-1st-PCP_for +12AA	ATTAGGATCCCGGGTCACGGGTCGCGAGCCG	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP1</i> -Klonierung
comC-1st-PCP_rev +3AA	ATCATACTCGAGTTAGGCCGGTCGGGCGGC	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP1</i> -Klonierung
comC-2nd-PCP_for +12AA	ATTAGGATCCGCCACGGCGAGCCGTGAGCC	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP2</i> -Klonierung
comC-2nd-PCP_rev +3AA	ATTACTCGAGTTACGCGAGGCGGCCACGGC	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP2</i> -Klonierung
comC-3rd-PCP_for +12AA	TTAGGATCCCGCGGGCGGACGCGAC	<i>Bam</i> HI	<i>comC-PCP3</i> -Klonierung
comC-3rd-PCP_rev +3AA	ATTACTCGAGTTAGGCCGCTTCGGCGAGCAGGG	<i>Xho</i> I	<i>comC-PCP3</i> -Klonierung
SL_comD-PCP_for +12AA	ATTAGGATCCCGGGTCGCCGACGCG	<i>Bam</i> HI	<i>comD-PCP</i> -Klonierung
SL_comD-PCP +3AA(new)_rev	ATGTACTCGAGTTACTTGCGCGGAGCACTCG	<i>Xho</i> I	<i>comD-PCP</i> -Klonierung
SL_comD-PCP- opt_for+12AA	TATAGGATCCCGTGTGGCTGGTCTGCGCCG	<i>Bam</i> HI	<i>comD-PCP+X</i> / <i>comD-X</i> -Klonierung
SL_comD-X-domain- opt_for	TATAGGATCCGTCCTCCGGCACTGCG	<i>Bam</i> HI	<i>comD-PCP+X</i> -Klonierung
SL_comD-X-domain- opt_rev	GTCGCTCGAGTCACTGCACTTGCG	<i>Xho</i> I	<i>comD-PCP+X</i> / <i>comD-X</i> -Klonierung
Cittilin-P450_for	ATCAGGATCCATGTACAGGTGCGCCTTC	<i>Bam</i> HI	<i>cit-P450</i> -Klonierung
Cittilin-P450_rev	ATTACTCGAGTCATGCTCCCGCCGATG	<i>Xho</i> I	<i>cit-P450</i> -Klonierung
cit-P450-LICRED_for	CCAGGGACCAGCAATGTACAGGTGCGCCTTC	-	<i>cit-P450</i> -Klonierung LICRED
cit-P450-LICRED_rev	GAGGAGAAGGCGCGTGCTCCCGCCGATGC	-	<i>cit-P450</i> -Klonierung LICRED
EC_fpr_for	GCAGGATCCATGGCTGATTGGGTAACAGGC	<i>Bam</i> HI	<i>fpr</i> -Klonierung
EC_fpr_rev	GCACTCGAGTTACCAGTAATGCTCCGCTGTG	<i>Xho</i> I	<i>fpr</i> -Klonierung
adr_for-new	TATAAGAATTCAGCACTCAAGAACAAACTC	<i>Eco</i> RI	<i>adr</i> -Klonierung
adr_rev	ATAAAGCTTGGATCTAGGCTCAGTG	<i>Hind</i> III	<i>adr</i> -Klonierung
adx_1-128_for	ATAGGATCCGGCAGCTCAG	<i>Bam</i> HI	<i>adx1-128</i> -Klonierung
adx_1-128_rev	GCGCTCGAGTTATTCTATCTTTG	<i>Xho</i> I	<i>adx1-128</i> -Klonierung
adx_4-108_for	ACAGGATCCGAAGATAAAATAAC	<i>Bam</i> HI	<i>adx4-108</i> -Klonierung
adx_4-108_rev	GTGCTCGAGTTAAGGTACTC	<i>Xho</i> I	<i>adx4-108</i> -Klonierung
gdh-BM3_for	GCAGCGGATCCATGTATACAGATTTAAAG	<i>Bam</i> HI	<i>gdh-BM3</i> -Klonierung
gdh-BM3_rev	ATCGTACTCGAGTTATCCGCGTCTGCTTG	<i>Xho</i> I	<i>gdh-BM3</i> -Klonierung
Sf_JBIR-seq0_for	ATCTCGTCGGCGATCTC	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq0_rev	ACGTCTGGGTCGATCTG	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq1_for	TCCGGTTGACCAGGATC	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq1_rev	GACGGGCAACTTCTTCC	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq2_for	TCGAGATCAGCAGCACC	-	PCR / Seq JBIR-Cluster

## Material und Methoden

Sf_JBIR-seq2_rev	ACTGGTCTGGAGAACG	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq3_for	CCGAAGACAGGTAGTGG	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq3_rev	TCTTCGGCGGATTCCTG	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq4_for	ACTCGGATTCACCTGG	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_JBIR-seq4_rev	AGAACTGGCCGAATCC	-	PCR / Seq JBIR-Cluster
Sf_fmoA1_for	TATAGGATCCATGCCACGACCTCTCGACG	<i>Bam</i> HI	<i>fmoA1</i> -Klonierung
Sf_fmoA1_rev	TATACTCGAGTCATGACGCCGCTGGTCTG	<i>Xho</i> I	<i>fmoA1</i> -Klonierung
Sf_fmoB_for	TATAGGATCCATGACCTACCTCCGAGCTGGC	<i>Bam</i> HI	<i>fmoB</i> -Klonierung / Screening
Sf_fmoB_rev	TATACTCGAGTCATGACGGTCTCTCTCGGCG	<i>Xho</i> I	<i>fmoB</i> -Klonierung / Screening
Sf_fmoC_for	TATAGGATCCATGATCCCGCAGCGCCGCC	<i>Bam</i> HI	<i>fmoC</i> -Klonierung
Sf_fmoC_rev	TATACTCGAGTTACGCACGCCGTTCCAGCCGC	<i>Xho</i> I	<i>fmoC</i> -Klonierung
Sf_fmoD_for	TATAGGATCCATGGGGGAGCCATTCGGAACATC	<i>Bam</i> HI	<i>fmoD</i> -Klonierung / Screening
Sf_fmoD_rev	TATACTCGAGTCACACTGTCCGCCGCGGG	<i>Xho</i> I	<i>fmoD</i> -Klonierung / Screening
Sf_fmoE_for	TATAGGATCCATGGGCCCGCGGCGG	<i>Bam</i> HI	<i>fmoE</i> -Klonierung
Sf_fmoE_rev	ATTACTCGAGTTATCGGTCGCCTTCCGGGC	<i>Xho</i> I	<i>fmoE</i> -Klonierung
SF_fmoL_for_2	ATAGGATCCGTGCATGACGGCGATCGG	<i>Bam</i> HI	<i>fmoL</i> -Klonierung / Screening
SF_fmoL_rev_2	ATACTCGAGTTATGCGGCGAGGAAGCGG	<i>Xho</i> I	<i>fmoL</i> -Klonierung / Screening
SF_fmoA4-end-screen_for	GGATCACGGTCACGGTGTTCC	-	Screening
SF_fmoA4-end-screen_rev	TCGTTCAGCCCTTGAACGCC	-	Screening
LICRED2pGS21a-comI-opt_for	GATCGAATTCATGGCTTCGCGTGATGTGCCGG	<i>Eco</i> RI	PCR / Transfer LICRED zu pGS-21a
LICRED2pGS21a-comJ-opt_for	GATCGAATTCATGCCGCAACAAGCTCAACGTACG	<i>Eco</i> RI	PCR / Transfer LICRED zu pGS-21a
LICRED2pGS21a-Cit-P450_for	GATCGAATTCATGTACAGGTGCGCCTCCGC	<i>Eco</i> RI	PCR / Transfer LICRED zu pGS-21a
LICRED2pGS21a_rev	GATCAAGCTTTCAGAGTCGAGGGCCAGCC	<i>Hind</i> III	PCR / Transfer LICRED zu pGS-21a
Cluster-screen1_for	TAYGAYCCNCCNGARCAYAC	-	DegPri; YDPPEHT
Cluster-screen1_rev	CARTRRTGNAYNCCRTGNCC	-	DegPri; GHG(V/I)H(H/Y)C
Cluster-screen2_for	GAYCCNCCNGANCAYACNMRNYT	-	DegPri; DPP(E/D)HT(R/Q)L
Cluster-screen2new_for	GAYCCNCCNGANCAYACNMR	-	DegPri; DPP(E/D)HT(R/Q)
Cluster-screen2_rev	CARTRRTGNAYNCCNTKNCC	-	DegPri; G(H/K)G(V/I)H(H/Y)C
Cluster-screen4_for	ATGYTNAMNCCNGARTTYAC	-	DegPri; ML(N/T)PEFT



## Material und Methoden

SUMO_S-fil_bip_11824_for_1	<u>CTCACAGAGAACAGATTGGTGGATCCATGTGTGCACGACAAGATTGG</u>	-	PCR / Gibson
SUMO_S-fil_bip_11824_rev_1	<u>ACTGGCGGCCGTTACTAGTGTACGTAACGAGGTCGCCAACAGCCC</u>	-	PCR / Gibson
SUMO_S-griseorub_10630_for_1	<u>CTCACAGAGAACAGATTGGTGGATCCATGCTCGACGTCCGGCGGAT</u>	-	PCR / Gibson
SUMO_S-griseorub_10630_rev_1	<u>ACTGGCGGCCGTTACTAGTGTACGTAGTGACTCGTTCACCCCTCG</u>	-	PCR / Gibson

### 4.3 Nährmedien, Zellanzucht und Puffer

Für die Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur oder auf Agarplatten wurden die folgenden Nährmedien und Bedingungen verwendet.

#### 4.3.1 Kultivierung von Bakterien

Die Bedingungen zur Kultivierung der verwendeten Bakterien in Flüssigkultur oder auf Agarplatten sind in Tab. 15 angegeben. Die angegebene Geschwindigkeit (rpm) bezieht sich auf die Flüssigkulturen.

**Tab. 15.** Bedingungen die im Laufe dieser Arbeit zur Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen genutzt wurden.

<b>Stamm</b>	<b>Medium</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>rpm</b>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	LB	37	200 rpm
<i>E. coli</i> EPI300™	LB	37	200 rpm
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LB, TB	37	200 rpm
<i>E. coli</i> BAP1	LB, TB	37	200 rpm
<i>E. coli</i> SoluBL21™	LB, TB	25	200 rpm
<i>S. griseorubiginosus</i> DSMZ 40469	GYM	28 °C	200 rpm
<i>S. griseorubiginosus</i> No. 43708	GYM	28 °C	200 rpm
<i>S. filipinensis</i> NRRL 3217	GYM, ISP-2	28 °C	200 rpm

Vorkulturen wurden aus Einzelklonen auf Agarplatten oder aus Kryolösungen angeimpft. Für das Animpfen aus einer Kryolösung wurden dabei entweder ein Teil der gefrorenen Zellsuspension (*E. coli*) oder 0,5 - 1,6 mL (Streptomyceten) verwendet. Die Standardvolumina der Vorkulturen betragen dabei 5 - 10 mL im Falle von *E. coli* und 50 - 100 mL für Streptomyceten. Die Vorkulturen wurden ü. N. (*E. coli*) oder für 2 ½ bis 3 Tage (Streptomyceten) inkubiert. Hauptkulturen für eine

## Material und Methoden

Produktion rekombinanter Proteine oder von Naturstoffen wurden im Verhältnis 1:100 (*E. coli*) oder 1:25 - 1:100 (Streptomyceten) aus diesen Vorkulturen beimpft.

Kulturvolumina und Temperaturen für Proteinexpressionen und Fermentationen sind entsprechend angegeben. Je nach verwendetem Expressionsplasmid (Tab. 13) wurden die entsprechenden Antibiotika in der angegebenen Endkonzentration eingesetzt. Zusätzliche Parameter sind direkt zu den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

### **4.3.2 Stammhaltung**

Zur Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden frische Übernachtskulturen (LB) unter sterilen Bedingungen mit einer Glycerinlösung bis zu einer Enkonzentration von 15% (v/v) versetzt. Streptomyceten wurden für 2 ½ Tage angezogen (GYM) und ein Teil der Mycel-haltigen Lösung steril mit einer Kryolösung (Tab. 16) gemischt (50% v/v). Die Lagerung aller Kulturen erfolgte bei -80 °C in sterilen Kryoröhrchen.

**Tab. 16.** Kryolösung zur Lagerung von Streptomyceten.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Sucrose	20 g
Glucose	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 70 mL

Die Kryolösung wurde nach ihrer Herstellung sterilfiltriert.

### **4.3.3 Reinheitskontrolle**

Die verwendeten Kulturen wurden regelmäßig makroskopisch und mikroskopisch auf Reinheit geprüft.

### **4.3.4 Medien**

Die folgenden Medien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Sie wurden mit dH<sub>2</sub>O hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

#### 4.3.4.1 Luria Bertani-Medium (LB)

LB-Medium nach Miller (1972)<sup>307</sup> wurde als Standardmedium für die Anzucht von *E. coli* verwendet (z. B. zur Transformation, Plasmidpräparation oder Proteinexpression) verwendet. Entweder wurde das Nährmedium aus den einzelnen Komponenten zubereitet (Tab. 17) oder von der Fa. Roth als fertig zusammengesetztes Pulver bezogen und gemäß Herstellerangabe 25 g in 1 L Reinstwasser gelöst und autoklaviert.

**Tab. 17.** Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 L

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 15 g Agar-Agar hinzugefügt.

Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 4.3.4.2 Terrific Broth-Medium (TB)

TB-Medium wurde für die Proteinexpression mit *E. coli* verwendet. Entweder wurde das Nährmedium aus den einzelnen Komponenten zubereitet (Tab. 18) oder von der Fa. Roth als fertig zusammengesetztes Pulver bezogen und gemäß Herstellerangabe 47.6 g mit 4 mL Glycerin in 1 L Reinstwasser gelöst und autoklaviert. TB-Medium, welches entsprechend der Angaben in Tab. 18 hergestellt wurde, musste nach dem Autoklavieren noch mit 100 mL eines separat autoklavierten Phosphatpuffers (0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,72 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) komplettiert werden.

**Tab. 18.** Zusammensetzung des TB-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 900 mL



#### 4.3.4.3 SOC-Medium (“Super Optimal broth with Catabolite repression”)

SOC-Medium nach Hanahan (1983)<sup>308</sup> wurde zur Anzucht von *E. coli* nach einer Transformation oder für dessen Kultivierung zur Herstellung kompetenter Zellen verwendet.

**Tab. 19.** Zusammensetzung des SOC-Mediums

Bestandteil	Menge
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	10 mL
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10 mL
D-Glucose (40% w/v)	9 mL
dH <sub>2</sub> O	ad 1L

Die Lösungen mit MgSO<sub>4</sub>, MgCl und Glucose wurden separat sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### 4.3.4.4 GYM-Medium und ISP-2-Medium

GYM wurde als Standardmedium für die Anzucht von Streptomyceten verwendet. Das auf dem GYM-Medium basierende ISP-2-Medium diente hingegen der Anzucht von Streptomyceten für eine nachfolgende Extraktion mittels EtOAc oder Ionenaustauschharz.

**Tab. 20.** Zusammensetzung von GYM- und ISP-2-Medium

Bestandteil	Menge	
	GYM	ISP-2
Glukose	4 g	4 g
Hefeextrakt	4 g	4 g
Malzextrakt	10 g	10 g
Spurenelementlösung	-	0,2% v/v
dH <sub>2</sub> O	ad 1 L	ad 1 L

## Material und Methoden

Für die Herstellung von GYM-Agarplatten wurden dem Medium 12 g Agar-Agar, sowie 2 g CaCO<sub>3</sub> hinzugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 7,2 eingestellt.

Um das GYM-Basismedium zum ISP-2-Medium zu erweitern, wurde die sterilfiltrierte Spurenelementlösung aus Tab. 21 verwendet.

**Tab. 21.** ISP-2-Spurenelementlösung

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
NaCl	200 mg
CoCl * 6 H <sub>2</sub> O	400 mg
CuBr <sub>2</sub>	200 mg
KBr	50 mg
MoCl <sub>5</sub>	400 mg
KI	50 mg
NaVO <sub>3</sub>	50 mg
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) * 6 H <sub>2</sub> O	5,4 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100 mg
CH <sub>3</sub> COOLi * 2 H <sub>2</sub> O	50 mg
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	200 mg
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 200 mL

### **4.3.5 Antibiotika**

Die folgenden Antibiotika (Tab. 22) wurden als Medienzusatz verwendet.

**Tab. 22.** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stockkonzentration [mg/mL]</b>	<b>Endkonzentration [µg /mL]</b>
Ampicillin	100	100
Chloramphenicol	25	25
Kanamycin	50	50
Tetracyclin	10	10

## Material und Methoden

Hierdurch sollten Klone mit bestimmten Plasmiden selektioniert und die Kontamination von Reinkulturen vermieden werden. Kanamycin wurde in Reinstwasser, Ampicillin in 50% (v/v) EtOH, Tetracyclin in 70% (v/v) EtOH und Chloramphenicol in 100% EtOH gelöst.

### 4.3.6 Weitere Medienzusätze

Die folgenden Zusätze wurden für die heterologe Proteinproduktion oder die Induktion einer hohen Kopienzahl von pCC1Fos verwendet.

**Tab. 23.** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Medienzusätze.

Medienzusatz	Stockkonzentration	Endkonzentration	Verwendung
IPTG	1,0 M	0,5 mM (Standard) 1,0 mM (+ pRKISC)	Induktion der heterologen Proteinproduktion
Autoinduktionslösung (Fa. Epicentre)	500 x	1 x	Induktion einer hohen Kopienzahl von pCC1FOS
5-Aminolävulinsäure	10 mg/mL	20 µg/L	CYP450-Überproduktionen
Fe(II)SO <sub>4</sub> / Fe(III)-EDTA	0,5 M	1,0 mM	Ferredoxin-Überproduktion
Riboflavin	50 mg/L	5 µg/L	Überproduktion flavinabhängiger Reduktasen

Alle Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und vor der Zugabe sterilfiltriert.

### 4.3.7 Puffer

Für die Herstellung aller Puffer wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet.

#### 4.3.7.1 Transformationspuffer (TB-Puffer)

**Tab. 24.** Zusammensetzung des TB-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
Hepes	10 mM
CaCl	15 mM
KCl	250 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde vor dem Autoklavieren mit KOH auf 6,7 eingestellt.  
Nach dem Autoklavieren wurden 55 mM MnCl<sub>2</sub> sterilfiltriert zugegeben.

#### 4.3.7.2 Tris-EDTA-Puffer (TE)

**Tab. 25.** Zusammensetzung des TE-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

#### 4.3.7.3 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

**Tab. 26.** Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Acetat	20 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 8,5 eingestellt.

#### 4.3.7.4 DNA-Ladepuffer (10 x)

**Tab. 27.** Zusammensetzung des 10-fachen DNA-Ladepuffers.

Bestandteil	Konzentration
Sucrose	20% (w/v)
Orange G	0,15% (v/v)
Xylencyanol	0,05% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

#### 4.3.7.5 Lysispuffer für die heterologe Proteinaufreinigung

**Tab. 28.** Zusammensetzung des Lysispuffers.

Bestandteil	Konzentration
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Glycerol	10% (v/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

#### 4.3.7.6 Wasch- und Elutionspuffer für die heterologe Proteinaufreinigung

**Tab. 29.** Zusammensetzung der Waschpuffer und des Elutionspuffers.

Bestandteil	Konzentration			
	Waschpuffer 1	Waschpuffer 2	Waschpuffer 3	Elutionspuffer
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol	20 mM	40 mM	80 mM	250 mM
Glycerol	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)

Der pH-Wert aller Puffer wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 4.3.7.7 SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)

**Tab. 30.** Zusammensetzung des 5-fachen SDS-Ladepuffers.

Bestandteil	Konzentration
Tris (1 M, pH 6,8)	25% (v/v)
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)
SDS	10% (w/v)
Bromphenolblau	0,2% (w/v)
Glycerol	50% (v/v)

#### 4.3.7.8 Trenngelbuffer (4 X)

**Tab. 31.** Zusammensetzung des 4-fachen Trenngelbuffers.

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	1,5 M
SDS	0,8% (w/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.

#### 4.3.7.9 Sammelgelbuffer (4 X)

**Tab. 32.** Zusammensetzung des 4-fachen Sammelgelbuffers.

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	0,5 M
SDS	0,8% (w/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt.

#### 4.3.7.10 Tris-HCl-Puffer für Proteinlösungen

Die Lösung und Lagerung rekombinanter Proteine erfolgte nach ihrer Aufreinigung und Entsalzung standardmäßig in Tris-HCl-Puffer mit Glycerol (Tab. 33).

**Tab. 33.** Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers zur Lösung und Lagerung rekombinanter Proteine.

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Tris	50 mM
Glycerol	10% (v/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 4.3.7.11 Tris-HCl-Puffer für Kristallisationsansätze

Ein Tris-HCl-Puffer mit niedrigerer Molarität und ohne den Zusatz von Glycerol (Tab. 34) wurde verwendet, um Proteine zu lösen, die in der Folge kristallisiert werden sollten.

**Tab. 34.** Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers für eine nachfolgende Kristallisation.

Bestandteil	Konzentration
Tris	20,0 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

#### 4.3.7.12 Tris-HCl-Puffer für enzymatische Reaktionen

Enzymatische Reaktionen wurden teilweise in einer Variante des Tris-HCl-Puffer aus Kapitel 4.3.7.10 ohne Glycerol (Tab. 35) durchgeführt.

**Tab. 35.** Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers für enzymatische Reaktionen.

Bestandteil	Konzentration
Tris	50 mM

Eine weitere Variante dieses Puffers mit Magnesiumchlorid (Tab. 36) wurde bei der Aktivierung von Apo-PCP-Domänen verwendet.

**Tab. 36.** Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers zur Aktivierung von Apo-PCP-Domänen.

Bestandteil	Konzentration
Tris	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Der pH-Wert beider Puffer wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

### 4.3.7.13 HEPES-Puffer

Enzymatische Reaktionen wurden teilweise in HEPES-Puffer (Tab. 37) durchgeführt.

**Tab. 37.** Zusammensetzung des HEPES-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
HEPES	25 mM
NaCl	50 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

### 4.3.7.14 Kaliumphosphatpuffer

Die Durchführung enzymatischer Reaktionen erfolgte teilweise in Kaliumphosphatpuffer. Für die Herstellung von 1 M Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten wurden dabei Stammlösungen von  $K_2HPO_4$  und  $KH_2PO_4$  in den in Tab. 38 angegebenen Verhältnissen gemischt. Durch Zugabe eines entsprechenden Volumens zum Reaktionsansatz oder zu ddH<sub>2</sub>O wurden die Puffer auf die gewünschte Molarität verdünnt.

**Tab. 38.** Zusammensetzung der Kaliumphosphatpuffer.

Bestandteil	Menge		
	pH 6,0	pH 6,6	pH 7,2
Puffer mit ...			
$K_2HPO_4$ (1 M)	13,2% (v/v)	38,1% (v/v)	71,7% (v/v)
$KH_2PO_4$ (1 M)	86,8% (v/v)	61,9% (v/v)	28,3% (v/v)

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden vor der Verwendung mit 70 % Ethanol gereinigt oder gespült. Gegenstände aus Metall, wie Impfösen, Spatel oder Pinzetten, wurden vor Gebrauch abgeflammt.



#### **4.4.2 Isolierung chromosomaler DNA**

##### **4.4.2.1 Isolierung mittels „Bacteria DNA Preparation Kit“ (Jena Bioscience)**

Genomischer DNA aus *E. coli* oder Streptomycceten wurde standardmäßig mittels des „Bacteria DNA Preparation Kits“ der Fa. Jena Bioscience aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers aus 0,5 - 2 mL einer ü. N.-Kultur von *E. coli* oder einer 2 ½ Tage alten Kultur der Streptomycceten.

##### **4.4.2.2 Isolierung von gDNA aus Streptomycceten mit hohen Ausbeuten**

Die Extraktion genomischer DNA aus Streptomycceten mit hohen Ausbeuten wurde nach dem Protokoll von Nikodinovic *et al.* (2003) aus 30 mL einer 2 ½ alten Kultur durchgeführt.<sup>309</sup>

#### **4.4.3 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Präparation von Plasmiden erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mithilfe des „Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kits“ der Fa. Jena Bioscience, des „Plasmid Miniprep Kits I, peqGOLD“ der Fa. Peqlab oder des „PureYield™ Plasmid Miniprep Kits“ der Fa. Promega. Die Aufreinigung wurde standardmäßig aus 3 bis 5 mL einer ü. N-Kultur von *E. coli* nach den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Fosmide mit gDNA-Inserts ( $\geq 40$  kb) wurden bei Bedarf auch mittels „XChange Plasmid Midi Kits, peqGOLD“ der Fa. Peqlab aufgereinigt, um größere Mengen an DNA zu erhalten. Hierbei wurde die Aufreinigung nach Herstellerangaben aus 30 bis 50 mL einer ü. N-Kultur von *E. coli* durchgeführt. Die entsprechenden Kulturen wurden zusätzlich mit der Autoinduktionslösung der Fa. Epicentre (Kapitel 4.3.6) induziert, um eine hohe Kopienzahl der pCC1FOS-Konstrukte zu gewährleisten.

#### **4.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine Methode um DNA selektiv zu amplifizieren. Als Template wurden gDNA von *S. griseorubiginosus* DSMZ 40469, *S. griseorubiginosus* No. 43708, *S. filipinensis* NRRL 3217 und *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet. Zudem wurden verschiedene Plasmide/Fosmide mit unterschiedlichen Inserts als Templat eingesetzt. Die gewünschten Gene oder DNA-Abschnitte wurden unter Verwendung der ‚Pfu-X-Polymerase‘ von Jena Bioscience oder der ‚Q5® High-Fidelity DNA Polymerase‘ von NEB

## Material und Methoden

amplifiziert. Beide besitzen eine Exonukleasefunktion zur Korrektur falsch eingebauter Basen. Dies verringert signifikant die Wahrscheinlichkeit einer Mutationen der amplifizierten DNA.

### 4.4.4.1 Pfu-X-PCR

PCR- Reaktionen mit der Pfu-X-Polymerase wurden nach dem Schema in Tab. 39 angesetzt.

**Tab. 39.** PCR-Ansätze mit der Pfu-X-Polymerase.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Pfu-X-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)	0,2 $\mu$ L
Pfu-X-Puffer (10 x)	5 $\mu$ L
DMSO (100%)	2 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ L
Forward-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
Reverse-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
Templat	1 - 100 ng DNA
rH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L

In Tab. 40 ist das Standardprogramm für PCR-Reaktion mit der Pfu-X-Polymerase zusammengefasst.

**Tab. 40.** Temperaturprogramm für die PCR mit der Pfu-X Polymerase.

<b>Segmente</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1 Anfangstemperatur	95 °C	2 min
2 Denaturierung	95 °C	20 s
3 Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47 - 68 °C	20 s
4 Elongation	68 °C	30 s/kb
5 Finale Elongation	68 °C	5 min

Die Schritte 2 - 4 wurden 30 Mal wiederholt. Bei der Amplifikation langer DNA-Fragmente (> 5 kb) wurde der finale Elongationsschritt entsprechend angepasst.

### 4.4.4.2 Q5-PCR

PCR- Reaktionen mit der Q5-Polymerase wurden nach dem Schema in Tab. 41 angesetzt. Die Zugabe des ‚GC-Enhancers‘ ist optional. Dieser wurde verwendet, wenn die Templat-DNA einen hohen GC-Gehalt ( $\geq 65\%$ ) besaß.

**Tab. 41.** PCR-Ansätze mit der Q5-Polymerase.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Q5-Polymerase (200 U/mL)	0,25 $\mu$ L
Q5-Puffer (5 x)	10 $\mu$ L
GC-Enhancer (5 x) (optional)	10 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ L
Forward-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	1,25 $\mu$ L
Reverse-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	1,25 $\mu$ L
Templat	1 ng – 1 $\mu$ g gDNA oder 1 pg – 1 ng Plasmid-DNA
rH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L

In Tab. 42 ist das Standardprogramm für PCR-Reaktion mit der Q5-Polymerase zusammengefasst.

**Tab. 42.** Temperaturprogramm für die PCR mit der Q5-Polymerase.

	<b>Segmente</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Anfangstemperatur	98 °C	30 s
2	Denaturierung	98 °C	10 s
3	Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47 - 72 °C	20 s
4	Elongation	72 °C	20 - 30 s/kb
5	Finale Elongation	72 °C	2 min

Die Schritte 2 - 4 wurden 30 Mal wiederholt. Bei der Amplifikation langer DNA-Fragmente (> 5 kb) wurde der finale Elongationsschritt entsprechend angepasst.

### 4.4.4.3 Taq-Screening-PCR

Mittels einer Screening-PCR (auch Kolonie-PCR genannt) wurde überprüft, welche Bakterienkolonien nach einer vorhergehenden Klonierung und Transformation das gewünschte Insert tragen. Einzelne Klone wurden mittels eines sterilen Zahnstochers von den Agarplatten gepickt und in 5 µL sterilem Reinstwasser resuspendiert. Diese Lösung diente als Templat für eine PCR mit der Taq-Polymerase der Fa. Jena Bioscience. Die Zusammensetzung der restlichen Reaktionslösung ist aus Tab. 43 zu entnehmen. Zur späteren Anzucht positiver Klone wurde ein Teil der gepickten Kolonien auf einer neuen Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C ü. N. inkubiert.

**Tab. 43.** Ansätze von Taq-Screening-PCRs.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Taq-Polymerase (2,5 U/µL)	0,125 µL
Taq-Puffer (5 x)	2,5 µL
DMSO (100%)	1 µL
dNTPs (10 mM)	0,25 µL
Forward-Primer (20 pmol/µL)	0,125 µL
Reverse-Primer (20 pmol/µL)	0,125 µL
Templat	5 µL
rH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

Tab. 44 fasst das Standardprogramm für eine Screening-PCR mittels Taq-Polymerase zusammen.

**Tab. 44.** Temperaturprogramm für die Screening-PCR.

	<b>Segmente</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1	Anfangstemperatur	94 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	30 s
3	Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47 - 72 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	60 s/kb
5	Finale Elongation	72 °C	5 min

Die Schritte 2 - 4 wurden 33 Mal wiederholt.

#### 4.4.4.4 Überhang-Extension-Polymerasekettenreaktion

Überhang-Extension-PCRs wurden nach dem Protokoll von Chen *et al.* (1994) durchgeführt.<sup>310</sup> Sie kann der Synthese kleiner Gene oder DNA-Fragmente (ca. 300 bp) dienen, falls keine gDNA oder Plasmid-DNA als Templat verfügbar ist. In einer ersten PCR werden Primerpaare verwendet, die identische Überhänge von 19 - 23 bp besitzen (Tab. 14). Mittels dieser Überhänge können die Primer sich aneinander anlagern, wodurch sie in der Lage sind ein Templat zu ersetzen. Auch die resultierenden PCR-Produkte besitzen aufgrund der gewählten Primer identische Überhänge. Daher können sie in einer zweiten PCR verwendet werden, um das Produkt der gewünschten Länge zu generieren. Hierbei finden auch die Primer der ersten PCR Verwendung, welche an den jeweiligen 5'-Enden des zu erzeugenden Produkts binden und die Restriktionsschnittstellen für eine spätere Klonierung tragen (Primer 1 und 4).

Für beide PCR-Reaktionen wurde die Pfu-X-Polymerase der Fa. Jena Bioscience verwendet. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionen ist in Tab. 45 zusammengefasst.

**Tab. 45.** Zusammensetzung der ersten und zweiten PCR-Reaktion im Rahmen der Überhang-Extension-PCR.

Bestandteil	Menge	
	Erste PCR	Zweite PCR
Pfu-X-Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)	0,2 $\mu$ L	0,2 $\mu$ L
Pfu-X-Puffer (10 x)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
DMSO (100%)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Forward-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Reverse-Primer (20 pmol/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Produkt 1. der ersten PCR (10 – 30 ng/ $\mu$ L)	-	0,2 $\mu$ L
Produkt 2. der ersten PCR (10 – 30 ng/ $\mu$ L)	-	0,2 $\mu$ L
rH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L	ad 50 $\mu$ L

Beide PCRs wurden mit dem Programm aus Tab. 46 durchgeführt.

Die Schritte 2 - 4 wurden dabei 30 Mal wiederholt.

## Material und Methoden

**Tab. 46.** Temperaturprogramm für die erste und zweite Reaktion im Rahmen der Überhang-Extension-PCR.

	Segmente	Temperatur	Zeit
1	Anfangstemperatur	95 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	1 min
3	Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47 - 68 °C	2 min
4	Elongation	68 °C	1 min 30 s
5	Finale Elongation	68 °C	2 min 30 s

### 4.4.4.5 Gerichtete, Ligase-unabhängige Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Die gerichtete, Ligase-unabhängige Mutagenese-Polymerasekettenreaktionen (engl. „Site-directed, Ligase-independent Mutagenesis-PCR“, SLIM) zur Generierung der Vektoren pHis8-TEV und pHis8C(+)-TEV wurden nach dem Protokoll von Chiu *et al.* (2008) durchgeführt.<sup>204</sup>

### 4.4.4.6 Durchmusterung von gDNA-Bibliotheken mittels PCR und Endsequenzierung

Zur Identifizierung von Einzelklonen der gDNA-Bibliothek von *S. filipinensis* NRRL 3217,<sup>171</sup> die einen gDNA-Abschnitt mit einem Teil des Sf-JBIR-Clusters tragen, wurde die Bibliothek mittels eines PCR-basierten Ansatzes durchmustert. Hierfür wurden je 48 Klone der Bibliothek (entspricht einer halben „96 well“-Platte, 6 Spalten x 8 Zeilen) auf einer LB-Agarplatte mit Chloramphenicol angezogen und die Zellen in je 1 mL rH<sub>2</sub>O gepoolt. Dies wurde wiederholt bis die gesamte Bibliothek einmal abgedeckt war. Je 5 µL dieser Zellsuspension wurden dann als Templat für 25 µL PCR-Ansätze mit der Taq-Polymerase (Kapitel 4.4.4.3) oder der Q5-Polymerase (Kapitel 4.4.4.2) verwendet. Aufgrund der hohen Zelldichte des Templats und eines tendenziell geringen Anteils positiver Klone wurde hierbei eine erhöhte Anzahl an Zyklen (48 bis 55) gewählt. Es wurden spezifische Primer für die Gene *fmoB*, *fmoD*, *fmoL* oder das 3'-Ende von *fmoA4* genutzt. Als Positivkontrolle diente genomische DNA von *S. filipinensis* NRRL 3217.

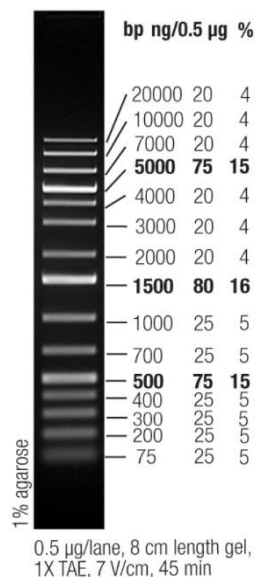
Die Agarplatten, welche zu einer positiven Suspension gehörten, wurden einer weiteren PCR-Runde unterzogen. Hierbei wurden alle Klone einer Zeile (8 Zeilen) in je 50 µL rH<sub>2</sub>O gepickt und 5 µL diese Lösung als Templat für eine erneute Taq- oder Q5-PCR verwendet. Die Klone einer positiven Zeile wurde dann noch einmal einzeln mittels einer Taq-Screening-PCR untersucht, um den jeweiligen positiven Einzelklon zu identifizieren. Dieser wurde in der Folge in LB-Medium angezogen und für eine

## Material und Methoden

Plasmidpräparation verwendet. Zur Bestimmung des enthaltenen gDNA-Inserts wurde das resultierende Fosmid einer Endsequenzierung mit den Primer M13-FP und/oder M13-RP unterzogen.

### 4.4.5 Visualisierung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu PCR-Reaktionen, die Extraktion von Plasmiden und gDNA sowie Restriktionsverdau zu analysieren. Außerdem können mit ihr DNA-Fragmente aufgereinigt und isoliert werden (4.4.7.2). Standardmäßig wurde 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Nachdem die Flüssigkeit auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde ‚GelRED Nucleic acid stain‘ der Fa. Biotium oder ‚Clear G DNA stain‘ der Fa. Serva zugegeben und die Lösung in einen geeigneten Gelschlitten mit Probenkamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 1 x TAE-Puffer befüllt bis das Gel komplett bedeckt war. Bevor die DNA-Proben in die Taschen gefüllt werden konnten, wurden sie mit einem geeigneten Ladepuffer (4.3.7.4) versetzt, um sie zu beschweren. Als Referenz zur Größen- und Konzentrationsbestimmung dienten 2 µL der ‚O‘GeneRuler™ 1 kb plus DNA Ladder‘ der Fa. Thermo Scientific (Abb. 62). Durch Anlegen einer elektrischen Spannung (90 - 120 V) wurde die Migration der gleichmäßig negativ geladenen Proben von Anode zu Kathode bewirkt. Nach 20 - 30 min konnten die Gele unter UV-Licht analysiert und dokumentiert werden.



**Abb. 62.** Im Größenstandard ‚O‘GeneRuler™ 1 kb plus DNA Ladder‘ der Fa. Thermo Scientific enthaltene DNA-Fragmente. Angegeben sind die Größen (bp) sowie der mengenmäßige (ng/0,5 µg) und prozentuale Anteil der Fragmente. Die Abbildung wurde der Produktbroschüre des Herstellers entnommen.

#### **4.4.6 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit**

Die Konzentration und Reinheit von PCR-Produkten, Plasmid-DNA oder gDNA wurde photometrischen über das Implen Nanophotometer P330 bestimmt. Hierfür wurden die folgenden Einstellungen verwendet: Menüpunkt ‚NanoVolume Applications‘, Unterpunkte ‚Nucleic Acids‘ und ‚dsDNA‘; Einstellungen: LID-Factor: 10 (bei zu hohen Konzentrationen automatischer Wechsel auf 50); Dilution: 1.000; Background: On; Units: ng/μL; Factor: 50.0. Der Leerwert gegen den gemessen wurde bestand aus rH<sub>2</sub>O oder dem Puffer in dem die DNA gelöst war. Eine Messung mit diesen Einstellungen resultierte neben einer Anzeige der Konzentration in der Ausgabe des Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) oder 230 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>). Beide Quotienten geben Auskunft über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Salzen und sollten in Bereich  $\geq 1,8$  liegen.

#### **4.4.7 Präparation von PCR-Produkten**

##### **4.4.7.1 Direkte Aufreinigung von PCR-Ansätzen**

PCR-Produkte wurden mithilfe des „PCR Purification Kits“ der Fa. Jena Bioscience, des „Cycle-Pure Kits, peqGOLD“ der Fa. Peqlab oder des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Systems“ der Fa. Promega direkt aus den PCR-Ansätzen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

##### **4.4.7.2 Aufreinigung mittels Gelextraktion**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Gelextraktion erfolgte über das „Agarose Gel Extraction Kit“ der Fa. Jena Bioscience, das „Gel Extraction Kit, peqGOLD“ der Fa. Peqlab oder das „Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System“ der Fa. Promega. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

#### **4.4.8 Enzymatische DNA-Modifikationen**

##### **4.4.8.1 DNA-Verdau für nachfolgende Ligation**

Restriktionen von DNA wurden zur präparativen Vorbereitung von Klonierungsexperimenten, sowie zur Analytik von Klonierungen und fertigen Plasmiden durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden



## Material und Methoden

von der Fa. Jena Bioscience oder von der Fa. New England Biolabs bezogen. Die Ansätze wurden für 1 ½ bis 2 ½ h bei 37 °C inkubiert und für 20 min bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. Auf eine eventuelle Dephosphorylierung (4.4.8.2) folgte die Extraktion der verdauten DNA, entweder durch die direkte Aufreinigung der Ansätze (4.4.7.1), oder mittels Gelextraktion (4.4.7.2). Aus Tab. 47 und Tab. 48 sind die Standardzusammensetzungen der Verdauung zu entnehmen.

**Tab. 47.** Zusammensetzung des Restriktionsverdau von Vektoren.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Vektor	100 - 500 ng
Restriktionsenzym(e)	1 µL
Puffer (10 x)	2 µL
rH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

**Tab. 48.** Zusammensetzung des Restriktionsverdau von PCR-Produkten.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
PCR-Produkt	10 µL
Restriktionsenzym(e)	Je 1 µL
Puffer (10 x)	2 µL
rH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

### **4.4.8.2 Dephosphorylierung**

Nach einem Restriktionsverdau wurden linearisierte Vektoren an ihren 5'- und 3'-Enden dephosphoryliert um die Wahrscheinlichkeit einer Rezirkularisierung des linearen Vektors während einer folgenden Ligation (4.4.8.3) zu minimieren. Hierzu wurde das Enzym ‚Antarctic Phosphatase‘ der Fa. New England Biolabs verwendet.

**Tab. 49.** Zusammensetzung der Dephosphorylierungsreaktionen.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Restriktionsverdau	20 µL
Antarctic Phosphatase Puffer (10 x)	3 µL
Antarctic Phosphatase (5 U/µL)	1 µL
rH <sub>2</sub> O	7 µL

Es wurde für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Die dephosphorylierten, linearen Vektoren wurden dann mittels direkter Aufreinigung (4.4.7.1) oder Gelextraktion (4.4.7.2) extrahiert.

### **4.4.8.3 DNA-Ligation mittels T4-DNA-Ligase**

Zur Ligation von kompatiblen DNA-Enden wurde die T4-Ligase der Fa. Jena Bioscience benutzt. Die Zusammensetzung wurde für jede Ligation individuell aus der Konzentration der PCR-Fragmente und der Vektoren berechnet. Dabei betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Insert, wenn möglich, idealerweise 1:3. Die Ligationsansätze wurden für 1 h 30 min bei RT, ü. N. bei 16 °C, oder 2 ½ Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 20 min bei 65 °C inaktiviert und in kompetente Bakterienzellen transformiert (4.5).

### **4.4.8.4 DNA-Ligation mittels Ligase-unabhängiger Klonierung (LIC)**

Ligase-unabhängige Klonierungen wurden nach dem Protokoll von Bonsor *et al.* (2006) durchgeführt.<sup>192</sup> Primer mit den benötigten Überhängen (Tab. 14) wurden entsprechend der Vorgaben von Sabbadin *et al.* (2010) konstruiert.<sup>190</sup>

### **4.4.8.5 TA-Klonierung**

PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden, besitzen eine zusätzliche Base am 3'-Terminus. Hierbei handelt es sich fast immer um ein Adenosin. Aufgrund dieser Eigenschaft können entsprechende Produkte ohne weitere Behandlung in einen Vektor kloniert werden, der mit glatten Enden linearisiert und an den 3'-Enden mit Thymidin-Überhängen versehen wurde. Diese Methode diente dazu, um DNA-Regionen, die zur Identifikation des Biphenomycin-Genclusters mittels degenerierter Primer und Taq-Polymerase amplifiziert wurden, direkt in pBluescript II SK zu integrieren. Zur Herstellung eines entsprechend präparierten Vektors wurde das Protokoll von Marchuk *et al.* (1991) verwendet.<sup>311</sup> Hierfür wurden 10 µL einer pBluescript II SK-Lösung mittels *EcoRV* linearisiert (Kapitel 4.4.8.1) und das Restriktionsenzym anschließend inaktiviert (80 °C, 20 min). Dann wurden dem Restriktionsansatz 1 U Taq-Polymerase / µg Plasmid-DNA / 20 µL Ansatz sowie dTTP in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 70 °C inkubiert und anschließend, wie bei PCR-Produkten, aufgereinigt (4.4.7.1). Für die eigentliche TA-Klonierung wurde

das aufgereinigte PCR-Fragment und der entsprechend präparierte Vektor pBluescript II SK mittels T4-Ligase ligiert (Kapitel 4.4.8.3) und anschließend transformiert (Kapitel 4.5).

### **4.4.8.6 Gibson-Assemblierung**

Größerer DNA-Fragmente ( $\geq 5$  kb), wie vollständige Gencluster oder Teile hiervon, wurden mittels Gibson-Assemblierung kloniert. Hierfür wurden mithilfe der Onlineanwendung ‚NEBuilder‘ (Kapitel 4.1.5) spezifische Primer generiert. Für die Überhänge wurde dabei eine Länge von mindestens 20 bp verwendet. Bei Bedarf wurde ausgewählt die evtl. zur Linearisierung des Vektors verwendete Restriktionsschnittstelle zu regenerieren. In einer nachfolgende Q5-PCR (Kapitel 4.4.4.2) wurden diese Primer verwendet, um den Vektor (pBluescript) oder das Insert (*bip*-Cluster aus *S. filipinensis* oder *S. griseorubiginosus*) zu amplifizieren. Das jeweilige Produkt konnte dann über eine PCR-Aufreinigung (Kapitel 4.4.7.1) (pBluescript) oder eine Gelextraktion (Kapitel 4.4.7.2) (*bip*-Cluster aus *S. filipinensis* oder *S. griseorubiginosus*) gereinigt werden. Der zweite Bestandteil der Assemblierung (entsprechendes Insert oder Vektor) wurden mittels Restriktionsverdau generiert/linearisiert (Kapitel 4.4.8.1). Hierfür wurde zum einen ein 8,2 kb großes Fragment (Teilstück von *fmoK* [761 bp], *fmoA5*, *fmoL* und ein Teilstück des TK-Gens [593 bp]) über den Verdau von pCC1Fos::Sf-JBIR-6 mit *PstI* erzeugt. Zum anderen wurde der Vektor pET-28b-SUMO mit *BamHI* verdaut und anschließend dephosphoryliert (Kapitel 4.4.8.1 und 4.4.8.2). Beide DNA-Fragmente wurden mittels PCR-Aufreinigung oder Gelextraktion gereinigt.

Die eigentliche Assemblierung der jeweiligen Kombinationen (pBluescript plus 8,2 kb-Fragment; pET-28b-SUMO plus *bip*-Cluster aus *S. filipinensis* oder *S. griseorubiginosus*) erfolgte unter Verwendung von 10  $\mu$ L des „HiFi DNA Assembly Mix“ (2x, NEB „HiFi DNA Assembly Cloning Kit“) und 10  $\mu$ L einer Mischung aus Vektor und Insert. Letztere besaß ein ‚Vektor zu Insert‘-Verhältnis von 1:2, wobei mindestens 0,02 pmol des entsprechenden Vektors eingesetzt wurden. Die 20  $\mu$ L-Ansätze wurden für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Von dieser Lösung wurden dann 10  $\mu$ L mittels Hitzeschock-Transformation in chemokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (Kapitel 4.5).

### **4.4.8.7 DNA-Verdau zur Identitätsprüfung (Testverdau)**

Klone, die in einer Screening-PCR (Kapitel 4.4.4.3) positiv erschienen, wurden unter Standardbedingungen angezogen (Kapitel 4.3.1) und einer Plasmidpräparation unterzogen (Kapitel 4.4.3). Ein Teil der Plasmidlösungen wurde anschließend einem Testverdau mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen unterzogen (Tab. 50). Dabei sollte ein charakteristisches Bandenmuster generiert

## Material und Methoden

werden, das eine eindeutige Identifizierung von Vektoren mit dem gewünschten Insert erlaubte. Vektoren, welche auch im Testverdau positiv erschienen, konnten in der Folge für eine DNA-Sequenzierung genutzt werden.

**Tab. 50.** Zusammensetzung der Restriktionsanalytik neu klonierter Konstrukte.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Plasmid	50 - 200 ng
Restriktionsenzym(e)	Je 0,5 µL
Puffer (10 x)	1 µL
rH <sub>2</sub> O	ad 10 µL

### **4.4.9 DNA-Sequenzierung**

Zur Überprüfung einer erfolgreichen und mutationsfreien Klonierung der jeweiligen DNA-Sequenzen wurden die entsprechenden Plasmide oder PCR-Produkte an die Fa. GATC Biotech AG geschickt. Dies erfolgte entweder in aufgereinigter Form (20 µL des jeweiligen Templats) oder als fertige Mischung aus Templat und Primer (10 µL), die nach Angaben des Dienstleisters hergestellt wurde. Für die Sequenzierung wurden dabei verschiedene Standardprimer oder die die jeweiligen Amplifikationsprimer verwendet (Tab. 14). Eine Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte über die Alignment-Funktion („Geneious Alignment“ mit Standardeinstellungen) von Geneious (Kapitel 4.1.5).

Nur wenn eine mutationsfreie Klonierung nachgewiesen werden konnte, wurde eine Stammkultur des jeweiligen Klons angelegt und dieser für weitere Experimente verwendet. In allen anderen Fällen wurde der Klon verworfen und weitere Plasmide oder PCR-Produkte sequenziert.

### **4.4.10 Sequenzierung chromosomaler DNA von Streptomyceten und Genom-Analyse**

Die vollständige Sequenzierung der chromosomalen DNA von Streptomyceten erfolgte durch die Fa. GATC Biotech AG. Hierfür wurde die jeweilige gDNA extrahiert (Kapitel 4.4.2.1 und 4.4.2.2) und deren Konzentration und Reinheit überprüft (Kapitel 4.4.6). Wenn die gemessenen Werte den Vorgaben der GATC Biotech AG entsprachen (mindestens 8 - 10 µg DNA, ca. 200 ng/µL, A260/280 ≥ 1,8, A260/230 ≥ 1,9), wurde eine ausreichende Menge gDNA zur Sequenzierung zur Verfügung gestellt. Die Sequenzierung selbst erfolgte dann mittels Illumina-Verfahren im Falle von *S. filipinensis* NRRL 3217 und SMRT-Verfahren im Falle von *S. griseorubiginosus* No. 43708.

Die resultierenden Sequenzdaten wurden durch die Fa. BaseClear B. V. (*S. filipinensis* NRRL 3217) und/oder durch die GATC Biotech AG (*S. filipinensis* NRRL 3217 und *S. griseorubiginosus* No. 43708) assembliert. Die so generierten Contigs wurden durch die entsprechenden Firmen zur Verfügung gestellt. Eine weitergehende Analyse dieser Contigs erfolgte standardmäßig über die Programme ‚Geneious‘ und ‚RAST‘ (automatisierte CDS-Vorhersage und -Annotierung) sowie ‚antiSMASH 3.0‘ (Vorhersage von Naturstoffgenclustern).

### **4.5 Transformation von *Escherichia coli***

#### **4.5.1 Präparation chemokompetenter *E. coli*-Zellen**

2,5 mL einer frischen Übernachtskultur wurden in 250 mL SOC-Medium überführt und bei 18 °C (200 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde steril entnommen und das Pellet in 80 mL 4 °C kaltem TB-Puffer (Kapitel 4.3.7.1) resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gekühlt. Die Kulturen wurden ein weiteres Mal für 10 min bei 4.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand steril entnommen. Das Pellet wurde in 18,6 mL 4 °C kaltem TB resuspendiert, 1,4 mL DMSO (99,5%, 37 °C) zugegeben und die Suspension für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden jeweils 100 µL in vorgekühlten, sterilen 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **4.5.2 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen**

2,5 mL einer frischen Übernachtskultur wurden in 200 mL LB-Medium überführt und bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 4 °C für 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden nacheinander mit 200 mL, 100 mL, und 50 mL einer 4 °C kalten, Glycerinlösung (10% v/v) gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten jeweils für 5 min bei 5.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Glycerinlösung (10% v/v) resuspendiert und in sterile, vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße zu 70 µL aliquotiert. Mit flüssigem Stickstoff wurden diese schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **4.5.3 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock**

20 µL der Ligationsansätze oder 0,5 - 1 µL Plasmid wurden in 100 µL kompetenter Zellkultur suspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und erneut 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 500 µL LB-Medium zugegeben und die Lösung für 30 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

#### **4.5.4 Transformation elektrokompeterer *E. coli*-Zellen mittels Elektroschock**

5 - 10 µL der Ligationsansätze oder 1 - 100 ng Plasmid wurden zu 70 µL einer auf Eis aufgetauten kompetenten Zellsuspension hinzugegeben und in sterile, eisgekühlte, Elektroporationsküvetten (Schichtdicke 2 mm) überführt. In einem Elektroporator (Programm EC 2) wurden die Zellen einer kurzzeitigen Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und das Gemisch in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, die Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

### **4.6 Heterologe Proteinüberproduktion in *Escherichia coli***

#### **4.6.1 Testexpression zur Überprüfung der Expressionsbedingungen**

Standardmäßig wurden alle heterologen Proteine mit Polyhistidin-Tag einer Testexpression unterzogen, bevor sie in größerem Maßstab produziert und aufgereinigt wurden. Dies diente dazu die optimalen Expressionsbedingungen für jedes Protein zu determinieren. Eine Testexpression erfolgte unter Verwendung der verschiedenen Konstrukte, welche auf den Expressionsvektoren pHis8 (bzw. pHis8-TEV oder pHis8C(+)-TEV) oder pGS-21a basieren (Tab. 13). Für die Expression selbst wurden 50 - 75 mL LB-Medium mit einer Vorkultur von *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* SoluBL21™, welche den jeweiligen Vektor trugen, beimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 angezogen und dann für 30 min bei 4 °C gekühlt. Anschließend wurde je 1 mL als uninduzierte Probe entnommen, bei 9.000 rpm für 2 min (RT) zentrifugiert, das Pellet in 100 µL rH<sub>2</sub>O gelöst und die Suspension bei -20 °C gelagert. Die restliche Kultur wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und ü. N. bei 16 °C (teils 18 °C) und/oder 20 °C (teils 22 °C) und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur für 30 min bei 4 °C gekühlt und dann bei 10.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in

## Material und Methoden

Lysispuffer resuspendiert und per Ultraschall lysiert (Kapitel 4.6.3). Dem Lysat wurden dann 100 µL entnommen und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 290 µL rH<sub>2</sub>O resuspendiert und der Überstand mit 210 µL rH<sub>2</sub>O versetzt. Von der Probe der uninduzierten Zellen vom Vortag und den Lösungen von Pellet und Überstand wurden anschließend je 20 µL entnommen, mit 5 µL des 5-fachen SDS-Ladepuffers (Kapitel 4.3.7.7) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die resultierenden Proben wurden dann für eine nachfolgende SDS-PAGE (Kapitel 4.8) verwendet.

### 4.6.2 Proteinüberproduktion

Für eine Proteinüberproduktion mit nachfolgender Aufreinigung wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt. Hierfür konnte entweder ein Klon von einer Agarplatte oder eine Stockkultur (Kapitel 4.3.2) des jeweiligen Expressionsstammes verwendet werden. Mit diesen wurden 5 - 20 mL LB-Medium plus Antibiotikum beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 250 mL TB-Medium (1 L Erlenmeyerkolben) oder 500 - 600 mL TB-Medium (2 L Erlenmeyerkolben) plus Antibiotikum im Verhältnis 1:100 mit dieser Vorkultur beimpft. Die Hauptkultur wurde ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die sterile Zugabe eventueller Additive (Kapitel 4.3.6) für die Produktion Cofaktor-haltiger Proteine erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6. Nach weiterer Inkubation bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,4 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt. Dann wurde eine 1 mL-Probe entnommen, zentrifugiert (2 min, 9.000 rpm, RT), das Pellet in 100 µL rH<sub>2</sub>O resuspendieren und bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinüberproduktion mit 0,5 mM IPTG und die Kultur wurde ü. N. bei den Bedingungen inkubiert, die im Vorfeld (Kapitel 4.6.1) als optimal bestimmt wurden (Tab. 51). Die Zellen wurden im Anschluss für 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet entweder bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverwendet.

**Tab. 51.** Expressionsbedingungen der in dieser Arbeit verwendeten Proteine und Enzyme (Geschwindigkeit immer 200 rpm).

Protein	Vektor	Stamm	Temperatur
<b>CYP450s</b>			
ComI	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
ComI-mT	pHis8C(+)-TEV	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	22 °C
ComJ	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
ComJ-mT	pHis8C(+)-TEV	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	22 °C
ComJ-m17AS	pHis8-TEV	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
Cit-P450	pGS-21a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C

## Material und Methoden

ComI-RED	LICRED	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
ComJ-RED	LICRED	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
Cit-P450-RED	LICRED	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
ComI-21aRED	pGS-21a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
ComJ-21aRED	pGS-21a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
Cit-P450-21aRED	pGS-21a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
<b>PCP-Domänen &amp; X-Domäne</b>			
ComC-PCP1	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3) oder <i>E. coli</i> BAP1	18 °C
ComD-PCP	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3) oder <i>E. coli</i> BAP1	18 °C
ComD-PCP+X	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
ComD-X	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	20 °C
<b>Elektronentransport I. NADPH-Fd-Oxidoreduktasen</b>			
Fpr-DH5 $\alpha$	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	22 °C
Fpr-mT	pHis8C(+)-TEV	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	22 °C
AdR	pHis8	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C
<b>Elektronentransport II. Ferredoxine</b>			
ComK	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3) plus pRKISC	16 °C
PetF	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3) plus pRKISC	22 °C
Adx4-108	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
Adx1-128	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	16 °C
<b>Sonstige Helferproteine</b>			
Gdh-BM3	pHis8	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	17 °C
Sfp	pET-29a(+)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	18 °C
TEV-Protease	pET	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	18 °C
<b>JBIR-Proteine</b>			
FmoA1	pHis8-TEV	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C
FmoB	pHis8	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C
FmoC	pHis8-TEV	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C
FmoD	pGS-21a	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C
FmoE	pHis8-TEV	<i>E. coli</i> SoluBL21™	16 °C

### 4.6.3 Zellaufschluss

Um die Proteine aus den Zellen zu isolieren und aufzureinigen, wurde das Pellet aus Kapitel 4.6.2 in 4 °C kaltem Lysispuffer (4 mL/g Pellet) resuspendiert. Alle weiteren Schritte des Zellaufschlusses sowie der Aufreinigung wurden auf Eis durchgeführt. Mittels des Ultraschallhomogenisators wurden die



## Material und Methoden

Zellen lysiert, indem 10 - 30 mL Zellsuspension 6 - 10 Mal für 10 s (80% Intensität) beschallt wurden. Zwischen zwei Beschallungen wurde eine Pause von jeweils 10 s eingelegt. In einem Rosettengefäß wurden alternativ, für größere Pelletvolumina, die Suspensionen 8 min jede zweite Sekunde beschallt. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet verworfen. Zu analytischen Zwecken wurden dem Zelllysate vor der Zentrifugation 100 µL entnommen und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 290 µL rH<sub>2</sub>O und der Überstand in 210 µL rH<sub>2</sub>O resuspendiert. Von diesen Proben wurden je 20 µL entnommen, mit 5 µL des 5-fachen SDS-Ladepuffers (Kapitel 4.3.7.7) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und für eine nachfolgende SDS-PAGE (Kapitel 4.8) verwendet.

### **4.6.4 Standardaufreinigung von Proteinen mit His-Tag**

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine mit His-Tag wurde der Überstand der Zelllysate (Kapitel 4.6.3) mit einer Ni-NTA-Agarose-Lösung der Fa. Jena Bioscience (1 mL/L Zellkultur) versetzt und für 30 - 60 min unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Pierce™ Zentrifugationssäule der Fa. Thermo Scientific Fisher gegeben, die das Harz mit dem gebundenen Fusionsprotein zurückhält und den Überstand mit den nativen Proteinen des Expressionsstamms passieren lässt. Das Harz wurde dann mit den Waschpuffern 1 - 2 (Tab. 29) gewaschen. Hierbei wurden standardmäßig 20 mL Waschpuffer 1 und 5 mL Waschpuffer 2 pro 0,5 mL Ni-NTA-Agarose-Lösung verwendet. Bei Bedarf wurden die jeweiligen Volumina vergrößert, um eine höhere Reinheit zu erzielen, oder verringert, um einen Verlust des Proteins mit His-Tag zu vermeiden. Da der hohe Imidazolgehalt von Waschpuffer 3 (Tab. 29) häufig zu einem teilweisen Verlust des rekombinanten Proteins führt, fand dieser lediglich Verwendung (variables Volumen), wenn mittels der Waschpuffer 1 und 2 keine ausreichende Reinheit des gewünschten Proteins erreicht werden konnte. Mittels 2,5 mL des Elutionspuffers (Tab. 29) wurde das Protein in mehreren Fraktionen (je 500 - 750 µL) von der Säule eluiert. Von den Waschfraktionen, sowie den Elutionsfraktionen wurden je 20 µL entnommen, mit 5 µL des 5-fachen SDS-Ladepuffers (Kapitel 4.3.7.7) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **4.6.5 Aufreinigung von CYP450s unter Rekonstitution mittels Häminchlorid**

Als Ergänzung oder anstatt einer Supplementierung von CYP450-Expressionkulturen mit 5-Aminolävulinäure wurden die entsprechenden Enzyme im Zuge ihrer Aufreinigung mittels Häminchlorid rekonstituiert. Die Aufreinigung wurde dabei entsprechend den Angaben in Kapitel 4.6.4 durchgeführt,

bis das Ni-NTA-Harz mit den Waschpuffern 1 und 2 gewaschen war. Das CYP450 wurde in der Folge jedoch eluiert, sondern das Harz mit 2 x 15 mL Tris-HCl-Puffer (plus Glycerol, Kapitel 4.3.7.10) gespült, um Reste des Waschpuffers 2 zu entfernen. Anschließend wurde es in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen des Typs Falcon® (Fa. Sarstedt) überführt und das Volumen mit Tris-HCl mit Glycerol auf 10 mL aufgefüllt. Dieser Lösung wurden 200 µM Häminchlorid zugegeben. Die Häminchlorid-Stammlösung wurde dabei kurz vor Gebrauch frisch in 0,1 M NaOH angesetzt und die Konzentration mittels des Implen Nanophotometers P330 über die Absorption bei 385 nm ( $\epsilon = 58,44 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt.<sup>198</sup> Die Rekonstitution der Nickel-NTA-gebundenen Cytochrom P450-Enzyme erfolgte anschließend für 3 - 6 h (ComI und ComJ oder deren Derivate) oder ü. N. (Cit-P450 und dessen Derivate, FmoC) unter leichtem Schütteln auf Eis.

Die Dauer der Rekonstitution wurde dabei in Voruntersuchungen mit dem entsprechenden CYP450, welches über eine Standardvorgehen aufgereinigt wurde (Kapitel 4.6.4), getestet. Dabei wurde die konzentrierte Proteinlösung mit variablen Häminchlorid-Konzentrationen (100 bis 180 µM, generell aber 3 x die Konzentration des aufgereinigten CYP450) inkubiert und die Änderung des Verhältnisses von A420/A280 über die Zeit beobachtet. War keine Zunahme des Verhältnisses mehr zu erkennen, zeigt dies den Abschluss der Rekonstitution an. Bei schnellen Rekonstitutionen (< 6 h) wurde das Nickel-NTA-gebundene, rekombinante Proteine im Folgenden für 3 - 6 h inkubiert. Wenn die Rekonstitution erst am nächsten Tag abgeschlossen war, erfolgte eine Inkubation über Nacht.

Nach Abschluss der Rekonstitution wurde das Ni-NTA-Harz wieder in die Pierce™ Zentrifugationssäule (Fa. Thermo Scientific Fisher) überführt und erneut mit 8 x 10 mL Tris-HCl-Puffer mit Glycerol (Kapitel 4.3.7.10) gespült, um restliches Häminchlorid zu entfernen. Abschließend erfolgte die Elution des CYP450, wie bereits beschrieben (Kapitel 4.6.4).

### **4.6.6 Entsalzung und Aufkonzentration von aufgereinigten Proteinen**

Die Lösungen der mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden über die Verwendung einer PD-10-Säule oder eines Dialyseschlauchs entsalzt und anschließend aufkonzentriert.

#### **4.6.6.1 Entsalzung mittels PD-10-Säule**

Die Elutionsfraktionen aus Kapitel 4.6.4 wurden gepoolt und mittels PD-10-Entsalzungssäulen der Fa. GE Healthcare entsalzt und umgepuffert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

### **4.6.6.2 Entsalzung mittels Dialyseschlauch**

Das Eluat aus Kapitel 4.6.4 oder andere Proteinlösungen wurden mittels eines Dialyseschlauchs des Typs ‚SnakeSkin Dialysis Tubing, 10 MWCO, 16 mm dry I.D.‘ der Fa. Thermo Scientific entsalzt und umgepuffert. Hierfür wurde die Proteinlösung in ein Stück Schlauch mit passender Länge (nach Herstellerangaben) gefüllt, der vorher für 5 - 10 min mit dem gewünschten Puffer befeuchtet wurde. Die Enden wurden anschließend mit passenden Klammern fest verschlossen, der Schlauch in 1 L des Dialysepuffers gegeben und bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Nach 3 h wurde der Puffer gewechselt (erneut 1 L) und das Protein ü. N. bei 4 °C unter leichtem Rühren weiter dialysiert.

### **4.6.7 Aufkonzentration**

Die mittels PD-10-Säule oder Dialyseschlauch entsalzten Proteinlösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben über Vivaspin®-Zentrifugalkonzentratoren der Fa. Sartorius Stedim Biotech eingengt bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Die verwendeten Vivaspin®-Zentrifugatoren besitzen eine semipermeable Membran und arbeiten über Molekulargewichtsausschlussgrößen (engl. „Molecular weight cut-off“, MWCO). Die Porengröße der ausgewählten Membran bestimmt dabei über Größenausschluss die Permeabilität. Sie wurde in der Regel so gewählt, dass sie maximal die Hälfte des Molekulargewichts des zu konzentrierenden Proteins betrug (vgl. Tab. 52). Hierdurch sollte eine ausreichende Retention des Proteins gewährleistet werden. Das Säulenmaterial bestand standardmäßig aus Hydrosart®. Die Lagerung der Proteine erfolgte anschließend für mehrere Tage bei -4 °C oder nach aliquotieren und schockgefrieren der Lösung in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80 °C für mehrere Monate.

### **4.6.8 Abspaltung von Polyhistidin-Tags mittels TEV-Protease**

Für die Herstellung von Kristallisationsansätzen sollte das Polyhistidin-Tag, welches über die Verwendung der Vektoren pHis8-TEV oder pHis8C(+)-TEV an den *N*- oder *C*-Terminus rekombinanter Proteine angefügt wurde, mittels Verdau durch die TEV-Protease entfernt werden. Nach der Aufreinigung und Rekonstitution des CYP450 ComJ-m17AS (pHis8-TEV) wurde das Protein, wie in Kapitel 4.6.6.2 beschrieben, für 3 h mittels Dialyseschlauch entsalzt und umgepuffert (1 L Tris-HCl, 20 mM, pH 7,5). Der Proteinlösung wurde dann TEV-Protease im Konzentrationsverhältnis (mg/mL) 1:3 (TEV-Protease zu ComJ-m17AS) zugegeben. Eine proteolytische Spaltung des Tags erfolgte dann ü. N. unter fortlaufender Dialyse in 1 L frischem Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5) bei 4 °C und leichtem

Rühren. Am folgenden Tag wurde die Vollständigkeit des Verdauens mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.8) überprüft, die Proteinlösung aufkonzentriert (Vivaspin® 20, 30 kDa MWCO, PES; Kapitel 4.6.7) und ComJ-m17AS mittels FPLC (Kapitel 4.6.9) von freiem His8-Tag und TEV-Protease getrennt.

### **4.6.9 Aufreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

Nach der proteolytischen Abspaltung des Polyhistidin-Tags von einem rekombinanten Protein (Kapitel 4.6.8), wurde das gewünschte Proteine mittels FPLC von der hierfür verwendeten TEV-Protease und dem Tag getrennt. Hierfür wurde das Konzentrat (ca. 3 mL) des Verdauansatzes mittels eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße, PTFE) der Fa. Fisherbrand™ filtriert und auf ein ‚ÄKTA pure 25 M1‘-FPLC-System (Fa. GE Healthcare) mit ‚HiLoad 16/600 Superdex 200 pg‘-Säule (Fa. GE Healthcare) und 5 mL ‚Loop‘ gegeben. FPLC-System und Säule wurden dabei vorher mit gefiltertem (‚Filtropur BT50 500 mL 0,45 µm Bottle Top Filter‘, Sarstedt) und entgastem (30 min Ultraschallbad) Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5) äquilibriert. Die Aufreinigung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL/min und wurde bei den Wellenlängen 280 nm (charakteristisch für Proteine) und 420 nm (charakteristisch für CYP450s) kontrolliert. Es wurden 2 mL Fraktionen aufgesammelt. Fraktionen mit einer Absorption bei den entsprechenden Wellenlängen wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.8) überprüft und bei ausreichender Reinheit des gewünschten Proteins gepoolt und die Proteinlösung für eine weitere Verwendung erneut aufkonzentriert (Kapitel 4.6.7).

## **4.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

### **4.7.1 Photometrisch**

Zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die folgende Einstellung des Implen Nanophotometers P330 verwendet: Menüpunkt ‚NanoVolume Applications‘, Unterpunkte ‚Protein‘ und ‚Protein-UV‘; Einstellungen: LID-Factor: 10 (bei zu hohen Konzentrationen automatischer Wechsel auf 50); Dilution: 1.000; Background: On; Protein: Custom; Units: mg/mL. Zusätzlich wurden in Abhängigkeit des Vektors, der bei der Überproduktion genutzt wurde, die mittels ‚Protein Calculator‘ (Kapitel 4.1.5) vorhergesagten Massen (auf die zweite Nachkommastelle gerundet) und Extinktionskoeffizienten (bei 280 nm, mit Disulfiden; dieser Wert entspricht der Apofom von Proteinen mit Cofaktor) verwendet. Diese sind in Tab. 52 zusammengefasst. Der Leerwert gegen den gemessen wurde bestand aus dem Puffer in dem das Protein gelöst war.

## Material und Methoden

Die Apoprotein-Extinktionskoeffizienten der NADPH-Fd-Oxidoreduktasen Fpr und AdR sowie der Ferredoxine PetF, Adx1-128 und Adx4-108 in Tab. 52 sind nur der Vollständigkeit halber angegeben. Die eigentliche Konzentrationsbestimmung erfolgte mit den Literaturwerten der Holoproteine. Diese betragen für Fpr bei 456 nm  $\epsilon = 7.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , für AdR bei 450 nm  $\epsilon = 10.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , für PetF bei 422 nm  $\epsilon = 9.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für Adx1-128 / Adx4-108 bei 414 nm  $\epsilon = 11.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .<sup>69,312</sup>

**Tab. 52.** Erwartete Massen und Extinktionskoeffizienten (bei 280 nm; mit allen Disulfiden) der in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Proteine. Die Unterteilung der Proteine erfolgte nach Verwendungszweck oder Herkunft. Die Massen der mit \* gekennzeichneten Holoform der PCP-Domänen errechnen sich wie folgt: Masse Apoform - Masse OH-Gruppe Serin (17,007 Da) + Masse Ppant-Rest (C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>PS; 356,33 Da).

Protein	Vektor	MW [Da]	M-1 cm-1	(mg/mL)-1 cm-1
<b>CYP450s</b>				
ComI	pHis8	47.166,59	31.960	0,6776
	pHis8-TEV	47.214,58	33.240	0,7040
ComI-mT	pHis8C(+)-TEV	45.252,37	31.960	0,7063
ComJ	pHis8	50.083,88	45.900	0,9165
ComJ-mT	pHis8C(+)-TEV	48.169,65	45.900	0,9529
ComJ-m17AS	pHis8-TEV	48.161,74	47.180	0,9796
	pHis8-TEV, geschnitten mit TEV-Protease	45.896,15	45.900	1,0001
Cit-P450	pHis8	52.841,46	61.810	1,1697
	pGS-21a	79.760,34	102.730	1,2880
ComI-RED	LICRED	82.540,17	54.180	0,6564
ComJ-RED	LICRED	85.181,16	68.120	0,7997
Cit-P450-RED	LICRED	88.273,21	89.600	1,0150
ComI-21aRED	pGS-21a	109.782,74	95.100	0,8663
ComJ-21aRED	pGS-21a	112.423,74	109.040	0,9699
Cit-P450-21aRED	pGS-21a	115.515,46	130.520	1,1299
Kis-P450-1-mT	pHis8C(+)-TEV	43.497,95	18.140	0,4170
Kis-P450-2-mT	pHis8C(+)-TEV	49.651,80	26.270	0,5291
<b>PCP-Domänen &amp; X-Domäne</b>				
ComC-PCP1	pHis8	Apoform: 11.122,51	-	-
	pHis8	Holoform*: 11.461,83	-	-
ComD-PCP	pHis8	Apoform: 11.033,44	-	-
	pHis8	Holoform*: 11.372,76	-	-

## Material und Methoden

ComD-PCP+X	pHis8	Apoform: 62.264,71	44.950	0,7219
	pHis8	Holoform*: 62.604,03	44.950	0,7219
ComD-X	pHis8	53.667,91	44.950	0,8376
<b>Elektronentransport I. NADPH-Fd-Oxidoreduktasen</b>				
Fpr-DH5 $\alpha$	pHis8	30.169,59	33.120	1,0978
Fpr-mT	pHis8C(+)-TEV	28.255,42	33.120	1,1722
AdR	pHis8	52.991,33	44.620	0,8420
<b>Elektronentransport II. Ferredoxine</b>				
ComK	pHis8	10.260,45	5810	0,5663
PetF	pHis8	12.901,11	11.050	0,8565
Adx4-108	pHis8	14.067,83	1520	0,1080
Adx1-128	pHis8	16.436,35	1520	0,0925
<b>Sonstige Helferproteine</b>				
Gdh-BM3	pHis8	30.575,67	22.900	0,7490
Sfp	pET-29a(+)	27.200,68	26.980	0,9919
TEV-Protease	pET	26.845,52	32.530	1,2118
<b>JBIR-Proteine</b>				
FmoA1	pHis8-TEV	63.827,78	54.150	0,8484
	pGS-21a	90.698,76	93.790	1,0341
FmoB	pHis8	28.643,24	38.220	1,3343
	pGS-21a	55.562,21	79.140	1,4244
FmoC	pHis8-TEV	46.399,52	69.230	1,4920
	pGS-21a	73.270,5	108.870	1,4859
FmoD	pHis8-TEV	63.363,28	91.680	1,4469
	pGS-21a	90.234,25	131.320	1,4553
FmoE	pHis8-TEV	21.845,62	18.140	0,8304
	pGS-21a	48.716,6	57.780	1,1860

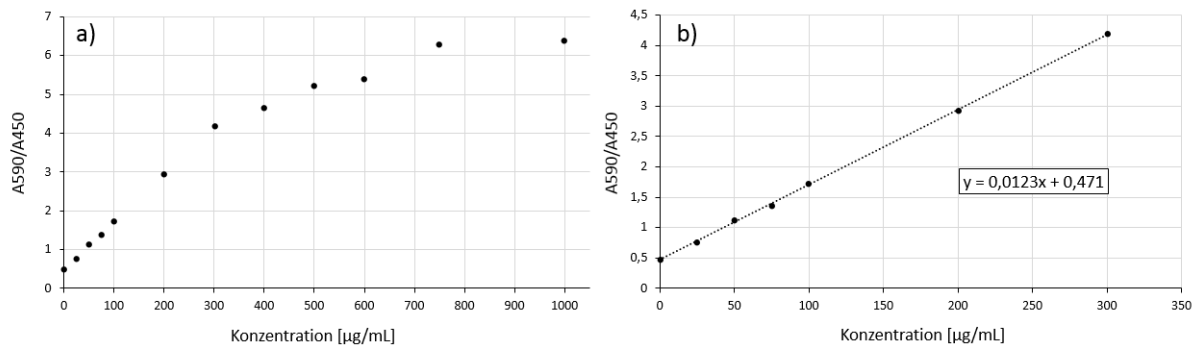
### 4.7.2 Bradford

Für einige Proteine konnte mittels „Protein Calculator“ (Kapitel 4.1.5) kein Extinktionskoeffizient bestimmt werden. In diesen Fällen wurde die Konzentration über die Methode nach Bradford unter Zuhilfenahme der Roti®-Nanoquant-Lösung (Fa. Roth) ermittelt. Dem Protokoll des Herstellers entsprechend wurde dabei eine Eichgerade mit Rinderalbumin (engl. „Bovine serum albumin“, BSA) als Standardprotein und rH<sub>2</sub>O als Leerwert erstellt. Dabei wurde der Quotient aus der Absorption bei

## Material und Methoden

590 nm und der Absorption bei 450 nm gegen die jeweilige BSA-Konzentration (verschiedene Konzentrationen zwischen 0 und 1000 µg/mL) aufgetragen (Abb. 63a).

Für die Messung der eigentlichen Konzentration wurden drei Verdünnungen des zu untersuchenden Proteins mit rH<sub>2</sub>O hergestellt (Standardmäßig 1:500, 1:1000, 1:2000). Das Endvolumen betrug dabei 200 µL. Die Lösungen wurden mit 800 µL der 1 x Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung gemischt. Mithilfe des Implen Nanophotometers P330 konnten anschließend die Absorptionen bei 590 und 450 nm gemessen und direkt der Quotient bestimmt werden (Menüpunkt ‚Functions‘, Unterpunkt ‚Absorbance Ratio‘). Über die Steigung des linearen Bereichs der Eichgerade (Abb. 63b) und unter Beachtung des jeweiligen Verdünnungsfaktors ließ sich dann die Konzentration der drei Proteinlösungen errechnen. Abschließend wurde der Mittelwert der drei Konzentrationen gebildet.



**Abb. 63.** Eichkurve für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford mittels Roti®-Nanoquant-Lösung. **a)** Komplette Kurve **b)** Linearer Bereich mit Steigung der interpolierten Gerade.

### 4.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analytik heterolog überproduzierter Proteine wurde die SDS-PAGE benutzt. Das negativ geladene Dodecylsulfat bindet dabei stöchiometrisch an die Proteine und maskiert ihre Eigenladung. Alle so behandelten Proteine besitzen somit ein identisches Verhältnis von Molekulargewicht und negativer Gesamtladung. Dies kann genutzt werden, um verschiedene Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes ausschließlich anhand ihrer Größe aufzutrennen, da kleinere Proteine hierbei schneller migrieren als größere.

Für eine Trennung wurden vertikale Multigel-Elektrophoresesysteme („Mini-Protean® Tetra Cell“ der Fa. Bio-Rad) verwendet, wobei Gele mit Konzentrationen von 8%, 12% oder 15% Acrylamid, abhängig vom Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins, zum Einsatz kamen. Für kleine Proteine wurden dabei höherprozentige Gele benutzt. Zunächst wurde das Trenngel (Tab. 53) angesetzt und zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche durch Klammern fixiert waren. Mit Isopropanol wurde das Trenngel überschichtet, damit eine gerade, horizontale Grenzschicht zwischen den Gelen entstand.

## Material und Methoden

Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel (4%) (Tab. 54) zugegossen und ein Kamm eingesetzt. Das Trenngel dient hierbei allein zur Trennung der Proteine, wobei das Sammelgel zur Fixierung der Proben dient.

**Tab. 53.** Zusammensetzung von Lösungen zur Herstellung von zwei Trenngelen.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>		
Trenngel mit ... Acrylamid	8%	12%	15%
Trenngel-Puffer (4 x) (Tab. 31)	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
H <sub>2</sub> O	7,5 mL	6,75 mL	5,625 mL
Acrylamid (40% v/v)	3,75 mL	4,5 mL	5,625 mL
APS (10% w/v)	150 µL	150 µL	150 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL

**Tab. 54.** Zusammensetzung einer Lösung zur Herstellung von zwei Sammelgelen.

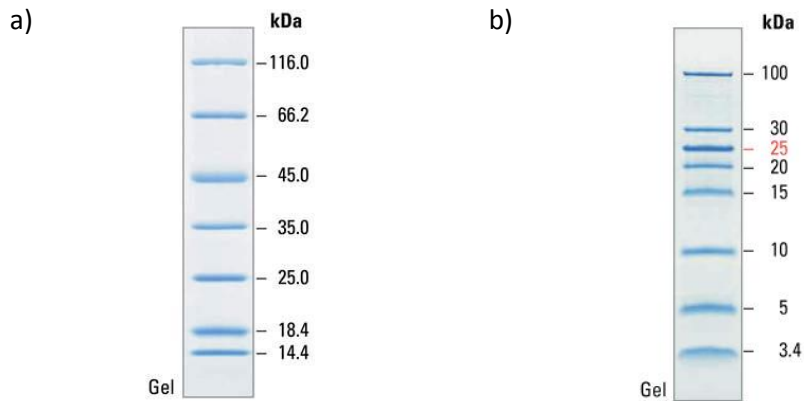
<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Sammelgel mit ... Acrylamid	4%
Sammelgel-Puffer (4 x) (Tab. 32)	1,25 mL
H <sub>2</sub> O	3,25 mL
Acrylamid (40% v/v)	0,5 mL
APS (10% w/v)	50 µL
TEMED	5 µL

Das fertige Gel wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt und dieses mit 1 x SDS-Laufpuffer der Fa. Roth überschichtet. Die Proben, erstellt wie in Kapitel 4.6.3 und 4.6.4 beschrieben, wurden nach Zugabe des Probenpuffers (Kapitel 4.3.7.7) kurz gevortext, für 5 min bei 95 °C denaturiert und erneut gevortext. Je 10 µL der so vorbereiteten Proben wurden dann in die Taschen des Sammelgels überführt. Als Referenz fanden 6 µL des „Unstained Protein Molecular Weight Markers“ oder des „Low Range Unstained Protein Molecular Weight Markers“ (beide Thermo Scientific, Abb. 64) Verwendung. Eine Auftrennung der Proteine fand in der Folge durch das Anlegen eines Stroms von 25 bis 30 A pro Gel statt und wurde beendet, wenn die Lauffront der Proben das Ende der Gele erreichte. Falls die Proteine zur sofortigen Weiterverwendung genutzt wurden, konnte die Färbung der Gele für 15 min mittels „Quick Coomassie Stain“ (Serva) erfolgen, wobei keine Entfärbung nötig war. Andernfalls wurden die Gele mittels „Roti Blue“ der Fa. Roth zunächst für 12 h angefärbt und anschließend für 1 - 3 h mit einer Wasser-Methanol-Waschlösung (25% v/v MeOH) entfärbt. Als dritte Methode wurden die Gele mit einer Coomassie-Färbelösung (10% v/v Eisessig, 30% v/v Methanol, 0,25% w/v Brilliant-



## Material und Methoden

Blau R250) für 30 - 60 min angefärbt und anschließend für 15 - 30 min mit einer Entfärber-Lösung (10% v/v Eisessig, 30% v/v Methanol) entfärbt. Während des Färbens oder Entfärbens wurden die Gele leicht geschüttelt. Die Dokumentation der Gele erfolgte entweder über das ‚Bio-Imaging-System Gene Genius‘ von SynGene oder mithilfe eines handelsüblichen Flachbettscanners.



**Abb. 64.** Die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards für Proteingele der Fa. Thermo Scientific. Die Abbildungen wurden der Homepage des Herstellers (thermofisher.com) entnommen. **a)** „Unstained Protein Molecular Weight Marker“, **b)** „Low Range Unstained Protein Molecular Weight Marker“.

### 4.9 Spektralanalyse von Proteinen

Zur weiteren Charakterisierung von Proteinen mit absorbierenden Cofaktoren über UV/VIS-Spektroskopie wurde die folgende Einstellung des Implen Nanophotometers P330 verwendet: Menüpunkt ‚Functions‘, Unterpunkt ‚Wavescan‘; Einstellungen: Start / End Wavelength: 200 - 800 nm (Standardmäßig); Mode: Absorbance; Pathlength: Abhängig vom auf dem LID angegebenen Wert. Der Leerwert gegen den gemessen wurde bestand aus dem Puffer in dem das Protein gelöst war.

Die Resultate der Messungen wurden über einen an das Nanophotometer angeschlossenen PC mittels des zugehörigen Programms ‚PVC‘ (Kapitel 4.1.5) aufgezeichnet und für weitere Analysen gespeichert.

### 4.10 Charakterisierung von Cytochrom P450-Enzymen

#### 4.10.1 Charakterisierung mittels Reduktion und CO-Bindung

Einem Aliquot der konzentrierten Proteinlösung des CYP450 (10 - 20  $\mu$ L) wurde eine Spatelspitze festen  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  zugegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde ein Teil der Probe sofort mittels Spektralanalyse (Kapitel 4.9) untersucht, um die Reduzierte Form des Enzyms zu detektieren.

Für eine CO-Bindung wurde das CYP450 auf identische Weise reduziert und anschließend 3 x mit ca. 1,5 mL CO durchgast. Auch hier erfolgte die umgehende Spektralanalyse eines Teils der Probe, um das Spektrum des CO-Komplexes aufzuzeichnen.

### **4.10.2 Charakterisierung mittels Differenzspektroskopie nach Imidazol-Zugabe**

Über die Differenzspektroskopie mit Imidazol sollte die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums von CYP450s für potentielle Substrate getestet werden. Hierfür wurden 10 µL Ansätze mit 100 µM des CYP450 und verschiedenen Imidazol-Konzentrationen (0, 2, 5, 7, 5, 15, 20, 30, 50, 70, 100, 150, 200, 300 oder 400 mM) hergestellt. Als Puffer wurde Tris-HCl (50 mM, 10 % v/v Glycerol, pH 7,5) (Kapitel 4.3.7.10) verwendet. Die Präparation der Ansätze erfolgte bei RT mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (0 mM zuerst, 400 mM zuletzt). In der Reihenfolge ihrer Herstellung wurden die Ansätze dann mittels des Implen Nanophotometers P330 einer Spektralanalyse unterzogen (Kapitel 4.9). Anschließend wurden Differenzspektren der jeweiligen Messungen gebildet (Spektrum mit ,X' mM Imidazol minus Spektrum mit 0 mM Imidazol) und graphisch aufgetragen.

Mit steigender Imidazol-Menge verschiebt sich die charakteristische Soret-Bande der CYP450s in Richtung des roten Bereichs des UV/VIS-Spektrums. Daher ergibt sich durch die Bildung der Differenzspektren für jede Imidazol-Konzentration ein Minimum ( $Abs_{min}$ ) und ein Maximum ( $Abs_{max}$ ) bei zwei Wellenlängen zwischen 350 nm und 500 nm (ComI:  $Abs_{min} = 412$  nm,  $Abs_{max} = 433$  nm; ComJ:  $Abs_{min} = 410$  nm,  $Abs_{max} = 434$  nm). Aus beiden Werten ließ sich die Absorptionsänderung nach der folgenden Rechnung bestimmen:

$$\Delta Abs = |Abs_{max}| + |Abs_{min}|$$

Abschließend wurde  $\Delta Abs$  graphisch gegen die jeweilige Imidazol-Konzentration aufgetragen. Die Geschwindigkeit mit der sich die Soret-Bande dabei verschob und die Imidazol-Menge ab der keine Veränderung mehr sichtbar war sind charakteristische Größen für jedes CYP450. Sie ließen Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums zu.

### **4.11 Bindungstests von CYP450s mit der X-Domäne von ComD**

Um die Affinität der X-Domäne von ComD zu verschiedenen CYP450s zu testen, wurde eine Expressionskultur (250 mL TB) von ComD-PCP+X lysiert, die unlöslichen Bestandteile pelletiert (Kapitel 4.6.3) und der resultierende Überstand in fünf Aliquots mit identischem Volumen aufgeteilt. Zu jedem

Aliquot wurden 250 µL Nickelharz gegeben und die Suspensionen für 35 min auf Eis inkubiert, um das lösliche Protein mit Polyhistidin-Tag an das Harz zu binden (vgl. Kapitel 4.6.4). Weiterhin wurden Expressionskulturen (250 mL LB) der Proteine Fpr-mT, ComI-mT und ComJ-mT, welche keinen Polyhistidin-Tag tragen, sowie einer Kultur (250 mL LB) von *E. coli* BL21(DE3) ohne Vektor lysiert und abzentrifugiert (Kapitel 4.6.3). Die Expressionsvektoren für Fpr-mT, ComI-mT und ComJ-mT sowie für die nicht für die Bindungstests verwendeten Kis-P450-1-mT und Kis-P450-2-mT konnten im Vorfeld durch die Klonierung der entsprechenden Gene mit Stopcodon in pHis8C(+)-TEV generiert werden. Der Vektor pHis8C(+)-TEV wurde dabei auf Grundlage von pHis8 nach dem Protokoll von Chiu *et al.* (2008) konstruiert (Kapitel 4.4.4.5).<sup>203,204</sup>

Je einer der vier Überstände wurde dann zu einem Aliquot des Nickelharz-gebundenen ComD-PCP+X gegeben und die resultierenden Lösungen für weitere 35 min auf Eis inkubiert. Das letzte Aliquot von ComD-PCP+X verblieb unbehandelt. Anschließend erfolgte eine Standardaufreinigung aller Ansätze (Kapitel 4.6.4) mit einem Waschschrift (10 mL Waschpuffer 1, Tab. 29) und der Elution der Proteine (2 mL Elutionspuffer, Tab. 29). Proben der uninduzierten Zellen, der Überstände und der Aufreinigungsschritte wurden dann mittels SDS-PAGE überprüft (Kapitel 4.8).

### **4.12 Kristallisation von ComJ-m17AS**

Für die Herstellung von Kristallisationsansätzen wurde eine Lösung (ca. 500 µL) des Cytochrom-P450-Enzyms ComJ-m17AS in Tris-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5) verwendet. Diese wurde im Vorfeld mittels TEV-Protease behandelt (Kapitel 4.6.8) und über eine FPLC aufgereinigt (Kapitel 4.6.9). Ihre Konzentration betrug 9,65 mg/mL. Die Lösung wurde zentrifugiert (25 min, 14.000 rpm, 4 °C) und der Überstand entnommen. Für eine Kristallisation nach dem „Sitting drop“-Verfahren pipettierte dann ein ‚Phoenix-Robot‘-System ComJ-m17AS und die Kristallisationslösungen aus den vorgefertigten Sammlungen ‚Classic Suite‘, ‚JCSG+ Suite‘, ‚PEGs Suite‘ (alle Fa. Quiagen) und ‚Wizard Classic 1 & 2‘ (Fa. Emerald BioSystems / Rigaku) auf Mikrotiterplatten des Typs INTELLI („96 well sitting drop vapor diffusion crystallography plates“, Fa. Art Robbins Instruments). Dabei wurden Proteinlösung und Kristallisationslösungen im Verhältnis von 1:1 gemischt (0,2 µL Proteinlösung und 0,2 µL Kristallisationslösung). Das Fassungsvermögen des Reservoirs betrug 40 µL. Anschließend wurden die Platten luftdicht verschlossen und für mehrere Wochen bei 20 °C gelagert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde das Fortschreiten des Kristallisationsprozesses mikroskopisch geprüft.

### 4.13 Enzymatische Assays im Rahmen des Complestatin-Projekts

#### 4.13.1 Test von Redoxsystemen mit Cytochrom C (CytC) als terminalem Elektronenakzeptor

Die Funktionalität der heterolog überproduzierten Elektronentransfersysteme Fpr/PetF und AdR/Adx sowie die Interaktion von AdR mit dem Ferredoxin ComK wurden nach Zanetti und Curti (1980) in Assays mit NADPH als Elektronendonator und Cytochrom C (CytC) als terminalem Akzeptor überprüft.<sup>186</sup> Die Assays enthielten standardmäßig 200 µM NADPH und 50 µM CytC und variable Konzentrationen der Reduktasen Fpr und AdR sowie der Ferredoxine PetF, Adx1-128, Adx4-108 oder ComK (Tab. 55). CytC und eine weitere Komponente wurden dabei in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5, kein Glycerol) (Kapitel 4.3.7.12) vorgelegt. Die photometrische Untersuchung der Ansätze wurde anschließend bereits gestartet, um die Äquilibration der Lösungen verfolgen zu können. Hierfür wurden 1,6 mL Halb-Mikro-Küvetten (Fa. Sarstedt) und das Nanophotometer P330 (Fa. Implen) verwendet (Menüpunkt ‚Functions‘, Unterpunkt ‚Kinetics‘; Einstellungen: Wavelength: 550 nm; Delay time: 0; Duration: 15 - 20 min; Interval: 10 s; Mode: Delta A; Factor: 1.0; Pathlength: 10 mm). Nach 2 - 4 min erfolgte die erste Zugabe einer weiteren Assay-Komponente (Tab. 55), wobei eine erneute Äquilibration der Lösungen für einige Minuten durchgeführt wurde. Nach 5 - 12 min erfolgte die Komplettierung der Assays durch Zugabe der letzten Komponente (Tab. 55). Hierdurch wurde die Elektronenübertragung von NADPH auf CytC gestartet. Das Endvolumen aller Ansätze betrug 0,8 oder 1 mL. Die Resultate der Messungen wurden über einen an das Nanophotometer angeschlossenen PC mittels des zugehörigen Programms ‚PVC‘ (Kapitel 4.1.5) aufgezeichnet und für weitere Analysen gespeichert.

**Tab. 55.** Zusammensetzung der Assays zum Test der Elektronentransfersysteme Fpr/PetF, AdR/Adx und AdR/ComK.

Assay		Bestandteil (Endkonzentration)			
		Vorgelegte Komponenten		Zugabe 1	Zugabe 2
Fpr/PetF-System	Ansatz 1	CytC (50 µM)	NADPH (200 µM)	PetF (10 µM)	Fpr (10 µM)
	Ansatz 2	CytC (50 µM)	NADPH (200 µM)	Fpr (10 µM)	PetF (10 µM)
	Ansatz 3	CytC (50 µM)	PetF (10 µM)	Fpr (0,1 µM)	NADPH (200 µM)
AdR/Adx-System	Ansatz 1	CytC (50 µM)	NADPH (200 µM)	Adx1-128 (10 µM)	AdR (1 µM)
	Ansatz 2	CytC (50 µM)	NADPH (200 µM)	AdR (0,01 µM)	Adx1-128 (0,1 µM)
	Ansatz 3	CytC (50 µM)	Adx1-128 (0,1 µM)	AdR (0,01 µM)	NADPH (200 µM)
	Ansatz 4	CytC (50 µM)	NADPH (200 µM)	Adx4-108 (1,35 µM)	AdR (0,5 µM)

## Material und Methoden

AdR/ComK-System	Ansatz 1	CytC (50 $\mu\text{M}$ )	ComK (22,9 $\mu\text{M}$ )	AdR (0,02 $\mu\text{M}$ )	NADPH (200 $\mu\text{M}$ )
	Ansatz 2	CytC (50 $\mu\text{M}$ )	ComK (22,9 $\mu\text{M}$ )	AdR (0,04 $\mu\text{M}$ )	NADPH (200 $\mu\text{M}$ )
	Ansatz 3	CytC (50 $\mu\text{M}$ )	ComK (45,8 $\mu\text{M}$ )	AdR (0,02 $\mu\text{M}$ )	NADPH (200 $\mu\text{M}$ )

### 4.13.2 Test der Glucose-Dehydrogenase (Gdh) aus *Bacillus megaterium*

Um die Funktionalität der Glucose-Dehydrogenase zu testen, wurde Gdh (10  $\mu\text{M}$ ) in einem Assay mit Fpr (2,5  $\mu\text{M}$ ), PetF (5  $\mu\text{M}$ ), NADPH (250  $\mu\text{M}$ ) und Glucose (250  $\mu\text{M}$ ) getestet (1 mL Ansätze). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Fpr gestartet und der Verbrauch oder die Regeneration von NADPH über dessen charakteristisches Absorptionsmaximum bei 340 nm verfolgt. Hierfür wurden 1,6 mL Halb-Mikro-Küvetten (Fa. Sarstedt) und das Nanophotometer P330 (Fa. Implen) verwendet (Menüpunkt ‚Functions‘, Unterpunkt ‚Kinetics‘; Einstellungen: Wavelength: 340 nm; Delay time: 0; Duration: 30 - 40 min; Interval: 30 s; Mode: Delta A; Factor: 1.0; Pathlength: 10 mm). Als Puffer wurden HEPES (25 mM, pH 7,0) (Kapitel 4.3.7.13) oder Tris-HCl (50 mM, 10 % v/v Glycerol, pH 7,5) (Kapitel 4.3.7.10) genutzt. Eine Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Gdh.

Die Resultate der Messungen wurden über einen an das Nanophotometer angeschlossenen PC mittels des zugehörigen Programms ‚PVC‘ (Kapitel 4.1.5) aufgezeichnet und für weitere Analysen gespeichert.

### 4.13.3 Aktivierung der Apo-PCP-Domänen ComC-PCP1 und ComD-PCP mittels Sfp

Durch ein enzymatisches Assay sollte getestet werden, ob die PCP-Domänen ComC-PCP1 und ComD-PCP über Sfp mit dem Ppant-Arm von CoA (**17**) beladen werden können. Hierfür wurde der Ansatz in Tab. 56 verwendet.

**Tab. 56.** Zusammensetzung der enzymatischen Assays mit PCP-Domänen und Sfp.

Bestandteil	Endkonzentration
ComC-PCP1	2 mM
oder	
ComD-PCP	2,5 mM
CoA ( <b>17</b> )	500 $\mu\text{M}$
Sfp	17,5 $\mu\text{M}$

Die entsprechenden Bestandteile wurden in 0,5 mL Ansätzen in Tris-HCl-Puffer mit  $\text{MgCl}_2$  (Kapitel 4.3.7.12) zusammengegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Negativkontrolle erfolgte ohne

## Material und Methoden

Zugabe von Sfp. Nach der Inkubation wurden die Assays für 5 min auf Eis gekühlt, um die enzymatische Reaktion zu stoppen, und für 5 min bei 14.000 rpm und 10 °C zentrifugiert. 50 µL (ComC-PCP1-Assay), 25 µL (Negativkontrollen) oder 12,5 µL (ComD-PCP-Assay) der jeweiligen Überstände wurden per LC-MS vermessen (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘; Kapitel 4.20).

### **4.13.4 Beladung von ComD-PCP+X mit dem CoA-Derivat der linearen Complestatinkette (39)**

Eine Beladung der Didomäne ComD-PCP+X mit der CoA-gebundenen, linearen Complestatin-Kette (**39**), welche von Frau Dr. Aldemir synthetisiert und bereitgestellt wurde, erfolgte analog zu Vitali *et al.* (2003).<sup>147</sup> Hierfür inkubierte man **39** (100 µM; 1:1 gelöst in H<sub>2</sub>O und ACN) und ComD-PCP+X (120 µM) 1 h lang unter dreimaliger Zugabe von Sfp (5 µM alle 20 min) bei 30 °C in Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, kein Glycerol) (Kapitel 4.3.7.12). Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 250 µL. Als Negativkontrolle wurde eine weitere Reaktion ohne Zugabe von CoA-gebundenem Heptapeptid (**39**) hergestellt. Ansatz und Durchführung waren dabei identisch zu den regulären Beladungen. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf Eis inkubiert und dann sofort für eine nachfolgende, enzymatische Biarylkupplungen verwendet.

### **4.13.5 Enzymatische Biarylkupplung der linearen Complestatinkette mittels ComI und ComJ**

Für die eigentliche Biarylkupplung wurden der Didomäne ComD-PCP+X, welche einen Ppant-Arm mit der linearen Complestatinkette trägt, (**40**) (Kapitel 4.13.4) weiteren Assay-Komponenten hinzugefügt (Tab. 57). Die Zugabe erfolgte auf Eis, das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 313,5 µL. Die Zusammensetzung des Assays richtete sich nach Untersuchungen der Vancomycin-Biosynthese durch Woithe *et al.* (2007).<sup>69</sup>

**Tab. 57:** Zusammensetzung der enzymatischen Biarylkupplungsassays, die der Lösung des Substrats **40** zugesetzt wurden.

Bestandteil	ComI	ComJ	Fpr	PetF	NADPH	Gdh	Glucose
Endkonzentration	8 µM	8 µM	10 µM	20 µM	1 mM	20 µM	1 mM

Hierbei wurde zuerst ComJ zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von ComI und eine weitere Inkubation für 30 min bei 30 °C. Zu Vergleichszwecken wurde ein zweiter Ansatz hergestellt, bei dem die Zugabe von ComI und ComJ gleichzeitig stattfand.

## Material und Methoden

Die Inkubation erfolgte hier für 60 min bei 30 °C. Die Reaktionsgefäße wurden mit perforiertem Parafilm verschlossen, um den Zugang von Luftsauerstoff zu den Ansätzen zu ermöglichen, ohne dass ein Verlust von Reaktionsvolumen durch Verdunstung zu befürchten war. Die Herstellung der Negativkontrolle erfolgte ebenfalls mit gleichzeitiger Zugabe der beiden CYP450s. Hierbei wurde eine Reaktion zur PCP-Beladung ohne **39** mit den Assay-Komponenten komplettiert. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls für 60 min bei 30 °C inkubiert.

Den drei Ansätzen wurde anschließend 1/13 ihres Gesamtvolumens (24,1 µL) von einer wässrigen Methylhydrazin-Lösung (50% v/v) zugegeben, um den Thioester zwischen Ppant-Arm und der gebundenen Peptidkette zu spalten. Die resultierende Lösung wurde für 30 min bei 30 °C (800 rpm) inkubiert. Im Anschluss konnten die Proteine durch Zugabe von 2% (v/v) TFA gefällt und mittels Zentrifugation (13.500 rpm, 10 min, RT) entfernt werden. Ein Teil des löslichen Überstands (65 µL) wurde per LC-MS mit einer ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4'-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) und dem Programm ‚Biarylkupplung‘ (Kapitel 4.20) analysiert.

### **4.14 Enzymatische Biarylkupplung linearer Vorläufer von Cittilin A (47)**

Die überproduzierten und aufgereinigten Enzyme (Kapitel 4.6) Cit-P450 (aus pGS-21a) oder Cit-P450-21aRED wurden zusammen mit den anderen Bestandteilen des Assays (Tab. 58) in HEPES-Puffer (Kapitel 4.3.7.13) auf Eis gemischt (200 µL-Maßstab) und die Reaktion durch Zugabe von Cit-P450 oder Cit-P450-21aRED gestartet. Die linearen Substrate **48** und **49** wurden durch Prof. Rolf Müller (Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Saarbrücken) zur Verfügung gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden mit perforiertem Parafilm verschlossen, um den Zugang von Luftsauerstoff zu den Ansätzen zu ermöglichen, ohne dass ein Verlust von Reaktionsvolumen durch Verdunstung zu befürchten war. Eine Negativkontrolle erfolgte jeweils ohne Zugabe des CYP450. Nach einer Inkubation der Ansätze für 2,5 Stunden bei 30 °C (300 rpm) wurde die Reaktion für 10 min auf Eis gestoppt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min bei 10 °C) und 25 µL der Überstände mittels LC-MS (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘; Kapitel 4.20) analysiert. Zusätzlich erfolgte die Analyse der einzelnen Assay-Bestandteile in den verwendeten Konzentrationen.

**Tab. 58:** Zusammensetzung der enzymatischen Biarylkupplungsassays mit Cit-P450 (pGS-21a) oder Cit-P450-21aRED.

<b>Bestandteil</b>	Cit-P450 <i>oder</i> Cit-P450-21aRED	<b>48</b> <i>oder</i> <b>49</b>	Fpr	PetF	NADPH	Gdh	Glucose
<b>Endkonzentration</b>	8 µM	80 µM	10 µM	20 µM	1 mM	20 µM	1 mM

## 4.15 Enzymatische Assays im Rahmen des JBIR-Projekts

### 4.15.1 Enzymatische Halogenierung von Trp (26) mittels FmoD und FmoE

#### 4.15.1.1 Halogenierung unter Verwendung von Zelllysat-Überständen

Expressionskulturen (500 mL TB-Medium) der Proteine FmoD und FmoE wurden, wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben, lysiert und die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Die resultierenden Überstände wurden auf Eis mit den anderen Assay-Bestandteilen (Tab. 59) gemischt (1 mL-Maßstab). Als Puffer wurde Kaliumphosphatpuffer (10 mM) mit einem pH-Wert von 6,0, 6,6 oder 7,2 (Kapitel 4.3.7.14) verwendet. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des FmoD-haltigen Überstands gestartet und mit perforiertem Parafilm verschlossen. Hierdurch wurde der Zugang von Luftsauerstoff zu den Ansätzen ermöglicht, ohne dass ein Verlust von Reaktionsvolumen durch Verdunstung zu befürchten war. Eine Inkubation erfolgte ü. N. bei 30 °C und 300 rpm. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne FmoD- oder FmoE-Zugabe. Die Reaktionen wurden durch Erhitzen (90 °C für 5 min) gestoppt und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 16 °C) entfernt.

**Tab. 59.** Zusammensetzung der enzymatischen Assays zur Halogenierung von Trp (26) mit Zelllysat-Überständen.

Bestandteil	FmoD	FmoE	FAD	NADPH	Gdh	Glucose	Trp (26)	NaCl
Endkonzentration	50% (v/v)	15% (v/v)	10 µM	2 mM	10 µM	4 mM	0,6 mM	100 mM

Je 50 µL der Überstände der inaktivierten Assays wurden mittels LC-MS analysiert. Dabei wurde eine ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) und das HPLC-Programm ‚Tryptophan‘ verwendet (Kapitel 4.20). Zusätzlich erfolgte die Analyse der einzelnen Assay-Bestandteile in den verwendeten Konzentrationen und des potentiellen Produkts **55**, welches von Frau Dr. Schaefers synthetisiert wurde.<sup>205</sup>

#### 4.15.1.2 Halogenierung unter Verwendung von aufgereinigten Proteinen

Die überproduzierten und aufgereinigten Proteine (Kapitel 4.6) FmoD und FmoE wurden zusammen mit den anderen Bestandteilen des Assays (Tab. 60) in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5, kein Glycerol) (Kapitel 4.3.7.12) auf Eis gemischt (1 mL-Maßstab) und die Reaktion durch Zugabe von FmoD gestartet. Die Reaktionsgefäße wurden dabei mit perforiertem Parafilm verschlossen, um den Zugang von Luftsauerstoff zu den Ansätzen zu ermöglichen, ohne dass ein Verlust von Reaktionsvolumen durch Verdunstung zu befürchten war. Eine Inkubation der Assays erfolgte über Nacht bei 30 °C und 300 rpm.



## Material und Methoden

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne FmoD-Zugabe. In der Folge wurde die Reaktion durch Erhitzen (90 °C für 5 min) gestoppt und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 16 °C) entfernt.

**Tab. 60.** Zusammensetzung der enzymatischen Assays zur Halogenierung von Trp (**26**) mit aufgereinigten Proteinen.

Bestandteil	FmoD	FmoE	FAD	NADPH	Gdh	Glucose	Trp ( <b>26</b> )	NaCl
Endkonzentration	0,32 µM / 1,94 µM*	10 µM	100 µM	1 mM	10 µM	2 mM	80 µM	100 mM

\*: Die Konzentrationen des aufgereinigten Enzyms waren zu gering, um die gewünschte Endkonzentration von 5 - 20 µM zu erreichen. Daher wurden 200 µl des Proteinkonzentrats eingesetzt was in den dargestellten Konzentrationen resultierte.

Je 50 µL der Überstände der inaktivierten Assays wurden mittels LC-MS analysiert. Dabei wurde eine ‚Europher II 100-3 C18A‘-Säule (150 x 4,6 mm mit Vorsäule) und das HPLC-Programm ‚Complestatin‘ verwendet (Kapitel 4.20). Zusätzlich erfolgte die Analyse der einzelnen Assay-Bestandteile in den verwendeten Konzentrationen.

### 4.15.2 Hydroxylierung von Trp (**26**) oder 6-Cl-Trp (**55**) mittels FmoC

Die enzymatische Hydroxylierung von Tryptophan (**26**) und 6-Chlorotryptophan (**55**) erfolgte analog zu den Untersuchungen der Ikarugamycin-Biosynthese durch Greunke *et al.* (2017).<sup>188</sup> Alle Bestandteile (Tab. 61) wurden in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5, kein Glycerol) (Kapitel 4.3.7.12) zusammengefügt (200 µL-Maßstab). Dabei wurden entweder **26** oder **55** als Substrat verwendet. 6-Chlorotryptophan (**55**) wurde dabei von Frau Dr. Schaefers synthetisiert.<sup>205</sup> Neben Reaktionen mit FmoA1, FmoB und FmoC wurden ebenfalls Ansätze ohne die Zugabe von FmoC oder FmoA1 hergestellt, welche als Negativkontrolle (FmoA1B) oder zum Test der Substratpräferenz von FmoC (FmoBC) dienen sollten.

**Tab. 61:** Zusammensetzung der enzymatischen Assays zur Hydroxylierung von Trp (**26**) oder 6-Cl-Trp (**55**).

Proteine							
Bestandteil	FmoA1	FmoB	FmoC	Sfp	AdR	Adx4-108	Gdh
Endkonzentration	40 µM	20 µM	10 µM	10 µM	10 µM	20 µM	10 µM
Weitere Assay-Komponenten							
Bestandteil	Trp ( <b>26</b> ) oder 6-Cl-Trp ( <b>55</b> )		ATP	NADPH	CoA ( <b>17</b> )	MgCl <sub>2</sub>	Glucose
Endkonzentration	5 mM		15 mM	15 mM	2 mM	7,5 mM	30 mM

## Material und Methoden

Die Lösungen wurden auf Eis hergestellt und die Reaktion durch Zugabe von AdR gestartet. Eine Inkubation erfolgte über Nacht bei 28 °C (800 rpm). Da die Ansätze mit perforiertem Parafilm verschlossen wurden, war ein ständiger Zugang von Luftsauerstoff möglich, ohne dass ein Verlust von Reaktionsvolumen durch Verdunstung zu befürchten war.

Nach der Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von MeOH im Verhältnis 1:1 (v/v) und intensives Vortexen gestoppt. Die Entfernung aller unlöslichen Bestandteile erfolgte durch Zentrifugation (14.000 rpm, RT für 10 min) und anschließende Filtration (Spritzenvorsatzfilters mit 0,2 µm Porengröße, PTFE, Fa. Fisherbrand™). Ein Teil der Überstände wurde entnommen und ausgehend von der Substratkonzentration (5 mM) so mit MeOH verdünnt, dass die kombinierte Konzentration von **26** oder **55** und ihrer eventuellen Produkte 1,6 mM betrug. Von diesen Lösungen wurden 10 µL über LC-MS (Säule: ‚Synchronis™ Amino, 150 × 2,1 mm, 5 µm‘, Programm: ‚Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung‘, Detektion bei 220 und 280 nm; Kapitel 4.20) analysiert. Als Standards wurden zwei Proben der Substrate Tryptophan (**26**) und 6-Chlorotryptophan (**55**) (0,8 mM, 10 µL) unter identischen Bedingungen gemessen.

### **4.16 Expression von Naturstoff-Genclustern**

#### **4.16.1 Naturstoffexpression durch *S. filipinensis* NRRL 3217**

*S. filipinensis* NRRL 3217 enthält ein Gencluster, welches zum biosynthetischen Cluster von JBIR-34 und -35 (**52** - **53**) homolog ist. Zur Expression von **52** - **53** oder potentieller Derivate hiervon wurden 250 mL - 500 mL ISP-2-Medium (in Erlenmeyerkolben mit 4 Mal größerem Volumen) mit einer frischen Vorkultur von *S. filipinensis* NRRL 3217 beimpft und für 5 - 7 Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion von 2 L der vollständigen Kulturen mittels Ionenaustauschharz (Kapitel 4.17.1.1) oder von 250 mL - 1 L der Kulturüberstände mittels EtOAc (Kapitel 4.17.1.2).

#### **4.16.2 Expression potentieller Biphenomycin-Gencluster in *E. coli***

Die mittels Gibson-Assemblierung (Kapitel 4.4.8.6) erzeugten Plasmide mit den *bip*-Genclustern von *S. griseorubiginosus* No. 43708 und *S. filipinensis* NRRL 3217 wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert (Kapitel 4.5). Ein Klon der jeweiligen Transformationen wurde für die Herstellung einer Vorkultur verwendet (Kapitel 4.3.1). Aus dieser wurde die eigentliche Expressionskultur (100 mL TB-Medium in 500 mL Erlenmeyerkolben) im Verhältnis 1:100 beimpft. Die Expressionskulturen wurden bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 - 1,2 angezogen, dann für

60 min bei 4 °C gelagert und anschließend mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 2 ½ Tage bei 16 °C, 200 rpm. Im Anschluss wurden Zellen und Überstand durch Zentrifugation (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) getrennt und separat extrahiert (Kapitel 4.17.2.1 und 4.17.2.2).

### **4.17 Extraktion von Bakterienkulturen**

Die folgenden Methoden wurden angewandt, um Bakterien zu extrahieren. Dies diente der Isolierung von Substanzgemischen, welche einen oder mehrere potentielle Naturstoffe enthielten, die auf natürliche Weise oder heterolog von dem entsprechenden Bakterium produziert wurden.

#### **4.17.1 Extraktion von *S. filipinensis* NRRL 3217-Kulturen**

##### **4.17.1.1 Extraktion von mittels Ionenaustauschharz**

Vor einer Verwendung wurden 40 g des Ionenaustauschharzes Diaion® HP-20 mit 2 x 40 mL eines 1:1 Gemischs aus MeOH und Aceton gewaschen. Lösungsmittelreste wurden mit 10 x 40 mL destilliertem Wasser entfernt und das Harz an der Luft getrocknet. Für eine Extraktion wurden die 40 g zu zwei Litern (20 g/L = 2% w/v) einer 5 Tage alten Kultur von *S. filipinensis* NRRL 3217 (4 x 500 mL, Kapitel 4.16.1), gegeben. Die Kultur wurde dann für weitere 4 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Pellet und Harz wurden anschließend durch Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt (11.000 rpm, 15 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Mischung aus Pellet und Diaion® HP-20 3 x mit 150 - 200 mL MeOH überschichtet und für 30 min bei 100 rpm und RT inkubiert. Das MeOH wurde anschließend durch Filtration abgetrennt, alle MeOH-Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde dann in 50 mL H<sub>2</sub>O resuspendiert und 3 x mit einem identischen Volumen EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die verbliebene wässrige Phase wurde mit HCl auf einen pH von 1,0 gebracht und erneut 3 x mit einem identischen Volumen EtOAc extrahiert. Auch hier wurden die organischen Phasen vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Analytik wurden die jeweiligen Rückstände in MeOH (1 mg/mL) gelöst und 50 µL mittels LC-MS untersucht (Säule: ‚Eurosphere II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘, Detektion bei 300 nm; Kapitel 4.20).

### **4.17.1.2 Extraktion von Kulturüberständen**

Eine 7 Tage alte Kultur von *S. filipinensis* NRRL 3217 (250 - 1000 mL ISP-2-Medium) (Kapitel 4.16.1) wurde abzentrifugiert (11.000 rpm, 15 min) und der Überstand 3 bis 4 x mit EtOAc (30 - 50 % des Kulturvolumens) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die verbliebene wässrige Phase wurde mit HCl auf einen pH von 1,0 oder 4,0 gebracht und erneut 3 bis 4 x mit einem EtOAc (35 - 50% des Volumens) extrahiert. Auch hier wurden die organischen Phasen vereinigt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Analytik wurde die jeweiligen Rückstände in MeOH (1 mg/mL) gelöst und 50 µL mittels LC-MS untersucht (Säule: ‚Eurospher II 100-3 C18A, 150 x 4,6 mm mit Vorsäule‘, Programm: ‚Complestatin‘, Detektion bei 300 nm; Kapitel 4.20). Als Negativkontrolle wurden 250 mL unbeimpftes ISP-2-Medium auf identische Art extrahiert und analysiert.

### **4.17.2 Extraktion von *E. coli* mit potentiellen Biphenomycin-Genclustern**

#### **4.17.2.1 Extraktion von Zellpellets**

Zur Extraktion der Zellpellets von *E. coli* BL21(DE3) mit einem potentiellen Biphenomycin-Gencluster (Kapitel 4.16.2) wurden diese in 25 - 30 mL einer 1:1 MeOH/Aceton-Lösung resuspendiert und dann für 45 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand entnommen und das Gemisch aus Lösungsmitteln und Wasser unter vermindertem Druck entfernt. Zur Analytik wurden die Rückstände in MeOH (1 mg/mL) gelöst, mittels Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße, PTFE) der Fa. Fisherbrand™ filtriert und 5 µL der Lösungen mittels LC-MS untersucht (Säule: ‚Hypersil GOLD™ aQ C18, 150 x 2,1 mm, 3 µm‘, Programm: ‚Biphenomycin‘; Kapitel 4.20).

#### **4.17.2.2 Extraktion von Kulturüberständen**

Die Überstände von *E. coli* BL21(DE3) mit einem potentiellen Biphenomycin-Gencluster (Kapitel 4.16.2) wurden mit HCl auf einen pH von 5,0 eingestellt. Die Extraktion erfolgte 3 x mit einem identischen Volumen EtOAc. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Analytik wurden die Rückstände in MeOH (1 mg/mL) gelöst, mittels Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße, PTFE) der Fa. Fisherbrand™

filtriert und 5 µL der Lösungen mittels LC-MS untersucht (Säule: ‚Hypersil GOLD™ aQ C18, 150 x 2,1 mm, 3 µm‘, Programm: ‚Biphenomycin‘; Kapitel 4.20).

### **4.18 Isolierung potentieller JBIR-Derivate mittels semi-präparativer HPLC**

Zur weiteren Identifizierung des potentiellen JBIR-Derivats aus *S. filipinensis* NRRL 3217 mit einer Masse von 641,3 m/z sollte dieses mittels semi-präparativer HPLC isoliert werden. Dafür wurde das EtOAc-Extrakt (40 mg) des Überstands einer 250 mL-Kultur (ISP-2-Medium) (Kapitel 4.17.1.2) in 1 mL MeOH gelöst und mittels Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm Porengröße, PTFE) der Fa. Fisherbrand™ filtriert. Eine Isolierung erfolgte mittels des HPLC-Programms aus Tab. 62 unter Verwendung der Säule ‚Eurospher II 100 RP C18, 5 µm, 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm‘ (Fa. Knauer) und einer Detektion bei 300 nm. Dabei wurde die Substanz bei einer Retentionszeit von 9 min 24 s aufgesammelt. Anschließend wurde das Acetonitril unter vermindertem Druck entfernt. Die restliche Probe wurde in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und ü. N. lyophilisiert. Das resultierende Extrakt (ca. 1,3 - 1,4 mg) wurde in deuteriertem DMSO gelöst und einer Langzeit-NMR-Messung mit einem ‚AVHD 500‘ der Fa. Bruker unterzogen.

**Tab. 62.** Programm der semi-präparativen HPLC (A: Wasser + 0.05% TFA, B: ACN + 0.05% TFA). Die Flussrate betrug 8 mL/min.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	80	20
2	80	20
15	30	70
16	5	95
20	5	95
21	80	20
26	80	20

### **4.19 Chromatographische Methoden**

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Für die HPLC-Analyse von Proben wurden computergesteuerte Jasco-Systeme verwendet (System 1: MD-2010 Plus Multiwavelength Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-2086 Plus Intelligent Prep. Pumps, AS-2055 Plus Intelligent Sampler, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL Portmann Instruments AG Biel-Benken Probenschleife, LCNetII/ADC; System 2: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, DG-2080-53 3-Line

## Material und Methoden

Degaser, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, AS-1550 Intelligent Sampler, HG-1580-32 Dynamic Mixer, LC-NetII/ADC). Die Auswertung erfolgte mittels ‚ChromPass Chromatography Data System‘-Software bzw. ‚Galaxie Chromatography‘-Software, jeweils von der Firma Jasco.

Produkt-Isolierung über semi-präparative HPLC-Trennungen wurden an einem PC-gesteuerten Jasco-HPLC-System durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, zwei PU-2086 Intelligent HPLC Pumps, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL Portmann Instruments AG Biel-Benken Probenschleife, LC-NetII/ADC, Rheodyne Injektionsventil. Die Programmsteuerung wurde mittels Galaxie-Software durchgeführt. Das Lösungsmittelsystem bestand aus A = Wasser + 0.05% TFA und B = Acetonitril + 0.05% TFA. Die angewendeten Gradienten und Säulen sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften notiert. Nach der präparativen Produkt-Isolierung wurden die entsprechenden Fraktionen kombiniert und unter vermindertem Druck vom Acetonitril befreit. Die wässrigen Phasen wurden anschließend entweder mittels Lyophilisation getrocknet oder mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen produkthaltigen Lösungen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

HPLC-MS-Kopplung: HPLC-HRMS-Untersuchungen wurden an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie unter der Leitung von Frau Dr. Engeser an einem ‚microQ-TOF‘-Flugzeitspektrometer (Fa. Bruker Daltonik) mit Apollo-ESI-Quelle gekoppelt mit einer Agilent-1200-HPLC-Anlage mit einer Messgenauigkeit von 5 ppm durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte über ‚HyStar‘ (Fa. Bruker) und die Messergebnisse wurden mittels ‚Data Analysis‘ (Fa. Bruker) ausgewertet. An der TUM wurden für die HPLC-MS-Analyse die beiden oben aufgelisteten HPLC-Systeme mit ‚Advion Expression CMS‘-MS-System gekoppelt (Kapitel 4.1.4). Weiterhin wurde das ‚LCQ Fleet Ion Trap‘-Massenspektrometer gekoppelt an ein ‚UltiMate 3000 HPLC‘-System verwendet (Kapitel 4.1.4).

Die HPLC-Methoden und Säulen, welche zusammen mit den jeweiligen Geräten verwendet wurde, sind in Kapitel 4.20 aufgelistet.

### **4.20 HPLC-Methoden**

Die folgenden Programme wurden zusammen mit den angegebenen Säulen verwendet, um Extrakte, Protein- oder Substanzlösungen mittels HPLC oder LC-MS analysieren. Laufmittel ‚A‘ war dabei immer Wasser mit 0,05% TFA (v/v), Laufmittel ‚B‘ entsprach immer Acetonitril mit 0,05% TFA (v/v).

#### 4.20.1 ‚Complestatin‘

Das Programm ‚Complestatin‘ (Tab. 63) wurde auf einem ‚MD-2010 Plus Multiwavelength Detector HPLC‘-System (Fa. Jasco) mit einer ‚Eurospher II 100-3 C18A‘-Säule (150 x 4,6 mm mit Vorsäule) (Fa. Knauer) verwendet. Die Flussrate betrug 1 mL/min.

**Tab. 63.** Gradient des HPLC-Programms ‚Complestatin‘.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
2	95	5
25	5	95
30	5	95
31	95	5
38	95	5

#### 4.20.2 ‚Biarylkupplung‘

Das Programm ‚Biarylkupplung‘ (Tab. 64) wurde auf einem ‚MD-2010 Plus Multiwavelength Detector HPLC‘-System (Fa. Jasco) mit einer ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) (Fa. Knauer) verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min.

**Tab. 64.** Gradient des HPLC-Programms ‚Biarylkupplung‘.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	80	20
2	80	20
17	20	80
18	5	95
23	5	95
24	80	20
31	80	20

#### 4.20.3 ‚Biphenomycin‘

Das Programm ‚Biphenomycin‘ (Tab. 65) wurde auf einem ‚UltiMate 3000 HPLC‘-System (Fa. Thermo Scientific) mit einer ‚Hypersil GOLD™ aQ C18‘-Säule (150 x 2,1 mm, 3 µm) (Fa. Thermo Scientific) verwendet. Die Flussrate betrug 0,7 mL/min.

**Tab. 65.** Gradient des HPLC-Programms ‚Biphenomycin‘.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
4	95	5
24	5	95
24,5	0	100
28,5	0	100
29	95	5
30	95	5

#### 4.20.4 ‚Trp-Halogenierung‘

Das Programm ‚Trp-Halogenierung‘ (Tab. 66) wurde auf einem ‚MD-2010 Plus Multiwavelength Detector HPLC‘-System (Fa. Jasco) mit einer ‚Eurosil Bioselect 300-3 C4‘-Säule (250 x 4 mm mit Vorsäule) (Fa. Knauer) verwendet. Die Flussrate betrug 1 mL/min.

**Tab. 66.** Gradient des HPLC-Programms ‚Trp-Halogenierung‘.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
2	95	5
17	40	60
18	2	98
20	2	98
21	95	5
26	95	5



#### 4.20.5 ,Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung‘

Das Programm ,Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung‘ (Tab. 67) wurde auf einem ,UltiMate 3000 HPLC‘-System (Fa. Thermo Scientific) mit einer ,Synchronis™ Amino‘-Säule (150 × 2,1 mm, 5 µm) (Fa. Thermo Scientific) verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min.

**Tab. 67.** Gradient des HPLC-Programms ,Trp/6-Cl-Trp-Hydroxylierung‘.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	10	90
5	10	90
35	50	50
35,5	100	0
39,5	100	0
40	0	100
44,5	0	100
45	10	90

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Ji, H.F., Li, X.J., Zhang, H.Y. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 194-200.
- [2] Cooksey, C. *Sci. Prog.* **2013**, *96*, 171-186.
- [3] Lee, M.R. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2005**, *35*, 83-92.
- [4] Lee, M.R. *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2007**, *37*, 77-84.
- [5] Blakemore, P.R., White, J.D. *Chem. Commun.* **2002**, 1159-1168.
- [6] Phillips, M.A., Burrows, J.N., Manyando, C., van Huijsduijnen, R.H., Van Voorhis, W.C., Wells, T.N.C. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2017**, *3*, 17050.
- [7] Chen, W.J. *Biomedical Journal* **2016**, *39*, 93-97.
- [8] Mulder, K.C., Mulinari, F., Franco, O.L., Soares, M.S., Magalhães, B.S., Parachin, N.S. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 648-665.
- [9] Mann, J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 417-430.
- [10] Mekhail, T.M., Markman, M. *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 755-766.
- [11] Demain, A.L. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 821-842.
- [12] Smith, R.A., M'likanatha N, M., Read, A.F. *Health Commun.* **2015**, *30*, 309-314.
- [13] Wright, P.M., Seiple, I.B., Myers, A.G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 8840-8869.
- [14] Lederberg, J. *Science.* **2000**, *288*, 287-293.
- [15] Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L.H. *J. Invest. Surg.* **2012**, *25*, 67-77.
- [16] Sekhon, B.S. *Res. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 145-158.
- [17] Chung, K.T. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **2016**, *34*, 233-261.
- [18] Fleming, A. *Bull. World Health Organ.* **2001**, *79*, 780-790.
- [19] Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2005**, 3-6.
- [20] Walsh, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65-70.
- [21] Silver, L.L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 71-109.
- [22] Lewis, K. *Nature.* **2012**, *485*, 439-440.
- [23] Katz, L., Baltz, R.H. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 155-176.
- [24] Aminov, R. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 4-19.
- [25] Walsh, C.T., Wencewicz, T.A. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 7-22.
- [26] Brown, E.D., Wright, G.D. *Nature.* **2016**, *529*, 336-343.
- [27] Boucher, H.W., Talbot, G.H., Benjamin, D.K., Jr., Bradley, J., Gidos, R.J., Jones, R.N., Murray, B.E., Bonomo, R.A., Gilbert, D., Infectious Diseases Society of, A. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1685-1694.
- [28] Palumbi, S.R. *Science.* **2001**, *293*, 1786-1790.
- [29] Thornsberry, C., Sahm, D.F., Kelly, L.J., Critchley, I.A., Jones, M.E., Evangelista, A.T., Karlowsky, J.A. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34 Suppl 1*, S4-S16.
- [30] Levin, B.R., Bonten, M.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 13101-13102.
- [31] Overbye, K.M., Barrett, J.F. *Drug Discovery Today.* **2005**, *10*, 45-52.
- [32] Silver, L.L. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 1711-1718.

## Literaturverzeichnis

- [33] Newman, D.J., Cragg, G.M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
- [34] Bérdy, J. *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 1-26.
- [35] Mahajan, G.B., Balachandran, L. *Front. Biosci. Elite.* **2012**, *4*, 240-253.
- [36] Genilloud, O. *Nat. Prod. Rep.* **2017**.
- [37] Cragg, G.M., Newman, D.J. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1830*, 3670-3695.
- [38] Genilloud, O. *Antonie van Leeuwenhoek.* **2014**, *106*, 173-188.
- [39] Schmidt-Dannert, C. *Microb. Biotechnol.* **2015**, *8*, 26-28.
- [40] Walsh, C.T., Fischbach, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469-2493.
- [41] Walsh, C.T., O'Brien, R.V., Khosla, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7098-7124.
- [42] Süßmuth, R.D., Mainz, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 3770-3821.
- [43] Fischbach, M.A., Walsh, C.T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- [44] Hur, G.H., Vickery, C.R., Burkart, M.D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1074-1098.
- [45] Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., Huson, D.H. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 78.
- [46] Liu, W.T., Kersten, R.D., Yang, Y.L., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18010-18013.
- [47] Höltzel, A., Schmid, D.G., Nicholson, G.J., Stevanovic, S., Schimana, J., Gebhardt, K., Fiedler, H.P., Jung, G. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 571-577.
- [48] Schimana, J., Gebhardt, K., Höltzel, A., Schmid, D.G., Süßmuth, R., Müller, J., Pukall, R., Fiedler, H.P. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 565-570.
- [49] Smith, P.A., Romesberg, F.E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5054-5060.
- [50] Driessen, A.J., Nouwen, N. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 643-667.
- [51] Roberts, T.C., Schallenberg, M.A., Liu, J., Smith, P.A., Romesberg, F.E. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4954-4963.
- [52] Walsh, C.T. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 127-135.
- [53] Kopp, F., Marahiel, M.A. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 735-749.
- [54] Du, L., Lou, L. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 255-278.
- [55] Payne, J.A., Schoppet, M., Hansen, M.H., Cryle, M.J. *Mol. Biosyst.* **2016**, *13*, 9-22.
- [56] Weber, G., Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E., Leitner, E. *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 120-125.
- [57] Perry, R.D., Fetherston, J.D. *Microbes Infect.* **2011**, *13*, 808-817.
- [58] Ahmadi, M.K., Fawaz, S., Jones, C.H., Zhang, G., Pfeifer, B.A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 5290-5298.
- [59] Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., Patel, H.M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525-534.
- [60] Gribble, G.W. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 1441-1449.
- [61] Agarwal, V., Miles, Z.D., Winter, J.M., Eustáquio, A.S., El Gamal, A.A., Moore, B.S. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5619-5674.
- [62] Podust, L.M., Sherman, D.H. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1251-1266.
- [63] Aldemir, H., Richarz, R., Gulder, T.A.M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 8286-8293.

## Literaturverzeichnis

- [64] Rudolf, J.D., Chang, C.Y., Ma, M., Shen, B. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 1141-1172.
- [65] Yim, G., Thaker, M.N., Koteva, K., Wright, G. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 31-41.
- [66] Bischoff, D., Pelzer, S., Bister, B., Nicholson, G.J., Stockert, S., Schirle, M., Wohlleben, W., Jung, G., Süßmuth, R.D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4688-4691.
- [67] Zerbe, K., Woithe, K., Li, D.B., Vitali, F., Bigler, L., Robinson, J.A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6709-6713.
- [68] Hadatsch, B., Butz, D., Schmiederer, T., Steudle, J., Wohlleben, W., Süßmuth, R., Stegmann, E. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1078-1089.
- [69] Woithe, K., Geib, N., Zerbe, K., Li, D.B., Heck, M., Fournier-Rousset, S., Meyer, O., Vitali, F., Matoba, N., Abou-Hadeed, K., Robinson, J.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887-6895.
- [70] Geib, N., Woithe, K., Zerbe, K., Li, D.B., Robinson, J.A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3081-3084.
- [71] Woithe, K., Geib, N., Meyer, O., Wortz, T., Zerbe, K., Robinson, J.A. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2861-2867.
- [72] Schmartz, P.C., Wolfel, K., Zerbe, K., Gad, E., El Tamany el, S., Ibrahim, H.K., Abou-Hadeed, K., Robinson, J.A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 11468-11472.
- [73] Haslinger, K., Maximowitsch, E., Brieke, C., Koch, A., Cryle, M.J. *Chembiochem.* **2014**, *15*, 2719-2728.
- [74] Brieke, C., Peschke, M., Haslinger, K., Cryle, M.J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 15715-15719.
- [75] Haslinger, K., Peschke, M., Brieke, C., Maximowitsch, E., Cryle, M.J. *Nature.* **2015**, *521*, 105-109.
- [76] Peschke, M., Brieke, C., Cryle, M.J. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35584.
- [77] Peschke, M., Haslinger, K., Brieke, C., Reinstein, J., Cryle, M.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6746-6753.
- [78] Ulrich, V., Brieke, C., Cryle, M.J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2849-2864.
- [79] Ulrich, V., Peschke, M., Brieke, C., Cryle, M.J. *Mol. Biosyst.* **2016**, *12*, 2992-3004.
- [80] Freeman, M.F., Gurgui, C., Helf, M.J., Morinaka, B.I., Uria, A.R., Oldham, N.J., Sahl, H.G., Matsunaga, S., Piel, J. *Science.* **2012**, *338*, 387-390.
- [81] Severinov, K., Nair, S.K. *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 281-289.
- [82] Dunbar, K.L., Mitchell, D.A. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 473-487.
- [83] Ortega, M.A., van der Donk, W.A. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 31-44.
- [84] Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Göransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Müller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süßmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M., van der Donk, W.A. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108-160.
- [85] Yang, X., van der Donk, W.A. *Chemistry.* **2013**, *19*, 7662-7677.
- [86] Anthony, C. *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26*, 413-417.

## Literaturverzeichnis

- [87] Mazodier, P., Biville, F., Turlin, E., Gasser, F. *J. Gen. Microbiol.* **1988**, *134*, 2513-2524.
- [88] Houck, D.R., Hanners, J.L., Unkefer, C.J., van Kleef, M.A., Duine, J.A. *Antonie van Leeuwenhoek.* **1989**, *56*, 93-101.
- [89] Velterop, J.S., Sellink, E., Meulenbergh, J.J., David, S., Bulder, I., Postma, P.W. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5088-5098.
- [90] Shen, Y.Q., Bonnot, F., Imsand, E.M., RoseFigura, J.M., Sjölander, K., Klinman, J.P. *Biochemistry.* **2012**, *51*, 2265-2275.
- [91] Shimamura, H., Gouda, H., Nagai, K., Hirose, T., Ichioka, M., Furuya, Y., Kobayashi, Y., Hirono, S., Sunazuka, T., Omura, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 914-917.
- [92] Otaka, T., Kaji, A. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 2299-2306.
- [93] Otaka, T., Kaji, A. *FEBS Lett.* **1981**, *123*, 173-176.
- [94] Otaka, T., Kaji, A. *FEBS Lett.* **1983**, *153*, 53-59.
- [95] Crone, W.J.K., Leeper, F.J., Truman, A.W. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3516-3521.
- [96] Gomez-Escribano, J.P., Song, L., Bibb, M.J., Challis, G.L. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3522-3525.
- [97] Hou, Y., Tianero, M.D., Kwan, J.C., Wyche, T.P., Michel, C.R., Ellis, G.A., Vazquez-Rivera, E., Braun, D.R., Rose, W.E., Schmidt, E.W., Bugni, T.S. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5050-5053.
- [98] Huo, L., Rachid, S., Stadler, M., Wenzel, S.C., Müller, R. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1278-1287.
- [99] Urlacher, V.B., Girhard, M. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 26-36.
- [100] Nelson, D.R. *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, *1814*, 14-18.
- [101] Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1770*, 330-344.
- [102] Munro, A.W., Girvan, H.M., McLean, K.J. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1770*, 345-359.
- [103] Warman, A.J., Roitel, O., Neeli, R., Girvan, H.M., Seward, H.E., Murray, S.A., McLean, K.J., Joyce, M.G., Toogood, H., Holt, R.A., Leys, D., Scrutton, N.S., Munro, A.W. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 747-753.
- [104] Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3898-3908.
- [105] Roberts, G.A., Çelik, A., Hunter, D.J., Ost, T.W., White, J.H., Chapman, S.K., Turner, N.J., Flitsch, S.L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48914-48920.
- [106] Hunter, D.J., Roberts, G.A., Ost, T.W., White, J.H., Müller, S., Turner, N.J., Flitsch, S.L., Chapman, S.K. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 2215-2220.
- [107] Krest, C.M., Onderko, E.L., Yosca, T.H., Calixto, J.C., Karp, R.F., Livada, J., Rittle, J., Green, M.T. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17074-17081.
- [108] Kaushik, M., Sinha, P., Jaiswal, P., Mahendru, S., Roy, K., Kukreti, S. *J. Mol. Recognit.* **2016**, *29*, 499-503.
- [109] Bernhardt, R., Urlacher, V.B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185-6203.
- [110] Zhang, X., Li, S. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 1061-1089.
- [111] Guengerich, F.P., Munro, A.W. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17065-17073.
- [112] Scheible, W.R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., Somerville, C.R. *Plant Cell.* **2003**, *15*, 1781-1794.
- [113] Barry, S.M., Kers, J.A., Johnson, E.G., Song, L., Aston, P.R., Patel, B., Krasnoff, S.B., Crane, B.R., Gibson, D.M., Loria, R., Challis, G.L. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 814-816.

## Literaturverzeichnis

- [114] Gillam, E.M., Hayes, M.A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 2254-2280.
- [115] Girvan, H.M., Munro, A.W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *31*, 136-145.
- [116] Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M.D., Tai, A., Main, A., Eng, D., Polichuk, D.R., Teoh, K.H., Reed, D.W., Treynor, T., Lenihan, J., Fleck, M., Bajad, S., Dang, G., Dengrove, D., Diola, D., Dorin, G., Ellens, K.W., Fickes, S., Galazzo, J., Gaucher, S.P., Geistlinger, T., Henry, R., Hepp, M., Horning, T., Iqbal, T., Jiang, H., Kizer, L., Lieu, B., Melis, D., Moss, N., Regentin, R., Secrest, S., Tsuruta, H., Vazquez, R., Westblade, L.F., Xu, L., Yu, M., Zhang, Y., Zhao, L., Lievense, J., Covello, P.S., Keasling, J.D., Reiling, K.K., Renninger, N.S., Newman, J.D. *Nature*. **2013**, *496*, 528-532.
- [117] Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I.J., Filsinger Interrante, M., Smolke, C.D. *Science*. **2015**, *349*, 1095-1100.
- [118] Farrow, S.C., Hagel, J.M., Beaudoin, G.A., Burns, D.C., Facchini, P.J. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 728-732.
- [119] Gesell, A., Rolf, M., Ziegler, J., Diaz Chávez, M.L., Huang, F.C., Kutchan, T.M. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24432-24442.
- [120] Thodey, K., Galanie, S., Smolke, C.D. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 837-844.
- [121] O'Reilly, E., Köhler, V., Flitsch, S.L., Turner, N.J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2490-2501.
- [122] Miura, Y., Fulco, A.J. *Biochim. Biophys. Acta*. **1975**, *388*, 305-317.
- [123] Boddupalli, S.S., Estabrook, R.W., Peterson, J.A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4233-4239.
- [124] Narhi, L.O., Fulco, A.J. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160-7169.
- [125] Noble, M.A., Miles, C.S., Chapman, S.K., Lysek, D.A., MacKay, A.C., Reid, G.A., Hanzlik, R.P., Munro, A.W. *Biochem. J.* **1999**, *339*, 371-379.
- [126] Kaneko, I., Fearon, D.T., Austen, K.F. *J. Immunol.* **1980**, *124*, 1194-1198.
- [127] Chiu, H.T., Hubbard, B.K., Shah, A.N., Eide, J., Fredenburg, R.A., Walsh, C.T., Khosla, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2001**, *98*, 8548-8553.
- [128] Park, O.K., Choi, H.Y., Kim, G.W., Kim, W.G. *Chembiochem*. **2016**, *17*, 1725-1731.
- [129] Kittilä, T., Kittel, C., Tailhades, J., Butz, D., Schoppet, M., Büttner, A., Goode, R.J.A., Schittenhelm, R.B., van Pée, K.H., Süßmuth, R.D., Wohlleben, W., Cryle, M.J., Stegmann, E. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5992-6004.
- [130] Seo, S.Y., Yun, B.S., Ryoo, I.J., Choi, J.S., Joo, C.K., Chang, S.Y., Chung, J.M., Oh, S., Gwag, B.J., Yoo, I.D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 377-384.
- [131] Yoo, I.D., Yun, B., Ryoo, I.J., Lee, S.Y., Shin, M.H., Oh, S. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 337-343.
- [132] Kim, E.-C., Yun, B.-S., Ryoo, I.-J., Min, J.-K., Won, M.H., Lee, K.-S., Kim, Y.-M., Yoo, I.-D., Kwon, Y.-G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *313*, 193-204.
- [133] Momota, K., Kaneko, I., Kimura, S., Mitamura, K., Shimada, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 243-250.
- [134] Matsuzaki, K., Ikeda, H., Ogino, T., Matsumoto, A., Woodruff, H.B., Tanaka, H., Omura, S. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1173-1174.
- [135] Tanaka, H., Matsuzaki, K., Nakashima, H., Ogino, T., Matsumoto, A., Ikeda, H., Woodruff, H.B., Omura, S. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 58-65.
- [136] Preobrazhenskaya, M.N., Olsufyeva, E.N. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 227-236.

## Literaturverzeichnis

- [137] Singh, S.B., Jayasuriya, H., Hazuda, D., Felock, P., Homnick, C.F., Sardana, M., Patane, M.A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8769-8770.
- [138] Singh, S.B., Jayasuriya, H., Salituro, G.M., Zink, D.L., Shafiee, A., Heimbuch, B., Silverman, K.C., Lingham, R.B., Genilloud, O., Teran, A., Vilella, D., Felock, P., Hazuda, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 874-882.
- [139] Kwon, Y.J., Kim, H.J., Kim, W.G. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 715-721.
- [140] Kusserow, K., Gulder, T.A.M. *J. Genomics.* **2017**, *5*, 75-76.
- [141] Nazari, B., Forneris, C.C., Gibson, M.I., Moon, K., Schramma, K.R., Seyedsayamdost, M.R. *Medchemcomm.* **2017**, *8*, 780-788.
- [142] Garfunkle, J., Kimball, F.S., Trzupek, J.D., Takizawa, S., Shimamura, H., Tomishima, M., Boger, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16036-16038.
- [143] Shimamura, H., Breazzano, S.P., Garfunkle, J., Kimball, F.S., Trzupek, J.D., Boger, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7776-7783.
- [144] Wang, Z., Bois-Choussy, M., Jia, Y., Zhu, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 2018-2022.
- [145] Nakano, M.M., Corbell, N., Besson, J., Zuber, P. *Mol. Gen. Genet.* **1992**, *232*, 313-321.
- [146] Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., Walsh, C.T. *Biochemistry.* **1998**, *37*, 1585-1595.
- [147] Vitali, F., Zerbe, K., Robinson, J.A. *Chem. Commun.* **2003**, 2718-2719.
- [148] Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., Burkart, M.D. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 61-108.
- [149] Aldemir, H. Studien zur chemo-enzymatischen Totalsynthese komplexer Peptide mit Biaryl-Strukturelementen. *Dissertation*, Technische Universität München, **2015**.
- [150] Ewen, K.M., Ringle, M., Bernhardt, R. *IUBMB Life.* **2012**, *64*, 506-512.
- [151] Weckbecker, A., Hummel, W. Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH in *Microbial Enzymes and Biotransformations* (Ed.: Barredo, J. L.), Humana Press, Totowa, NJ, **2005**, 225-238.
- [152] Bode, H.B., Müller, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6828-6846.
- [153] Jensen, P.R. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 968-977.
- [154] Ziemert, N., Alanjary, M., Weber, T. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 988-1005.
- [155] Martin, J.H., Porter, J.N., Mitscher, L.A. (American Cyanamid), Antibiotic AF283 and production thereof, US Patent 3,452,136. Jun 24, **1969**.
- [156] Ezaki, M., Iwami, M., Yamashita, M., Hashimoto, S., Komori, T., Umehara, K., Mine, Y., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1453-1461.
- [157] Uchida, I., Shigematsu, N., Ezaki, M., Hashimoto, M., Aoki, H., Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1462-1468.
- [158] Chang, C.C., Morton, G.O., James, J.C., Siegel, M.M., Kuck, N.A., Testa, R.T., Borders, D.B. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 674-677.
- [159] Ezaki, M., Shigematsu, N., Yamashita, M., Komori, T., Umehara, K., Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 135-140.

## Literaturverzeichnis

- [160] Ezaki, M., Iwami, M., Yamashita, M., Komori, T., Umehara, K., Imanaka, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 3879-3882.
- [161] Goldman, B.S., Nierman, W.C., Kaiser, D., Slater, S.C., Durkin, A.S., Eisen, J.A., Ronning, C.M., Barbazuk, W.B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H.S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S.A., Vaudin, M., Wiegand, R., Kaplan, H.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 15200-15205.
- [162] Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G.J., Müller, R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3058-3068.
- [163] Motohashi, K., Takagi, M., Shin-Ya, K. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 226-228.
- [164] Muliandi, A., Katsuyama, Y., Sone, K., Izumikawa, M., Moriya, T., Hashimoto, J., Kozone, I., Takagi, M., Shin-ya, K., Ohnishi, Y. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 923-934.
- [165] Chen, H., Walsh, C.T. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301-312.
- [166] Chen, H., Hubbard, B.K., O'Connor, S.E., Walsh, C.T. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 103-112.
- [167] Zhang, C., Kong, L., Liu, Q., Lei, X., Zhu, T., Yin, J., Lin, B., Deng, Z., You, D. *PLOS ONE.* **2013**, *8*, e56772.
- [168] Cochrane, R.V., Vederas, J.C. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3148-3161.
- [169] Sit, C.S., Ruzzini, A.C., Van Arnam, E.B., Ramadhar, T.R., Currie, C.R., Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2015**, *112*, 13150-13154.
- [170] Goering, A.W., McClure, R.A., Doroghazi, J.R., Albright, J.C., Haverland, N.A., Zhang, Y., Ju, K.S., Thomson, R.J., Metcalf, W.W., Kelleher, N.L. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 99-108.
- [171] Seel, C. Biosynthese der Biphenomycine. *Bachelorarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2012**.
- [172] Uhlmann, H., Beckert, V., Schwarz, D., Bernhardt, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 1131-1138.
- [173] Sagara, Y., Wada, A., Takata, Y., Waterman, M.R., Sekimizu, K., Horiuchi, T. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 627-630.
- [174] Uhlmann, H., Kraft, R., Bernhardt, R. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22557-22564.
- [175] Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R. *Proteins.* **2000**, *40*, 590-612.
- [176] Schaefer, F. Heterologe Expression und *in-vitro*-Charakterisierung neuer Biokatalysatoren zur Darstellung von Peptid-Naturstoffen. *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2011**.
- [177] Nakamura, M., Saeki, K., Takahashi, Y. *J. Biochem.* **1999**, *126*, 10-18.
- [178] O'Keefe, D.P., Gibson, K.J., Emptage, M.H., Lenstra, R., Romesser, J.A., Litle, P.J., Omer, C.A. *Biochemistry.* **1991**, *30*, 447-455.
- [179] Anzai, Y., Li, S., Chaulagain, M.R., Kinoshita, K., Kato, F., Montgomery, J., Sherman, D.H. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 950-959.
- [180] Wang, F., Zhou, J., Li, Z., Dong, W., Hou, Y., Huang, Y., Cui, Z. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2182-2188.



## Literaturverzeichnis

- [181] Donadio, S., Sosio, M., Stegmann, E., Weber, T., Wohlleben, W. *Mol. Genet. Genomics* **2005**, *274*, 40-50.
- [182] Xu, L., Huang, H., Wei, W., Zhong, Y., Tang, B., Yuan, H., Zhu, L., Huang, W., Ge, M., Yang, S., Zheng, H., Jiang, W., Chen, D., Zhao, G.P., Zhao, W. *BMC Genomics*. **2014**, *15*, 363.
- [183] Geib, N., Weber, T., Wortz, T., Zerbe, K., Wohlleben, W., Robinson, J.A. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *306*, 45-53.
- [184] Sticht, H., Rösch, P. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1998**, *70*, 95-136.
- [185] Arendsen, A.F., Schalk, J.S., van Dongen, W.M., Hagen, W.R. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *231*, 352-357.
- [186] Zanetti, G., Curti, B. *Methods Enzymol.* **1980**, *69*, 250-255.
- [187] Li, Y. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1487-1499.
- [188] Greunke, C., Glöckle, A., Antosch, J., Gulder, T.A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 4351-4355.
- [189] Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X.H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I., Okada, H. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5013-5020.
- [190] Sabbadin, F., Hyde, R., Robin, A., Hilgarth, E.M., Delenne, M., Flitsch, S., Turner, N., Grogan, G., Bruce, N.C. *Chembiochem.* **2010**, *11*, 987-994.
- [191] Munro, A.W., Lindsay, J.G., Coggins, J.R., Kelly, S.M., Price, N.C. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 70-74.
- [192] Bonsor, D., Butz, S.F., Solomons, J., Grant, S., Fairlamb, I.J., Fogg, M.J., Grogan, G. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1252-1260.
- [193] Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 63.
- [194] Zerbe, K., Pylypenko, O., Vitali, F., Zhang, W., Rousset, S., Heck, M., Vrijbloed, J.W., Bischoff, D., Bister, B., Süssmuth, R.D., Pelzer, S., Wohlleben, W., Robinson, J.A., Schlichting, I. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47476-47485.
- [195] Pylypenko, O., Vitali, F., Zerbe, K., Robinson, J.A., Schlichting, I. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46727-46733.
- [196] Luthra, A., Denisov, I.G., Sligar, S.G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 26-35.
- [197] Haslinger, K., Brieke, C., Uhlmann, S., Sieverling, L., Süssmuth, R.D., Cryle, M.J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 8518-8522.
- [198] Hofbauer, S., Hagmüller, A., Schaffner, I., Mlynek, G., Krutzler, M., Stadlmayr, G., Pirker, K.F., Obinger, C., Daims, H., Djinovic-Carugo, K., Furtmüller, P.G. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *574*, 36-48.
- [199] Uhlmann, S., Süssmuth, R.D., Cryle, M.J. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586-2596.
- [200] Brieke, C., Kratzig, V., Haslinger, K., Winkler, A., Cryle, M.J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2012-2021.
- [201] Pfeifer, B.A., Admiraal, S.J., Gramajo, H., Cane, D.E., Khosla, C. *Science*. **2001**, *291*, 1790-1792.
- [202] Stegmann, E., Frasch, H.J., Wohlleben, W. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 595-602.
- [203] Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P. *Biochemistry*. **2000**, *39*, 890-902.
- [204] Chiu, J., Tillett, D., Dawes, I.W., March, P.E. *J. Microbiol. Methods*. **2008**, *73*, 195-198.
- [205] Schaefer, F. Herstellung und funktionelle Charakterisierung von neuen Biokatalysatoren für die Verwendung in der Naturstoffsynthese. *Dissertation*, Technische Universität München, **2016**.
- [206] Makris, T.M., Chakrabarti, M., Münck, E., Lipscomb, J.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2010**, *107*, 15391-15396.
- [207] Peterson, J.A., Lorence, M.C., Amarneh, B. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6066-6073.

## Literaturverzeichnis

- [208] Roh, C., Choi, K.-Y., Pandey, B.P., Kim, B.-G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 248-253.
- [209] Cryle, M.J., Staaden, J., Schlichting, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 163-173.
- [210] Li, Z., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., Nair, S.K. *Proteins.* **2011**, *79*, 1728-1738.
- [211] Araújo, A.P., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R.C., Cáceres, O., Beltramini, L.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 480-484.
- [212] Halliwell, C.M., Morgan, G., Ou, C.P., Cass, A.E. *Anal. Biochem.* **2001**, *295*, 257-261.
- [213] Kallnik, V., Schulz, C., Schweiger, P., Deppenmeier, U. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1285-1293.
- [214] Cesaratto, F., Burrone, O.R., Petris, G. *J. Biotechnol.* **2016**, *231*, 239-249.
- [215] van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., Kim, P.M., Kriwacki, R.W., Oldfield, C.J., Pappu, R.V., Tompa, P., Uversky, V.N., Wright, P.E., Babu, M.M. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6589-6631.
- [216] Oldfield, C.J., Xue, B., Van, Y.Y., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Dunker, A.K., Uversky, V.N. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, *1834*, 487-498.
- [217] Benvenuti, M., Mangani, S. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1633-1651.
- [218] Banik, J.J., Brady, S.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 17273-17277.
- [219] Pelzer, S., Süßmuth, R., Heckmann, D., Recktenwald, J., Huber, P., Jung, G., Wohlleben, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565-1573.
- [220] Sosio, M., Stinchi, S., Beltrametti, F., Lazzarini, A., Donadio, S. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 541-549.
- [221] Pootoolal, J., Thomas, M.G., Marshall, C.G., Neu, J.M., Hubbard, B.K., Walsh, C.T., Wright, G.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 8962-8967.
- [222] Li, T.L., Huang, F., Haydock, S.F., Mironenko, T., Leadlay, P.F., Spencer, J.B. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 107-119.
- [223] Eustáquio, A.S., McGlinchey, R.P., Liu, Y., Hazzard, C., Beer, L.L., Florova, G., Alhamadsheh, M.M., Lechner, A., Kale, A.J., Kobayashi, Y., Reynolds, K.A., Moore, B.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 12295-12300.
- [224] Sonjak, S., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman, N. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *53*, 51-60.
- [225] Ziemert, N., Lechner, A., Wietz, M., Millan-Aguinaga, N., Chavarria, K.L., Jensen, P.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2014**, *111*, E1130-1139.
- [226] Morozova, O., Marra, M.A. *Genomics.* **2008**, *92*, 255-264.
- [227] Korlach, J., Bjornson, K.P., Chaudhuri, B.P., Cicero, R.L., Flusberg, B.A., Gray, J.J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., Turner, S.W. *Methods Enzymol.* **2010**, *472*, 431-455.
- [228] Gładek, A., Zakrzewska, J. *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, *24*, 73-76.
- [229] Woese, C.R. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 221-271.
- [230] Wright, F., Bibb, M.J. *Gene.* **1992**, *113*, 55-65.
- [231] Davis, J.J., Olsen, G.J. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 800-810.
- [232] Bignell, C., Thomas, C.M. *J. Biotechnol.* **2001**, *91*, 1-34.
- [233] Schumacher, M.A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 72-79.
- [234] Hetrick, K.J., van der Donk, W.A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 36-44.

## Literaturverzeichnis

- [235] Broad Institute, *Bacillus cereus* Initiative, *Bacillus cereus* ISP3191 Data. <https://olive.broadinstitute.org/strains/baci-cere-isp3191-v1.1> (Stand: 27. Februar 2017).
- [236] Daligault, H.E., Davenport, K.W., Minogue, T.D., Bishop-Lilly, K.A., Broomall, S.M., Bruce, D.C., Chain, P.S., Coyne, S.R., Frey, K.G., Gibbons, H.S., Jaissle, J., Koroleva, G.I., Ladner, J.T., Lo, C.C., Munk, C., Palacios, G.F., Redden, C.L., Rosenzweig, C.N., Scholz, M.B., Johnson, S.L. *Genome Announc.* **2014**, 2.
- [237] Yao, S., Liu, Y., Zhang, M., Zhang, X., Li, H., Zhao, T., Xin, C., Xu, L., Zhang, B., Cheng, C. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, 64, 206-210.
- [238] Yao, S., Xu, Y., Xin, C., Xu, L., Liu, Y., Li, H., Li, J., Zhao, J., Cheng, C. *Genome Announc.* **2015**, 3.
- [239] Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., Calteau, A., Cai, F., Tandeau de Marsac, N., Rippka, R., Herdman, M., Sivonen, K., Coursin, T., Laurent, T., Goodwin, L., Nolan, M., Davenport, K.W., Han, C.S., Rubin, E.M., Eisen, J.A., Woyke, T., Gugger, M., Kerfeld, C.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2013**, 110, 1053-1058.
- [240] Burkhardt, B.J., Hudson, G.A., Dunbar, K.L., Mitchell, D.A. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 564-570.
- [241] Umemura, M., Nagano, N., Koike, H., Kawano, J., Ishii, T., Miyamura, Y., Kikuchi, M., Tamano, K., Yu, J., Shin-ya, K., Machida, M. *Fungal Genet. Biol.* **2014**, 68, 23-30.
- [242] Donia, M.S., Hathaway, B.J., Sudek, S., Haygood, M.G., Rosovitz, M.J., Ravel, J., Schmidt, E.W. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 729-735.
- [243] Ding, W., Liu, W.Q., Jia, Y., Li, Y., van der Donk, W.A., Zhang, Q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2016**, 113, 3521-3526.
- [244] NCBI, Conserved Domain Database (CDD), Conserved Protein Domain Family 'UPF0489' (pfam12640). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi#seqalign> (Stand: 27. Juni 2017).
- [245] NCBI, Conserved Domain Database (CDD), Conserved Protein Domain Family 'mod\_pep\_cyc' (TIGR04510). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=275303> (Stand: 27. Juni 2017).
- [246] Haft, D.H., Basu, M.K., Mitchell, D.A. *BMC Biol.* **2010**, 8, 70.
- [247] Blatch, G.L., Lassel, M. *Bioessays.* **1999**, 21, 932-939.
- [248] Dunwell, J.M., Purvis, A., Khuri, S. *Phytochemistry.* **2004**, 65, 7-17.
- [249] Zhang, Q., Doroghazi, J.R., Zhao, X., Walker, M.C., van der Donk, W.A. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, 81, 4339-4350.
- [250] Ge, W., Wolf, A., Feng, T., Ho, C.H., Sekirnik, R., Zayer, A., Granatino, N., Cockman, M.E., Loenarz, C., Loik, N.D., Hardy, A.P., Claridge, T.D., Hamed, R.B., Chowdhury, R., Gong, L., Robinson, C.V., Trudgian, D.C., Jiang, M., Mackeen, M.M., McCullagh, J.S., Gordiyenko, Y., Thalhammer, A., Yamamoto, A., Yang, M., Liu-Yi, P., Zhang, Z., Schmidt-Zachmann, M., Kessler, B.M., Ratcliffe, P.J., Preston, G.M., Coleman, M.L., Schofield, C.J. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 960-962.
- [251] van Staalduinen, L.M., Novakowski, S.K., Jia, Z. *J. Mol. Biol.* **2014**, 426, 1898-1910.
- [252] NCBI, Conserved Domain Database (CDD), Conserved Protein Domain Family 'mod\_HExxH' (TIGR04267). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=275091> (Stand: 08. März 2017).
- [253] Gomis-Rüth, F.X., Botelho, T.O., Bode, W. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, 1824, 157-163.

## Literaturverzeichnis

- [254] Cerda-Costa, N., Gomis-Ruth, F.X. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 123-144.
- [255] NCBI, Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART), Query by arbitrary combination of domains ('mod\_HExxH').  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=cdd&uid=275091> (Stand: 08. März 2017).
- [256] Matsunaga, E., Higuchi, Y., Mori, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Takegawa, K. *Genome Announc.* **2015**, *3*.
- [257] Enright, A.J., Iliopoulos, I., Kyrpides, N.C., Ouzounis, C.A. *Nature.* **1999**, *402*, 86-90.
- [258] Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Ng, H.-L., Rice, D.W., Yeates, T.O., Eisenberg, D. *Science.* **1999**, *285*, 751.
- [259] Yanai, I., Derti, A., DeLisi, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 7940-7945.
- [260] Wang, S.C., Frey, P.A. *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 101-110.
- [261] Hiscox, M.J., Driesener, R.C., Roach, P.L. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, *1824*, 1165-1177.
- [262] Frey, P.A. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 121-148.
- [263] Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., Miller, N.E. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097-1106.
- [264] Flühe, L., Knappe, T.A., Gattner, M.J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U., Marahiel, M.A. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 350-357.
- [265] Flühe, L., Burghaus, O., Wieckowski, B.M., Giessen, T.W., Linne, U., Marahiel, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 959-962.
- [266] Nakai, T., Ito, H., Kobayashi, K., Takahashi, Y., Hori, H., Tsubaki, M., Tanizawa, K., Okajima, T. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 11144-11166.
- [267] Schramma, K.R., Bushin, L.B., Seyedsayamdost, M.R. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 431-437.
- [268] Wieckowski, B.M., Hegemann, J.D., Mielcarek, A., Boss, L., Burghaus, O., Marahiel, M.A. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1802-1806.
- [269] Barr, I., Latham, J.A., Iavarone, A.T., Chantarojsiri, T., Hwang, J.D., Klinman, J.P. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 8877-8884.
- [270] Wang, J., Woldring, R.P., Roman-Melendez, G.D., McClain, A.M., Alzua, B.R., Marsh, E.N. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1929-1938.
- [271] Saichana, N., Tanizawa, K., Pechousek, J., Novak, P., Yakushi, T., Toyama, H., Frebortova, J. *J. Biochem.* **2016**, *159*, 87-99.
- [272] Yan, N. *Annu. Rev. Biophys.* **2015**, *44*, 257-283.
- [273] Nawrocki, K.L., Crispell, E.K., McBride, S.M. *Antibiotics.* **2014**, *3*, 461-492.
- [274] Cundliffe, E., Demain, A.L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 643-672.
- [275] NCBI, Conserved Domain Database (CDD), Conserved Protein Domain Family 'AP2EC' (cl23721).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=329034> (Stand: 27. Juni 2017).
- [276] Fischbach, M.A., Walsh, C.T., Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 4601-4608.
- [277] Medema, M.H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., Fischbach, M.A. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1004016.
- [278] Mascher, T., Helmann, J.D., Udden, G. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 910-938.

## Literaturverzeichnis

- [279] Zschiedrich, C.P., Keidel, V., Szurmant, H. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3752-3775.
- [280] Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 183-215.
- [281] Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jimenez, H., Guazzaroni, M.E., Ramos, J.L. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 539-559.
- [282] Mendes, M.V., Tunca, S., Antón, N., Recio, E., Sola-Landa, A., Aparicio, J.F., Martín, J.F. *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 217-227.
- [283] Martín, J.F., Liras, P. *Subcell. Biochem.* **2012**, *64*, 115-138.
- [284] Rodríguez, H., Rico, S., Díaz, M., Santamaría, R.I. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 127.
- [285] Park, D.H., Kim, J.S., Kwon, S.W., Wilson, C., Yu, Y.M., Hur, J.H., Lim, C.K. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 2049-2054.
- [286] Labeda, D.P. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 2525-2531.
- [287] Ser, H.L., Palanisamy, U.D., Yin, W.F., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24247.
- [288] Mootz, H.D., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. *Chembiochem.* **2002**, *3*, 490-504.
- [289] Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D., Thomas, M.G. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 191-211.
- [290] Ali, H., Ries, M.I., Lankhorst, P.P., van der Hoeven, R.A., Schouten, O.L., Noga, M., Hankemeier, T., van Peij, N.N., Bovenberg, R.A., Vreeken, R.J., Driessen, A.J. *PLOS ONE.* **2014**, *9*, e98212.
- [291] Herbst, D.A., Boll, B., Zocher, G., Stehle, T., Heide, L. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 1991-2003.
- [292] Galm, U., Shen, B. *Expert Opin. Drug Discov.* **2006**, *1*, 409-437.
- [293] Muyrers, J.P., Zhang, Y., Stewart, A.F. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 325-331.
- [294] Wenzel, S.C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A.F., Müller, R. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 349-356.
- [295] Wolpert, M., Heide, L., Kammerer, B., Gust, B. *Chembiochem.* **2008**, *9*, 603-612.
- [296] Bian, X., Huang, F., Stewart, F.A., Xia, L., Zhang, Y., Müller, R. *Chembiochem.* **2012**, *13*, 1946-1952.
- [297] Yin, J., Hoffmann, M., Bian, X., Tu, Q., Yan, F., Xia, L., Ding, X., Stewart, A.F., Müller, R., Fu, J., Zhang, Y. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15081.
- [298] Gibson, D.G. *Methods Enzymol.* **2011**, *498*, 349-361.
- [299] Shin, M. *Methods Enzymol.* **1971**, *23*, 440-447.
- [300] Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J., Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6097-6106.
- [301] Zehner, S., Kotsch, A., Bister, B., Süßmuth, R.D., Méndez, C., Salas, J.A., van Pée, K.H. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445-452.
- [302] Zeng, J., Zhan, J. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1607-1613.
- [303] Schmartz, P.C., Zerbe, K., Abou-Hadeed, K., Robinson, J.A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5574-5577.
- [304] Cuq, J.C., Cheftel, J.C. *Food Chem.* **1983**, *12*, 1-14.
- [305] Yeh, E., Garneau, S., Walsh, C.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**, *102*, 3960-3965.
- [306] Studier, F.W., Moffatt, B.A. *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113-130.
- [307] Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, **1972**.
- [308] Hanahan, D. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557-580.

## Literaturverzeichnis

- [309] Nikodinovic, J., Barrow, K.D., Chuck, J.A. *Biotechniques* **2003**, 35, 932-934, 936.
- [310] Chen, G.-Q., Choi, I., Ramachandran, B., Gouaux, J.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8799-8800.
- [311] Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F.S. *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 1154.
- [312] Lambeth, J.D., Kamin, H. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 2908-2917.