



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fakultät für Chemie  
Biosystemchemie



# **Untersuchungen zur Biosynthese und Produktion bioaktiver polycyclischer Makrolactam-Naturstoffe**

---

Janine Antosch

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Tom Nilges

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder

2. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 31.08.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die promotionsführende Einrichtung Fakultät für Chemie am 17.12.2015 angenommen.



## Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Betreuer Herr Prof. Tobias Gulder danken für das interessante Promotionsthema und die Chance, diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen zu können. Für seine großartige Unterstützung und Ratschläge, ob im Labor oder bei der Planung von Auslandspraktika bin ich ihm sehr dankbar. Durch die Zusammenarbeit war es mir möglich mich sowohl fachlich, wie auch persönlich weiter zu entwickeln. Viele gute Lehrer und Ausbilder haben mich bis zu diesem Abschluss begleitet. Angefangen hat meine Zuneigung zur Chemie mit meiner Ausbildung im Organischen Landbau bei Herrn Zedow, der mich für das Studium der Chemie begeistert und mich immer hervorragend gefördert hat. Während meines Bachelorstudiums hatte ich großes Glück von Herrn Prof. Schram betreut zu werden, der mir die analytische Chemie näher brachte und mich während meiner Abschlussarbeit unterstützte. Das anschließende Masterstudium am Institut für Pharmazie lehrte mich, unter direkter Betreuung von Herrn Dr. Mayer und Frau Prof. Müller, die Vielfalt der pflanzlichen Naturstoffisolierung und intensivierte mein Interesse an der Erforschung von Naturstoffen und Herstellung von Arzneimitteln. Bei der Stiftung FCI (Fonds der Chemischen Industrie) möchte ich mich für die zweijährige Finanzierung meiner Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich bei der TUM Graduate School für stete Weiterbildungsmöglichkeiten erkenntlich zeigen. Wichtig für mich waren zudem die konstruktiven Gespräche mit damaligen Mitgliedern der Gruppe von Herrn Prof. Jörn Piel, speziell mit Herrn Dr. Michael Freeman und Herrn Dr. Christian Gurgui. Die Massenabteilung der Universität Bonn unter Leitung von Frau Dr. Marianne Engeser half mir bei vielen Rätseln, die mir die Naturstoffisolierung aufgab und bearbeitete unermüdlich den Fluss an Proben den ich bereitstellte. Die professionelle Hilfe von Herrn Andreas Schneider, bei der Aufreinigung von extrem kleinen Naturstoff-Mengen, war eine große Bereicherung für mich. Zudem möchte ich mich bei meinen Praktikanten: Iman Zaki, Katharina Lubitz, Phillip Wollnitzke, Michael Reinke und Melanie Mösch, die ich während meiner Promotionszeit betreuen durfte und fleißig mitgearbeitet haben, bedanken. Nach dem Umzug ins schöne Bayern (wo die „SCHEMIE“ auch „KEMIE“ genannt wird) wurde ich herzlichst von Frau Astrid König unter die Fittiche genommen und in die Kenntnisse der Kristallisation eingeführt...danke dafür, auch wenn die Kristalle nicht so wollten, wie wir wollten! Dem ganzen Arbeitskreis Gulder: Hülya Aldemir, Jana Kundert, Hanna Hong, Christian Greunke, Elke Duell, René Richarz, Françoise Schaefers, Kalina Kusserow, Anna Sib, Rebecca Miethaner und Anna Glöckle, möchte ich danken für die wunderschöne Zeit die wir miteinander verbracht haben. Besonders Christian Greunke bin ich dankbar für die gute und gewissenhafte Zusammenarbeit in diversen Projekten. Die Chance nach Sydney gehen zu dürfen, um dort ein Praktikum im Arbeitskreis von Herrn Prof. Brett Neilan zu absolvieren, verdanke ich durch die nicht selbstverständliche Hilfe von unserem zukünftigen Postdoktoranden Herrn Paul D'Agostino. Neben der Arbeit hatte ich besonderes Glück von Familie Behr, in ihr Heim aufgenommen worden zu sein, so dass

der schmerzliche Abscheid von zu Hause stark gelindert wurde. Zu letzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Geschwistern Marina und Max für die liebevolle Unterstützung und den Zusammenhalt bedanken. Erwähnen möchte in dem Zusammenhang auch meine Oma Margarethe Antosch, ihr war es ein besonderes Anliegen, dass ich den Dokortitel anstrebte. Leider kann Sie sich nicht mehr zusammen mit mir freuen.

**Diese Arbeit ist gewidmet**

**Meiner Familie**

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung und zum Verständnis der Biosynthese polycyclischer Tetramat-Makrolactame (PTMs). PTMs bestehen aus einem Makrolactamring, in dem eine Tetramsäure-Einheit inkorporiert ist. Am Makrolactam-Grundgerüst ist ein bi- bzw. tricyclisches Ringsystem anneliert. Dieses carbacyclische Strukturelement ist für die Klasse der PTM-Naturstoffe charakteristisch und variiert stark unter den einzelnen Vertretern. Die Aufklärung der Biosynthese der PTMs ist von großem Interesse, vor allem aufgrund des breiten Wirkungsspektrums und den daraus resultierenden Anwendungsmöglichkeiten dieser Verbindungen.

Im ersten Teil der Arbeit konnte erstmalig das Biosynthesecluster von Ikarugamycin (**23**) in *Streptomyces* sp. Tü6239 entdeckt werden. Durch heterologe Expression in *E. coli* stellte sich heraus, dass nur drei Gene für den Aufbau der komplexen Struktur von **23** notwendig sind. Mit weiteren Expressionsexperimenten, in denen einzelne Gene des Biosyntheseclusters deletiert wurden, konnten potentielle Biosynthese-Intermediate von **23** detektiert und damit ein Vorschlag für die Biosynthesesequenz aufgestellt werden. Die heterologe Expression in *E. coli* war zudem der erste funktionelle Beweis für das iterative PKS I-System in der PTM-Biosynthese. Unter Anwendung dieses neu etablierten Expressionssystems für PTMs konnten ferner die Produkte einer Reihe bislang nicht-charakterisierter PTM-Biosynthesecluster bestimmt werden (Produktion von HSAF (**25**) und Maltophilin (**24**) durch *Lysobacter capsici* und von **23** durch *Salinispora arenicola*). Zudem wurden Grundlagen für die heterologe Expression weiterer PTM-Gencluster (z. B. aus *Saccharophagus degradans* und *Saccharopolyspora spinosa*) in Streptomyceten gelegt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es zu testen, ob PTM-Biosynthesegene unterschiedlicher Gencluster ausgetauscht und so zur Generierung neuer PTM-Strukturen verwendet werden können. Dies gelang durch die *in vivo*- und *in vitro*-Hydroxylierung von **23** durch PTM-Hydroxylasen (aus *Lysobacter capsici* oder *Saccharophagus degradans*), die in vielen putativen PTM-Genclustern zu finden sind. Diese Arbeit zeigte erstmalig die Promiskuität eines postmodifizierenden PTM-Enzyms und bildet die Grundlage für weitere, gezielte Veränderungen komplexer PTM-Strukturgerüste durch Methoden der synthetischen Biologie.

In einem zusätzlichen Projekt wurde die Gewinnung neuer Naturstoffe aus Streptomyceten und marinen Actinomyceten behandelt. So gelang die Isolierung, Strukturaufklärung und biologische Charakterisierung der Cycloheptamycine aus *Streptomyces* sp. Tü6314 sowie die Identifizierung des Cycloheptamycin-Genclusters. Aus den beiden marinen Stämmen *Rhodococcus* RV77 und RV8 konnte ein Diketopiperazin, Cyclo(prolyltyrosyl) entdeckt werden. Ebenfalls konnten die bereits bekannten Antibiotika des SF2446-Typs aus *Streptomyces lincolnensis* RV15 isoliert werden.

## Abstract

This thesis provides an important contribution to the elucidation and understanding of the biosynthesis of polycyclic tetramate macrolactams (PTMs). PTMs consist of a macrolactam ring in which a tetramate unit is incorporated. Attached to this backbone is a bi- or tricyclic ring system. This carbacyclic element is characteristic for the class of PTM natural products and varies among the individual representatives. The elucidating of the biosynthesis of PTMs is of considerable interest, mainly due to the broad spectrum of biological activities and thus the resulting potential applications of these compounds.

In the first part of the work, the biosynthetic gene cluster of ikarugamycin (**23**) from *Streptomyces* sp. Tü6239 was discovered for the first-time. By heterologous expression in *E. coli* it was found that only three genes are required for the construction of the complex structure of **23**. Further experiments, in which single genes of the biosynthetic gene cluster were deleted, resulted in the detection of potential intermediates of **23**. Based on these results, a biosynthetic proposal for the formation of **23** was proposed. The heterologous expression in *E. coli* furthermore provided the first functional proof of the iterative PKS I system in PTM biosynthesis. Using this newly established expression system for PTMs, a number of products of previously uncharacterized PTM biosynthetic gene cluster were determined (production of HSAF (**25**) and maltophilin (**24**) by *Lysobacter capsici* and of **23** by *Salinispora arenicola*). In addition, the experimental foundation for the heterologous expression of further PTM gene cluster (e. g. from *Saccharophagus degradans* and *Saccharopolyspora spinosa*) in *Streptomyces* was elaborated.

Another objective of this work was to test whether PTM biosynthetic genes of different gene clusters can be interchanged for the generation of new PTM structures. This was achieved by *in vivo* and *in vitro* hydroxylation of **23** by PTM-hydroxylases (from *Lysobacter capsici* or *Saccharophagus degradans*). These enzymes can be found in many putative PTM gene clusters. This work showed the promiscuity of a postmodifying PTM enzyme for the first-time and thus forms the basis for further, selective modifications of PTM structural frameworks by applying new methods of synthetic biology.

In addition, the isolation of new natural products from streptomyces and marine actinomycetes was investigated. This led to the structure elucidation and biological characterization of cycloheptamycins from *Streptomyces* sp. Tü6314 and to the identification of the corresponding cycloheptamycin biosynthetic gene cluster. From the two marine strains *Rhodococcus* RV77 and RV8, a diketopiperazine, cyclo (prolyltyrosyl) was found. In addition, the antibiotics of the SF2446-type, which were previously reported from other bacteria, were isolated from *Streptomyces lincolnensis* RV15.

## Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ACP	Acylträgerprotein
ADP	Adenosindiphosphat
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA	Coenzym A
DH	Dehydratase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Epimerase
ER	Enoylreduktase
FAD	Flavinadenindinukleotid
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
KS	Ketosynthase
KR	Ketoreduktase
LC-MS	Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie



MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
Orf	Offenes Leseraster
PCP	Peptidyl-Träger-Protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
PTM	Polycyclische Tetramat-Makrolactame
SD	<i>Saccharophagus degradans</i>
SS	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>
TE	Thioesterase

## **Inhaltsangabe**

<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 STREPTOMYCETEN.....	4
<b>2. HINTERGRUND .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 GRUNDLAGEN DER POLYKETID-BIOSYNTHESE.....</b>	<b>7</b>
2.1.1 ITERATIVE PKS VOM TYP I.....	10
2.1.2 NICHTRIBOSOMALE PEPTIDSYNTHEASEN.....	14
<b>2.2 POLYCYCLISCHE TETRAMSÄURE-MAKROLACTAME (PTM) .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN VON TETRAMSÄUREN .....	16
2.2.2 BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER PTMS .....	17
2.2.3 HINTERGRUND ZUR BIOSYNTHESE DER PTMS.....	20
<b>3. FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT.....</b>	<b>25</b>
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 ARBEITEN IM RAHMEN DES PTM-PROJEKTES.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.1 HETEROLOGE REKONSTITUTION DER IKARUGAMYCIN-BIOSYNTHESE IN <i>E. COLI</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2 PROMISKUITIVE HYDROXYLASEN FÜR DIE FUNKTIONALISIERUNG VON POLYCYCLISCHEN TETRAMSÄURE-MAKROLACTAMEN .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.3 UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE AUS DEM PTM-PROJEKT .....</b>	<b>31</b>
4.1.3.1 HETEROLOGE EXPRESSION WEITERER PTM-CLUSTER IN <i>E. COLI</i> .....	31
4.1.3.1.1 <i>Genomische Bibliotheken weiterer putativer PTM-produzierender Bakterien-Stämme.....</i>	<i>31</i>
4.1.3.1.2 <i>PTM aus <i>Lysobacter capsici</i>.....</i>	<i>31</i>
4.1.3.1.3 <i>PTM aus <i>Salinispora arenicola</i> CNS-205 .....</i>	<i>32</i>
4.1.3.2 HETEROLOGE EXPRESSION VON PTMS IN STREPTOMYCETEN .....	34

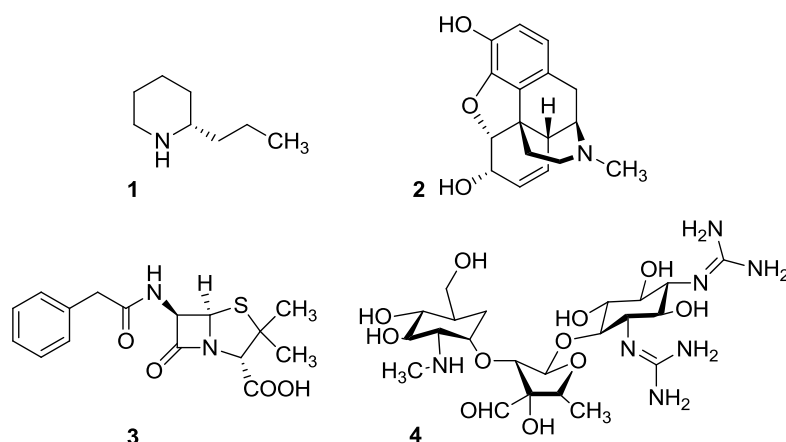
<b>4.2 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NATURSTOFFEN AUS STREPTOMYCETEN ..</b>	<b>36</b>
<b>4.2.1 STRUKTUR UND BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VON CYCLOHEPTAMYCIN .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2.2 UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE ZUR ISOLIERUNG VON NATURSTOFFEN.....</b>	<b>38</b>
4.2.2.1 NATURSTOFF-ISOLIERUNG AUS <i>RHODOCOCCUS</i> RV77 UND RV8 .....	38
4.2.2.2 SUBSTANZISOLIERUNG AUS <i>STREPTOMYCES</i> SP. RV15 .....	38
<b>5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>50</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>57</b>
7.1 KOPIE VON PUBLIKATION 1 MIT SUPPORTING INFORMATION (VGL. 4.1.1) .....	58
7.2 KOPIE VON PUBLIKATION 2 MIT SUPPORTING INFORMATION (VGL. 4.1.2) .....	59
7.3 EXPERIMENTELLE DETAILS ZU UNVERÖFFENTLICHTEN ERGEBNISSEN AUS DEM PTM-PROJEKT (VGL. 4.1.3) ....	60
7.3.2 HETEROLOGE PTM-EXPRESSION IN STREPTOMYCETEN (VGL. 4.1.3.2).....	69
7.4 KOPIE VON PUBLIKATION 3 MIT SUPPORTING INFORMATION (VGL. 4.2.1) .....	92
7.4.1 UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON CYCLOHEPTAMYCIN-DERIVATEN AUS <i>STREPTOMYCES</i> SP. Tü6314.....	93
7.5 EXPERIMENTELLE DETAILS ZUR ISOLIERUNG VON NATURSTOFFEN AUS RV77, RV8 UND RV15 (VGL. 4.2.2) .	101
7.6 ERLAUBNISSCHEINE DER VERLAGE .....	109
<b>8. BIBLIOGRAPHISCHE DATEN.....</b>	<b>110</b>
8.1 LISTE DER PROMOTIONSRELEVANTEN PUBLIKATIONEN .....	110
8.2 VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN .....	110
8.3 TABELLARISCHER LEBENS LAUF .....	111



## 1. Einleitung

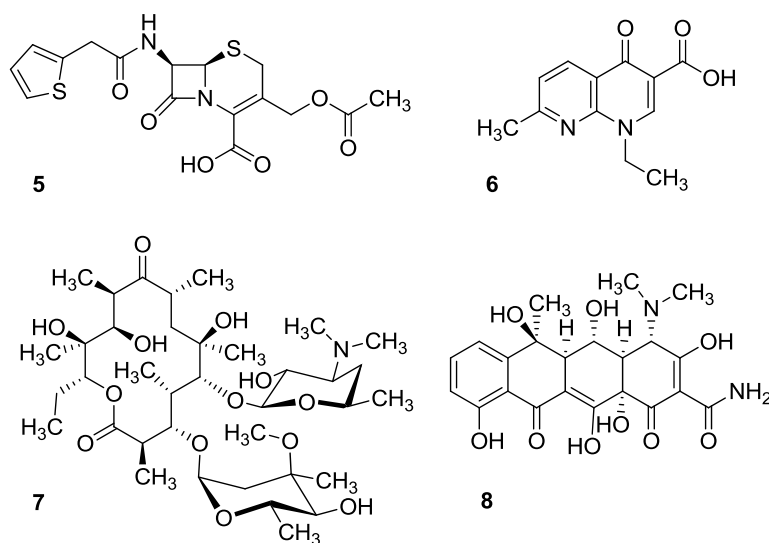
Naturstoffe sind Substanzen, die häufig im Rahmen des Sekundärmetabolismus von Organismen entstehen. Grundsätzlich unterscheidet man den Primär-, der für das Überleben essentiell ist, und den Sekundärstoffwechsel. Die Produkte des Sekundärstoffwechsels sind für die Vermehrung und Erhaltung zwar entbehrlich, aber wegen ihrer ökologischen Bedeutung für das Überleben eines Organismus von großem Vorteil. Beispielsweise fungieren diese Verbindungen als Kommunikations- oder Verteidigungssubstanzen und werden aufgrund dessen nicht notwendigerweise bei allen Umweltbedingungen produziert.<sup>1,2</sup> Naturstoffe werden schon seit Jahrtausenden vom Menschen verwendet. Der prähistorische Mensch nutzte etwa das Gift der Tollkirsche zur Benetzung von Pfeilen, um bei der Jagd erfolgreicher zu sein.<sup>3</sup> Im Gegensatz dazu liefert die Verabreichung des Schierlingsbechers ein negatives Beispiel für den Einsatz von Naturstoffen. Dieser wurde im antiken Griechenland, vermittelt durch das im Samen enthaltene toxische Alkaloid Coniin (**1**) (Abbildung 1), zur Vollstreckung der Todesstrafe genutzt. Ein berühmtes Beispiel ist die Hinrichtung des griechischen Philosophen Sokrates.<sup>4</sup>

Diese Beispiele zeigen, dass bis vor wenigen Jahrzehnten Pflanzen und deren Extrakte eingesetzt wurden, ohne die jeweils wirksamen Inhaltsstoffe zu kennen. Mit der Entwicklung moderner physikalisch-chemischer Methoden wurden erstmals gezielt Reinsubstanzen aus den Extrakten isoliert.<sup>1,5</sup> Die identifizierten Wirkstoffe der Heilpflanzen konnten dadurch besser dosiert verabreicht werden. Die Isolierung des Morphins (**2**) aus *Papaver somniferum* vor über 200 Jahren öffnete so neue Wege in der Anwendung von Naturstoffen. Bis heute zählt es zu den stärksten verfügbaren Schmerzmitteln.<sup>6</sup> Ebenfalls wegweisend war die Entdeckung von Penicillin G (**3**) aus *Penicillium notatum*<sup>7</sup> und Streptomycin (**4**), zur Behandlung von Tuberkulose, aus *Streptomyces griseus* (Abbildung 1).<sup>8</sup> Erstmals konnten bakterielle Infektionen, die früher den sicheren Tod bedeuteten, behandelt werden.<sup>8</sup>



**Abbildung 1.** Strukturen von Coniin (**1**), Morphin (**2**), Penicillin G (**3**) und Streptomycin (**4**).

Die Entdeckung wichtiger Wirkstoffe aus Mikroorganismen führte ab den 40er Jahren zu einer intensiven Erforschung antiinfektiver Substanzen aus mikrobiellen Quellen, mit der Entdeckung nahezu aller, auch heute noch eingesetzter Antibiotika. Davon wurden viele aus Bodenbakterien der Ordnung Actinomycetales gewonnen.<sup>9</sup> Zu den wichtigsten Strukturklassen, die als Antibiotika eingesetzt werden, zählen neben den Penicillinen, wie zum Beispiel **3**, die Cephalosporine, z. B. Cefalotin (**5**), die Quinolone, z. B. Nalidixinsäure (**6**), die Macrolide, z. B. Erythromycin (**7**) und die Tetracycline, z. B. Oxytetracyclin (**8**) (Abbildung 2).<sup>11</sup> Von den genannten Molekülen sind lediglich die Quinolone nicht bakteriellen Ursprungs. Trotz der hohen Anzahl bereits entdeckter antibiotischer Wirkstoffe ist die stetige Suche nach Strukturklassen mit neuartigen Wirkmechanismen unabdingbar, da die steigende Anzahl multiresistenter Erreger zunehmend die antibiotischen Behandlungsmöglichkeiten einschränkt. Fortlaufend werden neue Derivate der bekannten Antibiotika gegen die resistenten Erreger eingesetzt.<sup>11</sup> Dies gewährt jedoch nur einen kleinen Vorsprung, wie die stetig steigende Anzahl an Antibiotika-Generationen zeigt.<sup>11</sup> Besonders der Einsatz spezifisch wirkender Antibiotika könnte in Zukunft die Bildung von Resistenzen minimieren. Das Bundeskabinett beschloss kürzlich eine Strategie gegen die Antibiotika-Resistenzbildung (Deutsche Antibiotika-Resistenz-Strategie (DART 2020)), welche Regeln für den Einsatz und die Erforschung neuer Antibiotika beinhaltet.<sup>12</sup>



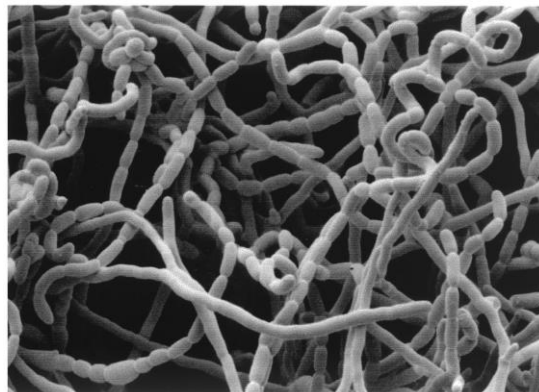
**Abbildung 2.** Strukturen einiger Antibiotika: Cefalotin (**5**), Nalidixinsäure (**6**), Erythromycin (**7**) und Oxytetracyclin (**8**).

Naturstoffe, die aus der Gruppe Actinomycetales isoliert werden, helfen jedoch nicht nur im Kampf gegen Infektionen, sondern z. B. auch gegen Zivilisationskrankheiten, wie zum Beispiel *Diabetes mellitus*. Der Naturstoff Acarbose hemmt etwa den Abbau von Kohlenhydraten im Darm und senkt somit den Glucosespiegel im Blut.<sup>13</sup> Zudem produzieren Actinomyceten viele weitere bioaktive Substanzen,

unter anderem Antimykotika, Zytostatika, Insektizide und Virostatika.<sup>8,14,15</sup> Die Etablierung moderner molekularbiologischer und biochemischer Arbeitstechniken ermöglichte in den letzten Jahren die Biosynthese von Naturstoffen genauer zu untersuchen. Mit Hilfe von genetischen Daten und deren bioinformatischen Analyse können daher nun Vorhersagen der zu erwartenden Naturstoffprodukte gemacht werden.<sup>26</sup> Der Einblick in das genetische Material von Bakterien der Ordnung Actinomycetales deckte viele bislang unbekannte Naturstoff-Biosynthesegencluster auf, deren Produkte sich mit den klassischen Methoden der Naturstoffisolierung nicht auffinden lassen.<sup>8</sup> Diese genomischen Datensätze verhelfen gezielt nach interessanten Stoffklassen zu suchen und Strategien zur Expression des jeweiligen Naturstoffs zu entwickeln. Im Folgenden werden in diesem Zusammenhang die Streptomyceten genauer vorgestellt, da sie bis heute die häufigsten Lieferanten von bioaktiven Naturstoffen aus Mikroorganismen sind und da deren Genome riesiges Potential zur Entdeckung einer Vielzahl weiterer, neuartiger Wirkstoffe vermuten lassen.<sup>8</sup>

## 1.1 Streptomyceten

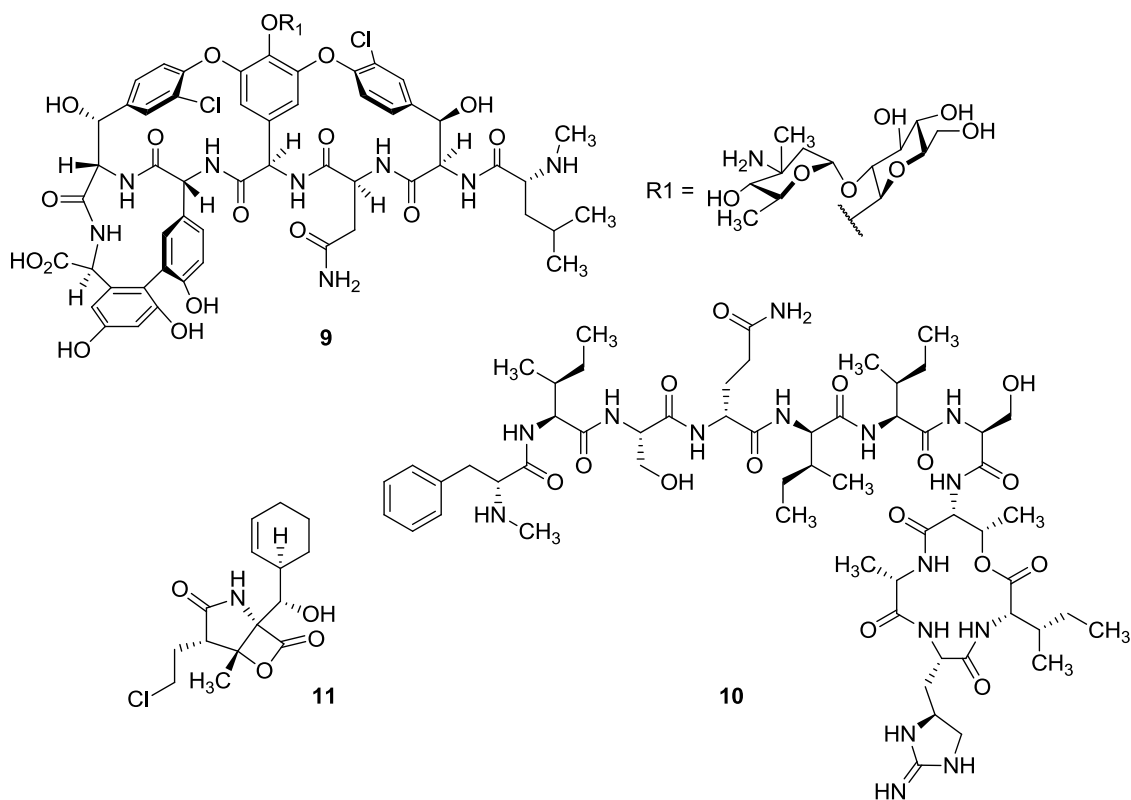
Streptomyceten gehören zur Gruppe der Actinomyceten und leben größtenteils im Boden. Sie ernähren sich von organischem Material und werden daher als saprotroph bezeichnet. Im Unterschied zu anderen Bakterien liegt ihr Genom nicht zirkular, sondern meist linear angeordnet vor und ist sehr GC-reich (ca. 72 % GC-Gehalt).<sup>8,17</sup> Ihr komplexer Lebenszyklus ähnelt eher dem von Pilzen als dem anderer Bakterienarten. So bilden sie wie Pilze Sporen, die als Übergangszustand bei ungünstigen Wachstumsbedingungen eine Überlebensstrategie darstellen.<sup>18</sup> Stehen wieder Nährstoffquellen zur Verfügung, keimen die Sporen aus und bilden das Substratmyzel (Abbildung 3). Daraufhin bildet sich ausgehend vom Substratmyzel das Luftmyzel. Die Segmentierung an den Enden des Luftmyzels führt wiederum zur Ausbildung von Sporen.<sup>18</sup>



**Abbildung 3.** Mikroskopische Aufnahme von kurzen, verzweigten Filamenten des Stammes *Streptomyces coelicolor*.<sup>20</sup>

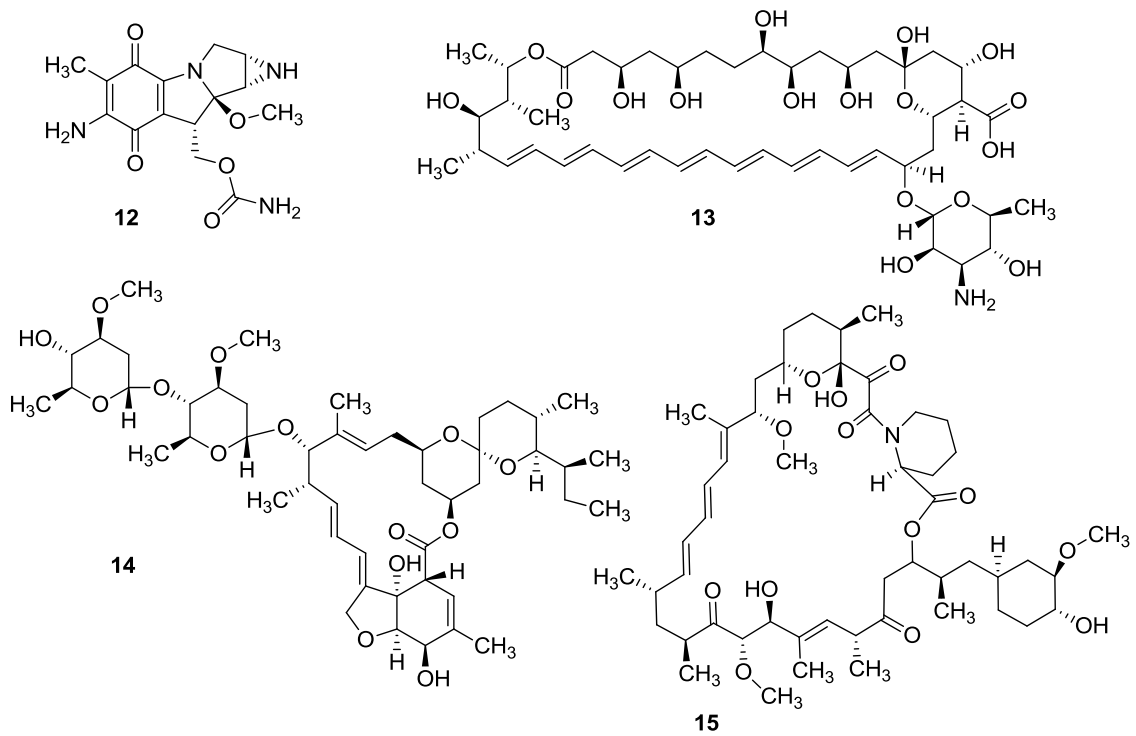
Streptomyceten produzieren eine sehr große Vielfalt an Sekundärmetaboliten und gelten als eine der wichtigsten Quellen medizinisch wirksamer Naturstoffe (Abbildung 4). Vancomycin (**9**) ist ein Reserveantibiotikum gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA).<sup>21</sup> Entdeckt wurde **9** aus *Amycolatopsis orientalis*, welches zur Ordnung der Actinomycetales gehört und den Streptomyceten sehr ähnlich ist. Ein Antibiotikum mit neuartigen Wirkmechanismus gegen MRSA-Stämme konnte kürzlich aus unkultivierbaren *Eleftheria terrae*, mit dem speziellen “iChip-Verfahren“, isoliert werden.<sup>22</sup> Es handelt sich dabei um das ungewöhnliche Depsipeptid Teicobactin (**10**), welches die Zellwandsynthese der Bakterien, durch Bindung an die zwei Vorstufen Lipid II und Lipid III, inhibiert.<sup>23</sup> Auch marine Streptomyceten produzieren eine Vielfalt biomedizinisch interessanter Naturstoffe und werden zurzeit intensiv untersucht.<sup>24,25</sup> Ein bekanntes Beispiel ist *Salinispora tropica* CNB-440,<sup>30</sup> ein in marinen Sedimenten vorkommender Actinomycet, aus welchem das vielversprechende Krebsmedikament Salinosporamid A (**11**) isoliert wurde (Abbildung 4).<sup>30</sup>





**Abbildung 4.** Strukturformeln von Vancomycin (**9**) aus dem Stamm *Amycolatopsis orientalis*<sup>28</sup>, Teicobactin (**10**) aus *Eleftheria terrae*<sup>29</sup> und Salinisporamid A (**11**) aus *Salinispora tropica*.<sup>30</sup>

Ein weiterer zytotoxischer, bakterieller Wirkstoff ist das Mitomycin C (**12**), welches aus *Streptomyces caespitosus* isoliert wurde (Abbildung 5).<sup>31</sup> Das bioaktive Spektrum bakterieller Naturstoffe umfasst außerdem antifungale (z. B. Amphotericin B (**13**), isoliert aus *Streptomyces nodosum*),<sup>32</sup> antiparasitäre (z. B. Ivermectin (**14**), isoliert aus *Streptomyces avermitilis*)<sup>33</sup> bis hin zu immunosuppressiven Substanzen (z. B. Rapamycin (**15**), isoliert aus *Streptomyces hygroscopicus*).<sup>34</sup> Interessanterweise werden viele der genannten, strukturell hoch komplexen Substanzen in den bakteriellen Produzenten aus einfachen Aminosäure- bzw. Acetat-Bausteinen über nicht-ribosomale Peptid-Biosynthese (**9**, **10**), Polyketidbiosynthesewege (**13-15**), oder Kombinationen daraus (**11**) aufgebaut. Das biosynthetische Konzept dieser äußerst wichtigen Sekundärstoffbiosynthesewege wird daher im Folgenden, insbesondere am Beispiel der Polyketid-Biosynthese, eingehend erläutert.



**Abbildung 5.** Strukturen von Mitomycin C (**12**) aus *Streptomyces caespitosus*<sup>31</sup>, Amphotericin B (**13**) aus *Streptomyces nodosum*<sup>32</sup>, Ivermectin (**14**) aus *Streptomyces avermitilis*<sup>35</sup> und Rapamycin (**15**) aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert.<sup>34</sup>

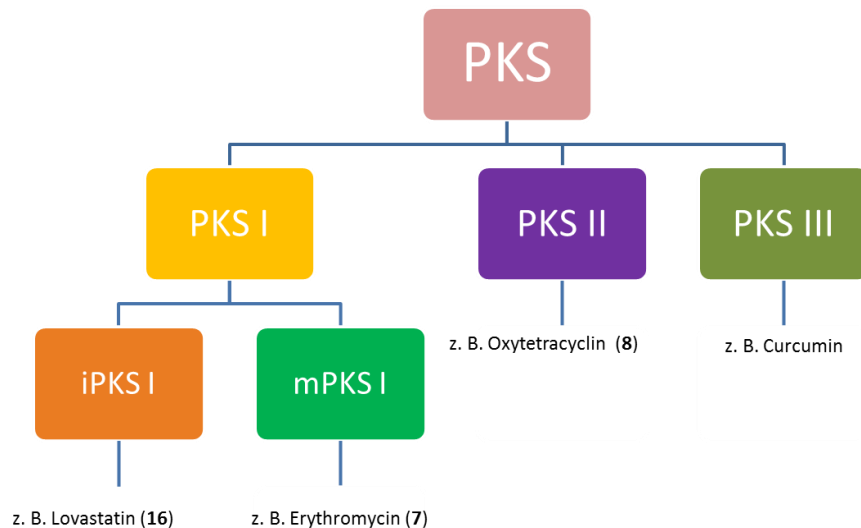
## 2. Hintergrund

### 2.1 Grundlagen der Polyketid-Biosynthese

Polyketidsynthasen (PKS) produzieren eine große Bandbreite bioaktiver Naturstoffe. Prominente Beispiele aus der Klasse der Polyketide sind die bereits erwähnten Verbindungen Erythromycin (**7**), Amphotericin B (**13**) und Rapamycin (**15**), sowie der Cholesterinsenker Lovastatin (**16**).<sup>36,37</sup> Die Biosynthese dieser Verbindungen erfolgt durch aufeinanderfolgende, Claisen-artige Kondensationsreaktionen mit Acyl-Coenzym A als Starter-Einheit und Malonyl-Coenzym A, oder einfachen  $\alpha$ -Alkyl-Derivaten davon, als Elongationssubstraten. Die Architektur der PKS und die Reaktionsabläufe erinnern an die der Fettsäurebiosynthese durch die Fettsäuresynthasen (FAS). PKS und FAS unterscheiden sich jedoch signifikant in der reduktiven Prozessierung der Biosyntheseintermediate. In der Fettsäure-Biosynthese kommt es nach jedem Elongationsschritt zu einer vollständigen Reduktion und damit jeweils zum Einbau eines vollständig gesättigten C<sub>2</sub>-Bausteins.<sup>38</sup> Polyketide können hingegen nach jedem Kettenverlängerungsschritt komplett, partiell oder gar nicht reduziert werden. Zudem kann sich die Komplexität der PKS-Produkte durch Variationen von Kettenlängen, Verzweigungsgrad und Stereochemie sowie durch die zusätzliche Anwendung funktionalisierender Tailoring-Enzyme weiter erhöhen.<sup>38</sup> Zu den katalytischen Domänen in PKS zählen unter anderem die Acyltransferase (AT), die Ketosynthase (KS), das Acyl-Träger-Protein (ACP), die Ketoreduktase (KR), die Dehydratase (DH), die Enoylreduktase (ER) und die Thioesterase (TE). Die einzelnen Funktionen dieser Domänen werden am Beispiel der Biosynthese von **7** im späteren Verlauf dieses Kapitels näher erläutert.<sup>37</sup>

Polyketidsynthasen können je nach Aufbau und Funktionsweise in drei Klassen unterteilt werden: PKS vom Typ I, II und III (Abbildung 6). Der Vorgang der Kettenverlängerung kann dabei je nach PKS iterativ oder modular erfolgen.<sup>38</sup> In iterativen PKS werden katalytische Domänen mehrfach genutzt. Im Gegensatz dazu wird in modularen Systemen fließbandartig jede Domäne nur einmal genutzt. Von der Typ II PKS kennt man bis heute nur iterative Synthasen, die ausschließlich in Bakterien vorkommen. Die katalytisch aktive Grundeinheit, die bei Typ II PKS immer wieder genutzt wird, wird als „Minimal-PKS“ bezeichnet. Diese besteht aus zwei freistehenden Ketosynthasen (KS <sub>$\alpha$</sub> , KS <sub>$\beta$</sub> ) und einer ACP. KS <sub>$\alpha$</sub>  katalysiert dabei die decarboxylative Kettenverlängerungsreaktion mit Malonyl-CoA. Dagegen ist KS <sub>$\beta$</sub>  nicht direkt an der Kettenverlängerung beteiligt. Es kontrolliert jedoch die Länge der wachsenden Polyketidkette und wird daher auch häufig als „chain length factor“ (CLF) bezeichnet.<sup>38</sup> Die Biosynthese durch die Minimal-PKS wird zusammen mit anderen katalytisch aktiven Biosyntheseenzymen, die das Produkt weiter modifizieren und aromatisieren, durchgeführt. Dazu gehören unter anderem die Cyclasen (CYC), die KR und die

Aromatasen (ARO).<sup>37</sup> Produkte der Typ II PKS sind aromatische, oft polycyclische Naturstoffe, zum Beispiel die Tetracycline, wie das bereits erwähnte **8** (siehe Abbildung 2).



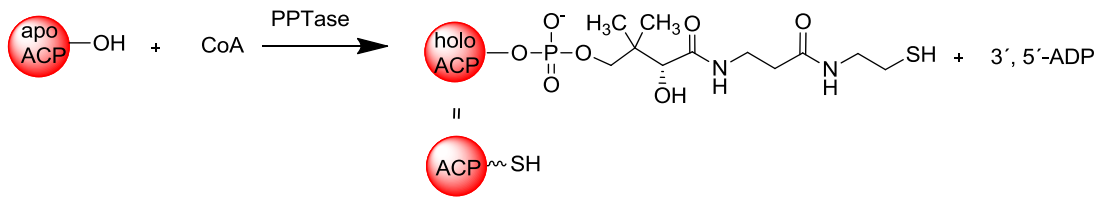
**Abbildung 6.** Schematische Übersicht zu den unterschiedlichen Typen der Polyketidsynthasen.<sup>37</sup>

Typ III PKS, auch bekannt als Chalcon-Synthase-ähnliche PKS, arbeiten ebenfalls iterativ und weisen eine Besonderheit auf: bei dieser PKS findet die Kettenverlängerung nicht wie üblich an ACP gebundenen, sondern direkt, mit freien Acyl-CoA-Bausteinen statt. Dabei dient Malonyl-CoA als Elongationssubstrat. Das breite Produktspektrum resultiert aus der Flexibilität der Verlängerungsschritte, der finalen Cyclisierung und der Auswahl des Startsubstrates. PKS III können alternative Starter-Einheiten verwenden, wie beispielsweise Zimtsäure-Derivate. Ihre Produkte sind ebenfalls vorwiegend aromatisch, wie zum Beispiel der natürliche Farbstoff Curcumin. Er wird von der Pflanze *Curcuma longa* gebildet.<sup>37,39</sup> Typ III PKS waren lange Zeit nur aus Pflanzen bekannt. In den letzten Jahren konnten einige wenige Vertreter dieser Synthasen jedoch auch in Pilzen<sup>40</sup> und in Bakterien<sup>41</sup> identifiziert werden.

PKS vom Typ I werden in iterative und modulare PKS I unterteilt. Im Folgenden werden die Funktionen der einzelnen Domänen am Beispiel der Biosynthese von **7** durch eine modulare PKS vom Typ I dargestellt (Abbildung 8). Zu Beginn der Synthese wählt die Acyltransferase (AT) in Modul eins der PKS Propionyl-CoA als Startsubstrat aus. Dieses wird unter Bildung eines Acyl-ACP-Thioesters zunächst an das ACP gebunden.<sup>42</sup> Dafür muss das ACP vor der Verknüpfung mit dem Substrat aktiviert werden. Dies geschieht durch die posttranslationale, kovalente Bindung des Phosphopantetheinyl-Armes aus Coenzym A an einen konservierten Serin-Rest im ACP. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Phosphopantetheinyltransferase (PPTase), die das ACP so von der apo-Form in die aktive holo-Form

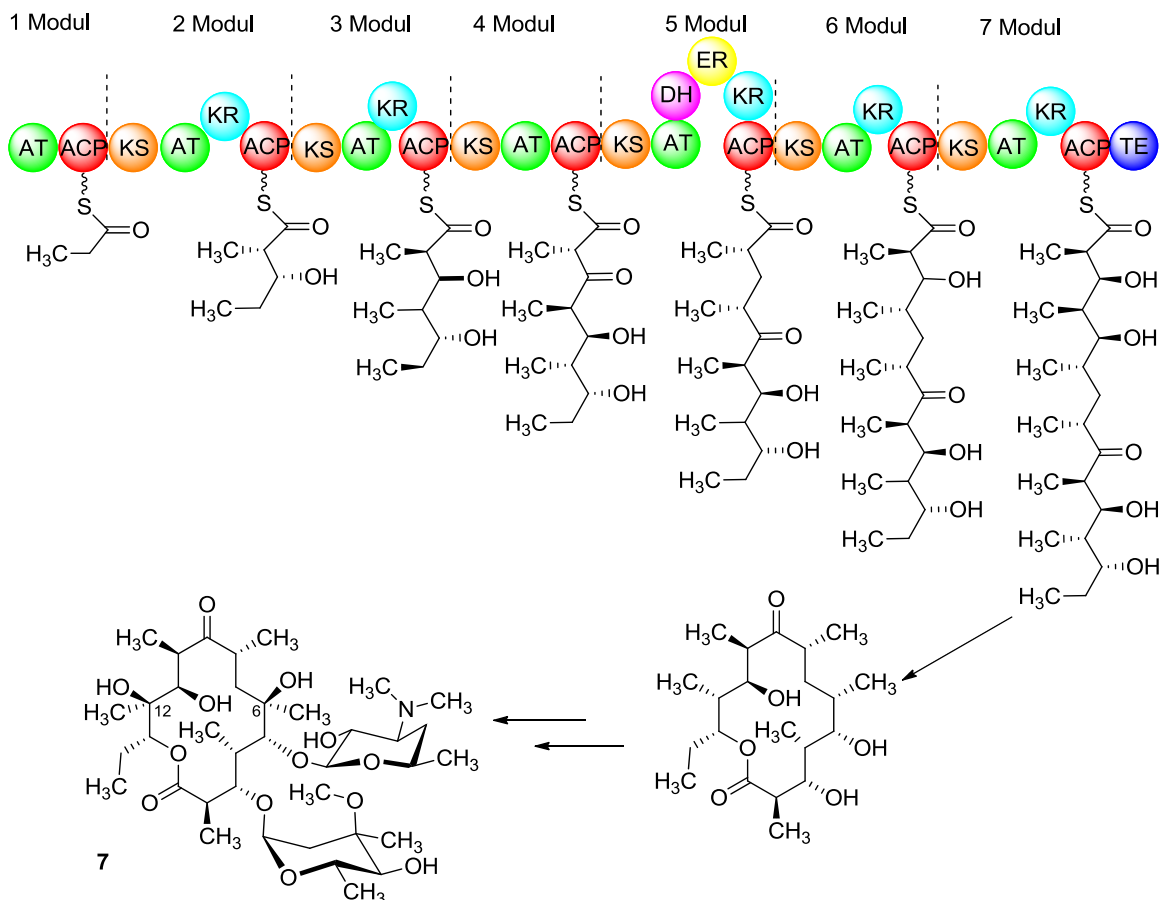
## Hintergrund

überführt (Abbildung 7). Das entstehende ACP trägt nach der Reaktion einen Phosphopantetheinarm zur Bindung der Substrate über einen Thioester.<sup>43</sup>



**Abbildung 7.** Dargestellt ist die Reaktion des apo-ACP zu seiner aktiven holo-Form, katalysiert durch eine PPTase. Die Struktur von Coenzym A wird häufig abgekürzt durch CoA.<sup>43</sup> Der Phosphopantetheinylrest wird häufig auch als geschlängelte Linie dargestellt.

In den folgenden Modulen wird durch die AT jeweils das Elongationssubstrat, in diesem Fall Methylmalonyl-CoA (mMCoA), ausgewählt. Die KS sorgt im weiteren Verlauf dafür, dass die Starter- und Elongationseinheit unter Kohlenstoffdioxid-Abspaltung verknüpft werden und sich die Kette somit um eine C<sub>2</sub>-Einheit je Modul verlängert. Während der Biosynthese bleibt die wachsende Polyketidkette an die ACPs der unterschiedlichen Module gebunden.



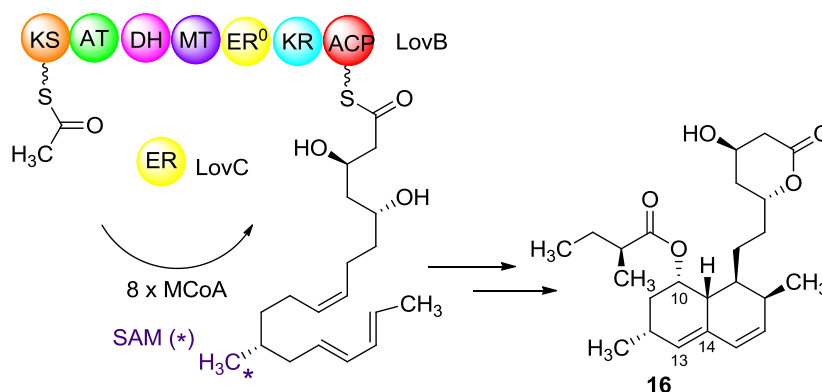
**Abbildung 8.** Biosynthese der modularen PKS-I von Erythromycin (7).<sup>38</sup>

In den Modulen zwei und drei katalysiert die zusätzlich anwesende KR die Reduktion der  $\beta$ -Ketofunktionen der verlängerten Biosyntheseintermediate. Das vierte Modul fügt ohne reduktive Veränderungen lediglich ein mMCoA an, wohingegen das fünfte Modul zunächst durch die KR eine Hydroxylgruppe generiert, welche anschließend durch die DH als Wasser abgespalten wird und nach ER-vermittelter Reduktion die Inkorporation eines gesättigten Bausteins erlaubt. Die letzten beiden Module sechs und sieben katalysieren, analog zu den Modulen zwei und drei, ebenfalls eine Addition von mMCoA unter Reduktion der Ketofunktion zum Alkohol. Im letzten Schritt wird das lineare Vorläufermolekül durch die TE in einer intramolekularen Makrolactonisierung vom siebten Modul abgespalten. Die erhaltene Absolut-Konfiguration in **7** wird durch die stereoselektive Reduktion der KR bestimmt (Abbildung 8).<sup>38</sup> Die nachfolgenden postmodifizierenden Enzyme katalysieren die Addition zweier Zuckermoleküle und fügen zwei Hydroxylgruppen in Position C-6 und C-12 an den Makrolactonring. Dieser fließbandartige Aufbau der Polyketidkette führt zu einer Eins-zu-eins-Beziehung zwischen der Struktur der modularen PKS und der daraus entstehenden Metabolitenstruktur. Diese Beziehung ist auch als Prinzip der Kollinearität bekannt.<sup>38</sup> Es existieren jedoch auch modulare PKS, bei denen dieses Prinzip nicht angewendet werden kann. Hierbei ist die AT-Einheit nicht in die Module integriert, sondern es sind ein bis drei externe ATs vorhanden, die den Acyltransfer in *trans* katalysieren. Module in solchen „*trans*-AT“-Systemen können mehr als einmal genutzt oder auch übersprungen werden.<sup>44</sup> Dies führt, verglichen mit modularen PKS I, zu einer erschwerten Vorhersage der zu erwartenden Molekülstruktur basierend auf bioinformatischen Analysen. Noch komplexer ist dieses Problem bei iterativen PKS-Systemen, die im Folgenden vorgestellt werden.

### 2.1.1 Iterative PKS vom Typ I

Iterative PKS I (*i*PKS I) wurden zuerst in Pilzen entdeckt und lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass diese Enzyme nur dort vorkommen. Die Biosynthesen der Aflatoxine und von Lovastatin (**16**) sind bekannte Beispiele für gut untersuchte *i*PKS I aus Pilzen.<sup>37</sup> Iterativ-arbeitende PKS I sind allgemein dadurch charakterisiert, dass sie nur aus einem einzigen Modul aufgebaut sind. Dabei entsprechen die Funktionen der einzelnen Domänen denen der modularen PKS I. Im Gegensatz zu dieser wird jedoch das Modul mehrfach für aufeinanderfolgende Reaktionsabläufe eingesetzt, wobei in jedem dieser wiederholten Elongationscyclen die enzymatische Aktivität der reduktiven Domänen individuell variiert werden kann. Entsprechend der Präsenz oder Abwesenheit von KR-Domänen werden Pilz-PKS in nichtreduzierende, teilweise reduzierende oder hochreduzierende PKS unterteilt. Die Folgende Abbildung

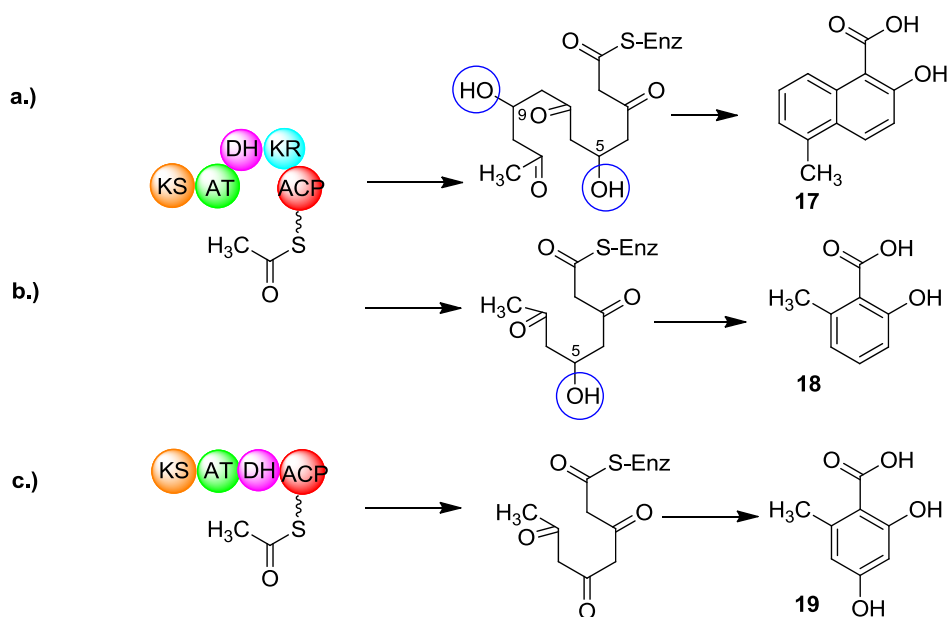
stellt die iterative Synthese von **16** dar, welche ein Beispiel für eine teilweise reduzierende PKS I aus Pilzen ist (Abbildung 9). Dabei wird in acht aufeinanderfolgenden Zyklen aus Malonyl-CoA das lineare Vorläufermolekül durch die *i*PKS I (LovB) aufgebaut. Die in LovB vorhandene ER<sup>0</sup> ist inaktiv und wird durch eine freistehende ER (LovC) ersetzt. Neben der KS-, AT-, DH-, KR- und ACP-Domäne befindet sich auch eine Methyltransferase (MT), welche unter Einwirkung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) die Methylierung in der gekennzeichneten Position katalysiert.<sup>45</sup>



**Abbildung 9.** Iterative Biosynthese von Lovastatin (**16**). MCoA entspricht Malonyl-Coenzym A und SAM steht für S-Adenosyl-L-Methionin.<sup>38,45</sup>

Sobald Acetyl-CoA, ausgehend von Malonyl-CoA, an LovB gebunden vorliegt, wird durch die KS in Claisen-artigen Reaktionen ein Nonaketid aufgebaut. An den ersten beiden Verlängerungszyklen sind die KR und DH beteiligt und führen die beiden *trans*-konfigurierten, konjugierten Doppelbindungen ein. Im dritten Schritt wird neben der Generierung einer Einfachbindung durch den zusätzlichen Einsatz der MT eine Methylgruppe eingefügt. Darauf folgt eine weitere Kettenverlängerung unter vollständiger Reduktion. Im Anschluss daran wiederholt sich die Ausbildung einer Doppel- und einer Einfachbindung. In den letzten beiden Schritten erfolgt der Verlängerungszyklus mit Beteiligung der KR, wodurch die beiden sekundären Alkoholfunktionen entstehen.<sup>46</sup> Eine zusätzliche CON-Domäne (nicht gezeigt) ist vermutlich an der Diels-Alder-Reaktion zur Bildung des bicyclischen Ringsystems beteiligt. Diese Reaktion wird noch während der Kettenverlängerung katalysiert.<sup>46</sup> Die Faktoren, die den optionalen Einsatz der reduktiven Domänen nach den individuellen Kettenverlängerungsschritten steuern, sind bislang weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund entsteht ein basierend auf der Sequenzanalyse der *i*PKS allein nicht vorhersagbares Substitutionsmuster des Polyketidprodukts.<sup>38</sup> Nach der Produktfreisetzung wird im weiteren Verlauf an Position 10 eine Hydroxylgruppe eingeführt, die im Anschluss mit  $\alpha$ -S-Methylbutyrat einen Carbonsäureester bildet. Die Doppelbindung zwischen C-13 und C-14 wird ebenfalls postmodifizierend eingebracht.<sup>45,47</sup>

Vor einigen Jahren wurde mit der Avilamycin-Synthase aus *Streptomyces viridochromogenes* erstmals eine Typ I *i*PKS beschrieben, die bakteriellen Ursprungs ist.<sup>48</sup> Die folgenden PKS-Systeme sind weitere Beispiele für bakterielle iterative PKS aus diversen Streptomyceten. Im Gegensatz zur modularen PKS I sind die Produkte der bakteriellen *i*PKS I häufig aromatische Verbindungen, zum Beispiel 5-Methyl-Napthalinsäure (**17**), 6-Methylsalicylsäure (**18**) und Orsellinsäure (**19**) (Abbildung 10).<sup>49,50</sup>

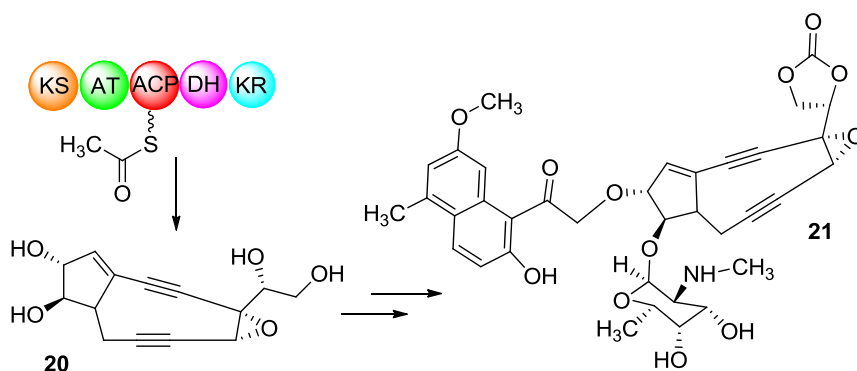


**Abbildung 10.** PKS-Aufbau zur Bildung von a.) 5-Methyl-Napthalinsäure (**17**),<sup>51</sup> b.) 6-Methylsalicylsäure (**18**)<sup>50</sup> und c.) Orsellinsäure (**19**).<sup>49</sup> S-Enz soll das enzymgebundene Substrat darstellen.

Eine gut untersuchte, bakterielle *i*PKS I ist die 6-Methylsalicylsäure-Synthase aus *Streptomyces antibioticus* für die Synthese von **18**.<sup>50</sup> Das Modul dieser PKS setzt sich aus den Domänen KS, AT, DH, KR und ACP zusammen (Abbildung 10b).<sup>50</sup> **18** wird aus einer Acetat- und drei Malonat-Einheiten aufgebaut. Nach der ersten Claisen-Kondensation schließt sich keine Reduktion an. Im zweiten Zyklus findet eine Reduktion der Ketofunktion zum sekundären Alkohol statt. Der darauffolgende dritte Zyklus verläuft wieder ohne Reduktionsschritt, an dem sich eine Cyclisierung der Polyketid-Kette unter Abspaltung des Produktes und Aromatisierung anschließt.<sup>50</sup> Bei der Biosynthese von **17** und **18** reduziert die KR selektiv die Polyketidkette in Position C-5 und C-9 (blau umkreist, Abbildung 10). Im Gegensatz dazu liegt bei der Biosynthese von **19** keine Beteiligung einer KR vor. Die DH ist in diesen PKS-Systemen inaktiv und vermutlich an der Cyclisierung mit gleichzeitiger Freisetzung des Produktes beteiligt.<sup>48,52</sup>

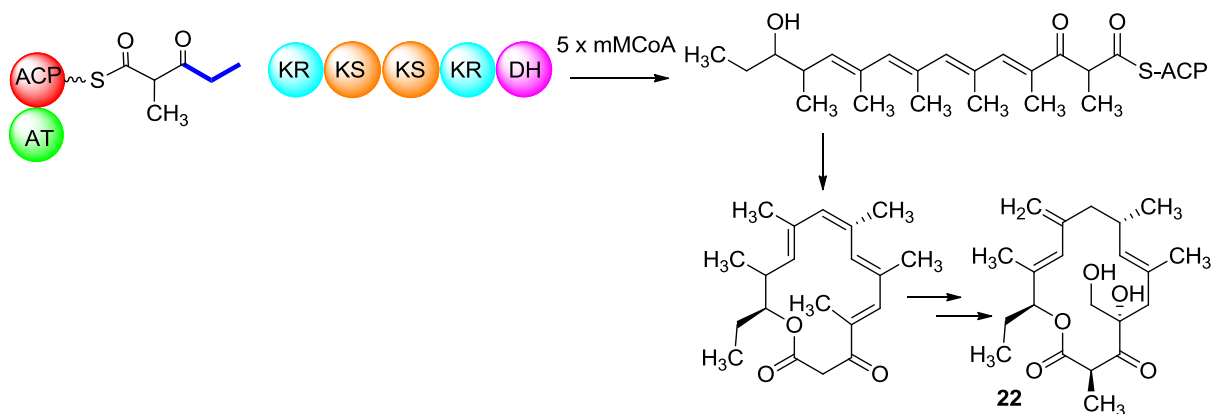


Die ungewöhnlichen Enediyn-Strukturen gehören ebenso zur Produktpalette der iterativen bakteriellen PKS I (Abbildung 11). Das Enediyn-Grundgerüst entsteht dabei ebenfalls aus einer linearen Polyketidkette, die in weiteren, bislang nicht vollständig aufgeklärten Katalyseschritten zum neungliedrigen Grundkörper **20** geformt wird.<sup>53</sup> Der Antitumor-Wirkstoff Neocarzinostatin (**21**) aus *Streptomyces neocarzinostaticus* inkorporiert diese komplexe Enediynstruktur.<sup>51,54</sup>



**Abbildung 11.** PKS-Aufbau des Enediyn-Bausteins (**20**) und der Struktur von Neocarzinostatin (**21**).<sup>54</sup>

Erst kürzlich wurde in *Streptomyces* sp. LZ35, einem marine Actinomyceten, eine einzigartige *i*PKS entdeckt. Dabei wird das Polyketid nicht nur durch ein Modul synthetisiert, sondern durch eine externe AT-ACP-Domäne und einem, aus KR-, KS- und DH-Domänen bestehenden *i*PKS-Modul. In fünf aufeinanderfolgenden Zyklen wird aus mMCoA als Elongations- und Startsubstrat das lineare Vorläufermolekül aufgebaut. An die Starter-Einheit wird zusätzlich Propionyl-CoA (blau markiert), unter Generierung eines Diketids durch ein FabH-ähnliches Enzym angefügt, bevor die eigentliche Elongation beginnt. Die Grundstruktur des daraus entstehenden Galbonolids B (**22**) erinnert trotz der signifikant unterschiedlichen Biosynthese stark an die Struktur von **7** (Abbildung 12).<sup>55</sup>



**Abbildung 12.** Vorschlag zur Biosynthese von Galbonolid B (**21**) aus *Streptomyces* sp. LZ35.<sup>55</sup>

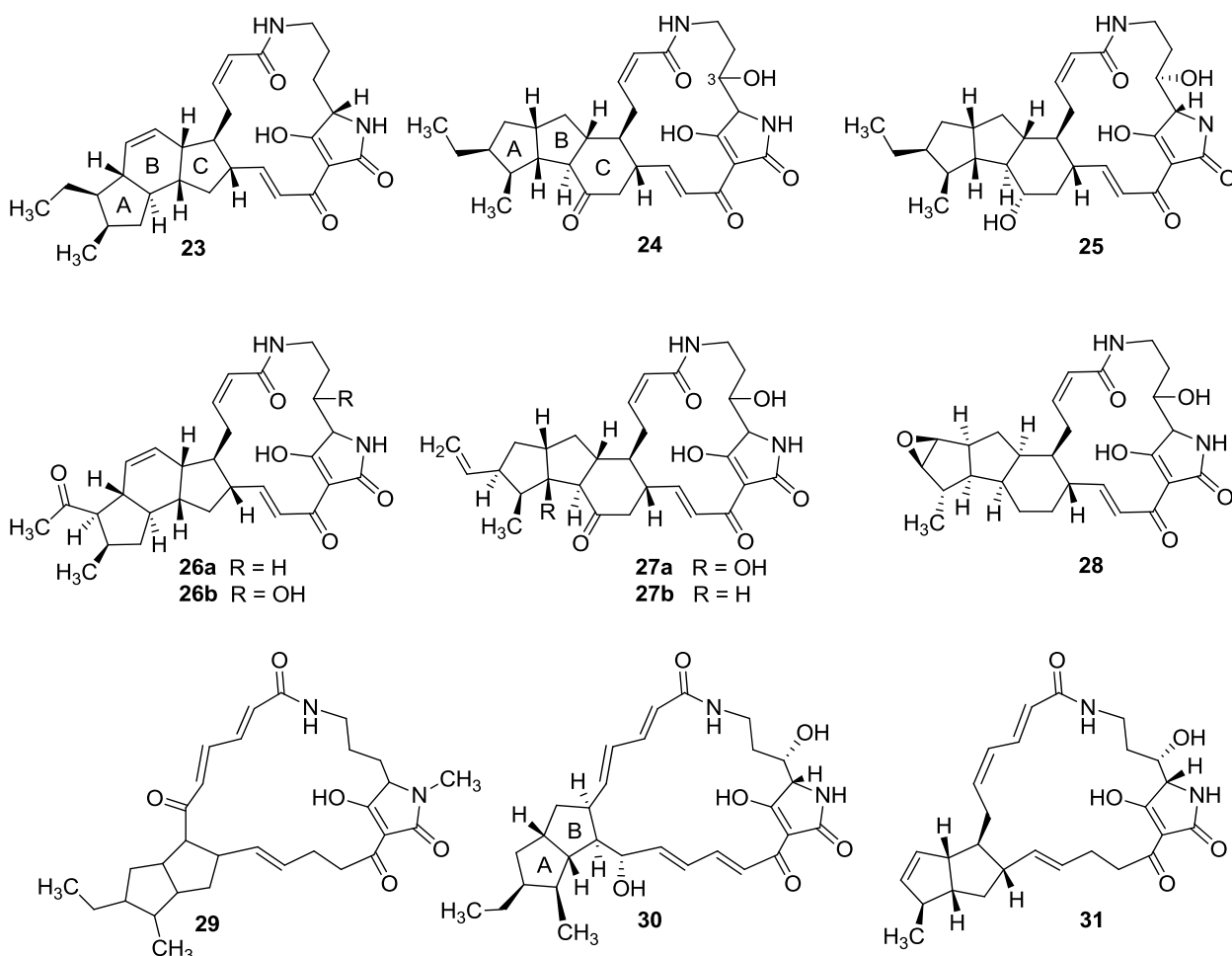
PKS besitzen mehrere Parallelen zu nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), z. B. die Substratbindung über Thioester. Die Hybridisierung beider Systeme führt zu komplexen Naturstoffen aus Polyketid- und Aminosäure-Einheiten. Häufig findet sich in der Natur die Kombination aus mPKS I und NRPS in Bakterien, z. B. bei der Biosynthese des antibiotisch wirkenden Bacillaens. *i*PKS I zusammen mit NRPS lassen sich vermehrt in Pilzen nachweisen, beispielsweise bei der Fusarin C-Biosynthese.<sup>56</sup> Im weiteren Verlauf wird die NRPS vorgestellt, um die oben genannten Parallelen zu erläutern.

### 2.1.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) synthetisieren Peptide, wie zum Beispiel das Immunsuppressivum Cyclosporin A und das Antibiotikum Penicillin G (**3**). NRPS sind, genau wie die PKS, große Multienzymkomplexe, welche modular aufgebaut sind. Man unterscheidet zwischen Initiations- und Elongationsmodulen. Ein Elongationsmodul besteht aus mindestens drei Domänen, die Adenylierungs-Domäne (A), die Kondensationsdomäne (C), sowie des Peptidyl-Träger-Protein (PCP). Die A-Domäne ist für die Auswahl der Aminosäure und deren Aktivierung zum Aminoacyladenylat verantwortlich und ist somit das Pendant zur AT einer PKS. Ein Analogon zum ACP ist das PCP: die wachsende Peptid-Kette ist im Falle der NRPS über eine Thioesterbindung zur PCP an die individuellen Module gebunden. Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindungsbildung und besitzt somit eine analoge Funktion zur KS. Die Initiationsmodule starten die Biosynthese und bestehen meist nur aus einer A-Domäne und PCP. Am Ende der NRPS befindet sich eine TE und sorgt, wie bei der PKS, für eine Freisetzung der Produktkette. NRPS können auch Domänen beinhalten, die für weitere Modifikationen der Aminosäuren verantwortlich sind. Dazu zählt beispielsweise die Epimerase (E), die L- in D-Aminosäuren umwandelt,<sup>39</sup> oder C- bzw. N-Methyltransferasen. Hybridisierte PKS-NRPS-Systeme sind seit längerem bekannt. Beispiele hierfür sind die Biosynthesysteme für den Immunsuppressor FK506<sup>57</sup>, sowie für die Antitumorsubstanzen Bleomycin und Pederin.<sup>10,38,58</sup> Innerhalb der Synthasen befinden sich Interpolypeptidlinker, jeweils am C- und N-Terminus der PKS und der NRPS, die vermutlich den Transport der wachsenden Kette zwischen den PKS- und NRPS-Modulen durchführen.<sup>38,59</sup>

## 2.2 Polycyclische Tetramsäure-Makrolactame (PTM)

Polycyclische Tetramsäure-Makrolactame (PTMs) stellen eine kleine Gruppe von Naturstoffen dar, die durch ihre hohe strukturelle Vielfalt ein breites Wirkungsspektrum besitzen. Dieses reicht von antibakteriellen über antifungale bis hin zu antitrypanosomalen und zytotoxischen Aktivitäten.<sup>16,27,60,62,67</sup> Die Isolierung des ersten Vertreters, des Ikarugamycins (**23**), aus *Streptomyces phaeochromogenes* erfolgte 1972 durch Hirata et al.<sup>63</sup> Seitdem konnten diverse PTMs in unterschiedlichen Organismen aus verschiedensten Habitaten entdeckt werden. Diese umfassen unter anderem Maltophilin (**24**) aus *Streptomyces* sp.,<sup>16</sup> Dihydromaltophilin (**25**) aus *Lysobacter enzymogenes*<sup>60,64</sup> (auch bekannt unter dem Namen „Heat-Stable Antifungal Factor“ HSAF), die Clifendamide (**26a/b**)<sup>65</sup> und die Frontalamide (**27a/b**),<sup>66</sup> jeweils isoliert aus terrestrischen *Streptomyces* sp., Aburatubolactam C (**29**) aus einem marinen *Streptomyces* sp.,<sup>67</sup> Alteramid A (**28**) aus einem Schwamm-assoziierten *Alteromonas* sp.,<sup>62</sup> sowie Cylindramid (**31**)<sup>65</sup> und Discodermid (**26**),<sup>68</sup> welche beide aus Schwammmaterial gewonnen wurden.

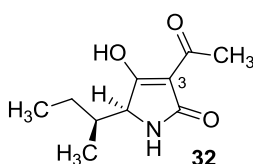


**Abbildung 13.** Strukturen einer repräsentativen Auswahl der bislang bekannten PTMs: Ikarugamycin (**23**), Maltophilin (**24**), HSAF (**25**), Clifendamide (**26a/b**), Frontalamide (**27a/b**), Discodermid (**28**), Aburatubolactam C (**29**), Alteramid A (**30**) und Cylindramid (**31**).

Ein Kennzeichnungsmerkmal der PTMs ist die Tetransäure-Einheit, die in einen Makrolactamring inkorporiert ist. An diesem Makrolactamring ist ein carbacyclisches Ringsystem anelliert. Das Cyclisierungsmuster dieser Struktureinheit ist verantwortlich für die hohe strukturelle Vielfalt und für das breite biologische Aktivitätsspektrum der PTMs. Neben der Anzahl der vorhandenen Ringe kann sich das individuelle Cyclisierungsmuster unterscheiden. So gibt es, wie in **23**, tricyclische Systeme (Ringe A,B,C) mit einer Abfolge der Ringgrößen 5-6-5, oder, wie bei **24**, mit einer häufiger auftretenden 5-5-6-Anordnung. Daneben gibt es auch PTMs, die nur zwei Fünfringe besitzen, wie zum Beispiel bei **30** (Ringe A,B) (Abbildung 13). Am Makrolactamring befindet sich in Position C-3 einiger PTMs zudem eine Hydroxylgruppe, wie beispielsweise bei **24**.<sup>69,70</sup>

### 2.2.1 Biologische Aktivitäten von Tetransäuren

Die Tetransäure-Einheit ist das auffälligste Strukturmerkmal der PTMs. Seit dem frühen 20. Jahrhundert sind Tetransäuren für ihre biologische Aktivität bekannt.<sup>71</sup> Aufgrund der vielseitigen pharmakologischen Wirksamkeit von Tetransäuren handelt es sich dabei um einen sehr gut untersuchten Strukturtyp. Neben den seit längerem bekannten antibiotischen,<sup>72</sup> antiepileptischen,<sup>73</sup> entzündungshemmenden,<sup>74</sup> schmerzlindernden<sup>75</sup> oder antitumoralen Eigenschaften<sup>76</sup> gewisser Verbindungen dieser Substanzklasse, gewannen sie in der Vergangenheit auch als Virostatika<sup>77</sup> an Bedeutung. Ihre Möglichkeit zur kompetitiven Hemmung von Aspartylproteasen in Verbindung mit ihrem nicht-peptidischen Grundgerüst rückt sie zudem in den Mittelpunkt der Alzheimerforschung.<sup>78</sup> Häufig tragen die Tetransäuren in Naturstoffen in Position C-3 einen Acylrest. Der einfachste, natürlich vorkommende Vertreter der Tetransäuren ist die Tenuazonsäure (**32**), die 1958 aus dem Pilz *Alternaria tenuis* isoliert wurde (Abbildung 14).<sup>79</sup> Diese besitzt antibiotische, zytotoxische<sup>80</sup> und antivirale Eigenschaften.<sup>81</sup>



**Abbildung 14.** Struktur der Tenuazonsäure (**32**) isoliert aus *Alternaria tenuis*.<sup>61</sup>

Die biologische Aktivität der Tetransäure-Einheit könnte über starke Wechselwirkungen der sich ausbildenden Wasserstoffbrücken mit den aktiven Zentren von Proteinen entstehen. Zu den ungewöhnlichsten Strukturen der 3-Acyl-Tetransäure-Gruppe gehören die PTMs.

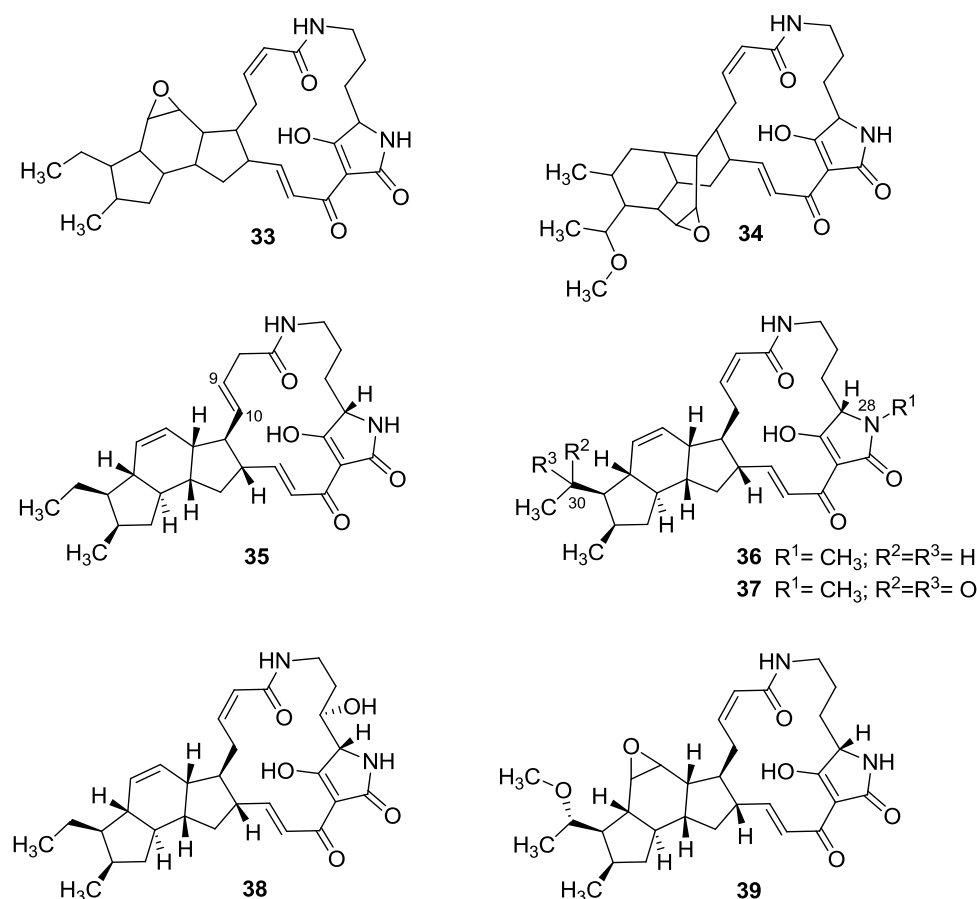
### 2.2.2 Biologische Aktivität der PTMs

Strukturelle Unterschiede innerhalb der PTMs ergeben sich hauptsächlich durch die Variationen im carbacyclischen Ringsystem. Dieses Ringsystem ist bei terrestrisch abstammenden PTMs meist tricyclisch. Die PTMs marinen Ursprungs besitzen, mit Ausnahme von Discodermid (**28**), ein bicyclisches Fünfringsystem. Die PTMs mit tricyclischem Ringsystem, wie Ikarugamycin (**23**), Maltophilin (**24**), HSAF (**25**), die Clifednamide (**26a/b**) und die Frontalamide (**27a/b**), weisen antifungale oder antibakterielle Wirkungen auf. Im Folgenden werden zunächst die biologischen Aktivitäten der PTMs mit tricyclischem Ringsystem und einer 5-5-6-Ringabfolge beschrieben.

Bakterienstämme der Art *Stenotrophomonas maltophilia* R3089, isoliert aus Rhizosphären der Weintraubepflanze (*Brassica napus* L.), produzieren das antifungale **24**, welches das Wachstum von diversen saprophytischen, humanpathogenen und phytopathogenen Pilzen hemmt.<sup>16</sup> Das strukturverwandte **25** besitzt antifungale Eigenschaften, besonders gegen *Plasmopara viticola* (Pflanzenpathogen der Weintraube). Das polarisierte Wachstum von Pilzen wird durch die Störung der Biosynthese der pilzspezifischen Sphingolipide verhindert.<sup>82</sup> Im Gegensatz zum ebenso tricyclischen, jedoch zytotoxischen **28** besteht der einzige Struktur-Unterschied zu **25** in der Präsenz einer Epoxidgruppe am Carbacyclus. Diese funktionelle Gruppe am Ringsystem besitzt offensichtlich einen hohen Einfluss auf die Bioaktivität und entscheidet über die Zytotoxizität.<sup>60</sup> **27a** und **b** besitzen ebenfalls, analog der biologischen Aktivität von **24** und **25**, antifungale Eigenschaften.<sup>66</sup>

Im Vergleich zu den bereits genannten, tricyclischen PTMs besitzen **23**, Ikarugamycin-Epoxid (**33**), Ripromycin (**34**), Butremycin (**38**) und Capsimycin (**39**) eine alternative Ringabfolge von 5-6-5. **23** wird in aktuellen Studien eine antibiotische Aktivität gegen grampositive Bakterien und zytostatische Effekte gegen verschiedene menschliche Tumorzellen zugeschrieben (HMO2- und MCF7-Zellen, 0.22-2.00 µg/ mL). Der Mechanismus, über welche die Hemmung der Zellproliferation in HL60-Zellen erzielt wird, läuft über die induzierte Apoptose und Aktivierung von Caspasen ab.<sup>83</sup> **23** verhindert außerdem die Aufnahme von oxidiertem LD-Lipoprotein in Makrophagen und inhibiert die Clathrin-vermittelte Endozytose.<sup>84</sup> Von den drei PTMs, die durch *Streptomyces* sp. Tü6239 produziert werden (**23**, Ikarugamycin-Epoxid (**33**) und Ripromycin (**34**)) ist **23** das wirksamste zytostatische und antibiotische Produkt (Abbildung 15).<sup>85</sup> Zudem besitzt es eine starke Aktivität gegen Protozoen, wie beispielsweise *Trichomonas vaginalis* (MIC 0.3-1.25 µg/ mL), *Tetrahymena pyriformis* W., und gegen diverse Amöben. Das Hexahydro-Ikarugamycin ist ein synthetisch hergestelltes Derivat, welches eine geringere Toxizität im Vergleich zu **23** besitzt.<sup>27</sup> Eine weitere Wirkung von **23** ist die Inhibierung der durch Nef-Proteine

vom HIV Typ-I induzierten Downregulation von CD4-Rezeptoren.<sup>86</sup> Derivate von **23** wurden aus *Streptomyces zhaozouensis* gefunden, einem aus marinem Sediment isolierten Stamm. Dabei handelte es sich um Isoikarugamycin (C-9/C-10 *E*-Konfiguration, **35**), 28-*N*-Methylikarugamycin (**36**) und 30-oxo-28-*N*-Methylikarugamycin (**37**) (Abbildung 15). Die ersten beiden Derivate sowie **23** zeigen eine starke Inhibition von MRSA-Stämmen und, mit Ausnahme von **36**, auch antifungale Wirkungen. Die *N*-Methylierung scheint keinen entscheidenden Effekt auf die biologische Aktivität von **37** zu haben, wo hingegen eine Carboxylgruppe an Position C-30, welche peripher am tricyclischen Ringsystem sitzt, zu einer stark verringerten Aktivität führt.<sup>87</sup> Die C-3-hydroxylierte Form von **23** entspricht dem 2014 entdeckten Butremycin (**38**),<sup>69</sup> welches das erste isolierte PTM aus der Gattung *Micromonospora* sp. ist (Abbildung 15). **38** besitzt im Gegensatz zu **23** nur eine schwache inhibitorische Aktivität gegen gram-positive und gram-negative Bakterien.<sup>69</sup> Der Effekt der C-3-Hydroxylierung auf die Bioaktivität wurde am Beispiel von **25** in den Arbeiten von Shen et al. untersucht.<sup>70</sup> Dabei wurde festgestellt, dass die C-3-Hydroxygruppe in **25** maßgeblich für die antifungale Aktivität gegen *Penicillium avellaneum* verantwortlich ist.<sup>70</sup>



**Abbildung 15.** Strukturen von Ikarugamycin-Epoxyd (**33**), Ripromycin (**34**), den Ikarugamycin-Derivaten (**35** - **37**), Butremycin (**38**) und Capsimycin (**39**).

Ebenfalls eine große Ähnlichkeit zu **23** und im Besonderen zu **33** besitzt das 1993 entdeckte Capsimycin (**39**).<sup>88</sup> Dieses ist aktiv gegen diverse Pilze, jedoch inaktiv gegen die meisten Bakterienarten (Abbildung 15).<sup>89</sup>

Zu den PTMs mit bicyclischen Fünfringsystem gehört das Aburatubolactam C (**29**), welches von dem marinen *Streptomyces* sp. SCRC A-20 produziert wird, das Alteramid A (**30**), welches aus den mit dem Schwamm *Halichondria okadae*<sup>62</sup> symbiotisch lebenden Bakterien *Alteromonas* sp. isoliert wurde, sowie das in *Halichondria cylindrat*<sup>65</sup> entdeckte Cylindramid (**31**) und das aus dem australischen Meeresschwamm *Geodia*<sup>90</sup> separierte Geodin A (**40**) (Abbildung 16). Die meisten PTMs mit bicyclischem Ringsystem besitzen zytotoxische Eigenschaften. Zum Beispiel besitzt **29** zytotoxische Eigenschaften gegen murine und humane Tumorzellen, welche durch die Induzierung von Apoptose ausgelöst werden.<sup>61</sup> **30** inhibiert die *in vitro*-Proliferation von P388-murinen Leukämiezellen und hemmt das Wachstum von *Candida albicans*.<sup>68</sup> Ebenso ist **31** toxisch für B16-Melanomazellen.<sup>65</sup> **40** weicht in der Wirkung zu den bereits genannten PTMs ab, da es sich um ein potentes Nematizid handelt und somit als Pflanzenschutzmittel verwendet werden kann (Abbildung 16). Hierfür könnte eventuell die Doppelbindung am Bicyclus verantwortlich sein.

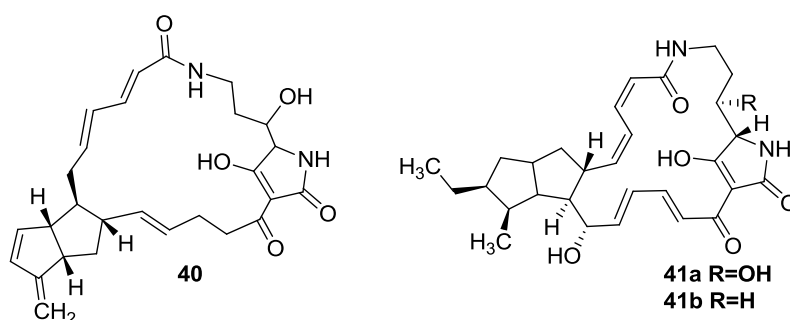
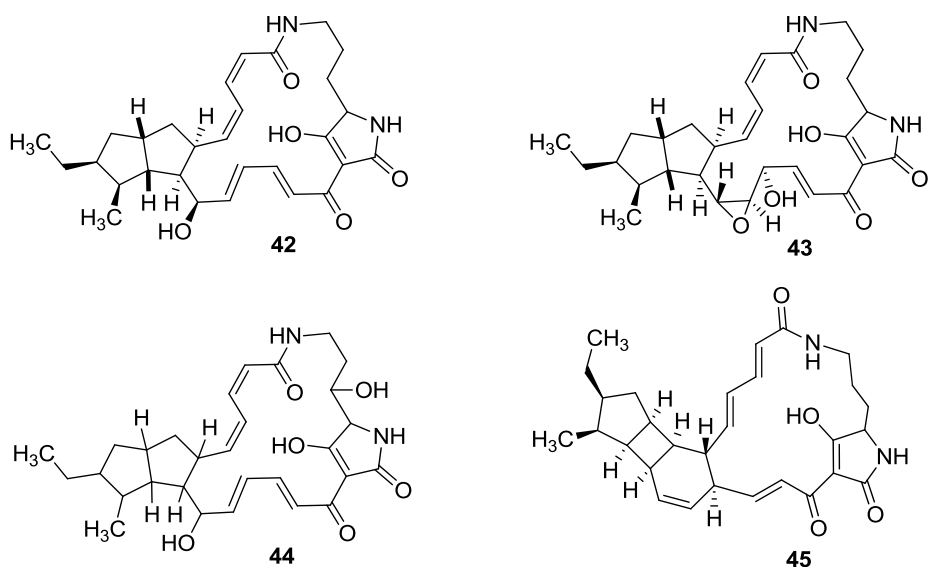


Abbildung 16. Strukturen von Geodin A (**40**)<sup>90</sup> und Alteramide (**41a/b**).<sup>91</sup>

Zwei weitere Isomere von **30** wurden vor kurzem entdeckt: 6-epi-Alteramid A (**41a**) und 6-epi-Alteramid B (**41b**). Beide wurden aus dem für heterologe Expression von Naturstoffen bekannten *Streptomyces albus* J1074 isoliert (Abbildung 16).<sup>91</sup> Aus *Streptomyces griseus* sind vier neue PTM-Strukturen isoliert worden, die eine zweigliedrige Ringstruktur aufweisen.<sup>92</sup> Dieser Stamm wird häufig im Erdboden, sowie in Tiefseesedimenten gefunden. Die neuen PTM-Strukturen bestehen aus zwei für marine PTMs üblichen, fünfgliedrigen Carbacyclen (**42**, **43**, **44**). Ein weiteres PTM (**45**) mit einer sehr außergewöhnlichen 5-4-6-Ringabfolge, die so vorher noch nicht dokumentiert wurde, konnte ebenfalls isoliert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Nebenprodukt, welches durch die fehlende Beteiligung einer Oxidoreduktase entsteht (Abbildung 17).<sup>92</sup>

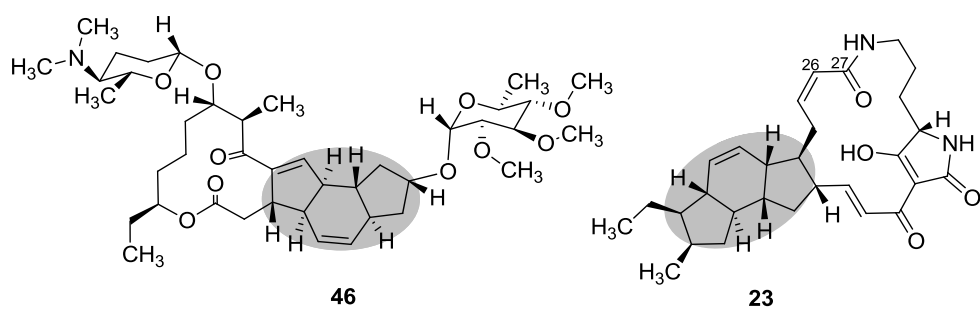


**Abbildung 17.** Strukturen der PTMs **42**, **43**, **44** und **45** aus *S. griseus*.<sup>92</sup>

Das breite biologische Aktivitätsspektrum und die daraus resultierenden medizinischen Anwendungsmöglichkeiten der PTMs wecken das Interesse die Biosynthese dieser strukturell diversen Substanzen zu untersuchen.

### 2.2.3 Hintergrund zur Biosynthese der PTMs

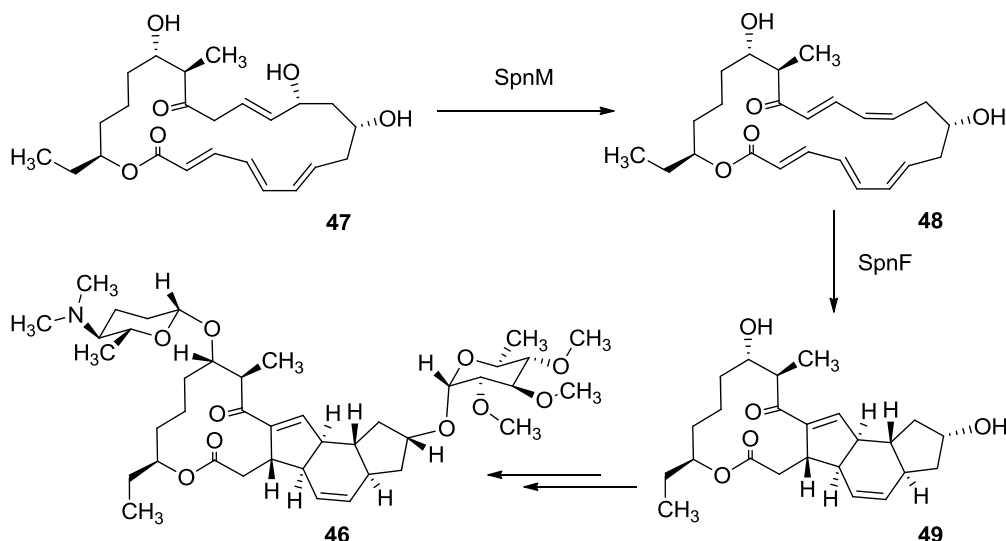
Das tricyclische Ringsystem von Ikarugamycin (**23**) erinnert stark an die Strukturen der Klasse der Spinosyne (zum Beispiel Spinosyn A (**46**)), die aus *Saccharopolyspora spinosa* isoliert wurden.<sup>93</sup> **46** besitzt selektive inhibitorische Eigenschaften gegen verschiedene Schadinsekten und wird daher in einigen kommerziellen Insektiziden genutzt. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Ringsysteme könnte angenommen werden, dass sich ebenfalls Gemeinsamkeit in der Biosynthese finden lassen (Abbildung 18).



**Abbildung 18.** Vergleich der carbacyclischen Ringstrukturen (grau hinterlegt) von Spinosyn A (**46**) und Ikarugamycin (**23**).



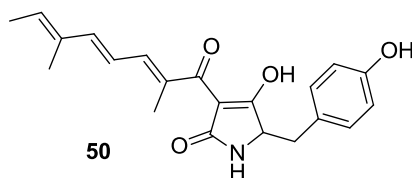
Das Grundgerüst von **46** entsteht an einer modularen Typ I PKS, an der zunächst ein lineares Vorläufermolekül aufgebaut wird, welches schließlich durch eine terminale Thioesterase in ein Macrolacton **47** überführt wird. Es wurde angenommen, dass aus **47** durch eine Michael-Addition und eine Diels-Alder-Cycloaddition das 5-6-5-tricyclische Ringsystem aufgebaut wird.<sup>14</sup> Die Beteiligung einer neuen Enzymklasse, der Diels-Alderasen, wurde ebenfalls in diesem Zusammenhang diskutiert.<sup>94,95</sup> Nach der Freisetzung von **47** katalysiert zunächst SpnM die Eliminierung eines Wassermoleküls unter Einführung einer Doppelbindung. Die S-Adenoysl-abhängige Methyltransferase (SpnF) soll für den enzymatischen Aufbau des Ringsystems, ausgehend von **48**, verantwortlich sein und die [4+2]-Cycloaddition zu Intermediat **49** katalysieren.<sup>96</sup> Liu et al. zeigten, dass eine Diels-Alder-Konvertierung von Pentaen **48** zum tricyclischen Produkt **49** unter Einwirkung von SpnF möglich ist (Abbildung 19). Diels-Alderasen werden auch in diversen anderen Biosyntheseclustern vermutet, zum Beispiel in der Solanapyron- und Lovastatin-Synthese (**16**).<sup>95,97</sup>



**Abbildung 19.** Ausschnitt aus der Biosynthese von Spinosyn A (**46**).<sup>96</sup>

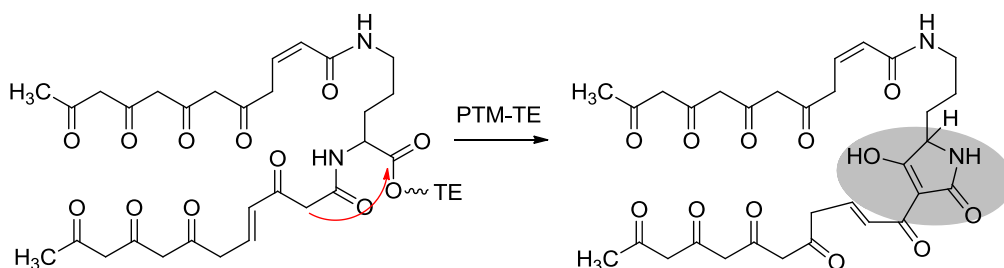
Die ersten Untersuchungen zur Biosynthese der PTMs wurden in den Laboren von Du und später von Clardy durchgeführt. Dabei entdeckte Du et al. ein bimodulares PKS-NRPS-System, welches essentiell für den Aufbau von HSAF (**25**) ist. Diese Untersuchungen stützten sich auf Deletionsmutanten des Produzentenstammes *Lysobacter enzymogenes* C3, die in Abwesenheit des PKS-NRPS-Bimoduls **25** nicht mehr produzieren konnten. Basierend auf der begründeten Annahme, dass die Biosynthese von **25** an einer modularen PKS ablaufen sollte, gingen sie davon aus, dass das Bimodul für den Einbau des Ornithins sowie der letzten beiden Kohlenstoffe C-26 und C-27 aus der Polyketidkette von **25** verantwortlich sei (siehe Abbildung 18).<sup>82</sup>

Im Jahr 2010 konnten Clardy et al. am Beispiel der Frontalamide mit Hilfe von Gendelektionen im Produzentenstamm *Streptomyces* sp. SPB78 zeigen, dass an der Biosynthese von PTMs vermutlich nur ein bimodulares PKS-NRPS-System beteiligt ist.<sup>66</sup> Ein modulares PKS I-System würde klassischerweise zwölf Module für die Synthese des Polyketidanteils der PTMs aus zwölf Kohlenstoff-Einheiten beinhalten. Das PKS-Modul aus der Frontalamid-Biosynthese besteht jedoch aus nur einem Modul mit fünf Domänen, nämlich eine Ketosynthase (KS), eine Acyltransferase (AT), eine Dehydratase (DH), eine Ketoreduktase (KR) und ein Acyl-Träger-Protein (ACP). Das Fehlen weiterer PKS-Enzyme ließ Clardy et al. vermuten, dass es sich bei diesem PKS-System um eine, für bakterielle Systeme bis dahin einzigartige, iterative PKS handeln könnte. Diese würde zwei Polyketidketten in jeweils fünf Verlängerungszyklen separat synthetisieren und der fungalen, iterativen PKS aus der Biosynthese von Prototenellin A (**50**) ähneln (Abbildung 20).<sup>66</sup>



**Abbildung 20.** Struktur von Prototenellin A (**50**), isoliert aus dem Pilz *Beuveria bassiana*.<sup>66</sup>

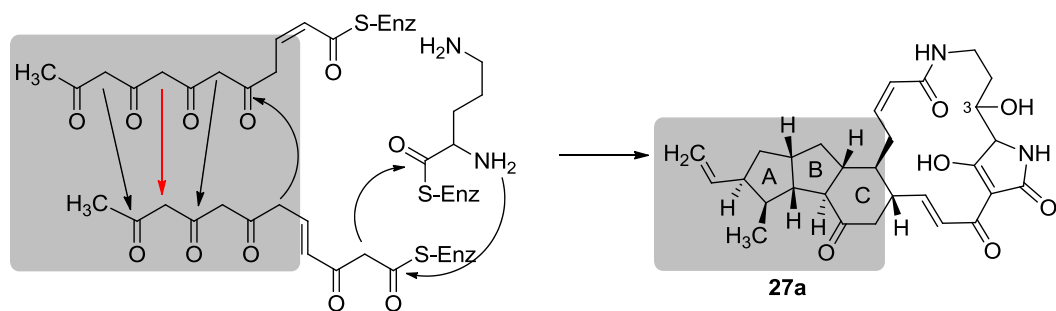
Clardy et al. postulierten zudem, dass die Thioesterase, wie auch in der Biosynthese von **50**, für den Aufbau der Tetransäure-Einheit zuständig ist. Im Jahr 2011 untersuchten Du et al. die Funktion der NRPS in einem *in vitro*-Assay mit vereinfachten, ACP-gebundenen Fettsäurederivaten (2 x Stearyl-S-ACP), NRPS-gebundenem L-Ornithin (Ornithinyl-S-NRPS), ATP und Coenzym A (CoA). Das Ornithinyl-S-NRPS wurde durch Inkubation der NRPS mit CoA und einer PPTase, gefolgt von der Zugabe von L-Ornithin und ATP, erzeugt. Sie bestätigten in diesem Versuch mit Hilfe von LC-MS-Untersuchungen und einer synthetisierten Referenz des erwarteten Produkts, dass sich die Tetransäure aus den beiden aktivierten Fettsäure-Derivaten und L-Ornithin unter Einwirkung des NRPS-Moduls bilden lässt. Dabei akzeptiert das NRPS-Modul zwei ACP-gebundene Fettsäureketten und generiert beide Amidbindungen an den  $\alpha$ - und  $\delta$ -Aminogruppen des L-Ornithins durch Peptidbindungsbildung. Außerdem vermuteten sie, dass die Thioesterase in einer Dieckmann-ähnlichen Reaktion die Synthese zur Tetransäure katalysiert.<sup>98</sup> In weiterführenden Untersuchungen stellten sie fest, dass diese Thioesterase, im Gegensatz zu gewöhnlichen Thioesterasen, als nucleophiles Agens nicht Stickstoff oder Sauerstoff, sondern ein Carbanion nutzt, um die Carbonylgruppe an der Acyl-O-Synthase anzugreifen und gleichzeitig das Vorläufermolekül von der NRPS abzulösen. Zudem fungiert diese TE unabhängig von ihrer Funktion in der PTM-Biosynthese auch als Peptidligase und als Protease (Abbildung 21).<sup>99</sup>



**Abbildung 21.** Funktion der PTM-Thioesterase aus dem *Streptomyces* sp. SPB78 Frontalamid-Cluster. Die Ausbildung der Tetramsäure-Einheit, welche durch die Thioesterase (TE) katalysiert wird ist grau hinterlegt.<sup>66</sup>

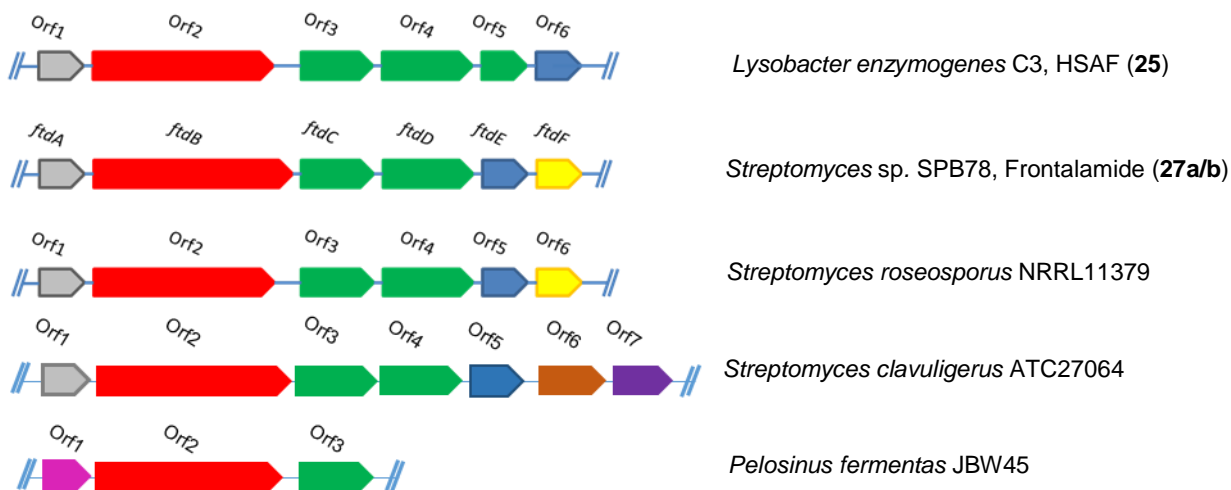
Durch bioinformatische Analysen und einem Bodenproben-Screening mit degenerierten Primern zeigte Clardy et al., dass potentielle PTM-Cluster in phylogenetisch diversen Bakterien, eingeschlossen  $\gamma$ -Proteobakterien, Actinomyceten und nicht identifizierten Symbionten mariner Schwämme, weit verbreitet sind.<sup>66,100</sup> Die Betrachtung der Gene in Nachbarschaft zu den jeweiligen bimodularen PKS-NRPS-Systemen zeigte das häufige Vorhandensein von putativen Alkohol-Dehydrogenasen, FAD-abhängigen Oxidoreduktasen, Cytochrom P450-Enzymen, und teilweise vorangestellt, von Sterol-Desaturasen (Abbildung 23).<sup>66</sup> Die Aufgaben dieser postmodifizierenden Gene, die alle in Verbindung mit Oxidations- oder Reduktionstransformationen gebracht werden können, blieb jedoch unklar. Eine Ausnahme bilden die Sterol-Desaturasen. Die hydroxylierende Funktion dieser Enzyme wurde durch die Deletion des entsprechenden Gens im Produzentenstamm der Frontalamide und des daraufhin isolierten Deshydroxy-Derivats bestätigt (vgl. Abbildung 22). Zu welchem Zeitpunkt die Hydroxylgruppe von der Sterol-Desaturase eingebracht wurde blieb unbekannt. Im Jahr 2012 wurde von Shen et al. in Fütterungsexperimenten mit 3-deOH-HSAF festgestellt, dass die Sterol-Desaturase im HSAF-Biosynthesecenter für den späten Einbau der C-3 Hydroxylgruppe im Makrolactamring des ansonsten kompletten HSAF-Strukturgerüsts verantwortlich ist.<sup>70</sup>

Bezüglich der Cyclisierung des anellierten Ringsystems vermutete die Arbeitsgruppe von Clardy, dass die Polyketidketten hauptsächlich unreduziert, durch die Redoxenzyme im Cluster, in einem Schritt zum 5-5-6-Ringsystem cyclisiert werden (Abbildung 22). Postuliert wurde für diese Cyclisierung, die für PKS-Systeme übliche Aldol-Chemie. Dies ist jedoch nicht für alle Cyclisierungsschritte einfach möglich. Der rote Pfeil markiert eine nicht plausible Cyclisierungsreaktion (Abbildung 22). Eine mögliche Erklärung für diese Reaktivität wurde bislang nicht geliefert.



**Abbildung 22.** Postulierte Biosynthese von Frontalamid A (**27a**) nach Clardy et al. Aus den grau hinterlegten Anteilen entsteht das 5-5-6-Ringsystem (ABC). S-Enz stellt das Enzymgebundene Substrat dar.<sup>66</sup>

Du et al. führten Gendeletionen im Biosynthesecluster von **25** durch und stellten bei der Deletion der putativen Alkoholdehydrogenase Orf6 fest, dass sich statt **25** Maltophilin (**24**) im Fermentationsmedium detektieren lässt. **24** entspricht dabei der unreduzierten Form von **25** und besitzt statt einer Hydroxyl- eine Carbonylgruppe am tricyclischen Ringsystem. Dies legt die Vermutung nahe, dass Orf6 für die Reduktion dieser Carbonylgruppe verantwortlich ist. Die Gendeletionen von Orf3-5 zeigten keine Produktion von **25** beziehungsweise **24** (Abbildung 23). Daraufhin wurde angenommen, dass sich die Enzymprodukte dieser Gene an der Formation des tricyclischen Ringsystems beteiligen.<sup>98</sup> Weitere Untersuchungen zum Cyclisierungsmechanismus wurden jedoch nicht durchgeführt. Die Entstehung der komplexen Carbacyclen der PTMs blieb daher bislang völlig ungeklärt.



**Abbildung 23.** Auswahl einiger PTM-Biosynthesecluster mit dem schematischen Aufbau der wichtigsten Elemente für die PTM-Biosynthese: Rot: PKS-NRPS, grün: FAD-Oxidoreduktase, blau: Alkohol-Dehydrogenase, gelb: Cytochrom P450-Enzym, grau: Sterol-Desaturase, braun: Dihydroxyaceton-Kinase, violett: O-Methyltransferase, magenta: Acyltransferase.

### 3. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Aus der hohen strukturellen Vielfalt der PTMs, mit ihren vielseitigen biologischen Eigenschaften und der wenig untersuchten Biosynthese, ergeben sich insbesondere die folgenden beiden wissenschaftlichen Fragestellungen: Wie ist es möglich, mit einer kleinen Anzahl postmodifizierender Red/Ox-Enzyme die hohe strukturelle Diversität der PTMs zu erklären? Welche Gene sind für den Aufbau des carbacyclischen Ringsystems in PTMs verantwortlich?

Die vorliegende Promotionsarbeit ist diesen Fragen gewidmet. Das erste Ziel ist, den Cyclisierungsmechanismus der PTM-Biosynthese aufzuklären. In vorherigen Studien von Clardy et al. und Du et al. wurde postuliert, dass der Carbacyclus wahrscheinlich von assoziierten Reduktasen aus zwei Tetransäure-gebundenen Polyketidketten aufgebaut wird.<sup>66,82</sup> Für diese Annahme fehlen bisher jedoch experimentelle Nachweise. Auch ein funktioneller Beweis für die iterative Funktion der PTM-PKS konnte bislang nicht erbracht werden. Die in dieser Arbeit in diesem Zusammenhang beschriebenen Untersuchungen zur PTM-Biosynthese sollen am Beispiel des Ikarugamycins (**23**) durchgeführt werden, da es eine alternative Ringabfolge von 5-6-5, im Vergleich zu den bereits bekannten 5-5-6-Ringsystemen aus den PTM-Strukturen von HSAF (**25**) und den Frontalamiden (**27a/b**), besitzt. Geplant ist hier die erstmalige Identifizierung, Klonierung und heterologe Expression des Biosyntheseegenclusters von **23**, sowie funktionelle Analysen der an der Biosynthese beteiligten Enzyme. Das im Rahmen dieser Untersuchungen zu etablierende, heterologe Expressionssystem soll ferner zur Erschließung weiterer PTMs durch "genome mining" identifizierten, putativen PTM-Clustern verwendet werden. Insbesondere die Produkte aus den Biosyntheseclustern aus *Lysobacter capsici*, *Salinispora arenicola*, *Saccharophagus degradans* und *Saccharopolyspora spinosa* sind von großem Interesse. Weiterhin soll im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Substrattoleranz von PTM-Biosyntheseenzymen zur Modifikation von strukturell verschiedenen PTMs getestet werden. Dies soll am Beispiel der Sterol-Desaturasen aus den PTM-Clustern von *Lysobacter capsici* und *Saccharophagus degradans* untersucht werden. Shen et al. zeigten in der Biosynthese von **25** bereits die in Position C-3 hydroxylierende Funktion der Sterol-Desaturase.<sup>70</sup> Für die entsprechenden Versuche sollen hier die Sterol-Desaturasen in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden, um im Anschluss **23** in *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten zu hydroxylieren.

Neben der Aufklärung der Biosynthese von PTMs und der Gewinnung neuer PTM-Strukturen soll diese Dissertation zudem einen Beitrag zur Isolierung anderer, neuer Naturstoffe leisten. Dafür wird *Streptomyces* sp. Tü6314 und die Ethylacetat-Extrakte von *Rhodococcus* RV77, *Rhodococcus* RV8 und *Streptomyces lincolnensis* RV15 auf das Vorkommen neuer Sekundärmetabolite untersucht.

#### 4. Ergebnisse

Dieses Kapitel enthält publizierte und nichtpublizierte Ergebnisse der Forschungsarbeiten, die in den Laboren der Fachgruppe Biosystemchemie an der Technischen Universität München durchgeführt wurden.

## 4.1 Arbeiten im Rahmen des PTM-Projektes

### 4.1.1 Heterologe Rekonstitution der Ikarugamycin-Biosynthese in *E. coli*

Das folgende Unterkapitel basiert auf der Publikation:

**J. Antosch**; F. Schaefer; T. A. M. Gulder, Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3011-3014.

Die Publikation beschäftigt sich mit der Aufklärung der Biosynthese von PTMs, insbesondere die Ausbildung des carbacyclischen Ringsystems betreffend. Die Untersuchungen erfolgten exemplarisch an Ikarugamycin (**23**). Der Produzentenstamm *Streptomyces* sp. Tü6239 wurde uns von Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler von der Universität Tübingen exklusiv für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt.<sup>85</sup> Durch die vorgestellten Experimente konnte erstmals das Biosynthesecluster von **23** identifiziert und ein funktioneller Beweis für das iterative PTM-PKS-System erbracht werden. Die anschließende heterologe Expression von **23** in *E. coli* BAP1 gelang mit nur drei Genen: einem PKS-NRPS-System (*ikaA*), einer FAD-abhängigen Oxidoreduktase (*ikaB*) und einer Alkohol-Dehydrogenase (*ikaC*). Die Detektion des Intermediates, welches ohne Beteiligung von *ikaC* erhalten wurde (**52**), gab Aufschluss über den möglichen Cyclisierungsweg des tricyclischen Ringsystems. Die so gewonnenen Erkenntnisse lassen auf einen sehr kompakten Biosyntheseweg von **23** schließen. Dieser startet ausgehend von zwei Polyketidketten, die separat von der PKS synthetisiert und nach Addition an L-Ornithin zur Tetramsäure-Einheit durch die NRPS umgeformt werden. Dabei wird das erste Intermediat freigesetzt (**51**). IkaB katalysiert die Bildung des außenliegenden Fünfrings, woran sich spontan eine Diels-Alder-Reaktion anschließt und der Sechsring entsteht. Das resultierende Intermediat entspricht **52**. In einer zweiten Hydrid-induzierten Cyclisierung wird der innenliegende Fünfring durch IkaC gebildet. Dieser Katalyseschritt komplettiert die Synthese zu **23** (Abbildung 24). Durch diese Arbeiten konnte erstmals ein durch funktionelle Studien verifizierter PTM-Biosynthesemechanismus aufgestellt werden. Die dargelegten Untersuchungen stellen ferner eines der wenigen Beispiele für eine erfolgreiche heterologe Expression eines bakteriellen PKS-Systems in *E. coli* dar, wobei erstmals eine *i*PKS vom Typ I verwendet wurde.<sup>102</sup>

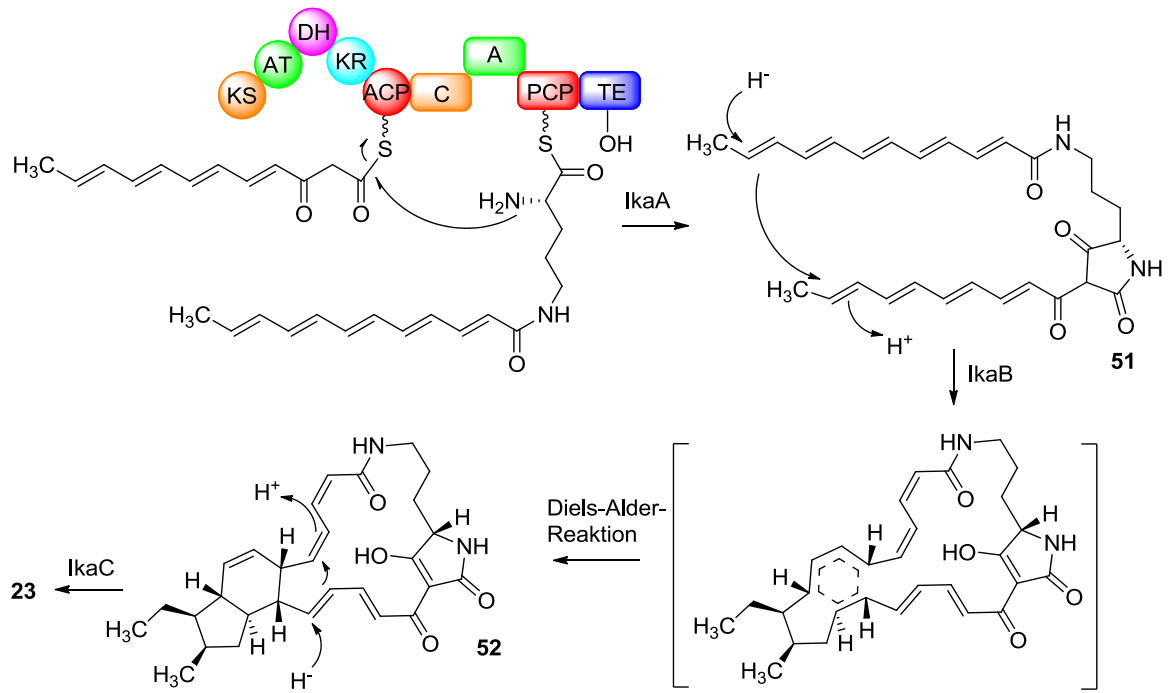


Abbildung 24. Biosyntheseroute von Ikarugamycin (23) aus *Streptomyces* sp. Tü6239.<sup>102</sup>

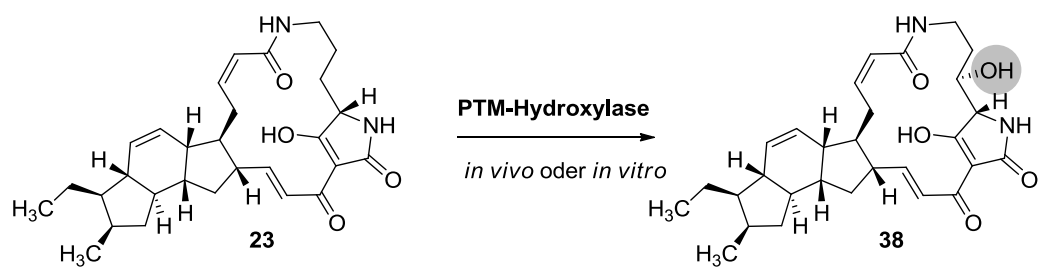


#### 4.1.2 Promiskuitive Hydroxylasen für die Funktionalisierung von polycyclischen Tetramsäure-Makrolactamen

Dieses Unterkapitel basiert auf folgender Publikation:

Greunke, C.;\* **Antosch, J.**;\* Gulder, T. A. M. Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5334-5336. (\* equally contributing first authors)

Die Untersuchungen zur Promiskuität postmodifizierender PTM-Enzyme wurden am Beispiel der Sterol-Desaturase durchgeführt, welche laut Shen et al. für den Einbau der Hydroxylgruppe in Position C-3 in HSAF (**25**) verantwortlich ist.<sup>70</sup> Die Makrolactamringe verschiedener PTMs sind strukturell nahezu identisch aufgebaut. Das ließ die Vermutung zu, dass sich die durch „genome mining“ von uns identifizierte Sterol-Desaturase aus anderen PTM-Clustern, zum Beispiel aus *Lysobacter capsici* oder *Saccharophagus degradans*, auch für die Hydroxylierung von Ikarugamycin (**23**) eignen könnten. Das hydroxylierte Produkt von **23** entspricht dem erst kürzlich isolierten Butremycin (**38**).<sup>69</sup> Zunächst sollte die Produktion von **38** in dem vorher etablierten *E. coli*-Expressionssystem<sup>102</sup> realisiert werden. Dafür wurde das **23**-produzierende *E. coli*-System mit einem Sterol-Desaturase-codierenden Expressionsvektor erweitert. Nach der Fermentation wurde der Zell-Extrakt mit einer von K. Kyeremeh (Universität von Ghana) zur Verfügung gestellten, angereicherten Butremycin-Extraktfraktion verglichen. Zudem sollte, in einem *in vitro*-Versuch, parallel gezeigt werden, dass die Hydroxylierung von **23** auch außerhalb der Zelle stattfinden kann. Dafür wurde ein käuflicher Standard von **23** zusammen mit aufgereinigter Sterol-Desaturase inkubiert. In beiden Systemen konnte eine Umwandlung von **23** zu **38** erreicht werden (Abbildung 25). Diese Arbeiten zeigen somit erstmals die Möglichkeit auf, neue PTM-Strukturen durch Austausch von PTM-Biosynthesegenen unterschiedlicher Cluster zu generieren. Sie bilden somit die Grundlage für nachfolgende Arbeiten zum „metabolic engineering“ von PTM-Strukturkörpern. Aufgrund der promiskuitiven, aber selektiven C-3-Hydroxylierungsaktivität der in PTM-Clustern vorkommenden Sterol-Desaturasen schlagen wir vor, diese Enzyme zukünftig als PTM-Hydroxylasen zu bezeichnen.<sup>131</sup>



**Abbildung 25.** *In vivo*- und *in vitro*-Hydroxylierung von Ikarugamycin (**23**) zu Butremycin (**38**). Die eingebaute Hydroxylgruppe, durch die PTM-Hydroxylase, wurde grau hinterlegt.<sup>131</sup>

### 4.1.3 Unveröffentlichte Ergebnisse aus dem PTM-Projekt

#### 4.1.3.1 Heterologe Expression weiterer PTM-Cluster in *E. coli*

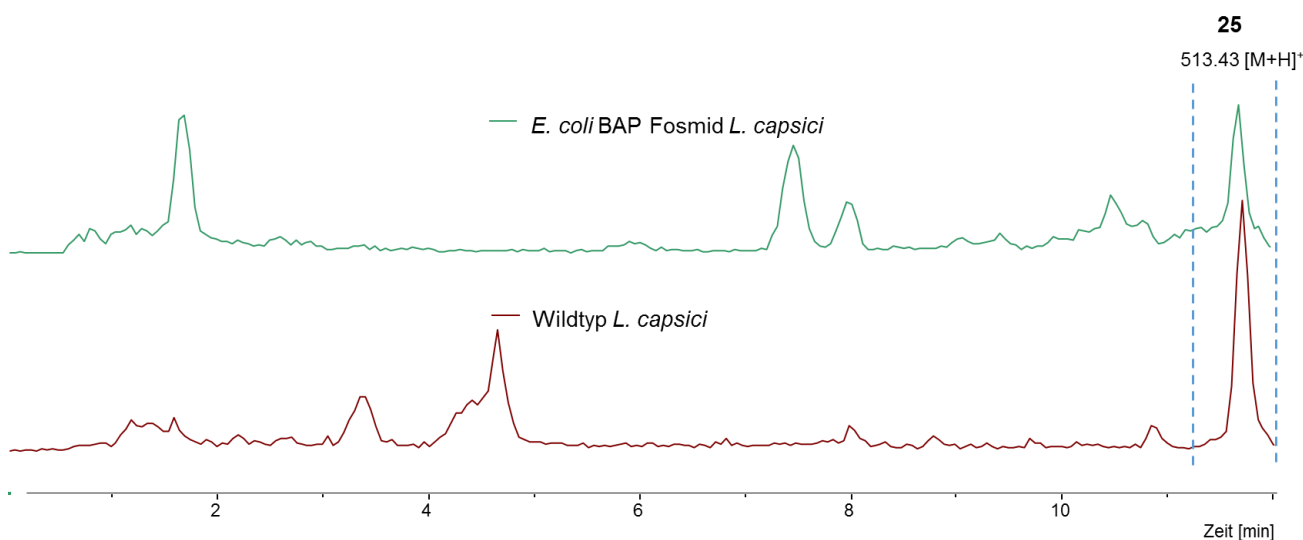
##### 4.1.3.1.1 Genomische Bibliotheken weiterer putativer PTM-produzierender Bakterien-Stämme

Die genomischen Bibliotheken für folgende Organismen wurden, wie im Anhang unter 7.1 Nr. 3 beschrieben, erstellt: *Saccharopolyspora spinosa* NRRL18395, *Streptomyces roseosporus* NRRL11379, *Saccharophaus degradans* DSM17024, *Streptomyces griseus* DSM 40236, *Lysobacter capsici* DSM19286 und *Salinispora arenicola* CNS-205.<sup>103</sup>

Die aus den Bibliotheken erhaltenen Fosmide, welche die putativen PTM-Cluster tragen, sollten mit Hilfe des etablierten heterologen Expressionssystems in *E. coli* BAP1 untersucht werden. Durch den Vergleich der *E. coli*-Extrakte mit den entsprechenden Wildtyp-Extrakten konnten die PTM-Produkte aus *L. capsici* und *S. arenicola* mittels LC-MS detektiert werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

##### 4.1.3.1.2 PTM aus *Lysobacter capsici*

Die Untersuchungen von Du et al. zeigten, dass *Lysobacter enzymogenes* C3 ein HSAF-Produzent (**25**) ist.<sup>82</sup> Nach bioinformatischer Analyse konnten wir bei *Lysobacter capsici* ebenso ein potentielles PTM-Cluster entdecken, welches eine hohe Übereinstimmung zu dem Cluster von **25** besitzt. Daraufhin wurde vermutet, dass auch *L. capsici* **25** bilden kann. Nach Erstellung einer Fosmid-Bank und Isolierung eines Fosmids, welches das gesamte PTM-Cluster aus *L. capsici* trug, wurde dieses in *E. coli* BAP1 zur heterologen Expression transformiert. Die Retentionszeiten mit den Massen von **25** im Wildtyp-Extrakt und im *E. coli*-Rohextrakt stimmten exakt überein (Abbildung 26). Durch diese Experimente wurde somit erstmalig belegt, dass auch *L. capsici* HSAF (**25**) produziert.



**Abbildung 26.** Massenspektren von HSAF (**25**) aus den Extrakten vom *L. capsici* und der heterologen Expression von **25** in *E. coli*. Die Retentionszeit von **25** wurde mit einer gestrichelten Linie markiert.

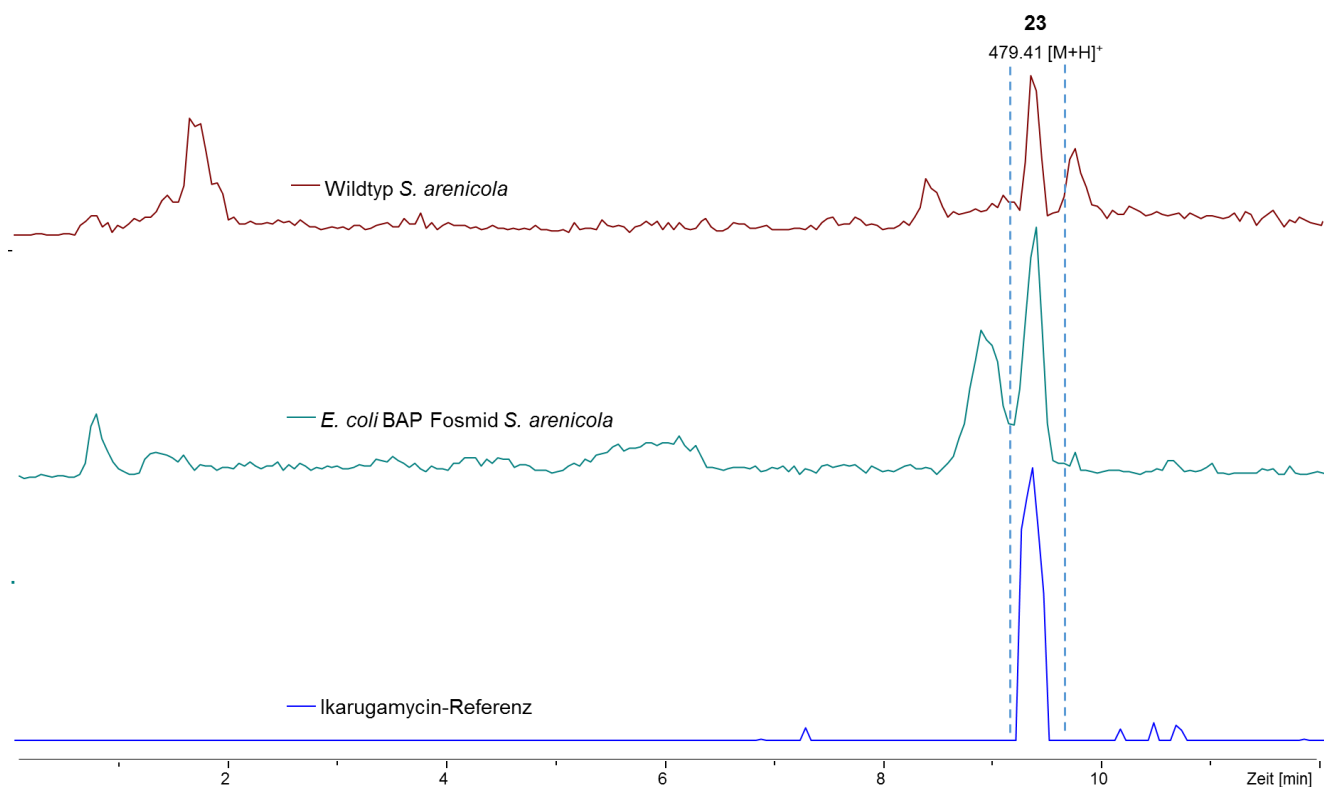
#### 4.1.3.1.3 PTM aus *Salinispora arenicola* CNS-205

Durch klassische Anzucht und Analyse der Extrakte von *S. arenicola* konnte trotz intensiver naturstoffchemischer Untersuchungen dieses Stammes bis heute kein PTM-verwandter Naturstoff isoliert werden. Zur Identifizierung des potentiellen PTMs sollte zunächst untersucht werden, ob sich Unterschiede im Wildtyp-Extrakt auffinden lassen, wenn putative PTM-Gene im Produzentenstamm deletiert werden. Die entsprechenden Deletions-Mutanten von *S. arenicola* wurden von Prof. Bradley Moore, Scripps Institution of Oceanography in San Diego, zur Verfügung gestellt. Durch den LC-MS-Vergleich der Knockout-Mutante ohne PKS-NRPS-Gen (Orf2, Knockout-Mutante  $\Delta 2407$ ) mit den Extrakten vom Wildtyp sollte der PTM-Naturstoff identifiziert werden, wobei  $\Delta 2407$  unfähig sein sollte, dass potentielle PTM zu bilden (Abbildung 27).



**Abbildung 27.** Putatives PTM-Cluster aus *S. arenicola*. Orf1 entspricht einem hypothetischen Protein, Orf2 einem PKS-NRPS-Modul, Orf3 einer Phytoen-Dehydrogenase und Orf4 einer zinkbindenden Alkohol-Dehydrogenase.

Durch Sequenzalignments stellte sich heraus, dass das Gen Orf1 im *S. arenicola* PTM-Cluster in ein Protein translatiert wird, welches keine nahe Verwandtschaft zu bekannten Proteinen besitzt (Knockout-Mutante  $\Delta 2406$ ). Bei den beiden Reduktasen Orf3 und Orf4 handelt es sich um eine Phytoen-Dehydrogenase (Knockout-Mutante  $\Delta 2408$ ) und eine Zink-bindende Alkohol-Dehydrogenase (Knockout-Mutante  $\Delta 2409$ ). Bioinformatische Analysen zeigten eine große Ähnlichkeit des potentiellen PTM-Biosyntheseclusters aus *S. arenicola* und dem von uns entdeckten Ikarugamycin-Cluster. Für die heterologe Expression des PTMs aus *S. arenicola* wurde das etablierte heterologe Expressionssystem für die Produktion **23** verwendet.<sup>102</sup> Prof. Moore stellte für diesen Versuch ein Fosmid zur Verfügung, welches das gesamte PTM-Cluster aus *S. arenicola* trug. Nach der Fermentation des Fosmids in *E. coli* BAP1 zeigte sich, dass auch das *S. arenicola*-Cluster für **23** codiert (Abbildung 28). Auch  $\Delta 2406$  war in der Lage **23** zu produzieren. Somit wurde gezeigt, dass das unbekannte Gen Orf1, nicht an der PTM-Biosynthese beteiligt ist. Durch den Chromatogramm-Vergleich beider Fermentationsextrakte der Knockout-Mutanten  $\Delta 2408$  und  $\Delta 2409$  mit den Extrakten der vorab heterolog produzierten Ikarugamycin-Intermediate, konnte festgestellt werden, dass auch die Intermediate wie erwartet die gleiche Masse besitzen (siehe Anhang 7.3).



**Abbildung 28.** Massenspuren von Ikarugamycin (**23**) aus den Extrakten von *S. arenicola*, der heterologen Expression in *E. coli* und der Ikarugamycin-Referenz.

Die hier aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass das im Rahmen dieser Arbeiten etablierte PTM-Expressionssystem in *E. coli* generell zur Produktion einer Vielzahl von PTMs geeignet zu sein scheint. Weiterführende Arbeiten dazu werden momentan in der FG Biosystemchemie durchgeführt.

#### 4.1.3.2 Heterologe Expression von PTMs in Streptomyceten

Für eine Steigerung der PTM-Ausbeute in heterologen Expressionssystemen wurde die Produktion in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen untersucht. Da eine hohe Verwandtschaft zwischen den originalen PTM-Produzenten und Streptomyceten besteht, liegt die Vermutung nahe, dass die Verwendung ähnlicher Expressionsstämme mit analogem Codon-Gebrauch die PTM-Ausbeute verbessern könnte. Zudem besitzen Streptomyceten im Vergleich zu *E. coli* höher entwickelte Expressions- und Sekretionsmechanismen für Proteine, welche zu gesteigerten Produktausbeuten führen können.<sup>104,105</sup> Als Expressionsstämme wurden *Streptomyces coelicolor* M1146, M1152 und M1154, sowie *Streptomyces albus* JI1074 verwendet. *S. coelicolor* M1146 besitzt, aufgrund deletierter Naturstoffcluster im Genom,

einen verringerten metabolischen Hintergrund. Die Stämme M1152 und M1154 sind eine Weiterentwicklung von M1146. Sie verfügen, wegen sogenannten „Ochi-Typ“-Mutationen, über höhere Transkriptionsraten der Gene, welche für die Produktion von Sekundärmetaboliten nötig sind.<sup>106</sup> *S. albus* besitzt ein eigenes PTM-Cluster auf seinem Genom.<sup>91</sup> Daher sind alle notwendigen Expressionselemente für die heterologe Produktion von PTMs vorhanden. Im ersten Schritt wurden die ausgewählten putativen PTM-Biosynthesecluster von *Saccharopolyspora spinosa* und *Saccharophagus degradans* in einen geeigneten Shuttlevektor kloniert (Abbildung 29).



**Abbildung 29.** Darstellung der putativen PTM-Cluster aus *Saccharophagus degradans* und *Saccharopolyspora spinosa* im Vergleich zum Ikarugamycin-Cluster. Die unterschiedlichen Gene wurden farblich markiert: Rot: PKS-NRPS; grau: PTM-Hydroxylase; grün: FAD-abhängige Oxidoreduktase; dunkelgrau: kurzkettige Alkohol-Dehydrogenase; blau: Alkohol-Dehydrogenase; hellgrün: Phytoen-Dehydrogenase; orange: Linalool-8-Monooxygenase; gelb: Cytochrom P450-Enzym; braun: O-Methyltransferase.

Als Shuttle-Vektor wurde pSET152 genutzt.<sup>107</sup> Auf diesem Vektor liegt ein Int-Gen, das für eine Integrase codiert und den Vektor über *attB*-Rekombinationsstellen in das Streptomyceten-Chromosom integriert.<sup>108</sup> Nach dem Einbringen eines potentiellen PTM-Clusters in den pSET152-Vektor wurde upstream des Clusters ein *ermE*-Promotor mit einer ribosomalen Bindungsstelle (RBS) kloniert.<sup>109</sup> Die erhaltenen Konstrukte wurden in *E. coli* ET12567 pUZ8002 transformiert und anschließend in die unterschiedlichen Streptomyceten konjugiert.<sup>110</sup> Die erhaltenen Exkonjugate wurden dann in dem Expressionsmedium nach Zhang et al.<sup>111</sup> fermentiert und die Zellextrakte mittels LC-MS auf potentielle PTM-Massen untersucht. Bislang konnte jedoch in diesen Systemen noch keine PTM-Produktion für einen der beiden untersuchten Stämme detektiert werden. Eine Ursache für die ausbleibende Produktion könnte zum Beispiel der *ermE*-Promotor darstellen. Es existieren verschiedene Promotorsysteme und auch *ermE*-Sequenzen, die sich für die heterologe Expression im Streptomyceten eignen und in weiterführenden Experimenten untersucht werden könnten.<sup>92</sup> Außerdem konnte durch Du et al. am Beispiel der heterologen Produktion von **25** gezeigt werden, dass sich die PTM-Produktion starten lässt, wenn der Promotor direkt vor das PKS-NRPS-Modul eingebracht wird.<sup>112</sup> Entsprechende Arbeiten werden momentan in der FG Biosystemchemie durchgeführt.



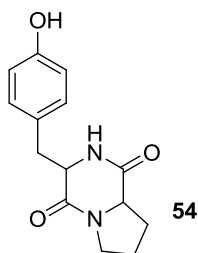


Neben dem Einbau ungewöhnlicher Aminosäuren, beispielsweise  $\beta$ -Hydroxynorvalin, N-Formyl-Valin und Methoxy-Tryptophan, wurden mehrere D-Aminosäuren detektiert, darunter D-Alanin, D-allo-Isoleucin und D-Methyltyrosin. Die Stereozentren wurden nach vollständiger Hydrolyse von **53** durch Derivatisierung der dann freien Aminosäuren mit dem bifunktionellen Marfey's Reagenz unter Bildung von Diastereomeren und Vergleich der derivatisierten Referenzamino­säuren bestimmt. Durch die Sequenzierung des gesamten Genoms konnte zudem ein Biosynthesecluster entdeckt werden, welches für **53** codiert. Die Position der Epimerasen im Cluster bestätigte und vervollständigte die Konfiguration der Aminosäuren. Neben den stereochemischen und biosynthetischen Analysen wurde die biologische Aktivität von **53** untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass **53** ein spezifischer Inhibitor für das Akne-­verursachende Bakterium *Propionibacterium acnes* darstellt. Diese biologischen Untersuchungen wurden am Kieler Wirkstoff-Zentrum, GEOMAR (KiWiZ) von Frau Dr. Jutta Wiese durchgeführt (Arbeitsgruppe von Prof. J. F. Imhoff).

## 4.2.2 Unveröffentlichte Ergebnisse zur Isolierung von Naturstoffen

### 4.2.2.1 Naturstoff-Isolierung aus *Rhodococcus* RV77 und RV8

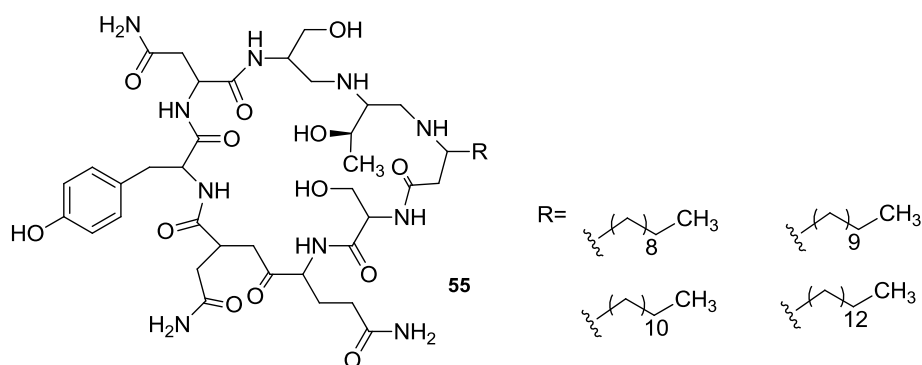
Die Bearbeitung der beiden Stämme *Rhodococcus opacus* B-4 (RV77) und *Rhodococcus fascians* (RV8) erfolgte ausgehend von Ethylacetat-Rohextrakten, welche von Herrn Dr. Usama Abdelmohsen (Gruppe von Frau Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurden. Das Ziel dieses Projektes war es, die vorliegenden Rohextrakte auf interessante Sekundärmetabolite zu untersuchen, sowie deren Struktur aufzuklären. Aus beiden Stämmen wurde das Diketopiperazin Cyclo(prolyltyrosyl) (**54**) isoliert (Abbildung 31). **54** konnte bereits 1964 aus *Streptomyces gelaticus* und in den darauffolgenden Jahren aus vielen weiteren Stämmen isoliert werden.<sup>114</sup> Diketopiperazine besitzen ein breites biologisches Aktivitätsspektrum von antibakteriellen,<sup>115</sup> über antifungalen,<sup>116</sup> bis hin zu phytotoxischen<sup>117</sup> Eigenschaften. Sie fungieren zudem als Signalstoffe in Quorum Sensing-Systemen.<sup>118</sup> Die hohe Anzahl an biologischen Wirkungen und der einfache Aufbau aus nur zwei L-Aminosäuren, in diesem Fall aus Tyrosin und Prolin, korreliert mit dem häufigen Auffinden dieser Substanzklasse.



**Abbildung 31.** Struktur von Cyclo(prolyltyrosyl) (**54**), einem Diketopiperazin, welches aus RV77 und RV8 isoliert wurde.

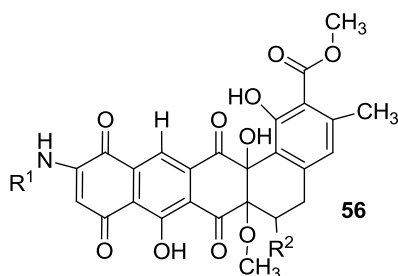
### 4.2.2.2 Substanzisolierung aus *Streptomyces* sp. RV15

*Streptomyces lincolnensis* sp. RV15 ist ein mariner Actinomycet, welcher aus Schwammmaterial von *Dysidea tupha* isoliert wurde. Ein Ethylacetat-Rohextrakt aus einer Fermentation von RV15, wurde von Herrn Dr. Usama Abdelmohsen (Gruppe von Frau Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Stamm wurden bereits in vorangegangenen Untersuchungen neue Sekundärmetabolite durch Hentschel und Bringmann et al. im Jahr 2012 isoliert. Es handelte sich dabei um die cyclischen Lipopeptide Cyclodysidin A-D (**55**) (Abbildung 32), welche sowohl antibiotische als auch zytostatische Wirkungen aufweisen.<sup>119</sup>



**Abbildung 32.** Strukturen der vier cyclischen Lipopeptide aus dem Stamm *Streptomyces* RV15, welcher symbiotisch mit dem Schwamm *Dysidea Tupha* zusammenlebt.<sup>119</sup>

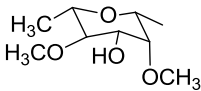
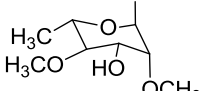
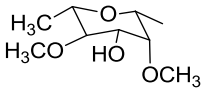
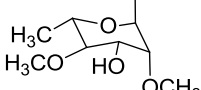
Das Ziel dieses Projektes war, den vorliegenden Rohextrakt zunächst mittels HPLC zu untersuchen, interessante, möglicherweise neue Sekundärmetabolite daraus zu isolieren und diese dann strukturell zu charakterisieren. Der Ethylacetat-Extrakt wurde mit Methanol und Cyclohexan im Scheidetrichter separiert und via HPLC auf Metaboliten-Bestandteile analysiert. Dabei konnten in der Methanolphase Signale in ausreichender Konzentration detektiert werden, welche nach ersten Untersuchungen zur Substanzklasse der Anthrachinone gehörten. Insgesamt konnten aus *Streptomyces* sp. RV15 sechs Sekundärmetabolite, welche alle eine intensive Rotfärbung aufwiesen, isoliert und deren Strukturen aufgeklärt werden. Die UV-Spektren der Substanzen wiesen starke Ähnlichkeiten untereinander auf. Nach NMR-spektroskopischer Charakterisierung zeigte sich, dass die entdeckten Metabolite bereits bekannt waren. Dabei handelte es sich um die antibiotisch wirksamen Substanzen SF2446 A1-A3 und B1-B3 (**56**), die bereits im Jahr 1988 von Shomura et al. aus *Streptomyces* sp. SF2446 isoliert wurden.<sup>120</sup>



**Abbildung 33.** Allgemeine Struktur der SF2446-Antibiotika (**56**).<sup>121</sup> Für R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> siehe Tabelle 1.

Die SF2446-Antibiotika tragen alle dasselbe Grundgerüst (Abbildung 33) und unterscheiden sich nur durch ihre Substituenten R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> (Tabelle 1). Sie besitzen eine hohe Aktivität gegen grampositive Bakterien und Mykoplasmen, beispielsweise gegen *Mycoplasma gallisepticum*.<sup>120</sup>

**Tabelle 1.** Substituenten der Substanzen SF2446 A1, A2, A3, B1, B2, B3.

Bezeichnung	R1	R2	Molare Masse [g/ mol]
A1		OH	697.64
A2		OH	697.64
A3	H	OH	523.45
B1		H	681.64
B2		H	681.64
B3	H	H	507.45

## 5. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Publikation „**Heterologe Rekonstitution der Ikarugamycin-Biosynthese in *E. coli***“ leistet einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der PTM-Biosynthese. Erstmals wurden experimentelle Beweise, am Beispiel des Ikarugamycins (**23**, Ika), für den Cyclisierungsmechanismus des anellierten PTM-Ringsystems und das iterative PKS I-System erbracht. Die *i*PKS generiert dabei zwei Polyketidketten, die separat von der NRPS verknüpft werden. Diese Funktionsweise ist einzigartig und so bislang noch nicht dokumentiert worden.

Die Nachweise erfolgten durch die heterologe Produktion des Ika-Clusters in *E. coli* BAP1.<sup>122</sup> Dieser *E. coli* wurde als Expressionsstamm genutzt, da er eine chromosomale Kopie der promiskuen Phosphopantetheinyl-Transferase (Sfp) besitzt, die die posttranslationale Aktivierung von Acyl- und Peptidyl-Trägerproteinen in PKS- beziehungsweise NRPS-Systemen katalysiert.<sup>43</sup> Voraussetzung für die Untersuchungen war die Identifizierung des Biosynthese-Clusters von **23**. Das Cluster wurde im Produzentenstamm *Streptomyces* sp. Tü6239 mit Hilfe von degenerierten Primern entdeckt. Diese Primer amplifizierten konservierte, spezifische Bereiche aus der PTM-Thioesterase. Die Vergleiche der peptidischen Sequenzen von PTM-Thioesterasen (TE) und TE aus Nicht-PTM-Biosynthese-Clustern zeigten Bereiche auf, die lediglich in PTM-TEs stark konserviert waren. Die erstellte genomische Bibliothek von *Streptomyces* sp. Tü6239 brachte ein Fosmid hervor, welches das gesamte Ika-Cluster trug. Insgesamt wurden drei Plasmide generiert, die alle Gene bis Orf+7 (pJA\_Orf+7), die drei Gene *ikaABC* (pJA\_ikaABC), oder lediglich *ikaAB* (pJA\_ikaAB) enthielten (Abbildung 34). Dabei entspricht *ikaA* dem spezifischen PKS-NRPS-Modul, *ikaB* einer FAD-abhängigen Oxidoreduktase und *ikaC* einer Alkohol-Dehydrogenase.

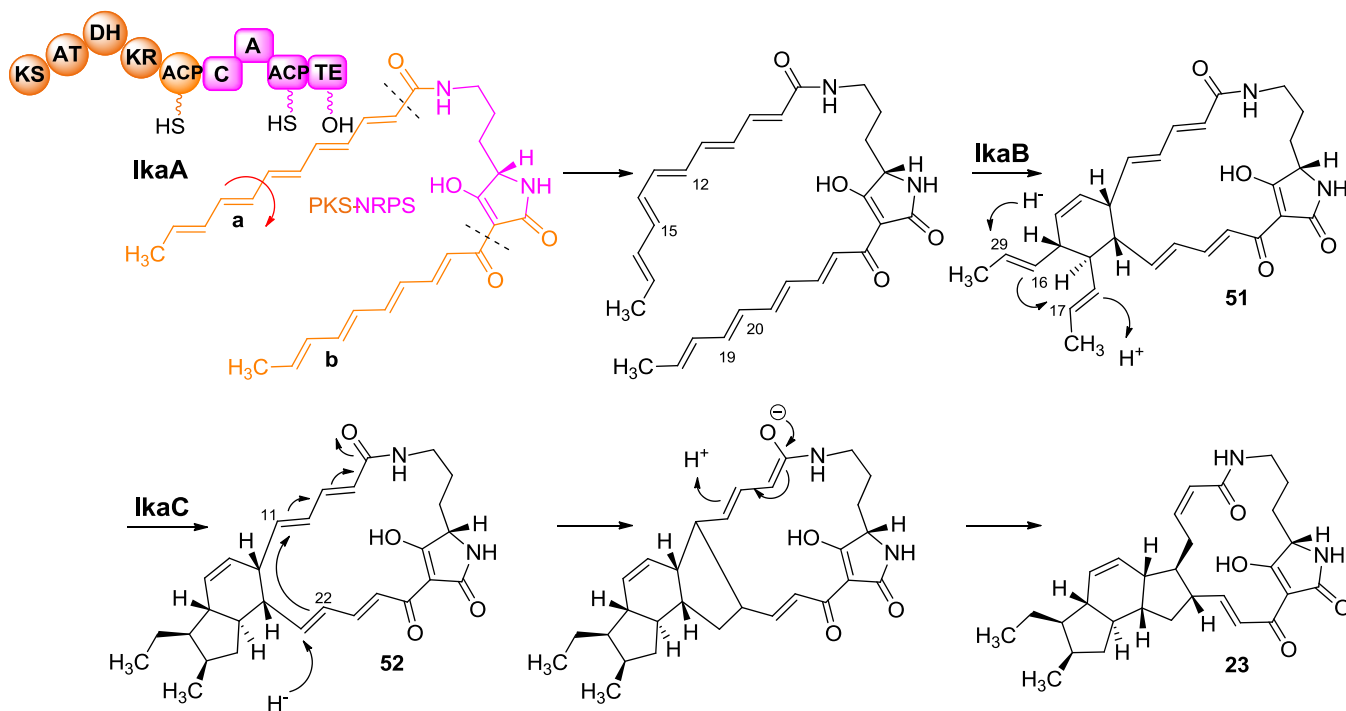


**Abbildung 34.** Vektoren für die heterologe Expression von Ikarugamycin und den Intermediaten. Rot: PKS-NRPS (*ikaA*), grün: FAD-abhängige Oxidoreduktase (*ikaB*), blau: Alkohol-Dehydrogenase (*ikaC*), gelb: Cytochrom P450-Enzym, pink: Haloacid-Dehalogenase, grau: Glycosylase, orange: Deacetylase.

Die Expressionsexperimente, die mit diesen Konstrukten durchgeführt wurden, zeigten die Bildung von **23** nicht nur mit pJA\_Orf+7, sondern auch mit dem auf drei Gene reduzierten pJA\_ikaABC. Die Analysen der heterologen Expressionsexperimente mit pJA\_ikaAB zeigte statt **23** die Anreicherung eines Metaboliten, dessen molekulare Masse dem postulierten IkaAB-Intermediat **52** entspricht. Zhang et al.

bestätigten kurze Zeit später mit einer NMR-spektroskopischen Untersuchung die postulierte Struktur der Zwischenstufe von **52**.<sup>111</sup> Das zusätzlich durchgeführte *in vitro*-Experiment, mit aufgereinigter Alkohol-Dehydrogenase aus *Streptomyces sp.* ZJ306, belegte den Ringschluss durch IkaC und den Einbau eines Deuteriums in Position C-15.<sup>111</sup>

Neben der bereits vorgestellten Biosynthese zu **23** ist eine alternative Syntheseroute möglich. Dabei entsteht, spontan zwischen C-15 und C-19, sowie zwischen C-20 und C-12, zuerst der Sechsring im IkaA-Intermediat (**51**). Voraussetzung dafür ist, dass beide Polyketidketten vorab in geeigneter Konfiguration vorliegen. Im zweiten Schritt wird durch IkaB der erste Fünfring zwischen C-16 und C-17 durch Addition eines Hydrids in Position C-29 katalysiert. Der innenliegende Fünfring wird erneut durch Hydrid-Induktion von IkaC zwischen C-22 und C-11 geschlossen (Abbildung 35).



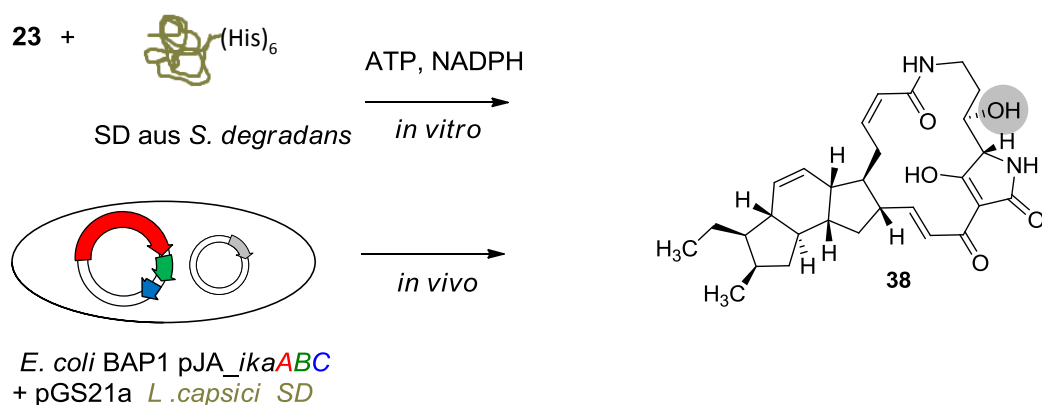
**Abbildung 35.** Alternative Biosyntheseroute von Ikarugamycin (**23**) aus *Streptomyces sp.* Tü6239.

Die Expression des PKS-NRPS-Moduls (pJA\_ikaA) in *E. coli* führte zum Nachweis der Masse von **51** (unpubliziertes Ergebnis, siehe Anhang 7.3). Dies deutet, unter der Annahme das Polyketetten instabil sind,<sup>123</sup> auf die alternative Ringschließung hin. Bei dieser Biosyntheseroute würde ein stabileres IkaA-Intermediat (**51**) entstehen. Du et al. untersuchte in einem *in vitro*-Assay, unter Einsatz aufgereinigter PKS- und NRPS-Proteine, die Bildung des ersten Intermediates von **25**. Im ersten Schritt wurde aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, sowie NADPH und dem aufgereinigten PKS-Modul aus *E. coli* ein Polyen erzeugt. Die nachgeschaltete Reaktion des NPRS-Moduls mit Ornithin und ATP führte zur

Ausbildung der Tetramsäure-Einheit mit zwei Polyenkettens, die iterativ aufgebaut und separat eingebaut werden mussten.<sup>112</sup> Die Analyse des entstehenden Intermediates mittels LC-MS/MS ließ Fragmente detektieren, die den beiden linearen Polyenkettens entsprechen würden. Die Fragmentierung würde dabei in Kette **b** zwischen dem Keton und dem Tetramsäurerest und in Kette **a** zwischen der Polyenkette und der Peptidbindung auftreten (Abbildung 35). Das Intermediat des PKS-NRPS-Moduls von **25** konnte ebenfalls im Streptomyceten heterolog produziert und eine Masse, welche **51** entsprach, detektiert werden.<sup>112</sup> Diese Ergebnisse sind jedoch nicht direkt auf die Biosynthese von **23** übertragbar, da an der Synthese von **25** keine Diels-Alder-Reaktion beteiligt sein kann. Zusätzlich konnte die Arbeitskreisgruppe von Du durch die heterologe Expression des gesamten Clusters ein Derivat von **25** isolieren und strukturell aufklären. Es handelt sich dabei um ein strukturverwandtes PTM mit einer 5-5-Ringabfolge, welches in Position C-12 eine andere Konfiguration besitzt. Dies führte vermutlich zur ausbleibenden Bildung des Sechsrings wie in **25**. Die Untersuchungen geben einen Hinweis darauf, dass die Polyenkettens in einer bestimmten Konfiguration durch die *i*PKS sezerniert werden. Die Entstehung des Nebenproduktes zeigt zudem eine verringerte Stereospezifität bei der Cyclisierung und/oder Isomerisierung der Alkene.<sup>64,112</sup> Um die Biosynthese der Polyketidketten von **25** zu entschlüsseln, versuchten Dussault et al. mit synthetisch hergestellten SNAC-Thioestern von Dodecapentaensäuren in einem *in vitro*-Assay mit NRPS und L-Ornithin, das PKS-NRPS-Intermediat darzustellen. Dies gelang jedoch nicht. Zu vermuten ist, dass das NRPS-Modul die SNAC-gebundenen Polyen-Derivate nicht akzeptiert. Ein anderer Grund könnte sein, dass sich diese sensitiven Produkte vor der Umsetzung durch die NRPS zersetzen.<sup>124</sup> Ferner fehlte ein polyungesättigtes Substrat, das Tetraen-Keton (Polyketidkette **b**), welches neben dem Pentaen-Derivat für die Generierung des ersten Intermediates vorhergesagt wird (Abbildung 35). Zu klären bleibt daher, in welcher Konfiguration die Doppelbindungen in beiden Hexaketiden nach deren Aufbau durch die *i*PKS vorliegen und ob die Reduktasen die Konfigurationen beeinflussen beziehungsweise Konfigurationsänderungen vornehmen. Eine gesteigerte Expression von *pJA-ikaA* und die Isolierung von **51** könnte zur Struktur-Aufklärung der Polyenkettens genutzt werden, unter der Voraussetzung, dass die Stabilität des *IkaA*-Intermediates für die Untersuchungen ausreichend ist. Ein weiterer, erforschungswerter Aspekt wäre es herauszufinden, welche Faktoren die Länge der Polyketidketten bestimmen und wie das unterschiedliche Reduktionsmuster der Polyenkettens entsteht. Dabei sorgt die  $\beta$ -Ketogruppe in Kette **b** für die Entstehung der CH-Acidität zwischen den beiden Carbonylgruppen und somit zur Bildung der Tetramsäure-Einheit und der Produktfreilassung.<sup>112</sup> In zukünftigen Projekten könnten Reduktasen verschiedener PTM-Cluster untereinander ausgetauscht werden, um zu untersuchen ob sich dabei andere Cyclisierungsmuster ergeben. Dies ist Gegenstand laufender Projekte in der FG Biosystemchemie.

Die Publikation: „**Promiskuitive Hydroxylasen für die Funktionalisierung von polycyclischen Tetransäure-Makrolactamen**“ ermöglichte den ersten Nachweis der Substrattoleranz von PTM-Biosyntheseenzymen. Durch Shen et al. wurde bekannt, dass die Sterol-Desaturase, im weiteren Verlauf PTM-Hydroxylase genannt, in HSAF (**25**) für den postmodifizierenden Einbau der Hydroxylgruppe in Position C-3 verantwortlich ist.<sup>70</sup> Die Makrolactamringe sind in allen PTMs strukturell nahezu identisch aufgebaut. Somit lag die Vermutung nahe, dass sich nicht nur das Intermediat, deOH-HSAF, durch die PTM-Hydroxylase hydroxylieren lässt, sondern auch nicht-native PTM-Strukturen. Da der Stamm *Lysobacter enzymogenes* C3, den Shen et al. für die Versuche nutzte, nicht kommerziell erhältlich war wurde nach Sequenzhomologen der PTM-Hydroxylase, mittels bioinformatischer Analysen, in diversen anderen PTM-Clustern gesucht. Die putativen PTM-Cluster aus den kommerziell erhältlichen *Lysobacter capsici* und *Saccharophagus degradans* enthielten ebenfalls PTM-Hydroxylasen. Die Hydroxylierung von Ikarugamycin (**23**) erfolgte in *in vivo*- und in *in vitro*-Experimenten. Dabei entspricht das hydroxylierte Produkt von **23** dem isolierten Butremycin (**38**).<sup>69</sup> Für den *in vivo*-Versuch wurde das **23**-produzierende *E. coli*-System (aus der Publikation 4.1.1) mit einem PTM-Hydroxylase-codierenden Expressionsvektor (aus *L. capsici*) erweitert. Dabei zeigte sich eine vollständige Umsetzung von **23** zu **38**. Im Vergleich dazu wurde im parallel durchgeführten *in vitro*-Versuch, in dem käuflich erworbenes **23** mit einer angereicherten PTM-Hydroxylase-Fraktion versetzt wurde, nur eine ca. 30-prozentige Umsetzung erreicht. Hierbei wurde die PTM-Hydroxylase aus dem *S. degradans*-Cluster verwendet, da sich bei dem Assay mit der Hydroxylase aus *L. capsici* nur eine 10-prozentige Ausbeute erreichen ließ. Auch mit einem Fütterungsexperiment, in dem **23** zu einer induzierten Kultur von PTM-Hydroxylase-produzierenden *E. coli* hinzugegeben wurde, konnte nur eine geringe Produktion von **38** beobachtet werden. Die Umsetzung wurde in diesem Experiment vermutlich durch den geringen Zellmembran-Transfer von **23** limitiert. Die Ausbeute von **38** erhöhte sich auf 50 Prozent, wenn statt dem angereicherten Enzym die Überstandfraktion des Zellysats der entsprechenden Proteinexpression verwendet wurde. Die Summe dieser Ergebnisse lässt die Vermutung zu, dass sich die Aktivität des Enzyms während der Aufreinigung reduziert. Eine weitere denkbare Erklärung wäre, dass sich im Lysat-Überstand zusätzliche Faktoren befinden, die für eine verbesserte Stabilität des Enzyms sorgen. Die *in vitro*-Experimente zeigen ferner, dass es Unterschiede in der Stabilität, eventuell auch durch Proteasen verursacht, zwischen den einzelnen PTM-Hydroxylasen aus verschiedenen PTM-Clustern gibt (Abbildung 36).





**Abbildung 36.** a.) *In vitro*-Hydroxylierung von Ikarugamycin (**23**) zu Butremycin (**38**) durch die PTM-Hydroxylase (SD) aus *S. degradans* b.) *In vivo*-Hydroxylierung von Ikarugamycin (**23**), welches mit dem heterologen Expressionssystem *E. coli* BAP1 pJA-ikaABC parallel generiert wird, durch die PTM-Hydroxylase (SD) aus *L. capsici*.

Im Vergleich mit einem Standard von **38**, der uns von Herr Dr. Kyeremh (Universität von Ghana) zur Verfügung gestellt wurde, zeigte sich, dass die Masse und Retentionszeit von **38** exakt mit den *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten übereinstimmte. Eine noch höhere Ausbeute von **38** könnte dadurch erreicht werden, dass eine PTM-Hydroxylase in den **23**-produzierenden *Streptomyces* sp. Tü6239 eingebracht wird. Voraussetzung dafür ist, dass das GC-arme Gen der PTM-Hydroxylase aus *L. capsici* beziehungsweise aus *S. degradans* vom GC-reichen *Streptomyces* transkribiert und translatiert werden kann. Um dieses Problem zu umgehen, könnte eine Codon-Optimierung für das PTM-Hydroxylase-Gen vorgenommen werden. In fortführenden Experimenten könnte zusätzlich versucht werden, weitere postmodifizierende Enzyme innerhalb der PTM-Cluster auszutauschen, um so innovative PTM-Strukturen zu kreieren.

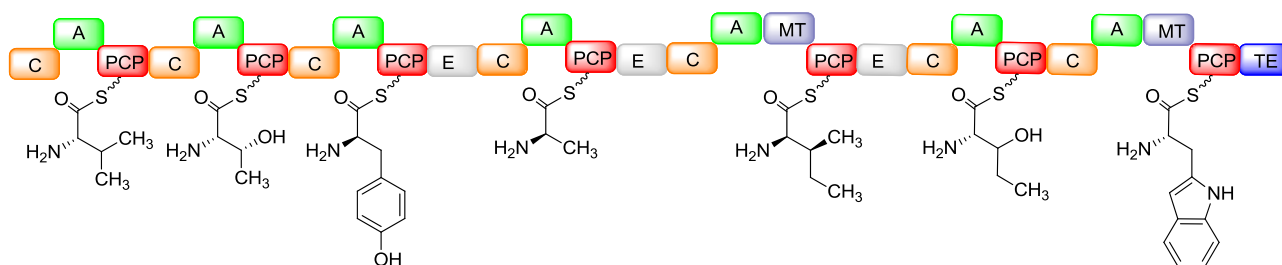
Für die weitere **Erschließung von PTM-Strukturen** wurden von interessanten, potentiellen PTM-Produzenten-Stämmen genomische Bibliotheken angelegt. Ein Sequenzalignment des HSAF-Clusters aus *Lysobacter enzymogenes* C3 und dem potentiellen PTM-Cluster aus *Lysobacter capsici* zeigte eine große Übereinstimmung. Daraufhin wurde das entsprechende Fosmid, welches das gesamte potentielle PTM-Cluster aus *L. capsici* trug, in *E. coli* BAP1 transformiert. Nach Fermentation und Extraktion konnte im *E. coli* Extrakt die Masse für **25** nachgewiesen werden. Dabei wurde als Referenz der Wildtyp-Extrakt von *L. capsici* verwendet. Ebenso wurde durch bioinformatische Analyse festgestellt, dass die Cluster aus *S. arenicola* und dem **23**-produzierenden Stamm *Streptomyces* sp. Tü6239 nahezu identisch sind. Die Annahme, dass auch *S. arenicola* ein Produzent von **23** ist, bestätigte sich in den LC-MS Untersuchungen des entsprechenden *E. coli*-Extrakts. Von Prof. Dr. Bradley Moore wurden Knockout-Mutanten erhalten, die einzelne Gene des *S. arenicola*-PTM-Clusters deletiert hatten. Die Fermentation des Knockout-Mutanten  $\Delta 2408$  (entspricht der Deletion von *ikaB*) zeigte die Produktion von **51**. Die Knockout-Mutante

$\Delta 2409$  (entspricht der Deletion von *ikaC*) bildete ein Intermediat, welches der Masse von **52** entsprach. Bei der Deletion des entsprechenden *ikaA*-Gens ( $\Delta 2407$ ) zeigte sich, wie erwartet, keine Produktion von **23**. Es stellte sich heraus, dass sich das *E. coli*-basierte Produktionssystem zur analytischen Untersuchung von bekannten PTM-Strukturen eignet. Die kurzen Fermentationszeiten und die einfache Manipulation des gut untersuchten *E. coli*-Bakteriums gehören zu den Vorteilen. Nachteilig hingegen sind die geringen Mengen der produzierten PTMs, die eine physiko-chemische Analyse von unbekanntem PTM-Strukturen erschweren. Einer der Gründe dafür könnte die Bildung von Einschlusskörpern sein, sowie das für PTM-Cluster aus GC-reichen Streptomyzeten teilweise ungeeignete Expressionssystem.<sup>125</sup>

Für die **heterologe Produktion von PTMs in Streptomyzeten** zur Steigerung von Produktionsmengen wurden die potentiellen PTM-Cluster von *Saccharophagus degradans* und *Saccharopolyspora spinosa* in einen geeigneten Shuttlevektor kloniert. Zusätzlich wurde ein für Streptomyzeten geeigneter, konsekutiver *ermE*-Promotor und eine ribosomale Bindungsstelle vor die PTM-Cluster eingebracht. Durch die Produktion in Streptomyzeten sollten die Nachteile des *E. coli*-basierten Expressionssystems umgangen und eine höhere PTM-Ausbeute erreicht werden. Die Nachteile der Streptomyzeten-basierten Expression sind lange Fermentationszeiten und eine relativ schwierige Manipulation der heterologen Wirtsstämme. Zudem produzieren sie eine Vielzahl eigener Sekundärmetabolite.<sup>8</sup> Aufgrund dessen wurden Streptomyzeten verwendet, die einen verringerten metabolischen Hintergrund durch entsprechende Gendeletionen aufwiesen. Die Fermentation und Extraktion der erhaltenen Exkonjugate zeigte neue UV-Signale in den Fermentationsextrakten. Es konnte jedoch keine potentiellen PTM-Massen detektiert werden. Als potentielle PTM-Massen wurden die Massenbereiche der bislang bekannten PTMs in Betracht gezogen. Dieser Massenbereich erstreckt sich von ca. 430 bis ca. 570 u. Neben den durchgeführten Versuchen existieren weitere Möglichkeiten die PTM-Expression im Streptomyzeten zu untersuchen, beispielsweise durch die Variation der Produktionsmedien, die Umklonierung der PTM-Cluster in andere Shuttle-Vektoren und die Verwendung anderer Streptomyzeten-Promotoren, zum Beispiel dem induzierbaren *tipA*- oder konsekutiven *gapdh*-Promotor aus *S. griseus*.<sup>92,126</sup> Durch eine gesteigerte Produktion der potentiell gebildeten PTMs könnten diese isoliert und strukturell untersucht werden. Aufgrund der Unterschiede in den Clustern von *S. degradans* und *S. spinosa*, zu den bereits bekannten PTM-Clustern, werden bislang unbekannte PTM-Strukturen erwartet. *S. degradans* besitzt dabei ein außergewöhnlich kleines PTM-Cluster aus nur drei Genen. Darunter befindet sich nur ein Reduktase-Gen, welches für eine FAD-abhängige Oxidoreduktase codiert. Die gesammelte Erfahrung aus dieser Arbeit lässt darauf schließen, dass sich dabei ein PTM mit einem zweigliedrigen Ringsystem bildet. Die vorangestellte PTM-Hydroxylase würde vermutlich, wie in Punkt 4.1.2 beschrieben, den gebildeten Makrolactamring in Position C-3 hydroxylieren. Das putative PTM-Cluster aus *S. spinosa* besitzt statt einer PTM-Hydroxylase zwei vorangestellte kurzkettige Alkohol-Dehydrogenasen und ein Cytochrom

P450-Enzym. Nach dem PKS-NRPS-Modul befinden sich drei Reduktase-Gene, zwei Phytoen-Dehydrogenasen und eine Linalool-8-Monooxygenase, sowie eine O-Methyltransferase. Ob alle genannten Enzyme an der Biosynthese beteiligt sind, ist nicht bekannt. Vermutlich handelt es sich bei dem Produkt um ein tricyclisches PTM mit zusätzlichen funktionellen Gruppen, wie z. B. einer Methoxygruppe, die von einem Red/Ox-Enzym und der O-Methyltransferase eingebaut werden.

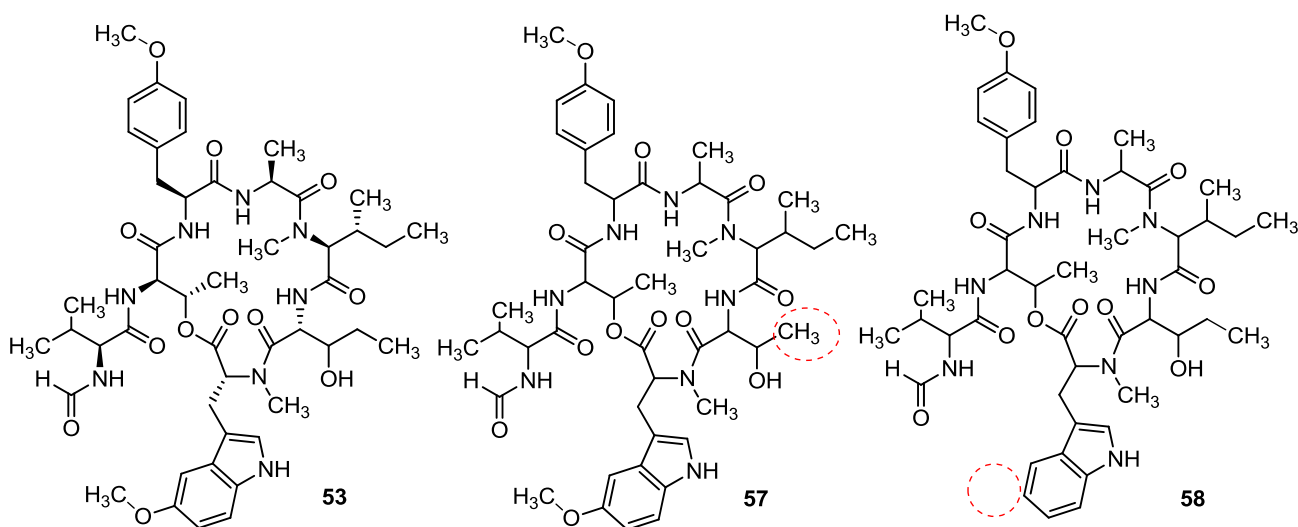
Die Publikation: „**Struktur und biologische Aktivität von Cycloheptamycin**“ zeigt die Isolierung des Cycloheptamycins (**53**) aus *Streptomyces* sp. Tü6314. **53** wurde bereits durch Thomas et al. im Jahre 1970 isoliert.<sup>113</sup> Bislang fehlten jedoch Untersuchungen zur biologischen Aktivität und die komplette Bestimmung der Absolutkonfiguration. Um einige der Stereozentren von **53** zu bestimmen, wurde zunächst eine saure Hydrolyse, gefolgt von einer Derivatisierung der einzelnen Aminosäuren mit dem bifunktionellen Marfey's Reagenz unter Bildung von Diastereomeren durchgeführt. Die Analyse der Derivate wurde mittels HPLC durchgeführt, unter Vergleich der entsprechend derivatisierten Referenzsubstanzen. Die zusätzliche Sequenzierung des gesamten Genoms von *Streptomyces* sp. Tü6314 zeigte ein Biosynthesecuster mit sieben NRPS-Modulen und einer Vielzahl postmodifizierender Enzyme, welches in der Lage sein sollte, Cycloheptamycin zu synthetisieren. Die Identifizierung der einzelnen Epimerasen vervollständigte die Bestimmung der Aminosäuren-Konfiguration (Abbildung 37). Somit inkorporiert Cycloheptamycin neben L-Valin, L-Threonin, L- $\beta$ -Hydroxynorvalin und L-Tryptophan, die drei D-Aminosäuren D-Alanin, D-allo-Isoleucin und D-Tyrosin. Die N-Methyltransferasen (MT) im Cluster sorgen für die Methylierung der Aminogruppen von D-allo-Isoleucin und L-Tryptophan. Flankierende Hydroxylasen, Formyltransferasen und O-Methyltransferasen fügen postmodifizierend Hydroxy-, Methyl- und Formylgruppen bei den entsprechenden Aminosäuren an. Die Biosynthese von  $\beta$ -Hydroxynorvalin wird vermutlich durch die in Cluster Nähe entdeckte Isopropylmalatsynthase katalysiert, welche ausgehend von 3-Methyl-2-oxobutanoat unter Beteiligung weiterer Enzyme Norvalin produziert.<sup>127</sup> Mit einer anschließenden Hydroxylierung in Position 3 würde  $\beta$ -Hydroxynorvalin entstehen.



**Abbildung 37.** Biosynthesecuster von Cycloheptamycin (**53**) aus *Streptomyces* sp. Tü6314. Der Farbcode der NRPS-Module steht für: Orange: Kondensations-Domäne, grün: Adenylierungs-Domäne, rot: Peptidyl-Träger-Protein, grau: Epimerase, violett: N-Methyl-Transferase, blau: Thioesterase.

Darüber hinaus deckte die Sequenzierung des kompletten *Streptomyces* sp. Tü6314 Genoms und dessen Interpretation mit antiSMASH<sup>128</sup> 34 weitere, potentielle Naturstoffgencluster auf. Darunter konnte ein putatives PTM-Cluster gefunden werden, welches große Ähnlichkeit zu dem von Zhao et al. entdeckten und heterolog produzierten PTM-Biosynthesecluster aus *S. griseus* besitzt.<sup>92</sup> Dies zeigt, wie von Clardy et al. beschrieben, die weite Verbreitung der PTM-Biosynthesecluster.<sup>66</sup> Die heterologe Expression und auch die Aktivierung der potentiellen Naturstoff-Cluster im Wildtyp könnten als Werkzeug zur Untersuchung der Naturstoffe genutzt werden.

Neben den stereochemischen und biosynthetischen Analysen wurde die biologische Aktivität von **53** untersucht. Durch *in vitro* Enzym- und *in vivo* Zell-Assays, welche im Kieler Wirkstoff-Zentrum am GEOMAR (KiWiZ) von Frau Dr. Jutta Wiese durchgeführt wurden (AG Prof. J. F. Imhoff), konnte festgestellt werden, dass **53** eine spezifische Inhibition von *Propionibacterium acnes* bewirkt. Es konnten zudem zwei weitere Derivate von **53** (**57** und **58**) isoliert und mit Hilfe von LC-MS/MS-Analysen untersucht werden (Abbildung 38). Der Vergleich von **53** mit dessen Derivaten konnte eine selektive und strukturabhängige Inhibition von *P. acnes* aufzeigen. Interessanterweise wurde das Wachstum des Bakteriums *P. acnes* durch **53** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $4.22 \pm 0.41 \mu\text{M}$  und von **57** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $17.32 \pm 2.78 \mu\text{M}$  gehemmt. Die periphere Methylgruppe im  $\beta$ -Hydroxy-Norvalin scheint ein wichtiger Bestandteil für die Aktivität zu sein. Wegen der begrenzt verfügbaren Menge von **58** wurde der IC<sub>50</sub>-Wert von  $> 50 \mu\text{M}$  nicht näher bestimmt. Die selektive Aktivität von **53** könnte für eine verbesserte Therapie zur Behandlung der von *P. acnes* verursachten Krankheiten, beispielweise von Akne, genutzt werden.<sup>129</sup> Laut Garner et al. ist oral verabreichtes Isotretinoin zurzeit die wirksamste Therapie gegen Akne. Aufgrund der Teratogenität von Isotretinoin und weiterer Nebenwirkungen stellt die Bekämpfung der Akne mit dieser Substanz jedoch keine zufriedenstellende Behandlung dar.<sup>130</sup> Es besteht ein dringender Bedarf, nicht nur das Wissen über den pathogenen *P. acnes* zu vermehren, sondern auch neue Medikamente mit spezifischer Wirkung zu erforschen.



**Abbildung 38.** Struktur von Cycloheptamycin (**53**) und dessen Derivaten **57** und **58** aus *Streptomyces* sp. Tü6314. Positionen der fehlenden Gruppen im Bezug zu Cycloheptamycin (**53**) wurden rot umkreist.

Die **Naturstoff-Isolate** aus *Rhodococcus* **RV77** und **RV8**, sowie aus dem Actinomycet **RV15** entsprachen bereits bekannten, biologisch-aktiven Substanzen. Dazu gehörten die SF2446-Antibiotika und das Diketopiperazin Cyclo(prolyltyrosyl). Es zeigte sich in diesen Projekten, dass es schwierig ist, mit der klassischen Naturstoffisolierung neue Metabolite zu isolieren. Die gezielte genomische Suche nach interessanten Genclustern könnte bei diesem Problem nutzbringend eingesetzt werden. Die Genomsequenzierung ist zwar kostenintensiv, jedoch besteht die Möglichkeit, dass bislang unbekannte Naturstoffcluster aufgedeckt werden. Diese könnten mit geeigneten Methoden, wie zum Beispiel der heterologen Expression, zur Entdeckung von innovativen Wirkstoffen führen.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Nuhn, P. *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*; S. Hirzel Verlag: Leipzig, **1997**; Vol. 3, 23-25.
- (2) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: Biosynthetic Approach*; John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2009**; Vol. 3, 7-8.
- (3) Meyer-Chlond, G. *Die PTA in der Apotheke*, **2013**, 06/13, 86.
- (4) Neuen-Biesold, A. *Die PTA in der Apotheke*, **2011**, 07/11, 54.
- (5) Krätz, O. *7000 Jahre Chemie*; Nikol Verlag: Hamburg, **1999**, Vol. 1.
- (6) Hamilton, G. R.; Baskett, T. F. *Can. J. Anaesth.* **2000**, 47, 367.
- (7) Fleming, A. *Br. J. Exp. Path.* **1929**, 10, 226.
- (8) Nett, M.; Ikeda, H.; Moore, B. S. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 1362.
- (9) von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5194.
- (10) Walsh, C. T. *Acc. Chem. Res.* 2008, **41**, 4.
- (11) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Science* **2009**, 325, 1089.
- (12) Bundesministerium für Gesundheit, Pressemitteilung: *Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART 2020)*; Berlin, **2015**.
- (13) Wang, Y. J.; Liu, L. L.; Wang, Y. S.; Xue, Y. P.; Zheng, Y. G.; Shen, Y. C. *Bioresour. Technol.* **2012**, 103, 337.
- (14) Huang, K. X.; Xia, L.; Zhang, Y.; Ding, X.; Zahn, J. A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82, 13.
- (15) Momota, K.; Kaneko, I.; Kimura, S.; Mitamura, K.; Shimada, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 243.
- (16) Jakobi, M. *J. Antibiot.* **1996**, 49, 1101.
- (17) Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*; John Innes Foundation: England, **2000**.
- (18) Drews, G. *Mikrobiologie: Die Entdeckung der Unsichtbaren Welt*; Springer-Verlag: Berlin, **2010**, 175.
- (19) Kretschmar, M.; Nichterlein, T.; Nebe, C. T.; Hof, H.; Burger, K. J. *Mycoses* **1996**, 39, 45.

- (20) Bibb, M. J.; Molle, V.; Buttner, M. J. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4606.
- (21) Varshney, A. K.; Wang, X.; Macintyre, J.; Zollner, R. S.; Kelleher, K.; Kovalenko, O. V.; Pechuan, X.; Byrne, F. R.; Fries, B. C. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 973.
- (22) Nichols, D.; Cahoon, N.; Trakhtenberg, E. M.; Pham, L.; Mehta, A.; Belanger, A.; Kanigan, T.; Lewis, K.; Epstein, S. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2445.
- (23) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schäberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K. *Nature* **2015**, *517*, 455.
- (24) Arasu, M. V.; Durairandiyan, V.; Ignacimuthu, S. *Chemosphere* **2013**, *90*, 479.
- (25) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 237.
- (26) Bode, H. B.; Müller, R. *Angew. Chem. Int Ed.* **2005**, *44*, 6828.
- (27) Jomon, K.; Kuroda, Y.; Ajisaka, M.; Sakai, H. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 271.
- (28) O'Connell, K. M. G.; Hodgkinson, J. T.; Sore, H. F.; Welch, M.; Salmond, G. P. C.; Spring, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10706.
- (29) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schaberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. A.; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K. *Nature* **2015**, *517*, 455.
- (30) Gulder, T. A.; Moore, B. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9346.
- (31) Belcourt, M. F.; Penketh, P. G.; Hodnick, W. F.; Johnson, D. A.; Sherman, D. H.; Rockwell, S.; Sartorelli, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10489.
- (32) de Ghellinck, A.; Fragneto, G.; Laux, V.; Haertlein, M.; Jouhet, J.; Sferrazza, M.; Wacklin, H. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes* **2015**, *1848*, 2317.
- (33) Wolstenholme, A. J.; Evans, C. C.; Jimenez, P. D.; Moorhead, A. R. *Parasitology* **2015**, *142*, 1249.
- (34) Ballou, L. M.; Lin, R. Z. *J. Chem. Biol.* **2008**, *1*, 27.
- (35) Edwards, G. *Filaria J.* **2003**, *2*, 8.
- (36) Schwecke, T.; Aparicio, J. F.; Molnar, I.; Konig, A.; Khaw, L. E.; Haydock, S. F.; Oliynyk, M.; Caffrey, P.; Cortes, J.; Lester, J. B.; Bohm, G. A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7839.

- (37) Staunton, J.; Weissman, K. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
- (38) Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688..
- (39) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: Biosynthetic Approach*; John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2009**; Vol. 3, 167.
- (40) Funa, N.; Awakawa, T.; Horinouchi, S. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14476.
- (41) Funa, N.; Ohnishi, Y.; Ebizuka, Y.; Horinouchi, S. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4628.
- (42) Liou, G. F.; Khosla, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 279.
- (43) Liu, Y. Z., T.; Bruner, S. D. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1482.
- (44) Piel, J. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996.
- (45) Kennedy, J.; Auclair, K.; Kendrew, S. G.; Park, C.; Vederas, J. C.; Hutchinson, C. R. *Science* **1999**, *284*, 1368.
- (46) Chooi, Y. H.; Tang, Y. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9933.
- (47) Xie, X.; Meehan, M. J.; Xu, W.; Dorrestein, P. C.; Tang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8388.
- (48) Gaisser S., T. A., Stockert S., Kirschning A., Bechthold A. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6271.
- (49) Zhao, Q.; He, Q.; Ding, W.; Tang, M.; Kang, Q.; Yu, Y.; Deng, W.; Zhang, Q.; Fang, J.; Tang, G.; Liu, W. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 693.
- (50) Shao, L.; Qu, X. D.; Jia, X. Y.; Zhao, Q. F.; Tian, Z. H.; Wang, M.; Tang, G. L.; Liu, W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*, 133.
- (51) Liu, W.; Nonaka, K.; Nie, L.; Zhang, J.; Christenson, S. D.; Bae, J.; Van Lanen, S. G.; Zazopoulos, E.; Farnet, C. M.; Yang, C. F.; Shen, B. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 293.
- (52) Moriguchi, T.; Kezuka, Y.; Fujii, I. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15637.
- (53) Liang, Z. X. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 499.
- (54) Sthapit, B.; Oh, T. J.; Lamichhane, R.; Liou, K.; Lee, H. C.; Kim, C. G.; Sohng, J. K. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 201.
- (55) Liu, C.; Zhang, J.; Lu, C.; Shen, Y. A. *Van. Leeuw. J. Microb.* **2015**, *107*, 1359.
- (56) Fisch, K. M. *RSC advances* **2013**, *3*, 18228.



- (57) Goranovic, D.; Blazic, M.; Magdevska, V.; Horvat, J.; Kuscer, E.; Polak, T.; Santos-Aberturas, J.; Martinez-Castro, M.; Barreiro, C.; Mrak, P.; Kopitar, G.; Kosec, G.; Fujs, S.; Martin, J. F.; Petkovic, H. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 238.
- (58) Mizuno, C. M.; Kimes, N. E.; Lopez-Perez, M.; Auso, E.; Rodriguez-Valera, F.; Ghai, R. *PloS one* **2013**, *8*, e76021.
- (59) Condurso, H. L.; Bruner, S. D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1099.
- (60) Graupner, P. R.; Thornburgh, S.; Mathieson, J. T.; Chapin, E. L.; Kemmitt, G. M.; Brown, J. M.; Snipes, C. E. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1014.
- (61) Nolte, M. J.; Steyn, P. S.; Wessels, P. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1980**, *5*, 1057.
- (62) Shigemori, H.; Myung-Ae, B.; Yazawa, K.; Sasaki, T.; Kobayashi, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317.
- (63) Ito, S.; Hirata, Y. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *12*, 1185.
- (64) Xu, L.; Wu, P.; Wright, S. J.; Du, L.; Wei, X. *J. Nat. Prod.* **2015**.
- (65) Kanazawa, S.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1065.
- (66) Blodgett, J. A.; Oh, D. C.; Cao, S.; Currie, C. R.; Kolter, R.; Clardy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 11692.
- (67) Myung-Ae, B.; Yamada, K.; Uemura, D.; Seu, J. H.; Kim, Y. H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *8*, 455.
- (68) Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; McCarthy, P. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4830.
- (69) Kyeremeh, K.; Acquah, K. S.; Sazak, A.; Houssen, W.; Tabudravu, J.; Deng, H.; Jaspars, M. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 999.
- (70) Li, Y.; Huffman, J.; Li, Y.; Du, L.; Shen, Y. *Med. Chem. Comm.* **2012**, *3*, 982.
- (71) Royles, B. J. L. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1981.
- (72) Iwata, Y.; Maekawara, N.; Tanino, K.; Miyashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1532.
- (73) Köhr, G.; Heinemann, U. *Epilepsy Res.* **1990**, *7*, 49.
- (74) Foden, F. R.; McCormick, J.; O'Mant, D. M. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 199.
- (75) Poschenrieder, H.; Przewosny, M.; Stachel, H.-D. Patent WO2001010833 A1, **2001**.
- (76) Hata, G.; Kawai, H.; Kaneko, T.; Imaoka, T.; Kitano, Y.; Mutoh, M.; Imanishi, H. *Chem. Lett.* **1993**, *3*, 529.

- (77) Singh, B. K.; Bisht, S. S.; Tripathi, R. P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 24.
- (78) Godel, T. H., H.; Humm, R. Patent: *WO 2005119329* **2005**.
- (79) Bottalico, A.; Logrieco, A. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1998**, 65.
- (80) Gittermann, C. O. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 483.
- (81) Miller, F. A.; French, J. C.; Sloan, B. J.; Ehrlich, J.; Dixon, G. J.; Bartz, Q. R.; Rightsel, W. A. *Nature* **1963**, *200*, 1338.
- (82) Yu, F.; Zaleta-Rivera, K.; Zhu, X.; Huffman, J.; Millet, J. C.; Harris, S. D.; Yuen, G.; Li, X. C.; Du, L. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2007**, *51*, 64.
- (83) Popescu, R.; Heiss, E. H.; Ferk, F.; Peschel, A.; Knasmueller, S.; Dirsch, V. M.; Krupitza, G.; Kopp, B. *Mutat. Res.* **2011**, *709-710*, 60.
- (84) Etzion, Y.; Hackett, A.; Proctor, B. M.; Ren, J.; Nolan, B.; Ellenberger, T.; Muslin, A. J. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 148.
- (85) Bertasso, M.; Holzenkämpfer, M.; Zeeck, A.; Stackebrandt, E.; Beil, W.; Fiedler, H. P. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2003**, *56*, 364.
- (86) Luo, T.; Fredericksen, B. L.; Hasumi, K.; Endo, A.; Garcia, J. V. *J. Virol.* **2001**, *75*, 2488.
- (87) Lacroet, R.; Oves-Costales, D.; Gomez, C.; Diaz, C.; de la Cruz, M.; Perez-Victoria, I.; Vicente, F.; Genilloud, O.; Reyes, F. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 128.
- (88) Evans, D. A.; Black, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4497.
- (89) Aizawa, S.; Akutsu, H.; Satomi, T.; Nagatsu, T.; Taguchi, R.; Seino, A. *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 193.
- (90) Capon, R. J.; Skene, C.; Lacey, E.; Gill, J. H.; Wadsworth, D.; Friedel, T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1256.
- (91) Olano, C.; Garcia, I.; Gonzalez, A.; Rodriguez, M.; Rozas, D.; Rubio, J.; Sanchez-Hidalgo, M.; Brana, A. F.; Mendez, C.; Salas, J. A. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, 242.
- (92) Luo, Y.; Huang, H.; Liang, J.; Wang, M.; Lu, L.; Shao, Z.; Cobb, R. E.; Zhao, H. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2894.
- (93) Huang, K. X.; Zahn, J.; Han, L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35*, 1669.
- (94) Kim, H. J.; Pongdee, R.; Wu, Q.; Hong, L.; Liu, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14582.

- (95) Kim, H.-J.; Rusczycky, M. W.; Liu, H.-w. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 1.
- (96) Kim, H.-J.; Choi, S.-h.; Jeon, B.-s.; Kim, N.; Pongdee, R.; Wu, Q.; Liu, H.-W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13553.
- (97) Townsend, C. A. *Chem. Biochem.* **2011**, *12*, 2267.
- (98) Lou, L.; Qian, G.; Xie, Y.; Hang, J.; Chen, H.; Zaleta-Rivera, K.; Li, Y.; Shen, Y.; Dussault, P. H.; Liu, F.; Du, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 643.
- (99) Lou, L.; Chen, H.; Cerny, R. L.; Li, Y.; Shen, Y.; Du, L. *Biochemistry* **2012**, *51*, 4.
- (100) Cao, S.; Blodgett, J. A.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652.
- (101) Fujii, I. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 155.
- (102) Antosch, J.; Schaefers, F.; Gulder, T. A. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3011.
- (103) Das Fosmid, welches das putative PTM-Cluster von *S. arenicola* trägt, wurde von Prof. Bradley Moore vom Scripps Institution of Oceanography in San Diego zur Verfügung gestellt.
- (104) Brawner, M.; Poste, G.; Rosenberg, M.; Westpheling, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, *2*, 674.
- (105) Binnie, C.; Cossar, J. D.; Stewart, D. I. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 315.
- (106) Gomez-Escribano, J. P.; Bibb, M. J. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 425.
- (107) Sioud, S.; Aigle, B.; Karray-Rebai, I.; Smaoui, S.; Bejar, S.; Mellouli, L. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 1.
- (108) Combes, P.; Till, R.; Bee, S.; Smith, M. C. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5746.
- (109) Bibb, M. J.; Janssen, G. R.; Ward, J. M. *Gene* **1985**, *38*, 215.
- (110) Gust B, Challis G. L, Fowler K, Kieser T, Chater K. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1541.
- (111) Zhang, G.; Zhang, W.; Zhang, Q.; Shi, T.; Ma, L.; Zhu, Y.; Li, S.; Zhang, H.; Zhao, Y. L.; Shi, R.; Zhang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4840.
- (112) Li, Y.; Chen, H.; Ding, Y.; Xie, Y.; Wang, H.; Cerny, R. L.; Shen, Y.; Du, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7524.
- (113) Godtfredsen, W. O.; Vangedal, S.; Thomas, D. W. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *26*, 4931.
- (114) Buckingham, J. *Dictionary of Natural Products A-C*; Capman & Hall: London, **1994**; Vol. 1.

- (115) Fdhila, F.; Vázquez, V.; Sánchez, J. L.; Riguera, R. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1299.
- (116) Byun, H. G.; Zhang, H.; Mochizuki, M.; Adachi, K.; Shizuri, Y.; Lee, W. J.; Kim, S. K. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 102.
- (117) Stierle, A. C.; Cardellina, J. H.; Strobel, G. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8008.
- (118) Degrassi, G.; Aguilar, C.; Bosco, M.; Zahariev, S.; Pongor, S.; Venturi, V. *Curr. Microbiol.* **2002**, *45*, 250.
- (119) Abdelmohsen, U. R.; Zhang, G.; Philippe, A.; Schmitz, W.; Pimentel-Elardo, S. M.; Hertlein-Amslinger, B.; Hentschel, U.; Bringmann, G. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 23.
- (120) Takeda, U.; Okada, T.; Takagi, M.; Gomi, S.; Itoh, J.; Sezaki, M.; Ito, M.; Miyadoh, S.; Shomura, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1988**, *41*, 417.
- (121) Gomi, S.; Sasaki, T.; Itoh, J.; Sezaki, M. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1988**, *41*, 425.
- (122) Pfeifer, B. A.; Admiraal, S. J.; Gramajo, H.; Cane, D. E.; Khosla, C. *Science* **2001**, *291*, 1790.
- (123) Müller, E.; Bayer, O.; Meerwein, H.; Ziegler, K. *Houben-Weyl: Methods of Organic Chemistry*, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1981**, Vol. 4.
- (124) Olson, A. S.; Chen, H.; Du, L.; Dussault, P. H. *RSC advances* **2015**, *5*, 11644.
- (125) Singh, S. M.; Panda, A. K. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99*, 303.
- (126) Murakami, T.; Holt, T. G.; Thompson, C. J. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459.
- (127) Soini, J.; Falschlehner, C.; Liedert, C.; Bernhardt, J.; Vuoristo, J.; Neubauer, P. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 30.
- (128) Blin, K.; Medema, M. H.; Kazempour, D.; Fischbach, M. A.; Breitling, R.; Takano, E.; Weber, T. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 204.
- (129) Perry, A.; Lambert, P. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9*, 1149.
- (130) Williams, H. C.; Dellavalle, R. P.; Garner, S. *Lancet* **2012**, *379*, 361.
- (131) Greunke, C.; Antosch, J.; Gulder, T. A. M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5334.
- (132) Zhang, B.; Zhang, L.; Dai, R.; Yu, M.; Zhao, G.; Ding, X. *PloS One*, **2013**, *8*, e55906.
- (133) Edlund, A.; Loesgen, S.; Fenical, W.; Jensen, P.R. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 5916.

## **7. Anhang**

7.1 Kopie von Publikation 1 mit Supporting Information (vgl. 4.1.1)

7.2 Kopie von Publikation 2 mit Supporting Information (vgl. 4.1.2)

7.3 Experimentelle Details zu unveröffentlichten Ergebnissen aus dem PTM-Projekt (vgl. 4.1.3)

7.4 Kopie von Publikation 3 mit Supporting Information (vgl. 4.2.1) und experimentelle Details zu unveröffentlichten Ergebnissen zur Isolierung von Cycloheptamycin-Derivaten (vgl. 4.2.1)

7.5 Experimentelle Details zur Isolierung von Naturstoffen aus den marinen Stämmen RV77, RV8 und RV15 (vgl. 4.2.2)

7.6 Erlaubnisscheine der Verlage

## **8. Bibliographische Daten**

8.1 Publikationsliste

8.2 Vorträge und Posterpräsentationen

8.3 Lebenslauf

## 7.1 Kopie von Publikation 1 mit Supporting Information (vgl. 4.1.1)

J. Antosch, F. Schaefers, T.A.M. Gulder, Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 3011-3014.

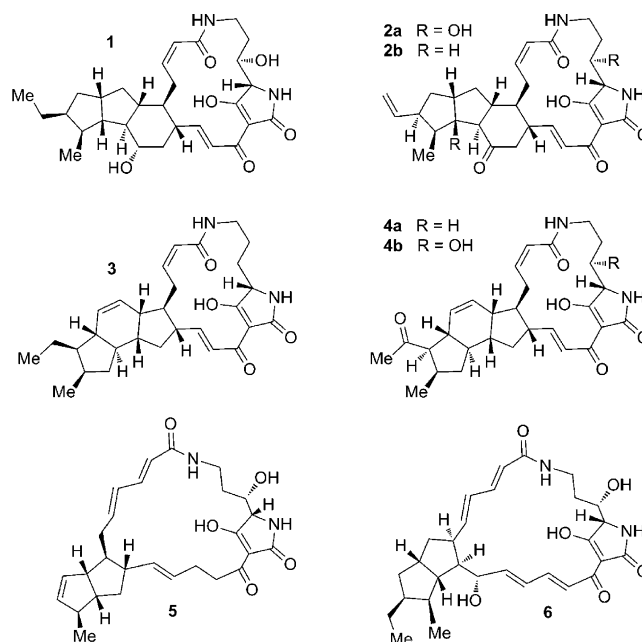
# Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*\*<sup>\*</sup>

Janine Antosch, Françoise Schaefer, and Tobias A. M. Gulder\*

**Abstract:** Polycyclic tetramate macrolactams (PTMs) are a family of biomedically promising natural products with challenging molecular frameworks. Despite these interesting properties, so far only relatively little is known about the biosynthetic origin of PTMs, in particular concerning the mechanism by which their ring systems are formed. Herein we present the first insights into these processes by using the biosynthesis of ikarugamycin as an example. This has been facilitated by the first heterologous expression of a PTM biosynthetic gene cluster in *Escherichia coli*. With this approach it will not only become possible to mechanistically investigate already known PTM biosynthetic pathways in more detail in the future, but also to interrogate cryptic PTM biosynthetic pathways chemically and biochemically.

**P**olycyclic tetramate macrolactams (PTMs) are structurally and biosynthetically intriguing examples of complex bacterial natural products. They all have a tetramic acid moiety in common that is incorporated into a macrolactam ring system. Directly fused to the macrolactam is a set of two or three five- or six-membered carbocycles that give rise to the impressive structural diversity of PTMs. Representative examples are HSAF (**1**)<sup>[1]</sup> and the frontalamides (**2**),<sup>[2]</sup> both equipped with a 5-5-6-polycyclic ring system, ikarugamycin (**3**)<sup>[3]</sup> and the clifednamides (**4**),<sup>[4]</sup> bearing a 5-6-5-cyclization pattern, as well as cylindramide (**5**)<sup>[5]</sup> and alteramid A (**6**),<sup>[6]</sup> characterized by two five-membered rings (Figure 1).

A broad variety of biological activities has been reported, depending on the individual structures of the PTMs, which range from antibacterial and antifungal to cytotoxic properties.<sup>[1–6]</sup> Despite this promising biomedical potential of the PTMs and their challenging molecular frameworks, surprisingly little is known about their biosynthetic origin. Even though putative PTM biosynthetic pathways are widespread in phylogenetically diverse bacteria,<sup>[2]</sup> the only PTM chemical structures that have been linked to biosynthetic pathways are



**Figure 1.** The structural diversity of PTM natural products exemplified by HSAF (**1**), the frontalamides (**2**), ikarugamycin (**3**), the clifednamides (**4**), cylindramide (**5**) and alteramid A (**6**).

those of **1**<sup>[7]</sup> and **2**,<sup>[2]</sup> two PTM family members with identical carbon skeletons. The respective gene clusters consequently are likewise highly similar, being composed of a hybrid polyketide synthase/nonribosomal peptide synthetase (PKS/NRPS)<sup>[8]</sup> equipped with a series of red/ox-tailoring enzymes (Figure 2). Most intriguingly, the PKS only consists of a single module, thus strongly suggesting an iterative mechanism (iPKS). Although this is a common situation in fungal PKSs,<sup>[8d]</sup> it is very unusual in bacterial polyketide pathways.<sup>[9]</sup> The only PTM biosynthetic steps that have so far been investigated in more detail revealed the origin of the hydroxy function attached to the ornithine building blocks of **1** and **2**, which gets introduced by a post-PKS/NRPS-hydroxylation,<sup>[2,10]</sup> and the formation of the tetramic acid moiety catalyzed by the NRPS-derived thioesterase domain,<sup>[7b]</sup> an enzyme that also exhibits unusual protease and peptide ligase activity.<sup>[11]</sup> However, many key steps in PTM biosynthesis still remain elusive, in particular the mechanism of the biocatalytic formation of the polycyclic ring system.

To shed more light on the biosynthetic logic leading to PTMs we set out to identify a gene cluster that encodes a PTM with a cyclization pattern deviating from that of **1** and **2**. As a consequence of its potential as a biochemical tool to investigate cellular processes associated with endocytosis,<sup>[12]</sup> we selected ikarugamycin (**3**) as the target molecule. Fiedler, Zeeck et al. showed that this metabolite is produced by

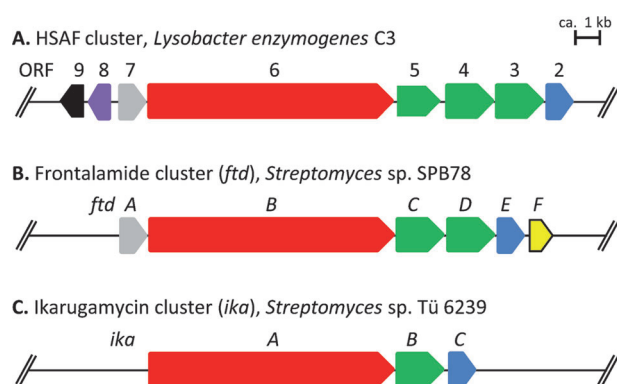
[\*] M.Sc. J. Antosch, Dipl.-Chem. F. Schaefer, Dr. T. A. M. Gulder  
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Universität Bonn  
Gerhard-Domagk-Strasse 1 (Germany)

M.Sc. J. Antosch, Dipl.-Chem. F. Schaefer, Dr. T. A. M. Gulder  
Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstrasse 4, 85748 Garching (Germany)  
E-mail: tobias.gulder@ch.tum.de  
Homepage: <http://www.biosystemchemie.ch.tum.de>

[\*\*] J.A. thanks the Fonds der Chemischen Industrie (FCI) for her PhD scholarship. This project is generously supported by the North Rhine-Westphalian Academy of Sciences, Humanities and the Arts ("Junges Kolleg") and the DFG (GU1233/2-1). We thank Prof. Dr. H.-P. Fiedler for providing *Streptomyces* sp. Tü 6239.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201310641>.

*Streptomyces* sp. Tü 6239.<sup>[13]</sup> Degenerate primers selectively targeting putative PTM thioesterase domains were designed to allow for a PCR-directed identification of the PTM biosynthetic gene cluster in this strain (see the Supporting Information). Based on the sequence data of the thus-obtained amplicon, specific primers were developed as probes to screen for the ikarugamycin biosynthetic gene cluster in a pCC1FOS genomic library of *Streptomyces* sp. Tü 6239 (1056 clones). This resulted in the identification of four clones bearing the desired sequence, one of which was identified to be a promising candidate to harbor the complete PTM gene cluster by end sequencing of the isolated fosmid Ika-Fos8. This fosmid was fully sequenced (GATC) and the resulting data bioinformatically analyzed, thereby revealing the organization of the putative ikarugamycin (**3**) pathway (*ika*, Figure 2). As expected, the *ika* locus likewise harbored the unusual PKS/NRPS system. In addition, only two oxidoreductases were identified, thus reducing the number

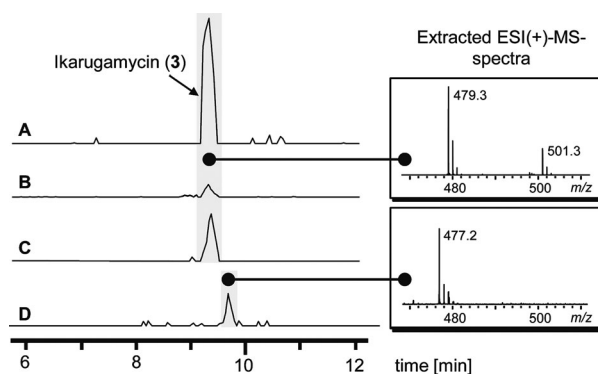


**Figure 2.** Biosynthetic gene clusters of HSAF (1, A), the frontaliamides (2, B), and ikarugamycin (3, C). Red = iPKS/NRPS (domains shown in Scheme 1), green = FAD-dependent oxidoreductase, blue = alcohol dehydrogenase, yellow = cytochrome P450, gray = sterol desaturase, violet = ferredoxin reductase, black = arginase.

of potential post-PKS/NRPS modifications compared to the two known PTM gene clusters. A number of genes that have not been reported in the two characterized PTM biosynthetic pathways were found up- and downstream of these PTM core genes (see Table S4 in the Supporting Information).

To prove the function of the *ika* cluster we chose its heterologous reconstitution in *E. coli*. As a production host we selected *E. coli* BAP1,<sup>[14]</sup> as it harbors a chromosomal copy of the promiscuous phosphopantetheinyl transferase Sfp from the surfactin biosynthetic pathway that catalyzes posttranslational activation of PKS and NRPS carrier proteins.<sup>[15]</sup> Based on pHIS8,<sup>[16]</sup> vectors were constructed by homologous recombination<sup>[17]</sup> that put the expression of the desired genes under the control of the inducible T7 promoter (see the Supporting Information). Three plasmids were generated, harboring all the genes from *ikaA* to Orf + 7 (pJA\_Orf + 7), the three genes *ikaABC* (pJA\_ikaABC), or only *ikaAB* (pJA\_ikaAB) (see Table S4 in the Supporting Information). In the expression experiments carried out with these constructs, the formation of **3** was not only evident with

pJA\_Orf + 7, but also—even with significantly improved production titers—with pJA\_ikaABC that is reduced to three genes (Figure 3). In experiments with pJA\_ikaAB, by contrast, **3** was not detectable. The thus-generated proof that the three proteins IkaABC are sufficient and essential for the production of **3** reveals a remarkable contrast between the

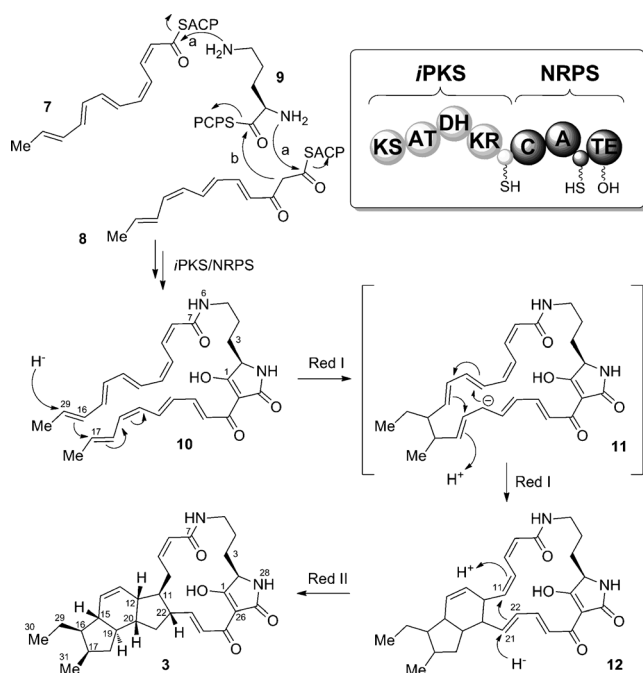


**Figure 3.** Analysis of the heterologous expression experiments with *E. coli* BAP1 by HPLC-ESI(+)-MS. Extracted ion chromatograms (EICs) of the masses for *m/z* of **3** and **12**. A = standard solution of **3** (0.1 mg mL<sup>-1</sup>); extracts of *E. coli* BAP1 pJA\_Orf + 7 (B), pJA\_ikaABC (C), or pJA\_ikaAB (D, intensity × 10).

simplicity of the *ika* locus and the structural complexity of **3**. Our experiments furthermore constitute the first experimental confirmation of the iterative mechanism of the PKS module in PTM biosynthesis.

A highly efficient biosynthetic pathway to **3** can be devised on the basis of these results. The iPKS module of IkaA consecutively provides two ACP-bound unsaturated hexaketides **7** and **8** that get attached to the nitrogen functions of PCP-bound ornithine (**9**) by action of the NRPS condensation domain (Scheme 1, arrows a).<sup>[18]</sup> The thioesterase subsequently catalyzes the formation of the tetramic acid moiety (arrow b),<sup>[7b]</sup> which concomitantly leads to cleavage of the precursor molecule **10** from the synthetase. Intermediate **10** is further processed by hydride-induced cyclization/protonation catalyzed by the two oxidoreductases IkaBC. Reductase I (Red I) triggers the formation of a bond between C16 and C17. The theoretical intermediate **11** further cyclizes to give **12**, which already bears two carbocycles. The last cyclization event between C22 and C11 is then catalyzed by reductase II (Red II), again by reductive cyclization.<sup>[19]</sup> This concludes the biosynthetic sequence to **3**, exclusively utilizing the three enzymes IkaABC. The proposed biosynthetic pathway, however, also raises the question of which of the two oxidoreductases is responsible for which ring-closing reaction. The analysis of the heterologous expression experiment with pJA\_ikaAB shows that, instead of **3**, a metabolite with a slightly higher retention time accumulates. This metabolite has the molecular mass of the postulated intermediate **12** (Figure 3D, for better visibility the relative intensity of chromatogram B was increased by a factor of 10 compared to A–C). Although structural elucidation of this metabolite by NMR was not possible because of the low production level, this observation strongly indicates that the





**Scheme 1.** Potential biosynthetic pathway leading to **3**. Reactions catalyzed by (a) C or (b) TE. KS = ketosynthase, AT = acyltransferase, DH = dehydratase, KR = ketoreductase, C = condensation domain, A = adenylation domain, TE = thioesterase domain, the unlabeled, thiol-containing domains in the *i*PKS and NRPS are carrier proteins.

initial cyclization cascade is induced by IkaB (= Red I), while IkaC (= Red II) catalyzes the formation of the last carbocycle. If IkaC is missing, as in *pJA\_ikaAB*, the final cyclization does not occur and the biosynthesis halts at intermediate **12**. This assumption is supported by bioinformatic analysis of putative PTM biosynthetic gene clusters in sequenced bacterial genomes (not shown), thus showing that all such clusters carry a homologue of *ikaB*, while not all harbor a copy of an alcohol dehydrogenase, here coded by *ikaC*. This is consistent with the observation that all the PTMs isolated so far show a cyclization between C16 and C17 and thus require a copy of Red I, whereas some representatives, such as **5** and **6**, only bear two small carbocycles and therefore should not contain a functional copy of Red II.

In conclusion, we developed PCR probes for the selective amplification of PTM thioesterase domains that were utilized for the identification of the ikarugamycin biosynthetic gene cluster *ika*. This system was transferred into an inducible expression vector by homologous recombination, transformed into *E. coli*, and used for the heterologous production of **3**. The findings obtained suggest a very compact biosynthetic pathway to **3**, thus revealing a large discrepancy between the simplicity of the *ika* locus, consisting of only three genes, and the complexity of its encoded natural product **3**. Our investigations constitute one of the few examples of the successful heterologous expression of a bacterial PKS system in *E. coli* and the first for a bacterial *i*PKS. The introduced simple system for PTM production can now be used to investigate cryptic *i*PKS/NRPS biosynthetic pathways found in other bacteria. It, therefore, constitutes

a valuable approach for the directed discovery of new PTMs and thus of potent biologically active natural products.

Received: December 8, 2013

Published online: February 12, 2014

**Keywords:** biosynthesis · heterologous expression · ikarugamycin · natural products · PTMs

- [1] P. R. Graupner, S. Thornburgh, J. T. Mathieson, E. L. Chapin, G. M. Kemmitt, J. M. Brown, C. E. Snipes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1014–1019.
- [2] J. A. V. Blodgett, D.-C. Oh, S. Cao, C. R. Currie, R. Kolter, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11692–11697.
- [3] K. Jomon, Y. Kuroda, M. Ajisaka, H. Sakai, *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 271–280.
- [4] S. Cao, J. A. V. Blodgett, J. Clardy, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652–4654.
- [5] S. Kanazawa, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1065–1068.
- [6] H. Shigemori, M.-A. Bae, K. Yazawa, T. Saaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317–4320.
- [7] a) F. Yu, K. Zaleta-Rivera, X. Zhu, J. Huffman, J. C. Millet, S. D. Harris, G. Yuen, X.-C. Li, L. Du, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 64–72; b) L. Lou, G. Qian, Y. Xia, J. Hang, H. Chen, K. Zeleta-Rivera, Y. Li, Y. Shen, P. H. Dussault, F. Liu, L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 643–645.
- [8] For reviews on PKS, NRPS, and hybrid PKS-NRPS biosynthesis, see a) C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782–4811; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688–4716; b) S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715–738; c) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496; d) D. Böttger, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 28–42.
- [9] The few examples of *i*PKS systems currently characterized in bacteria generally lead to rather simple products, or, as part of larger biosynthetic gene clusters, to relatively simple intermediates that get incorporated into more complex secondary metabolites: a) S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, A. Bechthold, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6271–6278; b) J. Ahlert, E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, N. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M. Farnet, J. S. Thorson, *Science* **2002**, *297*, 1173–1176; c) B. Sthapit, T. J. Oh, R. Lamichhene, K. Liou, H. C. Lee, C. C. Kim, J. K. Sohng, *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 201–206; d) W. Liu, K. Nonaka, L. Nie, J. Zhang, S. D. Christenson, J. Bae, S. G. Van Lanen, E. Zazopoulos, C. M. Farnet, C. F. Yang, B. Shen, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 293–302; e) S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fu, A. F. Stewart, R. Müller, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 349–356; f) X. Y. Jia, Z. Tian, L. Shao, X. Qu, Q. Zhang, J. Tang, G. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 575–585; g) L. Shao, X.-D. Qu, X.-Y. Jia, Q.-F. Zhao, Z.-H. Tian, M. Wang, G.-L. Tang, W. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*, 133–139; h) S. G. Van Lanen, T.-J. Oh, W. Liu, E. Wendt-Pienkowski, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13082–13094; i) Q. Zhao, Q. He, W. Ding, M. Tang, Q. Kang, Y. Yu, W. Deng, Q. Zahng, J. Fang, G. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 693–705; j) H. Kage, M. F. Kreutzer, B. Wackler, D. Hoffmeister, M. Nett, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 764–771.
- [10] Y. Li, J. Huffman, Y. Li, L. Du, *MedChemComm* **2012**, *3*, 982–986.
- [11] L. Lou, H. Chen, R. L. Cerny, Y. Li, Y. Shen, L. Du, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4–6.
- [12] a) K. Hasumi, C. Shinohara, S. Naganuma, A. Endo, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 841–846; b) E. Onelli, C. Prescianotto-

- Baschong, M Caccianiga, A. Moscatelli, *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3051–3068.
- [13] M. Bertasso, M. Holzenkämpfer, A. Zeeck, E. Stackebrandt, W. Beil, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 364–371.
- [14] B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **2001**, *291*, 1790–1792.
- [15] a) R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936; b) L. E. N. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1585–1595.
- [16] J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890–902.
- [17] a) K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6640–6645; b) B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1541–1546.
- [18] The configurations of the double bonds in **7** and **8** after their assembly by the *i*PKS and potential changes in their geometry catalyzed by the downstream reductases can currently not be predicted.
- [19] Alternatively, **10** might also directly get protonated at C18 after initial cyclization, followed by a (non-enzymatic) Diels–Alder cycloaddition of diene at C12 to C15 with the in that case *trans*-configured double bond at C19/C20; the reductive cyclization steps could furthermore also occur after an initial Diels–Alder cycloaddition.
-

Supporting Information

© Wiley-VCH 2014

69451 Weinheim, Germany

**Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*\*\***

*Janine Antosch, Françoise Schaefers, and Tobias A. M. Gulder\**

anie\_201310641\_sm\_miscellaneous\_information.pdf

# Supporting Information

## Contents

- General methods 2-3
- Design of degenerate primers for the detections of PTM biosynthetic pathways 4-6
- Construction and screening of a genomic library of *Streptomyces* Tü 6239 7-9
- Analysis of the sequencing data of Ika-Fos8 10-11
- Homologous recombination experiments 12-14
- List of primers used in this study 15
- Sequence data of genes in the *ika* locus and their corresponding protein products 16-21

## 1. General methods

### 1.1 Bacterial strains and cultivation

*E. coli DH5a* was used as the standard cloning host. *E. coli* BAP1 was used for heterologous expression experiments. Homologous recombination was carried out in *E. coli* BW25113 pKD46. *E. coli* EPI300-TR1 (Epicentre) was used to generate a pCC1FOS-based genomic library of *Streptomyces sp. Tü 6239*. The latter was generously provided by Prof. Dr. H.-P. Fiedler (University of Tübingen, Institute of Microbiology). All work with *E. coli* was carried out on LB agar or LB liquid media (Carl Roth) with the appropriate antibiotics for selection. Heterologous expression experiments were either carried out in LB with induction of secondary metabolite production using 1 mM IPTG. Alternatively, auto-induction media was used. Per 50 mL, this was composed of 46 mL ZY media (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 925 mL H<sub>2</sub>O), 0.5 mg arginine, 50 µL magnesium sulfate solution (24.65 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 13.84 g MgSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, 100 mL H<sub>2</sub>O), 1 mL 50 × 5052 solution (250 g glycerol, 100 g α-lactose, 25 g glucose, 730 mL H<sub>2</sub>O), and 2.5 mL 20 × NPS solution (142 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 66 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 900 mL H<sub>2</sub>O). Fermentation was carried out for 72 h at 16 °C and 150 rpm in 250 mL Erlenmeyer flask. For work-up, the pH of the cultures was adjusted to 5.0 with 1N HCl and the cultures were centrifuged for 10 min at 3800 rpm. The supernatant and cells were extracted with EtOAc and MeOH/acetone, respectively. The organic phases were dried in vacuo. The resulting extracts were re-dissolved in methanol for the further LC-MS analysis (see 1.5). *Streptomyces sp. Tü 6239* was incubated in a medium composed of 0.25 % corn steep liquid, 1 % starch, 1 % glycerol, 1 % glucose, 0.5 % peptone, 0.2 % yeast extract, 0.1 % CaCO<sub>3</sub>, and 0.1 % NaCl in tap water at pH 7.2 adjusted with 1N NaOH).

### 1.2 Transformation of electrocompetent *E. coli*

Electrocompetent cells were generated as follows: 200 mL of SOB media (20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0.6 g NaCl, 0.2 g KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 M MgSO<sub>4</sub>) were inoculated with 5 mL of a pre-culture of the respective *E. coli* strain (grown overnight at 37 °C) and incubated at 37 °C at 200 rpm until the OD<sub>600</sub> reached 0.8. The culture was centrifuged at 4 °C for 5 min at 5000 rpm. The supernatant was discarded, the pellet re-suspended in 25 mL of ice-cold 10 % glycerol and centrifuged at 4 °C for 5 min at 5000 rpm. This procedure was repeated 4 times with different amounts of ice-cold 10 % glycerol (20 mL, 15 mL, 10 mL, 5 mL). After the washing steps, the pellet was re-suspended in 1 mL 10 % glycerol and aliquoted in 75 µL portions. The aliquots were flash frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C until use.

For electroporation, 5 µL of the respective plasmid / fosmid to be introduced were added to an aliquot of thawed electrocompetent cells. The electroporation was carried out in a 0.2 cm ice-cold electroporation cuvette using a BioRad GenePulser II set to: 200 Ω, 25 µF and 2.5 kV. The expected time constant was 4.5-5.5 ms. Immediately after the electric pulse, 700 µL of ice-cold LB broth was added and the cells were incubated for 45 minutes at 37 °C. 150 µL solution was plated on LB agar (chloramphenicol 12.5 µg/mL and ampicillin 100 µL/mL) and incubated at 37 °C overnight. In case of *E. coli* BW25113 pKD46, all incubation steps were carried out at 30 °C to prevent loss of pKD46.

### **1.3 Isolation of genomic DNA (gDNA) of *Streptomyces* Tü 6239**

100 mL GYM media (4 g glucose, 4 g yeast extract, 10 g malt extract, 1 L water, adjusted with KOH (1 M) to pH 7.2) was inoculated with a 2 mL cryo culture of *Streptomyces* Tü 6239 and fermented for 3 days at 28 °C and 120 rpm. The gDNA isolation was performed with Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience). The precipitated gDNA was spooled on a glass rod and gently dissolved in 50 µL TE buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0).

### **1.4 Isolation and purification of plasmids and PCR amplicons**

Plasmids were isolated from single clones incubated overnight in LB broth with appropriate antibiotics using the peqGOLD Miniplasmid isolation Kit I (Peqlab) according to the protocol provided by the manufacturer. PCR products were either isolated using the PCR Purification Kit (Jena Bioscience GmbH) or purified by gel electrophoresis with re-isolation from the excised gel sample using Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience GmbH).

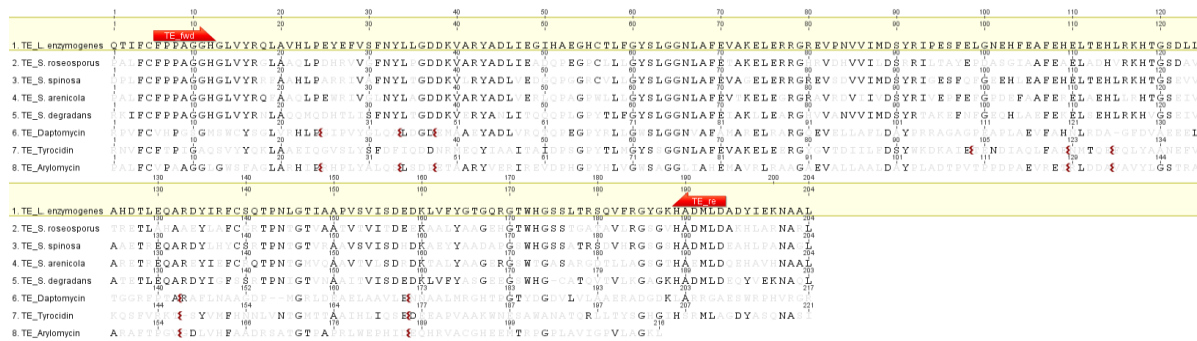
### **1.5 Chemical analysis**

The chromatographic system for HPLC-UV analyses consisted of two 2086-PU semi-preparative HPLC pumps, a MD-2010 diode array detector, a DG-2080-53 degassing unit, a 2055-AS automatic injection system, and a 2080-DHD dynamic gradient mixer (all JASCO) operated using the JASCO-ChromPass-I software (version 1.8.6.1). Multiple wavelength monitoring was performed in the range of 200 to 600 nm. The chromatographic separation was carried out on an Eurospher II C-8 HPLC column (100 x 3 mm, 5 µm particle size) using the following gradient with water (A) and acetonitrile (B), both buffered with 0,05 % TFA, as the eluents: linear gradient from 0 min, 40 % B to 10 min, 100 % B at 1 mL/min flow, 14 min, 100 % B, 14.1 min, 40 % B, 18 min, 40% B, all at an increased flow rate of 3 mL/min for washing and re-equilibration.

HPLC-MS analyses were carried out using an Agilent 1200-series HPLC system coupled to a micrOQ-TOF time-of-flight mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH) with Apollo-ESI-Source. This system was controlled by the HyStar software (Bruker). The calibration was performed internally with sodium formiate. The mass accuracy was 5 ppm (exact mass). The interpretation of the results was carried out with the Bruker Data Analysis software package (version 4.0). The chromatographic separation was carried out with the identical column and method as shown above.

## 2. Design of degenerate primers for the detections of PTM biosynthetic pathways

To allow for a PCR-directed detection of PTM biosynthetic pathways we constructed degenerate primers for the selective amplification of PTM-derived thioesterase domains (TEs). These TEs catalyze the unusual formation of the tetramic acid moiety in PTMs and consequently also deviate from common TEs at the protein sequence level. This was clearly apparent from a multiple protein sequence alignment (see Figure S1) of TE sequences excised from the PKS/NRPS system of the two known PTM biosynthetic pathways of *Lysobacter enzymogenes* (encoding HSAF; accession number ABL86391, residues 2907 to 3110) and *Streptomyces roseosporus* (encoding the frontalamides, accession number EFE79052, residues 2930 to 3133), together with bioinformatically identified putative PTM-TEs from *Saccharopolyspora spinosa* (accession number WP\_010311945, residues 2861 to 3064), *Salinispora arenicola* (accession number WP\_01798475, residues 2889 to 3092), and *Saccharophagus degradans* (accession number YP\_529192, residues 2896 to 3098) in comparison with TEs catalyzing macrolactonization (e.g. in daptomycin biosynthesis, *Streptomyces lividans*, WP\_003975580, residues 427 to 643), macrolactamization (from tyrocidin biosynthesis, *Brevibacillus brevis*, accession number T31076, residues 6254 to 6474), or simple hydrolysis (from arylomycin biosynthesis, *Streptomyces roseosporus*, accession number WP\_006128189, residues 80 to 295).



**Figure S1.** Multiple sequence alignment (Geneious) of protein sequences of the TE domains derived from *Lysobacter enzymogenes* (accession number ABL86391), *Streptomyces roseosporus* ATCC 11379 (accession number WP\_006128189), *Salinispora arenicola* CNS-205 (accession number WP\_01798475), *Saccharopolyspora spinosa* NRRL 18395 (accession number WP\_010311945). The sequences used for design of the degenerate primer pair are labeled with red arrows.

Based on two regions with identical sequence for all putative PTM-TEs with simultaneous low sequence similarity when compared to all other TEs (see red arrows, Figure S1), we constructed a pair of degenerate primers for selective PTM-TE amplification. These were based on the protein sequence FPPAGGH for the forward primer TE-Fwd and HADMLD for the reverse primer TE-Rev (for primer sequences, see Chapter 6, Table S6, entries 1 and 2).

The primers (Life Technologies) were diluted to a final stock concentration of 500 pmol/ $\mu$ L and 10  $\mu$ L of each of these solutions were used in standard 50  $\mu$ L PCR reactions using 0.125  $\mu$ L Taq polymerase (Jena Biosciences), 2.5  $\mu$ L Taq buffer, 0.25  $\mu$ L gDNA of *Streptomyces* Tü 6239 (conc. 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L), 0.25  $\mu$ L of dNTP Mix (Jena Biosciences), 0.3  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O, 1.25  $\mu$ L DMSO (Roth) and the following conditions (Table S1):

**Table S1.** PCR conditions for degenerate TE primers

Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	95	300	x 1
2	94	30	x 45
3	65.7	30	
4	72	32	
5	72	300	x 1

The success of the PCR reactions was monitored by gel electrophoresis on a 1 % agarose gel (Roth) using the midrange DNA ladder from Jena Bioscience (Figure S2). The PCR reaction was purified using a PCR Purification Kit (Jena Bioscience) and subsequently cloned into pBlueScrip SK (+) using the TOPO-TA technique (pLUG Prime® TA-cloning Vector Kit, iNtRON Biotechnologie). *E. coli* DH5 $\alpha$  was transformed with the resulting plasmid and plated on LB agar with 100  $\mu$ g/mL chloramphenicol for selection. 3 positive clones were inoculated overnight in 5 mL LB broth (100  $\mu$ g/mL chloramphenicol) at 37 °C. Plasmids of these cultures were isolated using the peqGOLD Miniplasmid isolation Kit I (Peqlab) and sequenced at GATC using the T7 forward sequencing primer (see Table S6, entry 17). This resulted in the following partial sequence of the *Streptomyces* Tü 6239 PTM TE:

```
GGCCTGGTCTACCGGGAGTTCGCGGCGCGGCTGCCGGAGTTCGAGTTCCTCGCCTTCAACTACCTGAT
GGGCGAGGACAAGGTAAGCGGGTACGCCGACCTGGTGGCCGGGCACCGGCCGAGGGCGAGATCGACC
TGCTCGGCTACTCGCTGGGCGGCAACCTCGCCTTCGAGGTGGCCAAGGAGCTGGAGCGGCGCGGCCGC
ACCGTGCGCCACGTCGTCATCATGGACTCGCTGCGGGTGACGGAGTCTTACGAGCTGGGCCCGGAGCA
CCTGGCCGTCTTCGAGCGGAGCTGGCCGAGCATCTGCGCAAGCACACCGGCTCGGCGCTGGTCGCGG
AGAAGACGCGCAACAGGCCAAGGACTACCTGGAGTTCACCGGCCGCACCGCCAACCCCGGCACCACC
GGGGCCCGGATCGCGGTGATCAGTGACGAGGAGAACCGGCCGCGTACGACAGCGGCGCCGAGGGCAG
CTGGCACGGCGCCTCCCGTACCGGAACCGTTCGTCGTCGCGGGGTGGGCCGG
```

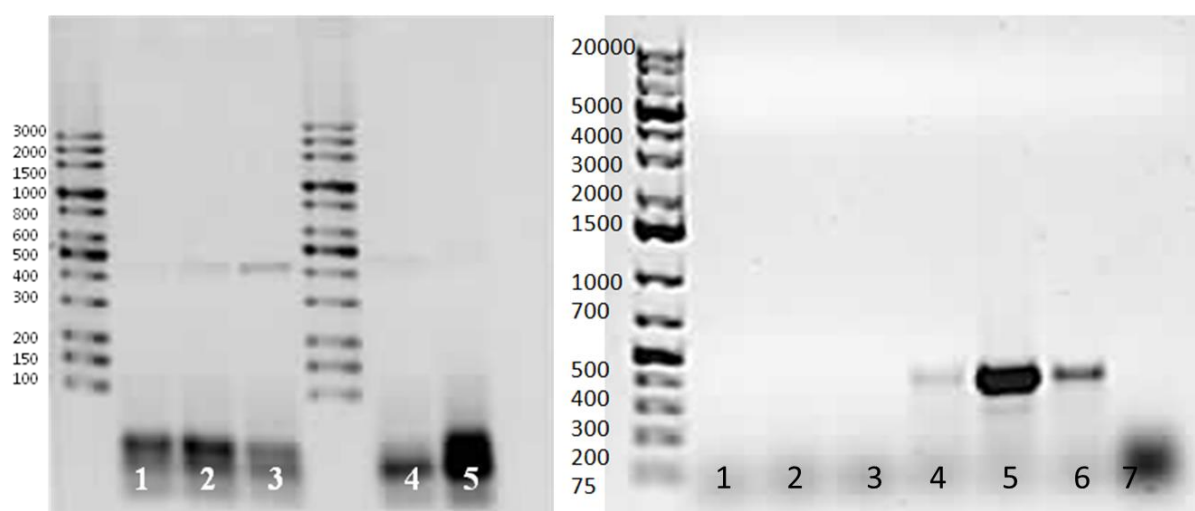
Full protein sequence of the excised PTM TE of *Streptomyces* Tü 6239 as derived from de novo sequencing of Ika-Fos8 (see Chapter 8, below), with partial protein stretch encoded by above nucleotide sequence labeled in yellow (red corresponds to the forward degenerate primer binding site):  
 GTVFC**FPPAGGH**GLVYREFFAARLPEFEFLAFNYLMGEDKVSQYADLVAGHRPEGEIDLGLGYSLGGNLA  
 FEVAKELERRGRTVRHVIMDSLRLVTESEYELGPEHLAVFERELAEHLRKHTGSALVAEKTREQAKDYL  
 EFTGRTANPGTTGARIAVISDEENAAAYDSGAEGSWHGASRTGTDVLRGVGRHADMLDPGTVEHNARL  
 A

Above nucleotide sequence was used to design specific primers to target the desired TE domain for screening of a genomic fosmid library of *Streptomyces* Tü 6239 (see Chapter 3, below). The primer sequences can be found in Chapter 6, Table S6, entries 3 and 4. The specific primers were tested in a series of PCR reactions to optimize amplification of the TE from gDNA of *Streptomyces* Tü 6239 (see Figure S2). The optimal conditions are described in Table S2. The primers (Life Technologies) were diluted to a final stock concentration of 20 pmol/ $\mu$ L and 0.25  $\mu$ L of each of these solutions were used in standard 25  $\mu$ L PCR reactions using 0.125  $\mu$ L Taq polymerase (Jena Biosciences), 2.5  $\mu$ L Taq buffer, 0.25  $\mu$ L gDNA of *Streptomyces* Tü 6239 (conc. 0.5  $\mu$ g/  $\mu$ L), 0.25  $\mu$ L of dNTP Mix (Jena Bioscience), 20  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L DMSO (Roth).



**Table S2.** PCR conditions for specific TE primers

Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	95	300	x 1
2	94	30	x 36
3	55.8	30	
4	72	40	
5	72	300	x 1

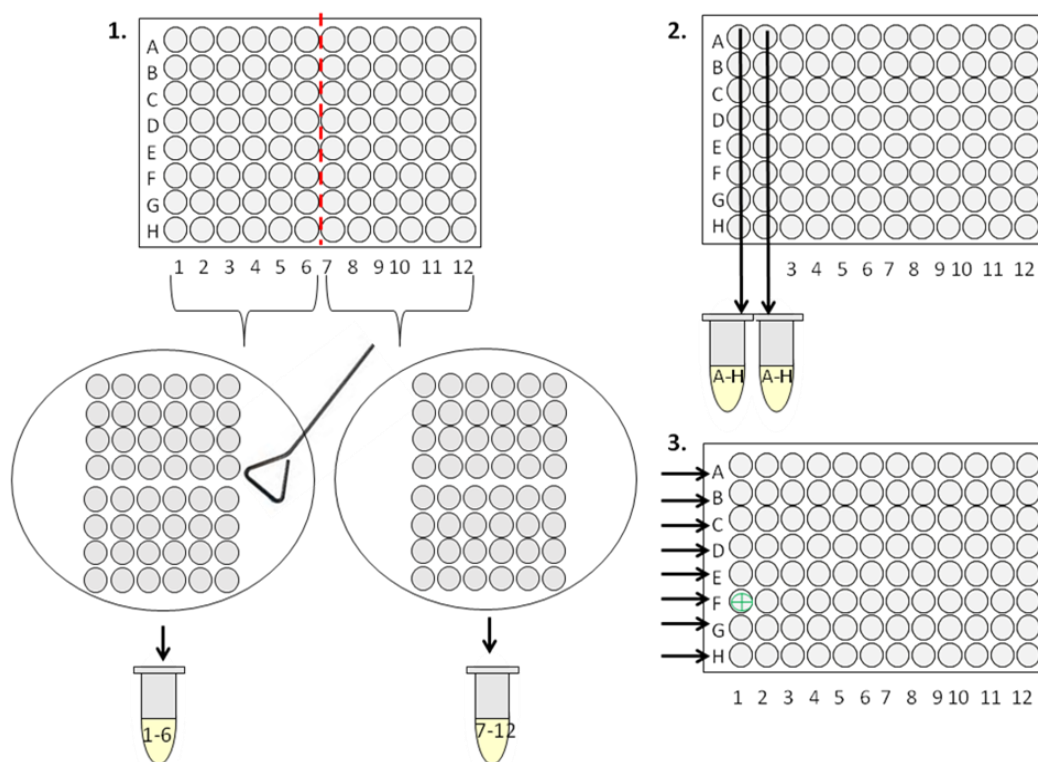


**Figure S2.** Optimization of the PCR conditions for amplification of the ikarugamycin TE domain using degenerate primers (left) and specific primers (right). gDNA from *Streptomyces* Tü 6329 was used as a PCR template. 1 = 61.4; 2= 63.5; 3= 65.7; 4= 68; 5= 60 °C (left); 1= 48; 2= 50.2; 3= 52.5; 4= 54.5; 5= 55.8; 6= 61 °C (right).

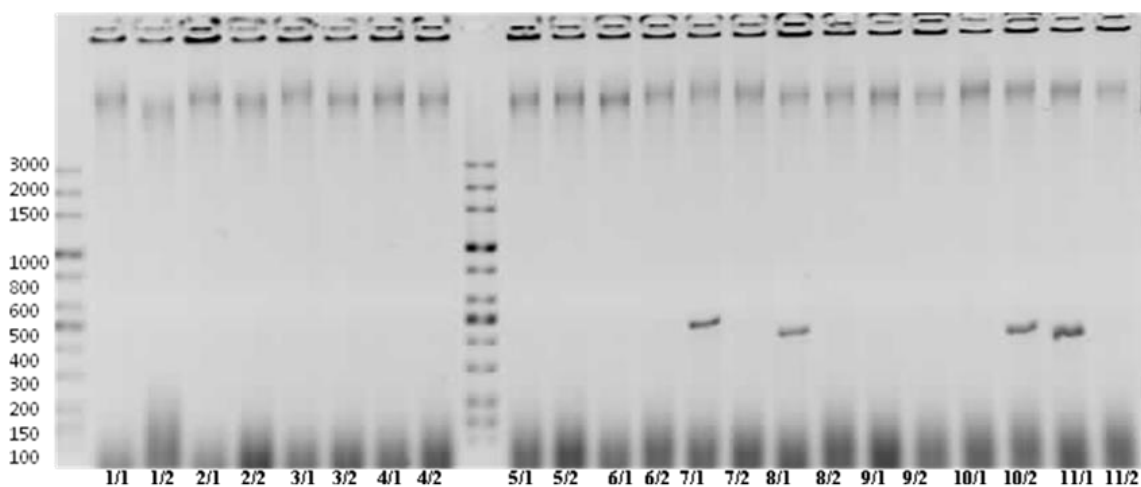
### 3. Construction of a genomic library of *Streptomyces* Tü 6239

The genomic library of *Streptomyces sp.* Tü 6239 was constructed using the CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre) using a modified protocol based on the one provided by the manufacturer. In short, large amounts of gDNA (600 µg in 1,2 mL TE buffer) were isolated from *Streptomyces sp.* Tü 6239 and mechanically sheared to predominantly yield 40 kb large fragments. These were purified by gel electrophoresis on 0.8 - 1.0 % low melting point (LMP) agarose (Carl Roth) gel in 1 x TAE buffer (Carl Roth) with subsequent gel extraction using GELase. Approx. 0.4 g gel slices were cut out of the gel and molten at 70 °C for 10-15 min. Warm GELase 50 x buffer was added to a final concentration of 1 x and 1 µL GELase enzyme was added. Incubation was carried out at 45 °C for 2 h. The DNA was subsequently precipitated by adding 1/10 volume of 3 M sodium acetate and 2.5 volumes of EtOH. After centrifugation at 4 °C and 16000 rpm for 25 min, the supernatant was decanted and the pellet washed twice with ice-cold 70 % EtOH. The resulting DNA was treated with End-Repair Enzyme Mix to create blunt ended, 5'-phosphorylated DNA. 27 µL of sterile water, 8 µL of 10 x End-repair buffer, 8 µL 2.5 mM dNTP mix, 8 µL 10 mM ATP, 25 µL DNA and 4 µL End-repair enzyme mix were gently mixed in a tube and incubated at room temperature for 45 min. For the inactivation of the enzymes EDTA was added to a final concentration of 10 mM. The change in chronology of size selection and end-repair procedure, when compared to the original protocol, leads to significantly improved overall results in our hands. The concentration of the blunt ended gDNA sample was determined by electrophoresis on a 1.0 % agarose gel and shown to be approximately 4 ng/µL. The blunt ended DNA was ligated into the pCC1FOS vector using Fast-Link DNA Ligase. 1 µL of 10 x Fast-Link ligation buffer, 1 µL of 10 mM ATP, 1 µL of CopyControl pCC1FOS vector (0.5 µg/µL), 1 µL of T4 ligase and 6 µL of blunt ended DNA were mixed and incubated at 16 °C for 24 h. The resulting fosmids were transferred to *E.coli* EPI300-TR1 cells using MaxPlax Lambda Packaging Extracts. For that, 50 mL of LB broth, 1 g/L maltose, and 10 mM MgSO<sub>4</sub> were inoculated with 0.5 mL of an overnight culture of EPI300-T1R cells and shaken at 37 °C to an OD<sub>600</sub> of 0.8-1.0. The cells were temporarily stored at 4 °C until needed for the transfection reaction. 10 µL of the ligation reaction were added to 25 µL of thawed MaxPlax Lambda Packaging Extract. The packaging reactions were incubated at 30 °C. After 90 minutes, another 25 µL of MaxPlax Lambda Packaging Extract were added to the above solution and incubated for additional 90 minutes at 30 °C. The reaction was diluted with Phage Dilution Buffer to a final volume of 500 µL. 5 mL EPI300-T1R cells were added and incubated for 20 min at 37 °C. The infected cells were spread onto LB plates containing 12.5 µg/mL chloramphenicol and incubated at 37 °C overnight to select for transformants. The resulting clones from the agar plates were individually picked and transferred into single cavities of 96-wells plates, each cavity containing 200 µL LB + 12.5 µg/mL chloramphenicol. A total of 1056 clones were thereby transferred into 96-well plates (Figure S3). After overnight incubation of these at 37 °C, each of the 96-well plates was duplicated. To the cavities of the duplicate 96-well plates were added 75 µL of 50 % glycerol solution to facilitate long-term cryo storage of the genomic library. The original 96-well plates were again transferred onto 2 LB agar plates (12.5 µg/mL chloramphenicol) with a 48-well stamp. Incubation of the agar plates at 37 °C overnight yielded a copy of the complete genomic library on agar used for further screening. These were used to generate pools of 48 clones for initial PCR screening (cf. Figure S3, step 1). The resulting stock solutions were thoroughly mixed and used as PCR templates to screen for clones containing the PTM cluster using selective TE primers (Figure S4; for primers, see Chapter 6, Table S6, entries 3 and 4; for conditions, see Table S2). In case of positive hits, the 96-well plate was used to pool rows (cf. Figure S3, step 2) and lines (cf. Figure S3, step 3) of the respective 48 clone pool. These mixtures were again PCR screened to very quickly determine candidate clones carrying the PTM TE domain (Figure S5; for primers, see Chapter 6, Table S6, entries 3 and 4; for conditions, see Table S2). Using this screening

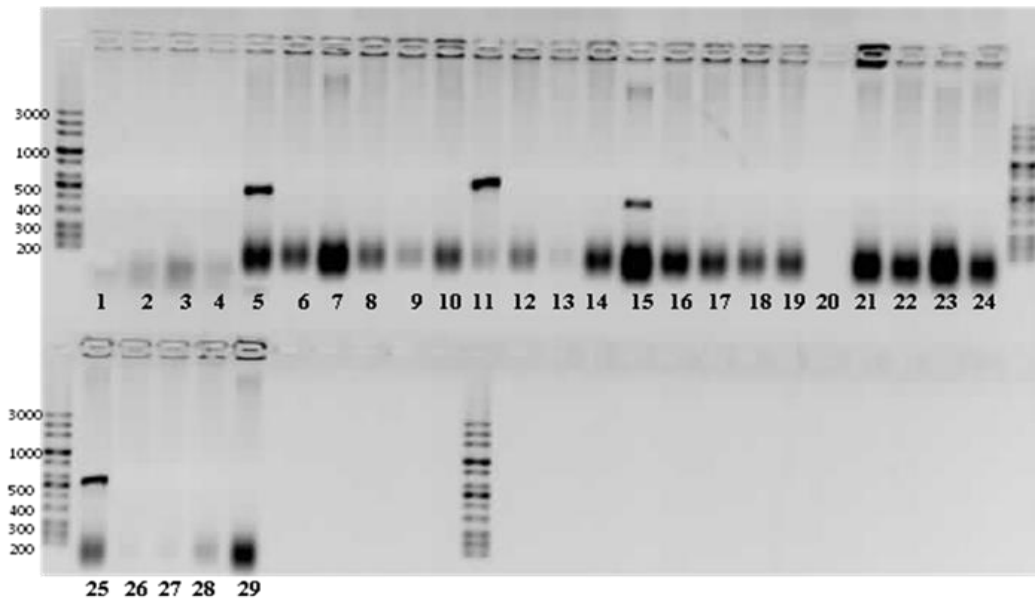
methodology, 4 positive clones were identified. The respective fosmids were isolated with the peqGOLD Mini Plasmid Isaltion Kit I (Peqlab). The purified fosmids were analyzed by endsequencing (GATC) using the T7 promoter and the pCC1FOS reverse sequencing primer. This resulted in the identification of Ika-Fos8 as a promising candidate to harbor the complete ikarugamycin biosynthetic gene cluster. This fosmid was consequently submitted to de novo 454 sequencing on a Roche GS FLX+ system (GATC, see below).



**Figure S3.** Pooling scheme to screen to genomic library of *Streptomyces* Tü 6239 (for details, please see text).



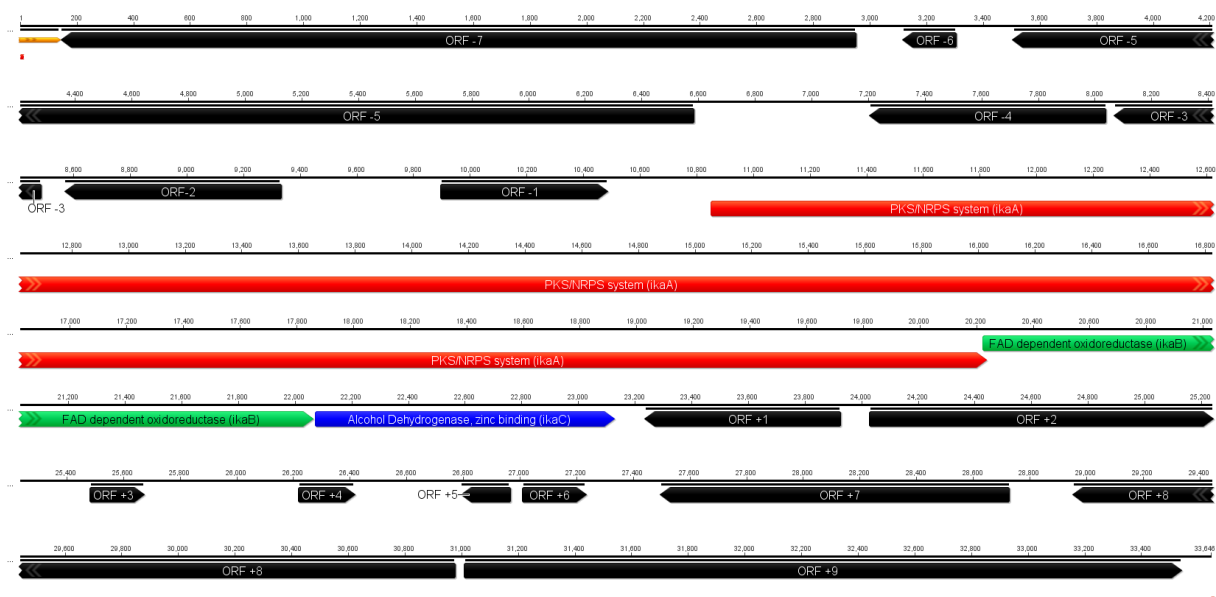
**Figure S4.** PCR screening of clone pools derived of step 1 of above pooling scheme (Figure S3) using specific TE primers (cf. Table S6, entries 3 and 4). Plates 7/1, 8/1, 10/2 and 11/1 show positive hits.



**Figure S5.** Identification of individual positive clones by PCR screening (TE primers, Table S6, entries 3 and 4) of lines and rows of positive plates 7/1, 8/1, 10/2 and 11/1. 1-5 = plate 11/1, row 6, lines A-E (clone 6E positive); 6-13 = plate 10/2, row 1, lines A-H (clone 1F positive); 14-21 = plate 8/1, row 6, lines A-H (clone 6B positive; this clone was used for sequencing and named Ika-Fos8 due to its origin from plate 8); 22-29 = plate 7/1, row 6, lines A-H (clone 6D positive).

#### 4. Analysis of the sequencing data of Ika-Fos8

De-novo assembly of the sequence data obtained from 454 sequencing of fosmid Ika-Fos8 (approx. 23.5 k reads, 9.2 mbp) on a Roche GS FLX+ was carried out at GATC resulting in a single 46.5 kb contig. Bioinformatic analysis and annotation of this contig was carried out with Geneious Pro (version 5.6.5). Open reading frames (ORFs) were predicted using the Glimmer Gene Prediction plugin (Glimmer 3.0) and FramePlot version 2.3.2. Putative gene functions were determined by BLAST analysis. Figure S6 shows a graphical representation of the *ika* locus and neighboring ORFs. The putative functions of the respective genes are summarized in Table S4.



**Figure S6.** Schematic representation of the organization of the *ika* biosynthetic gene cluster composed of the *iPKS/NRPS* system *ikaA* (red), the FAD dependent oxidoreductase *ikaB* (green) and the alcohol dehydrogenase *ikaC* (blue) with neighboring ORFs. For detailed analysis of gene functions, see Table S4.

**Table S4.** Deduced genes and their proposed functions found in Ika-Fos8. The entries with genes sufficient for ikarugamycin biosynthesis (*ikaABC*), as shown by heterologous expression experiments, are shaded in gray.

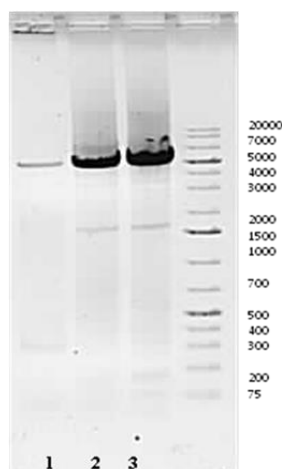
Gene	Closest homolog in	Acc. nr.	putative function	E value
Orf-7	<i>Streptomyces davawensis</i>	YP_007526106	Secreted protein	0.0
Orf-6	<i>Streptomyces</i> sp. ScaeMP-e10	WP_018516233	DNA helicase UvrD	$1 \times 10^{-4}$
Orf-5	<i>Gordonia bronchialis</i>	YP_003275739	BseRI endonuclease	0.0
Orf-4	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436013	Hydroxylase	$7 \times 10^{-137}$
Orf-3	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	WP_003990937	hyp. Protein	$4 \times 10^{-14}$
Orf-2	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436014	Deacetylase	$3 \times 10^{-156}$
Orf-1	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436016	hyp. Protein	$5 \times 10^{-84}$
<i>ikaA</i>	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436017	PKS/NRPS	0.0
<i>ikaB</i>	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436018	FAD dependent oxidoreductase	0.0
<i>ikaC</i>	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436019	Oxidoreductase, zinc-binding alcohol dehydrogenase family	0.0
Orf+1	<i>Streptomyces albulus</i>	WP_016570542	haloacid dehalogenase-like hydrolase	$1 \times 10^{-64}$
Orf+2	<i>Streptomyces albulus</i>	WP_020929353	XRE family transcriptional regulator	$9 \times 10^{-137}$
Orf+3	<i>Streptomyces albulus</i>	WP_020929354	hyp. Protein	0.72
Orf+4	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	YP_005263713.1	hyp. Protein	2.9
Orf+5			hyp. Protein	
Orf+6	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019435326	hyp. Protein	$2 \times 10^{-3}$
Orf+7	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436020	Cytochrome P450	0.0
Orf+8	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436021	Alpha glucosidase	0.0
Orf+9	<i>Streptomyces</i> sp. AA0539	WP_019436022	Phosphoketolase	$8 \times 10^{-171}$

## 5. Homologous recombination experiments

The different expression vectors based on pHIS8 containing defined parts of Ika-Fos8 were assembled by homologous recombination using the  $\lambda$ -Red system. The vector pHIS8 was isolated from an overnight culture of *E. coli* DH5 $\alpha$  harboring the plasmid. pHIS8 was cut in its multiple cloning site by digestion with BamHI (2  $\mu$ L pHIS8 vector [100  $\mu$ g/ $\mu$ L], 16  $\mu$ L sterile water, 2  $\mu$ L 10 x BamHI buffer, 1  $\mu$ L BamHI restriction enzyme [Jena Bioscience], 2 h, 37 °C), dephosphorylated using antarctic phosphatase (New England Biolabs) and used as template in subsequent PCR reactions. The primers used for attachment of overhangs homologous to defined parts of Ika-Fos8 possessed 20 bp overhangs with the DNA template and 50 bp sequence identity with the respective desired region of Ika-Fos8 (see Chapter 6, Table S6, entries 11 to 16). The primers for amplification of the pJA constructs were designed to ultimately allow – by homologous recombination – replacement of the former start codon of pHIS8 upstream of the octa histidine tag by the start codon of the PKS/NRPS-system *ikaA*, which is thus in control of the pHIS8-derived inducible T7 promoter. Three different expression constructs were generated, harboring the genes *ikaA* to Orf+7 (cf. Table S4, construct pJA\_Orf+7), the three genes *ikaABC* (pJA\_ikaABC), or only *ikaAB* (pJA\_ikaAB). PCR amplification was best carried out using 2-step hot-start conditions (see Table S5). The PCR products were analyzed and purified by gel electrophoresis (see Figure S7) following gel extraction using Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience). The respective purified DNA samples were used for subsequent  $\lambda$ -Red recombineering.

**Table S5.** Amplification of pJA constructs for homologous recombination using 2-step PCR.

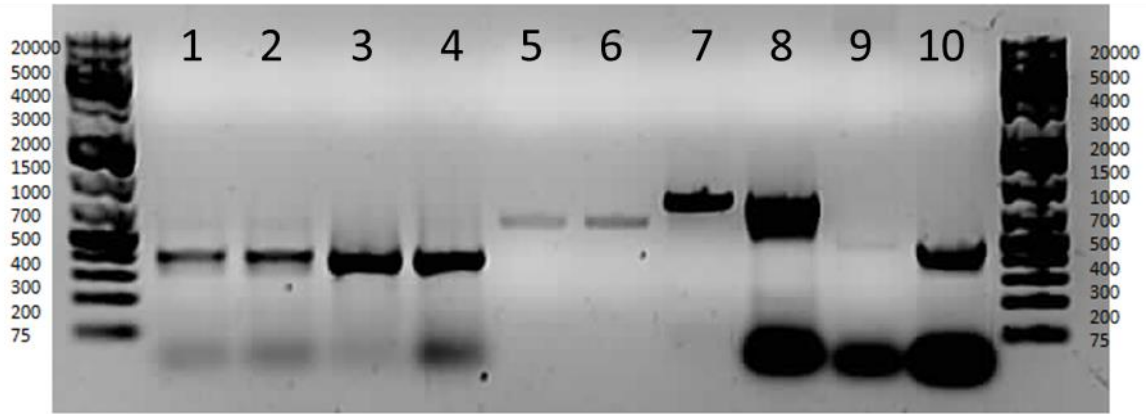
Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	95	120	x 1
2	96	30	x 3
3	Tm1 (see Table S6)	30	
4	72	330 / 120	
5	96	30	x 27
6	Tm2 (see Table S6)	30	
7	72	360 / 150	
5	72	600	x 1



**Figure S7.** PCR amplification of the pJA vector backbone needed to construct expression plasmids pJA\_ikaAB (lane 1), pJA\_ikaABC (lane 2) and pJA\_Orf+7 (lane 3) by subsequent homologous recombination.

Electrocompetent cells of *E. coli* BW25113 pKD46 were transformed with Ika-Fos8 (see Chapter 1.2) and grown on LB agar (chloramphenicol 12,5 µg/mL and ampicillin 100 µL/mL) overnight. A single clone was transferred into 5 mL SOB media (chloramphenicol 12,5 µg/mL and ampicillin 100 µL/mL) and incubated overnight at 30 °C, 200 rpm. 120 mL of SOB media (chloramphenicol 12,5 µg/mL and ampicillin 100 µL/mL) were inoculated with 100 µL of the overnight culture and 100 µL arabinose stock solution (1M, induction of red genes) were added. The bacterial solution was incubated for 3-4 h at 30 °C with shaking at 200 rpm to an OD<sub>600</sub> of 0.8. The cells were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was gently re-suspended in 10 mL ice-cold 10 % glycerol solution. This step centrifugation step was repeated with subsequent re-suspension of the cell pellet with 5 mL glycerol solution and renewed centrifugation. The obtained pellet was re-suspended in 100 µL 10 % glycerol. 5 µL linearized PCR-product (described above) and 50 µL cell suspension were mixed and electroporation was carried out (see Chapter 1.2). The cell mixture was spread out onto LB agar (50 µg/mL kanamycin) and incubated overnight at 37 °C to promote the loss of pKD46. Four clones were picked and examined via colony PCR (for conditions, see Table S2) using specific primers (see Chapter 6, Table S6, entries 3 to 10) for the amplification of genes expected to be located in the respective constructs (see Figure S8). Positive hits were further characterized by plasmid isolation followed by end-sequencing to verify the fidelity of the recombination products.





**Figure S8.** Verification of the genetic composition of pJA\_ikaAB, pJA\_ikaABC and pJA\_Orf+7 by PCR amplification of the respective first and last genes to be present in these constructs. PCR amplicons for: *ikaA* (for primers, see Table S6, entries 3 and 4) from pJA\_ikaAB (lane 1), pJA\_ikaABC (lane 2) and pJA\_Orf+7 (lane 3) with positive control (lane 4); *ikaB* from pJA\_ikaAB (lane 5; Table S6, entries 7 and 8) with positive control (lane 6); *ikaC* from pJA\_ikaABC (lane 7; Table S6, entries 5 and 6) with positive control (lane 8); Orf+7 from pJA\_Orf+7 (lane 9; Table S6, entries 9 and 10) with positive control (lane 10). For positive controls Ika-Fos8 was used as PCR template.

## 6. List of primers used in this study

**Table S6.** List of primers used in the present study.

Entry	Primer name	Sequence	Comments	Tm [°C]
1	TE-Fwd	5' -TTYCCNCCNGCNGGNGNCA-3'	deg. primer for TE amplification	65.7
2	TE-Rev	5' -GCRTCNCARCATRTCNGCRTG-3'	deg. primer for TE amplification	65.7
3	TE_PKS-NRPS_Fwd	5' -TTCAACTACCTGATGGGCGA-3'	spec. TE primer	55.8
4	TE_PKS-NRPS_Rev	5' -CCTCGTCACTGATCACCGCG-3'	spec. TE primer	55.8
5	AlcD_TG_Fwd	5' -TGTCGGTGGACCCGTATCT-3'	spec. primers for <i>ikaC</i>	53.2
6	AlcD_TG_Rev	5' -TCCTCCGTGTACCCTCGT-3'	spec. primers for <i>ikaC</i>	53.2
7	FAD_TG_Fwd	5' -TCAACGCCATCCGCAAGT-3'	spec. primers for <i>ikaB</i>	55.8
8	FAD_TG_Rev	5' -TGCACGTTTCATGCTGGGA-3'	spec. primers for <i>ikaB</i>	55.8
9	Cyp_TG_Fwd	5' -TTCGTGCAGGCCGTTTCAT-3'	spec. primers for Orf +7	56.2
10	Cyp_TG_Rev	5' -CCCACCAGATCGCCAACCT-3'	spec. primers for Orf +7	56.2
11	pJA_Fwd	5' -TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC GGGTCTTGAGGGTTTTTTGGGATCCGAAT TCGAGCTC-3'	amplification of pJA from pHIS8	Tm1 = 47.5 Tm2 = 67.4
12	pJA_Rev	5' -GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACA AAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCG CTCACAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTA-3'	amplification of pJA from pHIS8	Tm1 = 47.5 Tm2 = 67.4
13	HR-P450_Fwd	5' -GCGGGGACTTCGGGTACGGGGACGGGG GCAGGGTGGTGCATGGAATCCATGGTATAT CTCCTTCTTAAAGTTAA-3'	construction of pJA_Orf7(Cyp)	Tm1 = 47.7 Tm2 = 73.3
14	HR-AlcDe_Fwd	5' -TGTACACCGCCAGGAGGCCAACCGCG GCAAGTCTGGTCCGCTGTAGTAGCATA ACCCCTGGG-3'	construction of pJA_ika3	Tm1 = 47.7 Tm2 = 73.3
15	HR-FAD_Fwd	5' -AGACCGCCACCGGCCAACACACCG TCACATCGTTCGAGGAGCGTGTAGTAGCATA ACCCCTGGG-3'	construction of pJA_ika2	Tm1 = 47.7 Tm2 = 73.3
16	HR-PKS-NRPS_Rev	5' -GCGGGGACTTCGGGTACGGGGACGGGG GCAGGGTGGTGCATGGAATCCATGGTATAT CTCCTTCTTAAAGTTAA-3'	construction of all pJA expression vectors	Tm1 = 47.7 Tm2 = 73.3
17		5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'	T7 sequencing primer	45.9
18		5' -CTCGTATGTTGTGTGGAATGTGAGC-3'	pCC1Fos rev. sequencing primer	56.1

## 7. Sequence data of genes in the *ika* locus and their corresponding protein products

DNA sequence of the PKS/NRPS system *ikaA* (9375 bases):

```
ATGGATTCCATGCACCACCCTGCCCCGTCCCCGTACCCGAAGTCCCCGCGCCCGTCCCGTCCCAGGA
CGACGCGTTCGCCATCGTCGGCATCGGCTGCCGGTGCCCGGGCGGCCAGCGACTACCGGACCTTCT
GGCGAACCTCCTCGACGGCAAGGACTGCATCACCGACACCCCCGCCGACCGCTACGACACCCGCACC
CTGGGCAGCGGGCACAAGGCCAAGCCCGGCCGGCTGGTCGGCGGACGCGGTGGATACATCGACGGCTT
CGACGAGTTCGACCCCGCCTTCTTCGGCATCAGCCC GCGGAGGCCGAGCACATGGACCCCCAGCAGC
GGAAGCTCCTGGAGGTCGCTGGGAGGCGCTGGAGGACGGCGGCCTCAAGCCCGCCGAGCTGGCCGGC
AGCGATGTCGGGGTGTACGTCGGGGCGTTACCCCTCGACTACAAGATCCTGCAGTTCGCCGACCTCG
CTTCGAGACCCTGGCCGCGCACACCGCCACCGGCACCATGATGACGATGGTGTCCAACCGGATCTCGT
ACTGCTTCGACTTCCGCGGACCCTCGGTCTCCGTCGACACCGCGTGCAGCGGCTCCCTGGTCGCCGTC
CACCTCGCCTGCCAGAGCCTGCGCCGCGGGCAGACCTCCGTCGCCCTGGCCGGCGGCACCCTGCTGCA
CATGGCGCCGCAGTACCCATCGCCGAGACCAAGGGCGGGTTCCTCTCCCCGACGGCCGCTCCCGCG
CCCTGGACGCTCCGCCAACGGCTACGTGCGCGCCGAGGGCGTCGGCATGGTCGCCATCAAGCGCCTC
GCGGACGCGCAGCGCGACGGCGATCCATCCACGCCGTATCATCGGCAGCGGCGTCAACCAGGACGG
CCGCACCAACGGCATCACCGTGCCCAACCCCGACGCGCAGGTCGCCCTGATCGAGCGGGTCTGCGCCG
CCGCCGGCGTCACCCCGGCAGCTCCAGTACGTCGAGGCGCACGGCACCTCCACCCCGTCGGCGAC
CCGCTGGAGGCCAACGCCCTCGGCCGCGCGCTCTCCATCGGCCGCGAGCCGGGCGCCCGGACGTACGT
CGGCTCGGTCAAGACCAACATCGGGCACACCGAGTCCGCCCGCCGCATCGCCGGGCTGATCAAGACGG
TGCTCAGCCTCAAGCACAAGGTCAATCCCGCCGCACATCAACCTGGAGAAGCTCAACCCGCAGATCGAC
GAGGCGTCCCTGCCGTACGAGATCCCCCGGAGCCACCCCTGGCCCGAGCACAGCGGGCCGGCCCG
GGCCGGCGTCAACTCCTTCGGCTTCGGCGGGACCAACGCCACGTCCTGCTCCAGGAGGCACCGCCGA
CCGTCGGGGAGCCCGGCCACCGGCCACCGACGGGTACTCCGTGCTGCCGCTCAGCGCCCGCGACCC
GAAGCCTTTCCCGCCATCGCCACCGGCCTGCGCGAACGGCTCGCCGAGGGACTGCCGGTGGGCGACGC
CGCTACACCCTCGCCCACCGGCGGCAGCATCTGGAGCAGCGGCTGTCCGTGTGTACGACTCCCCCG
AGGCCCTCGACGAGGTGCTCGGCGCCGTGCCCCGCGGCAGAGCCACCCGCGTGCCGTGCCGGCACC
CAGCGGGAGGGCCTGGACCGCAGGCTGGTGTGGGTGTTACCGGCATGGGCCCGCAGTGGTGGGCCAT
GGGCCGCCAGTTGTACGCGAGCGAGCCGCTTACC GGGAGGTCATCGACCGCTGCGACCAGGAGATCG
CCGCGCTCACCGGCTGGTCCCTCACCCAGGAGCTGAACGCCGACGAGGCCGACTCCCGGATGAGCGAG
ACCTGGCTCGCCCAGCCCGCCAACCTCGCCGTCCAGATCGCCCTGGCCGCCCTGTGGCGCAGCAAGGG
GATCCAGCCCGACGCCGTACCCGGGCACAGCACCGGTGAGGTCGCCGCGTCTTACGAGGCCGGGGTGT
ACACCCCTCCCGAGGGCCGTGAAGATCGTGGTGCACCGCAGCCGGCTCCAGCAGAAGCTCATCGGCACC
GGCTCCATGCTCGCCGTACGCTCACCGAGGCGGAGGCCGCCCGCCGGGTGCGCCCGCACGGCGACCG
GGTCTCCATCGCCGCGTCAACAGCCCCACCTCCATCACCTGGCCGGGGACACCGAGGCGCTGGAGG
TGATCGCCGCGGAGCTGGGCGCCGAGGACATCTTCGCCCGCTTCTGGAGGTGCGCGTCCCGTACCAC
AGCCCCCGCATGGAGCTGATCAAGGACGAGCTGCTGACCTCGCTCGCCGATCTCAAGCCGCAGCAGGC
GAAGTTGCCGCTGTACCTCACCGCGTGCCGGGCACCGTTCGCGCAGGGCACGGAGCTGGACGCCGACT
ACTGGTGGCGCAATGTGCGCGAGGGCCGTGCACTTCGGGGCCGCCGTGGACCCGGCTGCTGGACGACGGC
TACGGCGTCTTCTGAGATCGGCCCGCACCCCGTGCTCGCCACTCCCTGCGCGAGTGTGCGAGGC
CCGCGACGCGCACAGCGTCACCCCTGGCCTCCATCCGCCGCAAGGGCGGACGAGCGCGAACGCCCTACCC
TGTCGCTCGCCGCGCTGCACAGCCTCGGCTTCGCCGTGGACTGGCACGCCCTGCACCCCGCCGGGCGG
CCGGCCGAACCTGCCGCGTACCCGTTCCGGCGCGACCGGTACTGGGTCGAGCCGGCCCCGGTTCGCGCA
GATCCGGCTCGGCCACCGCGACCAACCGCTGCTGGGCCGCCGCACCGCGAGCGCCGAGCCGGTGTGGG
AGGTGAAGCTGGACGCGGAGGCCGCCCGTACCTGGAGGACCACCGCATCCAGGGCACCGTGCTGTTC
CCGGCCCGGGCTATCTGGAGATGGCCGCGCAGGCCATGCGGGCGCTGACCGGTGATGAGCACAGCAC
CGCCGCGTGGCCGGCATCGAGCTGCGCAAGGCGTGTTCCTGCCGGACGGCGAGCCCGCAGACGGTGC
AGCTGTCCTTCTCCTCCGACGCCGCCGCTTCTCCATCGCCACCGTGGGCGCCGCCGGCGCCGAGCCG
```

ACCGTGCACGCCACCGGTACGGTACGGGCCGCCAGCGCCGCCGGCTGACCGCGCCGCTGGACACCGT  
CGCCGTCCGGGCCCCGCGCCGCCACCTGAGCGGCCCGACTGCTACGCCGAAGTGGCCGCGCTCG  
GCTACCCTACGGCCCCGCTTCCAGGGCATCGAGGAGGTGTGGATCGGCGAGGGCGAGGCCCTGGCC  
CGGATCCGTCCGCCGAGGGGCTCACCCCGGACGCGGGCGGCACCACATGCATCCGGTGTGCTCGA  
CTCCTGCTTCCAGTCGCTGCTGACCCCGCAGCTGCTCACCGCGCCCGCGGGCCCCGGGGCACCGGCA  
TCCGGCTGCCGCTGTCCATCGCCGAGGTACGGCTGGACCCGGTCGGCGACCCGGAAGTGTGGGTGCAC  
GCCACCGTCACCGGCGACGACGAGGACGAAGTACCGGTGACATCGCCGTGTACGACGGCGCCGACGG  
TACGCCGCTGGGCCGCTCGCCGGCTTCCGCGCCGCCGATGTGGAGAAGGCCGCCACCACCGTGGGGC  
TGTCCACCATCGACAGCTGGCTCACCGAACCGAGCTGGGTGCCGTGCCGCTGCCGAGGCGGCGTCC  
GCCGCGCCGGCGGGCCGGGCGGCACGTACTGTTCCGCGACGCGGGCGGGGTGCGCGAGCGGCTGGCCG  
GCTGATCGGCGAGGCCGGCGGGGAGGCCATCTGGTCCGGCCGGTGC CGCTACGGCCTGGACCGCA  
CGGCGAGGACCGCCACCCTCGTCCC GGATCCGCGGATGACCTGCGGCGGTTGCTCACCGATCTCGGG  
CAGGTGGACGGCGTCTCCACCTGTGGAACCTGGACCGGCCGGCGCTGGCCGACGCCCCGCGCGGACG  
GTTCCGCGACATCGCCTCCACCGGCGCGTACGCCCTGATCGCCCTCACTCAGGCCCTGCTCGCCGACC  
CGGAGCGGCACGGCGGCACCCCGGTGCACATCGTCACCAGAGCCGCCAGTGCCTGGTCCCGGTGAG  
CCGGTGGAGCCGCTGGGCGCGCCCGCCTGGGGCATCGGCCGGGTGCTGTGGCAGCAGGAAGTGGCCGG  
GCGCGGGCGCAAGCTGATCGACCTGGCGGCCGACGGCGGCGTCGAGGAGGACGCGTACGCGCTGCTGC  
GCGAGCTGGCCGACCCACCGGCGCGGCCGAGCGCGAGGACGAGATCGCGCTGCGCGCCGGGGAGCGG  
CACACCAGCCGGCTGGTGGCCGCCGAGGGGCTGAGCAGGCCGCTGCCCTGCGGCTGCGCCCGGACGG  
CAGCTATCTGGTGACCGGCGCGTTCGGCGCGCTCGGCAGGCTGCTGTGCCGCACGCTGGTCAGGCGCG  
GGGCGCGGCGGCTGATCCTGGTGGGCCGCACCCGGCTGCCGGAGCGCGAGCGCTGGGCCGACCAGGAC  
CCGAAGTCCCGGCCGGGCGGCACGTGGCCTTCCCTCAAGGAGCTGGAGGCGCTGGGCGCGCAGCCGAT  
TCTCGCGCCGCTGGACATCACCGACGAGGACGCGCTGGCCGGCTGGCTCGCCGGGTACCGGCGCGCC  
AGGGGCCCGGATCCGCGGGGTGTTCCATCTGGCGGGGAGGTGCGCGACACCCTGGTGC CGGAGATG  
GACCGGGAGGTGTTTCGACGCCGTCCACGACCCGAAGTGGTGGGCGCGGCGCTGCTGCACCGGCAGCT  
GAGCGGCGAACCCTGGAGCACTTCGTGCTGTTCCGCTCGGTGCGGCCCTGGCTGACGACGGCCGGAC  
AGACCAACTACGCGGCGGGGAACGCCCTTCCCTGGACGCGCTGGCGCACCACCGCCGCGCGCAGGGGCTG  
CCGGCGCTGGCGCTGGACTGGGGCCCGTGGGCCACCGGCATGATCGAGGAAGTGGGCGCTGATCGACCA  
CTACCGCAACAGCCGGGGCATGTCCCTCGCTGGCGCCGAGGCGGGCATGGCGGTGCTGGAGCGGGTCA  
TCGGGACAGGACCGGGCACAGCTGCTGGTGGCCACGGTTCGTGGACTGGCCGGTGTTCATGTCTGGTAC  
GCGGCGCCCGCGGGCTGGTCACGGAGCTGGCGGCCACCGCCAGGGACCGGGGTCCGAGGGCGACGG  
CAGTTTCCCTGGACGCGTTCGGGGAGGCCACCGCGGACAAGCGGCGGCTGCTGCTGACCGAGCGGTTCA  
CGACGCTGGTGGCGGTTGTGCTGCGGGTGC GGGCCGAGCAGGTGGATCCGGCGGTGAGCCTGAATCTG  
CTGGGGCTCGACTCGCTGCTGGCGATGGAGCTGCGAGCGCGGGTGGTGGCCGAGGTGGGCATCGCGCT  
GCCGGTGGTGGCGCTGCTGTCCAGCGCGCCGGCCGGGACCTGATCACCCAGCTGCACGAGGGCCTGG  
AGGAGTTGCTGGCCGAGGAGGGCAGCGGCGCCGCGGTGACGGCGGTGGAGCGCTTCGAGGACGAGGCC  
GAGTTC CGCTGACGCGAACCAGAAGGCGCTGTGGTTCCTGAAGCAGCTGAACCCGGACGGCTTCGC  
GTACAACATCGGCGGCGCCGTGAGGTGCGGGTGCAGCTGGACCCGGACCTGATGTTTCGAGGCGTTTC  
GCCGGCTGCTGGCCCCGGCATCCCGTGTGCGGGCGAAGTTCCTGCTGGTGGAGGGGCGAGGCGGTGCAG  
CGGATCTCCCCGAGATCAAGGAGGACATCGCGCTCTTCGACGTCGAGGACCGCGCGTGGGACGACAT  
CTACCGGATGATCATCGAGGAGTACCGCAAGCCGTACGACCTGGCGACCGATCCGCTGATCCGGTTCC  
GCCTCTTCCGGCGCGGCCCGGACCGCTGGGTTCATCACCAGGCGCTCCACCACATCATCTCGGACGCC  
ATCTCCACCTTACCTTCATCGAGGAAGTGTGTCCTGTACGAGGGGCTGCGGCAGGGCCACGACGT  
CGAAGTCCGCGCGGTGTCCGCCCGCTATCTGGACTTCCCTCAACTGGCAGAACGCGTTCCTGGCCGGCC  
GCGAGGCGCAGAAGATGCTCGCGTACTGGCGGGGCGAGCTGCCGGACGAGGTGCCGGTGTGTCGCTG  
CCCACCGACAAGCCGCGCCCGGCGGTGCTCACCCACAACGGGGCGTCCGAGTTCCTCGCCCTGGACGC  
GGAGTTGAGCGCCCGGTGCACGCGCTGGCGCGGGGAGCACAACGTCACCGTCTTCATGGTGTGCTGA  
GCGCGTACTACCTGCTGCTGCACCGCTATGCGGGGCGAGGACGACATCATCGTGGCTCCCCGTCACC  
GGCCGCACCCAGGAGGAGTTCGGCGCCGTCTACGGGTACTTCGTGAACCCGCTGCCGCTGCACGCCTC

GCTGGCCGGTGACCCACGGTCGCCGAGCTGCTGGACCAGGTGCGCACCACGGTGCTGGGCGGCCTGG  
ACCACCAGGAGTACCCGTTACGCTGCTGGTGGAGCAGCTGGGGCTGGCCCACGACCCGAGCCGGTCCG  
GCGGTCTTCCAGGCGATGTTTCATCCTGCTGCACCACAAGGTGGCCACCGAGAAGTACGGCTACAAGCT  
GGAGTACATCGAGCTGCCCCGAGGAGGAGGGCCAGTTCGACCTGACGCTGTCCGCGTACGAGGAGGAGG  
CGGACGGGCGGTTCCTACTGCGTCTTCAAGTACAACACCGACCTCTTCGAGGGCGGAGACGATCCGGCGG  
CTCGCCGGGCACTACACGCAGCTCCTGGAGTCGCTGACCGCGGCGCCCGCCGACGCCGCCACCGGTGG  
ACTGCGGATGCTGTGCGGGCGGCGAGCGGGAGCGGATCCTCACCAGTGGAGCGGGGCGGGCAGGGCG  
CGCAGGACGCGCCGGTGCCGGTGCACCGGCTGATCGCCGAGGCGGCGCACCGTACCCCGCAGGCGATC  
GCGGTGGCCGCGCCCGCCGAGAGCGGGGAGACCCGGCGGCTGACGTACGGCGAACTGGAGGAGCGCGC  
CGGCGAACTGGCCGGGCGGCTGCGGGCGCGCGGGCTGCGCGAGGGCACCGTCTGCGCGCTGTGCCTGG  
AGAAGTGCCTCGAGCTGATCACCGCCCTGCTGGCGGTCTCAAGGCGGGCGGCGCCTATCTGCCGCTG  
GACCCGGACTATCCGGCCGACCGGCTCGCGTACATGGTGCACAACGCCGGGGCCACGCTGGTGATCGG  
CGGGACGGGCGGCGCGGCCGAGGGGCTGCCGGGCACCGTGGTACCCTGGAGGAACTGCTCGCGGGCG  
AGGCCGGCGAAGCGGGGCGGACGCCGAGCCGGGGCCCGACTCCCCGCCTACGTTCATCTACACCTCG  
GGCTCCACCGGGCGCCCCAAGGCGGTGCGGGTACGCCACCGCAATCTGGCCTCGGTGTACGCCGGATG  
GCGCGACGCCTACCGCCTGGAGGAGGGCGGCATCCGGGTCCATCTCCAGATGGCCAGCCCCCTCCTTCG  
ACGTCTTACCAGGCGACCTGACCCGAGCCCTGTGCTCGGGCGGCACGCTGGTGTGGTTCGGCCGGGAG  
CTGCTGTTCAACACCGCCCGGCTGTACGAGACGATGCGCGCCGAACGGGTGGACTGCGGGCAGTTCGT  
GCCCCCGTGGTGCACCCCTGGTGCGGCACTGCGAGGACACCGGCGCCCGGCTGGACTTCCTGCGGC  
TGCTGATCGTGGGCTCGGACTCCTGGAAGGCCGAGGAGTACGAGCGGCTGCGCGCGCTGGGCGCACAG  
CGCCTGGTGAACCTCGTACGGGCTCACCAGGCCACCATCGACAGCGCCTGGTTCGAGGGTCCCGCGGA  
TGACCTGGAGGGCGGCCGGATGGTGGCCATCGGGCGGCCGTTCCCGGGCAGCGCGCTGTACATCCTGG  
ACTCGCGCGGCGAGCCGGTGCCGCCCGGTGTCCCCGGCGAGCTGTGGATCGGCGGCACCGGGGTGGCG  
CTCGGCTACCTCGGCGACGAGGCGCTGACCGGGGAGCGGTTCTCACC CGCGCCCTGGCCGGCGACGC  
TCCGGTACGGCTGTACCGCACCGGTGACCTCGCGCGCTGGGACGCGGCCGGCACCGTCCATCTGCTGG  
GCCGGGCCGACTCGCAGATCAAGGTGCGCGGGCACCGCATCGAGATCGGGGAGATCGAGTGCACCTG  
GCGGCCCTGCCCCGAGCTGGCCCAGGCGCAGGTACCGTGCGGCCGGACGCGGGCGGCGAGAACGTGCT  
GTGCGCGTACGGGGTGGCGGCCCGGGCGCCGTGCTGGACTGGCGCGAGGTGCGCCGGCGCCTGGCGG  
ACTATCTGCCGACGTTTCATGATCCCCACCCACTTACCAGGCTGCCCCCCTGCCGCTCACCCGAAC  
GGCAAGGTGGACGTGGCGGCGCTGCCGCCCGCGCACCGGCGACGGCGCGGACGGGCCGGTGTACGA  
GGCCCCCGTACGCTGTACGAGACCCGGATGGCCGAGCACTGGCAGCGGCTGCTGGGCATCGAGGCC  
CCGGGCCCGGTCTGGGCCACGACTTCTTCGAGACCGGTGGCAGCTCCATCCGGCTGATCGAGCTGATC  
TACCACCTGCAGGCCGAGTTCGGGATCTCCATCCCGGTGAGCCGGCTGTTCCAGGTGACGACGCTGCA  
CGGCATGGCCAAGACGGTCGAGCGGATCGTCACCGGGGAGATCGAGGGGTGCTGCCGTATCTGCGGT  
TCAACGAGAACGCCGCGGCGGGCACGGTGTCTGCTTCCC CGCGCCGGTGGCCACGGCCTGGTCTAC  
CGGGAGTTCGCGGGCGGGCTGCCGGAGTTCGAGTTCCTCGCCTTCAACTACCTGATGGGCGAGGACAA  
GGTAAGCGGGTACGCCGACCTGGTGGCCGGGCACCGGCCGGAGGGCGAGATCGACCTGCTCGGCTACT  
CGCTGGGCGGCAACCTCGCCTTCGAGGTGGCCAAGGAGCTGGAGCGGCGCGGCCGCACCGTGCGCCAC  
GTCGTCATCATGGACTCGCTGCGGGTGACGGAGTCTACGAGCTGGGCCCGGAGCACCTGGCCGTCTT  
CGAGCGCGAGCTGGCCGAGCATCTGCGCAAGCACACCGGCTCGGCGCTGGTTCGCGGAGAAGACGCGCG  
AACAGGCCAAGGACTACCTGGAGTTCACCGGCCGCACCGCCAACCCCGGCACACCGGGGCCCGGATC  
GCGGTGATCAGTGACGAGGAGAACGCGGCCGCGTACGACAGCGGCGCCGAGGGCAGCTGGCACGGCGC  
CTCCCGTACCGGAACCGACGTGCTGCGCGGGGTGGGCCGGCACGCCGACATGCTCGATCCGGGGACGG  
TCGAGCACAACGCGCGCCTGGCGCGCGGCATTCTCACC GGCGGTGATGGCGAGGTATGA

Peptide sequence of the PKS/NRPS system IkaA (3124 amino acids):

MDSMHHHPAPVPVPEVPAPVPSQDDAFAIVGIGCRLPGGASDYRTFWRNLLDGKDCITDTPADRYDTRT  
LGS GDKAKPGR L VGG RGGYIDGFDEFDPAFFGISPREAEHMDPQQRKLLLEVAVEALEDGGLKPAELAG

SDVGVYVGAFTLDYKILQFADLGFETLAAHTATGTMMTMVSNRISYCFDFRGPSVSVDTACSGSLVAV  
HLACQSLRRGETSVALAGGTLHMAPQYTTAETKGGFLSPDGRSRALDASANGYVRAEGVGMVAIKRL  
ADAQRDGDPIHAVIIGSGVNQDGRNGITVNPDAQVALIERVCAAAGVTPGSLQYVEAHGTSTPVG  
PLEANALGRALSIGREPGARTYVGSVKTNIGHTESAAGIAGLIKTVLSLKHKVIPPHINLEKLN  
PQID EASLPYEIPREPTPWPEHSGPARAGVNSFGFGGTNAHVLLQEAPPTVGEPPAPPATDGY  
SVLPLSARDP EAFPAIATGLRERLAEGLPVGDAAAYTLAHRHQHLEQRLSVVYDSPEALDEV  
LGAVARGESHPRAVAGT QREGLDRRLVWVFTGMGPQWAMGRQLYASEPVYREVIDRCDQEIA  
ALTGWSLTQELNADEADSRMSE TWLAQPANFAVQIALAALWRSKGIQPDVAVTGHSTGEVA  
AFYEAGVYTLPEAVKIVVHRSRLQOKLIGT GSMLAVSLTEAEAARRVRPHGDRVSI  
AAVNSPTSITLAGDTEALEVIAAELGAEDIFARFLEVGVYPYH SPRMELIKDEL  
LTSLADLKPQAKLPLYLTALPGTVAQGTELDADYWWRNVREAVHFRAAVDRLLDDG  
YGVFLEIGPHPVLAHSLRECCEARDAHSVTLASIRRKADERERLTLSLAALHSLGF  
AVDWHALHPAGR PAELPRYPFRDRYVVEPAPVAQIRLGRDHPLGRRTASAEPVWEV  
KLDAAEAPYLEDHRIQGTVLF PAAGYLEMAAQAMRALTGDEHSTAALAGIELRKAL  
FLPDGEPQTVQLSFSSDAAAFSIATVGAAGAEP TVHATGTVRAAQRRRLTAPLDT  
VAVRARAARHLSGPDCYAELAALGYHYGPAFQGIIEVWIGEALARA RIRPPQGLT  
PDAAAHMHMPVLLDSCFQSLTLPQLTAPAGPGGTGIRLPLSIAEVRLLDPVGDRE  
LWVH ATVTGDDEDELTDGDIIVYDGADGTPVLRVAGFRAADVEKAATTVGLSTID  
SWLTEPSWVPCPLPEAAS AAPAAGRHLVLFADAGGVAQRLAALIGEAGGEAHLV  
RPGAAYGLDRTARTATVVPGSADDLRRLLTDLG QVDGVVHLWNLDRPALADAP  
RGRFADIASTGAYALIALTQALLADPERHGGTPVHIVTRAAQCVPVGE PVEPL  
GAPAWGIGRVLWQQELAGRGKLIIDLAADGGVEEDAYALLRELADPTGAAERE  
DEIALRAGER HTSRLVAAEGLSRPLPLRLRPDGSYLVTFAGFALGRLLCRTL  
VRRGARRLILVGRTRLPERERWADQD PNSPAGRHVAFLEKELEALGAQPI  
LAPLDITDEDALAGWLAGYRRAQGPPIRGVHLAGQVRDITLVPEM DREVFDA  
VHDPKVVGAAALLHRQLSGEPLHFVLFASVAAWLTTAGQTNYAAGNAFLDAL  
AHHRAQGL PALALDWGPWATGMIEELGLIDHYRNSRGMSSLAPEAGMAVLE  
RVIGQDRAQLLVATVVDWPVFMVSWY AAPRVLTELAATAQPGSEGDGSFL  
DAFREATA DKRRLLTERFTTLVAGVLRVRAEQVDPVAVSLNL LGLD  
SLLAMELRARVVAEVLGIALPVVALLSSAPAGDLITQLHEGLEELLAEEG  
SGAAVTAVERFEDEA EFPLTQNQKALWFLKQLNPDGFAYNIGGAVEVR  
VELDPDLMFEAFRRLLARHPVLRANFLLVEGQAVQ RISPEIKEDIALFD  
VEDRAWDDIYRMIIEEYRKPYPDLATDPLIRFRLFRRGPD  
RWVITKAVHHIISDA ISTFTFIEELLSLYEGLRQGH  
DVELPPVSARYLDFLNWQNAFLAGREAQKMLAY  
WRGQLPDEVVLLAL PTDKPRPAVLTHNGASEFF  
ALDAELSARVHALAREHNVTVMVLLSAYYLL  
LHRYAGQDDIIVGSPVT GRTQEEFGAVYGY  
FVNPLPLHASLAGDPTVAELLDQVRTTVL  
GGLDHQEYPTLLVEQLGLAHDPSRS AVFQ  
AMFILLHHKVATEKYGYKLEYIELPEEEG  
QFDLTL SAYEEEEADGRFHCVFKYNTDL  
FEAETIRR LAGHYTQLLES  
LTAAPADAATGGLRMLSGGERERILTEWS  
GAGQGAQDAPVPVHRLIAEAAHRT  
PQAI AVAAPAESGETRRLTYGELEERAGEL  
AGRLRARGVREGTVVALCLEKSP  
ELITALLAVLKAGGAYLPL DPDY  
PADRLAYMVRNAGATLVIIGTGGA  
AEGLPGTVVTTLEELLAGEAGEAG  
PDAEPGPDSPAYVIYTS GSTGRPKAVAV  
SHRNLASVYAGWRDAYRLEEGGIRVHL  
QMASPSFDVFTGDLTRALCSGGT  
LVLVGRE LLFNTARLYETMRAERVDC  
GEFVPAVVRTLVRHCEDTGARLDF  
LRLLI VGSDSWKAEEYERLRALGAQ  
RLVNSYGLTEATIDSAWFE  
GPADDLEGGRMVPIGRPFPGSALY  
ILDSRGEPPVPGVPGELWIGGT  
GVALGYLGDEALTGERFLTRALAGDAP  
VRLYRTGDLARWDAAGTVHLLGRAD  
SQIKVRGHRIEIGEIESHL AACPELA  
QAQVTVRPDAGGENVLCAYGVAAPG  
AVLDWREVRRLADYLPTFMIPTHT  
FTELPALPLTPN GKVDVAALPAPRT  
GDGADGPVYEAPVTLYETRMAEHW  
QRLLGIEAPGPGLGHDFETGGSSIR  
LIELI YHLQAEFGISIPVSRLFQVTT  
LHGMAKTVERIVTGEIEGSLPYLRF  
NENAAAGTVFCFPAGGHGLVY REFA  
ARLPEFEFLAFNYLMGEDKVS  
GYADLVAGHRPEGEIDLLGYSLGG  
NLAFEVAKELERRGRTVRH VVIMD  
SLRVTESYELGPEHLAVFERELAEHL  
RKHTGSALVAEKTREQAKDYLEFT  
GRTANPGTTGARI AVISDEENAAAYD  
S  
GAEGSWHGASRTGTDVLRGVGRHAD  
MLDPGTVEHNARLARGILTGGDGEV

DNA sequence of the FAD dependent oxidoreductase *ikaB* (1833 bases):

ATGACGCCTTTTCGTTTCAGCCGGCGGTTCGACACCAAGGAGCACAGCGCCATGTCATCCCCCACCACCTC  
CGGCACCCCGGGCAGGCAGTCGATGATCATCATCGGCCGGCGGCTGGGGGGCTGTCCACCGGTGCT  
ACGCGCAGATGAACGGCTACGCGACGCGGGTCTTCGAGATGCACGAGATCCCGGGCGGTTCCGACCC  
GCCTGGGAGCGCGGGACTTCACCTTCGACTGGTGCCTCAGCTGGCTGCTGGGCAGCGGTCCCGGCAA  
CGAGATGTACCAGATCTGGATGGAACGGGGCGTTGCAGGGCAAGGAGATGCGCCAGTTCGACGTCT  
TCAACATCGTGCGGGTGCGCGGGCCAGCCGGTGTACTTCTACTCCGACCCGGACCGGTCCAGGCG  
CACCTGCTGGAGATCTCCCCGGCCGACGCCCGCCGCATCAAGAACTTCTGCGAGGGGGTGCACACCTT  
CCAGAAGGCGCTGTCGGTCTACCCGTTCCCTCAAGCCGGTGGGGCTGATGGGGCGGTGGGAACGGTGA  
AGATGCTGGCCTCGTTCCTGCCGTACTTCAACGCCATCCGCAAGTCCATCACCGAGCTGATGACGGAC  
TACGCGGAGAAGTTCAGCACCCGGTGTGCGCGAGGCCTTCAACTACGTGCTGTACGAGAAGCACGC  
CGACTTCCCCGTCTGCCGTTCTGGTTCAGCTGGCCTCGCACGCCAACGGCTCGGCGGGGGTCCCCG  
AGGGCGGCTCGCTGGAGCTGGCCCGTCCGTGGAGCGGCGCTACCTGGGGCTCGGCGGGGAGATCACC  
TACAACGCCAAGGTGGAGAAGATCCTCGTTCGAGCACGACAAGGCGGTGGGAGTGCAGGCTCACCGACGG  
CCGCGAGTTCGCGCGGACATCGTGGTGTTCGGCGGCCGATCTGCACACCACCGCCATGGAGATGCTCG  
GCGGCCGGTATCTCAACGACACCTGGCGCAAGCTGCTCACCGAGACGATCGACGAGGTGGGCACGATC  
TCCCCCGGCTATGTCGCTGTTCCCTGGGGCTGCGCCGGCCGTTCCCCGAGGGCGAGCCGTGCACCAC  
GTACGTGCTGGAGGACAGCATGGCGGAGAAGCTCACCGGCATGCGGCATCCCAGCATGAACGTGCAGT  
TCCGCAGCTGCCACTACCCGGAGCTGTGCGCCGCGGAGACCACGGTCATCTTCGCCACGTACTTCTCG  
GAGGCCGAGCCGTGGCGGGCGCTGCGCGACGACGTGCCGGAACAGGCGGGCCGGGTGCGGCGCGGTCA  
GGTGTGTCACACCCTGCCGTTGAAGCACGGCAAGGCGTACACCAGGCCAAGCGGCAGGCGCGGATCA  
CCATCGAGAACTTCTGGACGAGCGGTTCCCCGGTCTCAAGGACGCGGTGCGCCGTGCGGGACGTGTCC  
ACGCCGCTGACGCAGGTGCGCTACACGGGCACCTACAACGGCGGGTTCCCCCGCTGGCAGCCGTTCTGT  
GGACGGCGGGGAGACCGTGGAGGTGGAGATCAACAAGAACGGCCCGGTGCTGCCGGGGCTCTCCAAC  
TCTATCTGGCCGGGGTGTGGGTACCCGTGCGCGGGCTGATCCGGGCGGTGGCCTCGGGCCGGCAGGTC  
ACGCAGGTGATCTGCCGGGACGACGGGCGGGAGTTCACGGCGAGCGTGGACGAGAGCGCGCCGCCGCC  
CACCCAGGTGCCATCCCGGTGGGCAAGCAGCCGGGCGTGCAGGATCTGGCGGGCCGGGTTCGCCGCC  
AGACCGCCGGCGGGGAGACCGCCACCGGCGCCAACAACACCGTCACATCGTCGAGGAGCGTGTAG

Peptide sequence of the FAD dependent oxidoreductase IkaB (610 amino acids):

MTPFVQPAVDTKEHSSAMSSPTTSGTPGRQSMIIIGGGLGGLSTGCYQMNGYATRVFEMHEIPGGSC  
AWERGFDFDWCVSWLLGSGPGNEMYQIWMELGALQGKEMRQFDVFNIVRVRGGQPVFYFSDPDRLOA  
HLLLEISPADARRIKNFCEGVRTFQKALSVYPFLKPVGLMGRWERWKMLASFLPYFNAIRKSITELMTD  
YAEKFQHPVLREAFNYVLYEKHADFPVLPFWFQLASHANGSAGVPEGGSSLELARSVERRYLGLGGEIT  
YNAKVEKILVEHDKAVGVRLTDGREFRADIVVSAADLHTTAMEMLGGRYLNDTWRKLLTETIDEVGTI  
SPGYVSLFLGLRRPFPEGEPCCTTYVLEDSMAEKLTMGRHPSMNVQFRSCHYPELSPRETTVIFATYFS  
EAEPWRALRDDVPEQAGRVRGQVLHTLPVKHGKAYTQAKRQARITIEFLDERFPGLKDAVAVRDVS  
TPLTQVRYTGTYNNGFPGWQPFVDGGETVEVEINKNGPVLPLSNFYLAGVWVTVGGLIRAVASGRQV  
TQVICRDDGREFTASVDESAPPPTQVAIPVGKQPGVPDLAAGFPAQTAGGETATGANNTVTSSRSV

DNA sequence of the alcohol dehydrogenase *ikaC* (1047 bases):

GTGATCGCCGAGCACATCCCGGGGTCCCGGACACGGACCGGATCTACCGGAAGGTGACGCGGGAGTT  
CGATCCCGCCTCGCTGGCGGACGATCAGATGCTGCTGCGCACCCGGTACGTGTCGGTGGACCCGTATC  
TGGTGGGGCTCTCGCTCCAGACGCCGATCGGGGACACCGTGC GCGGTGACTCGATCATGGAGGTGGCC  
GTGGCGGGGCCGCGCGCCCGCTTCCAGGTCGGGGACCTGGTGCAGGGGTACGGCGGCTGGTGCAGCCA  
TCTGGTGTCCACCGGGGGGCCAGCGGATGGAACGACGACGGCGCCGAGTTCGCCGTCCAGTTGCCGC  
CGTTCCGCAAGCTGGACCCGCGCGGTACGACGAGGCGCTGCCGCTGTCCACGGCGCTGGGCGTGATG  
GGCACCCCGGGCATCACCGCTTCGGCGCGATGAAGACGTTCCCTGACCGTGGGCTCCGAGGACACGGT  
GGTGATCAGCGGGCGTCCGGGACGGTGGGCACCCCTGGTGGGCCAGCTCGCCAAGCGGGCCGGGGCCC  
GGGTGGTGGGCACCACCTCCTCGCCGGGAAGGCCGCGTATCTGACGCAGCTGGGCTTCGACGCGGTG  
GTGAACTACCGGCAGGGCGACGACACGGACACGGTGC GCGAGGCGCTGGCGGCGGCAGCGCCAACGG  
AATCGACAAGTACTTCGACAACCTGGGCGGCACCGTGACGGACGCGGTGTTACGATGCTCAACGTGC  
ACTCCAGGTGGCGGTGTGCTGGCAGTGGGCCACCACGGTCAACGGGGACTGGACGGGGCCGCGGCTG  
CTGCCGTACATCATGTTCCCGCGCACCACGATCCGGGGGATCTTCGCCGACGAGTGGTACACGGAGGA  
GATGGTGCACGCGCTGCACGAGGAGGTGGGCGGGCTGATCCGCAAGGGTGAGCTGGCCTACCACCAGA  
CCATCCACCAGGGCTTCGACGCCCTCCCGGACGCGTACCGCTCCCTGTACACCGGCCAGGAGGGCAAC  
CGCGGCAAGGTCTTGGTCCGCTGTAG

Peptide sequence of the alcohol dehydrogenase IkaC (348 amino acids):

VIAEHIPGVPTDRIYRKVTREDFPASLADDQMLLRTRYVSVDPYLVGLSLQTPIGD TVRGDSIMEVA  
VAGPRARFQVGD LVQGYGGWCSHLVSTGGPSGWND DGA EFAVQLPPFRKLDPRRYDEALPLSTALGVM  
GTPGITAFGAMKTF LTVGSEDTVVISGASGTVGTLVGLAKRAGARVVGTTSSPGKAAYLTQLGFDV  
VNYRQDDTDTVREALAAAAPNGIDKYFDNLGGT VTD AVFTMLNVHSQVAVCWQWATTVNGDWTGPRL  
LPYIMFPRTTIRGI FAD E WY TEEMVDALHEEVGGLIRK GELAYHQTIHQGF DALP DAYRSLYTGQEGN  
RGKVLVAL



## 7.2 Kopie von Publikation 2 mit Supporting Information (vgl. 4.1.2)

Greunke, C.;\* **Antosch, J.**;\* Gulder, T. Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5334-5336. (\* equally contributing first authors)



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 5334

Received 29th January 2015,  
Accepted 20th February 2015

DOI: 10.1039/c5cc00843c

www.rsc.org/chemcomm

# Promiscuous hydroxylases for the functionalization of polycyclic tetramate macrolactams – conversion of ikarugamycin to butremycin†‡

Christian Greunke,§ Janine Antosch§ and Tobias A. M. Gulder\*

Polycyclic tetramate macrolactams (PTMs) are a structurally, bio-medically and biosynthetically intriguing class of bacterial metabolites. By combining parts of the machineries of different PTM biosynthetic pathways, we demonstrate for the first time the substrate promiscuity of a class of PTM tailoring enzymes, thereby facilitating the (bio)synthesis of butremycin.

In the course of evolution, Nature has developed a large set of diverse natural products with unique structures and biological functions. An interesting group of such metabolites are the PTMs that are produced by bacteria. Depending on their individual structures, PTMs exhibit a number of valuable biological activities, ranging from antimicrobial to cytotoxic.<sup>1–6</sup> All PTMs contain a tetramic acid moiety incorporated into a macrolactam ring that is further modified with a fused carbocyclic system. Both overall size of the macrolactam and oxidation levels of the individual carbon atoms vary in different PTMs, as does the number of rings and their exact cyclization pattern in the carbocyclic portion. Overall, this leads to the structural diversity of this natural product class, with HSAF (**1**)<sup>1</sup> and the frontalamides (**2**),<sup>2</sup> alteramide A (**3**),<sup>3</sup> and ikarugamycin (**4**)<sup>4</sup> being typical examples (Fig. 1).

Triggered by initial work on the structure and biosynthesis of **1** by Du *et al.*<sup>7a</sup> and of **2** by the Clardy lab,<sup>2</sup> PTM biosynthetic pathways have meanwhile attracted significant attention. In particular the pioneering work by Du on HSAF assembly in *Lysobacter*<sup>7</sup> and our contribution towards understanding the biosynthesis of **4**<sup>8</sup> that was later validated by Zhang *et al.*<sup>9</sup> have revealed a number of interesting features of PTM biosynthesis. These include the unusual catalytic activities of the thioesterase domain in the mixed polyketide–non-ribosomal peptide (PKS–NRPS) biosynthetic machinery,<sup>7b,c</sup>

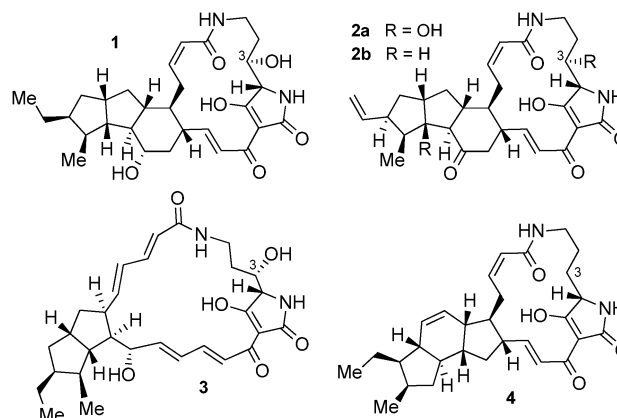


Fig. 1 Structures of the PTMs HSAF (**1**), the frontalamides (**2**), alteramide A (**3**), and ikarugamycin (**4**).

the origin of the C-3 hydroxyl group found in many PTMs that was shown to be introduced into **1** by late-stage hydroxylation,<sup>7d</sup> the unprecedented iterative use of a single PKS module for incorporation of twelve C<sub>2</sub>-units into a bacterial metabolite,<sup>7e,8,9</sup> and the remarkably low number of enzymes overall involved in the biosynthesis of the highly complex cyclic structures by reductive ring formation, only three in case of **4**.<sup>8,9</sup> In addition, Zhao *et al.* showed the applicability of their DNA assembler methodology towards unlocking a cryptic PTM biosynthetic pathway from *Streptomyces griseus*.<sup>10</sup>

Owing to the broad range of biological activities of different PTMs and the simplicity of PTM biosynthetic pathways in terms of the low number of tailoring enzymes needed to shape these complex molecules, the engineered biosynthesis of PTMs by swapping PTM genes between different pathways would be highly desirable. However, such an approach has not yet been reported. The success of such experiments is highly dependent on the level of substrate promiscuity of the employed enzyme. Within this work, we set out to test this by utilizing PTM-pathway derived sterol desaturases (SD), the catalysts responsible for C-3 hydroxylation in the biosynthesis of HSAF (**1**),<sup>7d</sup> to functionalize

Biosystems Chemistry, Department of Chemistry and Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Germany. E-mail: tobias.gulder@ch.tum.de

† This work is dedicated to our mentor and distinguished colleague Prof. Dr Dr h.c. mult. Gerhard Bringmann.

‡ Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5cc00843c

§ These authors contributed equally to this work.



ikarugamycin (**4**), a compound with a significantly altered cyclization pattern when compared to **1** (cf. Fig. 1).

For our experiments we decided to use the SD gene of a bacterial strain with a putative PTM biosynthetic gene cluster resembling that of the HSAF pathway in *Lysobacter enzymogenes* C3.<sup>7</sup> The SD gene of the commercially available *Lysobacter capsici* DSM 19286 was selected as a good candidate (see Fig. 2A/B). The production of **1** by *L. capsici* was confirmed by its cultivation and chemical analysis of organic extracts of the culture broth. Having thus indirectly proven the presence of a biocatalytically active SD protein that hydroxylates the HSAF skeleton in *L. capsici*, we set out to clone the respective candidate gene into a suitable overexpression vector. To allow later purification of the recombinant SD protein, the vectors pHis8<sup>11</sup> and pGS-21a<sup>12</sup> were used, both encoding N-terminal poly(His)-tags facilitating affinity chromatography, with pGS-21a additionally encoding a GST tag to enhance protein solubility. The putative SD gene of the PTM biosynthetic gene cluster in *L. capsici* was amplified from genomic DNA by PCR using two different sets of primers (see ESI†). This led to the production of a 810 bp copy of the SD gene as predicted by GLIMMER<sup>13</sup> and to a longer 1002 bp copy that includes an alternative, more upstream start codon of the original sequence and better resembles the length of other annotated SDs in published genomic data. The thus obtained constructs were transferred into *E. coli* BL21(DE3) for recombinant protein production studies. Unfortunately, all expression experiments with the four constructs revealed only very low overproduction levels and exclusive formation of insoluble inclusion bodies. Best overproduction levels were still achieved with the 810 bp construct of SD in pGS-21a (pSDsLcap).

We next examined the utility of pSDsLcap to provide the hydroxylating SD biocatalyst *in vivo*. The plasmid was transferred into our recently reported *E. coli* BAP1<sup>14</sup> based ikarugamycin (**4**) heterologous production system<sup>8</sup> by electroporation. Both the transcription of the ikarugamycin (**4**) pathway genes as well as of the SD gene from *L. capsici* were controlled by *lacI*. Fermentation of the resulting strain in ZY autoinduction media<sup>15</sup> revealed the exclusive production of the 3-hydroxylated derivative of **4** (see Fig. 3D), a compound very recently isolated as the natural product butremycin (**5**) from *Micromonospora* sp. K310.<sup>16</sup> Ikarugamycin (**4**) was not detectable in these experiments at all, revealing its highly effective, complete conversion to **5** catalysed by SD *in vivo*.<sup>17</sup> Because of the identical chromatographic behaviour of **5** produced by our approach compared to **5**

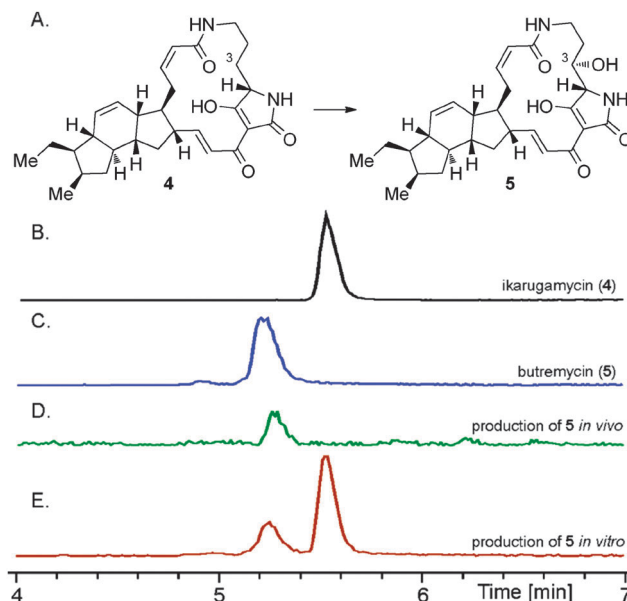


Fig. 3 (A) Conversion of ikarugamycin (**4**) to butremycin (**5**). HPLC-MS-analyses of (B) a standard of ikarugamycin (**4**), (C) a standard of butremycin (**5**), (D) the coexpression of Ika\_ABC<sup>8</sup> in *E. coli* BAP1<sup>14</sup> together with SD from *L. capsici*, (E) the *in vitro* transformation of **4** using the supernatant derived from a culture of an *E. coli* BL21(DE3) SD (*S. degradans*) overexpression strain. EICs at 479.3 (**4**) and 495.2 (**5**) are shown.

from *Micromonospora* sp., formation of the identical diastereomer, *i.e.*, with 3*S*-configuration, can be concluded.<sup>18</sup>

We next turned our attention to the possibility to hydroxylate purified ikarugamycin (**4**) using recombinant SD, as this methodology may easily be expanded to functionalize other PTM molecules without the need of a complete, heterologously reconstituted PTM pathway or a genetically transformable natural producer. Indeed, when feeding **4** to *E. coli* BL21(DE3) carrying pSDsLcap, a small portion of **4** was converted into **5** (with approx. 90% of **4** remaining, data not shown).

To improve turnover rates, which might have been hampered in the *E. coli* feeding experiments due to problems of **4** passing the bacterial cell wall, the *in vitro* modification of **4** was re-investigated. As the SD encoded by *L. capsici* did not yield sufficient quantities of soluble protein for purification (see above), the SD gene of the putative PTM biosynthetic gene cluster of *Saccharophagus degradans* DSM 17024, a close homolog of the respective *Lysobacter* genes, was selected as an alternative (cf. Fig. 2C). It was readily cloned into pHis8 and pGS-21a (see ESI†) and the resulting constructs tested in protein overproduction assays in *E. coli* BL21(DE3). Using the respective pGS-21a construct (pSDsSde), overproduction of soluble protein was indeed achieved. Purification of the recombinant SD was conducted using Ni-affinity chromatography. However, significant degradation of SD during the isolation procedure was observed. The SD enriched fraction was nevertheless assayed for its hydroxylating activity. In these experiments, **4** was incubated with SD for 12 hours, leading to approx. 30% conversion to **5** (Fig. 3E). The overall turnover was not increased when extending the reaction time, hinting at a complete degradation of SD under the assay conditions. To potentially circumvent

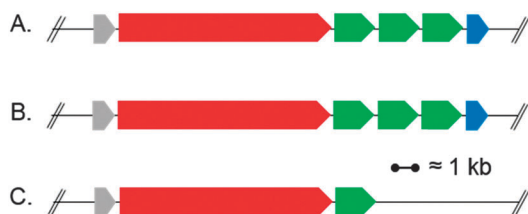


Fig. 2 Schematic representation of (A) the PTM biosynthetic pathway in *Lysobacter enzymogenes* C3 encoding HSAF (**1**)<sup>7</sup> and the putative PTM pathways in (B) *L. capsici* DSM 19286 and (C) *Saccharophagus degradans* DSM 17024. Genes putatively coding for: red: iterative PKS-NRPS system; green: oxidoreductase; blue: alcohol dehydrogenase; grey: sterol desaturase (SD).



the problems associated with decomposition of recombinant SD during purification, the *in vitro* hydroxylation of **4** using cell lysates of the *E. coli* BL21(DE3)::pSDSde expression system was tested. These experiments gave the best results so far for the *in vitro* preparation of **5**, leading to overall approx. 50% C-3 hydroxylation of **4** to **5**. This hydroxylation step could be forced to completion by simple extractive work-up of the mixture of **4** and **5** and its repeated metabolization with fresh cell lysate.

The members of the PTM class of natural products are characterized by highly complex molecular structures that arise from remarkably streamlined biosynthetic machineries. Besides the unusual iterative PKS–NRPS system there are only a very small number of tailoring enzymes involved in PTM biosynthesis. Generating new molecules by adding or swapping individual biosynthetic genes between pathways thus seems to be a rewarding task. A precondition for success of such experiments, however, is a relaxed substrate specificity of the respective encoded enzymes. We herein prove for the first time that a class of PTM tailoring enzymes, usually annotated as sterol desaturases (SD), is capable of transforming “unnatural” substrates derived from a different PTM pathway. This led to the development of a heterologous production system of butremycin (**5**) utilizing the ikarugamycin biosynthetic genes together with a SD from *L. capsici*. In addition, even purified **4** can be converted into **5** utilizing SD alone, both *in vivo* and *in vitro*. As this class of SDs from PTM pathways seems to have highly specific activity for C-3 hydroxylation of PTMs, as also shown for the previously uncharacterized SD from *Saccharophagus degradans*, we propose to rename these enzymes according to their function as PTM hydroxylases. The results presented here provide diverse methods for late-stage C-3 hydroxylation of PTM molecules. The utility of the PTM hydroxylases for the functionalization of other substrates is currently being tested in our laboratory. Our work should furthermore set the stage for other PTM pathway gene swapping experiments that are likewise being investigated by our group.

We thank Dr Markus Nett (HKI Jena) for *Lysobacter capsici* and Dr Kwaku Kyeremeh (University of Ghana) for an analytical sample of butremycin from *Micromonospora* sp. K310. J.A. and C.G. thank the Fonds der Chemischen Industrie (FCI) and the Friedrich Naumann Foundation for Freedom, respectively, for

their PhD scholarships. This work was generously funded by the DFG (GU1233/2-1 and the Center for Integrated Protein Science Munich CIPSM).

## Notes and references

- P. R. Graupner, S. Thornburgh, J. T. Mathieson, E. L. Chapin, G. M. Kemmitt, J. M. Brown and C. E. Snipes, *J. Antibiot.*, 1997, **50**, 1014.
- J. A. V. Blodgett, D.-C. Oh, S. Cao, C. R. Currie, R. Kolter and J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 11692.
- H. Shigemori, M.-A. Bae, K. Yazawa, T. Saaki and J. Kobayashi, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 4317.
- K. Jomon, Y. Kuroda, M. Ajisaka and H. Sakai, *J. Antibiot.*, 1972, **25**, 271.
- S. Cao, J. A. V. Blodgett and J. Clardy, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 4652.
- S. Kanazawa, N. Fusetani and S. Matsunaga, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1065.
- (a) F. Yu, K. Zeleta-Rivera, X. Zhu, J. Huffman, J. C. Millet, S. D. Harris, G. Yuen, X.-C. Li and L. Du, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**, 64; (b) L. Lou, G. Qian, Y. Xia, J. Hang, H. Chen, K. Zeleta-Rivera, Y. Li, Y. Shen, P. H. Dussault, F. Liu and L. Du, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 643; (c) L. Lou, H. Chen, R. L. Cerny, Y. Li, Y. Shen and L. Du, *Biochemistry*, 2012, **51**, 4; (d) Y. Li, J. Huffman, Y. Li, L. Du and Y. Shen, *MedChemComm*, 2012, **3**, 982; (e) Y. Li, H. Chen, Y. Ding, Y. Xie, H. Wang, R. L. Cerny, Y. Shen and L. Du, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 7524.
- J. Antosch, F. Schaefer and T. A. M. Gulder, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 3011.
- G. Zhang, W. Zhang, Q. Zhang, T. Shi, L. Ma, Y. Zhu, S. Li, H. Zhang, Y.-L. Zhao, R. Shi and C. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 4840.
- Y. Luo, H. Huang, J. Liang, M. Wang, L. Lu, Z. Shao, R. E. Cobb and H. Zhao, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 2894.
- J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon and J. P. Noel, *Biochemistry*, 2000, **39**, 890.
- The expression vector pGS-21a is commercially available from GenScript.
- A. L. Delcher, K. A. Bratke, E. C. Powers and S. L. Salzberg, *Bioinformatics*, 2007, **23**, 673.
- B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane and C. Khosla, *Science*, 2001, **291**, 1790.
- F. W. Studier, *Protein Expression Purif.*, 2005, **41**, 207.
- K. Kyeremeh, K. S. Acquah, A. Sazak, W. Houssen, J. Tabudravu, H. Deng and M. Jaspers, *Mar. Drugs*, 2014, **12**, 999.
- It is important to note that the heterologous ikarugamycin production system and our natural producer of **4**, *Streptomyces* sp. Tü 6239, do not produce any detectable amounts of butremycin (**5**).
- The characterization of **5** by coelution experiments was performed on a variety of different HPLC phases (XBridge C18, Chromolith RP18e, Eurospher II C18A and C8, and the chiral phase Nucleocell Delta-RP), with no chromatographic differences detectable.



# Supporting Information

## Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin

---

**Christian Greunke<sup>‡</sup>, Janine Antosch<sup>‡</sup> and Tobias A. M. Gulder**

*Biosystems Chemistry, Department of Chemistry and Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching.*

*E-Mail: tobias.gulder@ch.tum.de*

*‡: These authors contributed equally to this work.*

### Contents

- 1.) General methods
- 2.) Bioinformatic data
- 3.) Cloning of SD genes
- 4.) *In vivo* and *in vitro* assays
- 5.) Sequences of investigated PTM hydroxylase genes and corresponding translations
- 6.) Sequencing data
- 7.) LC-MS traces and MS data
- 8.) Vector maps
- 9.) References

## 1.) General methods

### 1.1 Bacterial strains and cultivation

*E. coli* DH5a was used as the standard cloning host. *E. coli* BAP1<sup>1</sup> was used for heterologous expression experiments. *E. coli* BL21(DE3) was used for protein expression. All work with *E. coli* was carried out on LB agar or LB liquid media (Roth) with the appropriate antibiotics for selection. Heterologous expression experiments were either carried out in LB with induction of secondary metabolite production using 1 mM IPTG. Alternatively, auto-induction media was used. Per 50 mL, this was composed of 46 mL ZY media (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 925 mL H<sub>2</sub>O), 0,5 mg arginine, 50 µL magnesium sulfate solution (24.65 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 13.84 g MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 100 mL H<sub>2</sub>O), 1 mL 50 x 5052 solution (250 g glycerol, 100 g α-lactose, 25 g glucose, 730 mL H<sub>2</sub>O), and 2.5 mL 20 x NPS solution (142 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 66 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 900 mL H<sub>2</sub>O).<sup>2</sup> *E. coli* BAP1 pHis8::Tü6239\_ikaABC was used for in vivo experiments.<sup>3</sup>

*Lysobacter capsici* (DSM 19286) was grown in 1/10-fold concentrated TSB-Medium at 30 °C while shaking (200 rpm) for three days, until gDNA was prepared following the instructions of the Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience).

*Saccharophagus degradans* (DSM 17024) was obtained from DSMZ. A pCC1Fos-based genomic library was prepared and a clone, covering the whole PTM cluster, was identified by PCR screening. This material was used as template DNA for PCR.

### 1.2 Transformation of electrocompetent *E. coli*

Electrocompetent cells were generated as follows: 200 mL of SOB media (20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0.6 g NaCl, 0.2 g KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) were inoculated with 5 mL of a preculture of the respective *E. coli* strain (grown overnight at 37 °C) and incubated at 37 °C at 200 rpm until the OD<sub>600</sub> reached 0.8. The culture was centrifuged at 4 °C for 5 min at 5000 rpm. The supernatant was discarded, the pellet re-suspended in 25 mL of ice-cold 10 % glycerol and centrifuged at 4 °C for 5 min at 5,000 rpm. This procedure was repeated 4 times with different amounts of ice-cold 10 % glycerol (20 mL, 15 mL, 10 mL, 5 mL). After the washing steps, the pellet was re-suspended in 1 mL 10 % glycerol and aliquoted in 75 µL portions. The aliquots were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

For electroporation, 5 µL of the respective plasmid to be introduced were added to an aliquot of thawed electrocompetent cells. The electroporation was carried out in a 0.2 cm ice-cold electroporation cuvette using a BioRad GenePulser II set to: 200 Ω, 25 µF and 2.5 kV. The expected time constant was 4.5-5.5 ms. Immediately after the electric pulse, 700 µL of ice-cold LB broth was added and the cells were incubated for 45 minutes at 37 °C. 150 µL solution was plated on LB agar supplemented with appropriate antibiotics and incubated at 37 °C overnight.

### 1.3 Isolation and purification of plasmids and PCR amplicons

Plasmids were isolated from single clones incubated overnight in LB broth with appropriate antibiotics using the peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I, C-Line (Peqlab) according to the protocol provided by the manufacturer. PCR products were either isolated using the PCR Purification Kit (Jena Bioscience) or by gel electrophoresis with re-isolation from the excised gel sample using the peqGOLD Gel Extraction Kit, S-Line (Peqlab).

### 1.4 Restriction analysis

A plasmid restriction (10 µL volume) was composed of: 1 µL compatible NEB buffer (10 fold); 1 µL BSA (10 fold); 0,125 µL per each enzyme, 5 µL plasmid solution containing 200 ng plasmid DNA and pure water. This mixture was incubated for 2 h at 37 °C and analyzed by gel electrophoresis. All enzymes and buffers used were purchased from NEB.

## 1.5 Chemical analysis

HPLC-MS analyses were carried out using an UltiMate 3000 LC System system coupled to a LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Scientific). HPLC-HR/MS analyses were performed on a Thermo Finnigan LTQ FT-ICR equipped with a Dionex Ultimate 3000 separation module. The Xcalibur software was used to control the system. Interpretation of the recorded data was carried out using the Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48 software.

The chromatographic separation for HPLC-MS was carried out on a XBridge (Waters) C-18 HPLC column (30 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m particle size) using the following gradient with water (A) and acetonitrile (B), both buffered with 0,1 % formic acid, as the eluents: linear gradient from 20 % B (0 min), 95 % B (6 min), 95 % B (7.5 min), 20 % B (8 min), 20 % B (9 min), all at a flow rate of 1,1 mL/min. The chromatographic separation for HPLC-HR/MS was carried out on a XBridge (Waters) C-18 HPLC column (100 x 4,6 mm, 3,5  $\mu$ m particle size) using the following gradient with water (A) and acetonitrile (B), both buffered with 0,1 % formic acid, as the eluents: linear gradient from 5 % B (2 min), 5 % B (2 min), 20 % B (2.5 min), 95 % B (5 min), 95 % B (6 min), 20 % B (9 min), 20 % B at 1,1 mL/min flow rate.

## 2.) Bioinformatic data



**Figure S1.** Alignment of SD-like protein sequences from *Lysobacter enzymogenes* C3 (1), *Lysobacter capsici* [ORF2 – Extended construct] (2) and *Saccharophagus degradans* SD-like protein (3) using Geneious default settings with Blosum 62 cost matrix.

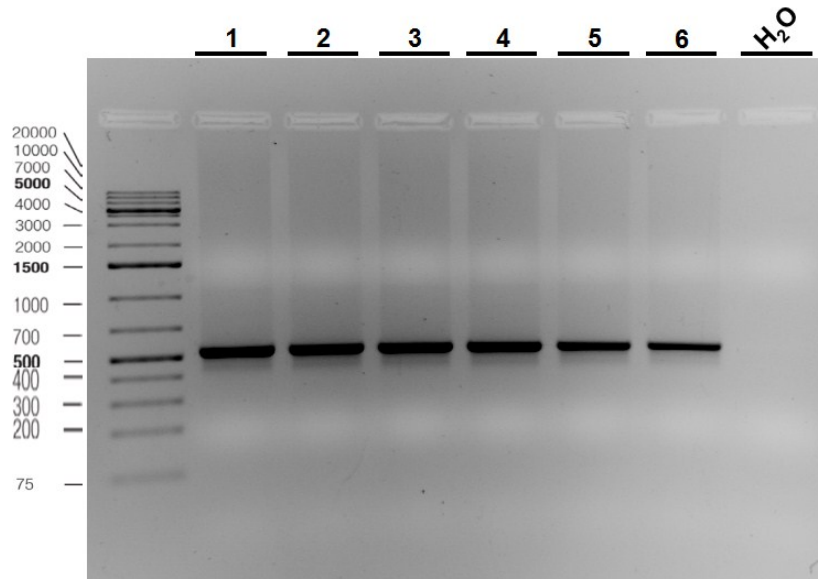
## 3.) Cloning of SD genes

### 3.1 Screening of gDNA samples for SD (*L. capsici*) – Taq-Polymerase

A total 25  $\mu$ L PCR reaction was composed as follows: 2.5  $\mu$ L of tenfold Taq buffer, 1  $\mu$ L DMSO, 0.25  $\mu$ L deoxynucleotide triphosphates (10 mM stock), 0.125  $\mu$ L forward primer (20  $\mu$ M), 0.125  $\mu$ L reverse primer (20  $\mu$ M) (see chapter 3, table S6, row 1 and 2), 19.875  $\mu$ L pure water and 1  $\mu$ L Template DNA (*L. capsici* gDNA, c = 305 ng/ $\mu$ L) were mixed with 0.125  $\mu$ L Taq polymerase. Optimal cycling conditions are depicted in table S1.

**Table S1.**

Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	95	120	
2	95	45	x 34
3	52	30	
4	72	45	
5	72	300	
6	16	$\infty$	



**Figure S2.** PCR screening of 6 samples for the presence of *L. capsici* SD with SD-Capsici For/Rev. The expected amplicon was 526 bp.

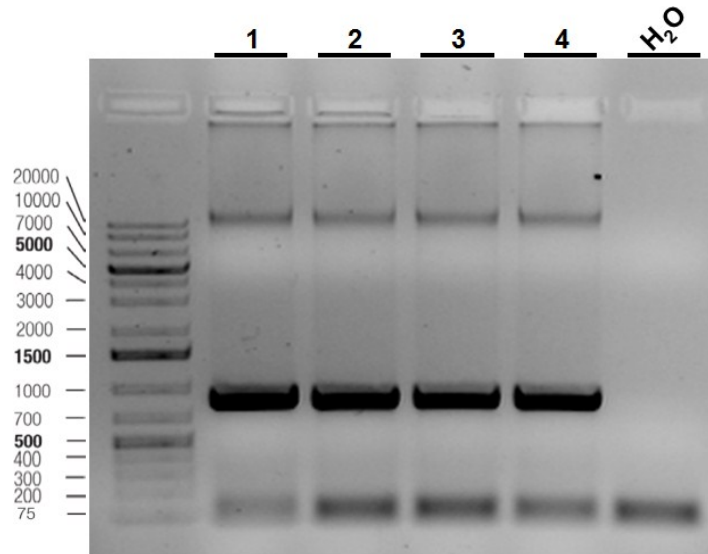
### 3.2 Amplification of SD (*L. capsici*) (ORF1, 810 bp) – Q5 polymerase

A total 25  $\mu$ L PCR reaction was composed as follows: 5  $\mu$ L of fivefold Q5 Reaction Buffer, 0.5  $\mu$ L deoxynucleotide triphosphates (10 mM stock), 0.625  $\mu$ L forward primer (20  $\mu$ M), 0.625  $\mu$ L reverse primer (20  $\mu$ M) (see chapter 3, table S6, row 3 and 5), 17.125  $\mu$ L pure water and 1  $\mu$ L template DNA (*L. capsici* gDNA, c = 305 ng/ $\mu$ L) were mixed with 0.125  $\mu$ L Q5 polymerase (2000 U/mL, NEB). Optimal cycling conditions are depicted in table S2.

**Table S2.**

Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	98	60	
2	98	10	x 30
3	72	20	
4	72	35	
5	72	120	
6	10	$\infty$	





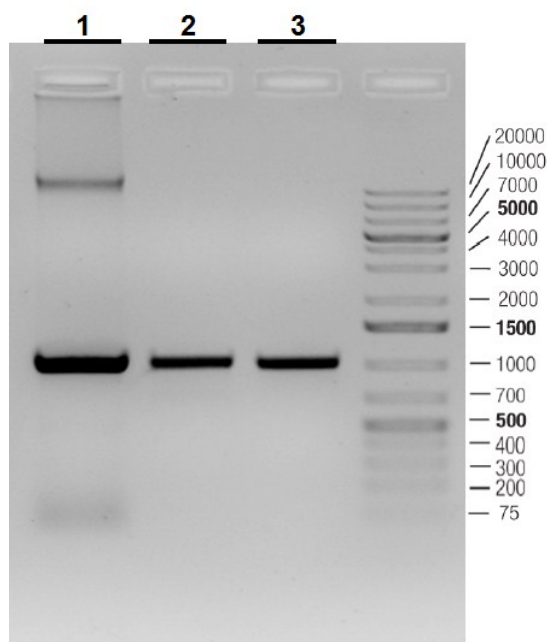
**Figure S3.** PCR amplification of *L. capsici* SD (ORF1, GLIMMER prediction) with *EcoRI* / *HindIII* overhangs (844 bp).

### 3.3 Amplification of SD (*L. capsici*) – (ORF2, 1002bp) – Q5 polymerase

A total 25  $\mu\text{L}$  PCR reaction was composed as follows: 5  $\mu\text{L}$  of fivefold Q5 Reaction Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  deoxynucleotide triphosphates (10 mM stock), 0.625  $\mu\text{L}$  forward primer (20  $\mu\text{M}$ ), 0.625  $\mu\text{L}$  reverse primer (20  $\mu\text{M}$ ) (see chapter 3, table S6, row 4 and 5), 17.125  $\mu\text{L}$  pure water and 1  $\mu\text{L}$  template DNA (*L. capsici* gDNA,  $c = 305 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) were mixed with 0.125  $\mu\text{L}$  Q5 polymerase (2000 U/mL, NEB). Optimal cycling conditions are depicted in table S3.

**Table S3.**

Step	Temperature [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Time [sec]	Cycle nr.
1	98	60	
2	98	10	x 30
3	72	20	
4	72	45	
5	72	120	
6	10	$\infty$	



**Figure S4.** PCR amplification of *L. capsici* SD (ORF2). Lane 1: Crude PCR mix. Lane 2: Gel purified PCR product containing *EcoRI* / *HindIII* overhangs (1035 bp). Lane 3: *EcoRI* + *HindIII* digested PCR product after clean-up (1014 bp).

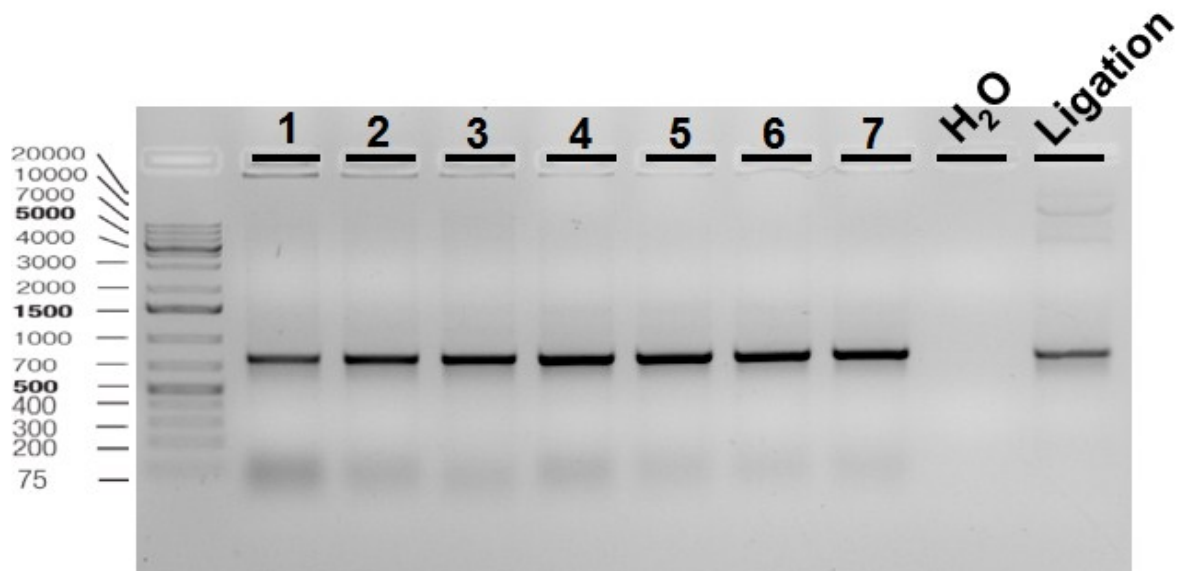
### 3.4 Colony screening PCR

Clones were picked and examined via colony PCR (for conditions, see Table S4) using specific primers (see Table S6) for the amplification of the sterol desaturase gene expected to be located in the respective construct (see Figure S5). Positive hits were further characterized by plasmid isolation followed by end-sequencing to verify the recombined plasmid.

A total 25  $\mu$ L PCR reaction was composed as follows: 2.5  $\mu$ L of tenfold Taq buffer, 1  $\mu$ L DMSO, 0.25  $\mu$ L deoxynucleotide triphosphates (10 mM stock), 0.125  $\mu$ L forward primer (20  $\mu$ M), 0.125  $\mu$ L pET-RP (reverse primer) (20  $\mu$ M) (see chapter 3, table S6, row 1 (*L. capsici*) / 6 (*S. degradans*) and 8), 19.875  $\mu$ L pure water and 1  $\mu$ L Template (bacterial material) were mixed with 0.125  $\mu$ L Taq polymerase. Optimal cycling conditions are depicted in table S4.

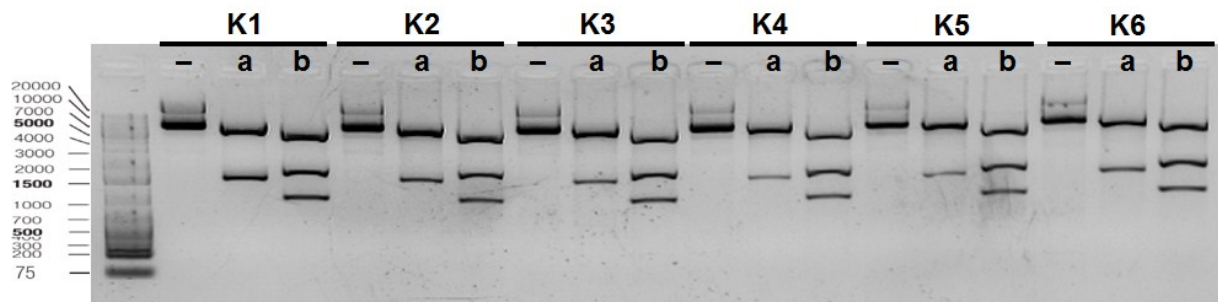
**Table S4.** PCR conditions for colony screening

Step	Temperature [°C]	Time [sec]	Cycle nr.
1	95	300	
2	95	45	x 34
3	47	30	
4	72	60	
5	72	300	
6	16	$\infty$	



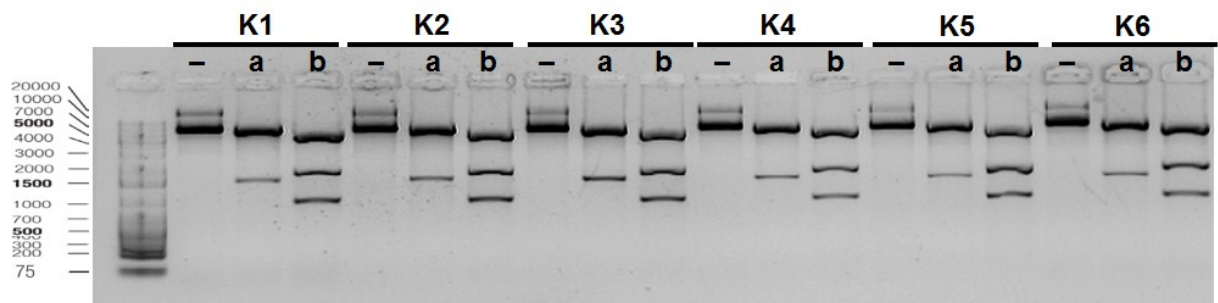
**Figure S5.** Example for a screening PCR of seven *E. coli* DH5 $\alpha$  clones with SD-Capsici for / pET-RP rev. An amplicon of 770 bp was obtained for clones harboring pHis8 / pGS-21a::*L-capsici*\_SD (ORF1/2).

### 3.4.1 Restriction analysis *L. capsici* SD [ORF2] cloned in pHis8



**Figure S6.** Restriction analysis of pHis8::*L-capsici*\_SD\_ORF2 (6328 bp) cut with a) *EcoRI* + *HindIII* (5314 + 1014 bp) and b) *PvuI* (4415 + 1232 + 664 [+17] bp). Undigested plasmid is shown in line (-).

### 3.4.2 Restriction analysis *L. capsici* SD [ORF2] cloned in pGS-21a



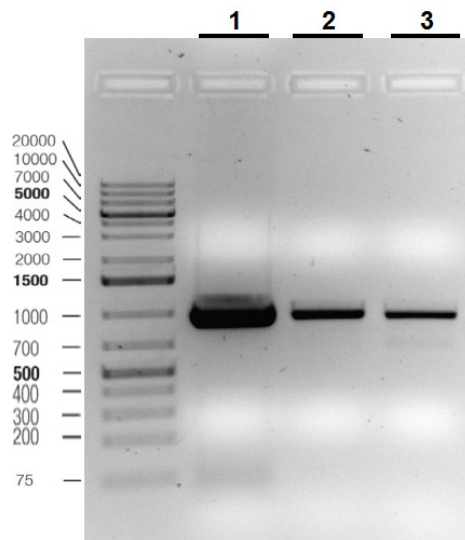
**Figure S7.** Restriction analysis of pGS-21a::*L-capsici*\_SD\_ORF2 (7165 bp) cut with a) *EcoRI* + *HindIII* (6151 + 1014 bp) and b) *PvuI* (5180 + 1304 + 664 [+17] bp). Undigested plasmid is shown in line (-).

### 3.5 Amplification of SD (*S. degradans*) – Q5 polymerase (NEB)

A total 25  $\mu\text{L}$  PCR reaction was composed as follows: 5  $\mu\text{L}$  of fivefold Q5 Reaction Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  deoxynucleotide triphosphates (10 mM stock), 0.625  $\mu\text{L}$  forward primer (20  $\mu\text{M}$ ), 0.625  $\mu\text{L}$  reverse primer (20  $\mu\text{M}$ ) (see chapter 3, table S6, row 6 and 7), 16.125  $\mu\text{L}$  pure water and 2  $\mu\text{L}$  template DNA (fosmid DNA, c = 17.4 ng/ $\mu\text{L}$ ) were mixed with 0.125  $\mu\text{L}$  Q5 polymerase (2000 U/mL, NEB). Optimal cycling conditions are depicted in table S5.

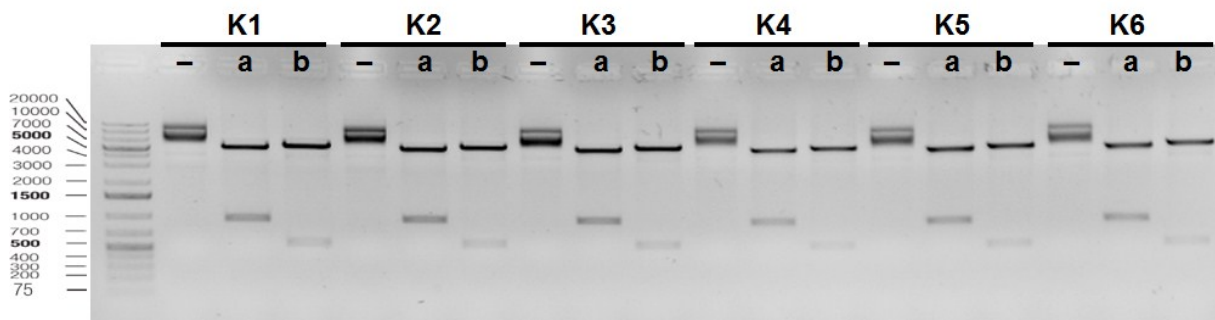
**Table S5.**

Step	Temperature [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Time [sec]	Cycle nr.
1	98	60	
2	98	10	x 30
3	65	20	
4	72	35	
5	72	120	
6	10	$\infty$	



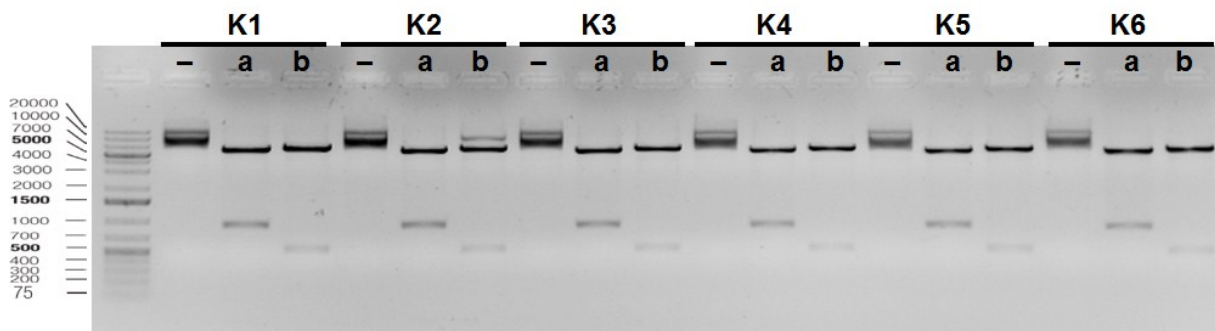
**Figure S8.** PCR amplification of *S. degradans* SD. Lane 1: Crude PCR mix. Lane 2: Gel purified PCR product containing *Bam*HI / *Xho*I overhangs (961 bp). Lane 3: *Bam*HI + *Xho*I digested PCR product after clean-up (945 bp).

### 3.5.1 Restriction analysis SD (*S. degradans*) cloned in pHis8



**Figure S9.** Restriction analysis of pHis8::*S-degradans*\_SD (6238 bp) cut with a) *Bam*HI + *Xho*I (5239 + 945 bp) and b) *Dra*III (5679 + 559 bp). Undigested plasmid is shown in line (-).

### 3.5.2 Restriction analysis SD (*S. degradans*) cloned in pGS-21a



**Figure S10.** Restriction analysis of pHis8::*S-degradans*\_SD (7075 bp) cut with a) *Bam*HI + *Xho*I (6130 + 945 bp) and b) *Dra*III (6516 + 559 bp). Undigested plasmid is shown in line (-).

**Table S6.** List of used primers in this study.

Entry	Primer name	Sequence	Comments	Tm [°C]
1	SD-Capsici For	5' -GTACGCGGTCTACTTCGTGA-3'	Screening primer for <i>L. capsici</i> 's SD-like protein	56.5
2	SD-Capsici Rev	5' -CCAGGTATAGCTGCCGAACA-3'	Screening primer for <i>L. capsici</i> 's SD-like protein	56.9
3	SD-Capsici_ORF1_EcoRI For	5' -CGGAACCTTAGAATTCGGTGGTTATCTACGTAATTGCCGCGA-3'	Cloning primer containing an <i>EcoRI</i> restriction site, GLIMMER predicted frame (ORF1) 810 bp	64.8
4	SD-Capsici_ORF2_EcoRI For	5' -AGAACTTAGAATTCAAACCGGACGCCGGTCGCA-3'	Cloning primer containing an <i>EcoRI</i> restriction site, Extended frame (ORF2) 1002 bp	66.5
5	SD-Capsici_HindIII Rev	5' -ATTCAACAAGCTTAAAGGCTCAGGGCGGCGT-3'	Cloning primer containing a <i>HindIII</i> restriction site, GLIMMER predicted frame	66.5
6	SD_S-degradans_BamHI For	5' -AACTTGGATCCGTGGATACCTTAACTCCCTCAG-3'	Cloning primer containing a <i>BamHI</i> restriction site	64.8
7	SD_S-degradans_XhoI Rev	5' -ACCTTCTCGAGTTACTGGCGGTAGGTAATGTTG-3'	Cloning primer containing a <i>XhoI</i> restriction site	66.5
8	pET-RP	5' -CTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	Screening / Sequencing primer	50.2

#### 4.) *In vivo* and *in vitro* assays

##### 4.1 Heterologous expression experiments - Fermentation of *E. coli* BAP1

The sequenced sterol desaturase pGS-21a-constructs were transformed into electrocompetent *E. coli* BAP1 cells via electroporation. These *E. coli* BAP1 contained the pHis8::Tü6239\_ikaABC construct which incorporates the whole ikarugamycin cluster. The transformed cells were fermented and automatically induced in auto-induction media with 0.05 mg/mL arginine (kanamycin 50 µg/mL and ampicillin 100 µg/mL). The fermentation was carried out for 72 h at 16 °C and 200 rpm in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of auto-induction medium. For the isolation and physico-chemical characterization, the pH of the main culture was adjusted to pH 5.0 with 1N HCl and centrifuged for 10 min at 3,800 rpm. The supernatant was extracted three times with 150 mL ethylacetate. The combined organic phases were concentrated in a rotary evaporator. The pellet was dissolved in 50 mL of a methanol/acetone solution and sonicated in an ultrasonic bath for 15 min. The solvents were removed in vacuo. The raw product was dissolved in 1 mL methanol for the further LC-MS measurement.

##### 4.2 Feeding experiments

100 µL *E. coli* BL21(DE3) pGS-21a::SD (after 15 h incubation with IPTG 1 mM, 16 °C, 200 rpm), 10 µL ikarugamycin (1 mg/mL in methanol, Santa Cruz Biotechnology, Texas), 1 µL ATP (100 mM) and 1 µL NADPH (100 mM) were combined and incubated for 6 h at 30 °C while shaking (350 rpm). Afterwards, 100 µL of pure methanol was added to the cellular mixture. The revealed supernatant after centrifugation for 1 min at 13,000 rpm was used for LC-MS measurement.

### 4.3 *In vitro* conversion assays

100  $\mu$ L of the cell lysate supernatant, prepared from induced *E. coli* BL21(DE3), were spiked with 1  $\mu$ L ATP (100 mM) and 1  $\mu$ L NADPH (100 mM). In control reactions, the supernatants were incubated at 95  $^{\circ}$ C for 10 minutes. Adjacently, 10  $\mu$ L ikarugamycin from a 1 mg/mL concentrated methanolic stock solution were added. After an incubation period of 6 hours at 30  $^{\circ}$ C while shaking (350 rpm), the reactions were quenched by the addition of 110  $\mu$ L methanol. After centrifugation for 1 min at 13,000 rpm, the supernatants were carefully transferred and used for the LC-MS measurements.

The enzymatic reaction with N-GST-SD (*S. degradans*) was composed as follows: 20  $\mu$ L enriched enzyme, 10  $\mu$ L sodium phosphate buffer (1 M, pH 8.0), 1  $\mu$ L ATP (100 mM), 1  $\mu$ L NADPH (100 mM) and 10  $\mu$ L ikarugamycin (c = 1 mg/mL, methanol stock solution) filled up with water to a volume of 100  $\mu$ L. The reaction was incubated at 30  $^{\circ}$ C while shaking (350 rpm) for 12 hours. The reaction was then quenched by the addition of 100  $\mu$ L methanol and subsequent centrifugation for 1 min at 13,000 rpm. The supernatant was used for LC-MS analysis.

### 4.4 Heterologous protein production in *E. coli* and enrichment of N-GST-SD (*S. degradans*)

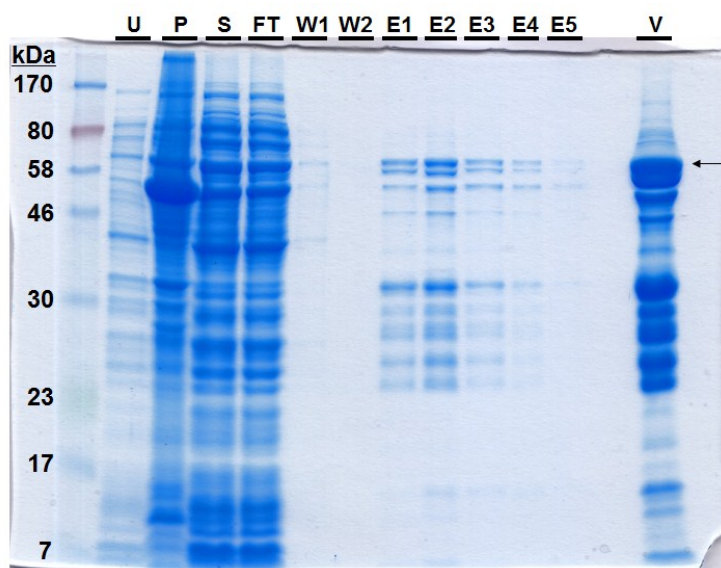
Starter cultures of *E. coli* BL21(DE3) pGS-21a::SD\_ *S-degradans* (5 mL) were grown overnight in Luria broth (Roth) and used to inoculate Terrific broth (Roth), supplemented with 100  $\mu$ g/mL ampicillin. When an OD<sub>600</sub> value of 0.6 was reached, cultures were cooled and protein synthesis was induced by adding 0.5 mM IPTG following an overnight incubation at 16  $^{\circ}$ C and moderate shaking (200 rpm). Alternatively, starter culteres were mixed 1:100 (v/v) with ZYM-5052 auto-induction medium.<sup>2</sup> After cultivation for around 3 hours at 37  $^{\circ}$ C while shaking (200 rpm), cultures were cooled and further incubated at 16  $^{\circ}$ C overnight.

In the following, cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 10 mM imidazol, pH 8.0). After sonification on ice and a subsequent centrifugation (10,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 min), the supernatants were taken and incubated with High Density Nickel Agarose (Jena Bioscience) and moderate shaking for at least 1 hour. This mixture was then applied onto a column, which was washed with lysis buffer (40 mM imidazole, pH 7.5). Finally, the protein was eluted with lysis buffer (250 mM imidazole, pH 7.5).

PD-10 columns (GE Healthcare) were used to exchange the eluate's buffer to 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 supplemented with 10 % glycerol. This protein solution was then concentrated using Vivaspin 2 columns (Sartorius).

Protein concentrations were determined photometrically by the use of the Implen Nanophotometer 330.

Bacterial induction and protein enrichment were monitored by SDS-PAGE analysis (Figure S11).



**Figure S11.** SDS-PAGE analysis for the expression and enrichment of N-GST-SD (*S. degradans*). Samples: uninduced bacteria (U), pellet (P), supernatant (S), flow-through (FT), wash fractions (W1, W2), elution fractions (E1-E5), desalted and concentrated eluate (V).

## 5.) Sequences of investigated PTM hydroxylase genes and corresponding translations

### 5.1 *Lysobacter capsici* DSM 19286

ORF1 – 810 bases (GLIMMER prediction):

```
GTGGTTATCTACGTAATTGCCGCGATCGGCCTGGACTGGGATCCGGGCGCCGCCAGCCTCGGCTTCGTGCTCGCCACCGTCTT
CTATCTGGCGATGCTCGAATTAATCATTTCCGTACGAGCGCGCATGGCTGCCCTCGCGGCGGAGTGGGGCTGTACGCGGTCT
ACTTCGTGATCAGGATGATCGGCGGCGCGCTGGCGCAGCTGCCGGTATGGCGGTGGTGTGATGGTTCGCCCGCTGCATCCG
CTGTTGCCGCTGTGGGCGCAGATCCCGCTCGCGCTGCTGCTGAGCTCGCTGGCGAGCTATGCGGTGCATCGCGCCGGCCACGA
CATCCCGCTGCTGTGGCGGCTGCACGGCGTGCATCAGTGCCTGACAAAGGTCAACGTGGCAACAACGGCGTCAACCACGTGT
TCGACATCGTCTGGCCAGTTCCTGGTGCAGGTGTCGCTGGCGCTGATCGGCTTTTCCGAGCACGCGGTGTTCCGCCGTCGGC
ATCTTCATCATCGCCAGGGCTATTTCTGTCACGCCAATCGACGTGCGCCTGGGCTGGCTCAACCACATCCTCGCCAGCCC
CGAGCTGCACCGCATGCATCACAGCGCCGACAAGGCCGAGGCCGGGCATTTCCGGCTCGGACCTGTGATCTGGGACCGCCTGT
TCGGCAGCTATACCTGGCGGCCGATCGCAAGCCGCGCGGATCGGCCTGTTTCGATCCGGGCTCGTTCGCCGCAACGGCGCG
ATCTTCTCGACCCTCGTCCACCCGCTGCGGCCGCGCAAGAAACCCGCGCCGACGCCGCCCTGA
```

Translation ORF1 – 269 amino acids:

```
MVIYVIAAIGLDWDPGAASLGFVLATVLYLAMELEIIPYERAWLPSRREWGLYAVYFVITMIGGALAQLPVMVSMVAPLPH
LLPLWAQIPLALLLSSLASAVHRAGHDIPLLWRLHGVHHPDKVNVGNNGVNHVFDIVLAQFLVQVSLALIGFSEHAVFAVG
IFIIAQGYFVHANIDVRLGWLNIHILASPELHRMHHSADKAEAGHFGSDLSIWDRLFSGYTWPRDRKPRAIGLFDPGSFPRNGA
IFSTLVHPLRPRKKPAPTPP
```

ORF2 – 1005 bases (Extended construct):

```
ATGAACACGGACGCCGGTCCGAGTTCAAACCTGACGGACACTGCTCAATCCGACCCTGACCCCGACCCGCTTAATATCGCCGG
ATTATCTTTTCGGCGCCGCCGACGGGGTTGAAAACCCAAACCAGGTCACGCCCGCCGGATAAATCCATTGAGCTTTATTAGTT
ATATCGCGCACCCGCTGTTATTAATTTCCGTTGGTTATCTACGTAATTGCCGCGATCGGCCTGGACTGGGATCCGGGCGCCGCC
AGCCTCGGCTTCGTGCTCGCCACCGTCTTCTATCTGGCGATGCTCGAATTAATCATTCGTACGAGCGCGCATGGCTGCCCTC
GCGGCGGAGTGGGGCTGTACGCGTCTACTTCGTGATCAGGATGATCGGCGGCGCGCTGGCGCAGCTGCCGGTGTGGCGG
TGGTGTGATGGTTCGCCCGCTGCATCCGCTGTTGCCGCTGTGGGCGCAGATCCCGCTCGCGCTGCTGCTGAGCTCGCTGGCG
AGCTATGCGGTGCATCGCGCCGGCCACGACATCCCGCTGCTGTGGCGGCTGCACGGCGTGCATCAGTGCCTGACAAAGGTCAA
CGTCGGCAACAACGGCGTCAACCACGTGTTTCGACATCGTCTGGCCAGTTCCTGGTGCAGGTGTCGCTGGCGCTGATCGGCT
TTTCCGAGCACCGGTGTTTCGCCGTCGGCATCTTCATCATCGCCAGGGCTATTTTCGTCACGCCAACATCGACGTGCCGCTG
GGCTGGCTCAACCACATCCTCGCCAGCCCGAGCTGCACCGCATGCATCACAGCGCCGACAAGGCCGAGCCGGGCATTTCCGG
CTCGGACCTGTGATCTGGGACCGCTGTTCCGCGAGCTATACCTGGCGGCCGATCGCAAGCCGCGCGCATCGGCCTGTTTCG
ATCCGGGCTCGTTCGCCGCAACGGCGCGATCTTCTCGACCCTCGTCCACCCGCTGCGGCCGCGCAAGAAACCCGCGCCGACG
CCGCCCTGA
```

Translation ORF2 – 334 amino acids (Extended construct):

```
MNTDAGRSSNLTDTAQSDRDPDPLNIAGLSFGAADGVENPTQVTPARINPLSFISYIAHPLLLISVVIYVIAAIGLDWDPGA
SLGFVLATVLYLAMELEIIPYERAWLPSRREWGLYAVYFVITMIGGALAQLPVMVSMVAPLPHLLPLWAQIPLALLLSSLA
SYAVHRAGHDIPLLWRLHGVHHPDKVNVGNNGVNHVFDIVLAQFLVQVSLALIGFSEHAVFAVGIFIIAQGYFVHANIDVRL
GWLNIHILASPELHRMHHSADKAEAGHFGSDLSIWDRLFSGYTWPRDRKPRAIGLFDPGSFPRNGAIFSTLVHPLRPRKKPAP
PP
```

### 5.2 *Saccharophagus degradans* DSM 17024

ORF – 939 bases:

```
GTGGATACCTTAACCTCCCTCAGATACGCTCGATTACAGGAATAGCTCAAGAACCAACTCCCCGCAAAACAAAAACACCAAGAC
GTTTAGCTTTGACCACTTTGCTACGCCACCTTTGTTACCCGCTACTTATGCTGGCCGTGCTTAACTTATTTATTGGCTTTA
CGTTTGATATCGATTTGGCTTGTGCAACATGGTGTCTGTTGGTAGGCACTATTGCCTACTTAGCGCTGTGCGAGCGGTTAATC
CCCTATAAAAAGCAATGGCACCAACTGCTAAAGAGTGGGGCCGAGACGCTATTTATTTAATTCTCACTATGATGGGTGGTGC
CTCTGCGGTAGCAGTGGTTTTTGAATAGCAGCTGTAGTATCGCCAAAGGAATCTACTTTAGGACTATGGGTAGAAGTGCCCA
TTGCGATTTTGTGCTCAGCTCGCTTGGTTCCTATATTTTCATCGCGCGGGGCACGACATACCTTTTTTTGTGGCGCTTTCATGGT
ATTCACCACGCGGCAGATAAAATAAACGTCAGTAACAACGCCCTAAATCACATAGCAGATGTATTCCGACGCAGGCTGCTCGC
ACAATFACCTTAATACTATTAGGCATTTCTACCCAGCCCTTTTTATTTGTGAGTATTTTAAATACAGCGCAAGGTTATTTTT
CTACGCAAAACCTGACCGTAAAAAATTGGTTGGTTGAACTATATAGTAGCAGCCAGAGCAACATCGTTTACACCATAGTAAA
GATCTCGCCGAGGCCGCCATTTACAGCGTAGATATCACCTGTGGGATTTCTTGTTTAAAAGCTATTTTTGGAAGAAAGGAAA
ACAACCAAGGAAATGGTGTACTAATCGCGCTTCGTTTCCGCCCTCTAATAACATTTGGAAAAATATTTACCCACTGCG
GTCGCAACATTACCTACCGCCAGTAA
```

Translation – 312 amino acids:

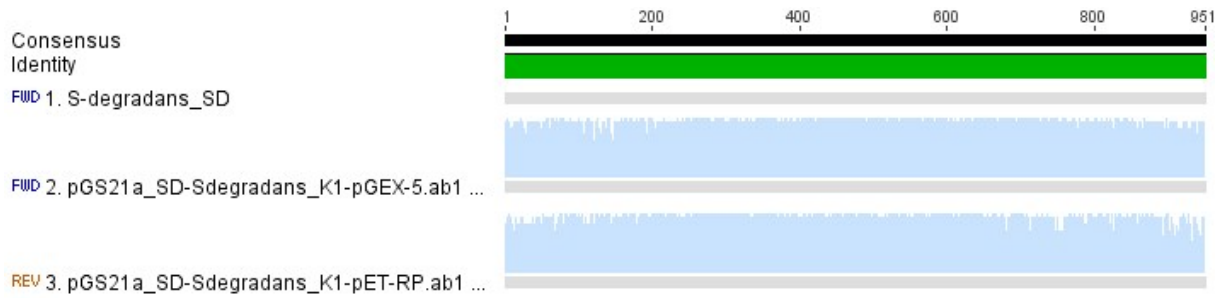
```
MDTLTPSDTLDSGIAQEPTPPQTKNTKTFSFATLLRHLCLYPLMLAVCLTLFIFGTFDIDFGLCNMVFVLTGTYIAYLALCERLI
PYKKQWHPTAKEWRDAIYILITMMGGASAVAVVFAIAAVVSPKESTLGLWVEVPIAILLTLGSLYSIFHRAGHDIPLWRFHG
IHHAADKINVSNNLNHIADVFGRRLLAQLPLILLGISTPALFIVSIFNTAQGYFSHANVDVKIGWLNLYIVGSPEQHRLLHHSK
DLAEAGHFSVDITLWDFLFKSYFWKKGKQPKIEIGVTNRASFPSPSNNIWKNIHPLRRNITYRQ
```



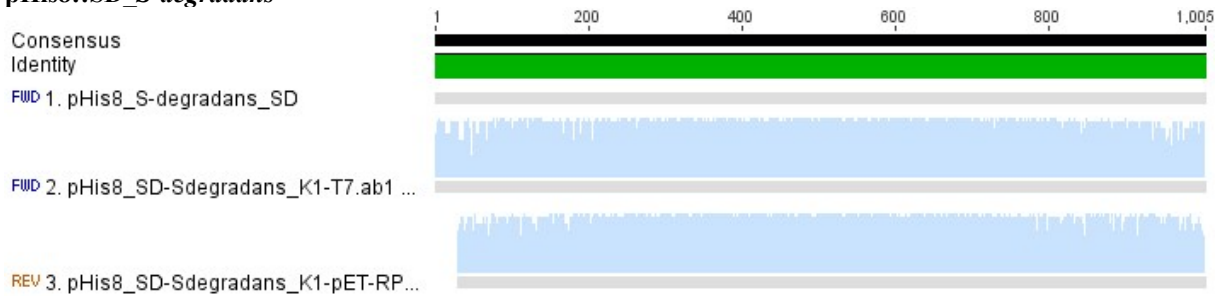
## 6.) Sequencing data of Sterol Desaturase expression vectors

The plasmids' inserts were sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany). The results, obtained as files of the .ab1 type, were analysed using Geneious software version 8.0.x (Biomatters). Alignments to the according reference sequences were performed using Geneious Alignment default settings.

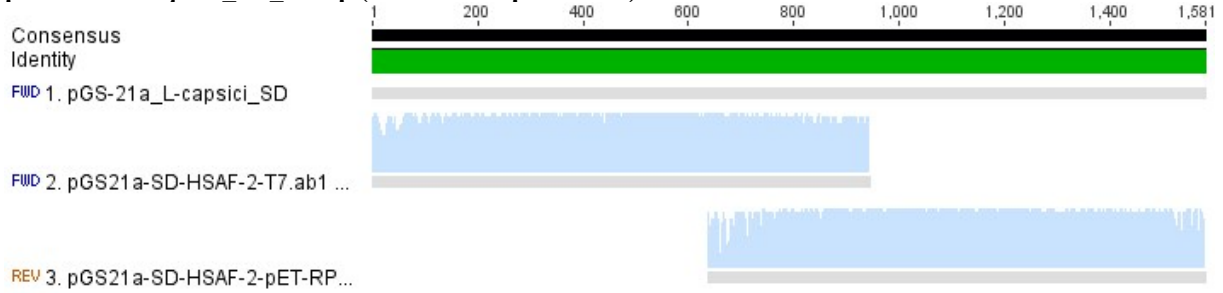
### pGS-21a::SD\_ *S-degradans*



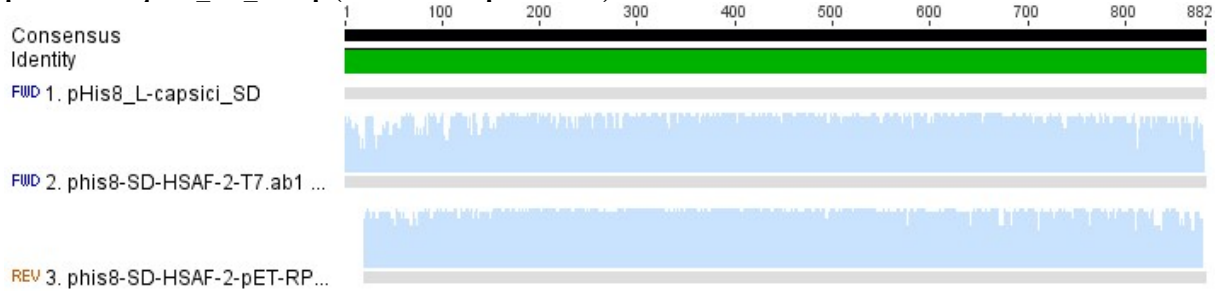
### pHis8::SD\_ *S-degradans*



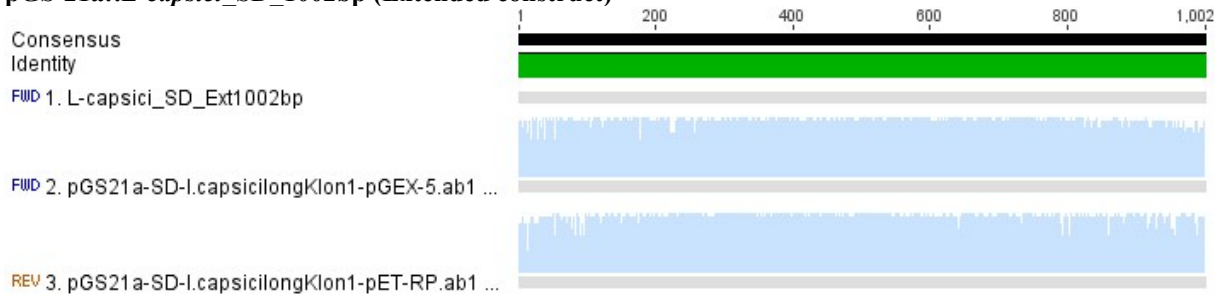
### pGS-21a::*L-capsici*\_SD\_810bp (GLIMMER prediction)



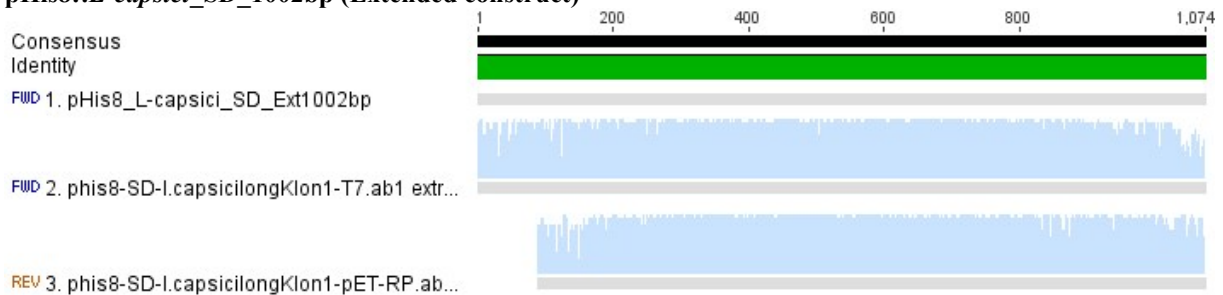
### pHis8::*L-capsici*\_SD\_810bp (GLIMMER prediction)



### pGS-21a::*L-capsici*\_SD\_1002bp (Extended construct)

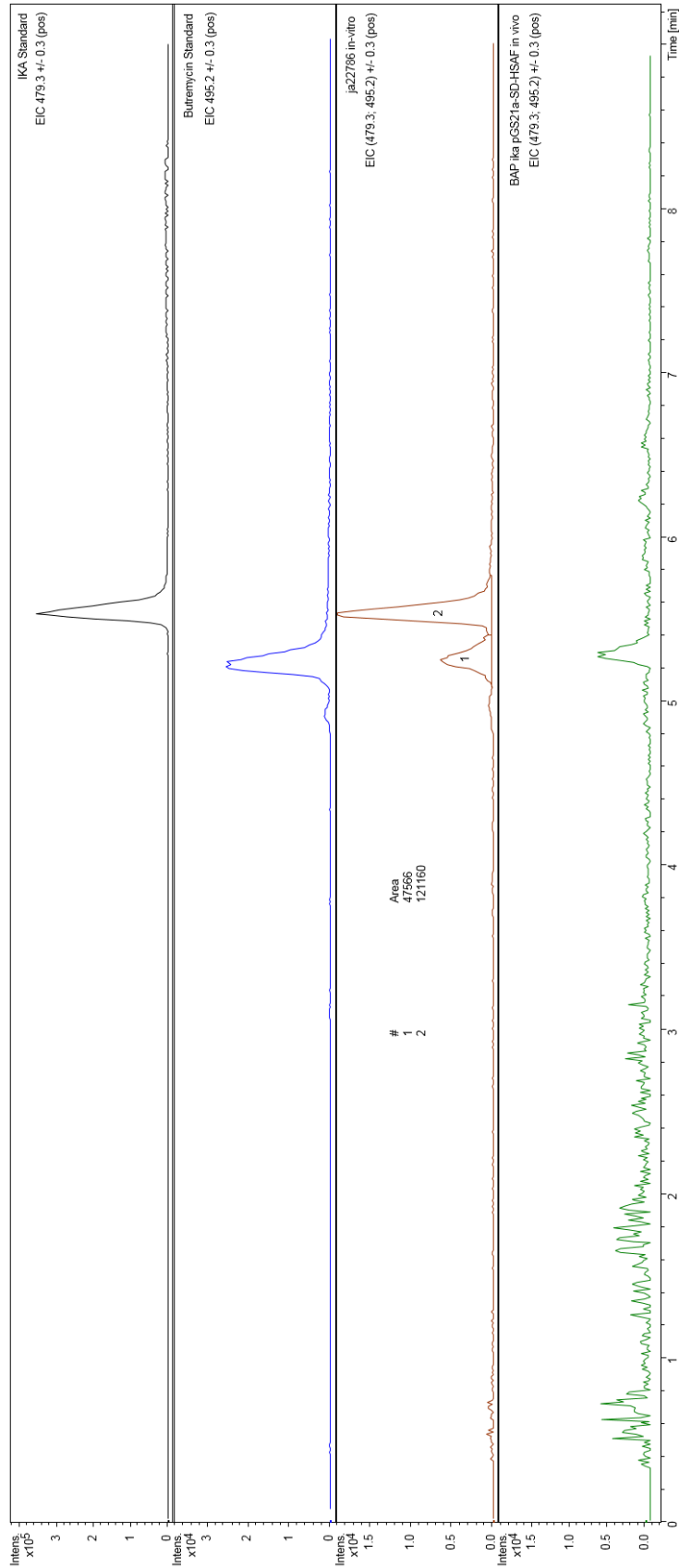


### pHis8::*L-capsici*\_SD\_1002bp (Extended construct)



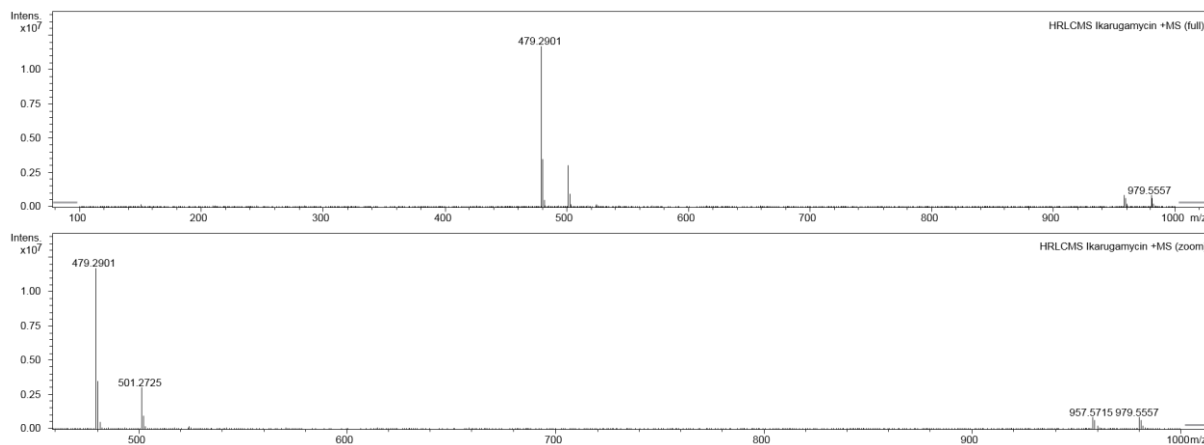
## 7.) LC-MS traces and MS data

7.1) LC-MS traces of ikarugamycin standard (black), butremycin standard (blue), production of butremycin in vitro (orange) and in vivo (green)



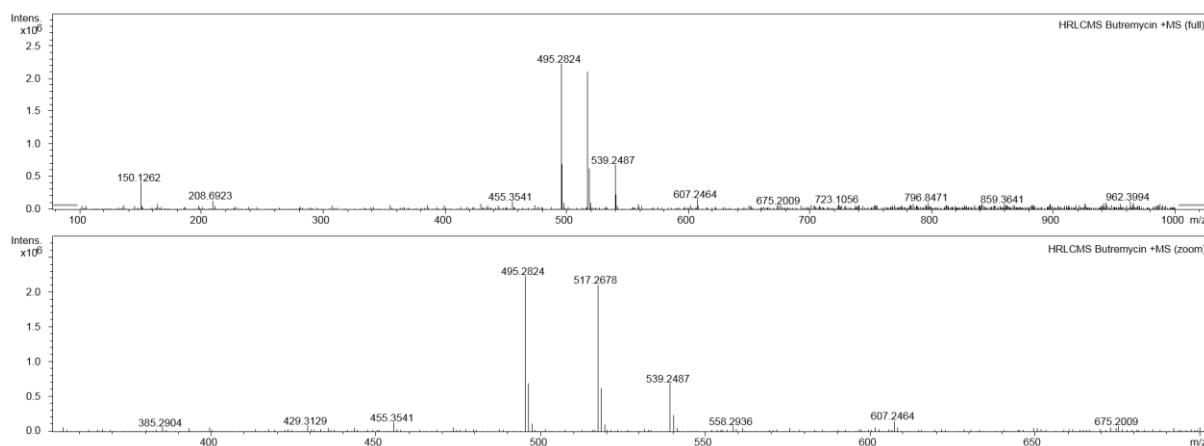
### 7.2) HR/MS data of ikarugamycin

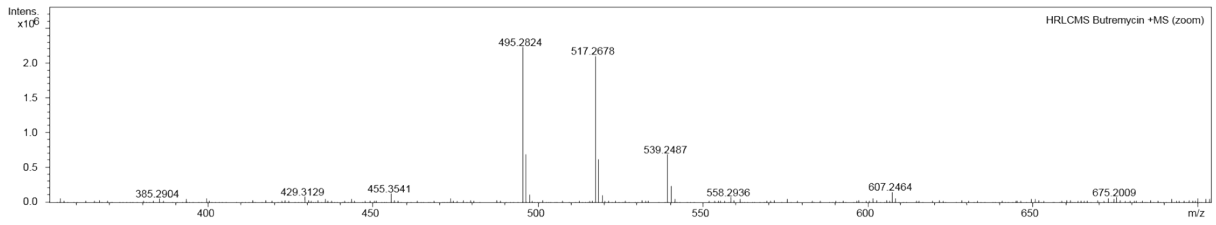
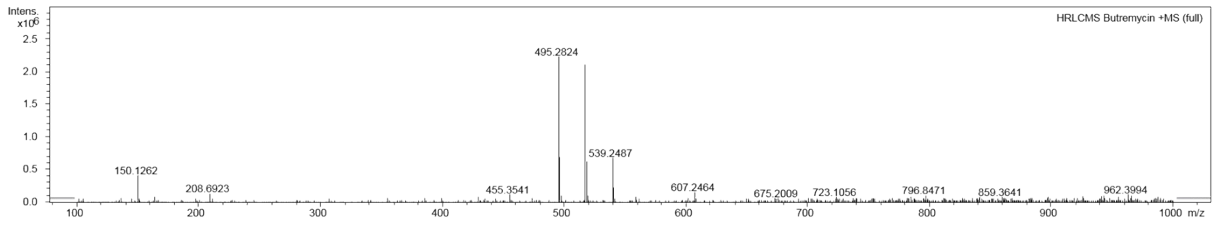
(calculated values:  $[M+H]^+ = 479.2904$ ;  $[M+Na]^+ = 501.2724$ ;  $[2M+H]^+ = 957.5736$ ;  $[2M+Na]^+ = 979.5555$ ).



### 7.3) HR/MS data of butremycin

(calculated values:  $[M+H]^+ = 495.2853$ ;  $[M+Na]^+ = 517.2673$ ;  $[M-H+2Na]^+ = 539.2498$ ).

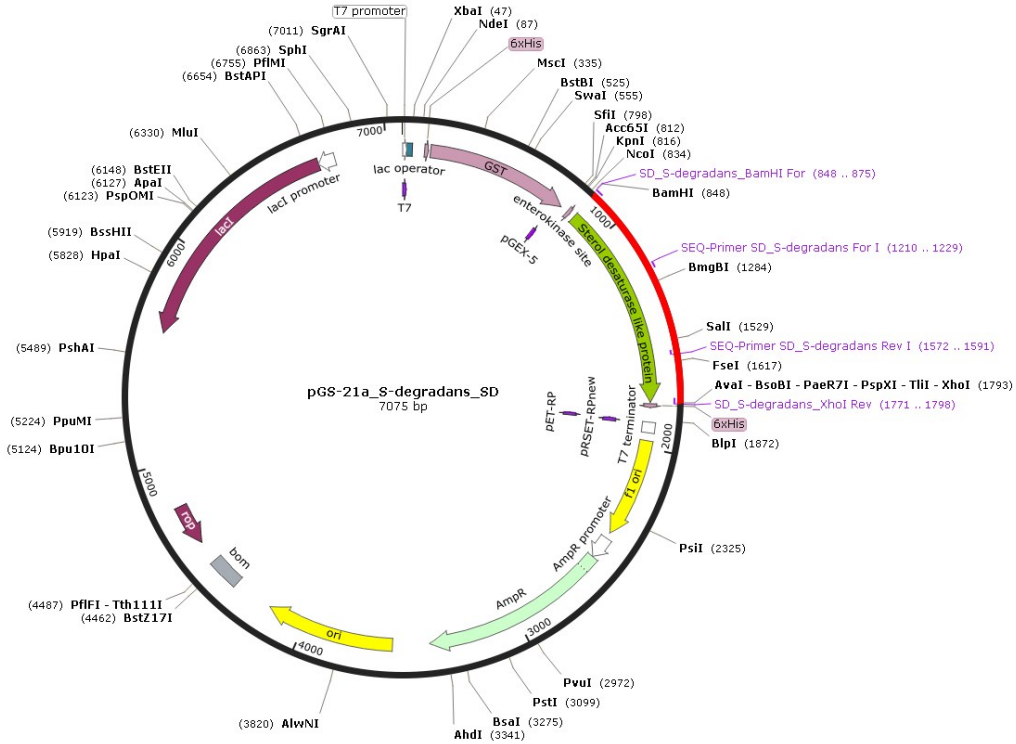




## 8.) Vector maps

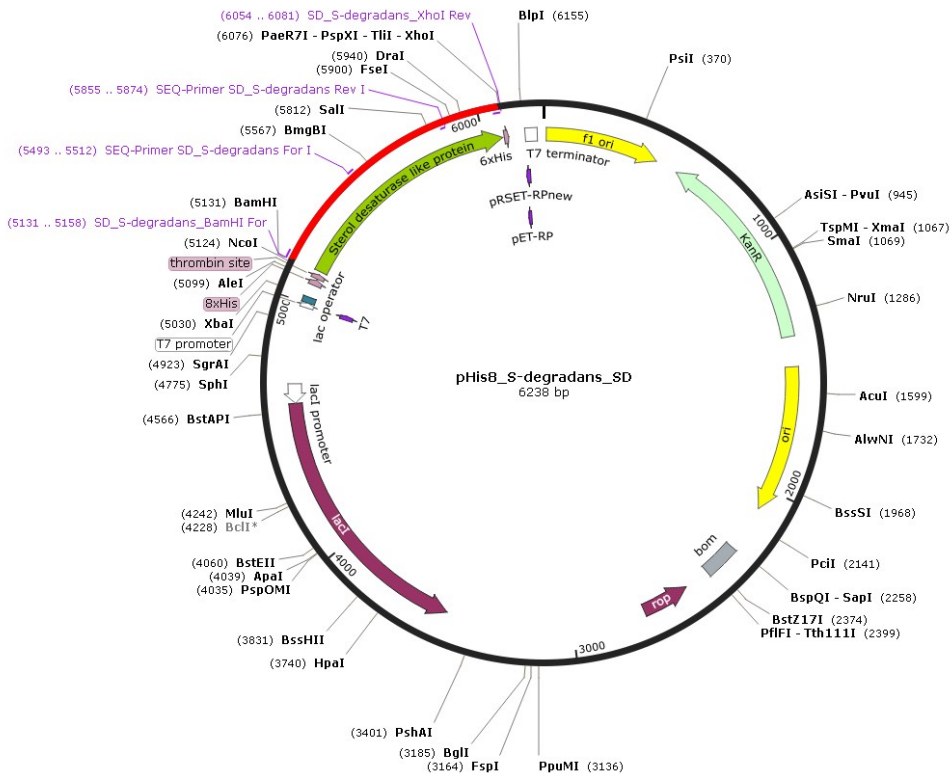
### pGS-21a::SD\_S-degradans [7075 bp]

Created with SnapGene®



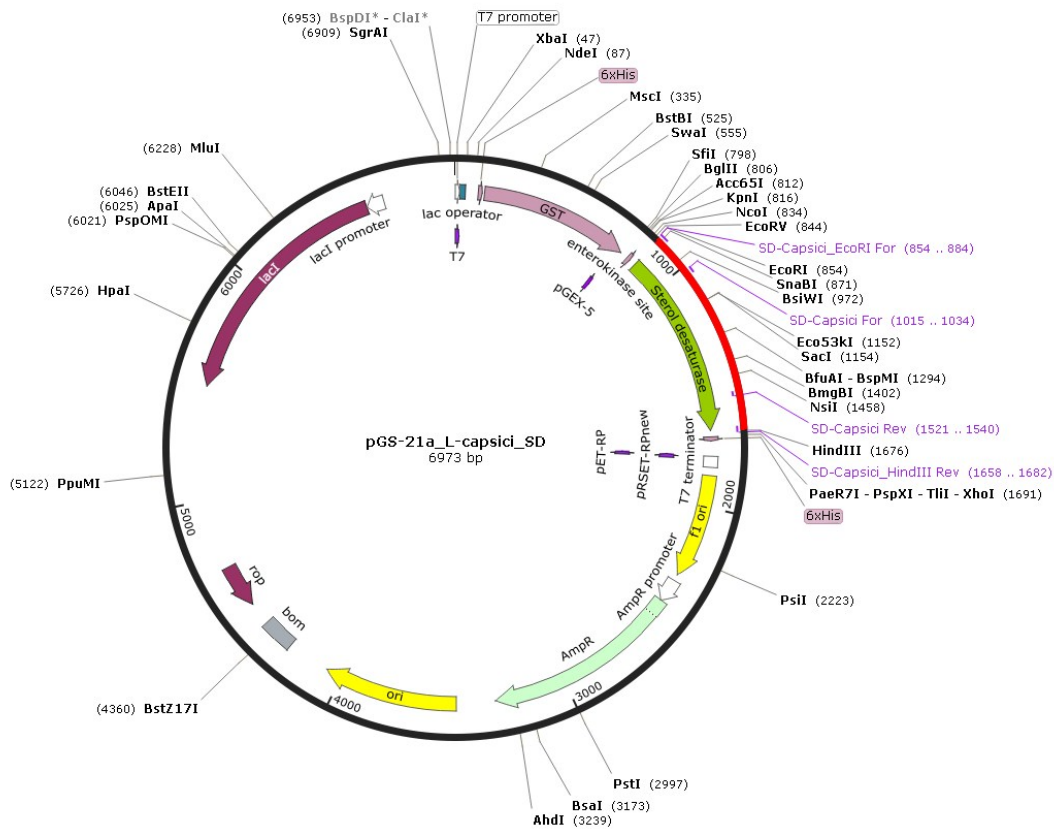
### pHis8::SD\_S-degradans [6238 bp]

Created with SnapGene®



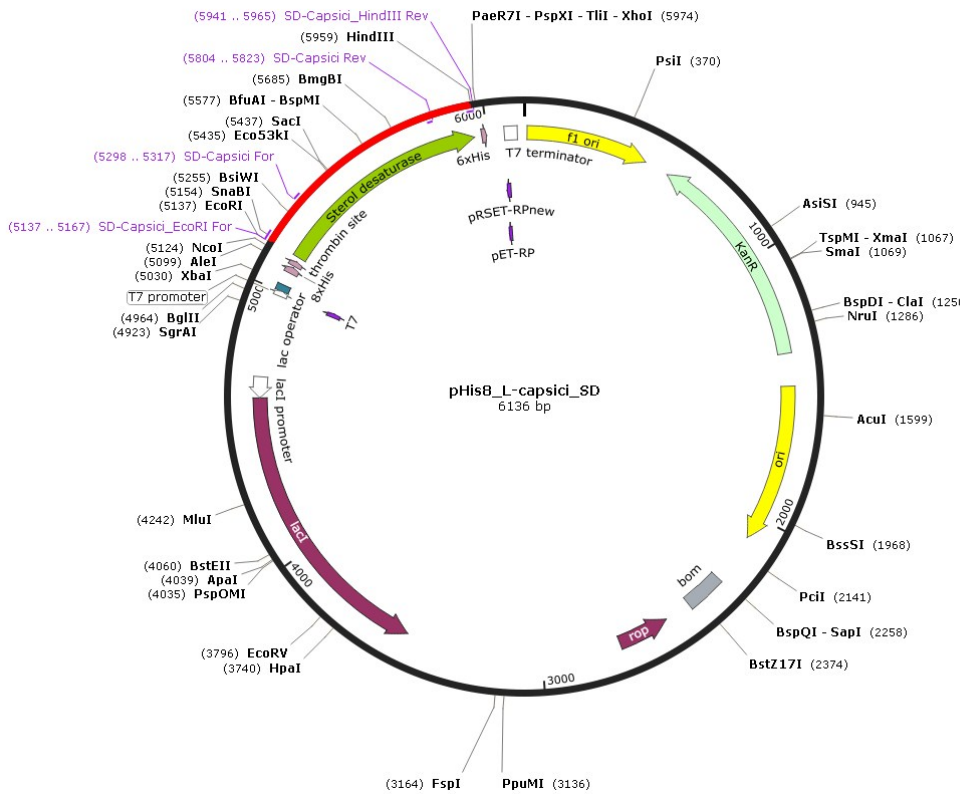
**pGS-21a::L-capsici\_SD\_810bp (GLIMMER prediction) [6973 bp]**

Created with SnapGene®



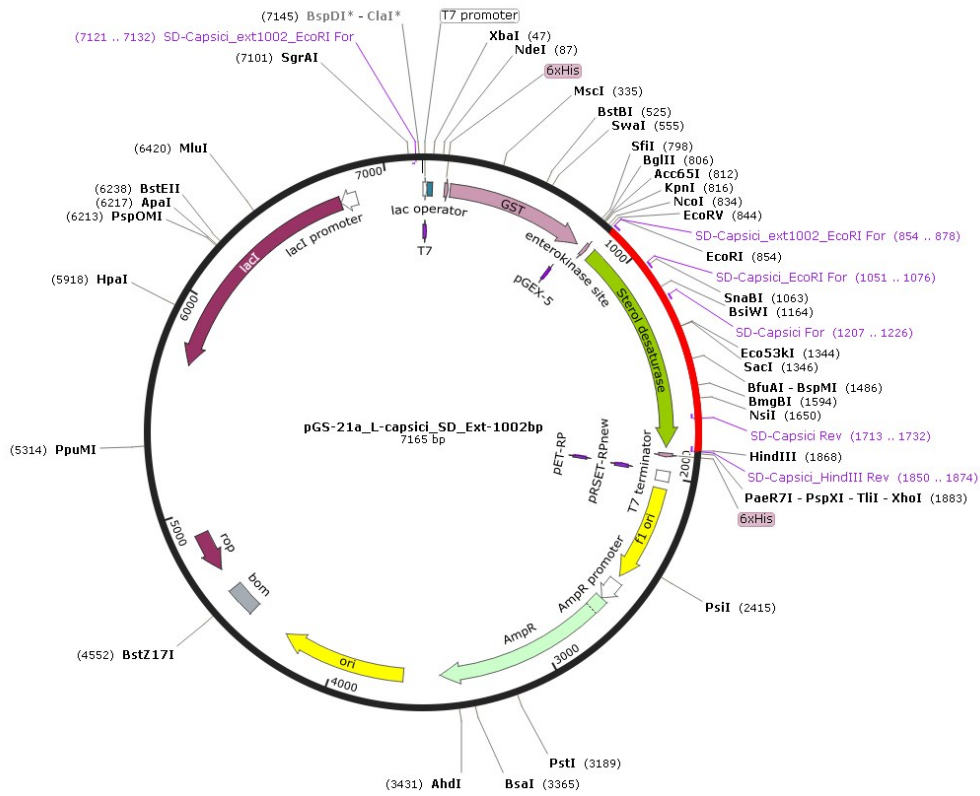
**pHis8::L-capsici\_SD\_810bp (GLIMMER prediction) [6136 bp]**

Created with SnapGene®



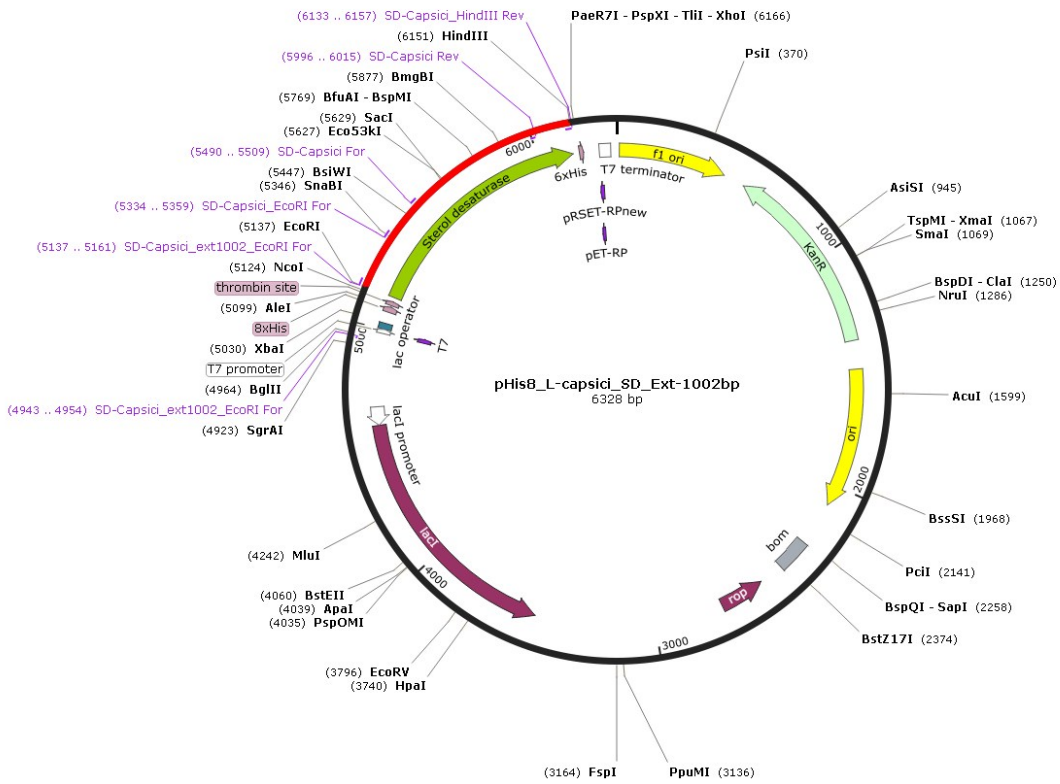
### pGS-21a::L-capsici\_SD\_1002bp (Extended construct) [7165 bp]

Created with SnapGene®



### pHis8::L-capsici\_SD\_1002bp (Extended construct) [6328 bp]

Created with SnapGene®





## 9.) References

1. Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, Cane DE, Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of E-coli. *Science* 2001, **291**(5509): 1790-1792.
2. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express Purif* 2005, **41**(1): 207-234.
3. Antosch J, Schaefer F, Gulder TA. Heterologous reconstitution of ikarugamycin biosynthesis in E. coli. *Angewandte Chemie (International ed in English)* 2014, **53**(11): 3011-3014.

### 7.3 Experimentelle Details zu unveröffentlichten Ergebnissen aus dem PTM-Projekt (vgl. 4.1.3)

#### 7.3.1) Heterologe Expression weiterer PTM-Cluster

##### 7.3.1.1) Generelle Instruktionen

##### 7.3.1.2) Bioinformatische Daten

##### 7.3.1.3) Heterologe Expression in *E. coli* BAP1

##### 7.3.1.4) Fermentation von *S. arenicola* und *S. arenicola*-Knock-out-Mutanten

##### 7.3.1.5) Fermentation von *L. capsici*

##### 7.3.1.6) Extraktion der Fermentationslösung

##### 7.3.1.7) MS-Spektren

### 7.3.1.1) Generelle Instruktionen

Für die heterologen Expressionsversuche wurde *E. coli* BAP1 genutzt. Der Stamm *S. arenicola* und dessen Knockout-Mutanten, sowie das pCC1FOS-basierte Fosmid, welches das putative *S. arenicola*-Cluster trägt, stellte uns freundlicherweise Prof. Dr. Bradley Moore vom Scripps Institution of Oceanography in San Diego zur Verfügung. Dieses Fosmid wurde zur Fermentation mittels Elektroporation (siehe 7.1 Nr.1.2) in *E. coli* BAP1 transformiert. Die Knockout-Mutanten entstanden mit Hilfe der REDIRECT-Technologie.<sup>132</sup> Die Bezeichnung repräsentiert das jeweilig deletierte Gen aus dem putativen PTM-Cluster, dabei entspricht  $\Delta 2406$  einem hypothetischen Protein,  $\Delta 2407$  einem PKS-NRPS-Modul,  $\Delta 2408$  einer FAD-abhängigen Oxidoreduktase und  $\Delta 2409$  einer Alkohol-Dehydrogenase. Die Bestellung von *Lysobacter capsici* DSM 19286 erfolgte bei der DSMZ. *E. coli* EPI300 -TR1 (Epicentre) wurde verwendet, um eine pCC1FOS-basierte genomische Bibliothek von *L. capsici* zu erzeugen. Die Herstellung der genomischen Bibliothek wurde im Anhang 7.1 beschrieben. Alle Arbeiten mit *E. coli* wurden auf LB-Agar oder in LB-Flüssigmedien (Carl Roth) mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion durchgeführt. Die heterologe Expression in *E. coli* BAP1 wurde entweder durch die Zugabe von 1 mM IPTG in das LB-Medium induziert oder mit Hilfe von Autoinduktionsmedium gestartet: pro 50 mL wurden 46 mL ZY Medium (10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 925 mL H<sub>2</sub>O), 0,5 mg Arginin, 50  $\mu$ L Magnesiumsulfat-Lösung (24,65 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 13,84 g MgSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, in 100 mL H<sub>2</sub>O), 1 mL 50 x 5052-Lösung (250 g Glycerin, 100 g  $\alpha$ -Lactose, 25 g Glucose, 730 mL H<sub>2</sub>O) und 2,5 mL 20 x NPS-Lösung (142 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 136 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 66 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, in 900 mL H<sub>2</sub>O) eingesetzt.

#### 7.3.1.1.1) Isolierung von genomischer DNA

Für die genomische DNA-Isolierung wurden 0,5 mL Kryokultur (siehe 7.3.1.1.3) beziehungsweise 1x1 cm<sup>2</sup> Sporen, von einer Agarplatte, in je 25 mL A1-Medium für *S. arenicola* und 25 mL TSB-Medium für *L. capsici* inokuliert und für drei Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zusammensetzung der Medien wird für das A1-Medium unter 7.3.1.4 und für das TSB-Medium unter 7.3.1.5 beschrieben. Die gDNA-Isolierung erfolgte mit dem Bakterien-DNA-Präparation-Kit von Jena Bioscience. Die präzipitierte gDNA wurde in 75  $\mu$ L Elutionspuffer resuspendiert.

#### 7.3.1.1.2) Isolierung von Fosmiden

Die *E. coli*-Klone mit den entsprechenden Fosmiden wurden als Einzelkolonie in LB mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz über Nacht inkubiert und mit dem peqGOLD Miniplasmid-Isolations-Kit I (Peqlab) folgend der Anweisungen im Hersteller-Protokoll isoliert.

### 7.3.1.1.3) Herstellung der Kryo-Stocklösung von *S. arenicola* und *L. capsici*

*L. capsici* wurde als gefriergetrocknete Kultur von der DSMZ erhalten und in 20 mL 1/10 TSB-Medium gelöst. *S. arenicola*-Sporen wurden in 20 mL A1-Medium resuspendiert. Nach fünf Tagen Inkubation bei 30 °C und 180 rpm wurden 800 µL der Bakteriensuspension mit 800 µL Kryo-Lösung (20 g Saccharose, 10 g Glucose, 70 mL rH<sub>2</sub>O) versetzt und bei – 80 °C eingefroren.

### 7.3.1.1.4) HPLC-MS Analyse

HPLC-MS-Analysen wurden unter Verwendung eines Agilent 1200-Serie HPLC-Systems mit einem MicroQ-TOF-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH) gekoppelt und einer Apollo-ESI-Quelle durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte durch die Software Hystar (Bruker) und die interne Kalibrierung mit Natriumformiat. Die Massengenauigkeit betrug 5 ppm. Die Interpretation der Ergebnisse entstand mit der Bruker-Datenanalyse-Software (Version 4.0). Die chromatographische Trennung wurde auf einer Eurospher-II C-8 HPLC-Säule (100 x 3 mm, 5 µm Partikelgröße) unter Verwendung des folgenden Gradienten mit Wasser (A) und Acetonitril (B) als Eluenten, beide mit 0.05 % TFA gepuffert, durchgeführt: Gradient von 0 bis 10 min von 40 % auf 100 % B bei 1 mL/ min, bis 14 min bei 100 % B und ab 14.5 min auf 40 % B bis 18 min, bei einer erhöhten Flussrate von 3 mL/ min.

### 7.3.1.2) Bioinformatische Daten

Sequenzalignments wurden mit GENEIOUS Pro (Version 8.1.6) erstellt. Die paarweise Nukleotid-Identität der PTM-Cluster von *Lysobacter enzymogenes* C3 und *Lysobacter capsici* liegt zwischen 72.4 % bei der Sterol-Desaturase (PTM-Hydroxylase auch genannt, grau markiertes Gen) und 87.6 % bei der FAD-abhängigen Oxidoreduktase (grün markierte Gene). Dabei zeigt der schwarze, durchgezogene Balken homogene Sequenzbereiche zwischen den beiden Clustern im Sequenzalignment an (Abbildung 39).

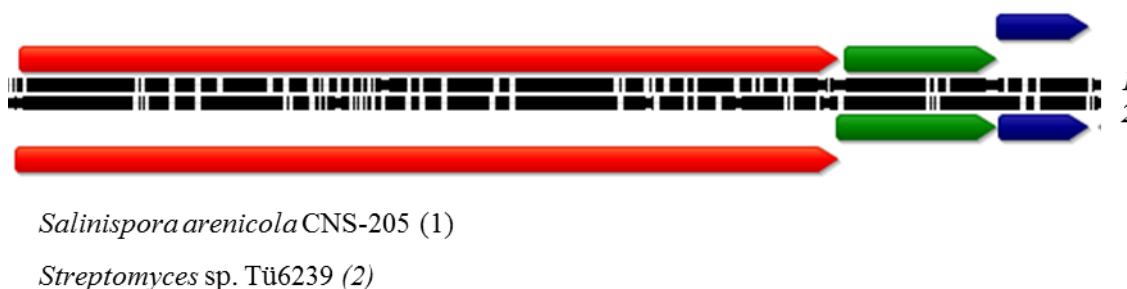


*Lysobacter enzymogenes* C3 (1)

*Lysobacter capsici* (2)

**Abbildung 39.** Nukleotid-Identität der PTM-Cluster von *Lysobacter enzymogenes* C3 (1) und *Lysobacter capsici* (2). Der Farbcode entspricht: Grau: Sterol-Desaturase (PTM-Hydroxylase); rot: PKS-NRPS; grün: FAD-abhängige Oxidoreduktase; blau: Alkohol-Dehydrogenase. Die Lücken in den schwarzen Linien zeigen Differenzen ab drei Basenpaaren in der Sequenzhomologie an.

Die paarweise Nukleotid-Identität der PTM-Cluster von *Streptomyces* sp. Tü6239 und *Salinispora arenicola* liegt zwischen 68.3 % bei der FAD-abhängigen Oxidoreduktase bis 72.4 % bei dem PKS-NRPS-Modul (Abbildung 40).



**Abbildung 40.** Nukleotid-Identität der PTM-Cluster von *Salinispora arenicola* CNS-205 (1) und *Streptomyces* sp. Tü6239 (2). Der Farbcode entspricht: Rot: PKS-NRPS; grün: FAD-abhängige Oxidoreduktase; blau: Alkohol-Dehydrogenase. Die Lücken in den schwarzen Linien zeigen Differenzen ab drei Basenpaaren in der Sequenzhomologie an.

### 7.3.1.3) Fermentation von *E. coli* BAP1

Die Fosmide wurden durch Elektroporation (siehe Anhang 7.1 Nr. 1.2) in elektrokompente *E. coli* BAP1-Zellen transformiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im 250 mL Erlenmeyerkolben bis zu einer  $OD_{600}$  (optische Dichte bei 600 nm) von 0.4 – 0.8 bei 37 °C und 200 rpm. Anschließend wurde die Temperatur auf 16 °C herabgesetzt und die Zellen für weitere 72 h bei 200 rpm geschüttelt. Die Induktion fand automatisch durch die Anzucht im Autoinduktionsmedium mit 12.5 µg/mL Chloramphenicol statt.

### 7.3.1.4) Fermentation des *S. arenicola* Wildtyps und von Knock-out-Mutanten

Die Fermentation des *E. coli* BAP1-Klons mit dem pCC1FOS-basierten-Fosmid von *S. arenicola* wurde wie in Punkt 7.3.1.3 beschrieben durchgeführt. Der *S. arenicola*-Wildtyp-Stamm und die entsprechenden Knock-out-Mutanten wurden in modifiziertem A1-Medium (10 g Kartoffelstärke, 4 g Hefeextrakt, 2 g Pepton, 1 g  $CaCO_3$ , 37.352 g Marine Medium (Zobell), 5 mL Eisensulfat x 7  $H_2O$  (14.63 g/L), 5 mL Kaliumbromid (20 g/L), pH 7.2 mit NaOH) bei 28 °C und 250 rpm inkubiert.<sup>133</sup> Dem Medium der Knock-out-Mutanten wurde zusätzlich Apramycin (200 µg/mL) hinzugefügt. Die Erstellung einer Vorkultur erfolgte mit *S.arenicola*-Sporen in 20 mL modifiziertem A1-Medium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben für drei Tage bei 28 °C und 200 rpm. Im Verhältnis 1:4 wurde die Vorkultur zu einer 250 mL Hauptkultur in einem 500 mL Erlenmeyerkolben zugegeben. Nach sieben Tagen bei 28 °C und 220 rpm endete die Fermentation. Die Aufarbeitung vollzog sich wie unter 7.3.1.6 beschrieben. Analysiert wurden die Extrakte mittels LC-MS.

### 7.3.1.5) Fermentation von *L. capsici*

Die Fermentation des *E. coli* BAP1-Klons mit dem pCC1FOS-basierten-Fosmid von *L. capsici* wurde wie in Punkt 7.3.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Fermentation des Wildtyps erfolgte in 250 mL TSB-Medium (17 g Bacto-Trypton, 3 g Bacto-Soyton, 2.5 g Glucose, 5 g NaCl, 2.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3) in einem 500 mL Erlenmeyerkolben. Das Medium wurde vorab im Verhältnis 1:10 verdünnt, da nach Du et al. nur in verdünntem Medium eine HSAF-Produktion beobachtet werden konnte.<sup>82</sup> Die Fermentation endete nach vier Tage bei 28 °C und 180 rpm. Die Fermentationslösung wurde wie unter 7.3.1.6 beschrieben aufgearbeitet und mittels LC-MS untersucht.

### 7.3.1.6) Extraktion der Fermentationslösung

Zur Isolierung und physikalisch-chemischer Charakterisierung der Extrakte wurde der pH-Wert der Hauptkultur auf pH 5 mit 1 N HCl eingestellt und zehn Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert. Die Extraktion des Überstands erfolgte dreimal mit je 150 mL Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt. Das Pellet wurde in 50 mL einer Methanol/Aceton-Lösung gelöst und in einem Ultraschallbad für 15 min mit Ultraschall behandelt. Die Entfernung der Lösungsmittel fand mittels Rotationsverdampfer statt. Das Rohprodukt wurde für weitere LC-MS-Messungen in 1 mL Methanol gelöst.

### 7.3.1.7) MS-Spektren

Abgebildet sind die MS-Spektren mit den entsprechenden Retentionszeiten für Maltophilin (**24**) und HSAF (**25**), bekannt aus *L. enzymongenes* C3, aus den Extrakten von *L. capsici* und *E. coli* BAP1 PTM-Fosmid *L. capsici*.

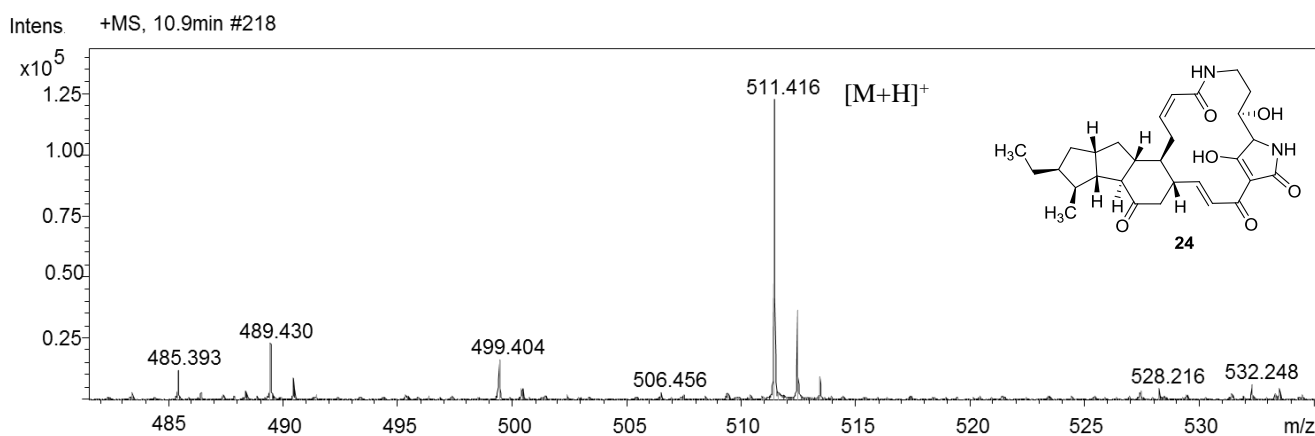
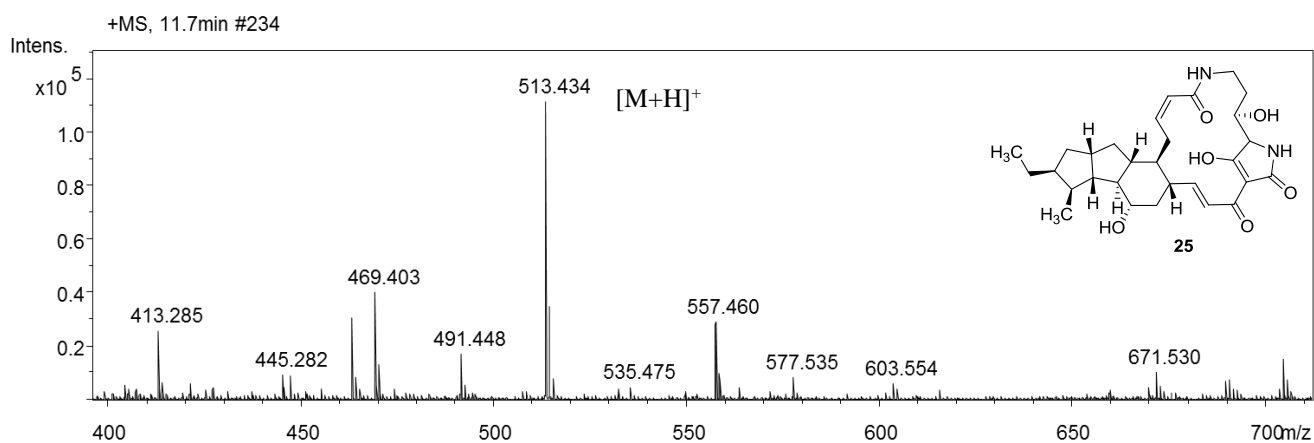
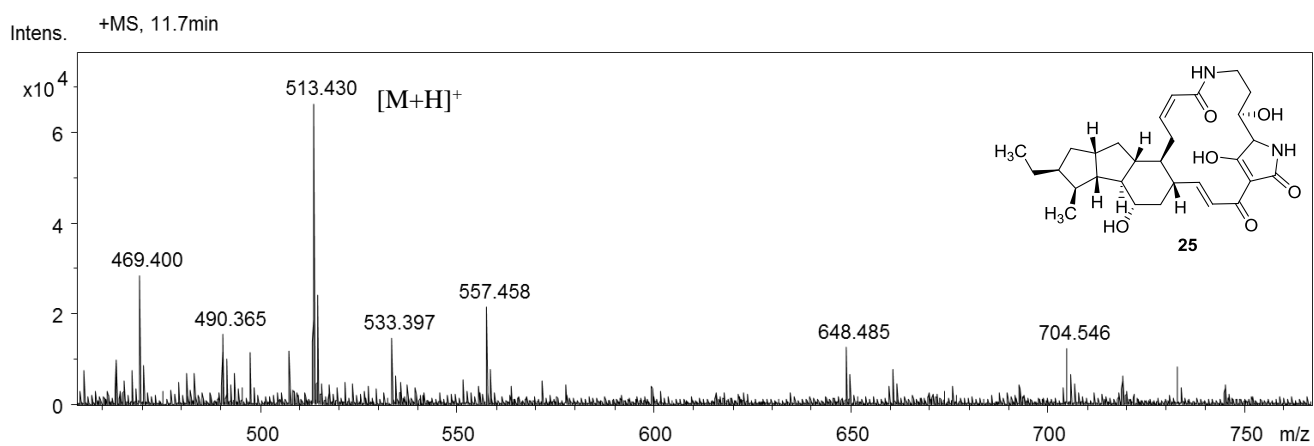


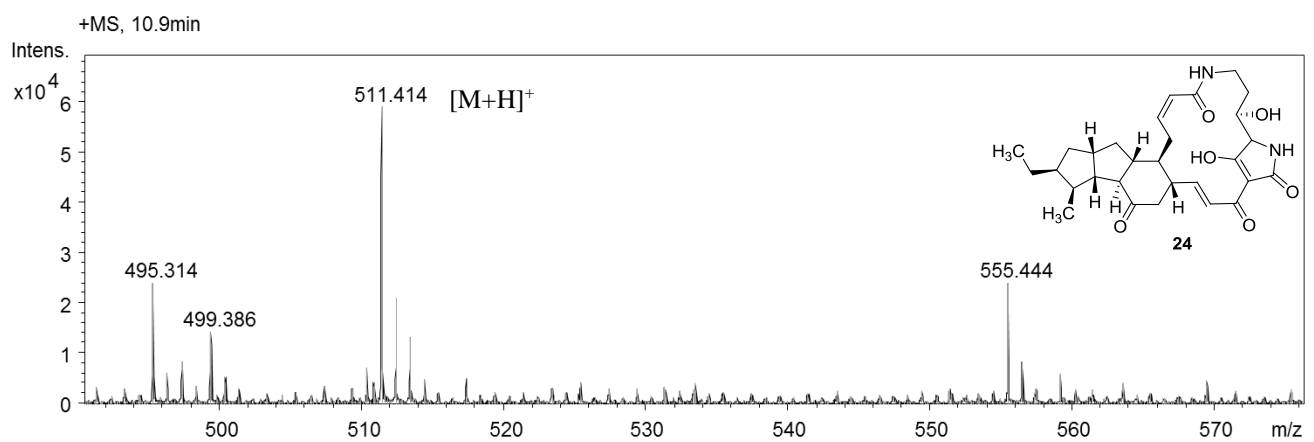
Abbildung 41. Wildtyp-Extrakt von *L. capsici* (Maltophilin (**24**), 511.4 [M+H]<sup>+</sup>).



**Abbildung 42.** Wildtyp-Extrakt von *L. capsici* (HSAF (**25**), 513.4 [M+H]<sup>+</sup>).

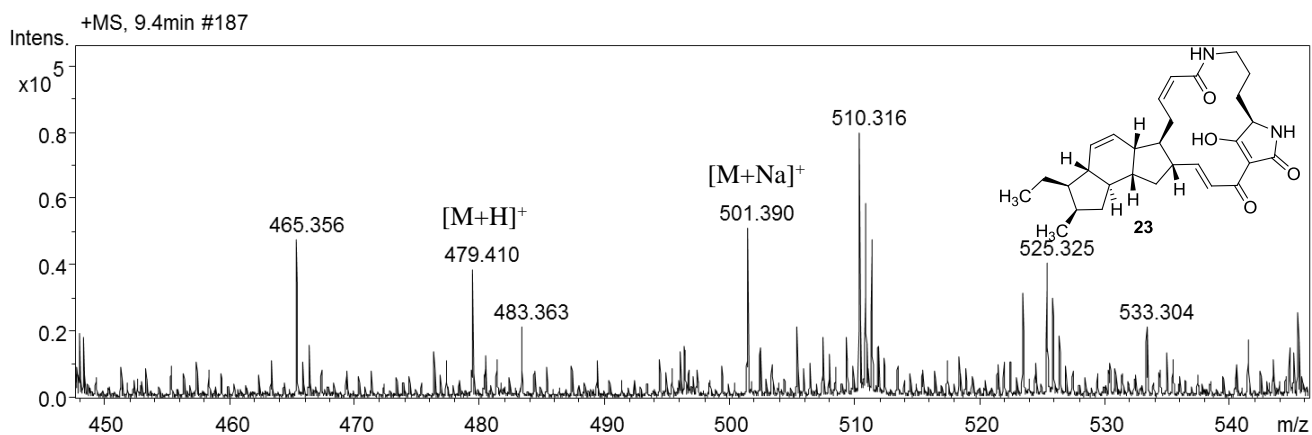


**Abbildung 43.** Extrakt von *E. coli* BAP1 PTM-Fosmid aus *L. capsici* (HSAF (**25**), 513.4 [M+H]<sup>+</sup>).

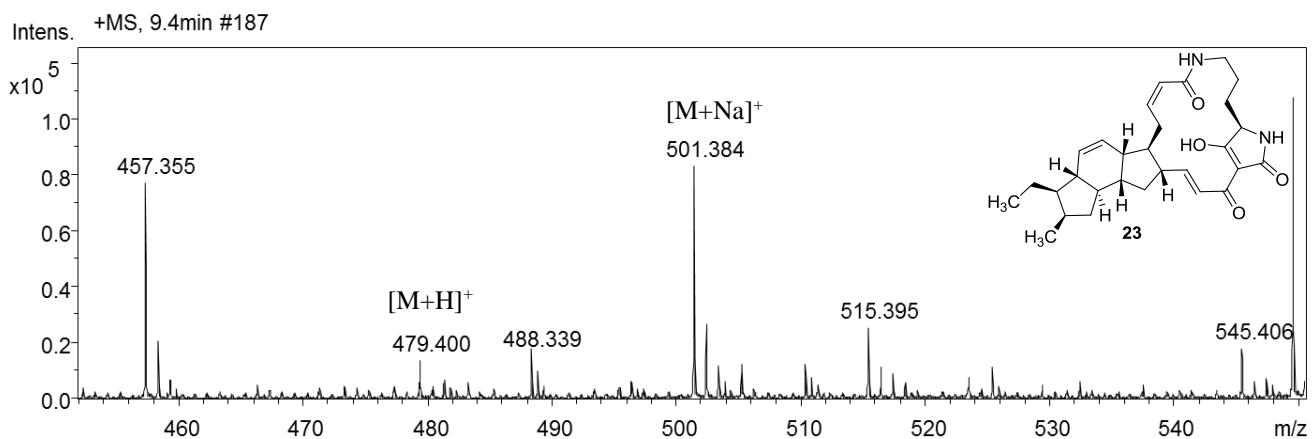


**Abbildung 44.** Extrakt von *E. coli* BAP1 PTM-Fosmid aus *L. capsici* (Maltophilin (**24**), 511.4 [M+H]<sup>+</sup>).

Im Folgenden sind die MS-Spektren mit der entsprechenden Retentionszeit für Ikarugamycin (**23**), bekannt aus *Streptomyces* sp. Tü6239, aus den Extrakten von *S. arenicola* und *E. coli* BAP1 PTM-Fosmid *S. arenicola* abgebildet. Zusätzlich sind die Ikarugamycin-Intermediate IkaA (475.3 [M+H]<sup>+</sup>) und IkaAB (477.3 [M+H]<sup>+</sup>) aus den *S. arenicola*-Knock-out-Mutanten Δ2408 und Δ2409 dargestellt.

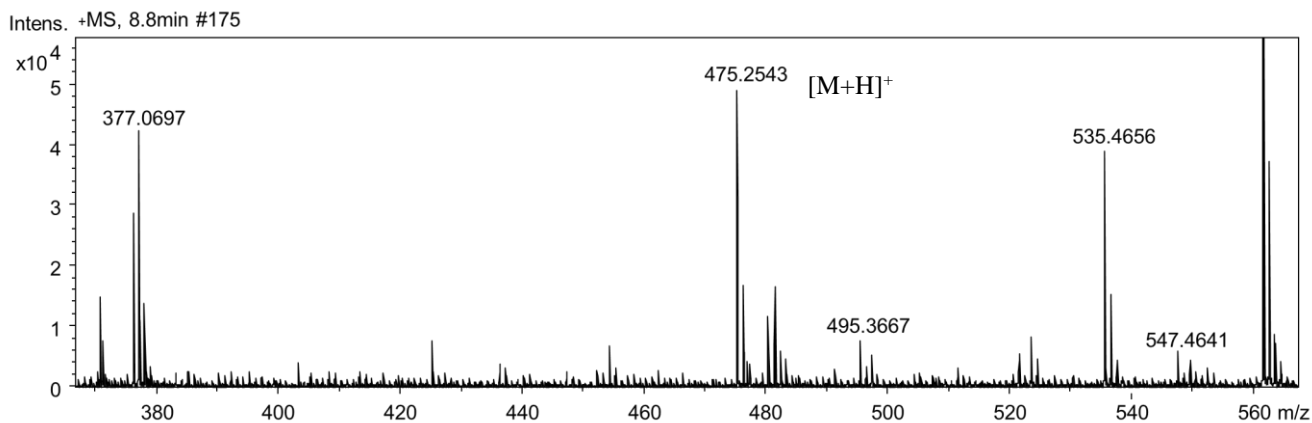


**Abbildung 45.** Wildtyp-Extrakt von *S. arenicola* (Ikarugamycin (**23**), 479.4 [M+H]<sup>+</sup>, 501.3 [M+Na]<sup>+</sup>).



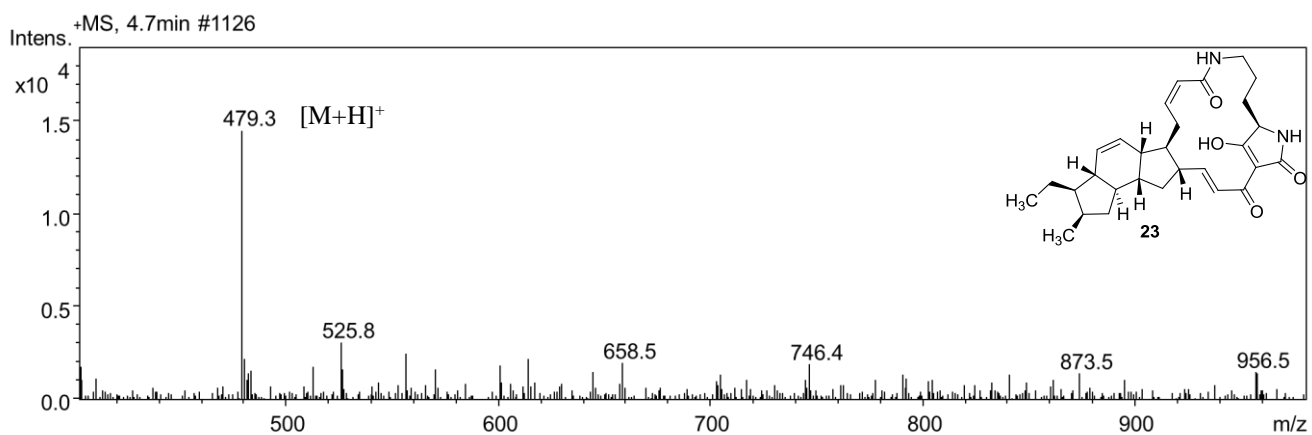
**Abbildung 46.** Extrakt von *E. coli* BAP1 PTM-Fosmid aus *S. arenicola* (Ikarugamycin (**23**), 479.4 [M+H]<sup>+</sup>, 501.3 [M+Na]<sup>+</sup>).



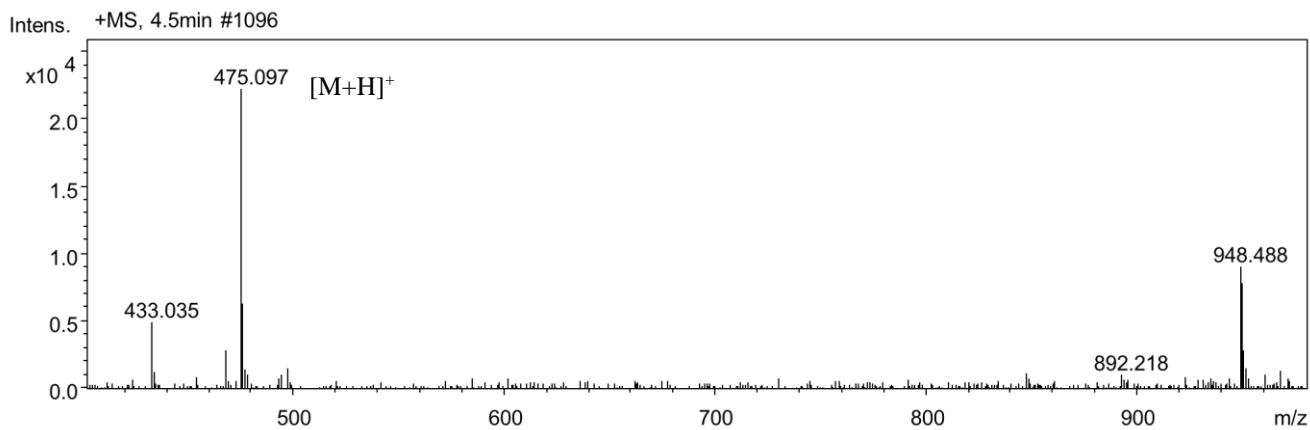


**Abbildung 47.** Extrakt von *E. coli* BAP pJA-ikaA (IkaA (**51**), 475.3 [M+H]<sup>+</sup>); die genaue Struktur ist bislang unbekannt.

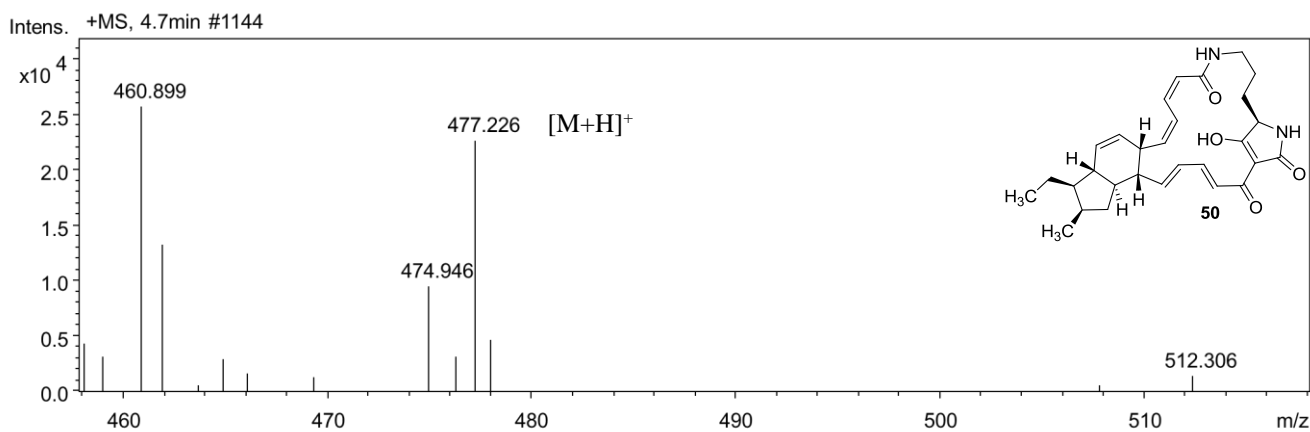
Die Massenspektren der Knock-out-Mutanten von *S. arenicola* wurden auf einem UltiMate 3000 LC-System, mit einem LCQ Fleet-Ion-Trap Massenspektrometer (Thermo Scientific), wie unter 7.2.3.1.9 vermessen.



**Abbildung 48.** Extrakt von der *S. arenicola*-Knock-out-Mutante Δ2406 (Ikarugamycin (**23**), 479.3 [M+H]<sup>+</sup>).



**Abbildung 49.** Extrakt von der *S. arenicola*-Knock-out-Mutante  $\Delta 2408$  (IkaA (**51**), 475.1 [M+H]<sup>+</sup>); die genaue Struktur ist bislang unbekannt.



**Abbildung 50.** Extrakt von der *S. arenicola*-Knock-out-Mutante  $\Delta 2409$  (IkaAB (**52**), 477.2 [M+H]<sup>+</sup>).

## 7.3.2 Heterologe PTM-Expression in Streptomyceten (vgl. 4.1.3.2)

### 7.3.2.1) Generelle Instruktionen

### 7.3.2.2) Bakterienstämme und Kultivierung

### 7.3.2.3) Klonierung der PTM-Cluster in den pSET152-Vektor

### 7.3.2.4) Klonierung der *ermE*-RBS-Sequenz in die pSET152-Konstrukte

### 7.3.2.5) Horizontale Konjugation in Streptomyceten

### 7.3.2.6) Liste der verwendeten Primer

### 7.3.2.7) Vektorkarten

### 7.3.2.8) Sequenzierungsdaten

### **7.3.2.1) Generelle Instruktionen**

#### **7.3.2.1.1) Bakterienstämme und Kultivierung**

*E. coli* DH5 $\alpha$  diente als Standard-Klonierungswirt. *E. coli* ET12567 pUZ8002 wurde zur horizontalen Konjugation verwendet.<sup>110</sup> *Streptomyces albus* J1074, *Streptomyces coelicolor* M1146, M1152 und M1154 wurden zur heterologen Expression genutzt. Die *S. coelicolor*-Stämme stammen von Prof. Mervyn Bibb, vom John Innes Centre aus Norwich und *S. albus* J1074 von JProf. Leo Kaysser der Universität Tübingen. Die *ermE*-RBS-Sequenz leitete sich von pUWL201PW ab. Dieser Vektor wurde von Herr PD Dr. Wehmeier der Universität Wuppertal zur Verfügung gestellt. Die beiden SUMO-Vektoren, welche jeweils ein putatives PTM-Cluster von *S. degradans*, beziehungsweise *S. spinosa*, enthielten, erstellte Christian Greunke (Arbeitskreis T.A.M. Gulder). Der horizontale Transfer in Streptomyceten erfolgte unter Verwendung des pSET152-Shuttlevektors.<sup>107</sup> Alle Arbeiten mit *E. coli* wurden auf LB-Agar oder LB-Flüssigmedien (Carl Roth) mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion durchgeführt. Die putativen PTM-Cluster aus *S. spinosa* und *S. degradans* werden im weiteren Verlauf in den Konstrukten nur als *S. spinosa* beziehungsweise *S. degradans* bezeichnet.

#### **7.3.2.1.2) Genomische DNA-Isolierung der Exkonjugate**

25 mL 2xYT-Medium mit Apramycin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) wurden mit 0.5 mL Kryokultur oder 1x1 cm<sup>2</sup> Sporen von einer Agarplatte, nach fünf Tagen Inkubation, für drei Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die Isolierung der gDNA fand mit einem Bakterien-DNA-Präparation-Kit von Jena Bioscience statt. Die präzipitierte gDNA wurde in 75  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer resuspendiert.

#### **7.3.2.1.3) Herstellung der Sporenlösung**

200  $\mu\text{L}$  Streptomyceten-Kryolösung wurden auf einer GYM-Platte ausgestrichen und für fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Die erhaltenen Sporen konnten mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens von der Agarplatte aufgenommen und in 500  $\mu\text{L}$  20 %-igem Glycerol gelöst werden. Von dieser Sporensuspension wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  Aliquots bei – 80°C eingefroren.

#### **7.3.2.1.4) Chemische Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$**

10  $\mu\text{L}$  Ligationsansatz wurden mit je einem Aliquot kompetenter Zellen (~ 100-200  $\mu\text{L}$  *E. coli* DH5 $\alpha$ ) gemischt. Die Lösung stand für 15 Minuten auf Eis und anschließend für anderthalb Minuten bei 42 °C. Daraufhin wurden die Lösungen erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 900  $\mu\text{L}$  LB-Medium erfolgte eine 35-minütige Inkubation bei 37 °C im Inkubationsschrank. 100  $\mu\text{L}$  der Bakterienlösung wurden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Vom restlichen Ansatz wurde ein Großteil des Überstandes nach zweiminütiger Zentrifugation bei

9000 rpm verworfen. Das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht.

#### **7.3.2.1.5) Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Inoue (Inoue et al., 1990)**

Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht bei 18 °C und 180 rpm in 5 mL SOC-Medium (5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton, 0.6 g NaCl, 0.2 g KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, die Magnesiumlösungen wurden steril nach dem Autoklavieren zugegeben) inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag in 250 mL SOC-Medium überimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 inkubiert. Die Bakterien wurden zehn Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 2500 rpm und 0 °C für zehn Minuten abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80 mL eiskaltem, sterilen TB (Transformations-Puffer: 10 mM HEPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl, 95 mL H<sub>2</sub>O, 55 mM MnCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, gelöst in 5 mL H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert zugeben) luftblasenfrei resuspendiert, erneut zehn Minuten auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen resuspendierten in 20 ml eiskaltem TB mit 1.5 mL DMSO (Endkonzentration 7 %). Die Lagerung der Bakteriensuspension erfolgte nach Behandlung mit flüssigem Stickstoff in 100 µL Aliquots bei – 80 °C.

#### **7.3.2.1.6) Restriktion und Dephosphorylierung des pSET152-Vektors**

Für die Klonierung der PTM-Cluster in den pSET152-Vektor wurden 2 µg pSET152-Vektor mit 1 µL Enzym (NEB oder JenaBioscience), 2 µL Enzypuffer (NEB oder JenaBioscience) und der entsprechenden Menge rH<sub>2</sub>O für einen 20 µL Ansatz für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit 1 µL Antarctic Phosphatase und 2 µL Antarctic Phosphatase Puffer (zehnfach konzentriert, NEB) versetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Aufreinigung des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors erfolgte mit dem PCR-Purification-Kit von Jena Bioscience.

#### **7.3.2.1.7) Isolierung und Reinigung der Plasmide und PCR-Produkte**

Ausgewählte Bakterienkolonien wurden über Nacht in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika für eine anschließende Plasmidisolierung, mit dem peqGOLD Miniplasmid Isolation Kit I (Peqlab), kultiviert. PCR-Produkte wurden entweder mit dem PCR-Purification-Kit (Jena Bioscience GmbH) isoliert oder nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnittenen und mit dem Agarosegel-Extraktions-Kit von Peqlab (S-Line) gereinigt.

#### **7.3.2.1.8) Agarosegel-Elektrophorese**

Die Herstellung der Agarosegele (Agarose-Standard von Roth) erfolgte in 1 %-Konzentration mit Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer. Als DNA-Leiter wurde die 1 kb Gene Ruler Plus DNA-Leiter von Thermo Scientific eingesetzt. Zum Anfärben der DNA wurde zum flüssigen Agarosegel 0.05 % Stain

Clear G zugegeben (SERVA Electrophoresis GmbH). Die Elektrophorese vollzog sich bei 115V für 25 Minuten mit einem Gerät von Biometra (Standard Power Pack P25).

#### **7.3.2.1.9) HPLC-MS-Analytik**

HPLC-MS-Analysen wurden mit einem UltiMate 3000 LC System verbunden mit einem LCQ Fleet-Ion-Trap Massenspektrometer (Thermo Scientific) mit Hilfe der Xcalibur-Software aufgenommen. Die Interpretation der aufgenommenen Daten erfolgte unter Verwendung der Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48 Software. Die chromatographische Auftrennung der HPLC-MS entstand auf einer XBridge (Waters) C-18 HPLC-Säule (30 x 4.6 mm, 3.5 µm Partikelgröße) mit einem Wasser (A) und Acetonitril (B) Gradient, beide gepuffert mit 0.1 % Ameisensäure: von 0 bis 6 min von 20 % B auf 95 % B, bis 7.5 min bei 95 % B, ab 8 bis 9 min auf 20 % B. Die Flussrate betrug 1.1 mL/ min. UV-Wellenlängen wurden bei 214 und 280 nm aufgenommen.

#### **7.3.2.1.10) Fermentation und Aufarbeitung**

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden PCR-validierte Exkonjugate von einer GYM-Agarplatte mit einem Zahnstocher in 20 mL 2xYT-Medium (16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl) überführt und für drei Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Vorkultur im Verhältnis 1:5 in einen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 150 mL PTM-Expressionsmedium nach Zhang et al. (25 g Glucose, 7 g Sojamehl (Henschel), 2.5 g Hefeextrakt, 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 g NaCl, 8 g CaCO<sub>3</sub>, 0.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7)<sup>111</sup> zugegeben. Die Fermentation endete nach sieben Tagen bei 28 °C und 200 rpm. Zur Isolierung und Charakterisierung der produzierten Metaboliten wurde der Fermentationsansatz bei 5000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Die Extraktion des Überstandes erfolgte nach Einstellung des pH-Wertes mit 1 N HCl auf pH 5 und anschließender dreimaliger Separation der Fermentationslösung mit Ethylacetat im Scheidetrichter. Die Menge Ethylacetat für eine Separation entsprach einem Drittel des Fermentationsvolumens. Das Pellet wurde parallel in 50 mL Aceton/Methanol-Lösung im Verhältnis 1:1 resuspendiert und für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Daran schloss sich eine zehnmünütige Zentrifugation bei 5000 rpm an. Beide Extrakte wurden anschließend am Rotationsverdampfer vollständig getrocknet und in 1 mL Methanol zur LC-MS Untersuchung gelöst.

#### **7.3.2.2) Klonierung der PTM-Cluster aus *S. spinosa* und *S. degradans* in pSET152**

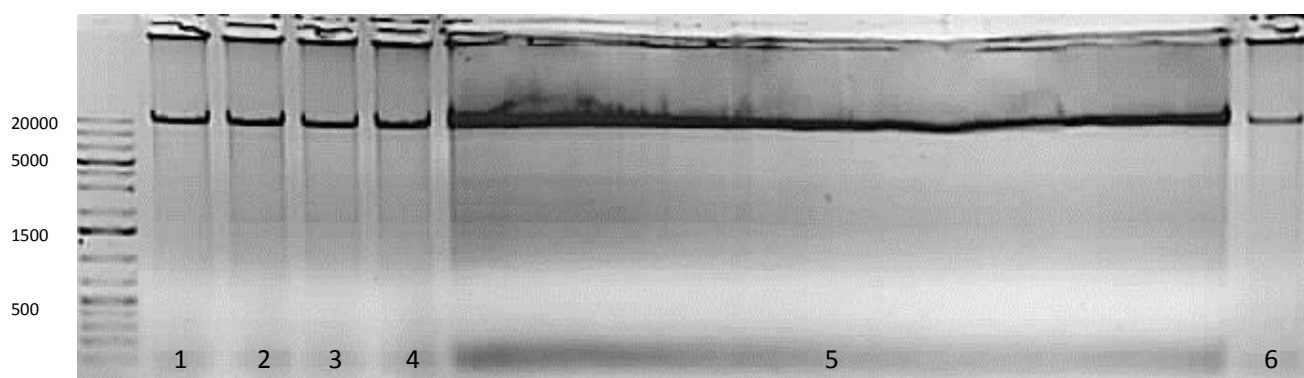
##### **7.3.2.2.1) Klonierung des PTM-Clusters aus *S. spinosa***

Als Template wurde ein pET28b-SUMO-Vektor mit *S. spinosa* PTM-Cluster (erhalten von Christian Greunke der Arbeitsgruppe von T.A.M Gulder (unveröffentlichte Daten)) verwendet. Mit Hilfe einer PCR sollten spezifische Überhänge für eine Ligation in den pSET152-Vektor, mittels Gibson-Assembly (NEB), an das PTM-Cluster angefügt werden. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde mit der Q5-Polymerase und zusätzlichem GC-Enhancer (NEB) durchgeführt. Die Bestellung

der Primer erfolgte bei Sigma Aldrich. Die finale Konzentration der Primer betrug 20 pmol/  $\mu\text{L}$ . Von jedem Primer wurden 0.625  $\mu\text{L}$  in einer 25  $\mu\text{L}$ -PCR eingesetzt. Der PCR-Mix setzte sich wie folgt zusammen: 0.125  $\mu\text{L}$  Q5-Polymerase (NEB), 5  $\mu\text{L}$  Q5-Reaktionspuffer, 30 ng pET28b-SUMO-Vektor mit *S. spinosa*-Cluster, 5  $\mu\text{L}$  GC-Enhancer (NEB), 0.5  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (10 mM, NEB), gefüllt auf 25  $\mu\text{L}$  mit rH<sub>2</sub>O (Abbildung 51). Insgesamt wurden 12 Ansätze mit Primer 1 und 2 hergestellt und den folgenden PCR-Bedingungen unterzogen (Tabelle 2, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 16102 bp.

**Tabelle 2.** PCR-Konditionen zur Amplifizierung des *S. spinosa*-PTM-Clusters mit gleichzeitiger Addition von Überhängen für das Gibson-Assembly.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	98	60	
2	98	10	
3	65,7	20	x 30
4	72	732	
5	72	732	



**Abbildung 51.** PCR-Gradient zur Generierung eines eingesetzten Fragments für die Gibson-Assemblierung des *S. spinosa* PTM-Clusters, 1-4 und 6: Temperatur-Gradient 65.7 bis 68.7 °C, 5: 12 x PCR-Reaktionen bei 65.7 °C.

Nach der Gelextraktion (pEQLab-Kit) des PCR-Produktes wurde dieses mit *Xba*I und *Spe*I linearisierten, dephosphorylierten pSET152-Vektor und dem Gibson-Assembly-Enzym-Mix für eine Stunde bei 50 °C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend folgte die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

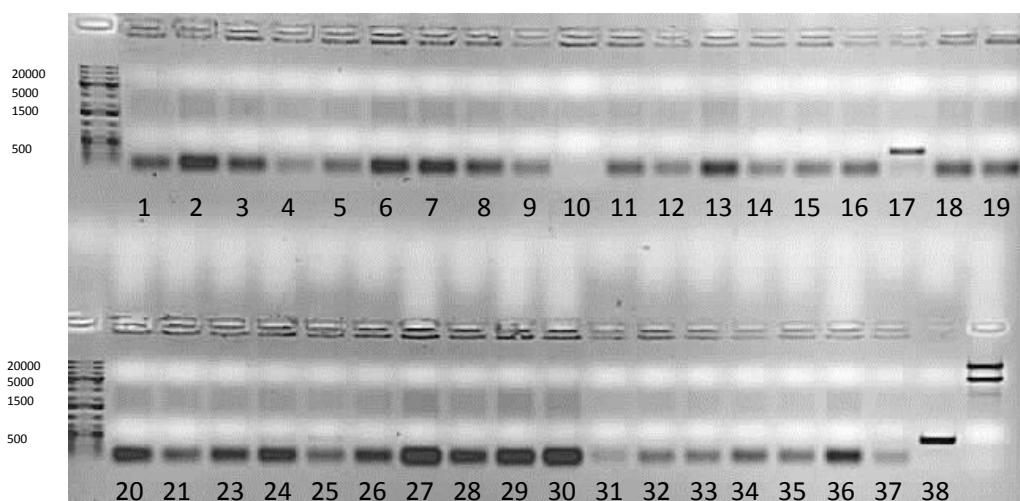
### Kolonie-PCR zur Kontrolle des pSET152-*S. spinosa* Konstruktes

Die Kontrolle der erhaltenen Klone erfolgte durch eine Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase. Dabei wurden 36 Klone einzeln mit einem Zahnstocher in 10  $\mu\text{L}$  rH<sub>2</sub>O überführt und 5  $\mu\text{L}$  davon für die PCR eingesetzt. Die restliche Lösung diente zum Anlegen einer 5 mL-Kultur. Der 25  $\mu\text{L}$  PCR-Mix bestand aus 0.125  $\mu\text{L}$  Taq-Polymerase (Jena Bioscience), 2.5  $\mu\text{L}$  Taq-Puffer, 5  $\mu\text{L}$  Bakteriensuspension, 0.25  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM, Jena Bioscience), 17.875  $\mu\text{L}$  rH<sub>2</sub>O und 1  $\mu\text{L}$  DMSO

(Roth). Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu\text{L}$  des Ligationsansatzes mit 4  $\mu\text{L}$   $\text{rH}_2\text{O}$  statt der Bakterienlösung eingesetzt. Für die PCR wurden die Primer 3 und 4 verwendet (Tabelle 3, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment: betrug 439 bp (Abbildung 52).

**Tabelle 3.** PCR-Konditionen der Kolonie-PCR für *E. coli* DH5 $\alpha$  pSET152-*S. spinosa*

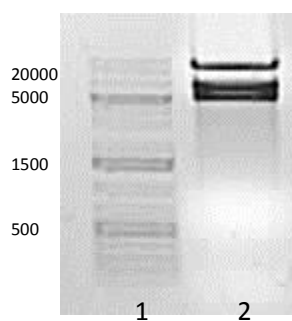
Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	95	300	
2	95	45	
3	49,1	30	X 30
4	72	40	
5	72	300	



**Abbildung 52.** Kolonie-PCR von *E. coli* DH5 $\alpha$  pSET152-*S. spinosa*, 1-37: untersuchte Klone, 38: Positiv-Kontrolle.

Der positive Klon 17 wurde in 5 mL LB-Medium mit Apramycin (50 ng/  $\mu\text{L}$ ) bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle des isolierten Plasmids erfolgte eine Restriktion mit 250 ng Plasmid, 1  $\mu\text{L}$  *Xho*I und 2  $\mu\text{L}$  Cutsmart (NEB). Der Ansatz wurde auf 20  $\mu\text{L}$  mit  $\text{rH}_2\text{O}$  aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Aufarbeitung der Probe konnte ein korrektes dreibandiges Schnittmuster (10824, 6062, 4789 bp) erhalten werden (Abbildung 53).





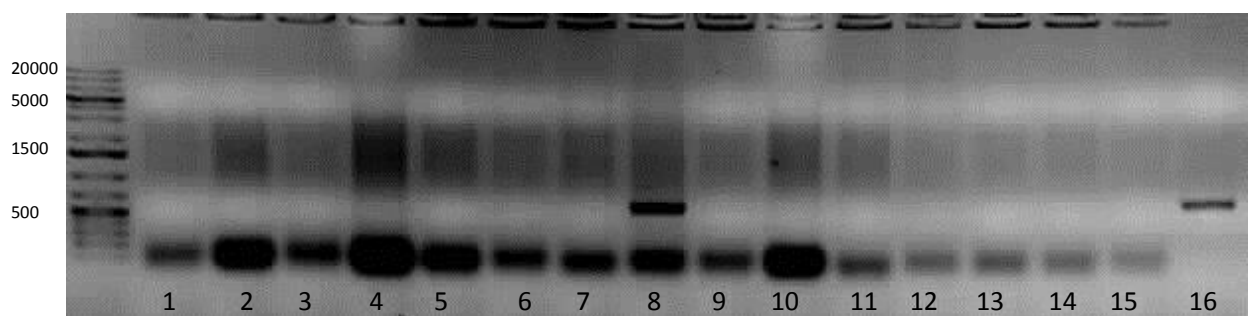
**Abbildung 53.** Restriktionsverdau des positiven pSET152-*S. spinosa* Klons 17. 1: 1kb plus DNA-Leiter; 2: Restriktion von pSET152-*S. spinosa* mit *XhoI*.

### 7.3.2.2.2) Klonierung des PTM-Clusters aus *S. degradans*

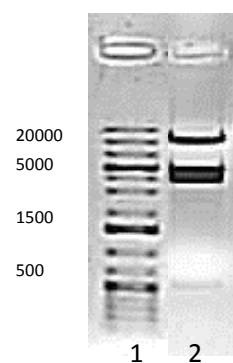
Der *E. coli* DH5 $\alpha$  pET28b-SUMO-Vektor mit dem *S. degradans* PTM-Cluster wurde von Christian Greunke der Arbeitsgruppe von T.A.M. Gulder zur Verfügung gestellt (unveröffentlichte Daten). Durch Anzucht des Klons in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm (Kanamycin 50 ng/  $\mu$ L) und anschließender Plasmidisolierung (pEQlab-Kit) konnte der entsprechende Vektor mit *Bam*HI und *Not*I verdaut werden. Für einen 20  $\mu$ L Restriktionsansatz vom pSET152-Vektor wurden 2  $\mu$ g Vektor mit 1  $\mu$ L *Bam*HI und 1  $\mu$ L *Not*I in 3.1 Puffer (zehnfach konzentriert, NEB) für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Vom pET28b-SUMO-*S. degradans*-Vektor wurden 8  $\mu$ g mit je 2.5  $\mu$ L je Enzym (*Not*I und *Bam*HI) und 4  $\mu$ L 3.1-Enzympuffer für die Restriktion eingesetzt. Der Ansatz wurde mit rH<sub>2</sub>O auf 40  $\mu$ L aufgefüllt und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz des pSET152-Vektors dephosphoryliert (siehe 7.3.2.1.6). Die Reinigung des linearisierten, dephosphorylierten Vektors und dem ausgeschnittenen PTM-Cluster erfolgten mit dem PCR-Purification-Kit (Jena Bioscience). Im Verhältnis 1:1 wurde das Insert und der Vektor gemischt und mit 1  $\mu$ L T4-Ligase (Jena Bioscience) und entsprechender Menge Ligasepuffer (zehnfach konzentriert, Jena Bioscience) bei 16 °C über Nacht inkubiert. 10  $\mu$ L des Ligationsansatzes wurden für die chemische Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingesetzt (Durchführung siehe 7.3.2.1.4). Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agar mit Apramycin (50  $\mu$ g/ mL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Klone erfolgte eine Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase. Dabei wurden 50 Klone mit Zahnstochern einzeln in 10  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O überführt und 5  $\mu$ L davon für die PCR eingesetzt. Die restliche Lösung diente zum Anlegen einer 5 mL-Kultur. Der 25  $\mu$ L PCR-Mix bestand aus 0.125  $\mu$ L Taq-Polymerase (Jena Bioscience), 2.5  $\mu$ L Taq-Puffer, 5  $\mu$ L Bakteriensuspension, 0.25  $\mu$ L dNTPs (10 mM, Jena Bioscience), 17.875  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ L DMSO (Roth). Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu$ L Ligationsansatz mit 4  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O statt der Bakterienlösung eingesetzt. Für die PCR wurden die Primer 5 und 6 verwendet (Tabelle 4, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 665 bp (Abbildung 54).

**Tabelle 4.** Konditionen der Kolonie-PCR für *E. coli* DH5α pSET152-*S. degradans*

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	95	300	
2	95	45	
3	47,1	30	X 34
4	72	45	
5	72	300	

**Abbildung 54.** Kolonie-PCR von *E. coli* DH5α pSET152-*S. degradans*, 1-15: untersuchte Klone, 16: Positiv-Kontrolle.

Der positive Klon 8 wurde in 5 mL LB-Medium mit Apramycin (50 µg/ mL) bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle des isolierten Plasmids erfolgte eine Restriktion mit 250 ng Plasmid, 1 µL *Xho*I und 2 µL Cutsmart (NEB). Der Ansatz wurde mit rH<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Das dargestellte Agarosegel zeigt die erwarteten Fragmente: 9879, 4509, 3677 bp (Abbildung 55).

**Abbildung 55.** Agarosegel der Restriktion von pSET152-*S. degradans*. 1: 1kb plus DNA-Leiter; 2: Restriktion von pSET152-*S. degradans* mit *Xho*I.

### 7.3.2.3) Klonierung der *ermE*-RBS-Sequenz in die pSET152-Konstrukte

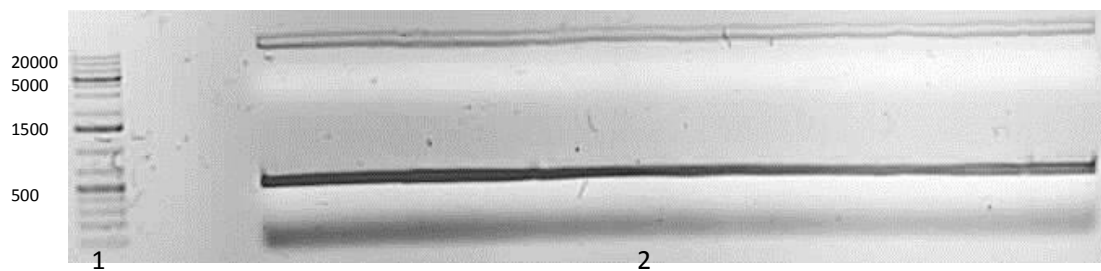
Zur gesteigerten heterologen Expression der PTM's im Streptomyceten wurde der starke, konsekutiv funktionierende *ermE*-Promotor<sup>109</sup> zusammen mit einer ribosomalen Bindungsstelle (RBS) in die pSET152-*S. degradans*/*S. spinosa*-Vektoren vor die PTM-Gene kloniert. Die *ermE*-RBS-Sequenz aus dem pUWL201PW-Vektor erhielt mittels PCR die entsprechenden Gibson-Assembly-Überhänge. Parallel erfolgte eine Restriktion von 8 µg pSET152-*S. spinosa* mit 1 µL *EcoRV* und 2 µL *EcoRV*-Enzypuffer (Jena Bioscience), aufgefüllt auf 20 µL rH<sub>2</sub>O für vier Stunden bei 37 °C. Ebenso wurden 8 µg pSET152-*S. degradans* mit *Bam*HI verdaut. Daran schloss sich eine Dephosphorylierung der linearisierten Vektoren an (siehe 7.3.2.1.6). Die entsprechenden *ermE*-RBS-Amplikons wurden mit den präparierten Vektoren im Verhältnis 5:1 in ein PCR-Tube pipettiert. Die Ligation erfolgte durch Zugabe des Gibson-Assembly-Enzym-Mixes (NEB) innerhalb einer Stunde bei 50 °C. Der Ligationsmix wurde anschließend in *E. coli* DH5α transformiert und die Klone mittels Kolonie-PCR untersucht.

#### 7.3.2.3.1) Klonierung der *ermE*-RBS-Sequenz in die pSET152-*S. spinosa*

Für die Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz wurden 30 ng pUWL201PW-Vektor, 5 µL Q5-Reaktionspuffer, 0,5 µL dNTPs (10 mM, NEB), 0,625 µL je Primer (20 pmol/ µL), 0,125 µL Q5-Polymerase eingesetzt und mit rH<sub>2</sub>O auf 25 µL aufgefüllt (Abbildung 56). Insgesamt wurden zwölf Reaktionen mit Primer 7 und 8 unter folgenden Bedingungen angesetzt (Tabelle 5, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 500 bp.

**Tabelle 5.** PCR für die Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz mit Gibson-Überhängen.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	98	60	
2	98	10	
3	67,4	20	X 30
4	72	30	
5	72	120	

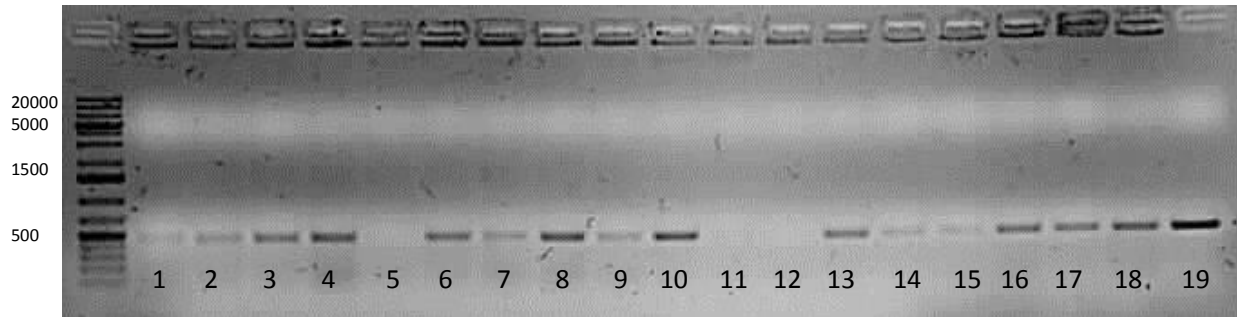


**Abbildung 56.** Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz mit Überhängen für die Gibson Assemblierung in pSET152-*S. spinosa*. 1: 1kb plus DNA-Leiter; 2: *ermE*-RBS-PCR-Produkt mit Überhängen.

Nach der Gelextraktion (peqLab-Kit) des PCR-Produktes wurde dieses mit dem *EcoRV* linearisierten, dephosphorylierten pSET152-*S. spinosa*-Vektor und dem Gibson-Assembly-Enzym-Mix für eine Stunde bei 50 °C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend folgte die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Zur Kontrolle der erhaltenen Klone wurde eine Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase durchgeführt. Dabei wurden 18 Klone mit Zahnstochern einzeln in 10  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O überführt und 5  $\mu$ L davon für die PCR eingesetzt. Die restliche Lösung diente zum Anlegen einer 5 mL-Kultur. Der 25  $\mu$ L PCR-Mix bestand aus 0.125  $\mu$ L Taq-Polymerase (Jena Bioscience), 2.5  $\mu$ L Taq-Puffer, 5  $\mu$ L Bakteriensuspension, 0.25  $\mu$ L dNTPs (10 mM, Jena Bioscience), 17.875  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ L DMSO (Roth). Als Positiv-Kontrolle wurde 1  $\mu$ L Ligationsansatz mit 4  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O statt der Bakterienlösung eingesetzt. Für die PCR wurden die Primer 3 und 11 verwendet (Tabelle 6, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 438 bp (Abbildung 57).

**Tabelle 6.** Konditionen der Kolonie-PCR für *E. coli* DH5 $\alpha$  pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa*.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	95	300	
2	95	45	
3	47,1	30	X 34
4	72	45	
5	72	300	

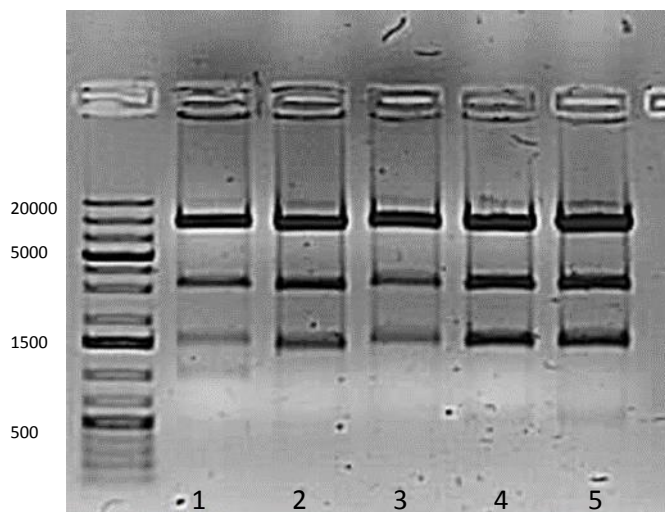


**Abbildung 57.** Kolonie-PCR für *E. coli* DH5α pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa*, 1-18: untersuchte Klone, 19: Positivkontrolle.

Vier der positiven Klone wurden in 5 mL LB-Medium mit Apramycin (50 µg/ mL) bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmid-Isolierung (peqLab-Kit) mit einem Kontrollverdau des Plasmids. Durch den Vergleich des verdauten pSET152-*S. spinosa*-Vektors ohne *ermE*-RBS-Sequenz und dem Vektor mit dieser Sequenz konnten die Plasmide verifiziert werden (Tabelle 7, Abbildung 58).

**Tabelle 7.** Erwartete Fragmente des Restriktionsverdaus von pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa*.

pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S. spinosa</i> EcoRI	pSET152- <i>S. spinosa</i> EcoRI
8632	8632
7932	7932
2911	2911
1381	1381
1323	880



**Abbildung 58.** Restriktionsverdau von pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa* (2-4); Restriktionsverdau pSET152-*S. spinosa* (1) mit *EcoRI*.

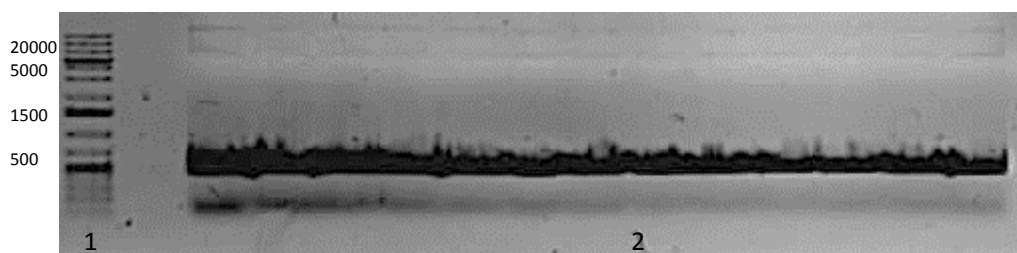
Die Abwesenheit des Fragmentes bei 880 bp in den Restriktionsproben der neuen Konstrukte zeigt, dass im Gegensatz zum pSET152-*S. spinosa*-Konstrukt (1), die *ermE*-RBS-Sequenz (2-5) vorhanden ist (Abbildung 58).

#### 7.3.2.3.2) Klonierung der *ermE*-RBS-Sequenz in pSET152-*S. degradans*

Die Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz mit den Gibson-Überhängen für die Klonierung in den pSET152-*S. degradans*-Vektor wurde mit der Q5-Polymerase durchgeführt. Die PCR bestand aus 30 ng pUWL201PW-Vektor, 5  $\mu$ L Q5-Reaktionspuffer, 0.5  $\mu$ l dNTPs (10 mM, NEB), 0.625  $\mu$ L je Primer (20 pmol/  $\mu$ L) und 0.125  $\mu$ L Q5-Polymerase. Der Ansatz wurde mit rH<sub>2</sub>O auf 25  $\mu$ L aufgefüllt (Abbildung 59). Insgesamt wurden zwölf Reaktionen mit Primer 9 und 10 angesetzt (Tabelle 8, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 503 bp.

**Tabelle 8.** PCR für die Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz mit Gibson-Überhängen.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	98	60	
2	98	10	
3	65	20	X 30
4	72	30	
5	72	120	

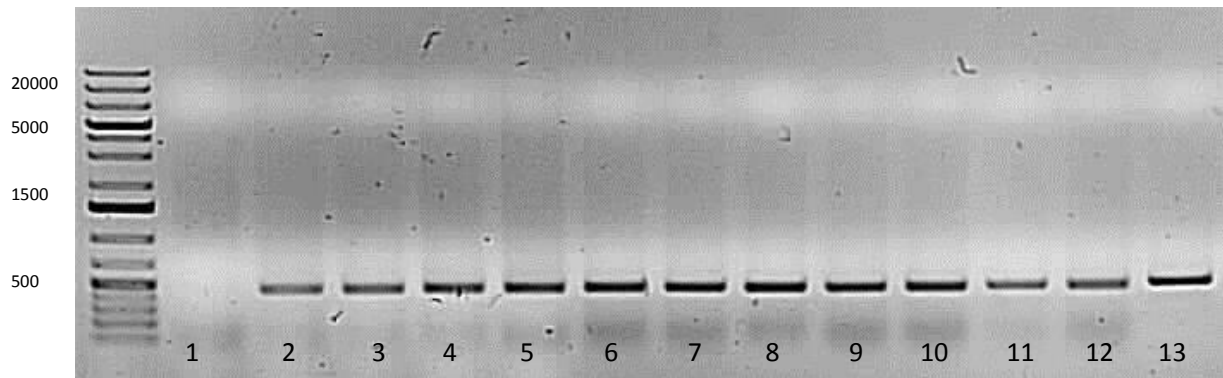


**Abbildung 59.** Amplifizierung der *ermE*-RBS-Sequenz mit Überhängen für die Gibson Assemblierung in pSET152-*S. degradans*. 1: 1kb plus DNA-Leiter; 2: *ermE*-RBS –PCR-Produkt mit Überhängen.

Nach der Gelextraktion (peqLab-Kit) des PCR-Produktes wurde dieses mit dem *Bam*HI linearisierten, dephosphorylierten pSET152-*S. degradans*-Vektor und dem Gibson-Assembly-Enzym-Mix für eine Stunde bei 50 °C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend folgte die Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Zur Kontrolle der erhaltenen Klone wurde eine Kolonie-PCR mit der Taq-Polymerase durchgeführt. 12 Klone wurden mit Zahnstochern einzeln in 10  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O überführt und 5  $\mu$ L davon für die PCR eingesetzt. Die restliche Bakteriensuspension diente zum Anlegen einer 5 mL-Kultur. Der 25  $\mu$ L PCR-Mix bestand aus 0.125  $\mu$ L Taq-Polymerase (Jena Bioscience), 2.5  $\mu$ L Taq-Puffer, 5  $\mu$ L Bakteriensuspension, 0.25  $\mu$ L dNTPs (10 mM, Jena Bioscience), 17.875  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ L DMSO (Roth). Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu$ L Ligationsansatz mit 4  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O statt der Bakterienlösung eingesetzt. Für die PCR wurden die Primer 5 und 11 verwendet (Tabelle 9, siehe Liste der Primer). Das erwartete Fragment betrug 454 bp (Abbildung 60).

**Tabelle 9.** Konditionen der Kolonie-PCR für *E. coli* DH5 $\alpha$  pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans*

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	95	300	
2	95	45	
3	49,1	30	X 34
4	72	45	
5	72	300	



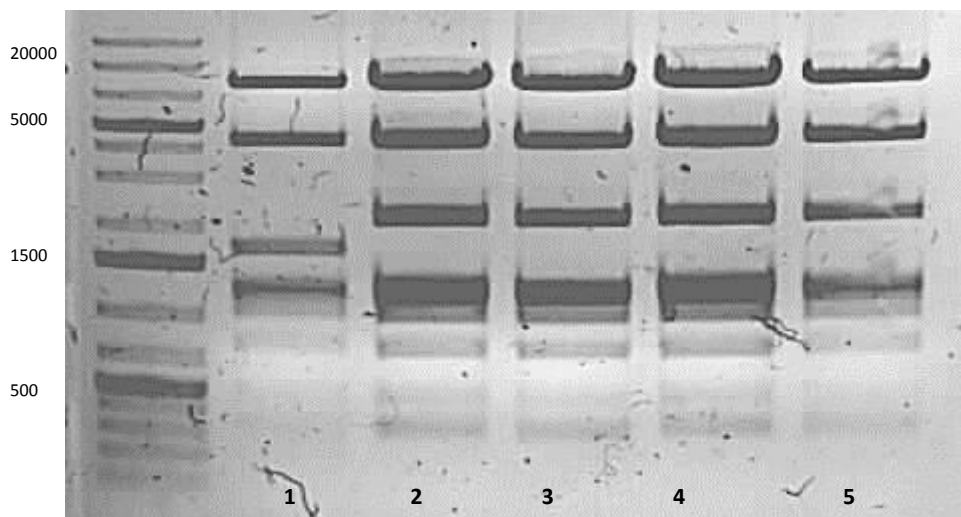
**Abbildung 60.** Kolonie-PCR für die Kontrolle von *E. coli* DHa pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans*, 1-12: untersuchte Klone, 13: Positivkontrolle.

Vier der positiven Klone wurden in 5 mL LB-Medium (50 µg/ mL) bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Verifizierung der Plasmide erfolgte nach Isolierung mittels Restriktion unter Vergleich des Konstruktes ohne *ermE*-RBS-Sequenz. Der Restriktionsansatz bestand aus 250 ng Plasmid, 1 µL *Hind*III (NEB) mit 2 µL 3.1 Puffer (NEB) und wurde auf 20 µL rH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Proben auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen (Tabelle 10, Abbildung 61).

**Tabelle 10.** Erwartete Fragmente aus dem Restriktionsverdau von pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans*.

pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S.degradans</i>	pSET152- <i>S.degradans</i>
7890	7890
4206	4206
1843	1646
1219	1219
1140	1140
969	969
723	723
300	300
124	–





**Abbildung 61.** Restriktion von pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* (2-5) und pSET152-*S. degradans* (1) mit *Hind*III.

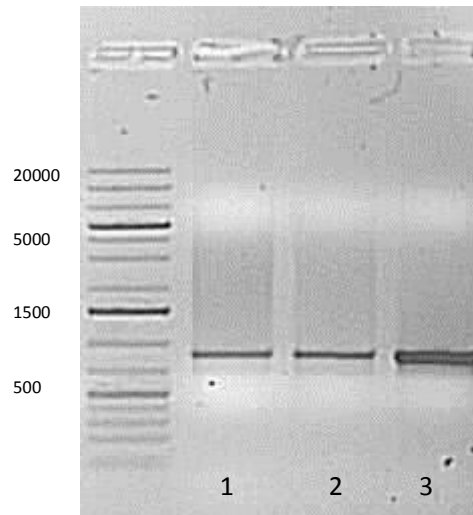
Der Fragmentshift von 1646 bp (1) zu 1843 bp (2-5) zeigt die Insertion der *ermE*-RBS-Sequenz im pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* Konstrukt (Abbildung 61). Die pSET152-*ermE*-Konstrukte wurden bei GATC endsequenziert, um den Einbau der *ermE*-RBS-Sequenz zu bestätigen.

### PCR-Validierung der Exkonjugate

Zur Kontrolle der Exkonjugate, auf Insertion der Vektoren, wurde die gDNA der Exkonjugate isoliert und mittels PCR untersucht. Der 25  $\mu$ L-PCR-Mix bestand aus 0.125  $\mu$ L Taq-Polymerase (Jena Bioscience), 2.5  $\mu$ L Taq-Puffer, 2  $\mu$ L der gDNA ( $\emptyset$  200 ng/  $\mu$ L), 0.25  $\mu$ L dNTPs (10 mM, NEB), 18.875  $\mu$ L rH<sub>2</sub>O und 1  $\mu$ L DMSO (Roth). Für die PCR-Validierung der Exkonjugate von *S. albus* und *S. coelicolor* M1152 pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa* wurde Primer 3 und 12 verwendet ( $T_m$ = 49.1  $^{\circ}$ C). Das erwartete Fragment betrug 858 bp. Als Positivprobe wurde 0.5  $\mu$ L pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa* genutzt (Tabelle 11, Abbildung 62).

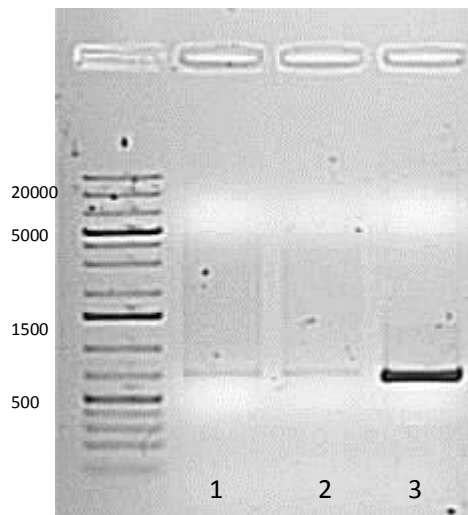
**Tabelle 11.** Konditionen der PCR zur Kontrolle der *S. albus/S. coelicolor* pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa/S. degradans*-Exkonjugate.

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [sec]	Zyklenanzahl
1	95	120	
2	95	45	
3	$\Delta T$ : 49/5	30	X 34
4	72	60	
5	72	300	



**Abbildung 62.** Agarosegelbild der PCR-Validierung der Exkonjugate pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa* (*ermE*-RBS-*S. spinosa* entspricht EBSS): 1: *S. coelicolor* M1152-EBSS; 2: *S. albus*-EBSS; 3: Positivkontrolle.

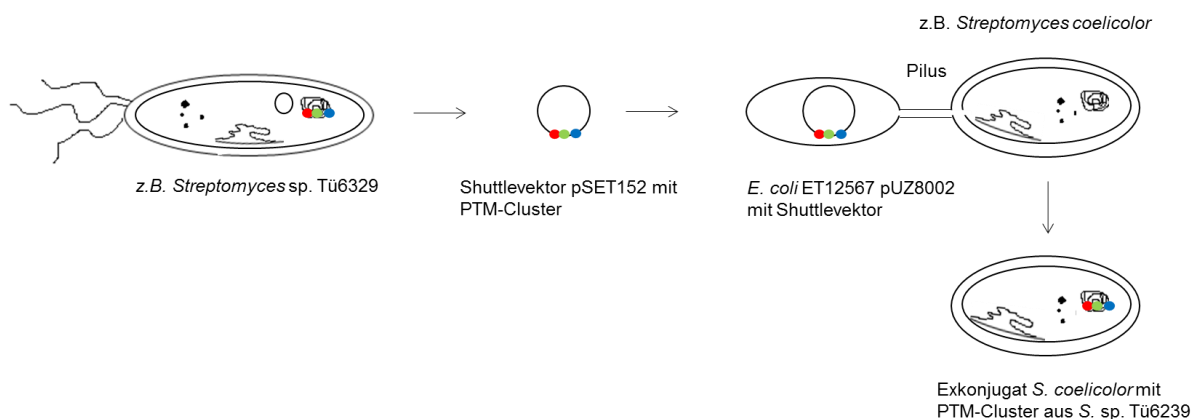
Für die PCR-Validierung der Exkonjugate *S. albus* und *S. coelicolor* M1152 pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* wurden Primer 5 und 6 verwendet ( $T_m = 47.1\text{ }^\circ\text{C}$ ). Das erwartete Fragment betrug 665 bp. Als Positivprobe wurde 0.5  $\mu\text{L}$  pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* genutzt (Tabelle 11, Abbildung 63).



**Abbildung 63.** Agarosegelbild der PCR-Validierung der Exkonjugate pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* (*ermE*-RBS-*S. degradans* entspricht EBSD): 1: *S. coelicolor* M1152-EBSD; 2: *S. albus*-EBSD; 3: Positivkontrolle.

### 7.3.2.4) Horizontale Konjugation in Streptomyceten

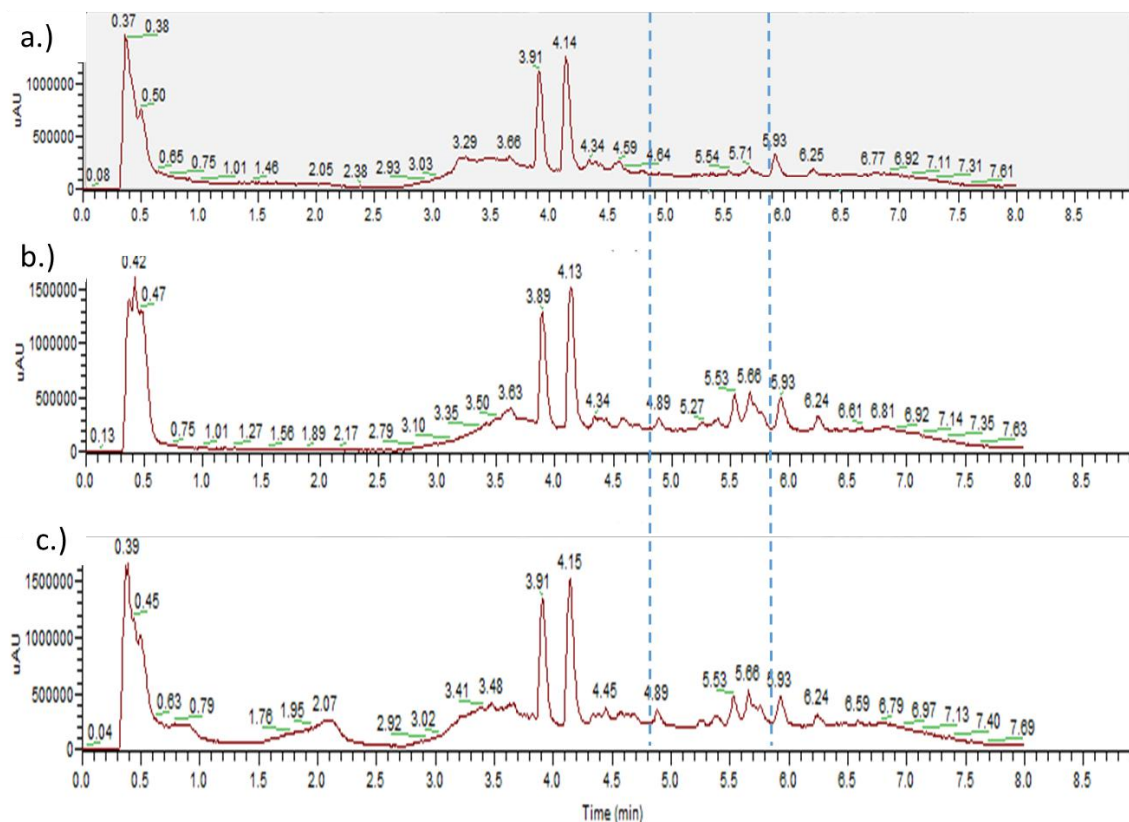
*E. coli* ET12567 pUZ8002 besitzt die Fähigkeit einen Pilus aufzubauen. Dieser dient als Brücke für Shuttlevektoren und bringt somit genetische Informationen in Streptomyceten ein. Als Shuttlevektor wurde pSET152 verwendet, welcher unter anderem auch ein *Int*-Gen, einen *oriT* und eine Apramycin-Resistenz besitzt. Zu Beginn erfolgte die Transformation der pSET152-Konstrukte in *E. coli* ET12567 pUZ8002 mittels Elektroporation (Durchführung siehe Anhang 7.1 Nr 1.2). Die Klone wurden über Nacht in 5 mL LB-Medium mit Chloramphenicol (25 µg/ mL), Ampicillin (100 µg/ mL) und Apramycin (50 µg/ mL) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienlösung in frisches LB-Medium mit Antibiotika im Verhältnis 1 zu 10 überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 – 0.6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die ET12567-Klone wurden zweimal durch Zentrifugation bei 4°C für fünf Minuten bei 5000 rpm mit 10 mL LB ohne Antibiotika gewaschen und schließlich in 500 µL LB resuspendiert. Parallel wurden für die Konjugation 10 µL der *S. coelicolor*/*S. albus*-Sporen-Lösung (gelagert in 20 %-igem Glycerol) in 500 µL 2xYT-Medium auf 50 °C für 15 Minuten erhitzt und danach bei 37 °C gelagert. Die aktivierten Sporen wurden mit den gewaschenen *E. coli*-Klonen gemischt und kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sporen/Bakterien-Pellet auf MS-Agar (20 g Agar, 20 g Mannitol, 20 g Sojamehl (Hensel, Magstadt), 0.95 g MgCl<sub>2</sub>, pH 7.2) ausplattiert. Nach 20 Stunden bei 30 °C wurde die Agarplatte mit 1 mL rH<sub>2</sub>O mit 1.25 mg Apramycin und 0.5 mg Nalidixinsäure überschichtet und weiterhin bei 30 °C inkubiert. Nach drei Tagen konnten weiße Kolonien, die sogenannten Exkonjugate, auf GYM-Agarplatten (4 g Glucose, 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 12 g Agar, 2 g CaCO<sub>3</sub>, pH 7.2 mit KOH) versetzt mit Apramycin (50 µg/ mL) mit Zahnstochern übertragen werden. Nach weiteren fünf Tagen wurden die gebildeten Sporen in flüssiges 2xYT-Medium überführt und drei Tage bei 28 °C und 200 rpm für eine Vorkultur inkubiert (Abbildung 64). Anschließend erfolgte eine Fermentation mit daraus folgender Aufarbeitung wie unter 7.3.2.1.10 beschrieben.



**Abbildung 64.** Schematische Darstellung von der Herstellung von Exkonjugaten mittels horizontaler Konjugation.

### 7.3.2.5) LC-MS Ergebnisse der heterologen Expression im Streptomyceten

Die LC-MS-Ergebnisse zeigen bei den neuen Konstrukte *S. albus* pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans* und pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa* neue UV-Signale im Bereich von 5-7 Minuten im Vergleich zu den Streptomyceten-Extrakten ohne Vektor. Um genauere Aussagen zur Struktur der gebildeten Metaboliten machen zu können, müssten diese aus Expressionsversuchen im größeren Maßstab, isoliert werden. Jedoch ließ sich keine Masse in den Exkonjugat-Extrakten detektieren, die auf ein potentielles PTM hindeutet (Abbildung 65). Bei den *S. coelicolor*-Exkonjugaten konnten keine neuen UV-Signale detektiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt).



**Abbildung 65.** LC-MS-Chromatogramm von a.) *S. albus*-Extrakt; b.) *S. albus* pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa*-Extrakt; c.) *S. albus* pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans*-Extrakt; rote Linie: UV-Spur. Die gestrichelten Linien zeigen den Bereich an, indem neue UV-Signale im Vergleich zur Kontrollprobe *S. albus* erscheinen.

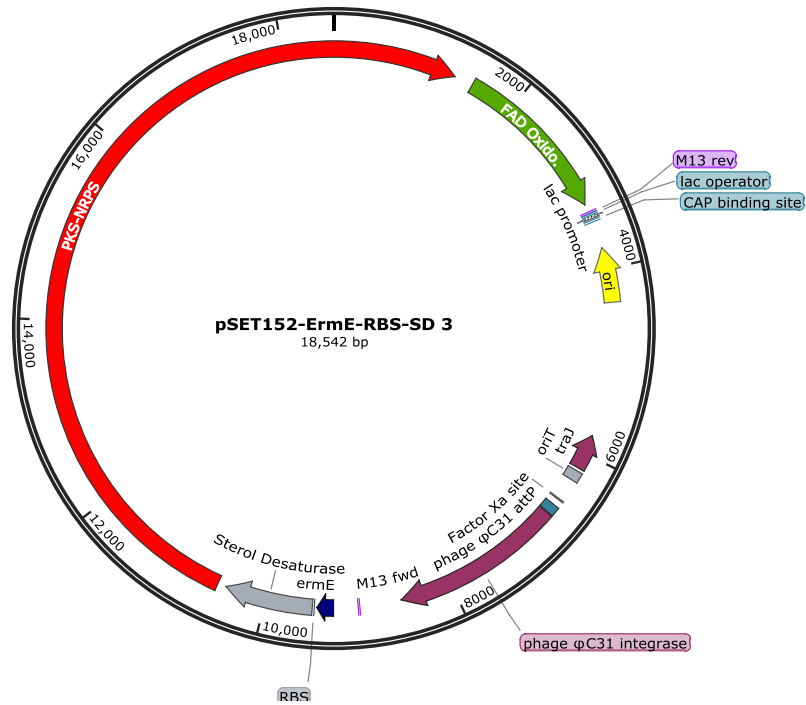
## 7.3.2.6) Primer-Liste

Nr.	Primer-Name	Sequenz	Kommentar	Annealing-Temperatur T <sub>m</sub> [°C]
1	<i>S.spinosa</i> -pSET152_Fwd	gaattcgatatcgcgcgATGCGCATTTGGCTGG TAAC	Primer für Gibson-assembly <i>S.spinosa</i> in pSET152	65.7
2	<i>S.spinosa</i> -pSET152_Rev	tgcaggtcgactctagaggatcCTGCCGGTCATGTG GTGA		
3	<i>M13_Fwd (GATC)</i>	TGTAACACGACGGCCAGT	Screening-Primer für Insert-Kontrolle <i>S.spinosa</i> -Cluster	49.1
4	Screening- <i>S.spinosa_Rev</i>	TACACCGGCAACTACGAC		
5	<i>M13_Rev (GATC)</i>	CAGGAAACAGCTATGACC	Screening-Primer für Insert-Kontrolle <i>S.degradans</i> -Cluster	47.1
6	Screening_FAD_ <i>S.degradans_Fwd</i>	GAAGAACAGGTGAGTCGC		
7	pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S.spinosa_Fwd</i>	aatgcgcatcgcgcgataTCTCCTCTTTAATGTT AAACAAAATTATTTCTAGACGATC	Primer für Gibson-Assembly <i>ermE</i> -RBS in pSET152- <i>S.spinosa</i>	67.4
8	pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S.spinosa_Rev</i>	catgattacgaattcgatGCCGTACGTCATCCCCGG T		
9	pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S.degradans_Fwd</i>	tgcaggtcgactctagaggatCCGTACGTCATCCC GGTG	Primer für Gibson-Assembly <i>ermE</i> -RBS in pSET152- <i>S.degradans</i>	65
10	pSET152- <i>ermE</i> -RBS- <i>S.degradans_Rev</i>	ggagttaaggtatccacgTATGTAATTTCTCCTCT TTAATGTTAAACAAAATTATTTCTAG		
11	<i>ermE_Rev</i>	TCCTACCAACCGGCACGATT	Screening-Primer auf <i>ermE</i> -RBS-Insert	59
12	Screening-FADII- <i>S.spinosa_Rev</i>	AGGAAAAGCGCGAAGTACC	Screening-Primer für Insert-Kontrolle <i>S.spinosa</i> -Cluster	56
13	Screening-pSET152_Rev	TAATGTGAGTTAGCTCACTC	Screening-Primer für Insert-Kontrolle der pSET152-Konstrukte	48

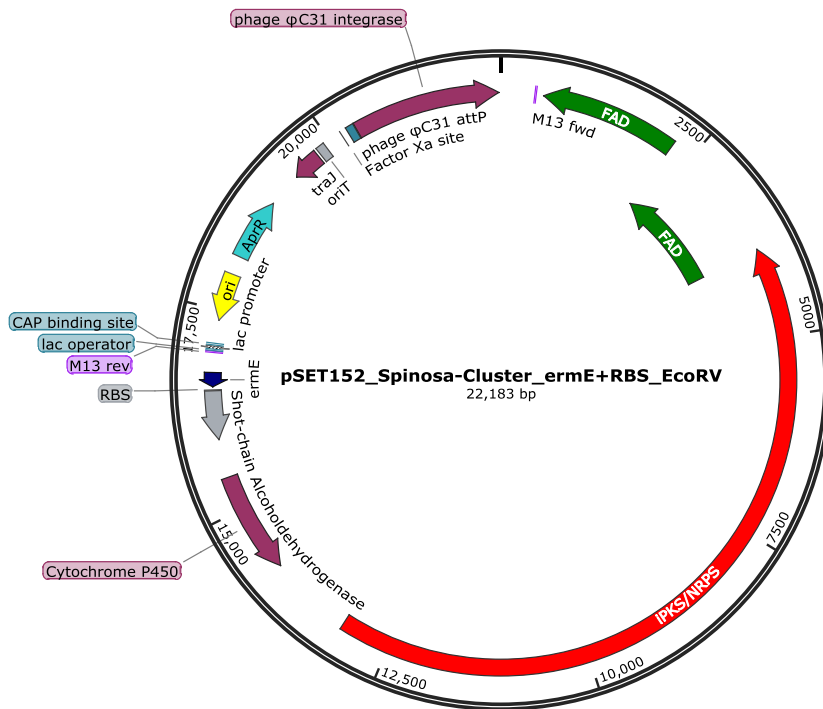
Groß geschriebene Nukleotide bei den Gibson-Assembly-Primern entsprechen dem Templat.

### 7.3.2.7) Vektorkarten

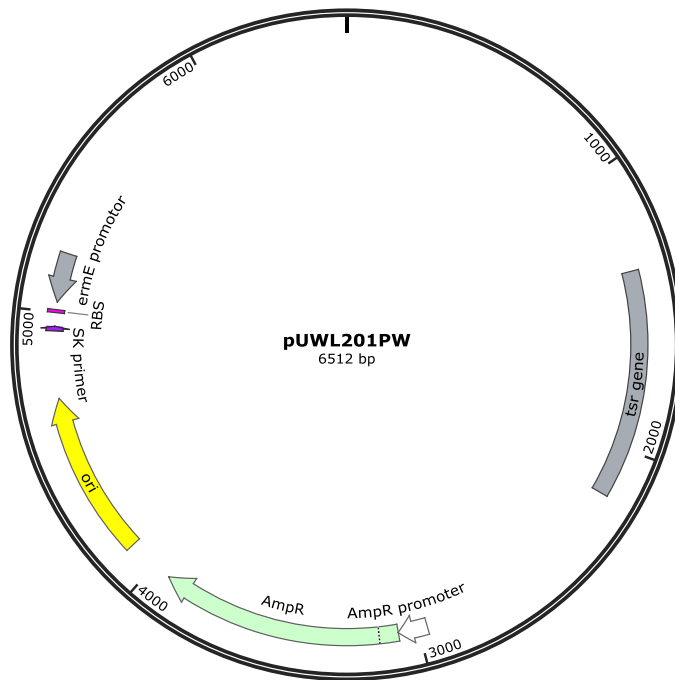
#### Vektorkarte pSET152-ermE-RBS-*S. degradans*



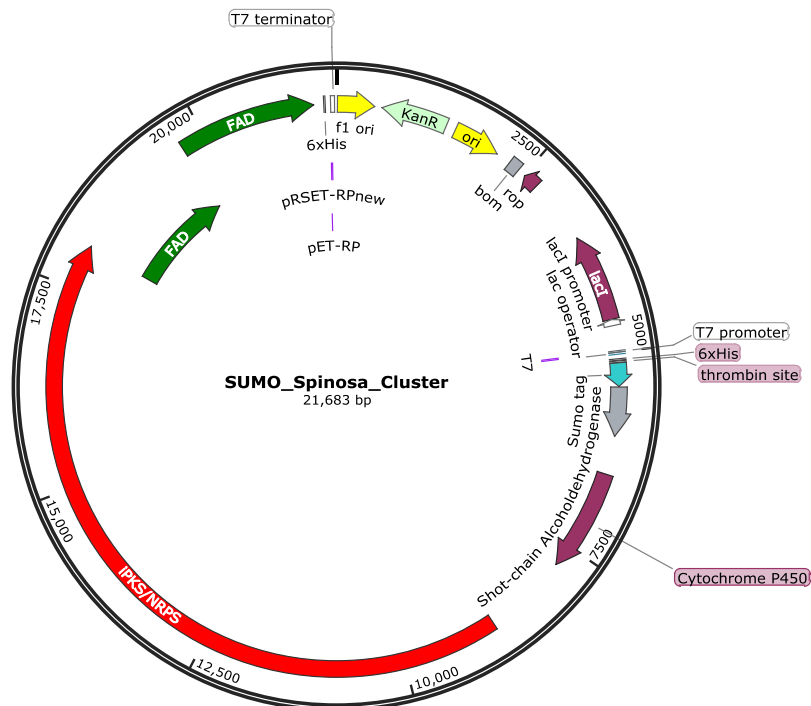
#### Vektorkarte pSET152-ermE-RBS-*S. spinosa*



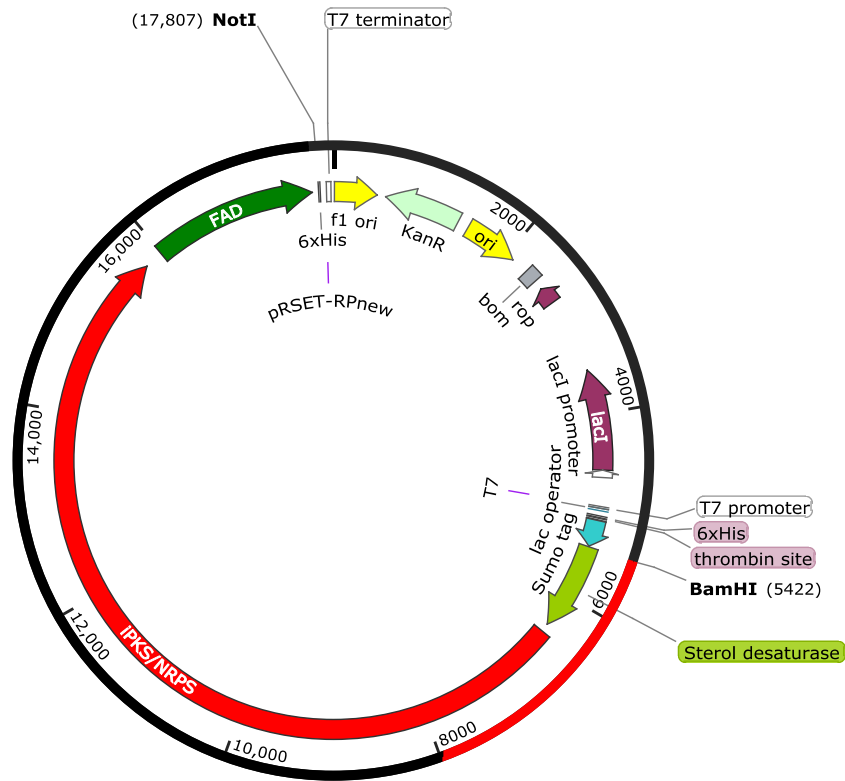
Vektorkarte von pUWL201PW



Vektorkarte von pET28b-SUMO-*S. spinosa*



Vektorkarte von pET28b-SUMO-*S. degradans*



**SUMO\_S-degradans\_Cluster\_full**  
17,977 bp

7.3.2.8) Sequenz- und Sequenzierungsdaten

Sequenzdaten vom *ermE*-RBS-Bereich aus pUWL201PW



**pUWL201PW (4999 .. 5440) ermE mit RBS**  
442 bp

GCCGTACGTCATCCCGGTGACGTACGGCGGGGGTTCGGTGACGTACGCGGCACGGCGGCCGGGGTTCGAAGCCGCGGGAGTAAT  
 CCTGGGATTACTCGCCGGGGTTCGGCCCCGCCGCACTTCGTGCAGGCGGTACCAGCCGACCCGAGCACGCGCCGGCAGCC  
 TGGTCGATGTCGGACCGAGTTCGAGGTACGCGGCTTCGAGGTCCAGGAAGGGGACGTCCATGCGAGTGTCCGTTTCGAGTGGC  
 GGCTTGCGCCCGATGCTAGTCGCGGTTGATCGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTCGATCTTGACGGCTGGCGAGAGGTGCGGGG  
 AGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGCACCGCGATGCTGTTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCGATCCACTA  
 GTTCTAGAAATAATTTTGTTTAACATTAAGAGGAGA



### **Endsequenzierung pSET152-*ermE*-RBS-*S. degradans***

Mit Primer 3.

TCTAGAGGATCCGTACGTATCCCGGTGACGTACGGCGGGGGTCCGGTACGTACGCGGCGACGGCGGCCGGGGTCTGAAGCCGC  
GGGAGTAATCCTGGGATTACTCGCCCGGGGTTCGGCCCCGCCGGCACTTCGTGCAGGCGGTACCAGCCCACCCGAGCACGCGC  
CGGCACGCCTGGTTCGATGTCGGACCGGAGTTCGAGGTACGCGGCTTGCAGGTCCAGGAAGGGGACGTCCATGCGAGTGTCCGT  
TCGAGTGGCGGCTTGCGCCGATGCTAGTCGCGGTTGATCGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTTCGATCTTGACGGCTGGCGAGA  
GGTGCGGGGAGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGCACCGCGATGCTGTTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATC  
GATCCACTAGTTCTAGAAATAATTTTGTTTAACATTTAAAGAGGAGAAATTACATACGTGGATACCTTAACCTCCCTCAGATACG  
CTCGATTTCAGGAATAGCTCAAGAACCAACTCCCCGCAAACAAAAACACCAAGACGTTTAGCTTTGCCACTTTGCTACGCCA  
CCTTTGTTACCCGCTACTTATGCTGGCCGTGTGCTTAACGTTATTTATTGGCTTTACGTTTGATATCGATTTTGGCTTGTGCA  
ACATGGTGTCTTCTGGTAGGCACTATTGCTACTTAGCGCTGTGCGAGCGGTTAATCCCCTATAAAAAGCAATGGCACCCAACT  
GCTAAAGAGTGGGGCCGAGACGCTATTTATTTAATTTCTCACTATGATGGGTGGTGCCTCTGCGGTAGCAGTGGTTTTTGC  
AGCAGCTGTAGTATCGCCAAAGGAATCTACTTTAGGACTATGGGGTAG

### **Endsequenzierung pSET152-*ermE*-RBS-*S. spinosa***

Mit Primer 13.

ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACATGATTACG  
AATTCGATGCCGTACGTATCCCGGTGACGTACGGCGGGGGTCCGGTACGTACGCGGCGACGGCGGCCGGGGTCTGAAGCCGCG  
GGAGTAATCCTGGGATTACTCGCCCGGGGTTCGGCCCCGCCGGCACTTCGTGCAGGCGGTACCAGCCCACCCGAGCACGCGCC  
GGCACGCCTGGTTCGATGTCGGACCGGAGTTCGAGGTACGCGGCTTGCAGGTCCAGGAAGGGGACGTCCATGCGAGTGTCCGTT  
CGAGTGGCGGCTTGCGCCGATGCTAGTCGCGGTTGATCGGCGATCGCAGGTGCACGCGGTTCGATCTTGACGGCTGGCGAGAG  
GTGCGGGGAGGATCTGACCGACGCGGTCCACACGTGGCACCGCGATGCTGTTGTGGGCACAATCGTGCCGGTTGGTAGGATCG  
ATCCACTAGTTCTAGAAATAATTTTGTTTAACATTTAAAGAGGAGATATCGCGCGCATGCGCATTTGGCTGGTAACCGGCGCGT  
CGCGCGGGTTGGGGTTCGGCGCTCGTTCACGCGGTGCTGGCGGGAGGGGACGCGGTGGTAGCCACAGCCCAGTTCCCGAGCAC  
ATCGCCGCTACCTCGCCGGGAAATGAGCAGCGGCTGCTCAGGTGCCGCTTTGACGTCACCGATCCGGACACCGTGGCGACGGC  
GGTTGCGGC

#### 7.4 Kopie von Publikation 3 mit Supporting Information (vgl. 4.2.1)

Der folgende Publikationsentwurf wird in Kürze eingereicht:

**J. Antosch**, J. Wiese, J. F. Imhoff, H.-P. Fiedler, T. A. M. Gulder, Structure and biological activity of cycloheptamycin. Geplant für *Org. Biomol. Chem.*

## 7.4.1 Unveröffentlichte Ergebnisse zur Identifizierung von Cycloheptamycin-Derivaten aus *Streptomyces* sp. Tü6314

7.4.1.1) Generelle Instruktionen

7.4.1.2) Tabelle der MS/MS-Fragmente

7.4.1.3) <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

7.4.1.4) Putatives PTM-Cluster aus *Streptomyces* sp. Tü6314

### **7.4.1.1) Generelle Instruktionen**

#### **7.4.1.1.1) Fermentation der Cycloheptamycin-Derivate**

*Streptomyces* sp. Tü6314 wurde uns von Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler (Universität Tübingen) exklusiv für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt.

#### **7.4.1.1.2) NMR-Analytik**

Für die Aufnahme der <sup>1</sup>H-Spektren wurde das NMR Avance DMX400 (400MHz) der Firma Bruker genutzt. Gelöst wurden die Proben in deuteriertem Methanol. Alle Spektren entstanden bei Raumtemperatur. Die Verschiebungen  $\delta$  sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf das nicht vollständig deuterierte Lösungsmittel, das als interner Standard diente MeOH ( $\delta = 3.31$  ppm).

#### **7.4.1.1.3) LC-MS- und MS/MS-Analytik**

HPLC-MS-Analysen wurden unter Verwendung eines Agilent 1200 Serie HPLC-System mit einem MicroQ-TOF-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH) mit Apollo-ESI-Quelle gekoppelt durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte mit der Software Hystar (Bruker) und die interne Kalibrierung mit Natriumformiat. Die Massengenauigkeit betrug 5 ppm. Die Interpretation der Ergebnisse entstand mit der Bruker-Datenanalyse-Software (Version 4.0). Die chromatographische Trennung resultierte auf einer Eurospher-II C-8 HPLC-Säule (100 x 3 mm, 5  $\mu$ m Partikelgröße) unter Verwendung des folgenden Gradienten mit Wasser (A) und Acetonitril (B) als Eluenten, beide mit 0.05 % TFA gepuffert: Gradient von 0 bis 10 min von 40 % B bis 100 % B bei 1 mL/ min, bis 14 min, 100 % B, ab 14.5 min 40 % B, ab 18 min, 40 % B, bei einer erhöhten Flussrate von 3 mL/ min. Für die MS/MS-Analytik wurde eine Kollisionsenergie von 30 eV bis 45 eV im positiven Modus genutzt.

#### **7.4.1.1.4) Semi-präparative HPLC-Trennung**

Semi-präparative HPLC-Trennungen erfolgten an einer HPLC-Anlage der Firma Knauer. Verwendet wurde das System RHEA, ein semi-präparatives Hochdruckgradientensystem der „Smartline“-Serie. System-Komponenten sind: 2-Kanal-Online-Degasser, 2 Pumpen S-1000 mit 50 mL Pumpenköpfen (Edelstahl/Titan), Assistent 6000 mit Feedpumpe S-100 und elektronischem Injektionsventil (6 Port), Statische Mischkammer "Smartmix 350", UV-Detektor S-2500 und ein elektrisches 16-Port-1-Kanal-Schaltventil zur Fraktionssammlung.

Säule: KNAUER Eurospher-II 100 RP C-18; 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 16 mm mit Vorsäule 30 x 16 mm

Wellenlänge: 225 nm; 245 nm; 275 nm; 330 nm

Probe: ca. 550 mg eingeeingter Fermentationsextrakt gelöst in 4125  $\mu\text{L}$  MeOH

Injektionsvolumen: 750  $\mu\text{L}$

Eluent: Acetonitril (B); Wasser PureLab (A)

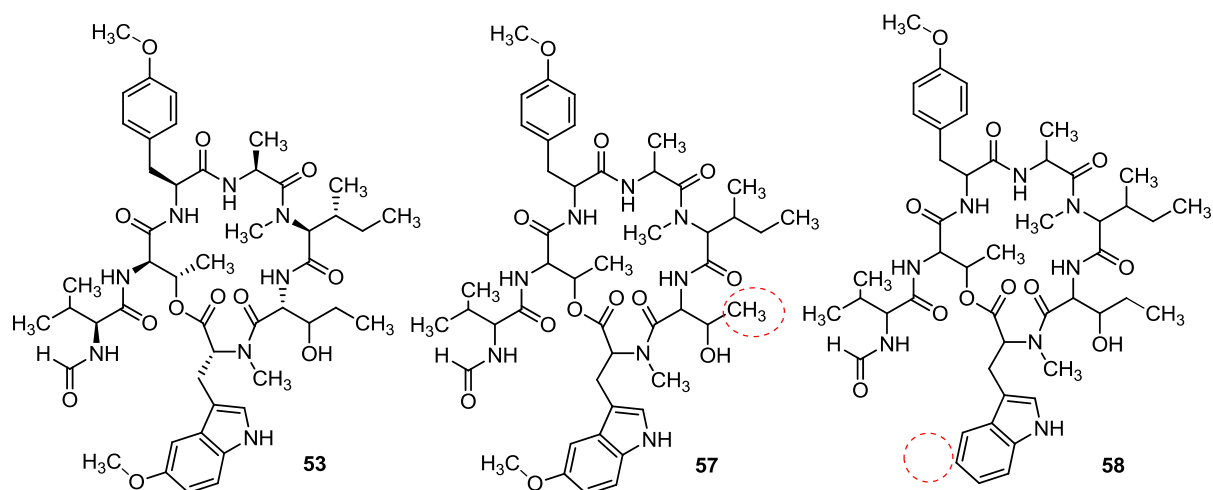
Gradient: 0 min 30 % (B), 25 min 70 % (B), 28 min 100 % (B), 33 min 100 % (B)

Flussrate: 16 mL/ min

Die gesammelten Fraktionen mit der Retentionszeit ( $R_t$ ) 16.67 min, 21.4 min und 22.51 min wurden am Rotationsdampfer eingeeingt. Das restliche Wasser wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Die Reinsubstanz ( $R_t = 21,4$  min) wurde als Cycloheptamycin (**53**) identifiziert. Neben dem Hauptpeak konnten zwei weitere Signale isoliert und als Derivate von Cycloheptamycin identifiziert werden. Im Folgenden werden diese Derivate als **58** ( $R_t = 16.67$  min) und **57** ( $R_t = 22.51$  min) beschrieben (Tabelle 12, Abbildung 66).

**Tabelle 12.** Auflistung der Derivate von Cycloheptamycin.

	<b>Derivate von Cycloheptamycin</b>	<b>Masse</b>
<b>58</b>	Fehlende Methoxygruppe am Tryptophan	941.4659
<b>57</b>	Fehlende Methylgruppe am $\beta$ -Hydroxy-Norvalin	957.4672



**Abbildung 66.** Strukturen der Cycloheptamycin-Derivate **57** und **58**. Positionen der fehlenden Gruppen im Bezug zu Cycloheptamycin (**53**) sind rot umkreist.

Mit Hilfe von LC-MS/MS-Experimenten konnten die einzelnen Massen der Aminosäuren, in den Cycloheptamycin-Derivaten, bestimmt werden. Dadurch konnten die Unterschiede im Bezug zu Cycloheptamycin identifiziert werden. Das Derivat **57** enthält kein  $\beta$ -Hydroxy-Norvalin, stattdessen inkorporiert es Threonin (Abbildung 67). **58** besitzt keine Methoxygruppe am Tryptophan (Abbildung 68). Von **58** konnten nur sehr geringe Mengen isoliert und auch durch wiederholte Fermentation, unter gleichen Bedingungen, nicht wieder entdeckt werden. Die Ausbeute von **57** variierte innerhalb verschiedener Fermentationsansätzen. Aus einem 1 L-Fermentationsansatz wurden ca. 5-10 mg Substanz erhalten.

#### 7.4.1.2) Liste der Fragmente aus der MS/MS-Analyse

Aminosäuren-Code: W' = 4-Methoxy-Tryptophan; X = Ethyl-Serin; V = Valin; T = Threonin; I = Isoleucin; A = Alanin; Y = Tyrosin

**Tabelle 13.** Fragmente aus LC-MS/MS-Experiment von Cycloheptamycin (53).

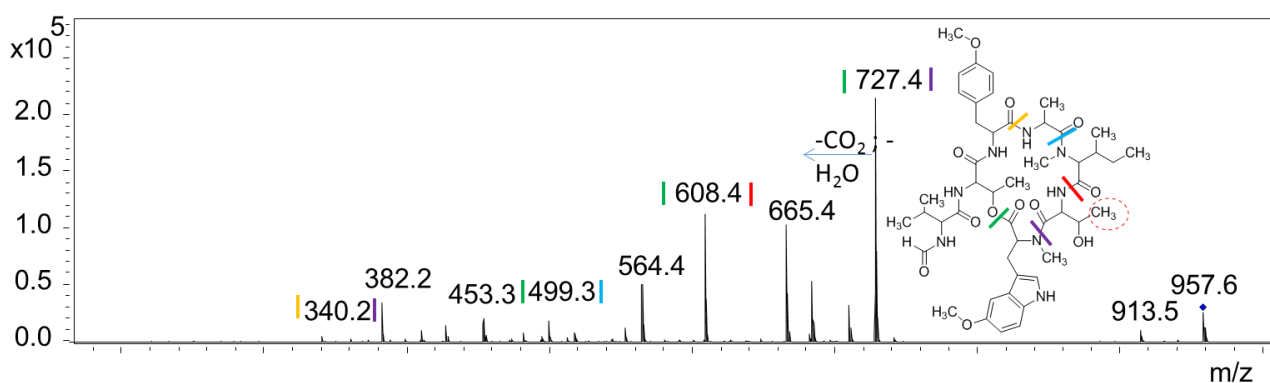
m/z 971.4:	Natriumaddukt-Ion des Moleküls HCO-V-T-Y'-A-I'-X-(W') $[M + Na]^+$
m/z 913.4:	(Fragment 1); entstanden durch Abspaltung von $C_3H_6O$ aus dem Molekül-Ion $[M + Na - C_3H_6O]^+$
m/z 741.4:	(Fragment 2); entstanden durch Abspaltung von Tryptophan $C_{13}H_{14}N_2O_2$ (W') aus dem Molekül-Ion $[HCO-V-T-Y'-A-I'-X + Na]^+$
m/z 679.4:	(Fragment 3); entstanden durch Abspaltung von $CO_2$ und $H_2O$ aus Fragment 2 $[HCO-V-T-Y'-A-I'-X - CO_2 - H_2O + Na]^+$
m/z 608.3:	(Fragment 4); entstanden durch Abspaltung von [X] und $H_2O$ aus Fragment 3 $[HCO-V-T-Y'-A-I' - H_2O + Na]^+$
m/z 499.2	(Fragment 5); entstanden durch Abspaltung von [I'] aus Fragment 4 $[HCO-V-T-Y'-A + Na]^+$
m/z 354.2	(Fragment 6); $[A-I'-X + H_2O + Na]^+$

**Tabelle 14.** Fragmente aus LC-MS/MS-Experiment von 57.

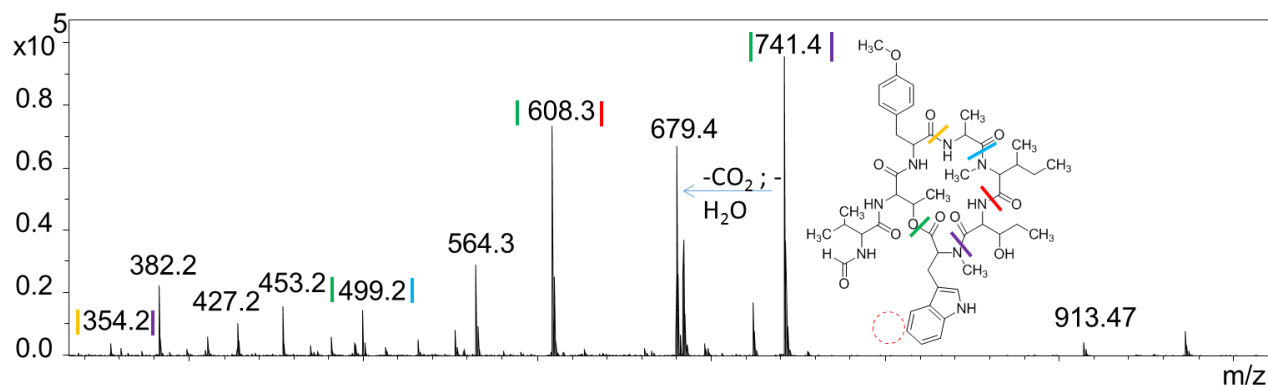
m/z 957.4:	Natriumaddukt-Ion des Moleküls HCO-V-T-Y'-A-I'-T-(W') $[M + Na]^+$
m/z 913.4:	(Fragment 1); entstanden durch Abspaltung von $C_3H_6O$ aus dem Molekül-Ion $[M + Na - C_3H_6O]^+$
m/z 727.3:	(Fragment 2); entstanden durch Abspaltung von 4-Methoxy-Tryptophan $C_{13}H_{14}N_2O_2$ (W') aus dem Molekül-Ion $[HCO-V-T-Y'-A-I'-T + Na]^+$
m/z 665.3:	(Fragment 3); entstanden durch Abspaltung von $CO_2$ und $H_2O$ aus Fragment 2 $[HCO-V-T-Y'-A-I'-T - CO_2 - H_2O + Na]^+$
m/z 608.3:	(Fragment 4); entstanden durch Abspaltung von [T] und $H_2O$ aus Fragment 3 $[HCO-V-T-Y'-A-I' - H_2O + Na]^+$
m/z 499.2	(Fragment 5); entstanden durch Abspaltung von [I'] aus Fragment 4 $[HCO-V-T-Y'-A + Na]^+$
m/z 340.2	(Fragment 6); $[A-I'-T + H_2O + Na]^+$

**Tabelle 15.** Fragmente aus LC-MS/MS-Experiment von **58**.

m/z 941.4:	Natriumaddukt-Ion des Moleküls HCO-V-T-Y'-A-I'-X-W [M + Na] <sup>+</sup>
m/z 902.4:	(Fragment 1); entstanden durch Abspaltung von C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O aus dem Molekül-Ion [M + Na - C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>
m/z 741.4:	(Fragment 2); entstanden durch Abspaltung von Tryptophan C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> W aus dem Molekül-Ion [HCO-V-T-Y'-A-I'-X + Na] <sup>+</sup>
m/z 665.3:	(Fragment 3); entstanden durch Abspaltung von CO <sub>2</sub> und H <sub>2</sub> O aus Fragment 2 [HCO-V-T-Y'-A-I'-X - CO <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> O + Na] <sup>+</sup>
m/z 608.3:	(Fragment 4); entstanden durch Abspaltung von [X] und H <sub>2</sub> O aus Fragment 3 [HCO-V-T-Y'-A-I'- H <sub>2</sub> O + Na] <sup>+</sup>
m/z 499.2	(Fragment 5); entstanden durch Abspaltung von [I'] aus Fragment 4 [HCO-V-T-Y'-A + Na] <sup>+</sup>
m/z 354.2	(Fragment 6); [A-I'-X + H <sub>2</sub> O + Na] <sup>+</sup>

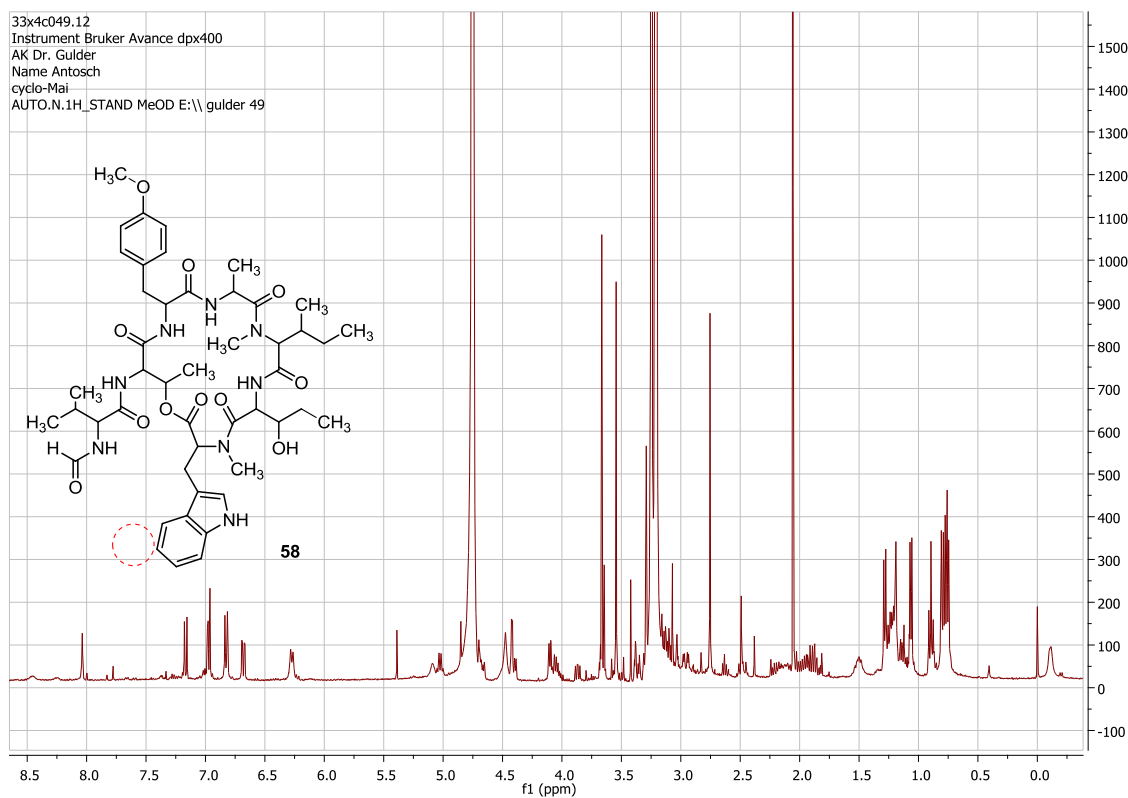
**Ausschnitte der MS/MS-Spektren von 57 und 58****Abbildung 67.** Darstellung der einzelnen Massenfragmente von **57**. Die farbigen Striche markieren das jeweilige Fragment. Der linke Strich neben der Massenzahl stellt den Anfang dar. Im Uhrzeigersinn wird das Fragment bis zum rechten Strich neben der Massenzahl dargestellt.



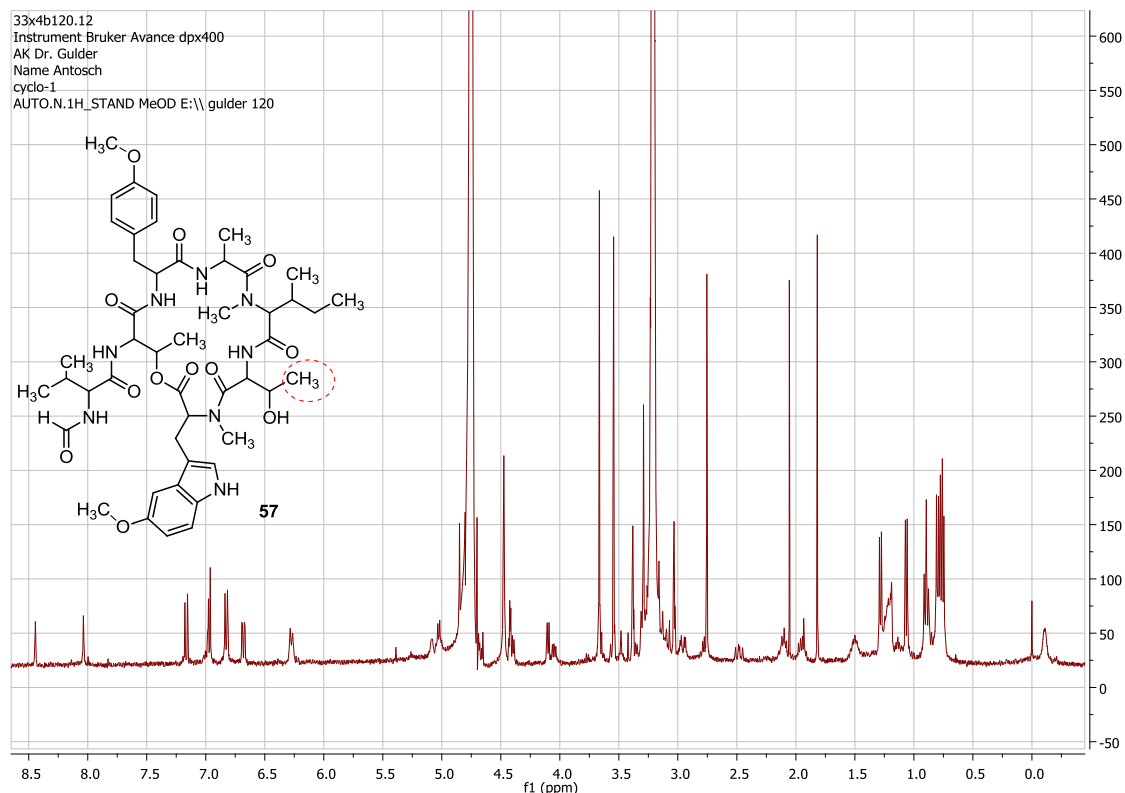


**Abbildung 68.** Darstellung der einzelnen Massenfragmente von **58**. Die farbigen Striche markieren das jeweilige Fragment. Der linke Strich neben der Massenzahl stellt den Anfang dar. Im Uhrzeigersinn wird das Fragment bis zum rechten Strich neben der Massenzahl dargestellt.

### 7.4.1.3) $^1\text{H-NMR}$ -Spektren



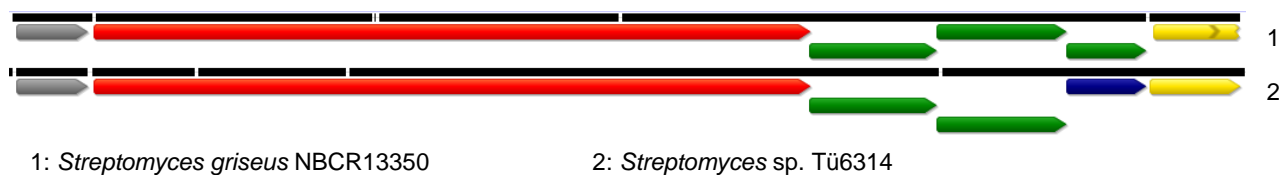
**Abbildung 69.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **58** in MeOD (1 mg/mL). Bereich der fehlenden Methoxygruppe in Bezug zu Cycloheptamycin ist rot markiert.



**Abbildung 70.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **57** in MeOD (1 mg/ mL). Bereich der fehlenden Methylgruppe in Bezug zu Cycloheptamycin ist rot markiert.

#### 7.4.1.4) Putatives PTM-Cluster aus *Streptomyces* sp. Tü6314

Das putative PTM-Biosynthesecluster aus *Streptomyces* sp. Tü6314 stimmt in großen Bereichen mit dem bereits bekannten PTM-Cluster aus *Streptomyces griseus* überein (Abbildung 71).



**Abbildung 71.** Sequenzvergleich mit GENEIOUS (Version 8.1.6) von dem putativen PTM-Cluster aus *Streptomyces* sp. Tü6314 und dem PTM-Cluster aus *Streptomyces griseus*. Der Farbcode entspricht: Grau: PTM-Hydroxylase; rot: PKS-NRPS; grün: FAD-abhängige Oxidoreduktase; blau: Alkohol-Dehydrogenase; gelb: Cytochrom P450-Enzym. Die schwarzen Linien zeigen homologe Sequenzen an. Lücken in der Linie werden ab drei unterschiedlichen Basenpaaren zwischen den Clustern angezeigt.

## 7.5 Experimentelle Details zur Isolierung von Naturstoffen aus RV77, RV8 und RV15 (vgl. 4.2.2)

### 7.5.1) Generelle Instruktionen

### 7.5.2) Naturstoffisolierung aus *Rhodococcus* RV77 und RV8

### 7.5.3) Naturstoffisolierung aus *Streptomyces lincolnensis* RV15

### 7.5.4) <sup>1</sup>H-NMR-Spektren

### **7.5.1) Generelle Instruktionen**

#### **7.5.1.1) Herkunft der Extrakte**

Die untersuchten Extrakte aus *Rhodococcus opacus* B-4 (RV77) und *Rhodococcus fascians* (RV8), sowie aus *Streptomyces lincolnensis* RV15 stammten von Herrn Dr. Usama Abdelmohsen (Gruppe von Frau Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida, Universität Würzburg). Von RV77, RV8 und RV15 wurde jeweils der Ethylacetat-Extrakt untersucht.

#### **7.5.1.2) LC-MS-Analytik**

HPLC-MS-Analysen wurden unter Verwendung eines Agilent 1200 Serie HPLC-System, gekoppelt mit einem MicroQ-TOF-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Bruker Daltonics GmbH) mit Apollo-ESI-Quelle, durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte mit der Software Hystar (Bruker) und die interne Kalibrierung mit Natriumformiat. Die Massengenauigkeit betrug 5 ppm. Die Interpretation der Ergebnisse entstand mit der Bruker-Datenanalyse-Software (Version 4.0). Die chromatographische Trennung resultierte auf einer Eurospher-II C-8 HPLC-Säule (100 x 3 mm, 5 µm Partikelgröße) unter Verwendung des folgenden Gradienten mit Wasser (A) und Acetonitril (B) als Eluenten, beide mit 0.05 % TFA gepuffert: Gradient 0 bis 10 min von 40 % B bis 100 % B bei 1 mL/ min, bis 14 min 100 % B, ab 14.5 min auf 40 % B bis 18 min, bei einer erhöhten Flussrate von 3 mL/ min.

#### **7.5.1.3) Semi-präparative HPLC**

Semi-präparative HPLC-Trennungen erfolgten an einer HPLC-Anlage der Firma Knauer. Verwendet wurde das System RHEA, ein semi-präparatives Hochdruckgradientensystem der „Smartline“-Serie. Die System-Komponenten sind: 2-Kanal-Online-Degasser, 2 Pumpen S-1000 mit 50 mL Pumpenköpfen (Edelstahl/Titan), Assistent 6000 mit Feedpumpe S-100 und elektronischem Injektionsventil (6 Port), Statische Mischkammer "Smartmix 350", UV-Detektor S-2500, sowie ein elektrisches 16-Port-1-Kanal-Schaltventil zur Fraktionssammlung.

### **7.5.2) Naturstoffisolierung aus *Rhodococcus* RV77 und RV8**

Die Vortrennung des Ethylacetat-Rohextraktes entstand über Größenausschlusschromatographie mit Sephadex® LH-20. Als Eluent wurde Methanol verwendet. Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von ca. 3 cm und eine Länge von ca. 28 cm. Zur Probenauftragung wurden ca. 1 g des Ethylacetat-Rohextraktes in 1-1,5 mL Methanol gelöst.

Die Flussrate betrug ca. 5 mL/ min und die Fraktionsgröße ca. 14 mL. Die Fraktionen der RV77-Extrakt-Auftrennung 6-8 und die Fraktionen der RV8-Extrakt-Auftrennung 13-19 wurden

entsprechend ihrer Dünnschichtchromatogramme (DC) vereinigt und zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt.

DC-Bedingungen: Silicagelplatten (Merck),  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1, v:v), Färbemittel: Anisaldehyd- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Reagenz erhitzt mit einem Heißluftfön für zwei Minuten.

### **Semi-präparative HPLC-Trennung RV77**

Säule: KNAUER Eurospher-II 100-5 RP-Phenyl; 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 16 mm mit Vorsäule 30 x 16 mm

Wellenlänge: 210 nm, 230 nm, 280 nm

Probe: ca. 80 mg gelöst in 350  $\mu\text{L}$  MeOH

Injektionsvolumen: 50  $\mu\text{L}$

Eluent: Acetonitril (B) + 0.05 % TFA; Wasser (A) PureLab + 0.05 % TFA

Isokratische Trennung: 10 % (B), 28 min

Flussrate: 15 mL/ min

### **Semi-präparative HPLC-Trennung RV8**

Säule: KNAUER Eurospher-II 100 RP C-18A; 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 16 mm mit Vorsäule 30 x 16 mm

Wellenlänge: 205 nm, 220 nm, 276 nm

Probe: ca. 30 mg gelöst in 300  $\mu\text{L}$  MeOH

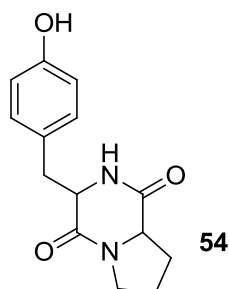
Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{L}$

Eluent: Acetonitril (B) + 0.05 % TFA; Wasser (A) PureLab + 0.05 % TFA

Gradient: 0 min 0 % (B); 15 min 70 % (B); 16 min 0 % (B); 20 min 0 % (B)

Flussrate: 15 mL/ min

Eine Substanz mit der Retentionszeit 15.36 Minuten bei RV77 6-8 und 8.46 Minuten bei RV8 13-19 wurde mittels semi-präparativer HPLC isoliert und strukturell untersucht. Es stellte sich heraus, dass es sich bei beiden Isolaten um Cyclo(prolyltyrosyl), einem Diketopiperazin, handelte (Abbildung 72).



**Abbildung 72.** Struktur von Cyclo(prolyltyrosyl) (**54**), einem Diketopiperazin, isoliert aus RV77 und RV8.

### 7.5.3) Naturstoffisolierung aus Actinomycet RV15

Der RV15-Ethylacetat-Extrakt wurde in Methanol gelöst und anschließend dreimal mit Cyclohexan extrahiert. Die gesammelten methanolischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

#### Semi-präparative HPLC-Trennung

Säule: KNAUER Eurospher-II 100-5 RP-Phenyl; 5 µm; 250 x 16 mm mit Vorsäule 30 x 16 mm

Wellenlänge: 220 nm; 254 nm; 330 nm; 410 nm

Probe: ca. 850 mg gelöst in 3000 µL MeOH

Injektionsvolumen: 300 µL

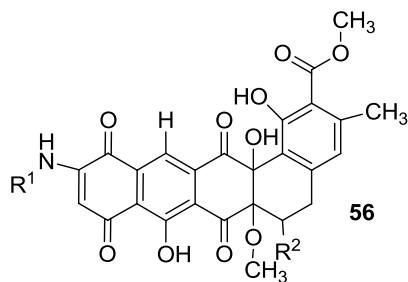
Eluent: Acetonitril (B) + 0.05 % TFA; Wasser (A) PureLab + 0.05 % TFA

Gradient: 0 min 40 % (B); 6 min 40 % (B); 26 min 45 % (B); 30 min 45 %

Flussrate: 15 mL/ min

Die Substanzen mit den Retentionszeiten: 14.8 min, 16.1 min, 16.6 min, 21.9 min, 22.1 min und 22.8 min wurden mittels semi-präparativer HPLC isoliert und strukturell untersucht. Die MS- und

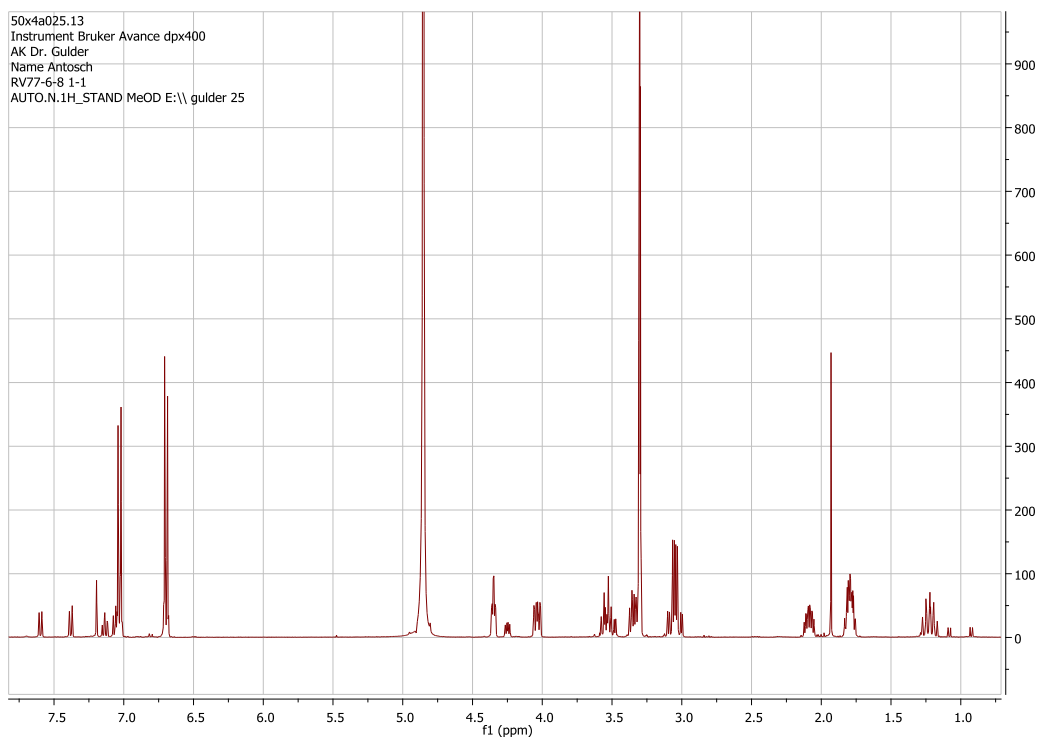
NMR-Analysen zeigten, dass es sich bei diesen Isolaten um die bereits bekannten SF2446-Antibiotika A1, A2, A3, B1, B2 und B3 handelte (Abbildung 73, Tabelle 16).<sup>121</sup>



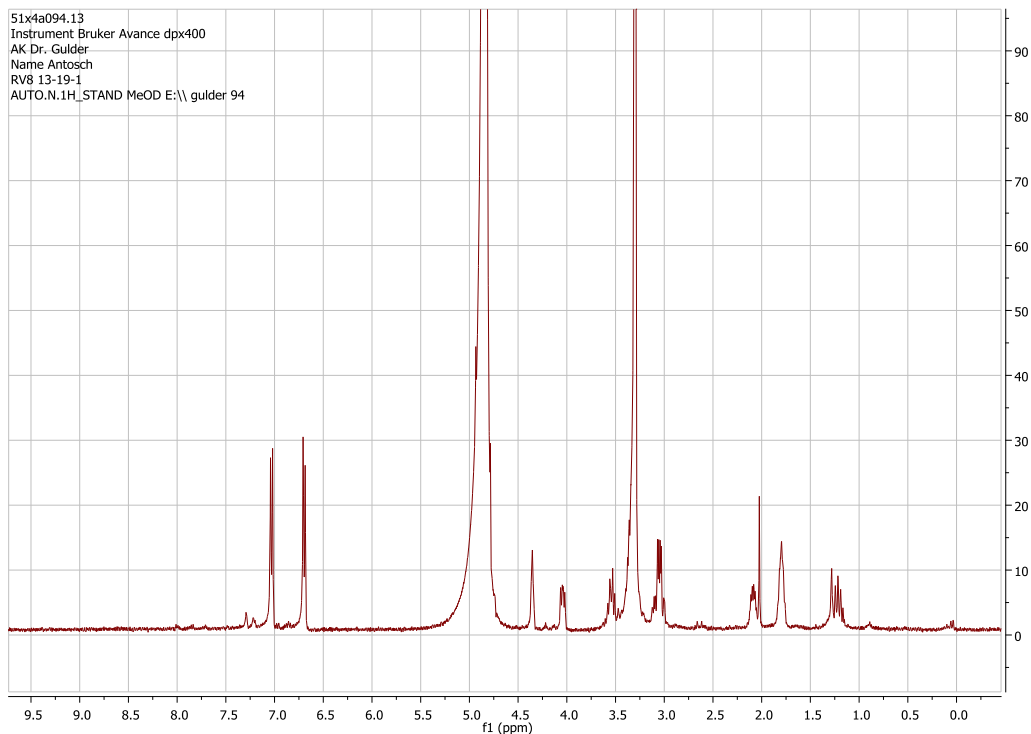
**Abbildung 73.** Allgemeine Struktur der SF2446-Antibiotika (**56**).<sup>121</sup>

**Tabelle 16.** Substituenten der Substanzen SF2446 A1, A2, A3, B1, B2 und B3.

Bezeichnung	R1	R2	Molare Masse [g/mol]
A1		OH	697.64
A2		OH	697.64
A3	H	OH	523.45
B1		H	681.64
B2		H	681.64
B3	H	H	507.45

7.5.4)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren

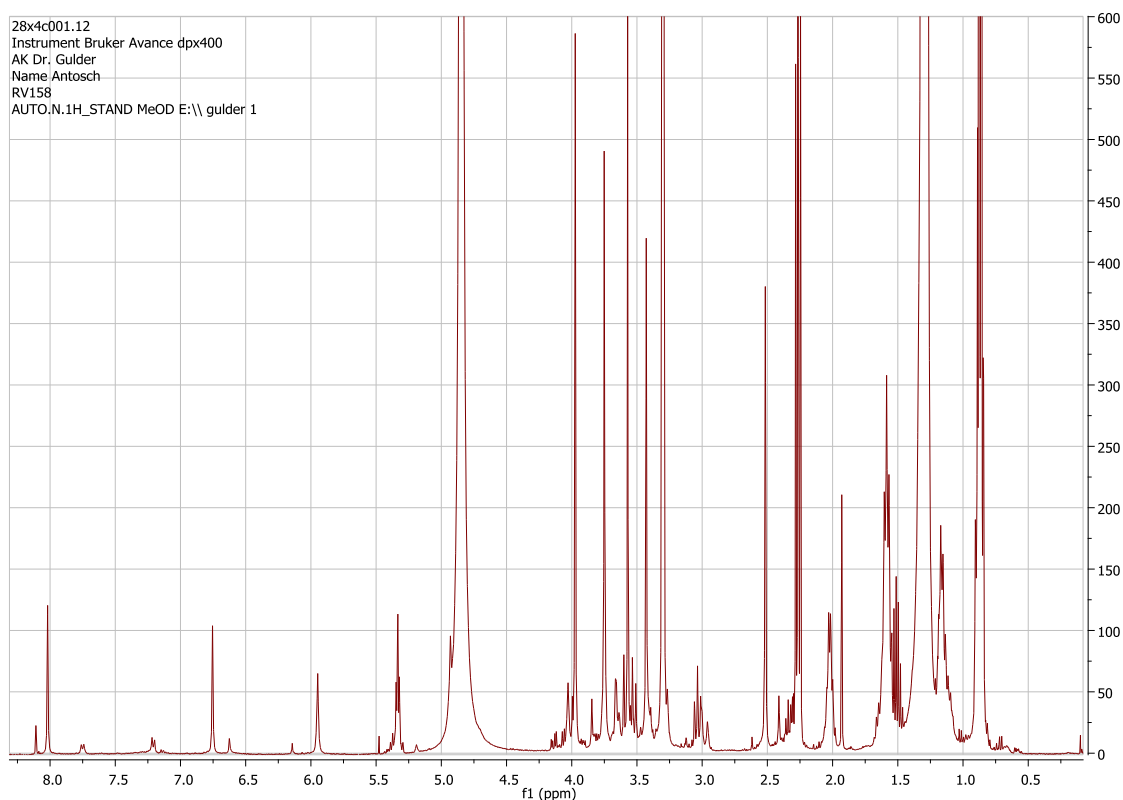
**Abbildung 74.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Isolats aus RV77 Fraktion 6-8. Die Substanz entspricht Cyclo(propyltyrosyl) (**54**).



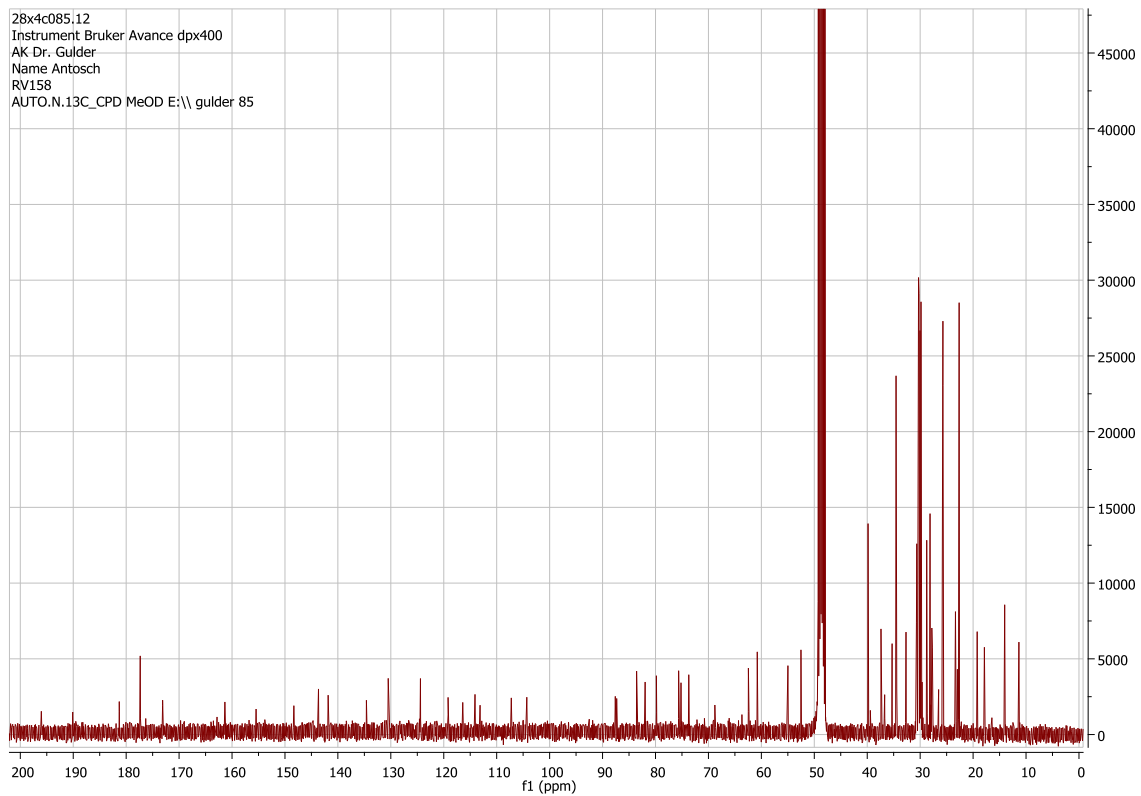
**Abbildung 75.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Isolats aus RV8 Fraktion 13-19. Die Substanz entspricht Cyclo(propyltyrosyl) (**54**).



Von den Naturstoffisolaten aus RV15 2-8 wurde nur von RV15-8 NMR-Spektren dargestellt, da diese Substanz eine hohe Reinheit aufwies (Abbildung 76 und Abbildung 77). RV15-8 konnte dem bekannten SF2446-Antibiotika A1 oder A2 zugeordnet werden (Masse 698.3 [M+H]<sup>+</sup>). Die Isolate 2 bis 7 wurden aufgrund ihrer Massendaten zu den SF2446 A3, B1/B2 und B3 zugeordnet. Die Bestimmung der Stereoisomere SF2446 A1 und A2, sowie B1 und B2 konnte mit der Massen-Analyse nicht getroffen werden. Da diese Naturstoffe bereits bekannt waren, wurden keine weiteren NMR-Untersuchungen, zum Beispiel NOESY-Experimente (Nuclear Overhauser Enhancement Spektroskopie), zur Bestimmung der Stereozentren unternommen.



**Abbildung 76.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Isolats RV15-8, welches SF2446 A1 oder A2 entspricht.



**Abbildung 77.**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Isolats RV15-8, welches SF2446 A1 oder A2 entspricht.

## 7.6 Erlaubnisscheine der Verlage

### **Erlaubnisschein für Publikation aus 4.1.1**

J. Antosch, F. Schaefer, T.A.M. Gulder, Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3011-3014.

Copyright 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Reproduced with permission number 3693060632458 from August 20<sup>th</sup> 2015. DOI: 10.1002/anie.201310641. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201310641/abstract>

### **Erlaubnisschein für Publikation aus 4.1.2**

Greunke, C.;<sup>1</sup> Antosch, J.;<sup>1</sup> Gulder, T. A. M. Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5334-6. Published by The Royal Society of Chemistry.

[This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. Material from this article can be used in other publications provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material and it is not used for commercial purposes.]

## 8. Bibliographische Daten

### 8.1 Liste der Promotionsrelevanten Publikationen

- 2014 J. Antosch, F. Schaefers, T.A.M. Gulder, Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3011-3014.
- 2015 Greunke, C.;<sup>1</sup> Antosch, J.;<sup>1</sup> Gulder, T. A. M. Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5334-6.
- 2015 J. Antosch, J. Wiese, J. F. Imhoff, H.-P. Fiedler, T. A. M. Gulder, Structure and biological activity of cycloheptamycin. Geplant für *Org. Biomol. Chem.* (wird in Kürze eingereicht)
- 2015 Greunke, C.; Antosch J.; Gulder, T. A. M. One-pot enzymatic total synthesis of ikarugamycin, in preparation.

1: gleich gestellte Erstauthoren

### 8.2 Vorträge und Posterpräsentationen

- 2012 Poster und Vortrag: VAAM-International Workshop: Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria and Fungi, Braunschweig  
Titel: Identification and Isolation of cycloheptamycins A-C.
- 2015 Vortrag auf der Tagung: “Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie”, Max-Planck-Institut für Chem. Ökologie, Jena  
Titel: Understanding and Applying PTM Biosynthetic Logic.
- 2015 Poster: GDCh-Wissenschaftsforum Chemie, Dresden  
Titel: Heterologous Expression and Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams.

### 8.3 Tabellarischer Lebenslauf

#### **Janine Antosch**

Kreillerstraße 25  
81673 München  
Deutschland

Telefon: +49 (0)228 9452230  
Mobiltelefon: +49 (0)1577 2535867

E-Mail: [janine@antosch.biz](mailto:janine@antosch.biz)

Geburtstag: 25.05.1987

Geburtsort: Mülheim an der Ruhr, Deutschland

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Familie: Wolfgang und Margit Antosch (GeschäftsführerIn Maschinenbau Karp), Marina Antosch (Maschinenbauingenieurin), Max Antosch (Mechatroniker)



#### **Ausbildung**

---

22/04/2014-02/2016 **Promotion**

Technische Universität München (TUM)  
Fakultät für Chemie  
Fachgruppe Biosystemchemie

Mitgliedschaft TUM Graduate School

11/2012-04/2014 **Promotion**

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
Kekulé -Instiut für Organische Chemie und Biochemie  
Arbeitskreis: Biosystemchemie, Prof. Dr. Tobias Gulder

10/2011-11/2012

**Wissenschaftliche Mitarbeiterin**

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
Kekulé-Instiut für Organische Chemie und Biochemie  
Arbeitskreis: Prof. Dr. Tobias Gulder

## Lebenslauf

---

- 10/2009-09/2011      **Master Studium Arzneimittelforschung**  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
Masterarbeit: „Bioaktive Inhaltsstoffe aus *Peganum harmala*: Isolierung und pharmakologische In-vitro-Testung“. Abschlussnote: 1,3
- 09/2006 – 08/2009      **Bachelor Studium Chemie und Biotechnologie**  
Hochschule Niederrhein, Krefeld  
Bachelorarbeit: „Etablierung einer Leitsubstanz aus *Plantago ovata* Forssk. Zur Quantifizierung im Fertigarzneimittel“. Durchgeführt bei der Rottapharm/Madaus GmbH im Bereich Pharmazeutische Entwicklung, Troisdorf.  
Abschlussnote: 1,4
- 09/2003 – 06/2006      **Fachhochschulreife**  
Goldenberg Berufskolleg, Wesseling. Abschlussnote: 1,6
- 09/2003 – 06/2006      **Ausbildung zur Chemielaborantin**  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
Institut für Organischen Landbau. Abschlussnote: 1,4 (92%)
- 09/1997-06/2003      **Mittlere Reife**  
Realschule der Ursulinen in Hersel
- 08/1993-08/1997      **Katholische Grundschule**  
Niederkassel-Mondorf

## Praktika

---

- 02/2011-03/2011      **Healthecon in Basel**  
Evidenzbasierte Medizin
- 08/2010-09/2010      **Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte**  
Klinische Prüfungen von Arzneimitteln
- 03/2009- 09/2009      **Madaus GmbH**  
Pharmazeutische Entwicklung
- 08/2008 – 09/2008      **Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**  
Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Technologie
- 07/2007 – 08/2007      **Stiftung Caesar in Bonn**  
Arbeitsgruppe Functional Peptide
- 01/2006 – 02/2006      **Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**  
Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften

## Lebenslauf

---

10/2004 – 02/2005      **Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**  
Pharmazeutisches Institut, Pharmazeutische Chemie

## Stipendien

---

03/2011-04/2011      **NRW-Forschungs-Stipendium**  
**Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Fachbereich  
pharmazeutische Chemie**  
Enzym-Assay Testung von Extraktfraktionen an der gewebsunspezifischen  
Alkalischen Phosphatase

11/2012-11/2014      **Fonds der chemischen Industrie Stipendium**

08/2012-08/2013      **e-fellows-Stipendium**

09/2015-12/2015      **DAAD Kurzstipendium für Doktoranden**, Praktikum im Arbeitskreis von Prof.  
B. Neilan: Laboratory of Microbial and Molecular Diversity, University of New  
South Wales, Sydney.

## Nebentätigkeiten

---

09/2008-02/2009      **Studentische Hilfskraft im Fachbereich Chemie**  
**Hochschule Niederrhein, Krefeld**  
Messung wässriger Proben (Atomabsorptionsspektroskopie,  
Ionenaustauschchromatographie)

Seit 07/2007          **Kaufmännisch / Technische Aushilfstätigkeit**  
**Maschinenbau Karp GmbH, Niederkassel**  
Qualitäts-Kontrolle wassermischbarer Kühlschmierstoffe, Daten- und  
Zeichnungsarchivierung, Neukunden-Akquise

## Poster/Vorträge

---

2012                      Poster und Vortrag: VAAM-International Workshop: Biology and Chemistry of  
Antibiotic-Producing Bacteria and Fungi, Braunschweig  
Titel: Identification and Isolation of cycloheptamycins A-C.

2015                      Vortrag auf der Tagung: "Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie", Max-  
Planck-Institut für Chem. Ökologie, Jena  
Titel: Understanding and Applying PTM Biosynthetic Logic.

2015                      Poster auf der GDCh-Tagung Wissenschaftsforum Chemie, Dresden.  
Titel: Heterologous Expression and Functionalization of Polycyclic Tetramate  
Macrolactams

### Publikationen

---

- 2010 Antosch, J.; Hadzifejzovic, N.; Hubbert, M.; Prenner L-N.; Donner, B.; Schram, J. Establishment of Xylose in *Plantago ovata* Forssk. As a leading compound for quantification in raw material and finished product. *J Liq Chrom Relat Tech.*, **2010**, 33(7/8), 996-1004
- 2014 J. Antosch, F. Schaefers, T.A.M. Gulder, Heterologous Reconstitution of Ikarugamycin Biosynthesis in *E. coli*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 3011-3014.
- 2015 Greunke, C.; Antosch, J.; Gulder, T. A. M. Promiscuous Hydroxylases for the Functionalization of Polycyclic Tetramate Macrolactams – Conversion of Ikarugamycin to Butremycin, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 5334-6.

### Fähigkeiten

---

- Sprachen Deutsch, Englisch, Spanisch
- EDV-Kenntnisse : Microsoft Office 2010
- Kurse HPLC-Spezialkurs für Fortgeschrittene (NOVIA GmbH), Reaxys Trainingskurs, konstruktive Gesprächstechniken, Surviving Complex Projects (Projektmanagement)
- Gremientätigkeit Mitglied des Studierendenparlaments der Hochschule Niederrhein  
01.09.2007 bis 01.04.2009
- Referenzen Prof. Dr. Tobias Gulder, TU München, München, (Betreuer Promotion), Tel.: 089/289-13833, Email: tobias.gulder@tum.de
- Prof. Dr. Christa Müller und Dr. Ralf Mayer, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, (Betreuer/-in Masterarbeit); Direkte Betreuung durch Dr. Ralf Mayer, Tel.: 0228/73-3634, Email: r.mayer@uni-bonn.de
- Prof. Dr. Jürgen Schram, Hochschule Niederrhein, Krefeld (Betreuer Bachelorarbeit), Tel.: 02151 329279, Email: schram@hs-niederrhein.de

**München, den 26.08.2015**

Janine Antosch