

# **Reduzierte Polyketide**

## **Beiträge zur Erforschung und Manipulation der Substratspezifität von Polyketidsynthasen**

Zur Erlangung des akademischen Grads eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität Dortmund  
angenommene

### **Dissertation**

von

Diplom-Ingenieurin (FH) Uschi Sundermann  
aus Coesfeld

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schulz

2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann



Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frank Schulz am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Zeit von Oktober 2008 bis September 2012 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

**The Development of DNA Sequencing: From the Genome of a Bacteriophage to that of a Neanderthal**

U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 8795-8797 und *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 8977-8979

**Naturstofflego**

U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachrichten aus der Chemie*, **2011**, 59, 29

**Trendbericht Biochemie: Kombinatorische Biosynthese**

U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachrichten aus der Chemie*, **2011**, 59, 313

**Minimally invasive Mutagenesis gives rise to a Biosynthetic Polyketide library**

S. Kushnir, U. Sundermann, S. Yahiaoui, A. Brockmeyer, P. Janning, F. Schulz, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 10664. und *Angewandte Chemie* **2012**, 124, 10820.

**A technique for modifying natural product biosynthetic pathways in bacteria**

S. Kushnir, U. Sundermann, F. Schulz, *Asian Journal of Biotechnology*, **2012**, under revision



Eingereicht am: 14.08.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2012



Für meine Eltern  
und meine drei Schwestern  
Eva, Lisa & Greta

„Aber wenn ich die ganze Nacht wach gelegen und mich darauf gefreut habe, aufzustehen und die Blumen zu gießen, dann lasse ich mich durch das bisschen Regen nicht daran hindern.“

(Pipi Langstrumpf)





# Danksagung

*Die vorliegende Dissertation wäre sicher nie entstanden, wenn ich nicht so breite Unterstützung erfahren hätte. Daher möchte ich einigen Leuten an dieser Stelle herzlich danken.*

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Schulz danke ich für die Überlassung des vielschichtigen und faszinierenden Themas, das große in mich gesetzte Vertrauen, seine Anregungen und Hilfestellungen sowie seine Unterstützung in allen Phasen der Promotionszeit. Frank, auch wenn es manche große Herausforderungen mit sich gebracht hat, es hat mir unheimlich Spaß gemacht Mitglied der ersten Stunde in Deinem Arbeitskreis zu sein und aktiv zu dessen Entwicklung beigetragen zu haben.

Für die Übernahme des Koreferats sowie die Möglichkeit meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen und so von der gesamten Infrastruktur profitieren zu können, danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann.

Meine Laborpartnerin Dr. Susanna Kushnir danke ich für die unzähligen Stunden in denen wir letztendlich erfolgreich versucht haben, einzelne Experimente zu initiieren. Susanna, danke dass Du mir eine so tolle Kollegin warst, von der ich unendlich viel lernen konnte.

Meinen Masterstudentinnen Anika Altenfeld, Kyra Koopmans und Carolin Bisterfeld danke ich für ihre tolle Arbeit die sie geleistet haben. Es hat mir große Freude bereitet, mit Euch zusammen zu arbeiten. Ich bin froh, dass ich Euch drei betreuen durfte und bin mächtig stolz auf Euch.

Stephan Klopries, „meinem“ Chemiker, danke ich für die unermüdliche Synthese der einzelnen Bausteine, sowie der Kooperation in den einzelnen Projekten. Niclas Pryk danke ich für die Synthese der Diketide.

Julia Arens und meinen Schwestern Eva und Lisa danke ich für die schnelle und gründliche Korrektur meiner Arbeit.



Dem gesamten AK Schulz und der AG Waldmann danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Dem Analytik-Team um Dr. Petra Janning danke ich für die Bestimmung akkurater Massen sowie der Hilfe in analytischen Fragestellungen.

Dr. Ingrid Vetter danke ich für ihre Kooperation bei der Charakterisierung der MAT.

Unserer Kooperationspartnerin Dr. Elsa Sanchez-Garcia sowie Ihrer Arbeitsgruppe vom MPI in Mülheim danke ich für die Modellierungen der AT6-Domäne aus *S. erythraea* sowie deren Varianten.

Christa Hornemann, Dr. Waltraud Hoffmann-Goody sowie Prof. Dr. Martin Engelhard, dem IMPRS-CB Team, danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz für uns Doktoranden. Es hat mir viel Spaß Mitglied der *International Max Planck Research School in Chemical Biology* zu sein. Waltraud, mein besonderer Dank gilt Dir – ohne Dich wäre ich wohl nie in Dortmund gelandet.

Der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der chemischen Industrie e.V. möchte ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion durch eine Doktoranden-Stipendium danken.

Meinem Freund Dennis danke ich für seine Schulter, die ich so manches Mal zum Anlehnen brauchte. Dennis - es ist schön, dass es Dich gibt.

Meinen Eltern und meinen drei Schwestern gilt mein größter Dank. Ihr habt aus mir das gemacht, was ich bin. Ich danke Euch von ganzem Herzen. Ohne Euch wären manche Zeiten härter und einige Durststrecken trockener gewesen!

*Ebenso sei allen anderen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.*

**Danke**



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Polyketide</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Biosynthese von Polyketiden.....	13
2.1.1.1 Die Biosynthese von Erythromycin .....	17
<b>1.3 Das biotechnologische Potential von Typ-I-PKS</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Die kombinatorische Biosynthese.....	22
<b>2 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>29</b>
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Identifikation und Behebung kritischer experimenteller Limitationen</b> .....	<b>35</b>
3.1.1 Entwicklung einer Methode zur zielgerichteten Modifikation von PKS.....	35
3.1.1.1 Etablierung von PCR Parametern zur Amplifikation von <i>pks</i> .....	35
3.1.1.2 Die Konstruktion von integrativen Vektoren: die pKSSU-Vektorfamilie	37
3.1.1.3 Entwicklung der SLIC-MIX Methode .....	41
3.1.1.4 Evaluierung der neuen Vektoren auf simultane Coexpression .....	45
3.1.2 Diskussion .....	46
<b>3.2 Quantifizierung der Einbauraten von N-acetylcysteamin aktiviertem Methylmalonat in die Biosynthese von Polyketiden</b> .....	<b>49</b>
3.2.1 Charakterisierung der SNAC-Aktivierung .....	49
3.2.1.1 Einbauraten in das Polyketid Erythromycin.....	50
3.2.1.2 Einbauraten in das Polyketid Rapamycin.....	52
3.2.1.3 Quantifizierung des Aktivierungseinflusses.....	53
3.2.2 Diskussion .....	54
<b>3.3 Versuche zur Generierung einer Hybrid PKS</b> .....	<b>55</b>
3.3.1 Austausch der DEBS AT6-Domäne gegen die Nid AT5-Domäne .....	56
3.3.2 Diskussion .....	57

<b>3.4</b>	<b>Studien zur Substratspezifität von <i>cis</i>-agierenden Acyltransferasen</b>	<b>59</b>
3.4.1	Identifikation von mit der Substratspezifität korrelierenden Resten	60
3.4.2	DEBS-AT6-Mutageneseexperimente	70
3.4.2.1	Generierung einer <i>S. erythraea</i> ΔAT6hyg <sup>R</sup> Variante	71
3.4.2.2	Einfluss der Klon-zu-Klon Variabilität auf das Erythromycin-Produktionsniveau	73
3.4.2.3	Mutagenese der 14 Reste innerhalb der AT6 Region	75
3.4.2.4	Generierung der AT6 Varianten in <i>S. erythraea</i> ΔAT6hyg <sup>R</sup>	77
3.4.2.5	Fermentation & Analyse: Expression der einzelnen DEBS3 Varianten	78
3.4.3	Theoretisch-chemische Untersuchungen zur Entwicklung eines Strukturmodells	88
3.4.4	Diskussion	96
<b>3.5</b>	<b>Chemofermentative Einführung einer orthogonalen Reaktivität in Erythromycin – Einfügen einer Alkylgruppe durch die Fütterung von SNAC-aktiviertem Propargylmalonat (SK 107)</b>	<b>99</b>
3.5.1	Screening der Variantenbibliothek auf erweiterte Substratspezifität	100
3.5.2	Weitergehende Betrachtung des Modell der AT-Region	101
3.5.2.1	Generierung von Val295 Varianten	101
3.5.2.2	Planung weiterer Mutageneseansatzpunkte	105
3.5.3	Diskussion	108
<b>3.6</b>	<b>Identifizierung einer moderat thermophilen <i>trans</i>-agierenden Acyltransferase</b>	<b>109</b>
3.6.1	MAT aus <i>Streptomyces coelicolor</i>	110
3.6.2	MAT aus <i>Thermofibida fusca</i>	111
3.6.2.1	Die Proteinstruktur der MAT aus <i>T. fusca</i>	115
3.6.2.2	Eine Plattform für die Gerichtete Evolution der MAT	117
3.6.2.3	Diskussion	127
<b>3.7</b>	<b>Anwendung der Mutasynthese zur Derivatisierung von Polyketiden</b>	<b>129</b>
3.7.1	Untersuchungen der Substratflexibilität der Rapamycin-Biosynthesemaschinerie	130
3.7.1.1	Generierung von Starter- und Endeinheit-Blockmutanten	133
3.7.1.2	Fermentation von NRRL 5491 sowie der rapK Blockmutanten	135

3.7.2	Untersuchungen zur Substratflexibilität der Erythromycin-Biosynthese.	143
3.7.2.1	Einfügen einer orthogonalen Reaktivität an Position C15 des Erythromycin A.....	144
3.7.3	Diskussion .....	154
<b>3.8</b>	<b>Studien zur Veränderung des Redox-Profiles von Polyketiden .....</b>	<b>157</b>
3.8.1	Zielgerichtete Mutagenese zur Generierung erhöhter Polyketid-Diversität.....	157
3.8.2	Analytische Untersuchung der Kulturextrakte mittels LC/ESI-MS .....	160
3.8.3	Weitergehende Verifizierung der gebildeten Substanzen.....	167
3.8.3	Diskussion .....	170
<b>3.9</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion .....</b>	<b>173</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>181</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>193</b>
<b>5.1</b>	<b>Mikroorganismen.....</b>	<b>193</b>
5.1.1	Bakterienstämme.....	193
5.1.2	Plasmide & Vektoren .....	194
<b>5.2</b>	<b>Medien und Antibiotika .....</b>	<b>197</b>
5.2.1	Medien.....	197
5.2.1.1	Nährmedien zur Kultivierung von Actinomyceten.....	197
5.2.1.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	198
5.2.1.3	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> .....	199
5.2.1.4	Spurenelementlösung .....	199
5.2.2	Antibiotika .....	199
<b>5.3</b>	<b>Puffersysteme, Lösungen, Enzyme und Kits .....</b>	<b>200</b>
5.3.1	Verwendete Lösungen.....	200
5.3.2	Verwendete kommerzielle Enzyme .....	205
5.3.3	Kits .....	206
<b>5.4</b>	<b>Größenstandards.....</b>	<b>206</b>
5.4.1	DNA Längenstandards .....	206

5.4.2	Protein Größenstandard .....	206
<b>5.5</b>	<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>207</b>
5.5.1	Standard-Oligonukleotide .....	207
5.5.2	Oligonukleotide zur semi-rationalen Mutagenese der Ery AT6-Domäne .... .....	211
5.5.3	Oligonukleotide zur semi-rationalen Mutagenese der MAT .....	214
<b>5.6</b>	<b>Allgemeine Methoden der Mikrobiologie .....</b>	<b>216</b>
5.6.1	Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> .....	216
5.6.1.1	Präparation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	216
5.6.1.2	Präparation elektro-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	216
5.6.2	Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> zur Sporenpräparation.....	217
5.6.3	Kultivierung und Lagerung von Actinomyceten .....	217
5.6.3.1	Sporenisolation von Actinomyceten .....	218
5.6.4	Fermentation von Actinomyceten zum Nachweis von Fermentationsprodukten .....	219
5.6.4.1	Fermentation von <i>S. erythraea</i> .....	219
5.6.4.2	Fermentation der <i>S. erythraea</i> AT6* Varianten .....	219
5.6.4.3	Fermentation von <i>S. cinnamonensis</i> sowie dessen Mutanten.....	220
5.6.4.4	Fermentierung von <i>S. hygrosopicus</i> NRRL5491 sowie dessen Mutante $\Delta$ RapK .....	221
5.6.4.5	Fermentierung von <i>S. hygrosopicus</i> DSM40822 sowie dessen Mutanten $\Delta$ Fkbl und $\Delta$ Fkbk .....	221
<b>5.7</b>	<b>Allgemeine Methoden zur Analytik polyketidischer Naturstoffe.....</b>	<b>222</b>
5.7.1	ESI/MS Analytik .....	222
5.7.2	Bestimmung der akkuraten Masse.....	224
5.7.3	Testung auf antimikrobielle Aktivität; Hemmhof-Test.....	224
<b>5.8</b>	<b>Allgemeine Methoden der Molekularbiologie .....</b>	<b>225</b>
5.8.1	Isolation von Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse.....	225
5.8.2	Isolation genomischer DNA aus Actinomyceten .....	225
5.8.3	Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen .....	225
5.8.4	Aufreinigung und Präzipitaion von DNA aus wässrigen Lösungen .....	226
5.8.4.1	Phenol/Chloroform-Extraktion (PCI-Extraktion) .....	226



5.8.4.2	Ethanol-Fällung der DNA.....	226
5.8.4.3	Sure Clean – DNA-Fällung .....	226
5.8.5	Einbringen von DNA in Mikroorganismen; Gentransfer .....	227
5.8.5.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	227
5.8.5.2	Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	227
5.8.5.3	Konjugation in Actinomyceten.....	227
5.8.5.4	Protoplastentransformation .....	229
5.8.6	Agarosegelelektrophorese.....	230
5.8.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	231
5.8.7.1	Kolonie PCR .....	234
5.8.7.2	Zielgerichtete Mutagenese via <i>overlap extension</i> PCR.....	235
5.8.7.3	DIG-Markierung von PCR Produkten (Sonden für den Southern Blot) ....	236
5.8.8	Sequenzierung .....	237
5.8.9	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	238
5.8.9.1	Aufreinigung des <i>DpnI</i> verdauten PCR Produktes mittels SureClean	239
5.8.9.2	Aufreinigung des mittels Gelelektrophorese .....	239
5.8.9.3	Aufreinigung mittels ExoI/SAP – speziell vor Sequenzierreaktionen..	239
5.8.10	Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	240
5.8.11	Klonierungsstrategien.....	241
5.8.11.1	Klonierung mittels Ligation .....	241
5.8.11.2	Klonierung mittels <i>in vivo cloning</i> .....	242
5.8.11.3	Klonierung mittels SLIC-MIX .....	242
5.8.12	Southern Blot.....	244
5.8.13	Fluoreszenzmikroskopie.....	245
<b>5.9</b>	<b>Allgemeine Proteinchemische Arbeitstechniken.....</b>	<b>246</b>
5.9.1	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> .....	246
5.9.1.1	Testexpressionen in <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3).....	246
5.9.1.2	Expression in <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) .....	246
5.9.2	Proteinaufreinigung .....	246
5.9.2.1	Zellaufschluss .....	246
5.9.2.2	SDS Polyacrylamid Gelelektrophores (SDS-Page).....	247
5.9.2.3	Aufreinigung mittels Ni-NTA Agarose Beads .....	247

5.9.2.4	Aufreinigung mittels Ni-NTA Säule .....	247
5.9.2.5	Größenausschlusschromatographie .....	248
<b>5.10</b>	<b>Kompatibilität der Integrativen Vektoren .....</b>	<b>248</b>
<b>5.11</b>	<b>Protokolle zur Untersuchung der AT6-Domäne in DEBS3 .....</b>	<b>249</b>
5.11.1	pKSSU89: DEBS3 codierender Expressionsvektor .....	249
5.11.2	pKSSU96: $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> eryAIII .....	250
5.11.3	<i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> .....	250
5.11.4	Wildtyp-Wiederherstellung von <i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> .....	251
5.11.5	Mutagenese der AT6-Domäne .....	251
5.11.6	Komplementierung von <i>S. erythraea</i> AT6-Nullmutanten mittels MAT ...	253
5.11.6.1	pKSSU665: MAT ( <i>S. coelicolor</i> ) codierender <i>Shuttle</i> -Vektor .....	253
5.11.6.2	<i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> _AT6Glu154Trp_pKSSU665 .....	254
5.11.6.3	<i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> _pKSSU168_pKSSU665 .....	254
<b>5.12</b>	<b>Protokolle zur Generierung einer Hybrid-PKS .....</b>	<b>254</b>
5.12.1	Austausch der AT6-Domäne gegen Nid AT5 .....	255
5.12.2	<i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> _Nid AT5 .....	255
5.12.3	pKSSU441: Ccr codierender Expressionsvektor .....	255
5.12.4	<i>S. erythraea</i> $\Delta$ AT6hyg <sup>R</sup> _Nid AT5_Ccr .....	256
<b>5.13</b>	<b>Protokolle zur Untersuchung der <i>trans</i>-agierenden MAT .....</b>	<b>257</b>
5.13.1	Generierung benötigter Konstrukte .....	257
5.13.1.1	pKSSU467: Dualer Expressionsvektor ACP6 & Sfp basierend auf pETDuet-1 .....	257
5.13.1.2	pKSSU453: Expressionsvektor für die MAT aus <i>T. fusca</i> basierend auf pETM11 .....	257
5.13.1.3	pKSSU475 & pKSSU399: Expressionsvektoren für die MAT aus <i>S. coelicolor</i> basierend auf pETM11 .....	258
5.13.1.4	MAT codierende <i>Shuttle</i> -Vektoren basierend auf pKSSU40 .....	258
5.13.2	Charakterisierung der MAT .....	259
5.13.2.1	CD-Messungen .....	259
5.13.2.2	Aktivitätsbestimmung mittels Übertrag von Malonyl-[ <sup>14</sup> C] Coenzym A. ....	260
5.13.3	Mutagenese der MAT .....	261

5.13.3.1	<i>Error Prone PCR</i> .....	261
5.13.3.2	<i>Random Priming</i> .....	261
5.13.3.3	<i>DNA Shuffling</i> .....	263
5.13.3.4	Zielgerichtete Mutagenese – Semi-rational .....	265
<b>5.14</b>	<b>Mutasyntese zur Erzeugung von Polyketid-Derivaten .....</b>	<b>266</b>
5.14.1	Untersuchungen der Substratflexibilität der Ascomycin- und Rapamycin-Biosynthesemaschinerie .....	266
5.14.1.1	pKSSU437 – Suizid- <i>Shuttle</i> -Vektor codierend für $\Delta rapK$ .....	266
5.14.1.2	pKSSU436 – Suizid- <i>Shuttle</i> -Vektor codierend für $\Delta fkbK$ .....	266
5.14.1.3	pKSSU449 – Suizid- <i>Shuttle</i> -Vektor codierend für $\Delta fkbI$ .....	267
5.14.1.4	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> $\Delta rapK$ .....	267
5.14.1.5	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> $\Delta fkbK$ .....	267
5.14.1.6	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> $\Delta fkbL$ .....	268
5.14.2	Untersuchungen der Erythromycin-Biosynthesemaschinerie; Fütterung von Diketiden als Bausteine.....	268
5.14.2.1	Einbringen einer $\Omega_{hyg}^R$ Resistenzkassette in DEBS1 .....	268
5.14.2.2	KS <sup>0</sup> : Einzelaminosäureaustausch innerhalb der KS1 in DEBS1 ..	269
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGEN AND AKRONYME.....</b>	<b>271</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>277</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>285</b>
<b>9</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>287</b>
<b>10</b>	<b>STRUKTUREN DER SUBSTANZEN 1 BIS 11 .....</b>	<b>289</b>

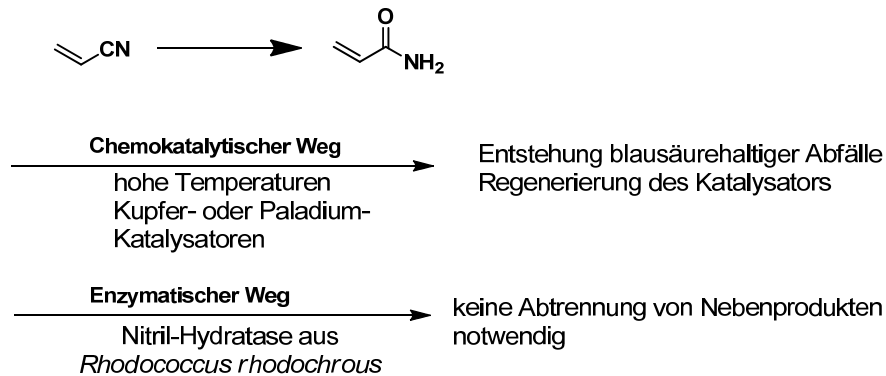


# I Einleitung

Bereits 1909 wurde mit „Oropon“ das erste Enzymprodukt industriell durch die Firma Röhm&Haas aus Darmstadt in der Ledergerbung eingesetzt. Die zuvor eingesetzten Beizen konnten nun durch das wesentlich umweltfreundlichere Produkt, das hauptsächlich aus Proteasen zusammengesetzt war, ersetzt werden.<sup>[1]</sup> Mit der Entdeckung von Penicillin<sup>[2]</sup> durch Alexander Fleming (1928) begann die Erschließung der Enzymmaschinerie von Mikroorganismen als Ressource für neue Wirkstoffe und gleichzeitig das Zeitalter der Antibiotika.<sup>[3]</sup> Die eigentliche wissenschaftliche Revolution begann mit der Entwicklung der Molekularbiologie in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Die neuen Methoden und Möglichkeiten trieben die dynamische Entwicklung der modernen Biotechnologie voran. Vor allem die Entdeckung der DNA als Träger der Erbinformation<sup>[4]</sup> und die Möglichkeit, Gene gezielt zu verändern<sup>[5,6]</sup> spielen hierbei zentrale Rollen. Durch das Wachstum der verfügbaren biochemischen Werkzeuge wurden enorme Fortschritte gemacht und das Fundament für eine industrielle Nutzung der in der Natur vorkommenden evolutionär geschaffenen biosynthetischen Vielfalt gelegt.<sup>[7]</sup>

Die weiße oder auch industrielle Biotechnologie verwendet Enzyme oder ganze Mikroorganismen um chemische Produkte zu synthetisieren.<sup>[8]</sup> In einigen Fällen kann die Biotechnologie hierdurch partielle Schwächen der klassischen Synthese komplementieren und so komplexe Reaktionskaskaden ermöglichen.<sup>[9,10]</sup> Dieses ist vor allem für die Synthese hoch funktionalisierter Moleküle sinnvoll. Durch den Einsatz von Enzymen können spezifische Selektivitäten erzeugt werden (Stereo-Regio- oder Chemoselektivität).<sup>[8,9]</sup> Als erfolgreiche Anwendungsbeispiele sind hier u.a. die von der Firma BASF durch den Einsatz von Enzymen erzeugten, und unter dem Namen ChiPros® vermarkteten, chiralen Verbindungen zu nennen (Tabelle 1). Im Gegensatz zu den *low volume, high value* Substanzen wird mit der Produktion von ca. 40.000 Tonnen pro Jahr Acrylamid durch biotechnologisch unterstützte Verfahren hergestellt.<sup>[11]</sup> Die Ausgangssubstanz Acrylnitril wird hier im Gegensatz zur chemischen Synthese (Hydratisierung bei hohen Temperaturen unter Einsatz von Schwefelsäure, Kupfersalzen oder Palladium-Komplexen als Katalysatoren) umweltschonend und selektiv mit Hilfe einer Nitril-Hydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* bei 10 °C zu Acrylamid hydratisiert (vgl. Abbildung 1). Das so produzierte Acrylamid ist so rein, dass keine Abtrennung von Nebenprodukten nötig

ist. Hingegen fallen bei der Aufreinigung des durch chemische Hydratisierung gewonnene Acrylamid blausäurehaltige Abfälle und eine komplexe Regenerierung des Katalysators an.<sup>[12]</sup>



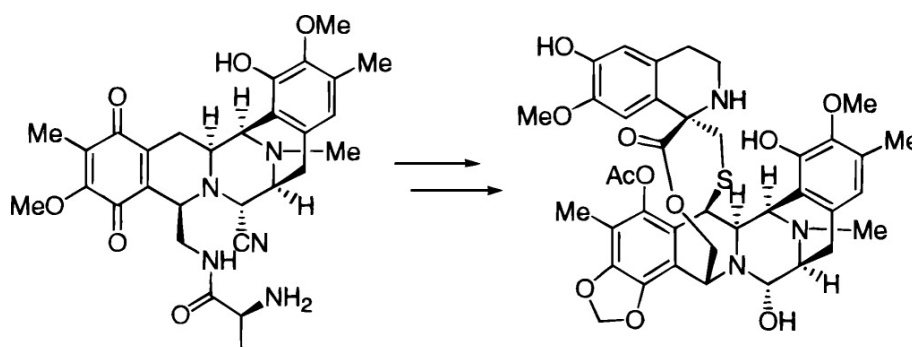
**Abbildung 1: Die Biokatalyse ebnet den Weg zu einer grüneren Chemie.** Hier ist ein Vergleich der klassischen chemischen und der biotechnologisch unterstützten Synthese zur Herstellung von Acrylamid gezeigt.

**Tabelle 1: Übersicht einiger weniger unter dem Namen ChiPros® vermarkteten chiralen Produkte der BASF.**

Produkt	Struktur	Produkt	Struktur
(R)-Styrenoxide		(R)-Mandelsäure	
(R)-(+)-1-Phenyl-ethanol		(R)-ortho-Chloromandelsäure	
(S)-2-Butanol		(R)-1-(3-Bromophenyl)ethylamine	

Die Biotechnologie kann somit zuweilen eine Durchführung von Synthesen unter umweltschonenden Bedingungen ermöglichen und dadurch den Weg zu einer grünen Chemie ebnen, was heute ein wichtiges Kriterium in der industriellen Syntheseplanung ist.<sup>[10,12]</sup> So ist heute sowohl der Zugang zu Feinchemikalien als auch zu *commodity* Chemikalien durch Einsatz biokatalytischer Methoden möglich. Die weitaus komplexeren Naturstoffe hingegen sind gegenwärtig in präparativen Mengen oftmals nur durch Biosynthese zugänglich. Im Fall der Synthese von

Naturstoffderivaten bietet die weiße Biotechnologie durch den Einsatz nativer oder gentechnisch manipulierter Biosynthesewege eine Vielzahl von Optionen.<sup>[7,13,14]</sup> Jedoch ist dieses Feld aktuell sehr explorativ und erfordert eine intensive Grundlagenarbeit. Alternativ kann die klassische Strategie der Partialsynthese angewandt werden, um ausgehend von Fermentationsprodukten durch chemische Modifikationen eine Vielzahl von Derivaten zu erzeugen. Ein erfolgreiches Beispiel dieser Kombination aus Fermentation und organischer Synthese ist die semisynthetische Herstellung des Wirkstoffes Trabectedin<sup>[15]</sup> (Ecteinascidin ET-743) (s. Abbildung 2), der unter dem Handelsamen Yondelis zur Behandlung von rezidierten Weichteilsarkoma eingesetzt wird.<sup>[16,17]</sup> Der komplexe marine Naturstoff, Ecteinascidin, konnte zuvor nur in unzureichenden Mengen aus einem im Meer vorkommenden Manteltier (*Ecteinascidia turbinata*) isoliert werden. Durch die semisynthetische Modifikation des durch Fermentation von *Pseudomonas fluorescens* gewonnene Cyanosafracin B, können nun ausreichende Mengen zugänglich gemacht werden.



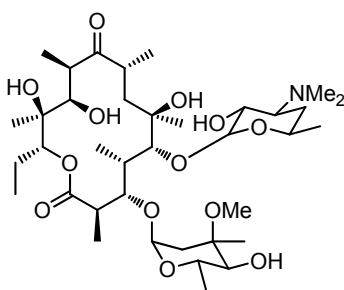
**Abbildung 2: Semisynthetische Route zur Generierung von Trabectedin ausgehend von Cyanosafracin B - einem Fermentationsprodukt aus *Pseudomonas fluorescens*.**<sup>[15]</sup>

## 1.2 Polyketide

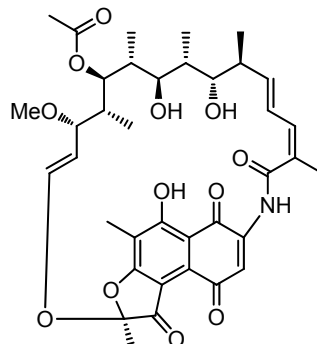
Polyketide bilden eine der größten Naturstoffklassen. Viele von ihnen wurden im Rahmen von Hochdurchsatz-Screens auf der Suche nach neuen biologischen Wirkstoffen identifiziert und aus Bakterien, Pilzen oder Pflanzen isoliert.<sup>[18]</sup> Für die Mikroorganismen selbst spielen die Polyketide eine sekundäre Aufgabe in ihrer Ontogenese. Sie werden von diesen z.B. zur Selbstverteidigung, zum Angriff oder zur Kommunikation eingesetzt.<sup>[19]</sup> Polyketide gehören zu den wichtigsten mikrobiellen Metaboliten und finden als Wirkstoffe sowohl in der Humantherapie als auch in der Veterinärmedizin breite Anwendung.<sup>[20,21,22]</sup> Ihre pharmazeutischen Eigenschaften

reichen von antibiotischer, fungizider, antiviraler, antiparasitärer und immunsuppressiver bis hin zur anti-karzinogener Wirkung (s. Abbildung 3).<sup>[20,23]</sup> Besonders bemerkenswert ist, dass sich alle Verbindungen dieser heterogenen Gruppe, zu denen Polyether, Polyene, Polyphenole, Makrolide und Endiine gehören, hauptsächlich von einem der einfachsten natürlichen Bausteine ableiten, der Essigsäure.<sup>[22]</sup> Die Klassifizierung der Polyketide erfolgt am einfachsten über ihren biosynthetischen Ursprung (vgl. Abbildung 3). Dabei werden Verbindungen aus Polyketonketten, die meist in aromatischen Verbindungen resultieren, von solchen unterschieden, bei denen diese Ketten während der Biosynthese weitgehend reduziert werden.<sup>[24]</sup>

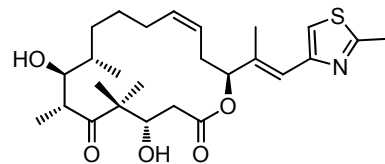
#### Reduzierte Polyketide



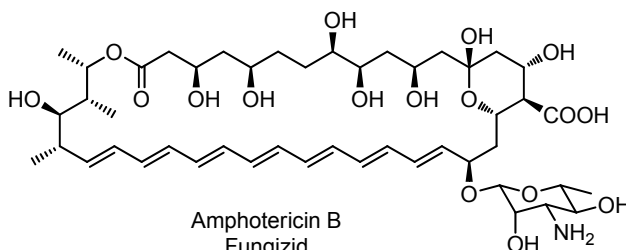
Erythromycin A (1)  
Makrolid-Antibiotikum



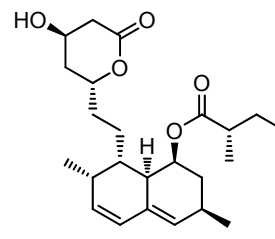
Rifamycin S  
Antibiotikum



Epothilone  
Polyketid-Polypeptid  
anti-karziogen

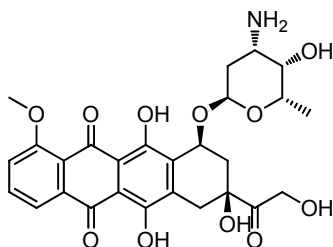


Amphotericin B  
Fungizid

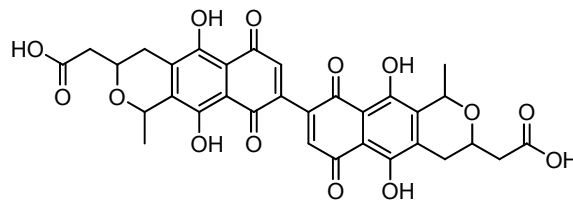


Lovastatin  
Cholesterinsenker

#### Aromatische Polyketide



Doxorubicin  
anti-karziogen



Actinorhodin  
Aromatisches Antibiotikum

**Abbildung 3: Repräsentative reduzierte und aromatische Polyketide, die nach ihrem biosynthetischem Ursprung klassifiziert werden.**



In der Biosynthese der aromatischen Polyketide bauen Typ-II-Polyketidsynthasen (Typ-II-PKS) den Naturstoff iterativ auf.<sup>[25]</sup> Der in Bakterien zu findende katalytisch aktivierte Enzymkomplex wird durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammen gehalten und ist aus vergleichsweise kleinen Enzymen aufgebaut.<sup>[22,26]</sup> Im Gegensatz zu den aromatischen Polyketiden katalysieren außergewöhnlich große Enzyme, die Typ-I-PKS, die zentralen Schritte der Biosynthese reduzierter Polyketide. Sie bilden ein molekulares Fließband, in dem für jeden Schritt eine festgelegte Enzymdomäne zuständig ist.<sup>[22,24]</sup>

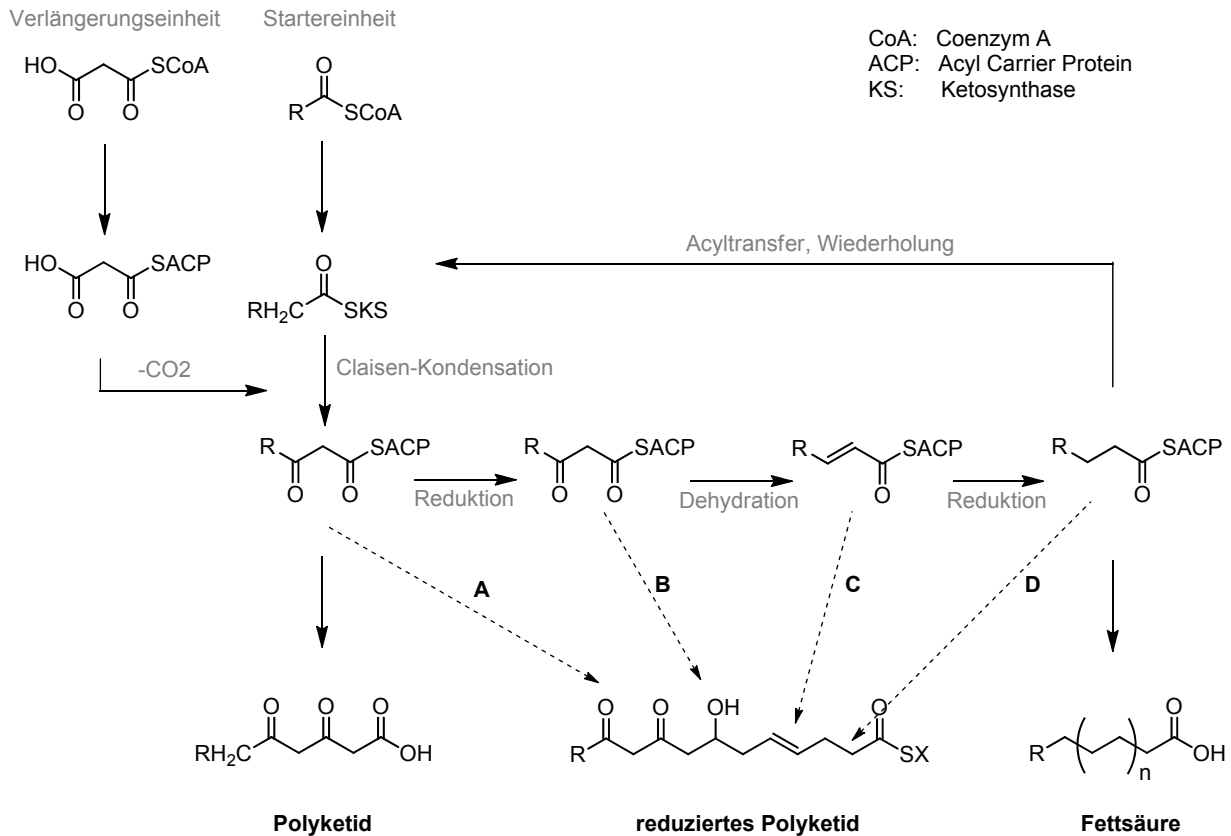
Das erste Polyketid Orcinol wurde im Jahr 1893 durch James N. Collie synthetisiert, der ebenfalls den Begriff prägte.<sup>[27]</sup> Seit Collies Pionierarbeit hat sich das Forschungsfeld der Polyketide enorm weiterentwickelt. Wissenschaftler haben nicht nur die Strukturen von Tausenden dieser komplexen Moleküle aufgeklärt, sondern haben ebenfalls begonnen die für die Biosynthese verantwortlichen Enzyme zu klonieren, isolieren und zu charakterisieren.<sup>[26,28]</sup>

### 1.2.1 Biosynthese von Polyketiden

Die enorme Vielfalt der mehr als 7000 bekannten natürlichen Polyketid-Strukturen ergibt sich aus einer Serie genetisch programmierter Ereignisse, die vor, während und nach dem Aufbau der Polyketid-Kette durch die PKS stattfinden. Die Biosynthese der Polyketide verläuft in Analogie zur Fettsäurebiosynthese (FAS, vgl. Abbildung 4).<sup>[29,30]</sup> Beide Enzymklassen katalysieren die Kondensation von aktivierten, primären Metaboliten (wie Acetyl- und Malonyl-CoA) zu  $\beta$ -Ketoacyl-polymeren die über Thiolbindungen mit dem Enzym verknüpft sind.<sup>[29,31]</sup> In der Fettsäurebiosynthese wird der  $\beta$ -Ketoester nachfolgend durch drei Enzyme zur vollständig reduzierten (gesättigten) Fettsäure prozessiert.<sup>[32]</sup> Polyketide hingegen weisen in der Regel eine wesentlich höhere Komplexität auf, da die reduktiven Schritte nur optional stattfinden wodurch die Strukturen sowohl  $\beta$ -Ketone,  $\beta$ -Hydroxyl- oder Enoylgruppen aufweisen können.<sup>[26,33,34]</sup>

In der Biosynthese von Polyketiden werden drei Typen von PKS klassifiziert.<sup>[25]</sup> Im Typ-I sind die katalytischen Domänen in Modulen (*cis*) zusammen gefasst und formen so ein multimodulares lineares Fließband.<sup>[26,31]</sup> Hingegen weisen Systeme des Typ-II einen dissoziierbaren Komplex diskreter und gewöhnlich monofunktioneller Enzyme auf.<sup>[25]</sup> Weiterhin wird eine dritte Gruppe multifunktioneller Enzyme vom Chalconsynthase-Typ als Typ-III-PKS bezeichnet.<sup>[22,25]</sup> Jedoch

schwinden die Grenzen der bisherigen Klassifizierung von PKS-Systemen und die Aufklärung neuer Biosynthesewege gewährt weitere Einsichten in die äußerst komplexe Funktionsweise dieser.<sup>[25,35]</sup>

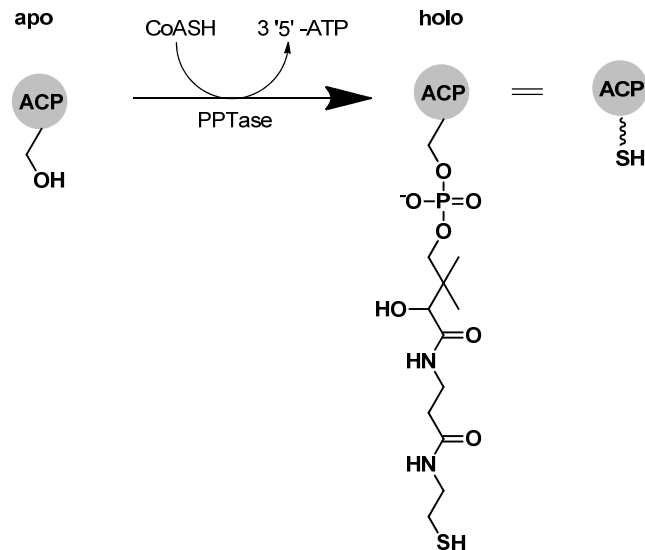


**Abbildung 4: Die Fettsäure- und Polyketidbiosynthese.** Während der Fettsäurebiosynthese wird die wachsende Kette durch eine Reihe von Claisen-Kondensationen aufgebaut, die durch Ketosynthasen (KS) katalysiert werden. Die Ketofunktion des so initial synthetisierte  $\beta$ -Ketoester wird nach jedem Kondensationsschritt in drei Schritten vollständig reduziert, bevor die nächste Runde der Kettenverlängerung initiiert werden kann. Im Gegensatz hierzu entfallen die Reduktionsschritte bei der Synthese aromatischer Polyketide komplett, so dass der  $\beta$ -Ketoester nicht modifiziert wird. Der resultierende hochreaktive poly- $\beta$ -Ketoester wird weiteren enzymkatalysierten intramolekularen Cyclisationsreaktionen unterzogen, was in aromatischen Strukturen resultiert. Reduzierte Polyketide weisen hingegen eine Mischung aus Hydroxyl-, Carbonylgruppen, Doppelbindungen und Methylengruppen auf. Dieses ist möglich, da die einzelnen Reduktionsschritte nur optional stattfinden. Abbildung in Anlehnung an Hopwood 1997.<sup>[33]</sup>

Da nur modulare Typ-I-PKS Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, wird weiterhin nur auf die durch diesen Enzymkomplex katalysierten Reaktionen eingegangen. Ihr Design resultiert in einem der größten Proteintypen die in der Natur bekannt sind.<sup>[36]</sup>

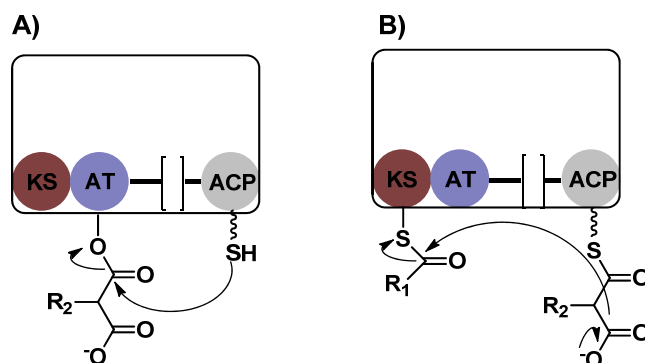
Die Aktivierung der Polyketidbausteine erfolgt zu den entsprechenden Coenzym A-Estern, wie Acetyl- oder Malonyl-CoA. Vor der eigentlichen Polyketidproduktion ist

eine Aktivierung der einzelnen Acylcarrierproteine (ACP) notwendig, damit eine Verknüpfung mit dem Substrat stattfinden kann.<sup>[37]</sup> Dabei wird Coenzym A über eine Phosphodiester-Bindung post-translational an die Seitenkette eines konservierten Serin-Restes des ACP kovalent gebunden.<sup>[31]</sup> Die Reaktion wird durch eine Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) katalysiert, die die inaktive *apo*-Form des ACP in seine aktive *holo*-Form umwandelt (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Aktivierung des *apo*-ACP in seine aktive *holo*-Form, katalysiert durch eine PPTase.** Der Phosphopantetheinarm wird häufig vereinfacht durch eine Wellenlinie mit der aktiven Thiol-Gruppe am Ende dargestellt.

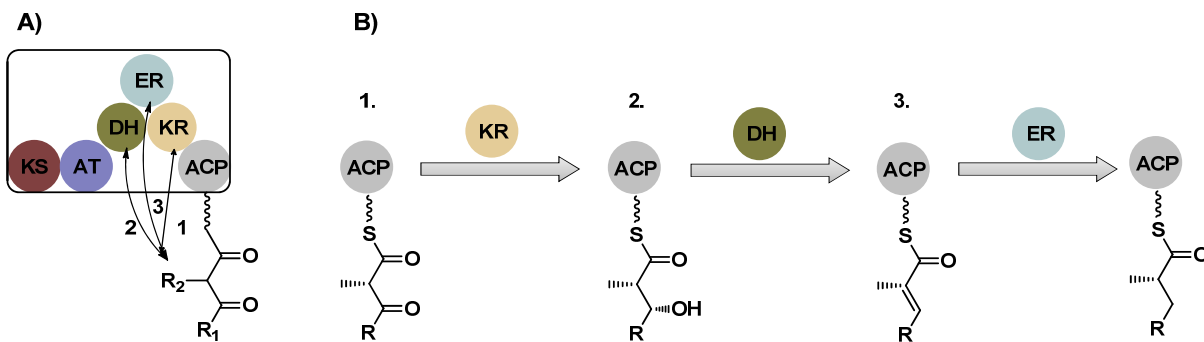
Mehrere katalytische Abläufe sind für eine einzelne Runde der Polyketidkettenverlängerung notwendig (s. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Grundmechanismen der Polyketid-Biosynthese.** Interaktionen zwischen ACP und AT (A) bzw. KS (B) Domäne während der Kettenverlängerung prozessiert durch eine modulare PKS. A Wahl der Verlängerungseineit durch die AT-Domäne und Übertragung auf das ACP. B Interaktion zwischen Acyl-ACP und KS, die die decarboxylierende Claisen Kondensation katalysiert.<sup>[38]</sup>

Eine Acyltransferase (AT) wählt und überträgt ein Acyl-Coenzym A Derivat auf das freie Thiol des 4'-Phosphopantetheins (4'-PP) welches kovalent mit einem ACP verknüpft ist.<sup>[31]</sup> Nachfolgend katalysiert die Ketosynthase (KS) eine decarboxylierende Claisen Kondensation, zwischen einer Verlängerungseinheit und dem acyl-ACP-Thioester-Intermediat, was unter Kohlenstoffdioxid-Abspaltung in einem  $\beta$ -Ketoester resultiert.<sup>[21]</sup>

Zusätzlich zu diesen minimalen katalytischen Komponenten kann der  $\beta$ -Ketoester weiter durch eine Ketoreduktase (KR), eine Dehydratase (DH) und eine Enoylreduktase (ER) prozessiert werden (Abbildung 7). So wird der Oxidationsstatus des  $\beta$ -Kohlenstoffes entweder als Ketogruppe beibehalten oder optional zur Hydroxyl-, Methin- oder zur Methylengruppe prozessiert.



**Abbildung 7: Prozessierung der Polyketidkette durch die reduktive Schleife innerhalb einer modularen PKS. A** Überblick über ein Typ-I-PKS Modul mit allen reduktiven Domänen **B** Reduktive Schritte durch die einzelnen Domänen.

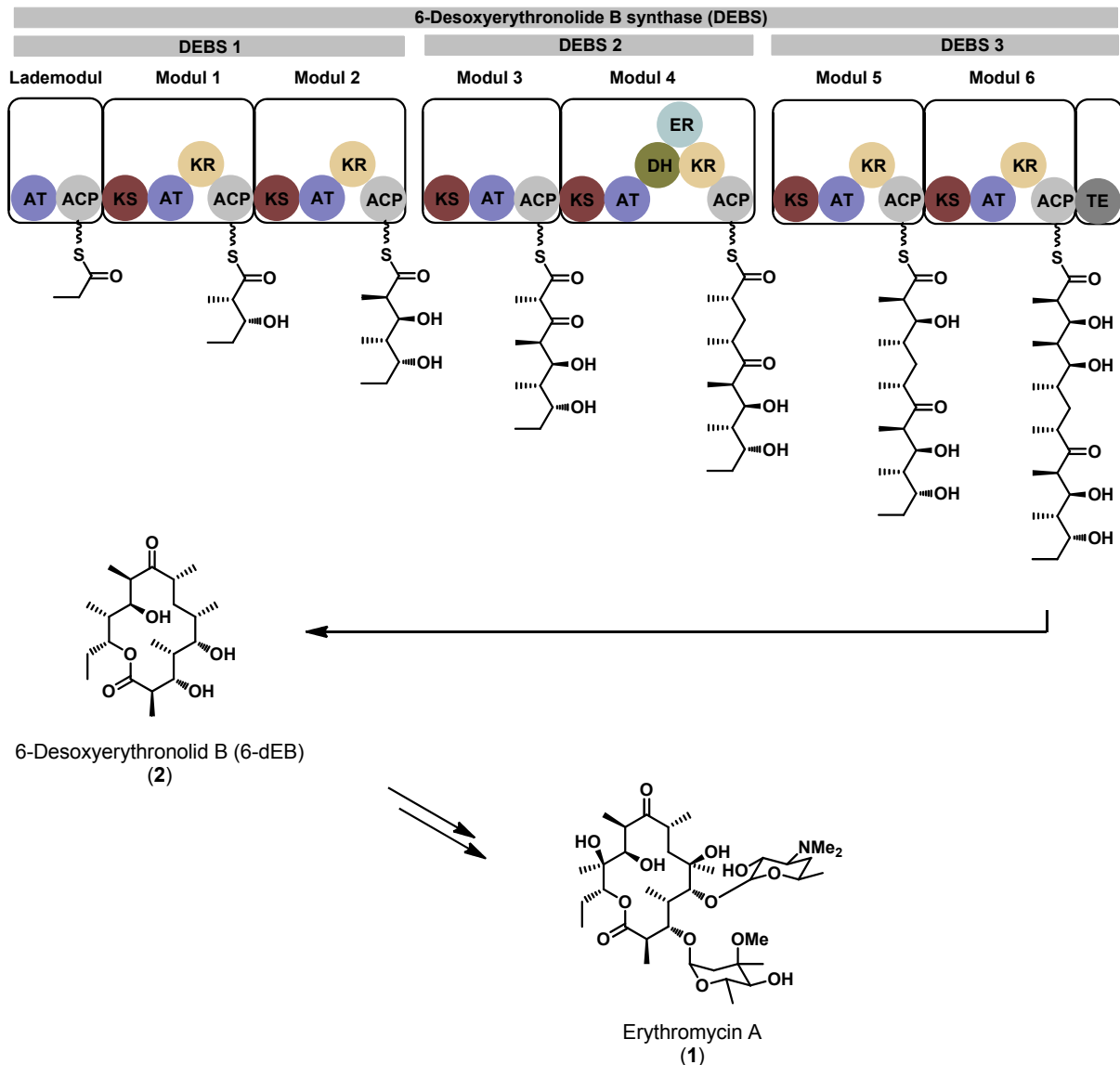
PKS können unvollständige reduktive Schleifen aufweisen, was so in Produkten mit verschiedenen Oxidationsstufen resultiert. Sobald eine Runde der Polyketidkettenverlängerung abgeschlossen ist, werden weitere Elongationen durch nachfolgende (*downstream*) Module prozessiert. (Im Fall der nicht iterativen Typ-II PKS hingegen würde die Verlängerung durch die gleichen Enzyme stattfinden.)<sup>[22]</sup> Während der Biosynthese bleibt das wachsende Polyketid kovalent an dem Enzym gebunden. Die Freisetzung wird erst nach Erreichen der vollständigen Länge durch eine terminale Thioesterase vermittelt.<sup>[39]</sup> Im Anschluss hieran folgt oftmals eine Cyclisierung des Grundgerüsts, wobei nachfolgende sekundäre Cyclisierungen, C-C-Bindungsspaltungen und Umlagerungen zu neuen Carba- und Heterocyclen führen.<sup>[22,40]</sup> Die nachfolgenden post-PKS Prozessierungen wie Glycosylierungen oder Hydroxylierungen tragen oftmals maßgeblich zur biologischen Aktivität der Polyketide bei.<sup>[41]</sup>

Die modulare Architektur der Typ-I-PKS ist inherent flexibel, eine Eigenschaft die mutmaßlich den hohen metabolischen Aufwand begründet.<sup>[36,42]</sup> Jedes Modul ist so konstruiert, dass ein bestimmter Synthesebaustein ausgewählt wird, und eine definierte reduktive Modifikation mit oftmals wichtigen stereochemischen Konsequenzen katalysiert. Die Gesamtzahl der Verlängerungsreaktionen ist meistens ebenfalls genau festgelegt, wie auch das Portfolio der post-PKS Reaktionen. Folglich sind die Produkte der modularen PKS divers, wenn auch macrocyclische Lactone die möglichen Strukturen dominieren.<sup>[36]</sup>

Die in die Erythromycin Biosynthese involvierte PKS ist der Prototyp für ein nicht-iteratives PKS Typ-I System und ist seit ihrer Entdeckung<sup>[43,44]</sup>, in den Arbeitsgruppen um Peter F. Leadlay und Leonard Katz, das Kernstück der Forschung rund um PKS. Ihre Funktion und ihr Mechanismus sollen im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

#### 2.1.1.1 Die Biosynthese von Erythromycin

Die modulare PKS 6-Desoxyerythronolid B Synthase oder kurz DEBS ist für die Biosynthese des Macrolides Erythromycin A (**1**) durch das Bodenbakterium *Saccharopolyspora erythraea* verantwortlich.<sup>[45]</sup> Sie ist die erste modulare PKS die Anfang der neunziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts durch die Sequenzierung der korrespondierenden Gene identifiziert wurde.<sup>[43,44]</sup> Die Gene, die für die Biosynthese des Macrolid-Intermediates 6-Deoxyerythronolide B (6-dEB (**2**)) codieren, sind *eryAI*, *eryAII* und *eryAIII*.<sup>[26]</sup> Sie codieren drei gigantische Enzyme (jeweils ~350 kDa): DEBS 1, 2 und 3, die als molekulares Fließband agieren (vgl. Abbildung 8).<sup>[26,39]</sup> Jedes dieser Enzyme ist aus zwei Verlängerungsmodulen aufgebaut (repräsentiert durch die schwarzen Kästen, s. Abbildung 8).



**Abbildung 8: Übersicht der Erythromycin Biosynthese.**<sup>[43,44]</sup> Abkürzungen: ACP: Acylcarrierprotein, AT: Acyltransferase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase, KR: Ketoreduktase, KS: Ketosynthase, TE: Terminale Esterase. Der Multienzymkomplex DEBS besteht aus drei Enzymen, DEBS1, 2 und 3, die nicht kovalent miteinander verknüpft mit einer Größe von ca. 2 MDa als molekulares Fließband agieren. Jedes dieser Enzyme besteht aus zwei bis drei kovalent miteinander verknüpften Modulen (schwarze Kästen). Die Bausteine der Biosynthese sind Propionyl-CoA als Startereinheit und sechs Äquivalente Methylmalonyl-CoA als Verlängerungseinheiten. Ein minimales Modul (vgl. Modul 3) besteht aus einer Ketosynthase, welche eine decarboxylierende Claisenkondensation katalysiert, einer Acyltransferase welche den Baustein auswählt und diesen auf das Acyl Carrier Protein überträgt. Zusammen katalysieren diese drei Domänen eine Kettenverlängerung um zwei C-Atome plus Seitenkette, was in der Bildung eines  $\beta$ -Ketoester resultiert. Dieser kann dann nachfolgend durch die einzelnen reduktiven Domänen weiter prozessiert werden. Hierbei bestimmt die Anzahl der reduktiven Domänen den Grad der Reduktion der wachsenden Kette. Final spaltet eine terminale Esterase die Polyketidkette vom Enzym ab und ermöglicht die Zyklisierung. Post-PKS Prozessierungen wie Glykosylierung und Methylierungen komplementieren die Biosynthese des biologisch aktiven, komplexen Naturstoffes Erythromycin A.

Die AT-Domäne des Lademoduls wählt Propionyl-CoA als Startereinheit aus und überträgt es auf das aktivierte, benachbarte ACP. (Alle ACP Domänen aus DEBS werden durch die Phosphopantetheinyltransferase SePptII phosphopantetheiniliert, das notwendige Gen findet sich anders als erwartet jedoch nicht im Erythromycin Biosynthesecluster.<sup>[46]</sup>) Der Propionyl-Rest wird dann zu der KS-Domäne des Modul 1 transferiert. In den letzten Jahren konnte aufgezeigt werden, dass Propionyl-CoA in Abwesenheit des Lademoduls auch direkt an die KS1 Domäne binden kann, jedoch mit deutlich reduzierter Effizienz.<sup>[47,48]</sup> Alle AT-Domänen der Module eins bis sechs wählen und transferieren ausschließlich das (2S)-Enantiomer von Methylmalonyl-CoA auf die nachfolgenden ACP.<sup>[40,49]</sup> Demnach muss eine Epimerisation der  $\alpha$ -Methylgruppe nach dem ersten, fünften und sechsten Kondensationsschritt stattfinden, jedoch ist bisher noch nicht bekannt ob diese Epimerisationsreaktionen durch die PKS kontrolliert werden.<sup>[50]</sup> Nach der ersten Kondensation, wird eine Reduktion des  $\beta$ -Carbonyls durch die KR Domäne des Moduls 1 katalysiert. Die Acylkette wird nachfolgend auf die KS-Domäne des zweiten Moduls übertragen und eine Kondensation mit einer Methylmalonyl-CoA Verlängerungseinheit generiert ein Triketid. Das  $\beta$ -Carbonyl des Triketids wird nachfolgend durch die KR2 Domäne reduziert. Der nächste Schritt basiert auf einem Interpolypeptidtransfer der wachsenden Polyketid-Kette vom ACP2 des DEBS1 zur KS3 von DEBS2.<sup>[50]</sup> Das dann durch die Kondensation einer weiteren Verlängerungseinheit resultierende Tetraketid wird nicht weiter durch reduktive Domänen prozessiert, wodurch eine Ketogruppe an Position C9 des 6-dEB erzeugt wird. Nach dem vierten Kondensationsschritt (Modul vier) erfolgt eine Reduktion des  $\beta$ -Carbonyls über die KR, DH, und ER Domäne zur Methylengruppe. Den Kondensationsschritten fünf und sechs folgen jeweils Reduktionen des  $\beta$ -Carbonyls zur Hydroxylgruppe durch die entsprechenden KR Domänen. Nachfolgend ermöglicht die terminale Esterase die Abspaltung der Polyketidkette von der PKS und leitet so den nukleophilen Angriff des C13-Hydroxyl auf das gebildete Carbanion C1 ein, wodurch der Macrolactonring geschlossen wird.<sup>[20]</sup> Der resultierende Erythromycin-Vorläufer wird weitergehend post-PKS prozessiert, wodurch die biologische Aktivität der Verbindung stark beeinflusst wird.<sup>[51]</sup> Zunächst katalysiert eine Monooxygenase eine Hydroxylierung an C6. Nachfolgend wird die Mycarose an die C3-Hydroxylgruppe gebunden und anschließend der Aminozucker durch eine Transferase übertragen<sup>[52]</sup>, wodurch das erste aktive Intermediat, Erythromycin D, entsteht. Durch weitere C12-Hydroxylierung

mit anschließender O-Methylierung der C3-Hydroxylgruppe der Mycarose wird über die Zwischenstufen Erythromycin C und B das Produkt Erythromycin A gebildet.<sup>[53]</sup>

DEBS repräsentiert wunderbar, wie die Natur das Problem der komplexen Programmierung der einzelnen Biosynthesewege gelöst hat: die Reihenfolge der einzelnen Schritte durch modulare PKS ist bereits in der primären Struktur des Proteins festgelegt. Demnach ist die Wahl der Anzahl und Art der Synthesebausteine für die Kettenverlängerung durch die Gensequenz kodiert, die dann in Proteine translatiert als Serie von *active sites* entsprechend in dem Multienzymkomplex platziert sind. Man spricht von dem Kolinearitäts-Prinzip<sup>[20]</sup>, welches besagt, dass die Anordnung der katalytischen Domänen in den einzelnen Modulen direkt mit der Struktur des biosynthetisierten Polyketids korreliert.

Einige bakterielle modulare Typ-I-PKS fügen sich jedoch nicht in dieses Schema ein, da bei ihnen Module mehr als einmal verwendet<sup>[54,55]</sup> oder übersprungen werden<sup>[56,57,58]</sup> oder weil die Architektur des Moduls nicht mit der Struktur des entstehenden Metaboliten zusammenpasst.<sup>[22,34,34]</sup> Der letzte Fall tritt vor allem in der Klasse der *trans*-AT-PKS auf, wo den Modulen diskrete AT-Domänen fehlen.<sup>[59,60,61]</sup> Im Unterschied zu den *cis*-AT-PKS werden *trans*-AT-PKS durch freistehende Acyltransferasen beladen (Abbildung 9).

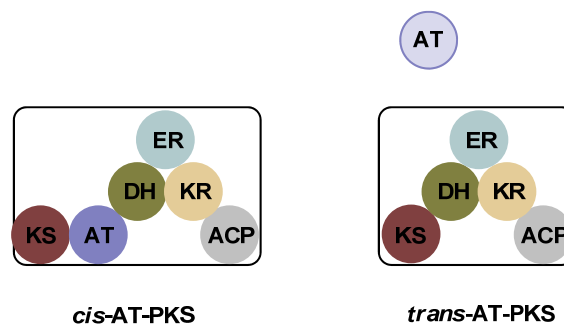


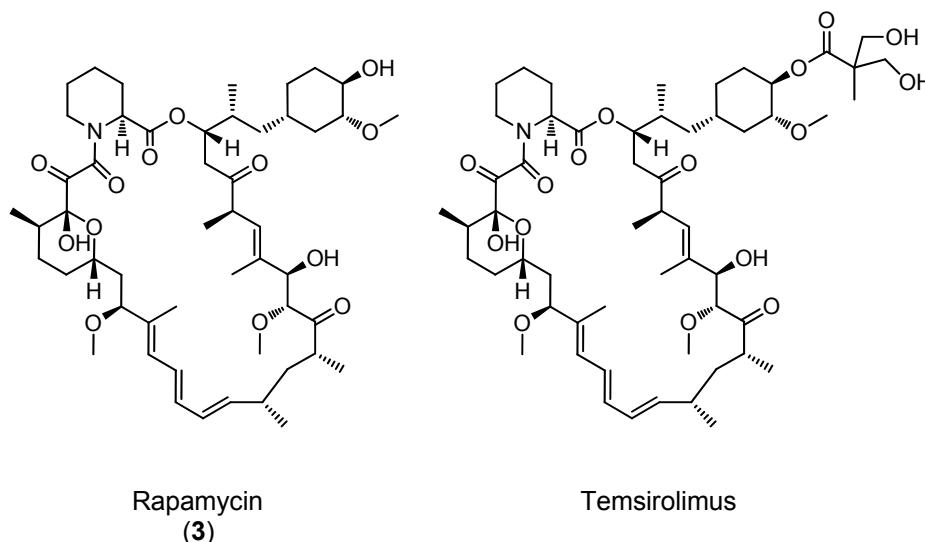
Abbildung 9: Abbildung eines Modules von *cis*-AT (links) und *trans*-AT-PKS (rechts).

### 1.3 Das biotechnologische Potential von Typ-I-PKS

Die Evolution von Naturstoffen zur Optimierung ihrer biologischen Aktivität erfolgte über Millionen von Jahren. Daher sind diese Naturstoffe oftmals nicht für eine anthropozentrische Nutzung optimiert und viele dieser Substanzen haben unerwünschte Eigenschaften oder Nebeneffekte wie geringe orale Verfügbarkeit oder Toxizität. Folglich weisen viele naturstoffbasierte Wirkstoffe Modifikationen auf, die



oftmals partialsynthetisch eingefügt worden sind. Ein prominentes Beispiel ist die Modifikation des fermentativ gewonnenen Naturstoffes Rapamycin (**3**) durch organische Synthese zum Derivat Temsirolimus (s. Abbildung 10). Durch die zusätzliche Esterfunktion konnte die Löslichkeit der Substanz deutlich verbessert und somit die Bioverfügbarkeit erhöht werden.<sup>[62]</sup>



**Abbildung 10: Struktur von Rapamycin und dem partialsynthetischen Derivat Temsirolimus.**

Semisynthetischen Substanzen wie Temsirolimus sind das Resultat von Leitstrukturoptimierungen. In Fall von hoch komplexen Naturstoffen wie Polyketiden, erlaubt die genetische Manipulation ebenfalls eine spezifische und selektive Modifizierung von Naturstoffen, die möglicherweise durch chemische Modifikationen nicht möglich oder ineffizient wären.

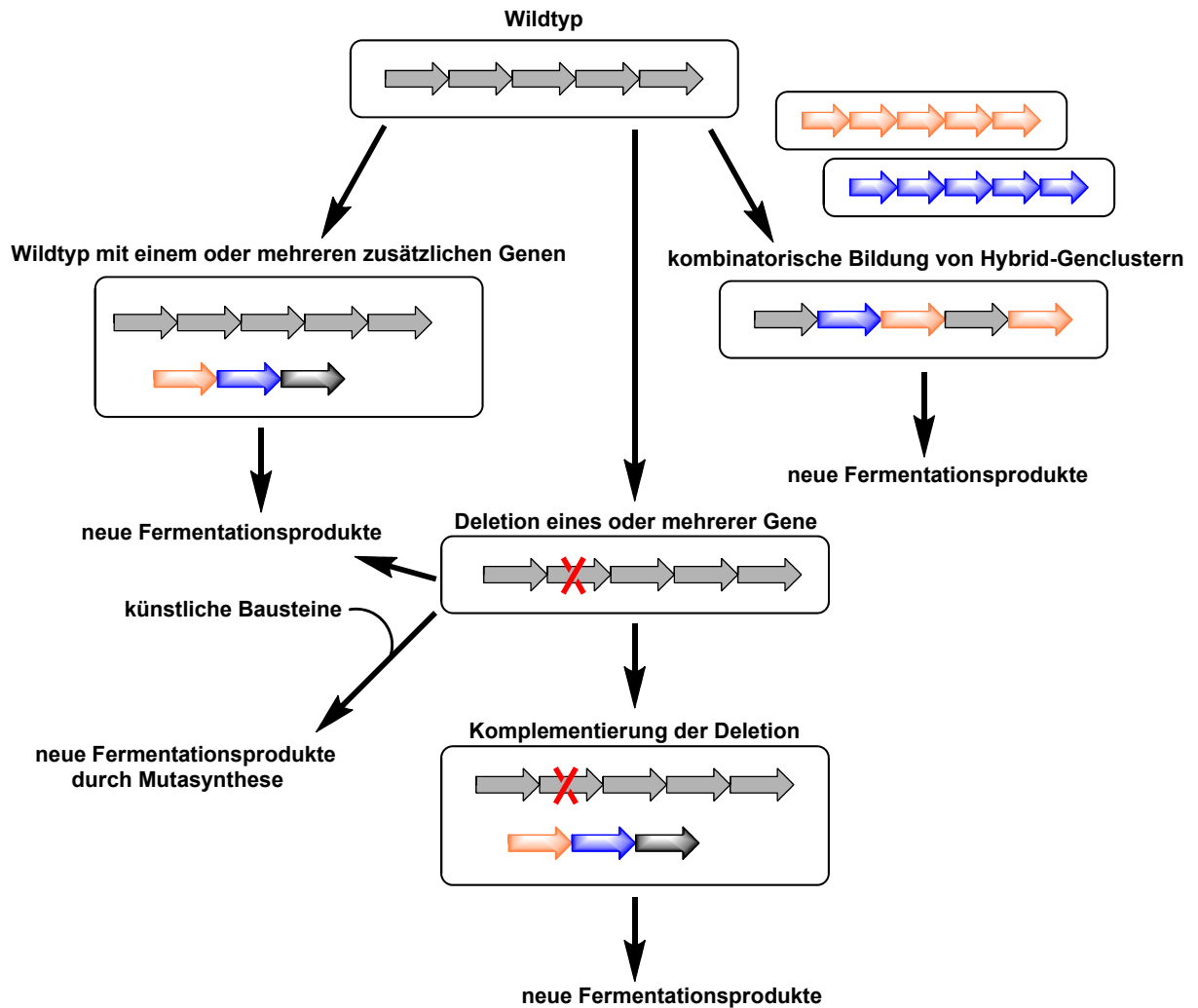
Noch vor dem Beginn der genetischen Ära der Polyketid Biosynthese war das zentrale Ziel der Wissenschaft große Bibliotheken struktureller Varianten für die Evaluierung von Leitstrukturen zu generieren.<sup>[36]</sup> Die Entdeckung und Aufklärung der modularen Typ-I-PKS eröffnete schlagartig eine neue Strategie in der Polyketid-Forschung als Pendant zur Total- und Semisynthese: das Mischen und Anpassen (*mixing and matching*) verschiedener PKS Komponenten sowohl innerhalb als auch zwischen verschiedenen PKS durch die genetische Modifikation dieser.<sup>[20,63]</sup> Hinter diesen Experimenten steht die Idee, dass sich durch genetische Manipulation der codierenden DNA-Sequenz unter Ausnutzung des modularen Prinzips neue Modul-Kombinationen generieren lassen sollten. Entsprechend ihrer veränderten Biosynthesemaschinerie sollten diese gegenüber des ursprünglichen Metaboliten zu einer veränderten Struktur führen. Meilensteine in dieser Entwicklung waren

Experimente, die belegten, dass Module oder Domänen einzeln transplantierbar sind, wenn auch mit Einschränkungen.<sup>[24,63]</sup> Zusammengefasst werden diese Ansätze unter dem Begriff der kombinatorischen Biosynthese.

### 1.3.1 Die kombinatorische Biosynthese

Die kombinatorische Biosynthese ebnet Wege, neue nicht in der Natur vorkommende Substanzen zugänglich zu machen.<sup>[64,65]</sup> Hierzu werden einzelne Reaktionen der Biosynthesekaskade abgewandelt, weggelassen oder ersetzt, so dass ein alternatives Produkt am Ende der Biosynthese steht (s. Abbildung 11). Abhängig von den möglichen bestrittenen Wegen, könnte die so erzeugte Diversität enorm sein.

Über die letzten Dekaden hat die Anwendung der kombinatorischen Biosynthese in mehr als 200 neuen Polyketiden resultiert.<sup>[36]</sup> Bis heute wurden hierzu verschiedene Ansatzpunkte verfolgt: 1. die Startereinheiten durch den Austausch der Lademodule oder durch zu Mutasyntese verändern<sup>[66,67,68,69,70]</sup>, 2. der Grad und die Stereochemie der Keto-Reduktion (durch Inaktivierung oder Austausch der KR Domänen) sowie durch Einfügen zusätzlicher reduktiver Domänen zu manipulieren<sup>[71,72]</sup>, 3. der Grad der Verzweigung durch die Substitution der AT-Domänen alternativer Spezies abzuwandeln,<sup>[73,74,75]</sup> und 4. die Kettenlänge durch die Relokalisation der TE Domäne zu einer vorhergehenden Position zu verkürzen<sup>[76,77,78]</sup>. Auch wenn die einzelnen Studien eindeutig die Anwendbarkeit dieser Reorganisation demonstrieren, sind die angewandten Methoden alles andere als trivial und bisher nicht für die Konstruktion großer Bibliotheken einsetzbar.<sup>[26,79]</sup> Immer wieder wurde beobachtet, dass die gentechnisch erzeugten Hybrid-PKS weitaus weniger effizient Produkte herstellen als die entsprechenden Wildtypen.<sup>[79,80]</sup> Darüber hinaus erweisen sich die Stämme der natürlichen Produzenten oftmals als wenig geeignet für die genetische Manipulation, was oftmals in einem enormen zeitlichen Aufwand resultiert.<sup>[81,82]</sup> Die größte Herausforderung dieser Technologie bleibt somit weiterhin bestehen: die Etablierung einer allgemeingültigen Strategie, die ein routiniertes Umprogrammieren der Biosynthesemaschinerie erlaubt.



**Abbildung 11: Strategien der kombinatorischen Biosynthese.** Ein natürlich vorkommender biosynthetischer Gencluster kann mit zusätzlichen Genen versehen werden, die der Biosynthese einzelne Syntheseschritte hinzufügen. Daraus resultieren neue Fermentationsprodukte. Aus einem Gencluster können jedoch auch Fragmente entfernt oder inaktiviert werden. Diese Lücke kann anschließend mit alternativen Genen komplementiert werden. Ein Spezialfall dieser Variante ist die Mutasyntese, bei der gezielt Gene ausgeschaltet werden, welche die Herstellung eines definierten Biosynthesebausteins dirigieren. Der dadurch entstehende Mangel lässt sich dann durch Zugabe synthetischer Bausteine komplementieren, auch der Einbau nichtnatürlicher funktioneller Gruppen ist möglich. Mit oder ohne Komplementierung kann auch diese Strategie Naturstoffderivate liefern. Experimentell außerordentlich anspruchsvoll ist die dritte Variante der kombinatorischen Biosynthese, in der gleich mehrere Gencluster durch molekularbiologische Methoden rekombiniert werden.<sup>[83]</sup>

### Deletion eines Genes und Mutasyntese

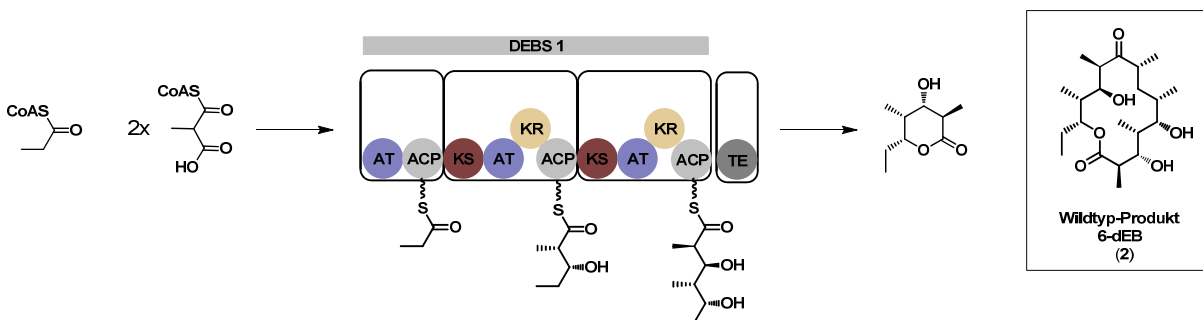
Eine der einfachsten Strategien zur strukturellen Veränderung von Polyketiden ist die Deletion eines Genes, das nachfolgend auf den eigentlichen Biosyntheseweg (über die PKS) agiert. Solche nachfolgenden Enzyme katalysieren oftmals Reaktionen wie: Glycosylierungen, Acetylierungen, Oxidationen, Methylierungen und Reduktionen.<sup>[79]</sup> Ein klassisches Beispiel ist hier die Deletion der P450 Epoxidase, die das Polyketid

Natamycin (Pimaricin) post-PKS modifiziert.<sup>[84]</sup> Durch die spezifische Deletion entsteht ein Naturstoffanalogon dem die Epoxid-Funktion fehlt.

Anspruchsvoller und meist nicht vorhersagbar ist die Anwendung der Mutasynthese auf PKS.<sup>[12,85]</sup> Gentechnisch wird eine mutierte Polyketidsynthase erzeugt, in der der Biosyntheseweg an einer bestimmten Stelle unterbrochen oder die Fähigkeit einen notwendigen Vorläufer zu generieren unterbunden ist. Komplementiert wird die Biosynthese dann durch die Zufuhr chemisch synthetisierter Substratanaloga. Werden diese von der PKS akzeptiert und weiter prozessiert, so entsteht ein Naturstoffderivat. Auf diese Art und Weise wurden eine Vielzahl neuer Polyketid-Derivate<sup>[86,87,88,89]</sup> zugänglich. Besonders hervorzuheben, sind hier die Vielzahl der erzeugten Rapaloga<sup>[69,90,91]</sup> (Derivate des Rapamycin), von denen einige verbesserte pharmakologische Eigenschaften aufweisen und sich mittlerweile in der klinischen Testung befinden.

### Kombinatorische Bildung von Hybrid-Clustern

Eine im Wortsinne kombinatorische Biosynthese von reduzierten Polyketiden mit einer randomisierten Zusammenfügung zahlreicher Domänen und Modulen aus verschiedenen Produktionsorganismen würde den Zugang zu sehr großen Substanzbibliotheken eröffnen.<sup>[24]</sup> Berechnungen zeigten, dass ausgehend von einer PKS mit 6 Modulen theoretisch mehr als 100.000 Strukturen synthetisiert werden könnten.<sup>[92]</sup> Durch die Generierung einer artifiziellen Mini-Synthase DEBS1-TE<sup>[77]</sup> konnte die Arbeitsgruppe um Peter F. Leadlay bereits Mitte der 90er Jahre die Transplantierbarkeit einzelner Domänen aufzeigen. In diesem Experiment wurde die terminale Esterase-Domäne aus der Erythromycin-PKS künstlich an DEBS1 fusioniert (vgl. Abbildung 12).

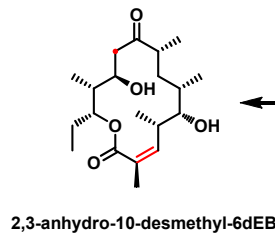
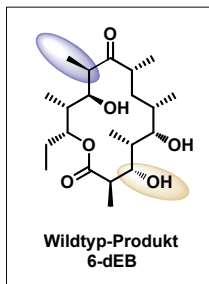
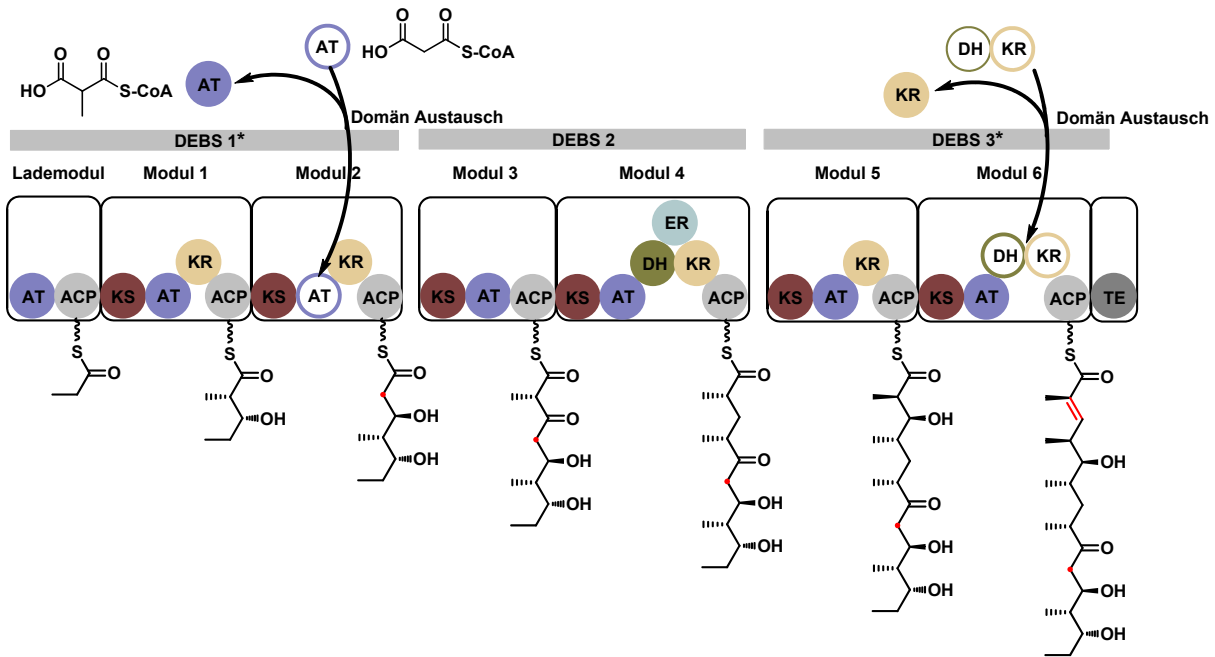


**Abbildung 12: Hybrid PKS DEBS1-TE.** Die Hybrid-PKS basiert auf dem DEBS Cluster, allerdings ist die Terminale Esterase (TE) an das DEBS1 fusioniert worden. Die so entstehende PKS katalysiert die Bildung eines nicht-natürlichen Triketidlacton (im Vergleich zum Wildtypprodukt 6-dEB) und diente in der Vergangenheit in einer Vielzahl von Studien als Modellsystem.

Die Substratspezifität der terminalen Esterase, die natürlicherweise mit DEBS3 verknüpft ist, erwies sich eindrucksvoll flexibel. Basierend auf der Fusion an DEBS1 katalysiert die Esterase-Domäne die Abspaltung und Zyklisierung der Polyketidkette bereits nach zwei Verlängerungsrunden zu einem Triketidlacton. Die so generierte, minimale Hybrid-PKS diente in einer Vielzahl von Experimenten<sup>[20,93,94,95]</sup> als Modellsystem.

Eine der größten mittels kombinatorischer Biosynthese erzeugten Derivat-Bibliotheken umfasst 61 Analoga von 6-dEB<sup>[96]</sup> und wurde durch Austausch der AT und der  $\beta$ -Kohlenstoff prozessierenden Domänen zwischen der Erythromycin und der Rapamycin PKS in einem gentechnisch veränderten Wirt erzeugt (Abbildung 13). Jedoch konnten diese Naturstoffderivate mit nicht-natürlichen Methylierungs- oder Redoxmustern meist nur mit Ausbeuten von weniger als 1 mg pro Liter Fermentationsmedium erzeugt werden. Dieses Experiment war trotz der geringen Fermentationsausbeuten ein Meilenstein, da es nicht wie viele andere an stark verkleinerten und vereinfachten Modellsystem durchgeführt wurde, sondern an einer vollständigen PKS.<sup>[24,79]</sup>

Zahlreiche andere *Swapping*-Experimente zeigten auf, dass sich die einzelnen funktionellen Domänen zwar nicht routinemäßig aber dennoch häufig zwischen den einzelnen Genclustern transferieren lassen.<sup>[73,75,97,98,99]</sup> Jedoch basieren wesentliche Schwierigkeiten bei der Generierung von Hybrid-PKS auf der exakten Erkennung von Modul- und Domängrenzen und auf der strukturellen Integrität dieser artifiziellen Hybrid-PKS.<sup>[20]</sup> In solchen Proteine die strukturelle Integrität und damit auch die katalytische Funktionalität solcher künstlichen Hybride zu gewährleisten, ist für die moderne Enzymchemie eine Herausforderung.<sup>[24,38]</sup> So resultieren *Swapping*-Experimente oftmals in nicht-funktionellen oder stark beeinträchtigten chimären Enzymen.<sup>[75,100]</sup> Die Probleme können auf zweierlei Gründen basieren: 1. Die nachfolgenden Domänen akzeptieren das modifizierte Substrat nicht, oder 2. der Domänaustausch zerstört die quaternären Interaktionen zwischen den einzelnen Domänen (durch Denaturierung etc.).<sup>[79]</sup>



aus dem *rapA* Modul 2, überträgt Malonyl-CoA



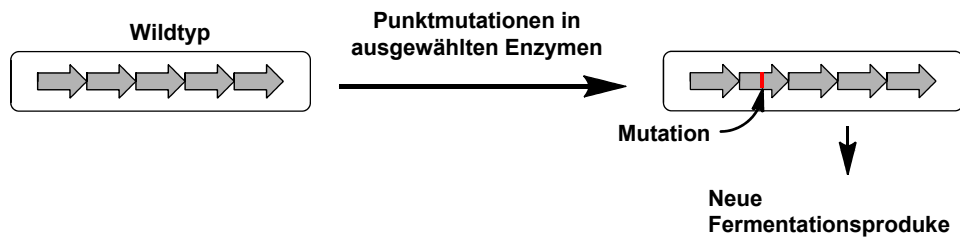
aus dem *rapA* Modul 4, reduziert den Ketoester zur Doppelbindung

**Abbildung 13: Austausch einzelner Domänen des DEBS Cluster führt zu 6-dEB Analoga.** Im aufgezeigten Beispiel ist die Methylmalonyl-CoA-spezifische AT-Domäne des Moduls 2 gegen eine Malonyl-CoA-spezifische AT-Domäne des Rapamycin Genclusters ausgetauscht, wodurch eine 10-Desmethylvariante resultiert. Darüber hinaus wurde die KR6 Domäne gegen die KR4 und DH4 Domäne aus dem Rapamycin Cluster ausgetauscht, durch die zusätzliche DH Domäne wird der  $\beta$ -Ketoester nun zur Alkenfunktion reduziert. Das resultierende 6-dEB-Derivat zeigt folglich ein unterschiedliches Methylierungs- und Redox-Muster.

## Das Einfügen von Punktmutationen als neue Strategie der kombinatorischen Biosynthese

Der gezielte Austausch einer limitierten Anzahl von Aminosäuren (s. Abbildung 14) könnte einen neuen Weg ebnen, mit dem die einzelnen Problematiken der *Swapping*-Experimente (wie Fehlfaltung) umgangen werden könnten. In ersten Versuchen hierzu konnte bereits aufgezeigt werden, dass durch den gezielten

Austausch von Aminosäuren die Stereoelektivität der reduktiven Domänen verändert<sup>[95]</sup>, sowie die Substratspezifität von AT-Domänen relaxiert<sup>[101]</sup> werden konnten. In Zukunft mögen *Swapping*-Experimente durch die zielgerichtete Mutagenese an Bedeutung verlieren. Bis heute ist das Verständnis der Enzymchemie von Polyketidsynthesen jedoch nicht so tiefgründig, dass eine breite Anwendung der zielgerichteten Mutagenese zum Einzelaminosäureaustausch in der kombinatorischen Biosynthese absehbar wäre.<sup>[24]</sup>



**Abbildung 14:** Einfügen von Punktmutationen als möglicher weiterer Arm der kombinatorischen Biosynthese.

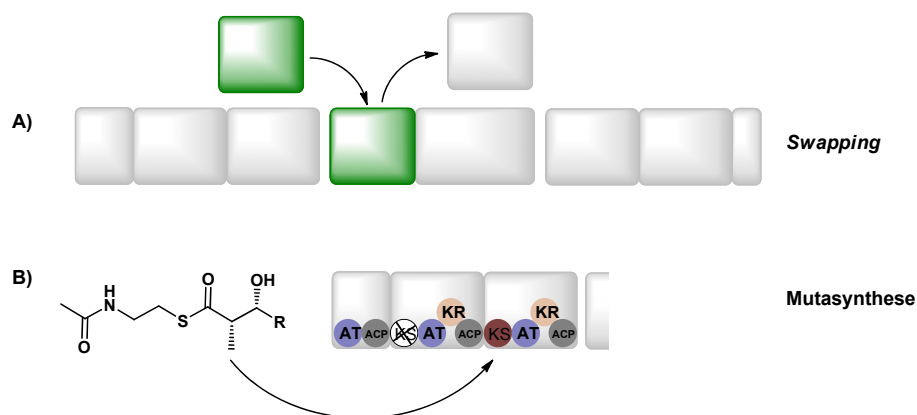




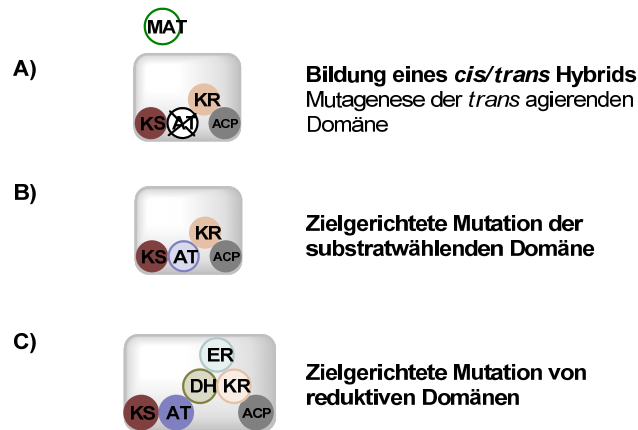
## 2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll eine nach Möglichkeit verallgemeinerbare Strategie gefunden werden, mit der sich nicht-natürliche funktionelle Gruppen in Polyketid-Biosynthesewege einbringen lassen. Des Weiteren soll an der Entwicklung einer neuen Strategie zur Nutzung von Punktmutationen in der Kombinatorischen Biosynthese geforscht werden, die eine Mechanismusbasierte und damit rationalisierbare Planung von Experimenten zur Diversifizierung polyketidischer Naturstoffe erlauben soll. Dabei ist die Arbeit mit den Originalproduzenten der Polyketide, üblicherweise filamentös wachsenden Bakterien aus der Familie der Actinomyceten, von zentraler Bedeutung. Diese sind zwar signifikant komplizierter und aufwändiger zu handhaben als heterologe Expressionsstämme wie zum Beispiel *E. coli*, jedoch sind mit ihnen erzielte Ergebnisse von erheblich höherer Bedeutung und lassen sinnvolle Schlussfolgerungen und Übertragungen auf andere Systeme zu.

Polyketide sind, ebenso wie alle anderen Naturstoffklassen, in der Diversität der genutzten funktionellen Gruppen stark eingeschränkt, was ihre Nutzung als Wirk- und Funktionsstoffe durch den Menschen nicht selten limitiert. Insbesondere bei Polyketiden ist die Semisynthese von Derivaten die an eine menschliche Nutzung angepasst sind, oft durch die Labilität der Naturstoffe und die mangelnde Orthogonalität der zur Verfügung stehenden Funktionalitäten begrenzt. Diese Limitation soll in der vorliegenden Arbeit auf verschiedene Arten aufgebrochen werden (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 16).

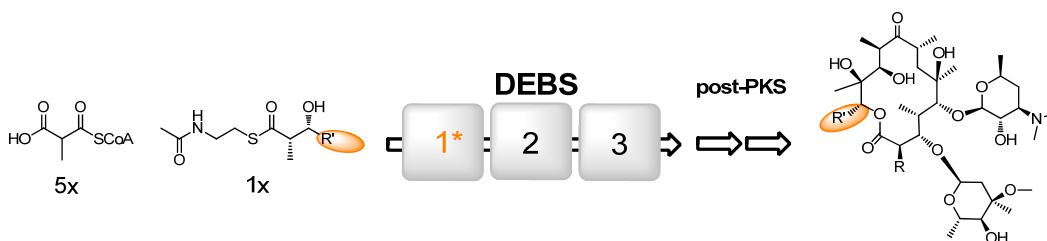


**Abbildung 15: Klassische Methoden zur Erweiterung der Polyketid-Diversität. A** Austausch (*Swapping*) von einzelnen Domänen oder ganzen Modulen zur Erzeugung von Hybrid PKS **B** Anwendung der Mutasynthese, die die moderne organische Chemie mit der komplexen Polyketid-Biochemie kombiniert.



**Abbildung 16: Moderne Versuchsansätze zur möglichen Erweiterung der Polyketid-Diversität.** **A** Bildung von *cis/trans* Hybrid Clustern und spezifischer Mutation der *trans* agierenden AT, MAT: Malonyl-CoA : Acyl Carrier Protein Transacylase, *fabD* Homolog **B** Zielgerichtete Mutagenese der substratwählenden Domäne **C** Zielgerichtete Mutation von reduktiven Domänen

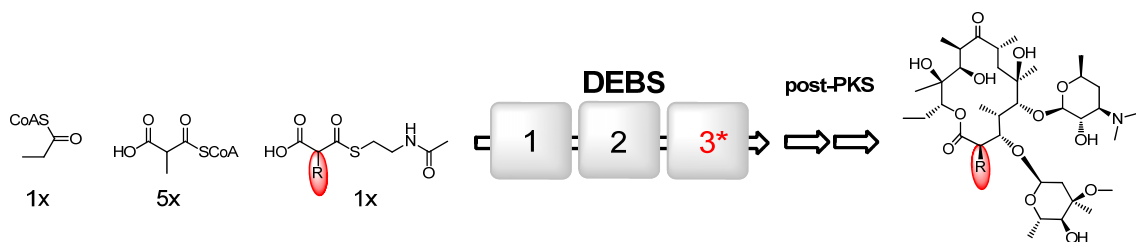
Eine zentrale Voraussetzung für die geplanten Arbeiten spielt die Entwicklung einer Methode für die rasche und zuverlässige genetische Manipulation der für Polyketide codierenden Gencluster. Diese sind in den untersuchten Fällen durchweg sehr groß und von hohem GC-Gehalt, was klassische Mutagenesetechniken an ihre Grenzen bringt. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit sollte auf der Modifizierung der Erythromycin Biosynthesemaschinerie DEBS liegen. Durch die Anwendung der Mutasyntese (vgl. Abbildung 17) sowie des Austausches von Domänen (*domain swapping*; Abbildung 18-1) sollen neue Polyketide durch klassische Strategien zugänglich gemacht werden.



**Abbildung 17: Modifikation von DEBS 1 zur Derivatisierung des Erythromycin C-15 mittels Mutasyntese.** Durch die heterologe Zufuhr synthetisch erzeugter Diketide an eine Blockmutante kann die Biosynthese komplementiert werden.

Im direkten Fokus standen die Entwicklung und Anwendung moderner Strategien, um die Substratflexibilität der Acyltransferasen zu relaxieren und so den Einbau nicht-natürlicher Bausteine zu ermöglichen. Hierzu sollten unterschiedliche Strategien angewandt werden (s. Abbildung 18-B bzw. Abbildung 18-C). 1. Durch die direkte zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren innerhalb der AT6-

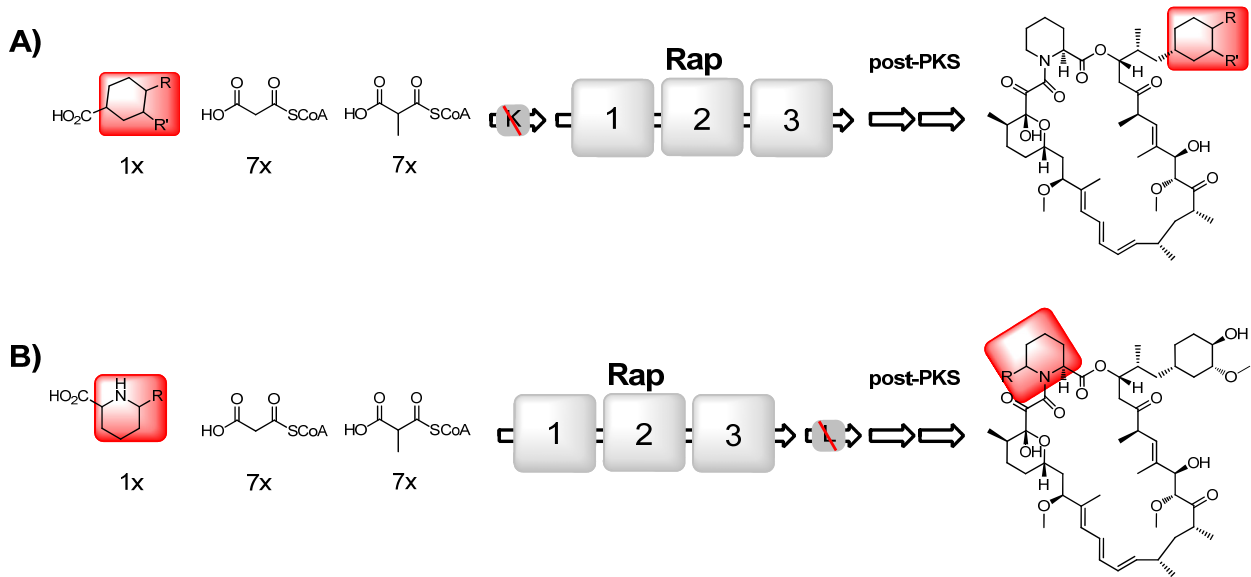
Domäne sollten Sequenz-Funktionsbeziehungen studiert werden. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse über den Prozess der Substratwahl gewonnen werden, die wegweisend für eine gezielte Relaxierung der Substratspezifität sein könnten. Eine relaxierte Substratspezifität könnte den Einbau eines nicht-natürlichen Bausteines durch die AT6-Domäne in das Polyketid ermöglichen. Zweitens sollte eine *cis/trans* Hybrid-PKS generiert werden. Die Modifikation eines freihstehenden substratauswählenden und –übertragenden Enzyms erleichtert den experimentellen Aufwand signifikant gegenüber der Manipulation von AT Domänen. Daher sollte eine moderat thermophile *trans*-agierende MAT, ein *fabD*-homologes Enzym, identifiziert und charakterisiert werden. Nachfolgend sollte eine Plattform für die gerichtete Evolution dieses freihstehenden Enzymes geschaffen werden, die sowohl semi-rationale als auch randomisierte Mutagenesen beinhaltet, wodurch langfristig der Einbau eines nicht-natürlichen Bausteines in das Polyketid Erythromycin ermöglicht werden könnte.



**Abbildung 18: Modifikation von DEBS3 zur Derivatisierung des Erythromycin C-2.** Drei unterschiedliche Strategien sollen hierzu verfolgt werden: **A** Durch den Austausch der AT6-Domäne gegen die Nid AT5 (*Swapping*) soll der Einbau eines nicht-nativen Substrates ermöglicht werden. **B** Durch die zielgerichtete Mutation der AT6-Domäne soll die Substratflexibilität der Domäne relaxiert werden **C** Generierung einer *cis/trans* Hybrid-PKS, durch die Mutation einer *trans* agierenden AT-Domäne soll die Substratspezifität ebenfalls relaxiert werden.

Einen weiteren Startpunkt für die Mutagenese sollte eine Hybrid-PKS liefern, bei der die native AT6-Domäne durch eine AT-Domäne aus einer anderen PKS mit unterschiedlicher Substratspezifität ersetzt wird (vgl. Abbildung 18A).

Durch die klassische Mutasynthese sollte zusätzlich das Immunsuppressivum Rapamycin an der Start- und Endeinheit des Moleküls modifiziert werden (s. Abbildung 19). Hauptaugenmerk soll hierbei auf dem Einbau von Bausteinen mit orthogonalen funktionellen Gruppen (wie Aziden) liegen, die nachfolgend eine vereinfachte partialsynthetische Modifikation ermöglichen könnten.



**Abbildung 19: Anwendung der Mutasynthese auf die Polyketidsynthese der Rapamycin Biosynthese.** Inaktivierung von RapK (synthetisiert die Startereinheit) zur Derivatisierung der Rapamycin Startereinheit **A** und Endereinheit **B** mittels Mutasynthese. Durch die heterologe Zufuhr von synthetischen Startereinheit-Analogen sollen Blockmutante der Startereinheit (rapK) bzw. der Endereinheit (rapL) komplementiert werden.

Darüber hinaus sollen Beiträge zur gerichteten Redox-Derivatisierung des Polyketid Pre-Monensin geleistet werden. Der Beitrag soll hierbei insbesondere in der Fermentation und Analytik der Naturstoffe liegen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die weiße Biotechnologie verwendet Enzyme oder ganze Mikroorganismen um chemische Produkte zu synthetisieren. In vielen Fällen kann die Biotechnologie partielle Schwächen der klassischen Synthese komplementieren und so komplexe Reaktionskaskaden ermöglichen.<sup>[9,10]</sup> Dieses ist oftmals vor allem für die Synthese hoch funktionalisierter und komplexer Moleküle sinnvoll. Insbesondere weisen viele Naturstoffe eine sehr hohe Komplexität auf<sup>[53]</sup> und ihre präparative Synthese ist ohne den Einsatz von Enzyme in vielen Fällen nicht realisierbar.<sup>[8,9]</sup> Im Fall der Synthese von Naturstoff-Derivaten, bietet die weiße Biotechnologie durch den Einsatz nativer oder auch manipulierter Biosynthesewege einige Optionen.<sup>[8,102]</sup> Dieses Feld ist jedoch gegenwärtig sehr explorativ und erfordert in nahezu allen Fällen intensive Grundlagenarbeit.<sup>[20,24,79,83]</sup> Alternativ kann die klassische Strategie der Partialsynthese angewandt werden um ausgehend von nativen Fermentationsprodukten vielfältige Derivate zu erzeugen. Ein prominentes Beispiel für solch eine Kombination aus Fermentation und organischer Synthese ist das Rapamycin-Derivat Temsirolimus<sup>[62]</sup> (vgl. Kapitel 1.3). Beide Strategien haben intrinsische Limitationen und bieten zahlreiche Herausforderungen für Synthesechemiker und Biotechnologen. Polyketide sind allgegenwärtig vorkommende Naturstoffe, die als Sekundärmetabolite von Bakterien, Pilzen und Pflanzen identifiziert wurden. Die enorme Vielfalt der mehr als 7000 bekannten natürlichen Polyketid-Strukturen ergibt sich aus einer Serie programmierter Ereignisse, die vor, während und nach dem durch PKS vermittelten Aufbau der Polyketid-Kette stattfinden.<sup>[22,103]</sup> Die Art und die Zahl der verwendeten Biosynthesebausteine (der „Starter“- und „Verlängerungseinheit“) sind hierbei die ersten bestimmenden Faktoren,<sup>[49]</sup> wobei die Spezifitäts-Divergenz von Acyltransferasen bedeutend zur Evolution der Polyketid-Diversität beitrug.<sup>[100]</sup> Folgend nimmt das unterschiedliche Prozessierungsausmaß der jeweiligen  $\beta$ -Ketogruppe und die daraus resultierende Konfiguration Einfluss auf die natürliche Diversität.<sup>[37]</sup> Im Anschluss an die Freisetzung der Polyketid-Kette folgt oftmals eine Cyclisierung des Grundgerüst, wobei nachfolgende sekundäre Cyclisierungen, C-C-Bindungsspaltungen und Umlagerungen zu neuen Carba- und Heterocyclen führen.<sup>[22]</sup> Zuletzt kann die Polyketidstruktur dann durch spezifische post-PKS Prozesse weitergehend modifiziert werden.<sup>[39,52]</sup>

Die Aufklärung der modular agierenden Polyketid Biosynthesemaschinerie und die Faszination über das unglaublich hohe kombinatorische Potential bildeten den Anreiz für viele Wissenschaftler, Strategien auszutesten und zu entwickeln, um nicht-natürliche Polyketide zu erzeugen. Strukturelle Modifikationen wurden durch das „Mischen“ der Megasyntasen auf Untereinheit-, Modul- oder Domänebene erzeugt (Generierung von Hybridclustern). Diese biotechnologischen Ansätze zur Modifikation der einzelnen genannten Variablen führen bis heute zu einer Vielzahl neuer Polyketiden<sup>[65,79]</sup> und somit zu erhöhter Diversität. Deutlich geht jedoch aus der Literatur hervor, dass es keine allgemeingültigen Strategien für solche Experimente gibt. Es scheint als würde das Prinzip von Versuch und Irrtum gelten. Oftmals resultieren *swapping* Experimente in nicht-funktionellen oder stark beeinträchtigten chimären Enzymen,<sup>[79,104,105]</sup> was uns dazu bewegen sollte die natürliche Strategie genauer zu studieren umso Rationalität in den einzelnen Versuchsansätzen zu ermöglichen. Anstelle eines Austausches von ganzen katalytischen Domänen könnte die direkte Modifikation von wenigen Aminosäuren innerhalb der entsprechenden Domäne wegweisend für eine vergrößerte Diversität von Polyketiden sein.<sup>[24]</sup> Betrachtet man die Komplexität von Polyketiden, so sind Redoxvariationen eher restriktiv, da hierdurch nur eine kleine Anzahl verschiedener funktioneller Gruppen eingebracht werden kann.<sup>[106]</sup> Eine deutlich höhere Diversität kann durch die Akzeptanz und den nachfolgenden Einbau von verschiedenen Malonyl-basierten Verlängerungseinheiten erreicht werden.<sup>[22,49]</sup> Das heutige Verständnis der PKS Enzymologie legt nahe, dass der komplexe Prozess der Baustein-Auswahl und der darauffolgende Einbau der einzelnen Bausteine in die wachsende Polyketidkette durch Acyltransferasen kontrolliert wird<sup>[26]</sup> und macht diese daher zu einem besonders interessantem Mutageneseziel. Jedoch bleibt die direkte Mutagenese durch die Komplexität der PKS und das fehlende Verständnis über die Erkennung von Malonylthioestern durch diese Enzyme eine gewaltige Herausforderung mit vielen Hindernissen, die bis zur Akzeptanz von weiteren Malonyl-CoA abgeleiteten Substraten durch gentechnisch modifizierte Acyltransferasen überwunden werden wollen.

Es muss fundamentale Enzymologie betrieben werden, um das Wissen über AT-Domänen zu vergrößern, schließlich haben sie einen bedeutenden Einfluss auf die Polyketid-Diversität. Hier gibt es noch viele Fragen zu beantworten: Wie sind AT-Domänen reguliert? Welche strukturellen Merkmale innerhalb der AT-Domäne sind

für die zumeist strikte strukturelle und stereochemische Spezifität verantwortlich? Nur Antworten auf diese Fragen können den Weg zu biotechnologischen Ansätzen ebnen.

### **3.1 Identifikation und Behebung kritischer experimenteller Limitationen**

Anwendungen die die gentechnische Manipulation von PKS ermöglichen, gehen über die routinemäßig eingesetzten und in der Biotechnologie gut etablierten Methoden hinaus. Hinzu kommt, dass die aktuellen Methoden zur Modifikation von Polyketidsynthasen sehr komplex und zeitintensiv sind, was ihre Anwendungen stark limitiert. Die Entwicklung einer zuverlässigen Methode, die eine schnelle und spezifische Modifikation einzelner *pks*-Gene erlaubt und somit nicht nur Untersuchungen von Acyltransferase-Domänen ermöglicht, bildet einen wichtigen Grundstein und sollte in der initialen Phase der Arbeit entwickelt werden.

#### **3.1.1 Entwicklung einer Methode zur zielgerichteten Modifikation von PKS**

Hauptaugenmerk sollte hier auf der Etablierung einer breit anwendbaren Methode liegen, die auf die Modifikation der Biosynthesewege von Naturstoffen in Bakterien ausgerichtet ist. Die neue Technologieplattform sollte eine schnelle und flexible Manipulation großer Fragmente der an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligten Gene ermöglichen. Grundstein dieser Methode sollte die möglichst fehlerfreie Amplifikation von sehr langen (~ 10 kb) und GC-reichen DNA-Sequenzen sein, wie sie für PKS codieren, gefolgt von einer sequenz- und ligationsunabhängigen Klonierungstechnik. Um weitergehend die nachfolgende Expression der manipulierten Enzyme in den jeweiligen bakteriellen Produzenten zu ermöglichen, sollten verschiedene integrative *Shuttle*-Vektoren konstruiert werden. Zusätzlich sollten diese Vektoren eine simultane Einbringung genetischer Information an bis zu drei Stellen von Actinomyceten-Genomen in einen Schritt erlauben, was die Kompatibilität dieser Vektoren untereinander voraussetzt.

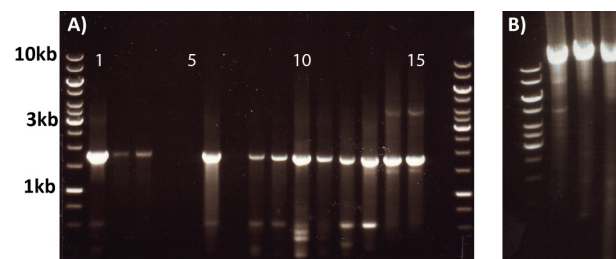
##### **3.1.1.1 Etablierung von PCR Parametern zur Amplifikation von *pks***

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine gut etablierte und routinemäßig eingesetzte Methode zur Amplifikation von Gensequenzen da. Werden jedoch bestimmte

Größenbereiche überschritten oder stellt der Aufbau der DNA-Sequenz (Struktur, GC-Gehalt) erhöhte bzw. besondere Anforderungen an die Reaktion, so gelangt der Experimentator unter Anwendung bisheriger Reaktionsbedingungen oft an Grenzen dieser Methodik. Eine Anpassung der klassischen PCR Parameter an die oben formulierten Anforderungen ist somit dringend notwendig und der zentrale experimentelle Schritt für die nachfolgend geplante und durchgeführte Manipulation von PKS durch Punktmutationen.

Die Etablierung der einzelnen PCR Parameter erfolgte an einer Vielzahl verschiedener Template, hauptsächlich fokussiert auf dem Erythromycin Biosynthesecolony von *S. erythraea* NRRL 2338 (NC\_009142).

Die initialen Screens (s. Abbildung 20) wurden mit kommerziell erhältlichen, *proofreading* DNA Polymerasen: Expand Long Range PCR System (Roche), KOD Polymerase (Novogene), Verbatim High-Fidelity DNA Polymerase, Phusion DNA Polymerase (Finnzymes), bei verschiedenen Konditionen, wie z.B. Temperaturprofilen, Puffern und Verwendung von Additiven (DMSO, PCR-Enhancer, Betain, Formamide, BSA und  $MgCl_2$ ) durchgeführt.



**Abbildung 20: Gelelektrophorese der PCR Produkte, verschiedene Ansätze zur Amplifizierung des ~10,5 kb großen *eryAIII* ausgehend von *pIB23*.** **A** Tasche 1: 1kb DNA Marker, Tasche 2-4: Expand Long Range PCR System (Roche) in Puffer 1,2 oder 3 5% DMSO als Additiv, Tasche 5-6: KOD Polymerase in Puffer 1 bzw. 2 mit 5 % DMSO als Additiv, Tasche 7-8: Verbatim High Fidelity DNA Polymerase in Puffer 1 oder 2, Tasche 9-10: Verbatim High Fidelity DNA Polymerase in Puffer 1 oder 2 mit zusätzlichen 1 mM  $MgCl_2$ , Tasche 11-13: Expand Long Range PCR System (Roche) mit verschiedenen Puffer, Tasche 15-16: Phusion DNA Polymerase in GC oder HF Puffer. **B** Amplifikation von *eryAI*, *eryAII* und *eryAIII* mit dem Phusion Flash Master Mix unter Zugabe von 1 M Betain und Durchführung im High-Speed Cycler.

Nur der auf der Phusion DNA Polymerase (in Form des Phusion Flash Master Mix) basierende und Betain als Additiv beinhaltende PCR Reaktionsansatz resultierte zuverlässig in Produktbildung mit hohen Ausbeuten. Hierbei stellte sich die Verwendung von Betain (1 M final) als kritischer Aspekt heraus. Die Reaktionsdurchführung in einem High Speed Thermocycler (Pico Thermal Cycler, Finnzymes) erhöhte signifikant die Spezifität und führte so zu nahezu nebenproduktfreier Amplifikation der einzelnen Gensequenzen (s. Abbildung 20B).



Die PCR verläuft gleichermaßen robust bei Verwendung von linearisierter Plasmid- oder Cosmid-DNA: bis zu 11 kb große Sequenzen konnten so nebenproduktfrei amplifiziert werden. Bei der Verwendung von genomischer DNA (linearisiert) als Templat konnten Amplifikationen bis zu einer Produktgröße von 5 kb reproduzierbar durchgeführt werden. Ein typischer Reaktionsansatz für die Amplifikation von *eryAIII* beinhaltet 5 µl 2 x Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix, 1 µl Templat (~50 ng/µl), jeweils 1 µl der verwendeten Oligonukleotide 5' und 3' (je 10 µM final) sowie 2 µl Betain (5 M). Folgende Parameter wurden für die Amplifikation von *eryAIII* (Oligonukleotide 206/207) verwendet: 1x 99 °C für 10 s, 25x [99 °C für 5 s, 72 °C für 250 s], 1x 72 °C für 60 s und Abkühlung und Lagerung bei 4 °C. Weitere Amplifikationen wurden analog hierzu durchgeführt, die *extension* Zeit wurde proportional zur Produktgröße (~25 s/kb) angepasst. Basierend auf diesem Protokoll wurden alle Template in der vorliegenden Arbeit amplifiziert und zum Großteil nach ihrer Klonierung sequenziert. 99,5 % aller Konstrukte zeigten keinerlei Mutationen auf, was die hohe Genauigkeit dieser Polymerase unter den gewählten Bedingungen belegt.

### 3.1.1.2 Die Konstruktion von integrativen Vektoren: die pKSSU-Vektorfamilie

Nachdem ein robustes und zuverlässiges PCR-Protokoll entwickelt wurde, sollte im nachfolgenden Schritt ein Satz an Vektoren konstruiert werden, welcher einerseits eine schnelle Identifikation von Insert-beinhaltenen Klonen ermöglicht und andererseits die schnelle und gezielte Integration in das Genom von Actinomyceten erlauben sollte. Der Vektor pMU3<sup>[107]</sup> wurde hierfür als Startpunkt gewählt. Charakteristika von pMU3 sind: 1. oriT (welches den Plasmidtransfer mittels Konjugation von *E. coli* in Actinomyceten ermöglicht), 2. eine Apramycin Resistenzkassette, sowie 3. eine attP Integrationsseite (des Bakteriophagen VWB für die effiziente Integration in das Chromosom verschiedener Actinomyceten). Eine lacZ-Kassette wurde aus pUC18 amplifiziert und in pMU3 kloniert. Der resultierende Vektor pKSSU11 beinhaltet somit ein lacZ Gen, welches durch eine Klonierung in die *SwaI* Schnittstelle vom eigenem Promoter getrennt werden kann, wodurch ein klassisches Blau / Weiß Screening in diesem *Shuttle*-Vektorsystem ermöglicht wird. Weitere Vektoren wurden basierend auf den bekannten Konstrukten<sup>[108]</sup> pSET152, pRT801 sowie pKT02 konstruiert, mit dem Ziel eine kleine Familie zueinander kompatibler Vektoren zu formen, die den simultanen Transfer mehrerer Vektoren in

Actinomyceten ermöglicht. Hierzu wurde die multiple Klonierungsstelle der Vektoren gegen die lacZ Kasette von pKSSU11 ausgetauscht. Die resultierenden Vektoren pKSSU38, pKSSU39 sowie pKSSU40 weisen entweder ein Apramycin- (*apr*<sup>R</sup>) oder Thiostrepton-Resistenzgen (*thio*<sup>R</sup>) auf (vgl. Tabelle 2). Bei der Verwendung von Thiostrepton als selektiver Marker, wurde dem Vektor für die Kultivierung in *E. coli* ein  $\beta$ -Lactamase Resistenzgen hinzugefügt. Eine Hygromycin-Resistenz (*hyg*<sup>R</sup>) vermittelnde Variante von pKSSU40, pKSSU41, wurde durch den Austausch der *apr*<sup>R</sup> Kasette gegen ein  $\Omega$ *hyg* Fragment erzielt. Jeder dieser Vektoren beinhaltet eine individuelle Bakteriophagen Integrase, welche die spezifische Integration in das Actinomyceten-Genom an definierten Stellen ermöglicht. Die Vektorspezifischen Eigenschaften sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Eigenschaften der konstruierten Vektoren**

Name	Abgeleitet von	Resistenzmarker	Phagen Integrase
pKSSU11	pMU3	<i>apr</i> <sup>R</sup>	VWB
pKSSU18	pKSSU11	<i>apr</i> <sup>R</sup>	VWB
pKSSU38	pRT801	<i>apr</i> <sup>R</sup>	BT1
pKSSU39	pKT02	<i>thio</i> <sup>R</sup> / <i>amp</i> <sup>R</sup>	VWB
pKSSU40	pSET152	<i>apr</i> <sup>R</sup>	phiC31
pKSSU41	pKSSU40	<i>hyg</i> <sup>R</sup>	phiC31

Nach ihrer Konstruktion wurde die Stammflexibilität der vier neuen Vektoren pKSSU38, pKSSU39, pKSSU40 und pKSSU41 mittels konjugativen Transfer von *E. coli* ET12568/pUZ8002 in *S. cinnamonensis* (A495 und A519), *S. coelicolor* A3(2), *S. lividans* TK24 und *S. erythraea* NRRL-B-24071 getestet. Alle Vektoren zeigten eine hohe Konjugationseffizienz in sämtliche Spezies und führten so zu einer Vielzahl von Transkonjuganten, was die Flexibilität dieser Vektoren für verschiedene Experimente aufzeigt (s. Tabelle 3 bis Tabelle 6).

**Tabelle 3: Konjugationseffizienz von pKSSU38 in verschiedene Actinomyceten.** Die Effizienz wurde als Quotient aus der Anzahl der Kolonie formenden Einheiten [cfu] bei einem gegebenen Donor / Rezipienten Verhältnis pro Anzahl der Transkonjuganten je ml Rezipienten-Kultur ermittelt.

Stamm	cfu	Konjugationsfrequenz (Donor / Rezipient)	Anzahl der Transkonjuganten [/ml]
<i>S. cinnamonensis</i> A495	2,0*10 <sup>8</sup>	2,0*10 <sup>-5</sup> (1/1)	4,0*10 <sup>3</sup>
	6,5*10 <sup>8</sup>	2,8*10 <sup>-6</sup> (1/37)	1,8*10 <sup>3</sup>
<i>S. cinnamonensis</i> A519	7,0*10 <sup>8</sup>	2,1*10 <sup>-6</sup> (3/1)	1,5*10 <sup>3</sup>
	1,8*10 <sup>8</sup>	4,3*10 <sup>-6</sup> (1/10)	7,8*10 <sup>2</sup>
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	1,5*10 <sup>6</sup>	3,3*10 <sup>-3</sup> (1000/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. lividans</i> TK24	3,0*10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>-5</sup> (7/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. erythraea</i> NRRL-B-24071	1,9*10 <sup>8</sup>	3,4*10 <sup>-6</sup> (1/10)	6,5*10 <sup>2</sup>

**Tabelle 4: Konjugationseffizienz von pKSSU39 in verschiedene Actinomyceten; in Analogie zu Tabelle 3.**

Stamm	cfu	Konjugationsfrequenz (Donor / Rezipient)	Anzahl der Transkonjuganten [/ml]
<i>S. cinnamonensis</i> A495	2,0*10 <sup>8</sup>	>2,0*10 <sup>-5</sup> (1/2)	>5,0*10 <sup>3</sup>
	6,5*10 <sup>8</sup>	7,7*10 <sup>-9</sup> (1/1)	5
<i>S. cinnamonensis</i> A519	7,0*10 <sup>8</sup>	2,1*10 <sup>-6</sup> (3/1)	1,5*10 <sup>3</sup>
	1,8*10 <sup>8</sup>	4,3*10 <sup>-6</sup> (1/10)	7,8*10 <sup>2</sup>
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	1,5*10 <sup>6</sup>	>3,3*10 <sup>-3</sup> (1000/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. lividans</i> TK24	3,0*10 <sup>8</sup>	>3,3*10 <sup>-6</sup> (7/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. erythraea</i> NRRL-B-24071	1,9*10 <sup>8</sup>	6,8*10 <sup>-7</sup> (1/10)	1,3*10 <sup>2</sup>

**Tabelle 5: Konjugationseffizienz von pKSSU40 in verschiedene Actinomyceten; in Analogie zu Tabelle 3.**

Stamm	cfu	Konjugationsfrequenz (Donor / Rezipient)	Anzahl der Transkonjuganten [/ml]
<i>S. cinnamonensis</i> A495	2,0*10 <sup>8</sup>	>2,0*10 <sup>-5</sup> (0,7/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. cinnamonensis</i> A519	7,0*10 <sup>8</sup>	6,0*10 <sup>-6</sup> (2/1)	4,2*10 <sup>3</sup>
	1,8*10 <sup>8</sup>	5,0*10 <sup>-7</sup> (1/59)	9,0*10
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	1,5*10 <sup>6</sup>	>3,3*10 <sup>-3</sup> (1000/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. lividans</i> TK24	3,0*10 <sup>8</sup>	1,7*10 <sup>-5</sup> (5/1)	>5,0*10 <sup>3</sup>
<i>S. erythraea</i> NRRL-B-24071	1,9*10 <sup>8</sup>	1,3*10 <sup>-7</sup> (1/63)	2,5*10

**Tabelle 6: Konjugationseffizienz von pKSSU41 in verschiedene Actinomyceten; in Anlalogie zu Tabelle 3.**

Stamm	cfu	Konjugationsfrequenz (Donor / Rezipient)	Anzahl der Transkonjuganten [/ml]
<i>S. cinnamomensis</i> A495	$2,0 \cdot 10^8$	$>2,5 \cdot 10^{-5}$ (2,5/1)	$>5,0 \cdot 10^3$
	$6,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^{-6}$ (1/1)	$1,0 \cdot 10^3$
<i>S. cinnamomensis</i> A519	$7,0 \cdot 10^8$	$>7,1 \cdot 10^{-6}$ (7/1)	$>5,0 \cdot 10^3$
	$1,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^{-7}$ (1/59)	$3,0 \cdot 10^3$
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	$1,5 \cdot 10^6$	$>3,3 \cdot 10^{-3}$ (1000/1)	$>5,0 \cdot 10^3$
<i>S. lividans</i> TK24	$3,0 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^{-5}$ (5/1)	$6,0 \cdot 10^5$
<i>S. erythraea</i> NRRL-B-24071	$1,9 \cdot 10^8$	0 (1/65)	0

Zusätzlich, und experimentell wesentlich anspruchsvoller und entscheidender, wurden die Vektoren pKSSU38, pKSSU39 und pKSSU41 auf ihre simultane Integration in einzelne Streptomyceten getestet. Für diesen Zweck wurde das bislang übliche Konjugationsprotokoll verändert. Die drei Vektoren wurden separat in *E. coli* ET12567/pUZ8002 Zellen transformiert und repliziert. Direkt vor der Konjugation wurden die verschiedenen *E. coli* Kulturen in äquivalenten Mengen vereinigt und als Gemisch eingesetzt. Anfangs wurden erst zwei Vektoren simultan getestet, was zu einer unterschiedlichen Anzahl an Transkonjuganten führte (Tabelle 7). Die Kombination von pKSSU39 und pKSSU40 resultierte, abhängig von Rezipienten-Stamm, in mehreren hunderten Transkonjuganten pro ml Rezipientenkultur, die sowohl Resistenz gegenüber Thiostrepton als auch Apramycin aufwiesen. Die simultane Konjugation von pKSSU39 und pKSSU41 führte zu einer Vielzahl thioStrepton- und hygromycinresistenter Transkonjuganten pro ml Rezipient (s. Tabelle 7). In beiden Fällen wurden die Agarplatte simultan mit dem zwei Antibiotika beinhaltenden Soft-Agar überschichtet.

Der simultane Transfer von drei Vektoren pKSSU38, 39, und 41 führte zu einem signifikanten Abfall in der Konjugationseffizienz. Nichtsdestotrotz wiesen *S. cinnamomensis* and *S. lividans* einige Transkonjuganten auf, die gegenüber allen drei Antibiotika resistent waren, wohingegen die Konjugation von *S. coelicolor* vollständig ineffektiv war (Tabelle 8). In diesem Experiment wurden alle drei Antibiotika simultan appliziert. Möglicherweise jedoch benötigen die Streptomyceten nach dem konjugativen Transfer dreier Plasmide mehr Zeit um die Resistenzen

entwickeln zu können. Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch das Konjugationsprotokoll abgewandelt: die drei Antibiotika wurden separat über einen Zeitraum von drei Tagen angewandt, was zu einem signifikanten Anstieg in der Konjugationseffizienz führte.

**Tabelle 7: Konjugationseffizienz bei der simultanen Konjugation zweier Vektoren**

Stamm	cfu	pKSSU39 / pKSSU40		pKSSU39 / pKSSU41	
		Konjugationsfrequenz	Anzahl der Transkonjuganten [./ml]	Konjugationsfrequenz	Anzahl der Transkonjuganten [./ml]
<i>S. cinnamomensis</i> A495	$4,0 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^4$
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	$2,0 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$8,8 \cdot 10^2$
<i>S. lividans</i> TK24	$1,2 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^3$

**Tabelle 8: Konjugationseffizienz bei simultaner Verwendung dreier Vektoren**

Stamm	cfu	Simultane Anwendung der Antibiotika		Successive Anwendung der Antibiotika	
		Konjugationsfrequenz	Anzahl der Transkonjuganten [./ml]	Konjugationsfrequenz	Anzahl der Transkonjuganten [./ml]
<i>S. cinnamomensis</i> A495	$1,4 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^{-6}$	$9,6 \cdot 10^3$
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	$2,0 \cdot 10^6$	0	0	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^3$
<i>S. lividans</i> TK24	$1,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	30	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^4$

### 3.1.1.3 Entwicklung der SLIC-MIX Methode

Im nachfolgenden Schritt sollte eine effiziente und robuste Klonierungsmethode entwickelt werden, die die Klonierungen der zuvor amplifizierten Gene zuverlässig ermöglicht. Im ersten Schritt wurde versucht, dass *eryAIII* Gen klassisch mittels Restriktion und Ligation in den Vektor pMU3 zu klonieren. Trotz Optimierung des Ligations-Protokolles (verschiedene Temperaturen, Ligasen und DNA Konzentrationen wurden getestet) wurde mit 0,3 % eine sehr niedrige Klonierungseffizienz erreicht.

Da diese Effizienz zu gering für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Experimente war, wurde nach alternativen Techniken gesucht. Hierzu wurde nachfolgend die kürzlich beschriebene Sequenz- und Ligationsunabhängigen Klonierung (SLIC)<sup>[109,110]</sup>

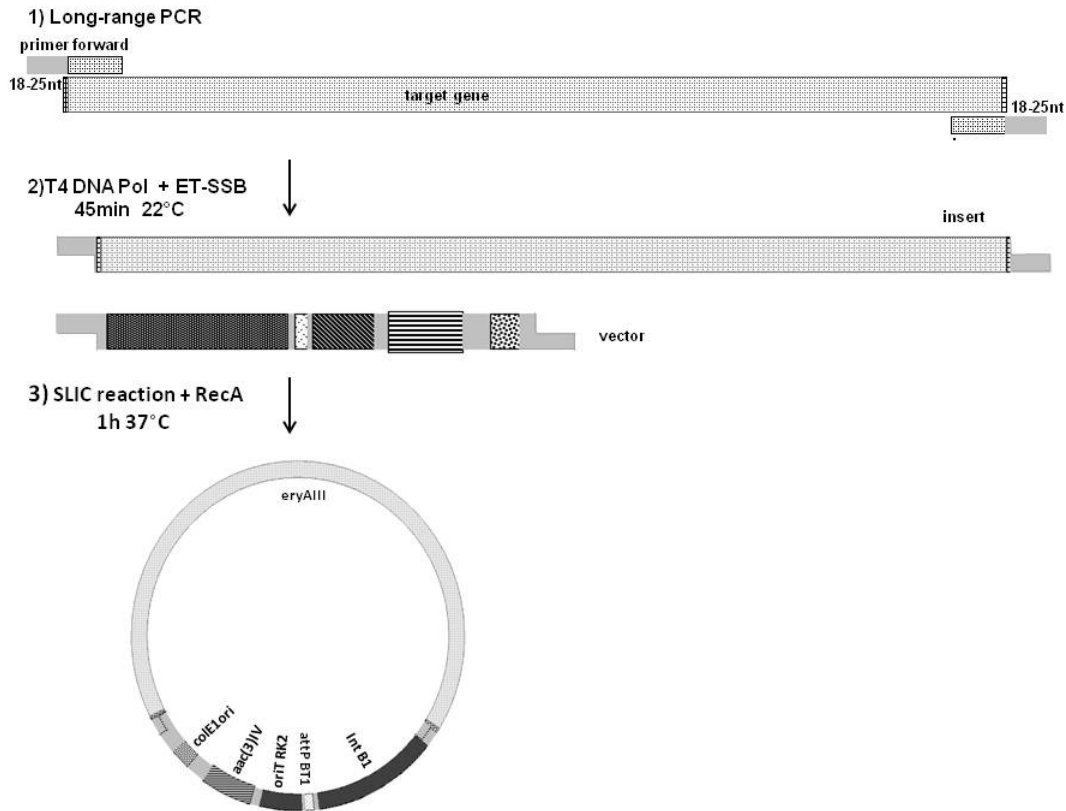
getestet. Diese RecA-vermittelte Rekombination wird durch einen T4 DNA Polymerase Verdau der homologen flankierenden Enden von Insert und flankierendem Vektor ermöglicht. Die resultierenden DNA Einzelstränge überlappen partiell, wodurch eine RecA geförderte homologe Rekombination stattfinden kann. Die Anwendung dieses Protokolls für die Klonierung von *eryAIII* und vergleichbaren Gensequenzen scheiterte jedoch. Nachdem einige verschiedene Parameter wie die Länge der Überlappungen, sowie Inkubationszeit und Temperatur variiert wurden, konnte eine Klonierungseffizienz vergleichbar mit der des zuvor getesteten Restriktion/Ligation-Protokolls erreicht werden. Ähnliche enttäuschende Resultate wurden bei Verwendung des in der Arbeitsgruppe gut etablierten ligations-unabhängigen Klonierens<sup>[111]</sup> erzielt.

Dieses führte zu einer Optimierung der bereits existierenden SLIC-Technik, um so deren Anwendungsspektrum zu erweitern und auf die gegebenen Anforderungen anzupassen. Eine Hypothese war, dass die Stabilität der intermediären DNA Einzelstränge einen limitierenden Faktor im Versuchsablauf darstellt. Die Zugabe von *single-stranded DNA binding protein* (SSB) könnte durch Komplexierung die Einzelstrang-DNA stabilisieren und so die Degradation unterdrücken. Außerdem könnten die GC-reichen DNA-Einzelstränge in Abwesenheit von SSB zu unspezifischen und unerwünschten Duplexen hybridisieren, womit sie für eine RecA-vermittelte Rekombination nur von geringerem Maße zu Verfügung stünden. Die direkte Zugabe von SSB zu der RecA unterstützten Reaktion hatte keinen Effekt. Jedoch wurde die Klonierungseffizienz drastisch erhöht, wenn das SSB dem vorausgehenden T4 DNA Polymerase Verdau hinzugegeben wurde (SLIC-MIX 1). Dieses korrelierte mit unserer Hypothese zur notwendigen Stabilisierung der Einzelstränge. Laut Literatur kann SSB negative Effekte auf die RecA Aktivität haben<sup>[112,113]</sup> (indem sie um die Bindungsstellen der Einzelstrang-DNA konkurrieren), jedoch wurde durch Optimierung der jeweiligen Konzentrationen ein scheinbar geeignetes Verhältnis zwischen RecA Aktivität und Einzelstrangstabilität erreicht.

Bei der Etablierung der SLIC-MIX Methode (Arbeitsablauf schematisch in Abbildung 21 dargestellt) dienten *eryAI* und *eryAIII* aus dem Erythromycin Gencluster als Modellsysteme. Die Gensequenzen sollten in den *E. coli*-Actinomyceten *Shuttle*-Vektor pKSSU11 kloniert werden, um so pKSSU18 (*eryAI*) und pKSSU62 (*eryAIII*) zu erhalten. Der mit *Swal* linearisierte Vektor und das jeweilige PCR Produkt mit den 20 bp langen und vektorüberlappenden flankierenden Regionen wurden separat

einem T4 DNA Polymerase Verdau in Anwesenheit eines thermostabilen SSB (ET-SSB) unterzogen (SLIC-MIX 1), um so komplementäre Einzelstrangbereiche zu erzeugen (SLIC-MIX1: 1 µg Vektor bzw. Insert DNA, 1 U T4 DNA Polymerase, 1x T4 DNA Polymerase Puffer und 80 ng ET-SSB in einem Volumen von 20 µl). Nach einer Reaktionszeit von 45 min bei 22 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 mM dCTP abgestoppt, bevor die zwei Ansätze in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 der RecA vermittelten Rekombination für 1 h bei 37 °C unterzogen wurden (SLIC-MIX 2: Produkte des SLIC-MIX1, 1x Ligase Puffer und 0,08 µg RecA in einem Volumen von 10 µl). Nachfolgend wurden ein Teil des Reaktionsansatzes (maximal 5 µl pro 50 µl Zellen) direkt zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen verwendet. Die Verwendung ultrakompetenter *E. coli* Omnimax-Zellen (cfu/ng > 10<sup>9</sup>) zeigte sich als besonders erfolgreich. Potentiell positive, weiße Klone wurden mittels Kolonie-PCR bestätigt und die Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse verifiziert. 98 % der weißen Klone konnten so als Insert tragend identifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch DNA Sequenzierung bestätigt, was für den hohen Genauigkeitsgrad des gesamten Arbeitsflusses spricht. Nachfolgend wurde das identische *eryAIII* PCR Produkt verwendet, was zuvor in pKSSU11 kloniert wurde, um dieses in pKSSU40 zu klonieren, wodurch pKSSU71 resultierte. Diese Klonierung erfolgte mit einer Effizienz analog zu der vorhergegangenen Klonierung und ermöglichte so einen schnellen Zugang zu einem Insert mit verschiedenem Vektorrückrad. Der Austausch des pMU3-basierten Vektorrückrad wurde notwendig, da deutliche Instabilitäten von pKSSU62 detektiert wurden. Bereits nach kurzer Lagerung (-20° C, >5 Tage) zeigte sich ein deutlicher Abbau des Vektors.

Dieses Experiment zeigt beispielhaft, dass die Verwendung verschiedener Vektorrückräder mit identischer Klonierungsstelle, in Kombination mit einer verlässlichen und schnellen Klonierungsstrategie, eine schnelle Optimierung der komplexen Konstrukte ermöglicht, wie sie oft für die Generierung von Expressionskonstrukten benötigt werden.



**Abbildung 21: Arbeitsschritte der Sequenz- und Ligationsunabhängigen Klonierung mittels SLIC-MIX.** Abkürzungen: Nukleotide (nt), Einzelstrangbindendes Protein (SSB), T4 DNA Polymerase (T4 DNA Pol), Rekombinase A (Rec A), Replikationsursprung *E. coli* (colE1ori), Apramycin Resistenzkassette (aac(3)IV), *Origin* des Plasmidtransfer (oriT RK2), Integrase des Bakteriophagen  $\phi$  BT1 (IntB1)

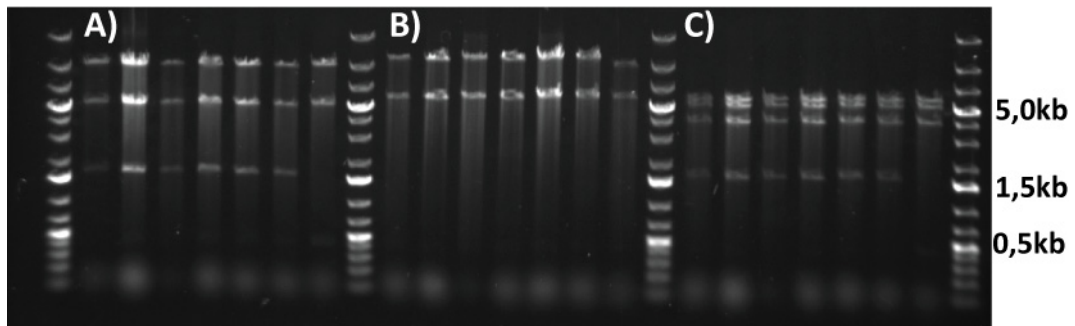
### Simultane Klonierung von drei Fragmenten mittels SLIC-MIX

Da der Vektor pKSSU40 keine Promotersequenz für die Expression des Inserts innerhalb des Actinomyceten besitzt, sollte eine erweiterte Methode getestet werden, um so ein funktionelles Expressionskonstrukt zu erhalten. Im Idealfall sollte die Promotersequenz simultan mit der codierenden Sequenz mittels einer 3-Fragment Klonierung in das Vektorrückrad kloniert werden. Hierzu wurde die actI-actIIorf4 Promoter Sequenz<sup>[114]</sup> ausgehend von pMU3 mit Oligonukleotiden amplifiziert, die *upstream* mit pKSSU40 und *downstream* mit *eryAIII* überlappen. Die Amplifikation von *eryAIII* wurde diesmal mit Oligonukleotiden durchgeführt die *upstream* mit  $P_{actI-actIIorf4}$  und *downstream* mit pKSSU40 überlappen.

Die resultierenden, gereinigten PCR-Produkte wurden danach der SLIC-MIX Technik unterzogen. Dieses Mal wurden drei Fragmente im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 der RecA vermittelnden Rekombination unterzogen, was zu pKSSU89 führte (einem Expressionsplasmid für DEBS3). Die Plasmid-DNA wurde mittels



Restriktionsanalyse (s. Abbildung 22) überprüft. Die Klonierungseffizienz lag in diesem Fall bei ~70 % (bezogen auf die weißen Klone), wodurch ein Zugang zu einem funktionalen Konstrukt in weniger als drei Stunden experimenteller Arbeit ausgehend von PCR Produkten ermöglicht wurde.



**Abbildung 22: Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid DNA pKSSU89.** **A** *NotI*, erwartete Fragmentgrößen 1,7 kb, 5,2 kb, 9,9 kb. **B** *EcoRV* erwartete Fragmentgrößen 5,9 kb, 11,0 kb. **C** *NotI/EcoRV* erwartete Fragmentgrößen 1,7 kb, 4,0 kb, 5,2 kb, 5,91 kb.

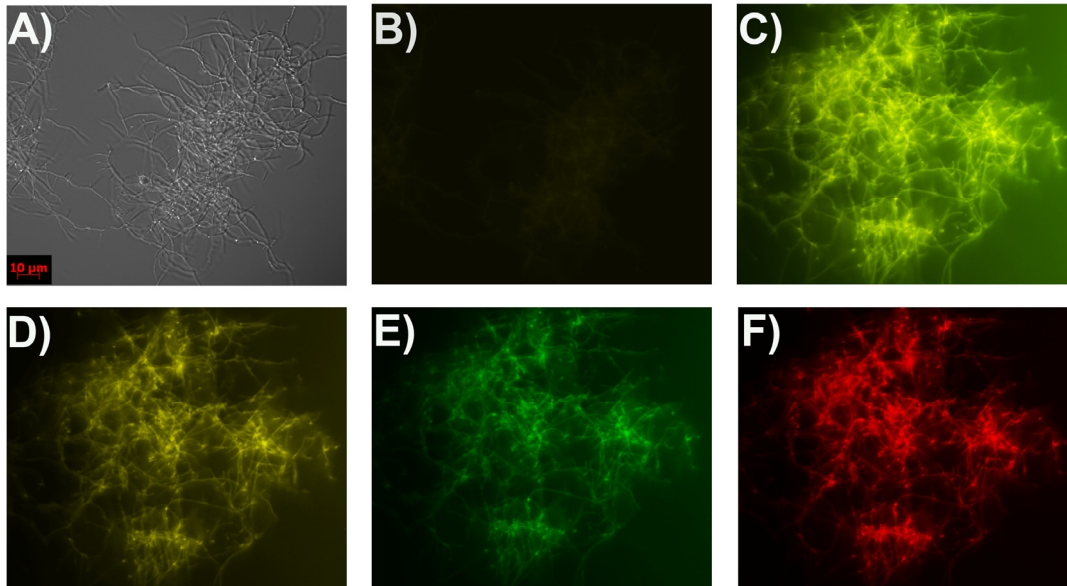
Die Doppelstrang-Sequenzierung eines Einzelklons verifiziert auch hier die hohe Genauigkeit von PCR und SLIC-MIX. Das *eryAIII* Gen wurde ohne eine einzige Mutation ausgehend von Plasmid DNA (pIB23) amplifiziert und kloniert. Die volle Funktionstüchtigkeit des konstruierten für DEBS3-codierenden Expressionsplasmides wurde in einer *S. erythraea*  $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup> Mutante durch Wiederherstellung der Biosynthese von Erythromycin bestätigt (s. Kapitel 3.4.2.2).

Weitergehend sollte erwähnt werden, dass die kombinierten Techniken ebenfalls für die Konstruktion von Expressionsplasmiden von bisher nicht untersuchten Enzymen geeignet sind, solange zumindest die flankierenden Regionen der *open reading frames* bekannt sind.

#### 3.1.1.4 Evaluierung der neuen Vektoren auf simultane Coexpression

Um die kleine Vektorfamilie auf ihre simultane Funktionalität jenseits der Antibiotika-Resistenz zu testen, sollte ein Expressionssystem für verschiedene fluoreszierende Proteine in Streptomyceten geschaffen werden. Die fluoreszierenden Proteine ermöglichen eine schnelle und verlässliche Detektion der Coexpression durch die kompatiblen Vektoren. Hierfür wurden die Gene codierend für eGFP (basierend auf pEGFP-C3, Clontech), Citrine (basierend auf pEYFP-C1 trägt Q69M, Clontech), und DsRed (basierend auf pDsRed-Monomer-N1, Clontech) unter Kontrolle des starken und konstitutiven Promoters  $P_{ermE}$ <sup>[115]</sup> mittels 3-Fragment-SLIC-MIX Protokolls in die Vektoren pKSSU38, 39 und 41 kloniert. Alle möglichen Kombinationen an Vektor und

Insert wurden hierzu konstruiert. Die resultierenden Expressionsplasmide wurden dann in Kombination von drei verschiedenen Vektoren und Inserts in das Genom von *S. cinnamonensis* A495, *S. coelicolor* A3(2), und *S. lividans* TK24 eingebracht. Die erfolgreiche Expression der drei Proteine konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (vgl. Abbildung 23).



**Abbildung 23: Mikroskopieaufnahmen von *S. cinnamonensis* A495.** **A** Bild der Transmissionmikroskopie, Hintergrundkontrolle. **B** Bild der Fluoreszenzmikroskopie aller 3 Kanäle der Hintergrundkontrolle. Das erwartete Level der Hintergrund-Fluoreszenz <sup>[116]</sup> konnte detektiert werden. **C** Fluoreszenzmikroskopie eines eGFP, DsRed und Citrine Co-Expemierenden Stammes (alle drei Kanäle). **D** bis **F** Abbildung C jedoch mit separat eingestellten Kanälen für Citrine, eGFP und DsRed.

### 3.1.2 Diskussion

Die Erforschung, Rekonstruktion und die Modifikation von biosynthetischen Genclustern sind von hoher Relevanz in der modernen Biotechnologie. Ihr potentieller Einfluss auf die Identifikation und Optimierung von Naturstoffderivaten macht sie attraktiven Forschungsthemen. Verschiedene metabolische Pfade wurden bisher erfolgreich verändert, was in einer Vielzahl neuer Substanzen von oftmals eindrucksvoller Komplexität resultierte.<sup>[20,24]</sup> Eine weitergehende, verbreiterte Verwendung dieser Strategie könnte möglicherweise zu einer signifikanten Anzahl interessanter Substanzen führen. Doch bis jetzt weist die biosynthetische Modifikation der Gene eine Vielzahl molekularbiologischer Herausforderungen auf, vor allem wenn große, GC-reiche Sequenzen, wie sie in den PKS-Genclustern vorkommen, als *Target* dienen. Das Forschungsfeld wird signifikant durch mühsame und zeitaufreibende Mutageneseprotokolle aufgehalten, sowohl in der eigentlichen

Molekularbiologie als auch bei der genetischen Manipulation der Actinomyceten. Dieses hat im Rahmen dieser Dissertation eine Methodenentwicklung notwendig gemacht, wodurch die Konstruktion von Expressionsplasmiden für Wildtyp- oder mutierte-PKS-Gene sowie die Transformation dieser (bei simultaner Behandlung verschiedener Loci) signifikant zuverlässiger und schneller durchführbar sind.

Ausgehend von einem systematischen Screen wurde ein robustes PCR-Protokoll für eine fehlerarme Amplifikation von bis zu 12 kb GC-reicher Amplikone entwickelt. Nachfolgend wurde ein Klonierungsprotokoll erstellt, das die schnelle und zuverlässige Klonierung von großen Fragmenten mit zufriedenstellender Klonierungseffizienz ermöglicht (SLIC-MIX). Die Zuverlässigkeit dieser Strategie wurde durch die Konstruktion eines DEBS3-codierenden Expressionsvektors, welcher eine nicht-funktionelle DEBS3 Variante von *S. erythraea* komplementierte, aufgezeigt. Weitergehend hat dieses Protokoll Anwendung in der *Dortmunder Protein Facility* (<http://www.mpi-dortmund.mpg.de/misc/dpf>) gefunden; hier wird der SLIC-MIX bei der Klonierung von Gensequenzen von mehr als 3kb im Hochdurchsatz eingesetzt. Zusätzlich wurde eine kleine Vektorfamilie konstruiert, welche die simultane Konjugation in den Actinomyceten mit bis zu drei verschiedenen Expressionsplasmiden ermöglicht. Die Anwendbarkeit dieser Vektoren wurde beispielhaft in der simultanen Konjugation in verschiedene Actinomyceten aufgezeigt. Dieses ist eins von nur zwei Beispielen des simultanen Transfers von mehreren Vektoren in Actinomyceten, die in der Literatur beschrieben sind.<sup>[117]</sup> Mit der kleinen pKSSU Vektorfamilie sind solche simultanen Experimente eindrucksvoll effektiv, was sich in der Vielzahl der vektortragenden Klone widerspiegelt.

Die kombinierte Technik eröffnet so eine neue Plattform, die Wege für die signifikante Beschleunigung aller anfallenden Arbeitsschritte während der Manipulation von biosynthetischen Pfaden auf dem Weg zu Naturstoffderivaten ebnet.

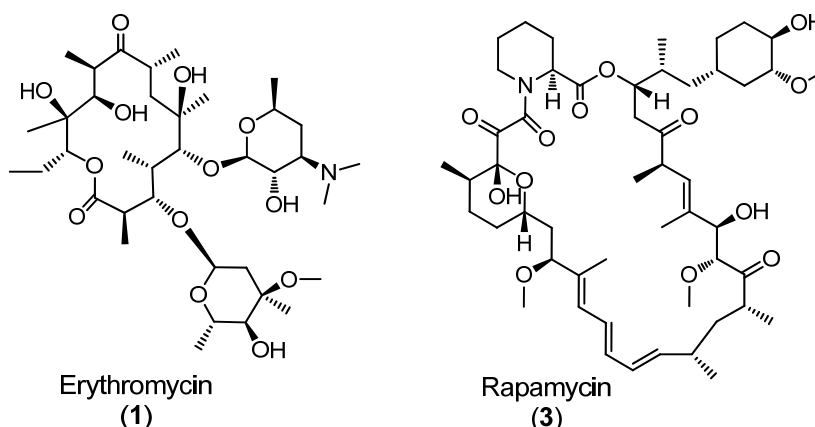


## 3.2 Quantifizierung der Einbautraten von N-acetylcysteamin aktiviertem Methylmalonat in die Biosynthese von Polyketiden

Die exogene Zuführung von aktivierten Malonaten (N-acetylcysteamin Thioester; Malonyl-SNAC) ist von großer Bedeutung für eine Erhöhung der Polyketid-Diversität. Nur so können nicht-natürliche Synthesebausteine für den Mikroorganismus zugänglich gemacht werden. Jedoch ist diese Art der Malonataktivierung (in der Natur mittels CoA) trotz ihrer Einfachheit bis zum heutigen Stand nicht ausreichend charakterisiert. Es gibt offene Fragen bezüglich der Bioverfügbarkeit und der relativen Akzeptanz dieser SNAC-aktivierten Substrate, die geklärt werden müssen, um möglichst effektiv weitergehende Experimente planen zu können.

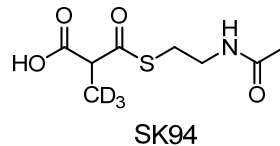
### 3.2.1 Charakterisierung der SNAC-Aktivierung

Die D<sub>3</sub>-Markierung des Substrates sollte eine genaue Charakterisierung der SNAC-Aktivierung ermöglichen. Bei SNAC handelt es sich um ein Coenzym A Mimetikum. Die eingesetzten Substanzen wurden von Stephan Klopries synthetisiert und werden mit dem Kürzel SK und einer Nummer benannt. Als aussagekräftige Modellsysteme wurden die gut untersuchten Biosynthesewege zu Erythromycin und Rapamycin gewählt. Diese zwei Polyketide werden von Bakterien zweier unterschiedlicher Gattungen produziert und weisen deutlich unterschiedliche PKS auf. Die Testsysteme zeigen jedoch dieselbe biosynthetische Logik auf.



**Abbildung 24: Strukturen von Erythromycin (links) und Rapamycin (rechts).** Beide Substanzen lagen nach der Fütterung in ihren Seitenketten partiell D<sub>3</sub>-markiert vor.

Mittels LC/ESI-MS Analyse der einzelnen Fermentationsextrakte wurden die Einbauraten in dem Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* NRRL-B-24071 und dem Rapamycin-Produzenten *Streptomyces hygroscopicus* NRRL-5491 mittels einer Verschiebung in dem jeweiligen Isotopenverhältnis quantifiziert. Die Verhältnisse der einzelnen Masse-zu-Ladung Signale der Produkte nach Fütterung des racemischen Gemisches SK94 (s. Abbildung 25) bildeten die Grundlage der Auswertungen. Alle Datenpunkte wurden dreifach bestimmt.



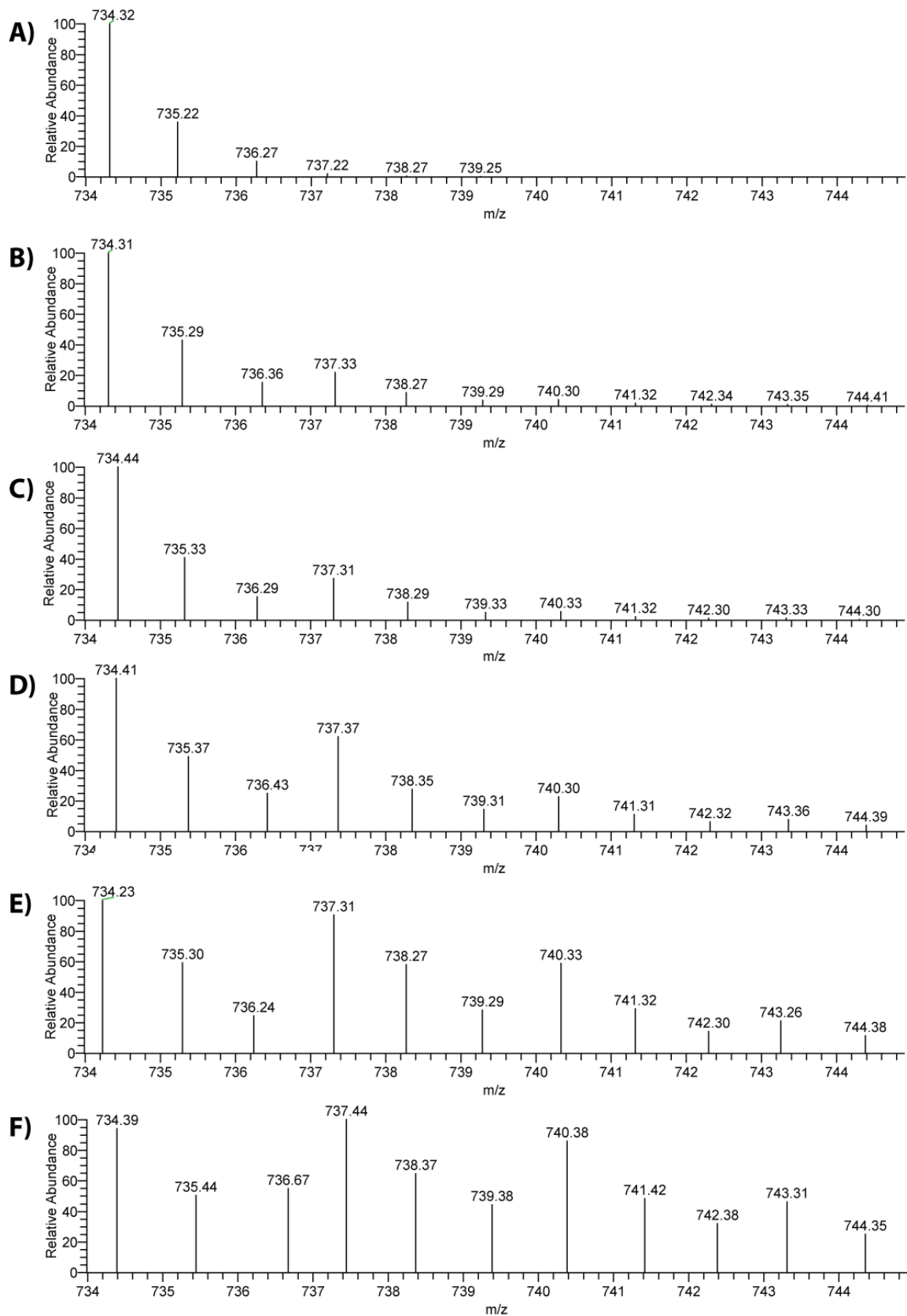
**Abbildung 25: Struktur der D3-markierten SNAC-aktivierten Methylmalonsäure SK94.**

### 3.2.1.1 Einbauraten in das Polyketid Erythromycin

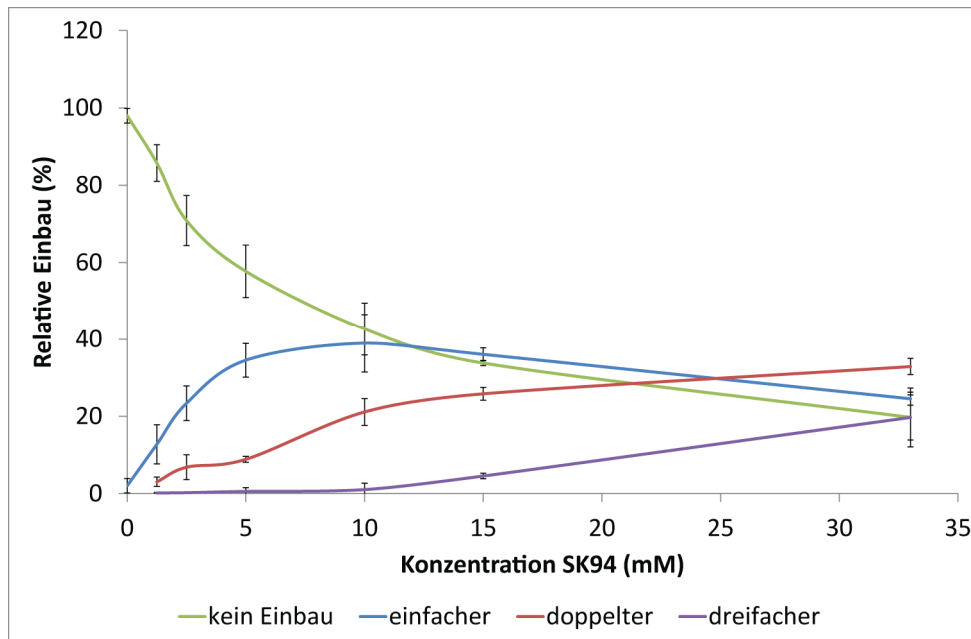
Das errechnete Isotopenmuster von Erythromycin ist wie folgt:

$[M+H]^+$	734,4685 (100,0%)
	735,4724 (40,0%)
	736,4758 (7,8%)
	737,4767 (1,1%)

Wie in Abbildung 26 deutlich wird, entsprechen die detektierten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ohne Fütterung von SK94 dem vorhergesagten Isotopenmuster von Erythromycin. Bei einer SK94-Konzentration von 1,25 mM wird einer der sechs endogenen Bausteine (Methylmalonyl-CoA) durch die SNAC aktivierte Malonsäure ersetzt. Da es sich bei SK94 um ein racemisches Gemisch handelt, durch die AT-Domänen aber nur die (2S)-Konfiguration eingebaut wird,<sup>[70]</sup> müssen die Konzentrationswerte durch zwei geteilt werden um die reale Konzentration an (S)-SK94 zu erhalten. Durch Fitten der erhaltenen Fütterungskurve an die Michaelis-Menten-Gleichung ergab sich so ein Wert von  $1,06 \pm 0,15$  mM für den Halbmaximalen einfachen Einbau, und  $4,84 \pm 1,31$  mM für den halb-maximalen doppelten Einbau.



**Abbildung 26: Massenspektrum des Erythromycin Signal.** Deutlich ist der Einbau des D3-markierten SNAC aktiviertem Malonats und die Zunahme der Einbaurrate mit Erhöhung der Fütterungskonzentration sichtbar. **A** 0 mM SK94, **B** 1,25 mM SK94, **C** 2,5 mM SK94, **D** 5 mM SK94, **E** 10 mM und **F** 15 mM.



**Abbildung 27: Relative Einbauraten des D3-markierten SNAC-aktiviertem Malonats (SK94) in Erythromycin.**

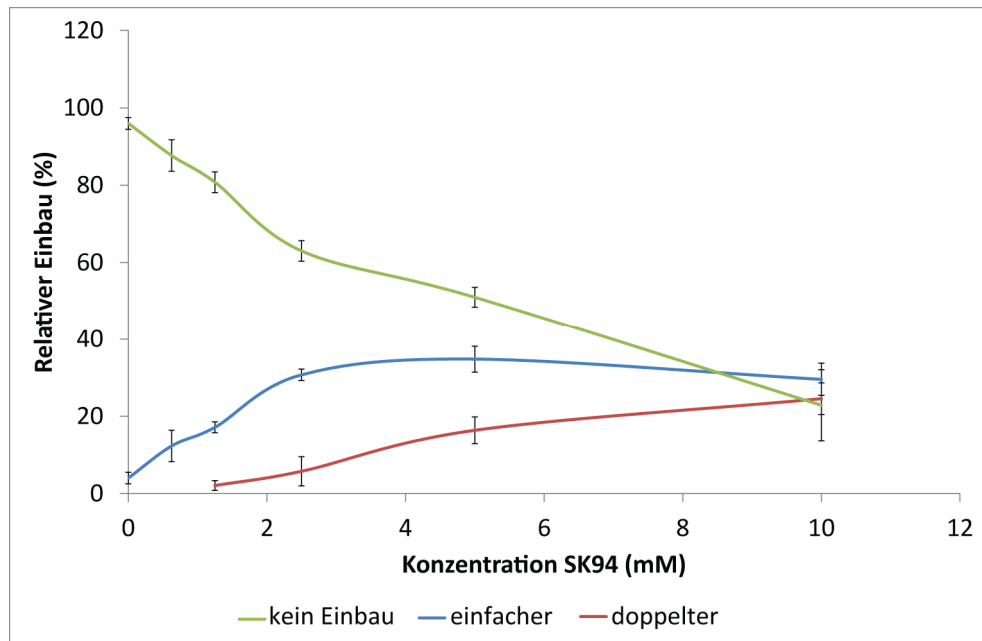
Basierend auf dem einfachen Einbau der D3-markierten SNAC-aktivierten Methylmalonsäure bei Konzentrationen bis zu 10 mM konnten relative Einbauraten von bis zu ~ 40% bestimmt werden (vgl. Abbildung 27). Der Einbau scheint bei dieser relativen Einbaurate von 40% zu stagnieren. Durch eine weitere Erhöhung der Konzentration nimmt hingegen der Mehrfacheinbau zu, diese scheinen jedoch ebenfalls bei ca. 40% zu stagnieren.

### 3.2.1.2 Einbauraten in das Polyketid Rapamycin

In Fall von Rapamycin wurden die Fütterungen bis zu einer Konzentration von 10 mM durchgeführt (Abbildung 28). Bei dieser Konzentration konnte im Gegensatz zum Erythromycin jedoch kein dreifacher Einbau detektiert werden. Die Isotopenverteilung ohne Fütterung entsprach der Voraussage, die Einbauraten wurden analog zu Erythromycin detektiert.

Für die Berechnung der halb-maximalen Konzentrationen durch Fitten an die Michaelis-Menten-Gleichung musste auch hier beachtet werden, dass es sich bei SK94 um ein racemisches Gemisch handelt, aber nur (2S)-Substrate in die Biosynthese eingebaut werden. Für den einfachen Einbau konnte so ein Wert von  $0,67 \pm 0,42$  mM und  $2,21 \pm 0,19$  mM für den doppelten Einbau bestimmt werden.



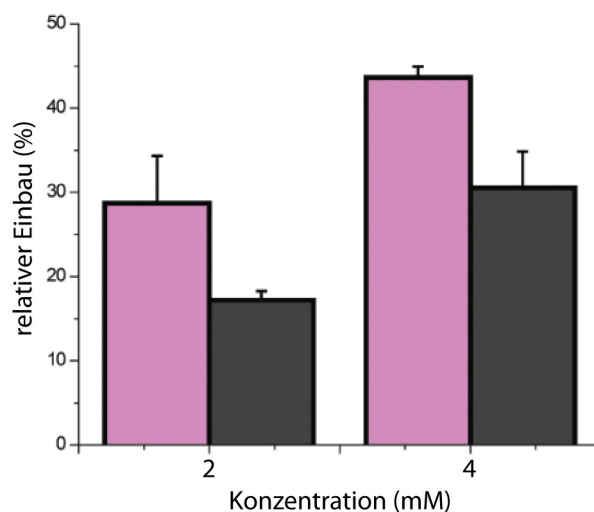


**Abbildung 28: Relative Einbauraten des D3-markierten SNAC aktiviertem Malonats (SK94) in Rapamycin.**

Auch hier scheint analog zum Einbau in Erythromycin die Einbaurate unterhalb von 40% zu stagnieren.

### 3.2.1.3 Quantifizierung des Aktivierungseinflusses

Um den Einfluss der SNAC-Aktivierung quantifizieren zu können, wurden die Einbaurate von SK94 mit D3-markierter Methylmalonsäure in die Biosynthese des Polyketid Rapamycin verglichen (s. Abbildung 29).



**Abbildung 29: Einbau von SK94 (magenta) und D3-Methylmalonsäure in die Biosynthese von Rapamycin**

Bei einer Konzentration von 2 mM der SNAC-aktivierten Malonsäure (SK94) sind ca. 29% des extrahierten Rapamycins D3 markiert, in den Extrakten der nicht aktivierten Malonsäure sind es hingegen durchschnittlich nur 17%. Ähnlich sieht es für die Einbauraten bei einer Konzentration von 4 mM aus, im Fall von SK94 sind 44% des analysierten Rapamycin D3 markiert, ohne aktivierte Malonsäure nur 31%. Dieses entspricht einer ca. 1,5 bis 1,7-fach höheren Einbaurate, die alleine auf die Aktivierung der Malonsäure zurück zu führen ist. Die Annahme einer spontanen oder intrazellulären enzymatischen Abspaltung und subsequenter Reaktivierung des exogenen Materials kann somit als nicht konkurrenzfähig betrachtet werden. Die artifizielle Aktivierung der Methylmalonsäure hat somit einen entscheidenden Einfluss auf den Einbau.

### **3.2.2 Diskussion**

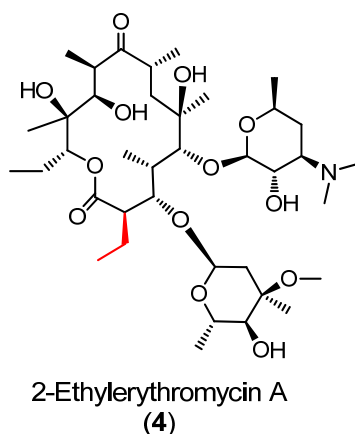
Der Einbau nicht-natürlicher biosynthetischer Bausteine in die Polyketid-Biosynthese ist ein enormes und wachsendes Forschungsfeld, und erfordert entweder eine modifizierte Biosynthese solcher Substanzen innerhalb des Wirts<sup>[12,79,85]</sup> oder die Bereitstellung exogen SNAC-aktivierter Malonsäuren. Die zuvor gezeigten systematischen Fütterungsexperimente erlaubten erstmals eine Quantifizierung der Akzeptanz SNAC-aktivierter Malonsäuren. Interessanterweise zeigt die Effizienz des Einfacheinbaus in beide Polyketide mit halbmaximalen Einbauraten von ~ 1 mM keine signifikanten Unterschiede. Dieses impliziert eine ähnliche Effizienz des gesamten Einbauprozesses, welcher mit dem Membranstransfer beginnt und mit der Transthoesterifizierung endet. Weitergehend weist dieses auf eine überraschend hohe Reaktivität dieses Substrates mit der PKS hin.

Um in Fütterungsexperimenten optimale Konditionen zu gewährleisten, ist dieses Wissen wichtig. Nur so kann die Verschwendung des synthetisierten Substrates oder falsch negative Ergebnisse, basierend auf einer zu geringen Fütterungsdosis, ausgeschlossen werden. Vor allem die Bedeutung der SNAC-Aktivierung für die Einbauraten konnte deutlich aufgezeigt werden. Dieses ist vor allem für nachfolgenden Fütterungsexperimente von hoher Bedeutung.

### 3.3 Versuche zur Generierung einer Hybrid PKS

Die Modularität von DEBS wurde bis heute vielfach biotechnologisch ausgenutzt und durch Modifizierung der Biosynthese (mittels Domäneninaktivierung, -Insertion oder -Substitution) eine Vielzahl von 6-Deoxyerythronolide B- (6-dEB) und Erythromycin-Derivaten erhalten.<sup>[49]</sup> Methylmalonyl-spezifische AT-Domänen wurden gegen malonyl-, ethylmalonyl-, oder methoxymalonyl-spezifische AT-Domänen anderer PKS ausgetauscht, wodurch die erwarteten regioselektiv modifizierten Polyketide erzeugt werden konnten.<sup>[73,74,75]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die AT6-Domäne aus dem Erythromycin Gencluster (DEBS) gegen die AT5-Domäne des Niddamycin Genclusters (Nid) ausgetauscht werden, um so eine 2-Ethyl-Variante von Erythromycin A (**4**) zu erzeugen. Bei der Nid AT5-Domäne handelt es sich um eine Acyltransferase die sowohl Methylmalonyl-CoA als auch Ethylmalonyl-CoA als Substrat akzeptiert.



**Abbildung 30: Zielstruktur des AT-Domänen Austausches innerhalb von DEBS.** Der Austausch der AT6-Domäne gegen die Ethylmalonyl-spezifische Nid AT5-Domäne würde in dem Erythromycin Derivat 2-Ethylerythromycin resultieren. Die Ethyl-Gruppe ist rot hervorgehoben.

Die Arbeitsgruppe um Leonard Katz, die erfolgreich einen Austausch der DEBS AT4-Domäne gegen die Nid AT5 durchführte, wies in ihrer Veröffentlichung darauf hin, dass sie nur bei zusätzlicher Substratgabe oder Coexpression einer Crotonylreduktase (involviert in die Butyryl-Biosynthese) signifikante Produktbildung des Ethylmalonyl-Derivates beobachten konnten.<sup>[75]</sup> Sie postulierten, dass das von Butyryl-CoA abgeleitete Ethylmalonyl-CoA in dem Expressionsstamm nicht in ausreichendem Maß vorhanden ist, um mit dem hohen intrazellulären Level an

Methylmalonyl-CoA konkurrieren zu können. Sie konnten keinerlei Aktivität der Crotonylreductase innerhalb von *S. erythraea* nachweisen und auch ein Nachweis mittels Hybridisierung schlug fehl, was die Hypothese des Substratmangels unterstützt. Um eine Substratlimitierung zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit sowohl eine Crotonylreduktase coexprimiert als auch Diethylethylmalonat als synthetischer Baustein der Fermentation hinzu gefügt.

### 3.3.1 Austausch der DEBS AT6-Domäne gegen die Nid AT5-Domäne

Die in der Vergangenheit erfolgreich für den Austausch der AT6-Domäne aus DEBS Cluster genutzten flankierenden Bereiche<sup>[104,118]</sup>, bildeten die Grundlage für den vorzunehmenden Austausch. Basierend auf zwei unterschiedlich langen Nukleotidsequenzen wurden zwei von pKSSU89 abgeleitete integrative Expressionsvektoren konstruiert (DEBS3\* codierend, AT6-Domäne wurde gegen Nid AT5 ausgetauscht) und diese in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> (vgl. hierzu 3.4.2.1) exprimiert. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuchsansatz eine Crotonylreduktase coexprimiert. Hierzu wurden die von pKSSU89 (s. hierzu 3.1.1.3) abgeleiteten Expressionsvektoren jeweils simultan mit dem Crotonylreduktase codierenden integrativen Expressionsvektor in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert.

Die einzelnen Transkonjuganten wurden fermentiert, wobei der *S. erythraea* Wildtyp zur Kontrolle eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde die Fermentation mit 0, 5 oder 10 mM Butanol als synthetischer Baustein versetzt. Die einzelnen Ethylacetatextrakte wurden mittels HPLC/ESI-MS analysiert. In keiner der Extrakte waren auch nur Spuren einer Produktbildung erkennbar. Weitergehend konnte auch kein Erythromycin in den Extrakten der einzelnen Transkonjuganten detektiert werden. Dieses müsste auf Grund der von der Nid AT5-Domäne ausgehende erweiterten Spezifität (Methyl- und Ethylmalonyl-CoA) der Fall sein, wäre nur die Bereitstellung von Ethylmalonyl-CoA limitierend. Ein mögliches Fehlschlagen durch die fehlerhafte Wahl von kritischen Fermentationsbedingungen kann durch eine erfolgreiche Fermentation des parallel eingesetzten Wildtypes ausgeschlossen werden. So deutet alles auf eine partielle Protein-Fehlfaltung als Folge der Hybrid-PKS-Bildung hin.

### 3.3.2 Diskussion

Wie auch in der Literatur oftmals beschrieben blieb dieses *swapping* Experiment erfolglos. Wesentliche Schwierigkeiten, die oftmals zum Scheitern führen, sind die exakte Erkennung von Modul- und Domänengrenzen sowie die strukturelle Integrität artifizieller Hybrid-PKS. Entsprechend sind solche Austauschexperimente oftmals vergeblich. Die Vielzahl der in der Literatur erzeugten Hybrid-PKS sind häufig inaktiv oder weisen eine drastisch reduzierte Enzymaktivität auf.

Die AT6-Domäne wurde in der Literatur erfolgreich gegen verschiedene heterologe Domänen ausgetauscht<sup>[73]</sup>, und auch eine Funktion der Nid AT5-Domäne an Stelle der DEBS AT4-Domäne konnte nachgewiesen werden.<sup>[75]</sup> Auch wenn häufig Daten zu fehlgeschlagenen Experimenten in der Literatur nicht dokumentiert werden, ist davon auszugehen, dass dieses einer von vielen Versuchen war, die Nid AT5-Domäne an die Stelle der AT6-Domäne zu positionieren. Die Arbeitsgruppe um Leonard Katz publizierte beiläufig, dass es sowohl bei dem Austausch der DEBS AT5 als auch AT6 gegen die Nid AT5-Domäne zu keinerlei mittels HPLC nachweisbarer Produktbildung gekommen sei.<sup>[75]</sup>

Höchstwahrscheinlich ist es durch den Austausch der AT-Domänen zu einer falsch gefalteten und somit inaktiven Proteinstruktur gekommen. Mögliche Abhilfe zur Verschiebung der AT-Substratspezifität könnte alternativ ein gezielter Austausch von Aminosäuren innerhalb von AT-Domänen bringen, wodurch die Problematik der Fehlfaltung im Idealfall umgangen und die Erfolgsaussichten damit drastisch gesteigert werden könnten. Komplexe Domain-*swapping* Experimente könnten durch solche Entwicklungen an Bedeutung verlieren. Das Verständnis der PKS Enzymchemie ist jedoch bei Weitem nicht ausgereift, sodass die breite Anwendung von Punktmutationen in der kombinatorischen Biosynthese noch nicht absehbar ist.<sup>[24]</sup>



### 3.4 Studien zur Substratspezifität von *cis*-agierenden Acyltransferasen

Ein erweitertes, fundamentales Verständnis der Enzymchemie ist notwendig, um in Zukunft gezielt die Substratspezifität von Acyltransferasen durch wenige Punktmutationen ändern zu können. Daher sollten die Untersuchungen zum Mechanismus der Substratspezifität von AT-Domänen auf breit anwendbarer Basis stattfinden und auf eine Vielzahl von Polyketid-Biosynthesewegen übertragbar sein. Aus diesem Grund sollten die Studien nicht an den Acyltransferasen der Epothilon-PKS durchgeführt werden, da diese eine große evolutionäre Distanz zu den häufigen PKS aus der Ordnung der Actinomycetales aufweisen. Basierend auf der nachfolgend gewünschten rationalen Anwendung der erzielten Ergebnisse soll Abstand von den AT-Domänen der Epothilone-PKS genommen werden, auch wenn bereits Untersuchungen zu deren Substratspezifität beschrieben worden sind.<sup>[94]</sup> Aus diesem Grund ist die Wahl auf eine *cis*-agierende AT-Domäne innerhalb der bisher am besten untersuchten PKS 6-Desoxyerythronolid B Synthase (DEBS) gefallen. In dieser PKS akzeptieren alle AT-Domänen ausschließlich (2S)-Methylmalonyl-CoA als Substrat und teilen alle eine signifikante Sequenzhomologie.

Die als Modell gewählte AT6-Domäne weist mit ~ 63% eine hohe Sequenzhomologie (s. Abbildung 31) zur kürzlich kristallisierten AT3-<sup>[119]</sup> sowie zur AT5-Domäne<sup>[120]</sup> auf und befindet sich im letzten Modul der PKS.

*Cis*-agierenden Acyltransferasen befinden sich innerhalb des molekularen Fließbandes einer PKS. Veränderungen in den letzten Schritten der Biosynthese lassen eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit vermuten, da weniger nachfolgende Enzyme von den vorhergegangenen Modifikationen betroffen sind und von diesen beeinflusst werden könnten.

```

DEBS AT3 FPGQGSQWAGMGAE L L S S S P V F A G K I R A C D E S M A P M Q D W K V S D V L R Q A P G
DEBS AT5 FPGQGAQWQGMARDLLRESQVFADSI RDCERALAPHVDWSLTDLLS---G
DEBS AT6 FPGQGAQWEGMARGLLS-VPVFAESI AECDAVLSEVAGFSASEVLEQRPD

DEBS AT3 APGLDRVDVVQPVLFAVMVSLAELWRSYGVEPAAVVGHSQGEIAAAHVAG
DEBS AT5 ARPLDRVDVVQPALFAVMVSLAALWRSHGVEPAAVVGHSQGEIAAAHVAG
DEBS AT6 APSLERVDVVQPVLFESVMVSLARLWGACGVSPSAVIGHSQGEIAAAVVAG
                                     ***

DEBS AT3 ALTLEDAAKLVVGRSRLMRSLSGEGGMAAVALGEAAVRERLRPWQDRLSV
DEBS AT5 ALTLEDAAKLVAVRSRVLRLRGGQGGMASFGLGTEQAAERIGRFAGALS I
DEBS AT6 VLSLEDGVRVVALRAKALRALAGKGMVSLAAPGERARALIAPWEDRISV
                                     *

DEBS AT3 AAVNGPRSVVVS GEPGALRAFSEDCAAEGIRVRDIDVDYASHSPQIERVR
DEBS AT5 ASVNGPRSVVVGESGPLDELIAECEAEGITARRIPVDYASHSPQVESLR
DEBS AT6 AAVNSPSSVVVSGDPEALAE LVARCEDEGVRAKTL PVDYASHSRHVEEIR

DEBS AT3 EELLETTGDIAPRPARVTFHSTVESRSMDGTELDARYWYRNLRQVRFAD
DEBS AT5 EELLTELAGISPVSA DVALYSTTTGQPIDTATMDTAYWYANLREQVRFQD
DEBS AT6 ETILADLDGISARRAAIPLYSTLHGERRDGADMGP RYWDNLRSQVRFDE

DEBS AT3 AVTRLAESGYDAFIEVSPHP---
DEBS AT5 ATRQLAEAGFD AFVEVSPHPVLT
DEBS AT6 AVSAAVADGHATFVEMSPHPVLT

```

**Abbildung 31: Sequenzhomologievergleich der AT3, AT5 und AT6 Domänen aus dem Erythromycin Cluster.** Homologe Reste sind grau unterlegt. Die Sterne unterhalb der Sequenz kennzeichnen die Reste der *active site*. Das Sequenzalignemt wurde unter Verwendung des T-Coffee Server erstellt: Sequenzdaten: GeneBank CAM00064.1 AT3-Region 562...832; CAM00065.1 AT5-Region 556...852, AT6-Region 2020...2291.

### 3.4.1 Identifikation von mit der Substratspezifität korrelierenden Resten

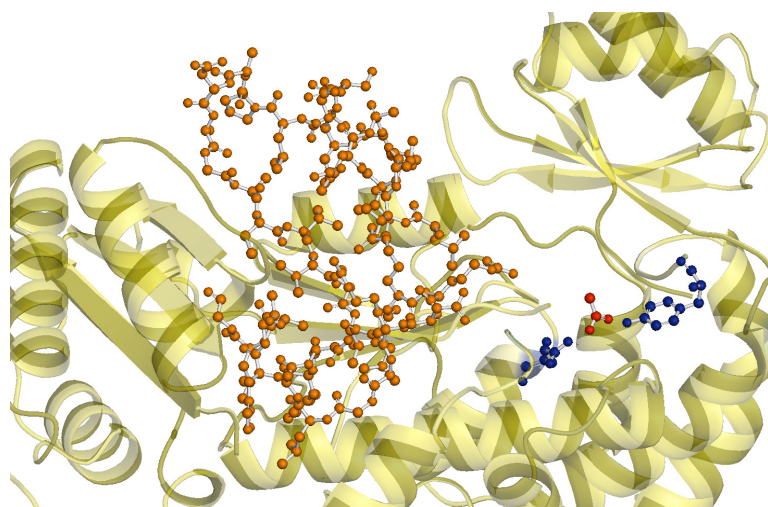
1995 wurde die Kristallstruktur der Malonyl-CoA:ACP Transferase aus *E. coli* mit einer Auflösung von 1,5 Å veröffentlicht<sup>[121]</sup>, die eine Identifizierung möglicher katalytischen Reste in den verwandten AT-Domänen ermöglichte.

Die Arbeitsgruppe um Peter F. Leadlay publizierte kurze Zeit später einen Aminosäuresequenzvergleich der 14 AT-Domänen des Rapamycin-Biosynthese-Genclusters (sieben Malonyl- und sieben Methylmalonyl-CoA-spezifische AT-Domänen) mit den Sequenzen weiterer Acyltransferase Domänen der Fettsäurebiosynthese (*fabD*) und der bakteriellen Polyketidbiosynthese.<sup>[93]</sup> Auf dieser Grundlage wurde nach divergenten Sequenzmotiven gesucht, die deutlich unterschiedlich für Malonyl- und Methylmalonyl-CoA-spezifische Domänen in einer modularen PKS sind. Eines der identifizierten Motive befindet sich C-terminal zum katalytischen Serin: **GHSXG** wobei das X in Malonyl-CoA-spezifischen-AT-Domänen für V, I oder L steht, in Methylmalonyl-CoA-spezifischen mit einer Ausnahme M für Q.



1999 postulierte die Arbeitsgruppe um Chaitan Khosla eine Bedeutung zu der hypervariablen Regionen der Acyltransferasen für die Selektion von Verlängerungseinheiten.<sup>[74]</sup> Ihren Schlüssen zur Folge ist ein 35 Aminosäuren großes Fragment (*Nhel*-Styl innerhalb der DEBS AT2, oder der entsprechende Bereich innerhalb anderer AT) ein wichtiger Faktor für die Spezifität der AT-Domänen gegenüber Methylmalonyl-CoA oder Malonyl-CoA. Sequenzvergleiche mit analogen Segmenten bekannter AT-Domänen zeigte eine auffällige Diversität in Bezug auf die Sequenzlänge (23-35 Aminosäuren) und auf die Sequenz dieser Aminosäuren (Abbildung 32, markierte hypervariable Region innerhalb der DEBS AT5-Domäne). In ihrer Arbeit schlugen Sie eine strukturbasierte und / oder kombinatorische genetische Manipulation dieser C-terminal gelegenen hypervariablen Region vor, um so veränderte oder relaxierte Substratspezifitäten zu erzeugen. Jedoch wurde diese Hypothese in der Literatur nicht weiter verfolgt, es liegt lediglich eine analoge Patentschrift dieser Arbeitsgruppe vor. Weitergehend werden nun Argumente aufgezeigt, die gegen eine Rolle der hypervariablen Region im Bezug auf die Substratspezifität der AT-Domänen sprechen.

Im Jahr 2005 publizierte die Arbeitsgruppe um Romas J. Kazlauskas unter dem Titel „Improving enzyme properties: when are closer mutations better?“ ihre Gedanken zur Manipulation von Enzymeigenschaften in Laboratoriumsexperimenten. Im Bezug auf eine veränderte Substratspezifität konnte die Arbeitsgruppe aufzeigen, dass überwiegend Mutationen von Aminosäuren die weniger als 15 Å vom aktiven Zentrum entfernt sind Einfluss auf die Substratelektivität haben.



**Abbildung 32: Ausschnitt aus der Kristallstruktur KS-AT5 Didomäne.** Das co-kristallisierte Acetatanion innerhalb der Bindetasche ist in Rot dargestellt. Die Substratinteraktionspartner Tyr742 und Gln643 sind blau, die 1999 von Chaitan Khosla *et al.* definierte hypervariable Region orange dargestellt.

Die Kristallisation der KS-AT5 Didomäne als Homodimer ermöglichte im Jahr 2006 eine erste, wenn auch sehr grobe, Modellierung des nativen Substrats in der Bindetasche der AT-Domäne und somit eine erste Visualisierung der möglichen Substratbindung.<sup>[120]</sup> An die Position eines co-kristallisierten Acetatanions wurde eine Methylmalonylphosphopantethein-Struktur modelliert. Hierdurch konnten die zuvor vermuteten Wechselwirkungen<sup>[93]</sup> zwischen Substrat und den Resten Tyr742 (mit der  $\alpha$ -Methylengruppe) sowie Gln643 (mit dem Carboxylat) innerhalb der Bindetasche weitergehend unterstützt werden. Die Reste der von Khosla und Mitarbeitern definierten hypervariablen Region sind in Abbildung 32 als orangefarbene Stabmodelle dargestellt. Deutlich wird hier, dass die einzelnen Reste zum größten Teil eine größere Distanz als 15 Å zum Aktiven Zentrum haben. Basierend auf den zuvor aufgeführten Arbeiten von Romas J. Kazlauskas könnten aus Mutation in der hypervariablen Region nur *remote effects* resultieren, die nur indirekt Einfluss auf die Substratselektivität haben können.

Im darauf folgenden Jahr wurde die Proteinstruktur der DEBS AT3-Domäne, ebenfalls als KS-AT-Didomäne kristallisiert, zugänglich.<sup>[119]</sup> Ausgehend von NMR-Messungen und Homologiemodellen generierten die Mitarbeiter um Chaitan Khosla eine Struktur für das DEBS ACP3, welches sie nachfolgend an die AT3-Domäne dockten. Die Interaktionen an der Grenzfläche zwischen ACP3 und AT3 involviert die Aminosäuren Arg44 (ACP3) sowie Glu849 und Asp850. Keiner dieser Reste ist im Vergleich mit den anderen AT-Domänen aus dem DEBS Cluster konserviert. Sowohl die Reste Glu849 als auch Asp850 befinden sich innerhalb der von Chaitan Khosla und Mitarbeitern definierten hypervariablen Region. Weiterhin stimmt die fehlende Konservierung dieser Reste ebenfalls mit den Charakteristika dieser Region überein. Zusammenfassend spricht neben der Entfernung der hypervariablen Region zum aktiven Zentrum vorallem die Interaktion der Aminosäuren Glu849 und Asp850 (innerhalb der als hypervariabel definierten Region der AT3-Domäne) an der Grenzfläche zum ACP gegen eine Bedeutung dieser Region im Bezug auf die Substratspezifität. Vielmehr scheint diese Region eine große Bedeutung in der Interaktion zwischen AT-Domäne und ACP zu spielen; aufgrund der geringeren Sequenzkonservierung in ACP mag dies eine hohe Variabilität auf Seiten der AT erfordern.

Im gleichen Jahr wurde von der Arbeitsgruppe um Satoshi Omura die Organisation der PKS für die Biosynthese von Avermectin beschrieben.<sup>[122]</sup> Nach erfolgreicher Sequenzierung des Biosynthesecusters ausgehend von Cosmid-Bibliotheken verglichen sie die Sequenzen der AT-Domänen mit denen aus den Biosynthesegenclustern für Erythromycin, Pikomycin, Tylosin, Niddamycin und Rapamycin (insgesamt 57 AT-Domänen) und konnten diese mittels phylogenetischer Analyse in drei Gruppen unterteilen. Hierbei weist die erste Gruppe nur AT-Domänen mit Malonat-Ladefunktion auf, die zweite Gruppe Domänen mit Methylmalonat-Ladefunktionen und die dritte Gruppe beinhaltet Acyl-Reste die von Monocarboxylsäure-Ladefunktionen abgeleitet werden können. Weitergehend postulierte die Gruppe eine Konsens-Sequenz für Malonyl- und Methylmalonyl-CoA-spezifische AT-Domänen (vgl. Abbildung 33).

```

malonyl      GQGXR...TXYAQXXXXXXXXQXALXXXX...GHSIG...XXAFH...WXXXX..
methylmalonyl GQGXR...VDVVQXXXXXXXXMXSLXXXX...GHSQG...XYASH...WXXNL..

```

\*

**Abbildung 33: Konsens-Sequenz von Malonyl- und Methylmalonyl-CoA-spezifischen AT-Domänen.** Rote Buchstaben kennzeichnen die signifikanten Unterschiede beider Domän-Arten. Grau hinterlegt ist das von Leadlay und Mitarbeitern zuvor identifizierte GHSXG Motiv, in dessen Sequenz sich auch das katalytische Serin befindet. Ebenfalls befindet sich innerhalb dieser Konsens-Sequenz das später identifizierte YASH (Methylmalonyl-CoA) und HASH Motiv (Malonyl-CoA).

2001 konnte die Firma Kosan Biosciences erstmalig aufzeigen, dass die Spezifität von AT-Domänen gegenüber ihrem Substrat durch spezifische Mutationen erweitert werden kann.<sup>[101]</sup> Die Gruppe griff hierbei die drei zuvor identifizierten divergenten Sequenzmotive auf (s. Abbildung 34), deren Beiträge zur Substratspezifität bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht experimentell bestätigt worden waren.

Mutation 1	...ERVDVLQ...	
	... <b>DTLYA</b> ...	
Mutation 2	...GHSQGEI...	GHSXG-Motiv
	... <b>L</b> ...	
Mutation 3	...VRYASHS...	YASH-Motiv
	... <b>H F</b> ...	

**Abbildung 34: Lokalisierung der von Kosan Biosciences durchgeführten spezifischen Aminosäureaustausche innerhalb der AT4-Domäne aus DEBS.** Die fett gedruckten Reste betiteln die Zielaminosäuren.

Bis dato konnten nur durch den gezielten Austausch der gesamten, etwa 300 – 350 Aminosäuren großen, AT-Domäne (*swapping* Experimente) die Polyketid-Diversität erweitert werden. Problematisch zeigten sich hierbei oft die Erfolgsquote und die erzielte Ausbeute. Die Gruppe um McDaniel versprach sich durch den gezielten Austausch einer limitierten Anzahl von Aminosäuren einen neuen Weg, um die Diversität zu erhöhen, und so die Problematik der Fehlfaltung zu umgehen.

Hierdurch konnten sie aufzeigen, dass spezifische Aminosäurenaustausche innerhalb dieser divergenten Sequenzmotive am Beispiel der DEBS AT4-Domäne (Methylmalonyl-CoA-spezifisch) zu einer erweiterten Substratbreite führten. Der in *S. lividans* heterolog exprimierte DEBS\* Cluster (innerhalb der AT4-Domäne modifiziert) führte sowohl zur Bildung von 6-Deoxyerythronolid B als auch zu 6-Desmethyl-6-Deoxyerythronolid B. Zwar konnte kein vollständiger Wechsel der Substratspezifität beobachtet werden, jedoch konnte durch diese Arbeit die Bedeutung der Sequenzmotive auf die Substratspezifität unterstrichen werden. Da Aminosäurenaustausche in jeder dieser drei Motive zur Erweiterung der Substratspezifität beitragen, ist davon auszugehen dass scheinbar mehrere Reste zum Prozess der Substratauswahl und Übertragung beitragen können – direkt oder indirekt.

Weitere von Peter F. Leadlay und Mitarbeitern durchgeführte, Sequenzvergleiche zwischen Verlängerungseinheiten-übertragenden AT-Domänen <sup>[118]</sup> unterstrichen die Bedeutung der hoch konservierten Aminosäurenregion YASH, C-terminal ca. 90-100 Aminosäuren vom katalytischen Serin entfernt, die in der Mehrzahl aller Methylmalonyl-CoA-spezifischen AT-Domänen gefunden werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnte in Malonyl-CoA-spezifischen AT-Domänen das Aminosäurenmotiv HAFH identifiziert werden. Acyltransferasen, die den Einbau von Ethylmalonyl-CoA (beispielsweise AT5 aus dem Niddamycincluster) oder anderen voluminösen CoA-Estern erlauben, weisen hier eine weniger konservierte Region auf: XAGH wobei das X in der Mehrzahl der Fälle ein F, T, V oder H ist. Es scheint als wäre der dritte Rest dieses Motives umgekehrt proportional zur Substratgröße. Weitergehend konnte bei einer Acyltransferase aus dem Epothilone-Cluster, die sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA einbaut, ein Hybrid der Motive YASH und HAFH, HASH, identifiziert werden.

Nachfolgend wurde an dem Modellsystem DEBS1-TE (s. Kapitel 1.3.1) der Einfluss des identifizierten YASH Motiv auf die Substratspezifität getestet. Das Hybrid HASH sowie das Motiv HAFH wurden mittels Einzelaminosäurenaustausch ausgehend von YASH erzeugt, was zu einer Relaxation der Substratspezifität führte. Jedoch konnte auch hier kein kompletter Wechsel der Substratwahl detektiert werden. Es scheint als wäre der Austausch weiterer Aminosäuren notwendig um die Substratspezifität zu verschieben. Weitergehend stellte die Arbeitsgruppe ein Kassettensystem vor, mit dem ein deletiertes Modul der Tylosin PKS *in trans* durch dasselbe Modul substituiert werden konnte. Hierfür wurde die *attB* chromosomale Bindungsstelle für die Phagenintegrase  $\Phi$ C31 ausgenutzt, an der der entsprechende Expressionsvektor unter der Kontrolle des *ermE* Promoters integrieren konnte. Sie postulierten, dass die Evolvierung einer heterologen AT-Domäne zur kombinatorischen und / oder strukturgeleiteten Mutagenese mit diesem Kassettensystem einfach durchzuführen sei.

Die von Rolf Müller, Barrie Wilkinson und deren Mitarbeitern beschriebene Sequenzanalyse<sup>[94]</sup> des Epothilon Biosynthesecluster beinhaltet zwei AT-Domänen, die sich in lediglich neun Resten unterscheiden (Abbildung 35), jedoch unterschiedliche Substratspezifität aufweisen. Die AT2-Domäne ist strikt Malonyl-CoA-spezifisch, wohingegen die AT3-Domäne sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA als Substrat akzeptiert und überträgt, wodurch es zur Bildung von Epothilon A und B kommt. Wie in der Arbeitsgruppe um Leadlay wurden auch hier weitergehende Analysen an DEBS1-TE, einer vereinfachten Modell-PKS, durchgeführt. Hierzu wurde die AT1 aus DEBS1 sowohl gegen die Epo AT2 als auch Epo AT3-Domäne ausgetauscht. Wie erwartet, wurden durch die AT2-Domäne spezifisch Methylmalonyl-CoA und durch die AT3-Domäne sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA übertragen. Nachfolgend wurde das HASH Motiv der Epo AT3-Domäne zu YASH mutiert. Hieraus resultierte kein statistisch signifikanter Anstieg in Bezug auf die Spezifität von Methylmalonyl-CoA und dessen resultierender Einbau. Wider erwartend resultierte die Mutation von HASH zu HAFH in einer inaktiven PKS. Da sich die AT2 und AT3 nur an neun Aminosäuren unterscheiden scheint es, als würde eine überraschend kleine Anzahl von Aminosäuren innerhalb von AT-Domänen die Substratspezifität bestimmen.

```

Epo AT2  GQGAQT PGMGRGLCAAWPAFREAFDRCVALFDRELDRLPREVMWAEAGSA
Epo AT3  GQGAQT PGMGRGLCAAWPAFREAFDRCVALFDRELDRLPREVMWAEPGSA

Epo AT2  ESLLLDQTAFTQPALFAVEYALTALWRSWGVEPELVGHSIRGELVAACVA
Epo AT3  ESLLLDQTAFTQPALFTVEYALTALWRSWGVEPELVAGHSRAGELVAACVA

Epo AT2  GVFSLEDGVRLVAARGRLMQGLSAGGAMVSLGAPEAEVAAAVAPHAASVS
Epo AT3  GVFSLEDGVRLVAARGRLMQGLSAGGAMVSLGAPEAEVAAAVAPHAASVS

Epo AT2  IAAVNGPEQVVIAGVEQAVQAIAAGFAARGARTKRLHVSHAFHSPLMEPM
Epo AT3  IAAVMGPEQVVIAGVEQAVQAIAAGFAARGARTKRLHVSHASHSPLMEPM
                                     * * * *

Epo AT2  LEEFGRVAASVTYRRPSVSLVSNLSGKVVTDELSAPGYWVRHVREAVRFA
Epo AT3  LEEFGRVAASVTYRRPSVSLVSNLSGKVVADELSAPGYWVRHVREAVRFA

Epo AT2  DGVKALHEAGAGTFVEVGPKPTLLGLSPACLPEAEPTLLASLRAGREEAA
Epo AT3  DGVKALHEAGAGTFVEVGPKPTLLGLLPACLPEAEPTLLASLRAGREEAA

Epo AT2  GVLEALGRLWAAGGSVSWPGVFPTAGRRVLLPTYPW
Epo AT3  GVLEALGRLWAAGGSVSWPGVFPTAGRRVLLPTYPW

```

**Abbildung 35: Aminosäuresequenzvergleich (Alignment) der Epo AT2- und AT3-Domäne in Analogie zu Müller *et al.*** Die Struktur motive HAFH, HASH sind innerhalb der primären AT Sequenz durch Sterne gekennzeichnet. Der beschriebene N-Terminus (GQG), der C-Terminus (LPTY) sowie die Reste der *active site* (GHS und R) sind grau hinterlegt. Die neun unterschiedlichen Aminosäuren zwischen Epo AT2 und Epo AT3 sind fett hervorgehoben. Zwei Schlüssel-Aminosäuren die durch vorhergegangene Sequenzvergleiche identifiziert wurden sind als weiße Buchstaben vor schwarzem Hintergrund hervorgehoben.<sup>[123]</sup>

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels Sequenzvergleichen (Abbildung 36) innerhalb der DEBS AT6 die korrespondierenden neun Reste identifiziert werden, die sich zwischen der Epo AT2- und AT3-Domäne unterscheiden.

Deutlich erkennbar wird durch den Sequenzvergleich, dass dieser allein zur Identifizierung von Aminosäuren innerhalb der DEBS AT6-Domäne, die potentiell einen Einfluss auf die Substratspezifität haben, nicht ausreicht. Deutlich sind signifikante Unterschiede erkennbar, die eine direkt Übertragung aller identifizierten Reste nicht immer zulassen. Dieses kann jedoch auf die evolutionär bedingte Distanz dieser Domänen zurückgeführt werden.

Da in Proteinen die Struktur höher konserviert ist als die Sequenz, sollte weitergehend die strukturelle Homologie betrachtet werden, um so weitere potentiell kritische Reste zuordnen zu können.

```

DEBS AT6 GQGAQWEGMARGLLSV-PVF----AESIAECDAVLSEVAGFSASEVLEQR
Epo AT2 GQGAQT PGMGRGLCAAWPAFREAFD----RCVALFDRELDRLPREVMWAR
Epo AT3 GQGAQT PGMGRGLCAAWPAFREAFD----RCVALFDRELDRLPREVMWAR

DEBS AT6 PD---APSLERVDVVQPVLFVSMVSLARLWGACGVSP----SAVIGHSQG
Epo AT2 AGSAESLLLDQTAFTQPALFAVEYALTALWRSWGVEPELV----GHSIG
Epo AT3 PGSAESLLLDQTAFTQPALFTVEYALTALWRSWGVEPELVA----GHSAG

DEBS AT6 EIAAAVVAGVLSLEDGVRVVALRAKALRALAGKGMVSLAAPGERARALI
Epo AT2 ELVAACVAGVFSLEDGVRLVAARGRLMQGLSAGGAMVSLGAPEA----EV
Epo AT3 ELVAACVAGVFSLEDGVRLVAARGRLMQGLSAGGAMVSLGAPEA----EV

DEBS AT6 A----PWEDRISVAAVNSPSSVVVSGDPEALAEVVARCEDEGVRAKTLPV
Epo AT2 AAVAPHAASVSIAAVNGPEQVVIAGVEQAVQAIAGFAARGARTKRLHV
Epo AT3 AAVAPHAASVSIAAVMGPEQVVIAGVEQAVQAIAGFAARGARTKRLHV

DEBS AT6 DYASHSRHVVEIRET----ILADLDGISARRAAIPLYSTLHGERRDGADM
Epo AT2 SHAFHSPLMEPMLLEEFGRVAA----SVTYRRPSVSLVSNLSGKVVTDELS
Epo AT3 SHASHSPLMEPMLLEEFGRVAA----SVTYRRPSVSLVSNLSGKVVADELS

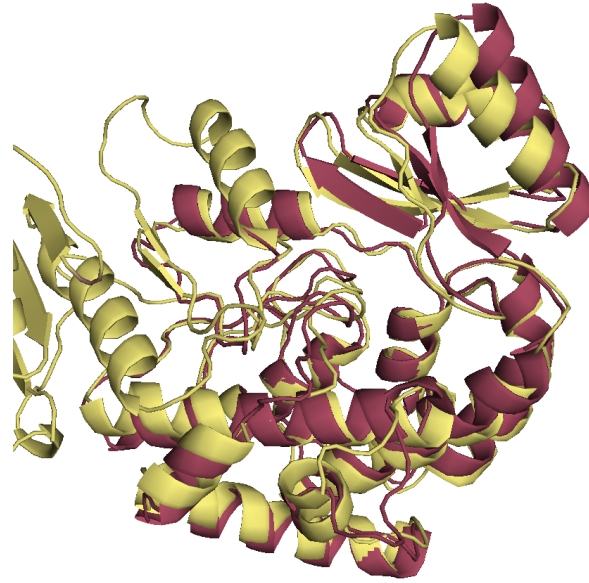
DEBS AT6 GPRYWYDNLRSQVRFDEAVSAAVADGHAT----FVEMSPHPVLTAAVQEI
Epo AT2 APGYWVRHVREAVRFADGVKAL----HEAGAGTFVEVGPKPTLLGLSPAC
Epo AT3 APGYWVRHVREAVRFADGVKAL----HEAGAGTFVEVGPKPTLLGLLPAC

DEBS AT6 AADAVAIGSLHRDTAEHLIAELARAHVHGVAVDW
Epo AT2 LPEA-----EP
Epo AT3 LPEA-----EP

```

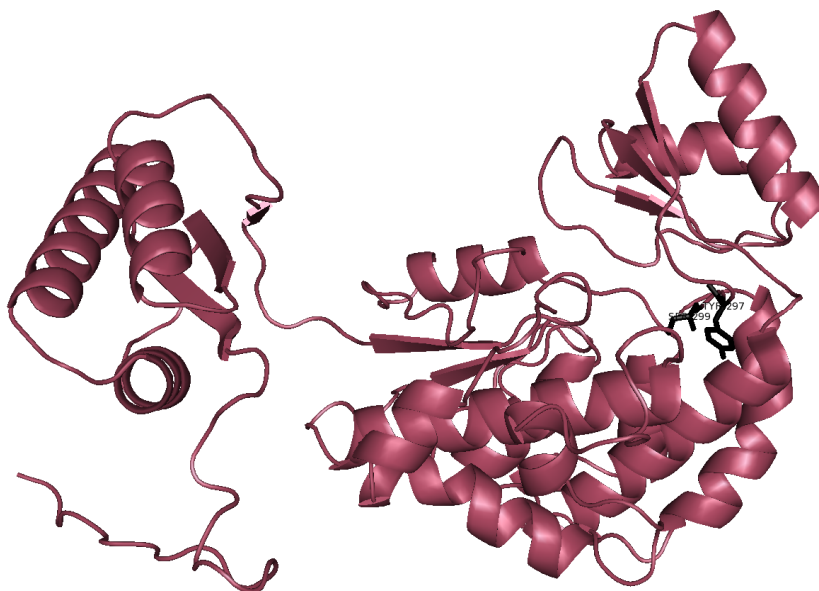
**Abbildung 36: Aminosäuresequenzvergleich der AT6-Domäne aus dem DEBS sowie der AT2- und AT3-Domäne aus dem Epo Cluster.** Sequenzhomologe Regionen sind grau hinterlegt. Die neun unterschiedlichen Reste in der Epo AT2- und der AT3-Domäne sind rot hervorgehoben, die in der AT6 korrespondierenden Reste können so einfach abgelesen werden.

Mittels des I-Tasser Servers<sup>[124,125]</sup> wurden strukturelle Vergleiche mit den in der Proteindatenbank vorhandenen, artverwandten Strukturen durchgeführt und so ein Homologiemodell (Abbildung 37) generiert. Mit einem TM-Score von 0,92, der ein Messwert für die globale strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem generierten Homologiemodell und einer vorhandenen Proteinstruktur ist, besteht hohe strukturelle Ähnlichkeit zur kristallisierten AT5-Domäne<sup>[120]</sup>. Die von Chaitan Khosla und Mitarbeitern veröffentlichte Struktur zeigt bei einer Auflösung von 2,7 Å ein homodimeres Protein mit komplett gelöster Ketosynthase (KS) und Acyltransferase sowie drei flankierenden Linkern. Ein ähnlich hoher TM-Score wird zur kristallisierten DEBS AT3-Domäne<sup>[119]</sup> erzielt.



**Abbildung 37: Partielle Überlagerung des Homologiemodells I der DEBS AT6 (Magenta) mit der Kristallstruktur der KS-AT5 Didomäne (gelb).**

Um den möglichen Einfluss der Linkerregionen mit einbeziehen zu können, wurde die Sequenz der AT6-Domäne sowohl N- als auch C-Terminal um weitere Aminosäuren verlängert und wiederum ein Homologiemodell mittels des I-Tasser Servers generiert (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Homologiemodell der verlängerten AT6-Domäne.** Die Aminosäuren Tyr297 und Ser299 (YASH Motiv) innerhalb der Bindetasche sind zur besseren Visualisierung als schwarze Stabmodelle dargestellt.

Basierend auf den Sequenz- und Strukturalignments konnten durch visuelle Analyse innerhalb der N- und C-terminal verlängerten AT6-Domäne aus DEBS insgesamt 14



Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität haben. Die folgende Sequenz wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als AT6-Region bezeichnet:

```
EPPEPEPLPEPGVGLAAANSVPVLLSARTETALAAQARLLESVDDSVPLT
ALASALATGRAHLPRRAALLAGDHEQLRGQLRAVAEGVAAPGATTGTASAGGV
VFVFPQGAQWEGMARGLLSVPVFAESIAECDAVLSEVAGFSASEVLEEQRPDA
PSLERVDVVQPVLFSVMVSLARLWGACGVSPSAVIGHSQGEIAAAVVAGVLSL
EDGVRVVALRAKALRALAGKGMVSLAAPGERARALIAPWEDRISVAAVNSPS
SVVVSQDPEALAELVARCEDEGVRAKTLPVDYASHSRHVEEIRETILADLDGI
SARRAAIPLYSTLHGERRDGADMGPYRYWYDNLRSQVRFDEAVSAAVADGHATF
VEMSPHPVL
```

**Abbildung 39: Aminosäuresequenz der AT6-Region.** Identifizierte Reste die potentiell Einfluss auf die Substratspezifität haben können, sind in rot hervorgehoben.

Die in der AT6 Region identifizierten Aminosäuren Prolin94, Glycin95, Glutaminsäure154, Prolin157, Serin174, Valin193, Isoleucin194, Glutaminsäure198, Asparagin262, Serin263, Tyrosin297, Serin299, Arginin336 und Asparaginsäure337 sollten nachfolgend mittels Sequenz-Funktionsbeziehungen auf ihre Bedeutung untersucht werden.

Bis zum heutigen Stand der Forschung konnte in wenigen Beispielen aufgezeigt werden, dass durch spezifische Aminosäureaustausche innerhalb der AT-Domänen die Substratspezifität verbreitert werden kann. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen, die Substratspezifität vollkommen zu verschieben oder durch eine partielle Verbreiterung den Einbau nicht-natürlicher Substrate zu ermöglichen - was einen enormen Beitrag zur gezielten erweiterten Polyketid-Diversität leisten könnte. Die vorliegende Arbeit soll den Weg zu einem besseren Verständnis des Prozesses der Substraterkennung und Übertragung ebnen, um so die Substratspezifität von AT-Domänen erweitern zu können.

Hierzu sollten die identifizierten 14 Aminosäuren mittels der Sättigungsmutagenese in alle 19 proteinogenen Aminosäuren mutiert werden, und der Einfluss dieser Reste auf die Erythromycin-Produktion detektiert werden. Insgesamt sollten so 266 Enzymvarianten untersucht werden.

### 3.4.2 DEBS-AT6-Mutageneseexperimente

Alle Experimente wurden im Originalproduzenten von Erythromycin, *Saccharopolyspora erythraea* durchgeführt. Dieses erhöhte signifikant die Ansprüche an die einzelnen Experimente im Vergleich zur heterologen Expression in Wirten wie *E. coli*. Gleichzeitig aber ermöglicht dieses den Vergleich zum nativen Enzym und verhindert stammspezifische Einflüsse wie drastisch reduzierte Fermentationsausbeuten, die oftmals in heterologen Fermentationssystemen beobachtet werden können.<sup>[81,126]</sup> Weitergehend wurde in der Literatur mehrfach aufgezeigt, dass die mittels vereinfachten Modellsystemen von PKS erlangten Ergebnisse nicht auf die komplexen Multienzyme in ihren natürlichen Produzenten übertragen werden konnten.<sup>[95]</sup>

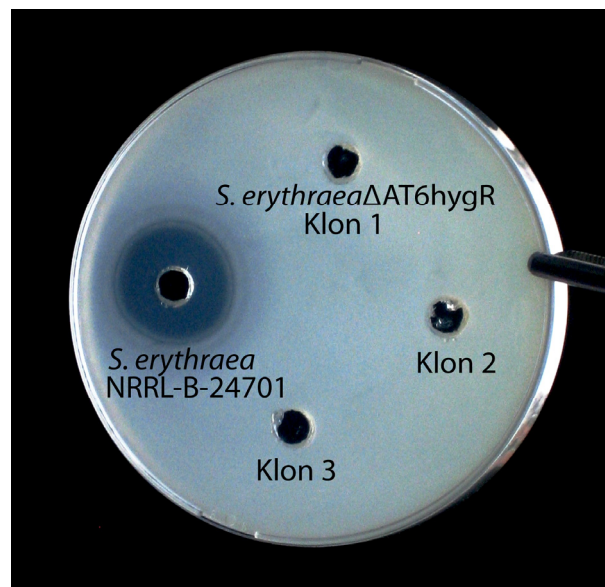
Grundlage dieser Studien ist der mittels SLIC-MIX generierte Vektor pKSSU89 (integrativer *E. coli* / Actinomyceten *Shuttle*-Vektor, trägt die komplette DEBS3 codierende Gen-Kassette unter der Kontrolle von *Pact*) sowie eine Mutante von *S. erythraea*, die an der Position der zuvor definierten AT-Domäne eine Hygromycin Resistenzkassette trägt (resultierend in einem Erythromycin-negativen Phänotyp).

Um die von den Positionen der 14 Aminosäuren ausgehende Sequenz-Funktionsbeziehung untersuchen zu können, sollte jede dieser Aminosäuren mittels Sättigungsmutagenese mutiert werden. Um aussagekräftige Datensätze mit handhabbarem Screening-Aufwand zu erhalten, wurde jede der resultierenden 266 Enzymvarianten mit spezifisch definierten Oligonukleotiden erzeugt und auf die Verwendung der in der Sättigungsmutagenese sonst üblichen von degenerierten Oligonukleotiden verzichtet. Die resultierenden Plasmide wurden konjugiert und komplementierten so den Stamm *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> (trägt ein nicht funktionelles DEBS3). Vier Klone jeder Mutante, der Wildtyp *S. erythraea* NRRL-B-24071 sowie der simultan wiederhergestellte Wildtyp (basierend auf *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>) wurden parallel fermentiert und deren Etylacetatextrakte mittels HPLC/ESI-MS untersucht; wobei letztere als Standard für Fermentationen der einzelnen DEBS3 Varianten dienten. Das resultierende Erythromycin-Produktionsniveau wurde als Indikator für die Funktionalität der jeweiligen Enzymvariante verwendet. Eine potentielle erweiterte Substratpromiskuität wurde zusätzlich analysiert.

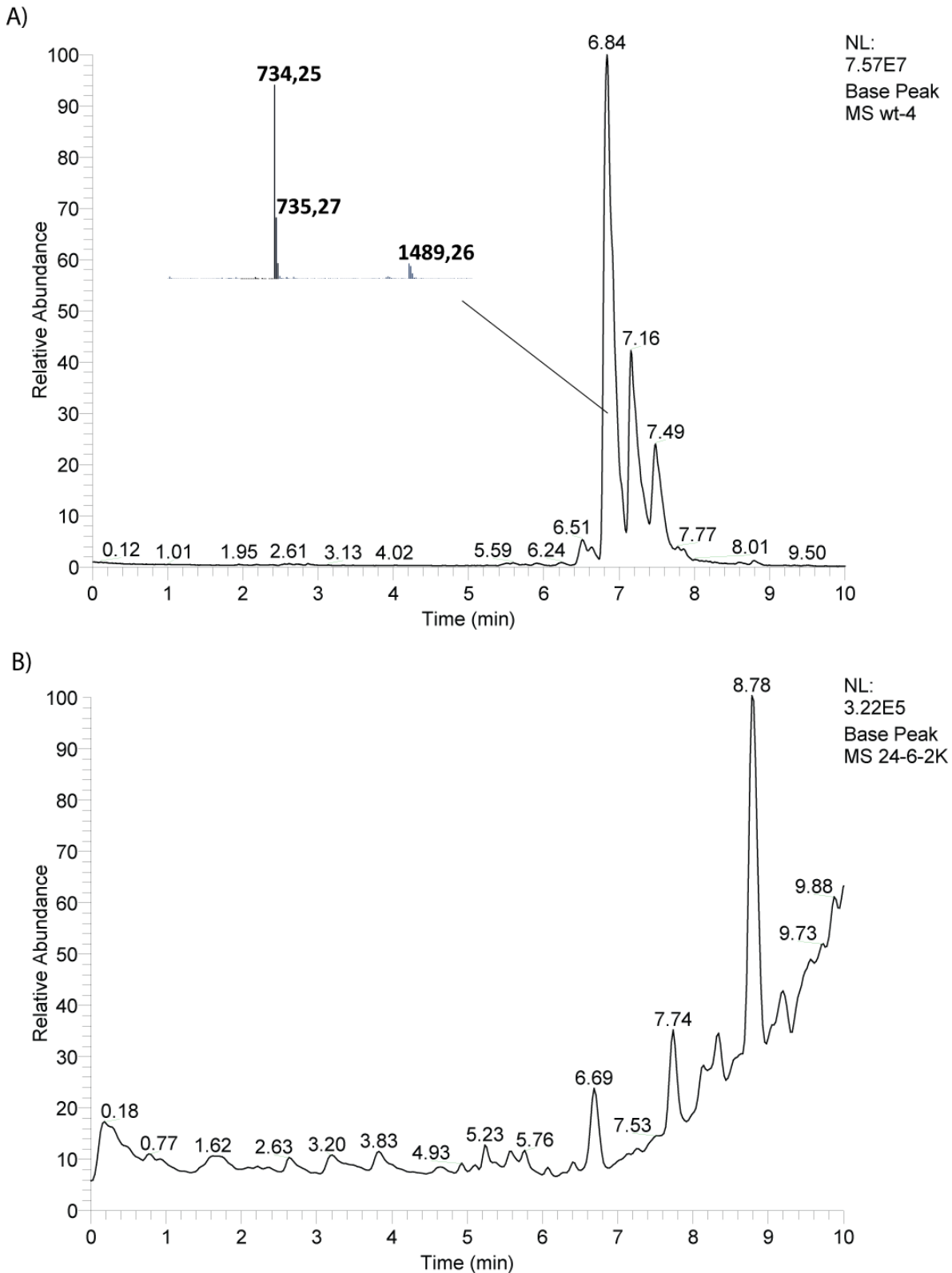
### 3.4.2.1 Generierung einer *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> Variante

Die durch einen doppelten *cross-over* mit dem Plasmid pKSSU129 vermittelte homologe Rekombination in *S. erythraea* NRRL-B-24071 resultierte in einer Variante, die ein nicht funktionelles DEBS3 in ihrem Genom trägt. Die resultierende PKS ist somit nicht mehr in der Lage, Erythromycin zu synthetisieren.

Die Ethylacetatextrakte von Wildtyp und Variante wurden sowohl mittels HPLC/ESI-MS (Abbildung 41) analysiert, als auch die von ihnen ausgehende antimikrobielle Aktivität mittels sogenanntem Hemmhof-Assay (Abbildung 40) bestimmt. Beide Analysen bestätigen eindeutig den von der *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> Variante ausgehenden Fähigkeitsverlust Erythromycin produzieren zu können.



**Abbildung 40: Testung der antimikrobiellen Aktivität unter Verwendung von *Bacillus subtilis* als Referenzstamm.** Das Ethylacetatextrakt der Wildtyp-Fermentation erzeugt eine deutliche Wachstumsinhibitionszone wohingegen die Extrakte von *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> keine Ausbildung einer Inhibitionszone induzieren.

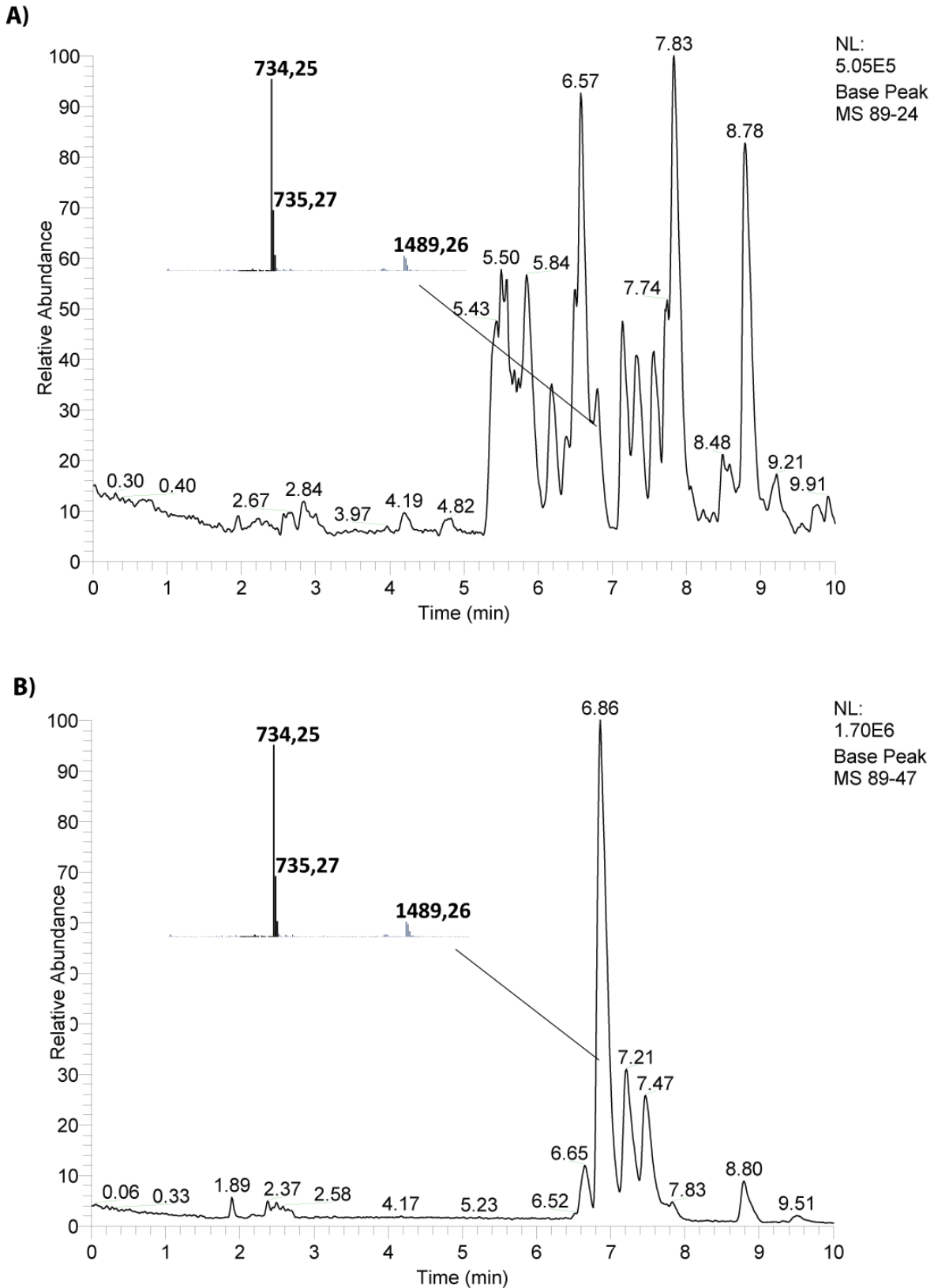


**Abbildung 41: HPLC/ESI-MS Messung von Ethylacetatextrakten der Fermentation des *S. erythraea* Wildtyp NRRL-B-24071 (A) und *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> (B).** Das Erythromycin anzeigende Signal bei einer Retentionszeit von 6,84 min ist lediglich in dem Fermentationsextrakt des Wildtyp nachweisbar.

### 3.4.2.2 Einfluss der Klon-zu-Klon Variabilität auf das Erythromycin-Produktionsniveau

Grundlage aller nachfolgenden Experimente ist die Möglichkeit, *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> mittels eines für DEBS3 codierenden, integrativen Vektors komplementieren zu können, um so die Biosynthese von Erythromycin wiederherzustellen. Die Fermentationsextrakte einzelner Transkonjuganten wurden mittels HPLC/ESI-MS untersucht, wodurch bestätigt werden konnte, dass der Vektor pKSSU89 den Wildtyp wiederherstellen kann. Die Erythromycin-Produktion konnte komplementiert werden, was durch die Bildung eines deutlichen Produktsignals sichtbar wurde (vgl. Abbildung 42).

Eine starke Variabilität in der Naturstoffproduktion der einzelnen Klone als Folge der genetischen Manipulation ist ein allgemeines Problem bei Actinomyceten,<sup>[127]</sup> das unbedingt berücksichtigt werden musste. Aus diesem Grund wurden 60 Klone des wiederhergestellten Wildtyp (pKSSU89 in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>) fermentiert und ihr Erythromycin-Produktionsniveau mit dem des Wildtyps verglichen. Hieraus resultierte eine große Produktivitätsspanne, die alleine auf die genetische Manipulation zurückzuführen ist. Das Erythromycin-Produktionsniveau lag bei den 60 analysierten Klonen zwischen 10 und 50 % der Wildtyp-Produktivität. Die Abbildung 42 zeigt die untere und obere Grenze der Produktivität der einzelnen Fermentationsextrakte auf. Dieses Spanne von 10 – 50% bildete die Basis für die nachfolgenden Analysen. Befand sich das durch die Variante erzeugte Erythromycin-Produktionsniveau innerhalb dieser Normalspanne, so konnte von einer Mutation gesprochen werden, die im Rahmen des Experimentes keinen detektierbaren Einfluss (neutraler Effekt) auf die Produktivität hat. Bei Varianten die ein Produktionsniveau unterhalb des Grenzbereiches (< 10%) aufwiesen, wurde von einem negativem Effekt dieses Aminosäureaustausches auf die Proteinstruktur und die damit verbundene Erythromycin-Produktion ausgegangen. Werte oberhalb 50%, die für einen positiven Einfluss der Mutation sprechen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht detektiert werden.



**Abbildung 42: Klon-zu-Klon Variationen des wiederhergestellten Wildtypes in Bezug auf das Produktionsniveau. Die zwei Abbildungen repräsentieren die untere (A) und obere (B) Grenze**

### 3.4.2.3 Mutagenese der 14 Reste innerhalb der AT6 Region

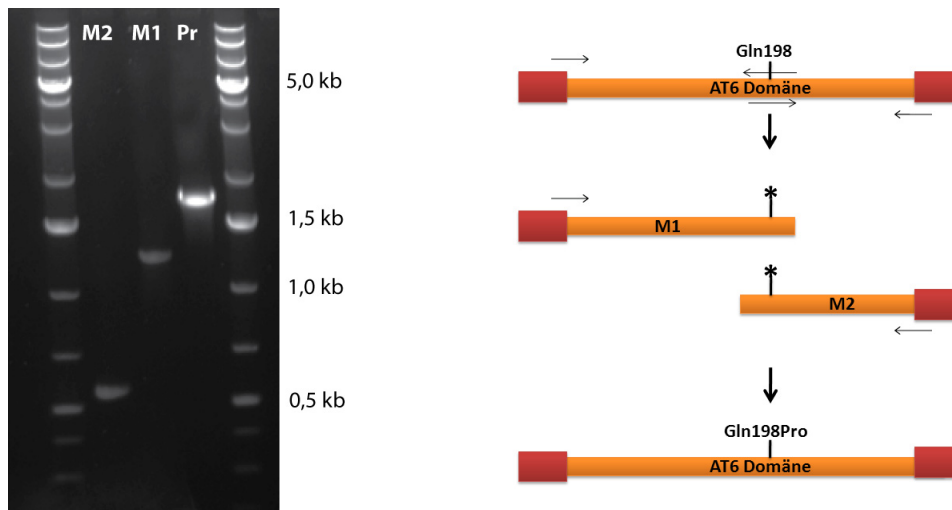
Die zuvor definierten 14 Reste innerhalb der AT6-Region sollten mittels Sättigungsmutagenese ausgetauscht werden. Hierbei handelt es sich um eine Technik, die sich großer Beliebtheit in der gerichteten Evolution von biokatalytisch genutzten Enzymen erfreut, bisher jedoch nicht erfolgreich auf komplexe Multienzymsysteme wie PKS übertragen wurde.

Eine große Herausforderung im Bezug auf die molekularbiologische Herangehensweise musste jedoch im Vorfeld überwunden werden. Die Assemblierung zweier Fragmente mittels PCR, wie sie für die Sättigungsmutagenese eingesetzt wird, ist zwar eine gut etablierte Technik, stößt aber ab ca. 5 kb an ihre Grenzen. Das ca. 10 kb große DEBS3 codierende Gen, *eryAIII*, weist innerhalb seiner Gensequenz keine Restriktionsschnittstellen (die Einzel- oder Doppelschnittstellen erzeugen) auf, die eine partielle Handhabung des Gens ermöglichen. Daher musste im ersten Schritt ein Vektor erzeugt werden, der es ermöglicht, spezifisch den AT6-codierenden Bereich auszutauschen und im Anschluss daran keinerlei sonstigen Unterschied zu *eryAIII* aufweist. So muss die eigentliche Mutagenese mittels PCR nur über diesen Bereich von ca. 1,7 kb durchgeführt werden, was die Handhabung drastisch vereinfacht.

Der integrative Vektor pKSSU96 (basierend auf pKSSU89) wurde mittels homologer Rekombination ( $\lambda$ -Red-System) erzeugt, wobei die zuvor definierte AT6 Region gegen eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Zusätzlich wurde flankierend zu dieser Region, an beiden Seiten eine *SwaI* Schnittstelle eingefügt (ohne die *Codon Usage* der umgebenden *eryAIII* Region zu verändern). So konnte die Resistenzkassette mittels der Restriktionsendonuklease *SwaI* entfernt werden und der aus *eryAIII* amplifizierte, potentiell mutierte Bereich mittels SLIC-MIX in den Vektor pKSSU96 kloniert werden. Dieses resultierte in dem wiederhergestellten Vektor pKSSU89. Analog sollten so die Produkte der Sättigungsmutagenese kloniert werden, was einen schnellen Zugang zur Bibliothek der 266 Expressionkonstrukte ermöglichen sollte.

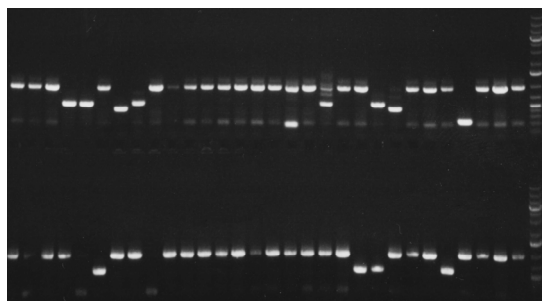
Im 96-well Plattenformat wurden die Produkte M1 (C-Terminus) und M2 (N-Terminus der AT-Domäne, vgl. Abbildung 43) unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide mittels PCR amplifiziert. In allen Fällen konnten die zwei zusammengehörigen Produkte nebenproduktfrei amplifiziert werden. Dieses erleichterte die nachfolgenden Arbeitsschritte, da die PCR Produkte M1 und M2 nach

einem *DpnI* Verdau nur noch unter Verwendung von Sure Clean® gefällt werden und die DNA nach Trocknung in doppelt deionisiertem Wasser gelöst werden musste. Die Fragmente wurden dann zur Assemblierung in eine zweite PCR eingesetzt.



**Abbildung 43: Sättigungsmutagenese mittels *overlap-extension* PCR.** Links: Gelelektrophorese der einzelnen PCR. Sichtbar sind neben dem 1 kb plus Marker (Fermentas) in Tasche 1 und 4 die Produkte der ersten PCR (M2 und M1) sowie das Produkt der *overlap-extension* PCR (Templat-DNA hierfür sind M1 und M2). Rechts: schematisch dargestellter Arbeitsablauf.

Die Assemblierung verlief nicht immer nebenproduktfrei (oft wurden die Edukte M1 und M2 ebenfalls in der Gelelektrophorese sichtbar). Aus diesem Grund wurde das PCR-Produkt grundsätzlich gelgereinigt bevor die DNA für die Klonierung in den mittels *Swal* geschnittenen *Shuttle*-Vektor pKSSU96 eingesetzt wurde. Das gut etablierte SLIC-MIX Protokoll lieferte hier zuverlässig AT6 Mutanten, sodass für die Kolonie-PCR routinemäßig lediglich zwei Klone pro gewünschter Mutante eingesetzt wurden (Abbildung 44).



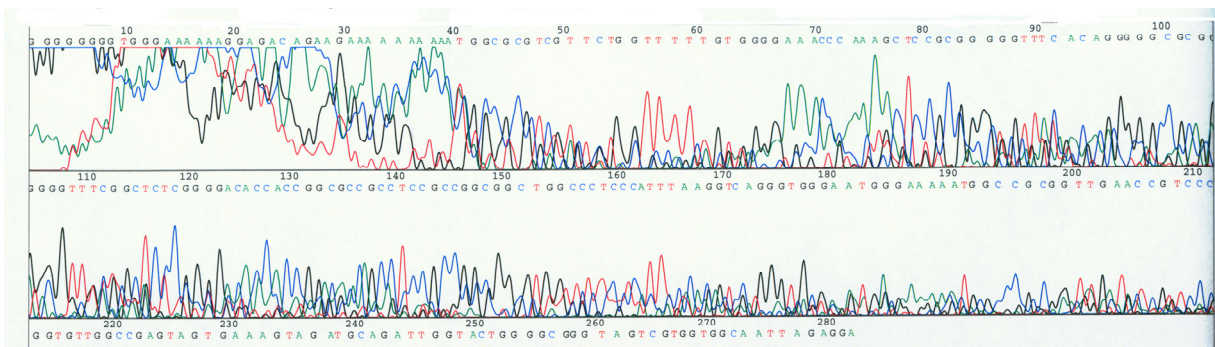
**Abbildung 44: Kolonie-PCR zur Identifizierung potentiell richtiger (Insert-tragender) Klone.** Die hohe Effizienz dieser Klonierungsstrategie wird in der Anzahl der 1 kb großen PCR Produkte der jeweiligen Klone deutlich (2 PCR pro Mutante).

Weitergehend wurden potentiell richtige Klone mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.



### 3.4.2.4 Generierung der AT6 Varianten in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>

Da es sich bei *S. erythraea* um ein Gram positives Bakterium handelt, ist es nicht problemlos möglich, heterologe Plasmid-DNA mittels Transformation in die Zelle einzubringen. Standardmäßig wird beim Gentransfer in Actinomyceten die Konjugation angewandt, eine Technik die nach Anpassung des verwendeten Protokolls auf den Wirt zwar zeitaufwändig ist, jedoch in einer Vielzahl von Transkonjuganten resultiert. Da *S. erythraea* weder methylierte noch freie DNA innerhalb der Zelle akzeptiert (beides würde abgebaut werden), ist es dringend erforderlich diesen Aspekt zu beachten. Zum einen ist es notwendig, einen methylierungsnegativen Donorstamm zu verwenden, wodurch die durch den F-Faktor übermittelte DNA ohne Methylierung vorliegt und somit vom Akzeptorstamm nicht als heterolog erkannt werden kann. Weitergehend ist es notwendig, die DNA mittels homologer Rekombination oder integrativen Vektoren in das Genom von *S. erythraea* einzubringen. Der große Vorteil bei der Verwendung integrativer Vektoren (basieren auf Phagen-Integrasen, die an spezifischen Positionen innerhalb des Genoms integrieren) ist die enorme Zeitersparnis (oftmals vergehen bei der homologen Rekombination Monate bis zum Erfolg). Nach rund sieben Tagen (abhängig vom Akzeptorstamm und gewähltem Medium) können einzelne Transkonjuganten identifiziert werden. Nachteil dieser Methode ist jedoch die vergleichsweise geringe Stabilität der Integration<sup>[75]</sup>, was einen konsequenten Selektionsdruck (basierend auf Antibiotikaresistenz) erfordert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass selbst Lagerung bei -80°C deutlich mit Instabilität einhergeht. Mittels stichprobenartiger Sequenzierungen einzelner Genbereiche (ausgehend von isolierter genomischer DNA) deuteten die Sequizierergebnisse auf Mischkulturen hin (s. Abbildung 45).



**Abbildung 45: Sequenzierung (Ausschnitt) einer bei -80°C gelagerten *S. erythraea* DEB3 Variante.** Deutlich ist die Sequenzierung unterschiedlicher DNA Sequenz sichtbar, was auf die Bildung auf Mischkultur und den damit verbundene partielle Veränderung des Stammes hinweist.

Wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kulturen vor der DNA-Isolation auf Antibiotika-beinhaltenden Agarplatten (erneuter Selektionsdruck) ausgestrichen, konnte dieses Problem umgangen werden. Jedoch bleibt fraglich, wie lange eine Lagerung dieser Mutanten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  überhaupt möglich ist. Abhilfe könnte eine Gefriertrocknung der jeweiligen Kulturlösung vor der Lagerung schaffen. Alternativ könnten Transkonjuganten frisch vor ihrer Verwendung generiert werden.

Als besonderen Faktor in der Protokolloptimierung ist die Wahl eines geeigneten Mediums hervorzuheben. Es stellte sich heraus, dass bei Verwendung von SY-Agar (versetzt mit Thiamin, Magnesium-, und Eisensulfat) die Generierung und das Wachstum der Transkonjuganten zwar langsamer ablief (bis zu 10 Tage), die Anzahl der falsch positiven Klone jedoch gegen null ging (im Gegensatz zu ABB13-, GYM-, MS- oder ISP3-Agar). Weitergehend wurde im ersten Teil der Arbeit ein stets frisch kultivierter Akzeptorstamm in der log-Wachstumsphase eingesetzt. Eine Lagerung dieser Zellsuspension (1:1 verdünnt mit 2 M Sorbitol) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und spätere Verwendung führte zu keinerlei signifikantem Absinken der Konjugationseffizienz. Dieses resultierte vor allem bei kleineren Anzahlen von Konjugationen in Zeitersparnis und ermöglichte ebenfalls spontane Konjugationen (z.B. Wiederholungen, solange die entsprechenden *E.coli* ET12567/pUZ8002 Zellen vorlagen). Im Gegensatz hierzu war eine Lagerung der transformierten *E. coli* ET12567/pUZ8002 Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  nicht möglich. Eine längere Lagerung dieser Zellen auf Antibiotika beihaltenden LB-Agarplatten ging mit einem deutlichen Verlust der Konjugationseffizienz einher. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden *E. coli* Zellen vor ihrer Verwendung maximal für drei weitere Tage (nach Inkubation bei 30 oder  $37^{\circ}\text{C}$ ) bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.4.2.5 Fermentation & Analyse: Expression der einzelnen DEBS3 Varianten**

Die nachfolgend beschriebenen Fermentationen wurden stets mit frisch generierten Transkonjuganten oder erst nach erneutem Ausüben von Selektionsdruck (bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte Kultur wurde vor Verwendung auf entsprechenden Antibiotika beinhaltenden Agarplatten angezüchtet) kultiviert.

Das 24-well System Duetz ermöglicht konstante Fermentationsbedingungen über alle Löcher der Platte durch gleichmäßige Belüftung.<sup>[128]</sup> Ein Kulturvolumen von 3 ml SM3 Medium lieferte bei einer Fermentationsdauer von 5 Tagen, 180 rpm bei 5 cm Schüttler-Auslenkung sowie  $30^{\circ}\text{C}$  das höchste Erythromycin-Produktionsniveau

(basierend auf dem Wildtyp NRRL-B-24071). Alle nachfolgenden Fermentationen wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

Jeweils vier Klone einer DEBS3 Variante wurden parallel fermentiert, als Kontrolle dienten sowohl der Wildtyp (NRRL-B-24071) als auch der wiederhergestellte Wildtyp (*S. erythraea* $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup>\_pKSSU89). Die Extraktion der Fermentationskultur erfolgte im 15 ml Reaktionsgefäß, wozu die 3 ml Kulturlösung überführt wurden und jeweils mit 2 Volumina Ethylacetat über Nacht bei 19 °C im Schüttler (200 rpm) waagrecht kreisten. Die nach Verdampfung des Ethylacetats in Methanol gelösten Extrakte wurden dann mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Um statistisch signifikante Ergebnisse über den Einfluss der einzelnen Reste auf die Erythromycin-Produktion zu erhalten, wurde in den Ergebnisse der vier Klone jeder Variante nach Ausreißern gesucht und der Mittelwert der Varianten auf die Fermentationsergebnisse des Wildtyps bezogen (s. Tabelle 9).

**Tabelle 9: Einfluss der einzelnen 14 Reste innerhalb DEBS3 auf die Erythromycin-Produktion.** Alle Werte (in %) beziehen sich auf den parallel fermentierten Wildtyp. n.d. = not determined, nicht bestimmt.

		Pro94	Gly95	Glu154	Pro157	Ser174	Val193	Ile194	Glu198	Asn262	Ser263	Tyr297	Ser299	Arg336	Asp337
unpolar / hydrophob	Ala	28.32	3.69	12.18	12.01	0	23.07	1.33	25	4.82	0	3.52	25	45.21	37.92
	Val	19.41	43.96	49.75	0.1	38.52		1.74	1.53	10.84	47.23	8.68	42.84	12.3	8.33
	Met	34.77	45.02	20.65	0	0	10.99	30.33	5.38	7.22	38.82	0	0	0	n.d.
	Leu	45.41	0	10.95	5.01	6.54	9.03	8.41	27.83	0.12	0.28	14.61	0	0	51.5
	Ile	38.87	22.27	1.53	14.3	48.26	20.03		0	3.74	21.86	4.93	28.19	49.26	n.d.
	Pro		0	16.22		13.72	35.96	0.26	28.39	5.9	20.72	8.21	45.18	4.62	15.74
	Trp	0.06	22.01	0	0	30.99	30.57	0.03	1.2	8	0.01	47.67	0	0	20.5
	Phe	1.47	7.82	0.05	41.49	24.56	0	30.06	0	2.4	25.92	16.08	64.68	26.33	2.94
basisch	Lys	12.5	0	49.89	46.07	0.06	10.52	0.02	4.28	1.69	33.05	0	50.91	2.6	n.d.
	Arg	0.01	0	34.73	37.68	16.68	25.32	7.84	24.3	10.81	0	1.21	0		0.01
	His	6.02	0	26.2	8.85	0	2.58	18.95	1.35	2.08	35.99	17.05	0	0.04	0
polar / neutral	Tyr	0	0	50.74	22.35	19.68	0.24	0.02	0	3.18	13.58		0	38.01	41.25
	Thr	0.01	46.46	17.86	0	32.64	11.04	53.72	10.33	12.91	25.86	2.13	0	0	0
	Gln	20.05	41.1	34.64	23.94	25.53	42.15	0		0	0	0	12.91	29.86	0
	Gly	23		35.13	43.33	22.94	7.63	0	43.52	49.53	6.2	0	0.04	24.4	0.68
	Ser	0	6.58	48.42	49.97		0	18.62	25	0		0		0	16.59
	Cys	27.3	31.65	48.43	0.05	0	44.39	9.07	0.08	46.8	40.2	6.49	0	25.43	0.01
	Asn	0.04	13.04	6.48	39.16	40.58	23.84	0.01	0		27.24	0.03	28.82	20.21	n.d.
sauer	Glu	17.3	31.77		18.49	43.84	39.36	3.06	0.39	1.1	23.98	3.38	18.55	33.51	20.51
	Asp	23	15.43	0	14.88	0.03	13.16	24.15	1.9	3.07		0.97	1.51	0	

An Position Asp337 konnten in drei Fällen keine Einflüsse der jeweiligen Reste auf die Erythromycin-Produktion bestimmt werden, da es nicht gelang die jeweilige Variante zu erzeugen.

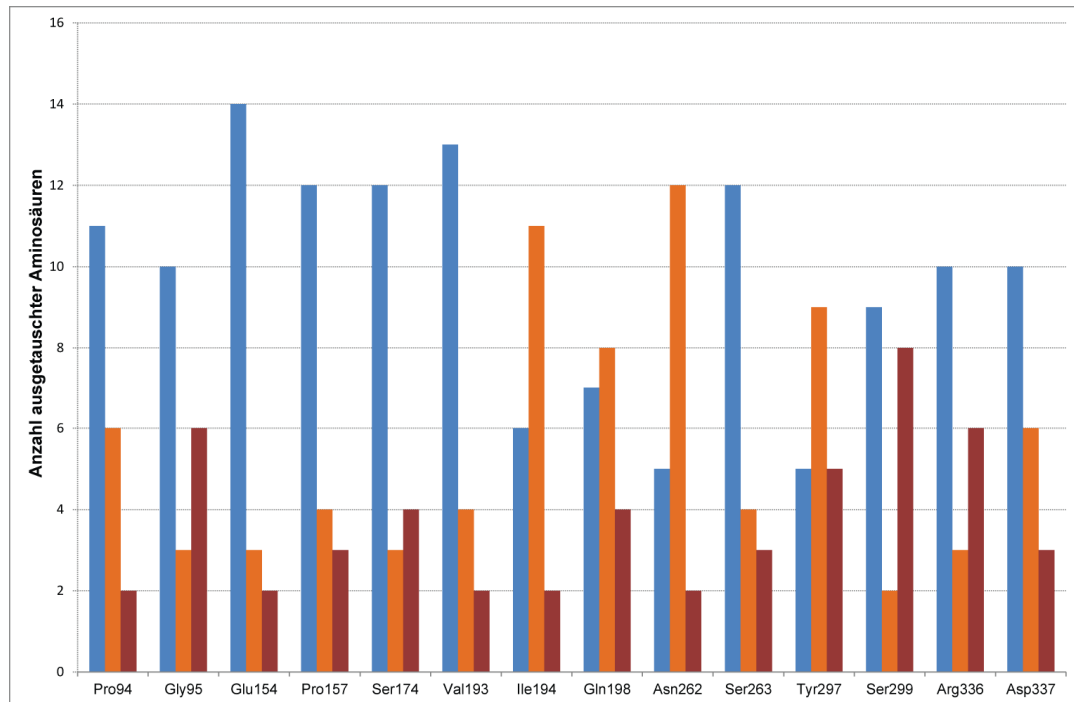
### Interpretation der Ergebnisse

Nachfolgend wurde das Produktionsniveau der jeweiligen Varianten (% , bezogen auf die Wildtypaktivität) mit den Ergebnissen der 60 Fermentationen des wiederhergestellten Wildtypes (s. 3.4.2.2) bezogen. Dabei wurde der Einfluss einzelner Reste auf das Erythromycin-Produktionsniveau wie folgt zugeordnet wurden:

Wildtypaktivität [%]	Effekt des Aminosäureaustausches	
< 10	Negativ	Neg.
10 - 50	Neutral	0

**Tabelle 10: Effekt des Aminosäureaustausches innerhalb von DEBS3 auf die Erythromycin-Produktion.** Wobei 0 einem neutralen Effekt entspricht, Neg. einem negativen, rot hinterlegte einen totalen Verlust der Fähigkeit Erythromycin zu produzieren aufweisen. n.d. = not determined, nicht bestimmt.

		Pro94	Gly95	Glu154	Pro157	Ser174	Val193	Ile194	Glu198	Asn262	Ser263	Tyr297	Ser299	Arg336	Asp337
unpolar / hydrophob	Ala	0	Neg.	0	0	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	Neg.	Neg.	0	0	0
	Val	0	0	0	Neg.	0		Neg.	Neg.	0	0	Neg.	0	0	Neg.
	Met	0	0	0	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	Neg.	n.d.
	Leu	0	Neg.	0	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	0
	Ile	0	Neg.	Neg.	0	0	0		Neg.	Neg.	0	Neg.	0	0	n.d.
	Pro		Neg.	0		0	0	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	0
	Trp	Neg.	0	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	0
	Phe	Neg.	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	0	Neg.	Neg.	0	0	0	0	Neg.
basisch	Lys	0	Neg.	0	0	Neg.	0	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.	0	Neg.	n.d.
	Arg	Neg.	Neg.	0	0	0	0	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	Neg.		Neg.
	His	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	Neg.
polar / neutral	Tyr	Neg.	Neg.	0	0	0	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	0		Neg.	0	0
	Thr	Neg.	0	0	Neg.	0	0	0	0	0	0	2.13	Neg.	Neg.	Neg.
	Gln	0	0	0	Neg.	0	0	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	0	0	Neg.
	Gly	0		0	0	0	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.
	Ser	Neg.	Neg.	0	0		Neg.	18.62	0	Neg.		Neg.		Neg.	0
	Cys	0	0	0	Neg.	Neg.	0	Neg.	Neg.	0	0	Neg.	Neg.	0	Neg.
Asn	Neg.	0	Neg.	0	0	0	Neg.	Neg.		0	Neg.	0	0	n.d.	
sauer	Glu	0	0		0	0	0	Neg.	Neg.	Neg.	0	Neg.	0	0	0
	Asp	0	0	Neg.	0	Neg.	0	0	Neg.	Neg.		Neg.	Neg.	Neg.	



**Abbildung 46: Verteilung der verbleibenden Aktivität der Erythromycin PKS nach Sättigungsmutagenese der 14 ausgewählten Positionen.** Blau: Anzahl der Mutationen ohne signifikanten Einfluss auf das Produktionsniveau (10 – 50 % Wt Aktivität), Orange: Mutationen mit negativen Effekt auf die Aktivität (< 10 %), Rot: Mutanten mit Funktionsverlust bei denen keiner der vier unabhängigen Klone Erythromycinproduktion aufwies.

Es scheint, als könnten die 14 untersuchten Aminosäuren in zwei Gruppen eingeteilt werden (vgl. Abbildung 46). Der Austausch der Aminosäuren Pro94, Gly95, Glu154, Pro157, Ser174, Val193, Ser263 und Arg336 gegen eine Vielzahl der anderen Reste ( $\geq 10$ ) hat keinen signifikanten Effekt, wohin gegen nur sehr wenige Aminosäuren in einem absoluten Aktivitätsverlust resultieren. Höchstwahrscheinlich ist die Aminosäure Asp337 ebenfalls dieser Gruppe zuzuordnen, jedoch konnte der Einfluss dreier Austausche nicht bestimmt werden. Basierend auf der Lokalisation der einzelnen Reste, fern ab vom aktiven Zentrum scheinen diese Aminosäuren keinen auf die katalytische Aktivität sowie die Substratspezifität der AT-Domäne zu haben. Dieses steht unter anderem in Einklang mit den bereits erwähnten Arbeiten von Romas J. Kazlauskas.<sup>[129]</sup> Möglicherweise tragen diese Reste zur Struktur des Protein bei. Ob die wenigen resultierenden Nullmutanten jedoch auf Grund von einer Fehlfaltung oder durch einen *remote effect* auf die katalytische Aktivität einen kompletten Aktivitätsverlust aufweisen bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Die Integration einer *trans*-agierenden Acyltransferase in das Genom dieser Nullmutanten könnte zur Klärung der Frage in jedem Einzelfall beitragen. Basiert der komplette Aktivitätsverlust auf einer Fehlfaltung der Acyltransferase, was wiederum

eine Fehlfaltung von DEBS3 impliziert, könnte die zusätzliche *trans*-agierende Acyltransferase die Biosynthese von Erythromycin nicht komplementieren. Die entsprechende Variante wäre weiterhin inaktiv. Anders würde es bei einem *remote effect* auf die katalytische Aktivität aussehen. Hier könnte die *trans*-agierende Acyltransferase die AT6-Nullmutante komplementieren, wodurch die Biosynthese von Erythromycin wieder möglich ist.

Im Gegensatz hierzu weisen die Positionen 194, 198, 262, 297 und 299 eine geringe Toleranz für Mutationen auf (vgl. Abbildung 46). Diese Reste haben daher entweder einen katalytischen Effekt oder essentiell strukturgebende Funktionen, was mit der Lokalisierung der einzelnen Reste innerhalb des aktiven Zentrums korreliert. Hervorzuheben sind die Mutation der Positionen 194, 262 und 297 bei denen nur  $\leq 6$  Aminosäureaustausche keinen zerstörenden Effekt auf die Erythromycin-Produktion haben. An diesen Positionen resultieren die Austausche hauptsächlich in einer reduzierten Enzymaktivität. Eine besondere Rolle scheint die Aminosäure Ser299 einzunehmen. Hier resultieren acht Austausche in einer Nullmutante und zwei weitere in einer drastisch reduzierten Enzymaktivität. Möglicherweise wird speziell durch die Mutation dieser Aminosäure die Struktur der Bindetasche verändert, so dass entweder Substratbildung oder die katalytische Umsetzung des Substrats nicht mehr oder nur noch deutlich ineffizienter ablaufen können.

Jedoch können in beiden Gruppen die Ergebnisse nur unzureichend interpretiert werden. Es scheinen keine Trends basierend auf strukturellen oder funktionellen Eigenschaften der mutierten Aminosäuren identifiziert werden zu können. Oftmals sind es nur wenige Mitglieder einer Aminosäurenklasse, die andere Effekte aufweisen, jedoch ohne offenkundige Systematik. Insgesamt scheint eine sehr hohe Spezifität vorzuliegen, auf die die einzelnen Mutationen bedeutend Einfluss nehmen. Zum Beispiel ist das Motiv YAYH, eine dem YASH Motiv sehr ähnliche Sequenz, nahezu vollständig inaktiv, wobei die minimale Restenzymaktivität für die Bildung von Wildtypprodukt sorgte. Die Mutation zu YAVH beeinträchtigt die Enzymaktivität nicht, wohingegen YAFH zu einer partiellen Änderung der Substratspezifität führt, was den Einbau von Malonyl-CoA und die Bildung von 2-Desmethylerythromycin A (5) ermöglicht. Weitergehend führte der Austausch von Gln198 mit den basischen Aminosäuren Arginin und Histidin zu keiner signifikanten Änderung der Enzymaktivität. Die dritte basische Aminosäure (Gln198Lys) resultierte jedoch in einer nahezu komplett ausgeschalteten Enzymaktivität.

Offen bleibt jedoch die Erklärung der experimentellen Ergebnisse. Warum führt beispielsweise der Austausch von YASH zu YAFH partiell zur Bildung von 2-Desmethylerythromycin A wohin gegen der Austausch zu YAVH keinen signifikanten Einfluss hat und YATH zu einem gänzlichen Aktivitätsverlust führt? Diesen Fragen sollen im weiteren Verlauf der Arbeit durch die Generierung und Betrachtung eines substratgebundenen AT6 Modells Antworten folgen (s. hierzu Kapitel 88).

### Detektion erhöhter Substratpromiskuität

Die Enzympromiskuität widerspricht veralteter Textbuchannahmen und definiert Enzymaktivitäten die sich von denen unterscheiden, für die das Enzym evolviert ist.<sup>[130,131,132]</sup> Neben der katalytischen Promiskuität von Enzymen ist die Substratpromiskuität ein oft beobachtetes Phänomen. Als prominente in der Natur vorkommende Beispiele in Bezug auf die Polyketidbiosynthese sind hier zum einen die AT5-Domäne des Monensin Genclusters, die sowohl Methyl- als auch Ethylmalonyl-CoA als Substrat akzeptiert und überträgt<sup>[133]</sup>, als auch die AT3-Domäne des Epothilon Genclusters, die sowohl Malonyl- als auch Methylmalonyl-CoA akzeptiert,<sup>[94]</sup> zu nennen. Die Induktion solcher Promiskuität kann künstlich durch Mutagenese erzeugt werden. In der Literatur gibt es hierzu eine Vielzahl von Beispielen. In wenigen Beispielen konnte aufgezeigt werden, dass ein einzelner Aminosäureaustausch ausreicht um die Substratspezifität eines Enzymes zu verändern. Prominentes Beispiel ist hier der Aminosäureaustausch von His98Phe innerhalb einer Tyrosin Ammoniak Lyase, wodurch die Substratspezifität von Tyrosin zu Phenylalanin wechselt.<sup>[132]</sup>

Im Bezug auf die Acyltransferasen von PKS sind hier Aminosäureaustausche innerhalb genau definierter Motive zu nennen, die in relaxierten Substratspezifitäten resultierten. So konnte aufgezeigt werden, dass die Generierung des Hybrids HASH (aus den substratspezifischen Motiven YASH: Methylmalonyl-CoA und HAFH: Malonyl-CoA) in einer partiellen Bildung der Desmethylvariante des Produktes resultiert.<sup>[94,101,118]</sup> Ferner konnte durch den Aminosäurenwechsel Gln198Leu innerhalb der DEBS AT4-Domäne durch heterologe Expression des mutierten Genclusters in *S. lividans* Zugang zum 6-Desmethyl-6-dEB geschaffen werden.<sup>[101]</sup> Ein möglicher Einbau des, nativ in ausreichenden Mengen vorkommenden, Malonyl-CoA durch die AT6-Enzymvarianten wäre ein Hinweis auf eine durch die Mutation

induzierte veränderte Substratpromiskuität. Daher wurden alle Fermentationsextrakte auf die Bildung von 2-Desmethylethromycin A (**5**) untersucht.

Durch die Generierung des HASH und des YAFH Motives sind Hybridmotive erzeugt worden, die eine veränderte Substratspezifität der entsprechenden Enzymvarianten erwarten lassen. Darüber hinaus könnten ebenfalls weitere der 266 Enzymvarianten einen Einbau von Malonyl-CoA ermöglichen.

Bei drei der 266 Enzymvarianten konnte mittels HPLC/ESI-MS Analyse ein signifikantes Signal identifiziert werden, welches das für 2-Desmethylethromycin A (**5**) erwartete Masse-zu-Ladungsverhältniss von 720 aufweist. Bei zwei dieser Enzymvarianten handelt es sich wie vorausgesagt um die Hybride der substratspezifischen Motive YASH und HAFH. Die dritte produktbildende Enzymvariante basiert auf dem Austausch von Gln198 gegen Leucin. In den nachfolgend abgebildeten HPLC Chromatogrammen (s. Abbildung 47 und Abbildung 48) wird jedoch ein deutlicher Unterschied in den Produktionsniveaus der einzelnen Varianten sichtbar. Ist das intensivste Signal des Fermentationsextraktes von YAFH und HASH das des Erythromycins ( $m/z = 734$ ;  $R_t = 6,86$  bzw.  $6,83$  min s. Abbildung 47) finden sich im Extrakt von Gln198Leu eine Vielzahl von konkurrierenden Signalen (mit  $m/z < 400$ ) neben dem Erythromycin-Signal ( $m/z = 734$ ;  $R_t = 6,87$  min, s. Abbildung 48). Darüber hinaus weisen die Chromatogramme der analysierten Varianten YAFH und HASH ein weiteres signifikantes Signal auf ( $R_t = 6,58$  bzw.  $6,64$  min). Dieses ist verglichen mit dem Erythromycin-Signal ca. eine Größenordnung weniger intensiv, beinhaltet aber das gesuchte Masse-zu-Ladungsverhältniss von 720. Der Austausch von Gln198Leu hingegen führt ebenfalls zu einem Signal, das das gesuchte Masse-zu-Ladungsverhältnis von 720 beinhaltet, jedoch ist die Intensität mit ca. 2,5 Größenordnungen unterhalb des Erythromycin-Signal deutlich geringer als bei den anderen zwei Varianten (vgl. Abbildung 48).

Um die Bildung von 2-Desmethylethromycin A (**5**) bestätigen und eine Verwechslung mit Erythromycin C ausschließen zu können, wurde das neue Signal ( $m/z = 720$ ), der einzelnen Fermentationsextrakte weitergehend mittels HPLC/ESI-MS/MS analysiert.



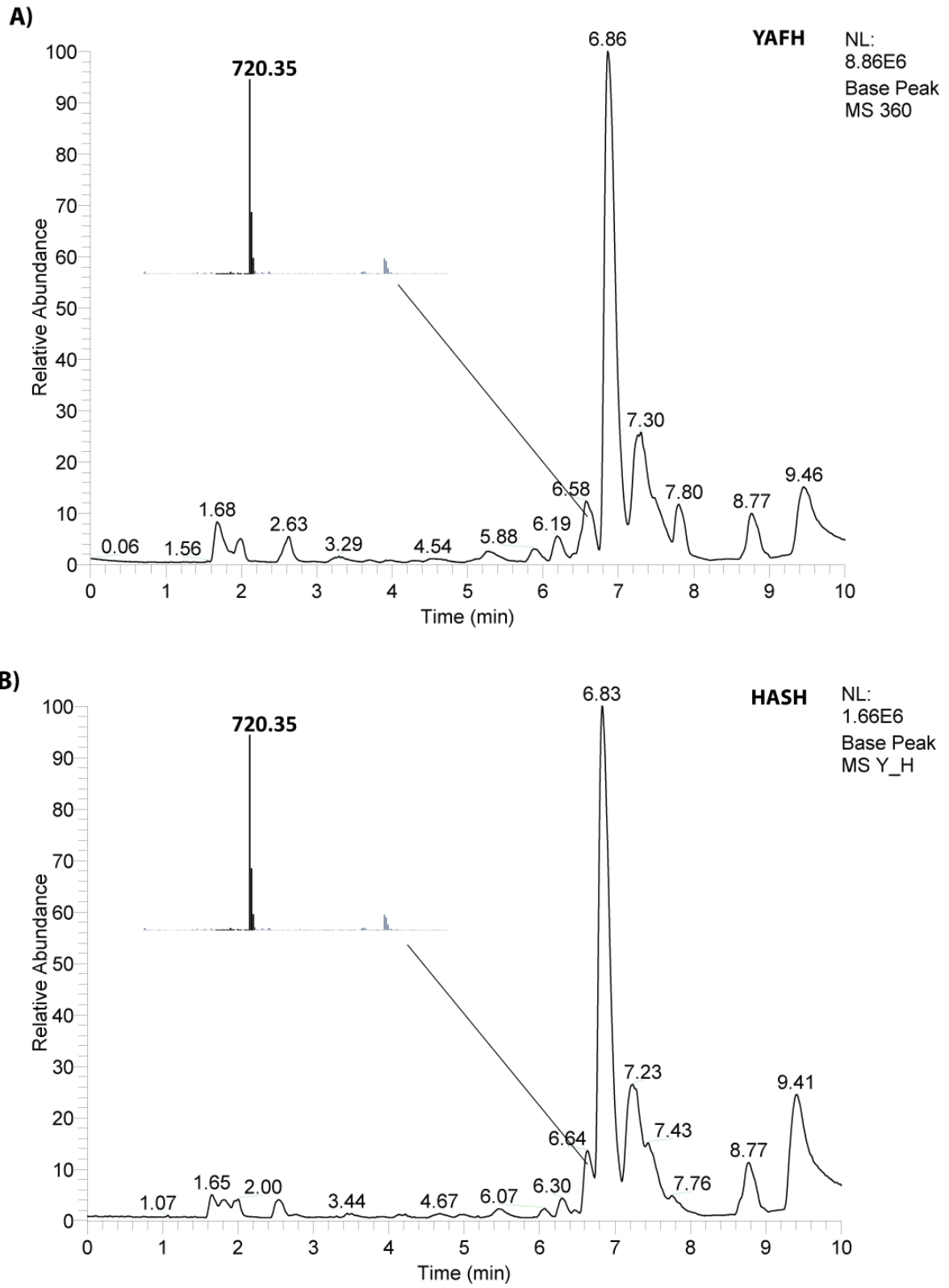
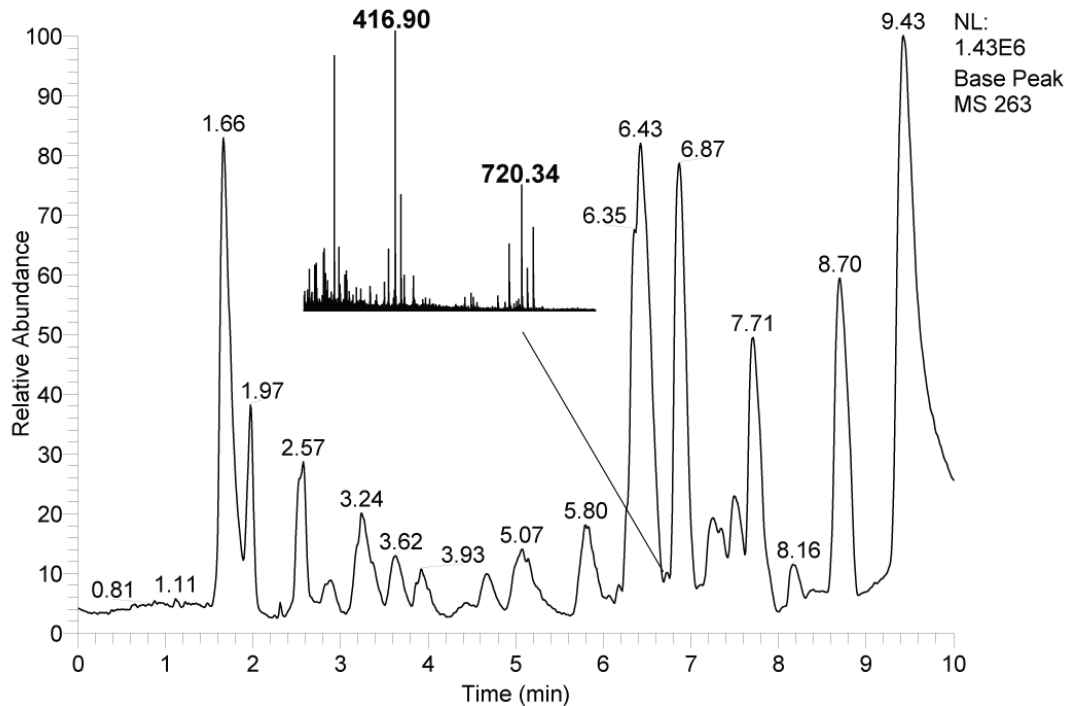
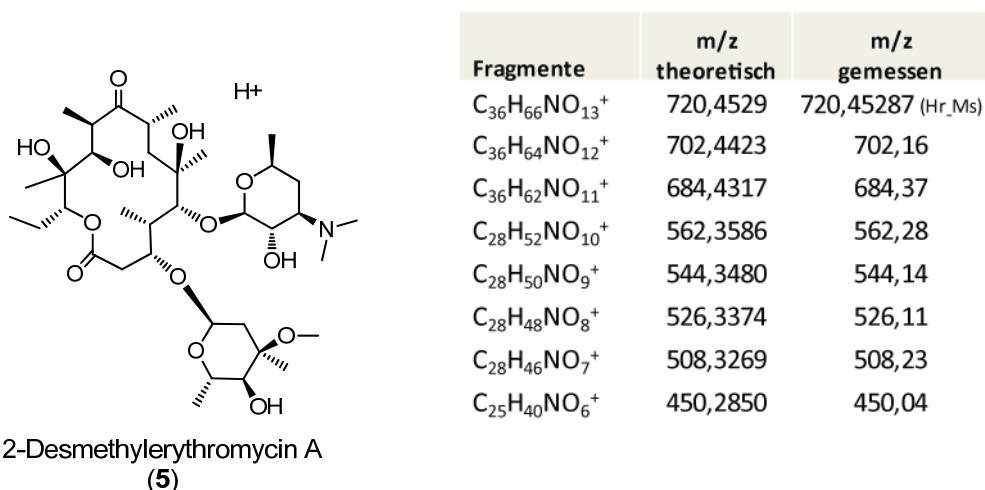


Abbildung 47: HPLC/ESI-MS Analyse der zwei DEBS Varianten YAFH (A) und HASH (B).



**Abbildung 48: Chromatogramm Enzymvariante Gln198Leu.**

Im Gegensatz zu Erythromycin A ist das C4 des Erythromycin C durch Mycarose glykosiliert. Das Fragmentierungsmuster beider Substanzen unterscheidet sich demnach deutlich. Die Fragmentierung entspricht in allen drei Fällen, dem für das 2-Desmethylethromycin (**5**) erwarteten Muster (Abbildung 49, Abbildung 50). Darüberhinaus wurde die exakte Masse und die Summenformel mittels HR-MS bestimmt.



**Abbildung 49: ESI-MS/MS-Fragmentierungsmuster.** Links Struktur von 2-Desmethylethromycin A; Rechts Bestimmung der einzelnen Fragmente mittels MS/MS sowie der exakten Masse mittels HR-MS zur Verifizierung.

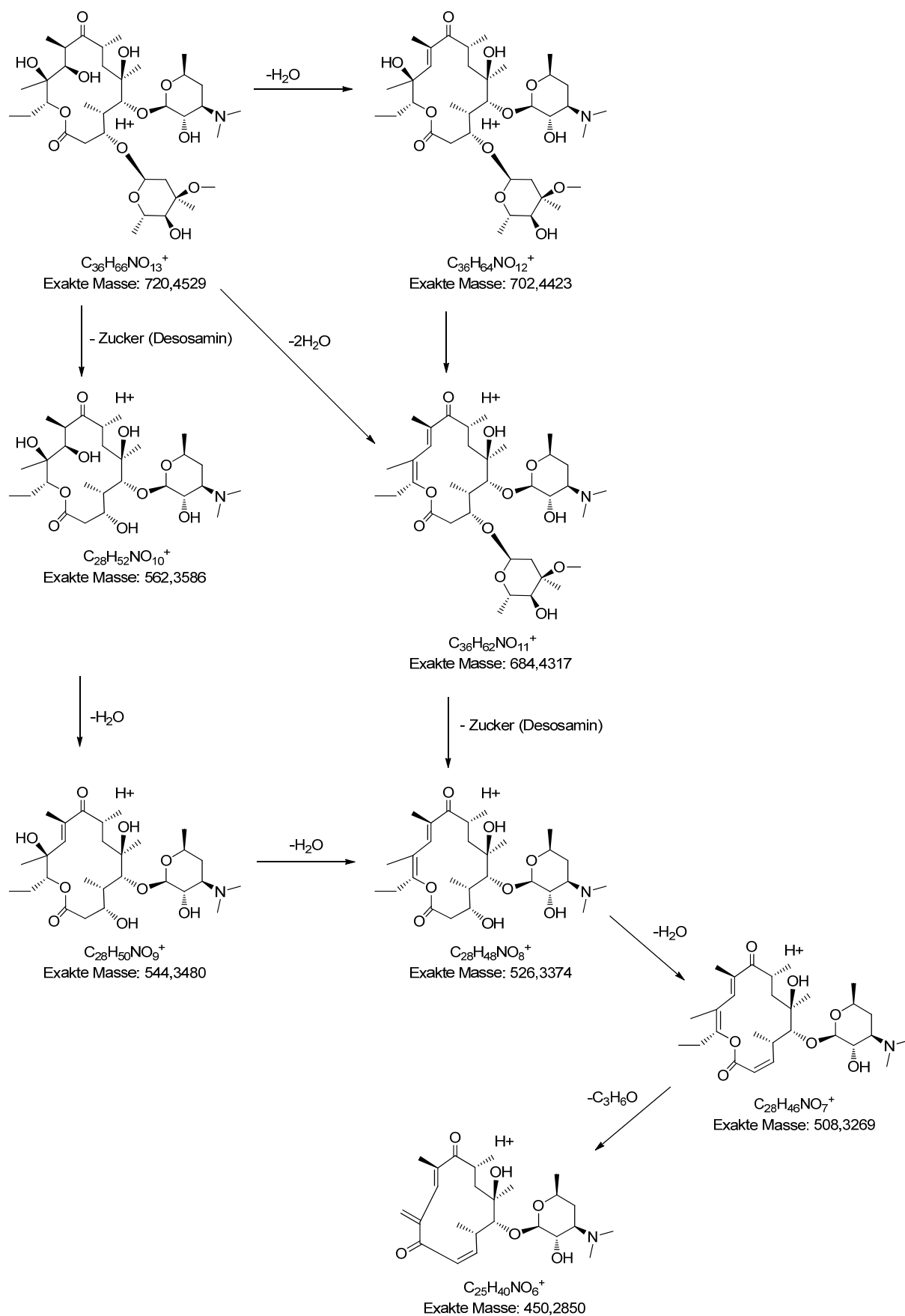


Abbildung 50: Fragmentierung von 2-Desmethylerythromycin A (5) in Analogie zu Erythromycin<sup>[134]</sup>.

In diesem Experiment wurde zum ersten Mal die Substratspezifität partiell durch zielgerichtete Mutagenese innerhalb des Originalproduzenten (inklusive aller post-PKS Prozessierungen) verschoben, was in drei Enzymvarianten zur signifikanten Bildung von 2-Desmethylethromycin A (5) neben Erythromycin führte. Interessanterweise führen nur exakt diese drei Varianten (der 266 Enzymvarianten) zur partiellen Synthese von 2-Desmethylethromycin A neben Erythromycin, was zeigt, wie subtil der Mechanismus der Substraterkennung in AT-Domänen reguliert ist. Bei diesen Enzymen führen offenbar nur wenige Wege nach Rom.

### **Einfluss des Motiv-Austausch YASH → HAFH**

Die einzige in dieser Arbeit erzeugte Doppelmutante YASH → HAFH (Motiv-Austausch innerhalb des aktiven Zentrums) resultierte in einer drastisch reduzierten Enzymaktivität. Etwa die Hälfte der analysierten Klone (insgesamt 20) wiesen keinerlei Produktbildung (weder Erythromycin noch 2-Desmethylethromycin A) auf. Die andere Hälfte zeigte ebenfalls, wie erwartet, die Bildung beider Produkte und keinen kompletten Shift zum 2-Desmethylethromycin A jedoch bei minimalen Produktionsraten. Diese Ergebnisse gliedern sich in die Literatur ein; hier wurde mehrfach aufgezeigt, dass der simultane Austausch von mehr als einer Aminosäure innerhalb einer PKS (oder ganze Motiv-Austausche) oft mit drastisch reduzierten Produktionsniveaus in Actinomyceten einher geht.<sup>[75,79]</sup> Romas J. Kazlauskas zeigte auf, dass Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums in großen Veränderungen resultieren die einerseits die katalytische Aktivität unterbinden und zum anderen die Form der Bindetasche drastisch modifizieren können.<sup>[129]</sup> Basierend hierauf könnte der deutliche Aktivitätsverlust durch den Motivaustausch entweder durch eine reduzierte katalytischen Aktivität der AT-Domäne oder durch eine partielle Fehlfaltung der Bindetasche erklärt werden.

### **3.4.3 Theoretisch-chemische Untersuchungen zur Entwicklung eines Strukturmodells**

Um eine weitergehende systematische Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde mit der Arbeitsgruppe um Dr. Elsa Sanchez Garcia (Abteilung für Theoretische Chemie, MPI Mülheim) eine Kooperation gegründet. Die Theoretiker konstruierten ein Homologiemodell der definierten AT6 Region, in dem das natürliche Substrat Methylmalonyl-CoA in der Bindetasche gebunden ist.

Da bis heute keine Kristallstruktur für AT-Domänen mit gebundenem Substrat beschrieben wurde, war der Bindungsmodus für Methylmalonyl-CoA (MMCoA) unklar. Die mittels des I-TASSER Servers generierte Struktur (auf Basis der Proteinstruktur der AT3- und AT5-Domäne des DEBS-Clusters) wurde als Ausgangspunkt für das *docking* von (2S)-Methylmalonyl-CoA in die postulierte Bindetasche gewählt. Die so erhaltene Struktur wurde einer 30 ns *Molecular Dynamics Simulation* (MD) unterzogen. Eine Analyse der molekularen Interaktionen innerhalb des Wildtyp-AT6 Methylmalonyl-CoA Systems, zeitlich konserviert während der MD Simulation, ermöglichte es, die Qualität des Modells abzuschätzen. Für jedes System, Wildtyp und Enzymvarianten, wurden jeweils vier MD Schnappschüsse auf dem QM/MM Level optimiert. Kenny Bravo-Rodriguez, der diese Berechnungen vornahm, stellte für diese Dissertation sein mittels pymol generierten Grafiken zur Verfügung.

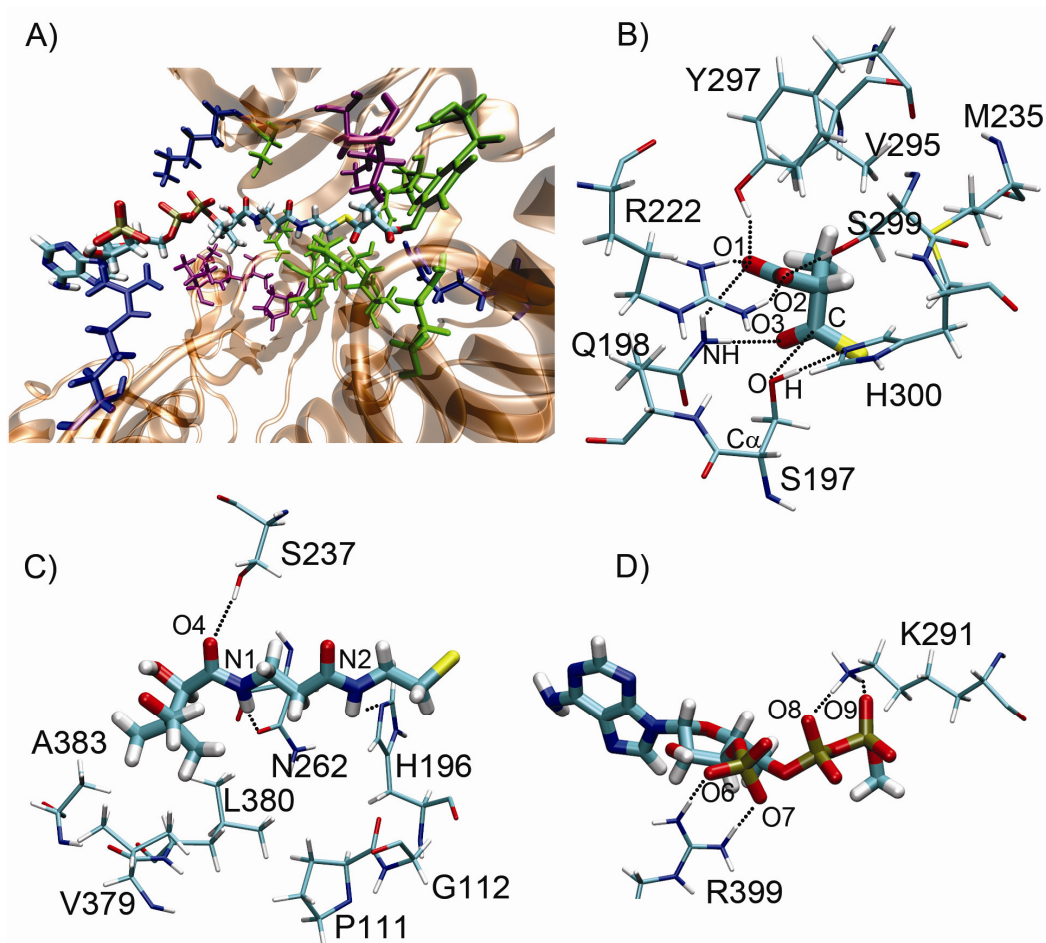
### **Beschreibung des Wildtyp-Modells mit Substrat-Interaktionen (Abbildung 51)**

Die aktive Region der Acyltransferase wird durch die Aminosäuren der Bindetasche geformt: Pro111, Gly112, Gln113, Gln169, Ser197, Arg222, Leu226, Met235, Ser237, Asn262, Lys291, Val295, His377, Pro378, Val379, Leu380, Ala383, His398 and Arg399. Zur besseren Interpretation wurden drei Interaktionsregionen definiert:

1. Thioester-Region: beinhaltet alle Atome der Carboxylgruppe von MMCoA bis zu dessen Thioestergruppe (Abbildung 51 B).
2. Isopropyl-Region: reicht vom aliphatischen Kohlenstoff, das an das Schwefelatom der Thioestergruppe gebunden ist, bis zur Isopropylgruppe (Abbildung 51 C).
3. Phosphat-Region: reicht von der Phosphatgruppe des MMCoA bis zur Adenin-Gruppe (Abbildung 51 D).

**Thioesterregion:** Die hoch konservierten Reste Arg222, Tyr297, Ser299, Gln198, Gln113 und Gln169 bilden eine polare Umgebung um die Thioesterregion von Methylmalonyl-CoA. Arg222 interagiert frontal und nicht symmetrisch mit beiden Carboxylsauerstoffatomen von MMCoA. Die einzelnen Distanzen betragen hier  $2,50 \pm 0,31 \text{ \AA}$  für  $\text{NH}_{222} \cdots \text{O1}_{\text{MMCoA}}$  und  $1,87 \pm 0,21 \text{ \AA}$  für  $\text{NH}_{222} \cdots \text{O2}_{\text{MMCoA}}$ . Zur gleichen Zeit kommt es zur Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen dem O1 und O2 des Carboxylats mit den oberhalb dieser Sauerstoffatome lokalisierten Aminosäuren Tyr297 und Ser299 ( $\text{OH}_{297} \cdots \text{O1}_{\text{MMCoA}} = 1,72 \pm 0,14 \text{ \AA}$  und  $\text{OH}_{299} \cdots \text{O2}_{\text{MMCoA}} = 1,76 \pm$

0,14 Å). Die Aminosäure Gln198 bildet über die Seitenkette Wechselwirkungen mit dem O3 des Thioesters aus ( $\text{NH}_{198} \cdots \text{O3}_{\text{MMCoA}} = 1,98 \pm 0,23 \text{ \AA}$ ). Die Distanz zwischen der Seitenkette von Gln198 und dem O1 der Thioestergruppe beträgt  $3,36 \pm 0,34 \text{ \AA}$ , was ebenfalls zur Unterdrückung der Rotationsfreiheit der Carboxylatgruppe des MMCoA beiträgt. Hierdurch wird MMCoA in einer Konformation gehalten, die einen nukleophilen Angriff von Ser 197 ermöglicht. Die Distanz zwischen dem nukleophilen Sauerstoffatom von Ser197 (O) und dem elektrophilen Kohlenstoffatom von MMCoA (C) deuten auf die Bildung eines Reaktandenkomplexes (*prereactive complex*) hin. Weitergehend interagiert das Hydroxyl-Wasserstoffatom des Ser197 mit dem nicht protonierten Stickstoffatom des His300, was die in der Literatur mehrfach postulierte Rolle von His300 in der Ser197-Aktivierung untermauert.

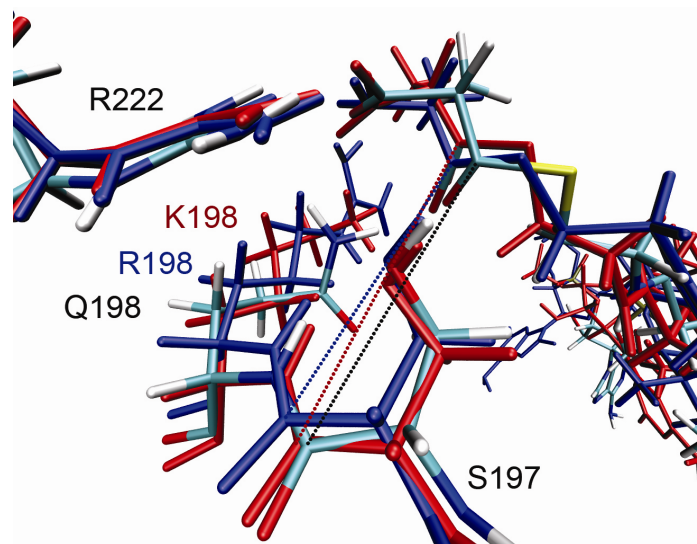


**Abbildung 51: Molekulare Interaktionen zwischen Methylmalonyl-CoA und der Bindetasche der AT6-Domäne.** **A** Reste der Bindetasche, die mit Methylmalonyl-CoA interagieren, sind entsprechend ihrer Polarität dargestellt, grün: polar, magenta: nicht polar und blau: basisch **B** Interaktionen der Thioester-Region **C** Interaktionen in der Isopropyl-Region und **D** Interaktionen der Phosphat-Region.

Isopropyl- und Phosphatregion: Nur wenige Interaktionen sind zwischen der Isopropyl-Region des MMCoA und der AT6 Bindetasche konserviert. Dieses steht im Bezug zu der Tatsache, dass das Coenzym A die Bindetasche der AT6 verlassen muss, sobald der nucleophile Angriff durch das Ser197 statt gefunden hat. Die Reste Asn262, Gln112, His196 und Ser237 bilden eine polare Umgebung um die Amidgruppen der Isopropyl-Region, wohingegen der überwiegende unpolare Isopropyl-Bereich des MMCoA in der unpolaren Region lokalisiert ist, der durch die Aminosäuren Pro111, Val379, Leu380 und Ala383 gebildet wird (Abbildung 51 C). Weitergehend wird die konformelle Flexibilität durch die Interaktionen von Lys291 und Arg339 mit der Phosphatgruppe reduziert (Abbildung 51 D).

### Beschreibung der Modelle ausgewählter Enzymvarianten

Weitergehend wurden von der AG Schez-Garcia ebenfalls Modelle ausgewählter Enzymvarianten errechnet. Ein interessanter Ausgangspunkt war hier der Vergleich der funktionell neutralen Mutation Gln198Arg mit der chemisch ähnlichen jedoch Enzymaktivität-zerstörenden Variante Gln198Lys (s. Abbildung 52).



**Abbildung 52: Visuelle Überlagerung des Wildtypes (Q198) mit den Enzymvarianten Gln198Arg (R198) und Gln198Lys (K198).**

Die MD Simulationen zeigten auf, dass die Interaktionen zwischen Bindetasche und MMCoA in beiden AT6 Varianten sehr ähnlich zum Wildtyp sind. Einzig drei, die Thioesterregion betreffende Interaktionen sind unterschiedlich. Die Berechnungen zeigten, dass eine deutliche Differenz in Länge und Flexibilität der lateralen Kette der Aminosäuren Glutamin, Arginin und Lysin bedeutend für die Interpretation der

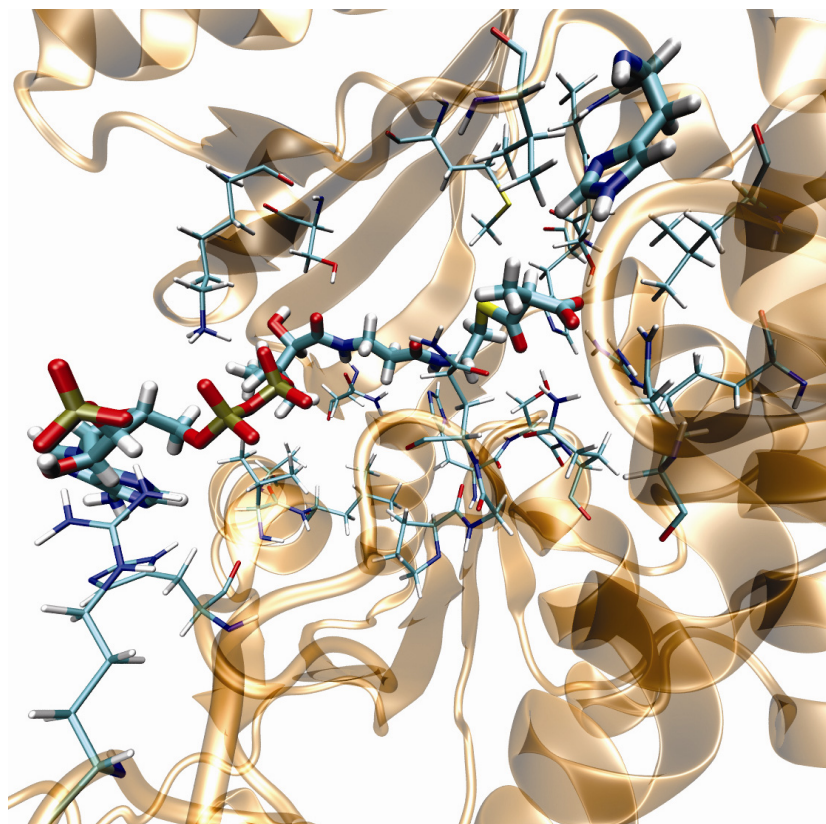
experimentellen Ergebnisse ist. Im Fall des Aminosäureaustausches Gln198Arg (R198) wird der Malonyl-Thioester, durch Interaktionen mit der rigiden lateralen Kette des Arginins, in einer Position gehalten, die einen Angriff durch Ser197 ermöglicht.

Die Enzymvariante Gln198Lys (K198, Abbildung 52) hingegen zeigt eine größere Flexibilität der lateralen Kette. Dieses führt zu einer veränderten MMCoA Positionierung und einer vergrößerten  $C_{\text{MMCoA}}\text{-Ser197}$ -Distanz, was einen nukleophilen Angriff von Serin197 weniger wahrscheinlich macht. Ein weiterer Faktor der zur Enzymaktivität beiträgt ist die Interaktion zwischen Tyr297 und der Carboxylatgruppe von MMCoA, die in der Gln198Lys Variante nicht mehr möglich ist. Die Mutation Tyr297His (YASH  $\rightarrow$  HASH, Abbildung 53) innerhalb DEBS3 führte zu einer Variante, die neben dem natürlichen Erythromycin zusätzlich in der Lage ist, 2-Desoxyerythromycin (**5**) zu synthetisieren, jedoch zum Preis einer leicht verringerten Enzymaktivität. Die laterale Kette von Histidin und Tyrosin besteht zum größten Teil jeweils aus einem planaren Ring. Dieser ermöglicht eine analoge Positionierung von His zwischen Val295 und Leu226. Jedoch ist die laterale Kette des Histidins kleiner als die des Tyrosins wodurch eine veränderte Positionierung des MMCoA innerhalb der Bindetasche resultiert (Abbildung 53). In der Enzymvariante Tyr297His führt der Verlust der Hydroxylgruppe des Tyrosins und die Reduktion der Kettengröße in einer Positionierung des MMCoA oberhalb der Ringebene, die durch die Guanidinium-Gruppe der lateralen Kette von Arg222 definiert wird. Hervor zu heben ist, dass in allen anderen bisher betrachteten Systemen unterhalb dieser Ebene positioniert ist. Darüber hinaus korrelieren die deutlich unterschiedlichen Distanzen  $O_{197}\cdots C_{\text{MM-CoA}} = 4,34 \pm 0,44 \text{ \AA}$  und  $C\alpha_{197}\cdots C_{\text{MM-CoA}} = 6,48 \pm 0,36 \text{ \AA}$  mit der veränderten Positionierung des MMCoA in dieser Enzymvariante. Obwohl die Tyr297His Variante im Vergleich zu Tyrosin in einer größeren  $C_{\text{MMCoA}}\text{-Ser197}$  Distanz resultiert, sorgt die fehlende starke Interaktion mit einer geladenen Aminosäure (wie es beispielsweise bei Gln198Lys der Fall ist) für eine größere Flexibilität des MMCoA, wodurch diese sich Ser197 annähern kann und der nukleophile Angriff nach der Aktivierung von Ser197 stattfinden kann.

Ser299 ist ebenfalls Teil des YASH Motivs und die Varianten Ser299Val, Ser299Phe und Ser299Tyr wurden basierend auf ihren zuvor experimentell ermittelten, signifikant unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt und modelliert. Wie in Kapitel 3.4.2.5 beschrieben, führte die Enzymvariante Ser299Val zum Wildtypprodukt und



der Aminosäurenaustausch scheint keinen signifikanten Effekt auf die Enzymaktivität zu haben.



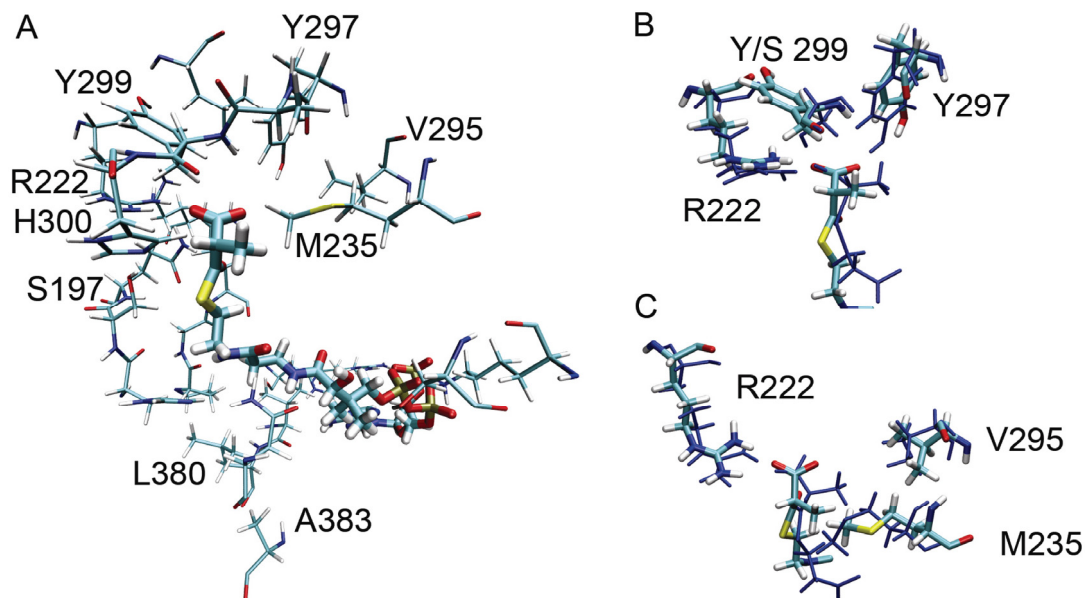
**Abbildung 53: Modellierter Y297H Variante: H297 platziert sich zwischen Val295 und Leu226.**

Die Ser299Phe Variante zeigte eine relaxierte Substratspezifität auf, was die Produktion von 2-Desmethylerythromycin A (**5**) neben dem Wildtyp-Produkt Erythromycin A (**1**) ermöglichte, jedoch bei leicht reduzierter Enzymaktivität. Die Enzymvariante Ser299Tyr hingegen war vollkommen inaktiv.

In den MD Simulationen konnte eine Korrelation zwischen der Größe der Aminosäure und der reduzierten Enzymaktivität aufgezeigt werden. Die zunehmende Größe der Seitenkette von Valin über Phenylalanin zum Tyrosin, bezogen auf das im Wildtyp vorkommende Ser, resultiert, verdrängt das katalytische His300 aus der Bindetasche heraus. Hierdurch wird die Interaktion zwischen His300•••Ser197 unterbunden. In diesen Enzymvarianten wird die Aktivierung des katalytischen Ser197 wahrscheinlich selbst, jedoch weniger effizient, durch die Carboxylatgruppe des MMCoA durchgeführt. Weitergehend ist die Positionierung des Gln198 im Bezug auf das MMCoA beeinträchtigt. Die größere Aminosäure an Position 299 verändert die Positionierung des MMCoA, wodurch Gln198 nicht mehr

mit der Thioestergruppe des MMCoA interagieren kann. Für die Variante Ser299Val beträgt die  $\text{NH}_{198} \cdots \text{O3}_{\text{MM-CoA}}$  Distanz  $2,98 \pm 0,34 \text{ \AA}$ , verglichen mit dem Wildtyp der hier eine Distanz  $1,98 \pm 0,23 \text{ \AA}$  aufweist. Demnach haben alle drei Aminosäureaustausche einen ungünstigen Effekt auf die Interaktionen, die sowohl zur Aktivierung des Substrat-Thioester als auch des katalytischen Ser197 notwendig sind. Folend werden nun die Ser299Tyr und Ser299Phe Enzymvarianten genauer betrachtet.

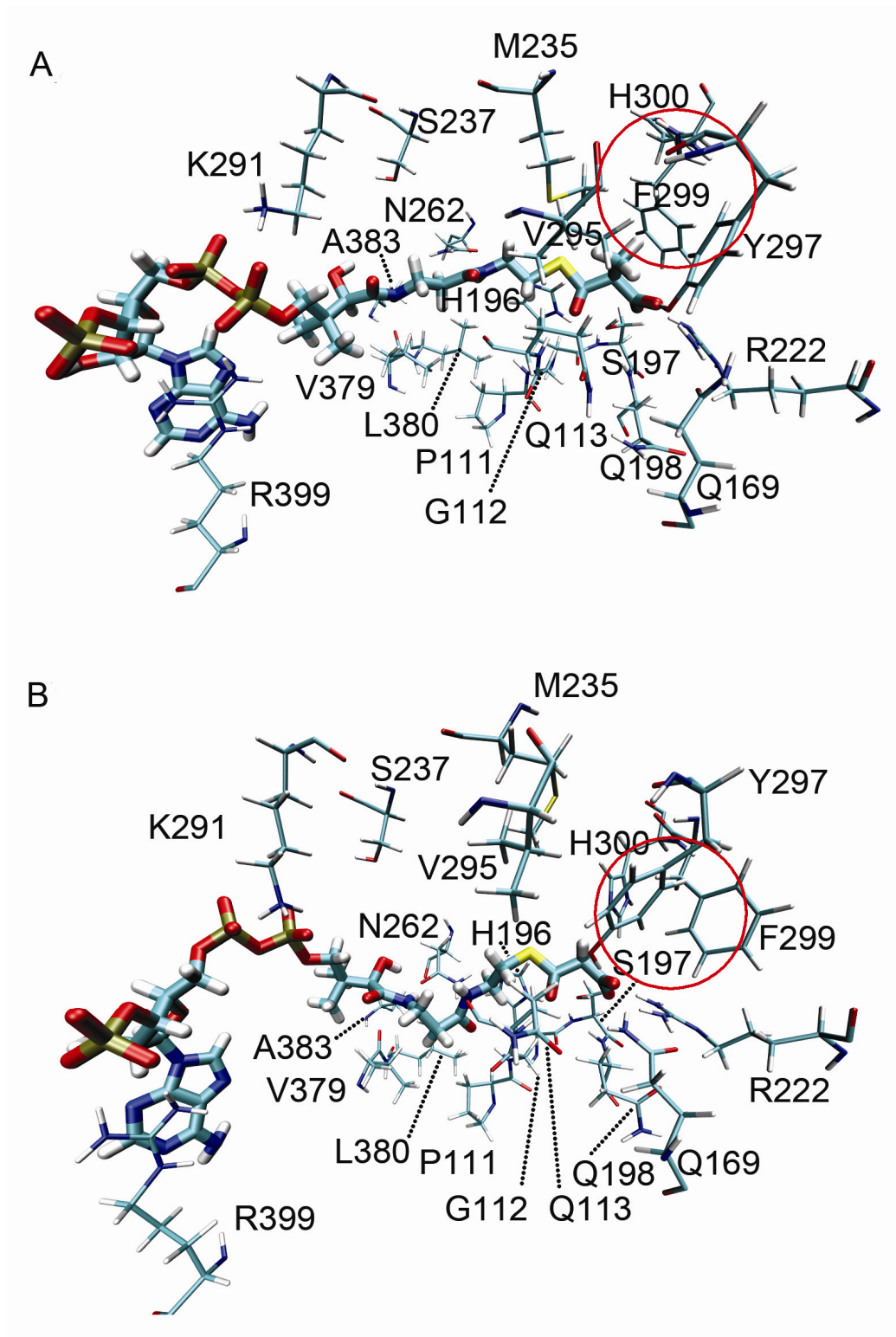
Der Aminosäureaustausch Ser299Tyr resultiert in einer Unterdrückung fast aller nötigen Interaktionen zwischen der Bindetasche und MMCoA. Die MD-Simulationen zeigen, dass sich das MMCoA innerhalb der erweiterten und unstrukturierten Bindetasche (Abbildung 54 A) frei bewegen kann.



**Abbildung 54: Mutation Ser299Tyr.** A Bindetasche zeigt sich unstrukturiert. B und C Überlagerung von Wildtyp (blau) und Ser299Tyr.

Von besonderem Interesse war die Mutation Ser299Phe (YAFH), da hier eine relaxierte Substratspezifität analog zu Tyr297His beobachtet werden konnte. Die Berechnungen dieser Mutante zeigten, dass die Benzylgruppe des Phenylalanins in der Lage ist, innerhalb der Enzymstruktur zu rotieren. Diese Rotation reduziert partiell den verfügbaren Raum um MMCoA in der Bindetasche unterzubringen, was zur Bildung von 2-Desmethylerythromycin A neben Erythromycin führte. Die Distanzen zwischen der Methylgruppe des MMCoA und Met235 werden um  $0,42 \text{ \AA}$  reduziert,  $4,57 \pm 0,54 \text{ \AA}$  im Wildtypsystem verglichen mit  $4,15 \pm 0,48 \text{ \AA}$  in der Ser299Phe Variante. MD Simulationen mit dem nicht-nativen Substrat Malonyl-CoA

(MCoA) innerhalb der Ser299Phe Variante verdeutlichen, dass sich der Phenylring bei der Abwesenheit der Methylgruppe außerhalb der Bindetasche lokalisiert, was eine bessere Positionierung von MCoA ermöglicht (Abbildung 55 B). Die QM/MM Kalkulationen der AG Sanchez-Garcia bestätigen ebenfalls die MD Resultate.



**Abbildung 55: Ser299Phe Variante mit gebundenem Substrat. A** Methylmalonyl-CoA und **B** Malonyl-CoA. Relevante Konformationsänderungen sind hervorgehoben.

### 3.4.4 Diskussion

Zum ersten Mal konnte eine systematische Analyse der Sequenz-Funktionsbeziehung einer AT-Domäne innerhalb einer gesamten Polyketidsynthase aufgezeigt werden.

Die in der Biotechnologie routinemäßig zur Enzymoptimierung eingesetzte Sättigungsmutagenese konnte auf die Manipulation katalytischer PKS-Domänen in ihrer nativen Umgebung (im Originalproduzenten) übertragen werden. Die Analyse der Screening-Resultate erfolgte durch einen direkten Vergleich mit Referenzkulturen. Die Ergebnisse wurden mit denen von 60 Klonen des wiederhergestellten Wildtypes, verglichen, die die Grenzen der Klon-zu-Klon Variation aufzeigten (10-50%). So konnte ein Datensatz generiert werden, der die Sequenzabhängigkeit einzelner Varianten auf die Aktivität des großen Enzyms DEBS3 innerhalb seiner Umgebung widerspiegelt.

Der minimalinvasive Eingriff (Einzelaminosäureaustausch) hatte nur selten gravierende Folgen für das Gesamtprotein, was sich in einem Totalverlust der Enzymaktivität und damit der Fähigkeit Erythromycin zu produzieren widerspiegelte. Dieses könnte in naher Zukunft möglicherweise nicht nur ein tieferes Verständnis der PKS Enzymologie, sondern auch eine zielgerichtete Modifizierung der Enzymmaschinerie ermöglichen. Weitergehend könnte die beschriebene robuste Plattform angewandt werden, um die schnelle Manipulation weiterer Merkmale einzelner PKS zu ermöglichen, und basierend auf diesen Ergebnissen die komplexen PKS grundlegender zu studieren.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurde neben der Untersuchung der Sequenz-Funktionsbeziehung eine Reduzierung der Substratspezifität einzelner Varianten im Bezug auf den partiellen Einbau von Malonyl-CoA analysiert, was bei lediglich drei der 266 Enzymvarianten der Fall war. Nach bestem Wissen wurde hier zum ersten Mal die Substratspezifität partiell durch zielgerichtete Mutagenese innerhalb der PKS im Originalproduzenten (inklusive aller post-PKS Prozessierungen) verschoben, was bei den beiden Hybriden YAFH und HASH zur signifikanten Bildung von 2-Desmethylerythromycin A (**5**) neben Erythromycin führte.

Darüberhinaus sollte man den potentiellen Einbau nicht-natürlicher Substrate durch diese Variantenbibliothek testen und analysieren. Möglicherweise werden durch einige der Enzymvarianten größere Malonate akzeptiert und eingebaut. Diese Varianten konnten nicht im Rahmen dieses Screens identifiziert werden, da nur

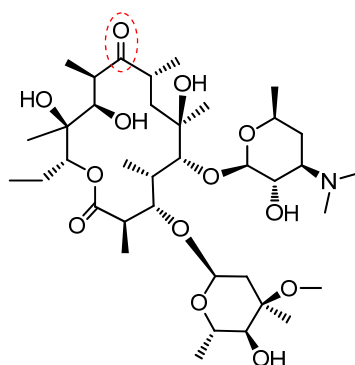
ausreichend große Konzentrationen von Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA intrazellulär in *S. erythraea* vorkommen und der Biosynthese zugeführt werden können. Bausteine wie Ethylmalonyl-CoA oder Hydroxymalonyl-CoA sind in vielen Bakterienstämmen endogen oftmals nicht vorhanden; entsprechende Enzyme fehlen im Cluster oder ihre Aktivität ist limitierend. Die Arbeitsgruppe um Leonard Katz zeigte im Rahmen von *swapping* Experimenten auf, dass das Level von Butyryl-CoA (Vorläufer für Ethylmalonyl-CoA) nicht ausreichend ist, um in einer Hybrid PKS ein Ethylmalonyl-Erythromycin zu erzeugen.<sup>[75]</sup> Aus diesem Grund können mögliche, von weiteren Enzymvarianten ausgehende, reduzierte Substratspezifitäten erst durch heterologe Fütterungen weiterer von der Malonsäure abgeleiteter Substrate identifiziert werden.

Alle experimentell erzeugten Daten stehen in vollständigem Einklang mit den theoretischen Beobachtungen in einem generiertem Methylmalonyl-CoA bindendem Modell der AT6-Domäne aus DEBS. Dieses Modell untermauert die Hypothesen des postulierten Katalysemechanismus von PKS AT-Domänen und erzeugt ein klares Bild der molekularen Interaktion zwischen Substrat und Enzym. Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine substratgebundene Kristallstruktur einer AT-Domäne. Das generierte, und durch die unabhängig erzeugten experimentellen Daten verifizierte Modell könnte so den Weg zu einem rationalem Enzymdesign von PKS AT-Domänen ebnen, um hierdurch nachfolgend die Polyketid-Diversität zu erhöhen.



### 3.5 Chemofermentative Einführung einer orthogonalen Reaktivität in Erythromycin – Einfügen einer Alkylgruppe durch die Fütterung von SNAC-aktiviertem Propargylmalonat (SK 107)

Die Generierung einer erhöhten Polyketid-Diversität ist von besonderem Interesse in der heutigen Forschung. Der Weg zum Einbau orthogonaler Reaktivitäten in Polyketide nimmt hierbei einen besonderen Stellenwert ein. Grund hierfür ist der modulare und repetitive Aufbau der Polyketide, der eine semisynthetische Modifikation deutlich erschwert. Zusätzliche orthogonale Funktionen würden einfache Zugänge zur partialsynthetischen Modifikation und somit zur Erhöhung der Diversität führen. Betrachtet man beispielsweise das Polyketid Erythromycin genauer, so erlaubt nur die Ketofunktionalität an Position neun eine einfache orthogonale Derivatisierung.<sup>[135]</sup>



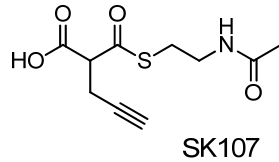
**Abbildung 56: Struktur des Polyketides Erythromycin.** Die Ketofunktion an Position 9, die zur Partialsynthese von Erythromycin-Derivaten wie Roxithromycin genutzt wird, ist rot umkreist.

Bis zum heutigen Zeitpunkt führten partialsynthetische Ansätze zur Modifikation dieser Position zu verbesserten Erythromycin-Derivaten, die Einsatz in der Klinik finden.<sup>[136,137,138]</sup> Die Einführung einer orthogonalen Funktion an weiteren Positionen des Moleküls, würden neue Wege und Ansatzpunkte für die Partialsynthese ebnet. So könnten auch Modifikationen an anderen Regionen des Polyketid durchgeführt werden.

#### SK 107: SNAC-aktiviertes Propargylmalonat

Bei dem Substrat SK 107 handelt es sich um ein SNAC-aktiviertes Propargylmalonat, das als racemisches Gemisch von Stephan Klopries synthetisiert wurde. Für die

nachfolgenden Fütterungsexperimente komplementierte es in einer Konzentration von 10 mM das Fermentationsmedium. Mit 10 mM liegt die gewählte Konzentration ~ fünfmal so hoch, wie die zuvor für den Einbau von SNAC aktiviertem Methylmalonat bestimmte, halbmaximale Konzentration. Hierdurch kann ein falsch negatives Ergebnis, erzeugt durch Substratmangel, ausgeschlossen werden.



**Abbildung 57: Struktur des SNAC-aktivierten Propargylmalonat SK 107, synthetisiert durch Stephan Klopries**

Die Alkinverbindung würde beim Einbau durch eine AT6\* Variante in einer orthogonalen Reaktivität an Position zwei des Moleküls resultieren. Ausgehend von der Alkinfunktion könnten neue partialsynthetische Ansätze zur Diversitätssteigerung verfolgt werden.

### 3.5.1 Screening der Variantenbibliothek auf erweiterte Substratspezifität

Die komplette DEBS AT6-Varianten-Bibliothek sowie der Wildtyp wurden in Anwesenheit von SK 107 rekultiviert. In Analogie zu den vorher durchgeführten Experimenten wurden die Ethylacetatextrakte der einzelnen Fermentationen mittels HPLC/ESI-MS untersucht. Hierbei zeigte der *S. erythraea* Wildtyp (NRRL-B-24071) eine minimale aber nicht signifikante natürliche Akzeptanz gegenüber dem Substrat SK 107. Jedoch ist hier fraglich, an welcher Position (über welche AT-Domäne) der Einbau stattgefunden hat. Die Analyse der Fermentationsextrakte aller 266 Enzymvarianten zeigte keinen signifikanten Einbau des Propargylmalonats. Ähnlich wie beim Wildtyp konnten auch hier für einige der Enzymvarianten Signale mit dem erwarteten Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z = 758$ ) im Bereich des Rauschens identifiziert werden. Es bleibt jedoch weiterhin fraglich, ob der Einbau durch die Mutation ermöglicht wurde, oder wie beim Wildtyp natürlich vorgekommen ist. Basierend auf den einzelnen HPLC/ESI-MS Messungen wird jedoch letzteres erwartet. Die möglichen Ausbeuten scheinen minimal, was eine Isolation dieses Substrates unmöglich erscheinen lässt.

Es stellt sich nun die Frage, ob zuvor „falsche“ Aminosäuren identifiziert und innerhalb des Aktivitätsscreens charakterisiert wurden oder ob ein einzelner



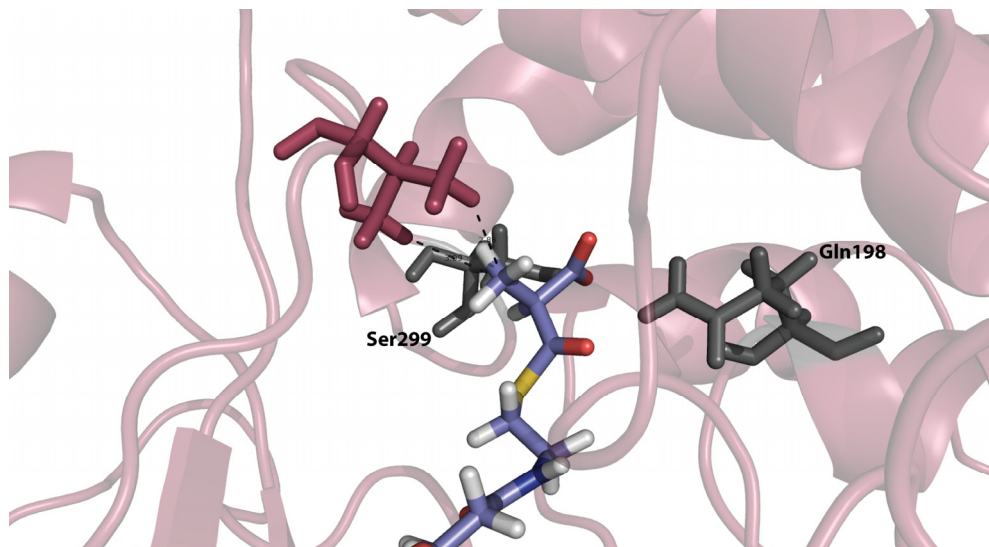
Aminosäurenaustausch alleine nicht ausreicht um die Substratspezifität zu reduzieren. Nachfolgend sollte daher das generierte Modell weitergehend betrachtet werden.

### 3.5.2 Weitergehende Betrachtung des Modell der AT-Region

Das generierte Modell der AT6 Region mit gebundenem Substrat (Methylmalonyl-CoA, vgl. hierzu Kapitel 3.4.3) bietet einen hervorragenden Ausgangspunkt für die Identifizierung weiterer Aminosäuren, die möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität haben und basierend auf den Sequenz- und Strukturvergleichen bisher nicht berücksichtigt wurden. Um den Einbau von SK 107 zu ermöglichen, müsste genügend Platz in der Bindetasche der Acyltransferase geschaffen werden. Die verlängerte Seitenkette erhöht signifikant den sterischen Anspruch an die Bindetasche. Möglicherweise müssten Mutationen kombiniert werden, um diesem Anspruch gerecht zu werden.

#### 3.5.2.1 Generierung von Val295 Varianten

Betrachtet man die Bindetasche der modellierten AT-Region mit gebundenem Substrat, ausgehend von der Methylgruppe des Substrates, hat man eine gute Vorstellung über möglicherweise korrelierender Aminosäuren (Abbildung 58). Im Falle des propargylierten Substrates würde sich die Seitenkette des Substrates um ca. 2,7 Å verlängern, jedoch mit freier Rotation um die Methylengruppe.



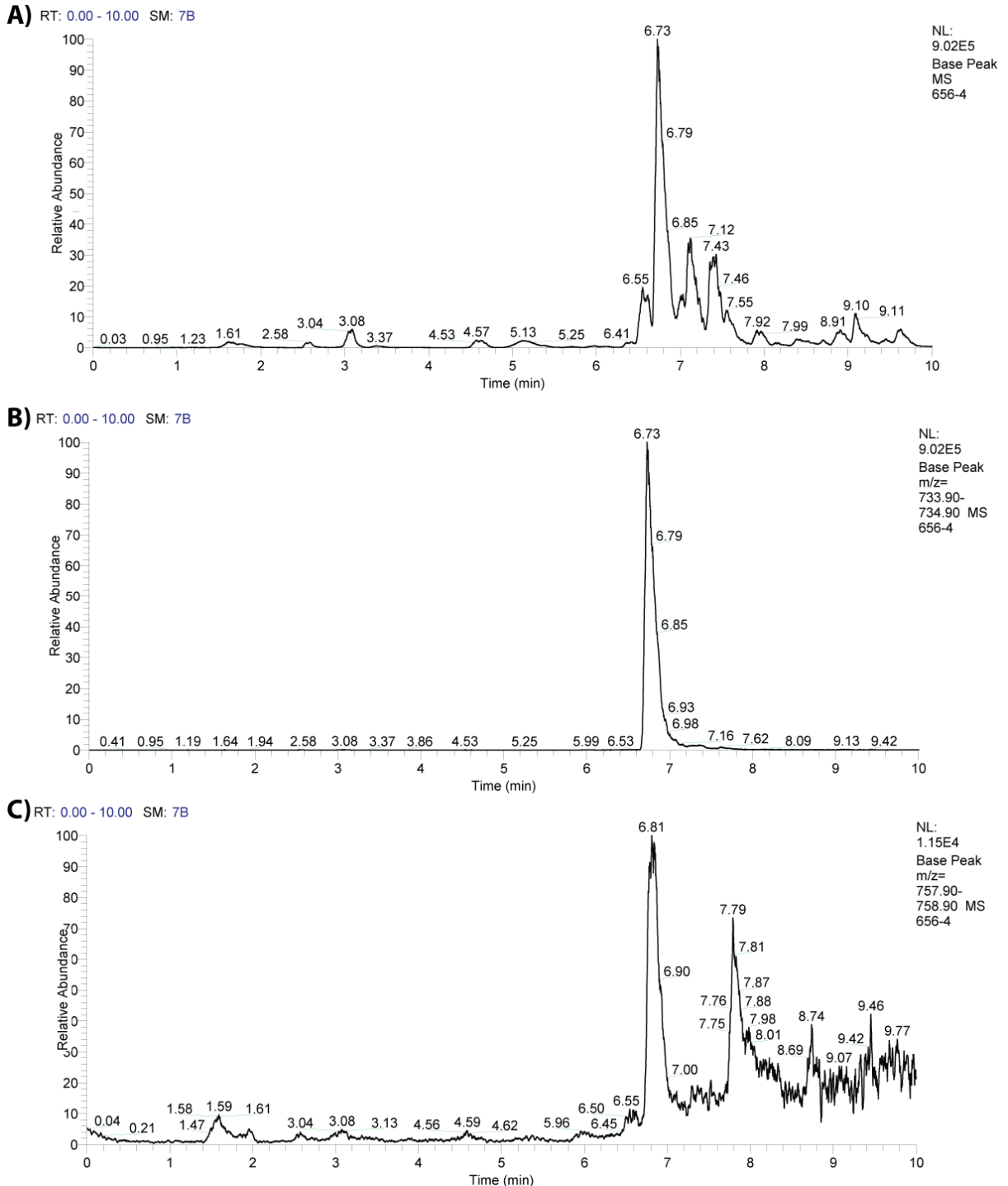
**Abbildung 58: Ausschnitt aus dem Modell der AT6 Region mit gebundenem Methylmalonyl-CoA.** Gln198 und Ser299 der Bindetasche sind zur besseren Orientierung als graue Rest dargestellt. Die Aminosäure Val295 mit der Isopropylgruppe der lateralen Kette ist in Magenta dargestellt.

Betrachtet man die Aminosäuren um die Methylgruppe findet sich außer den mutierten Aminosäuren, Ser297 und Tyr299 (YASH-Motiv), eine weitere Aminosäure in direkter Nähe. Hierbei handelt es sich um Val295. Die laterale Kette mit der Isopropylgruppe ragt mit einem Abstand von 2,83 Å bzw. 3,09 Å in Richtung des C-Atom der Methylgruppe. Dies führt bei einer Verlängerung der Seitenkette um zwei weitere C-Atome höchstwahrscheinlich zu einer Kollision innerhalb der Bindetasche, was der Grund für den Ausschluss von SK 107 als Substrat sein könnte. Es scheint, als könne ein Aminosäureaustausch von Val295 gegen eine sterisch anspruchslosere Aminosäure der richtige Weg zur relaxierten Substratspezifität sein. Hierzu wurde Val295 gegen die kleinen, sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäuren Glycin, Alanin und Leucin ausgetauscht. Jeweils vier Transkonjuganten wurden in Anwesenheit von 10 mM SK 107 fermentiert und die Ethylacetatextracte mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Die Enzymvariante Val295Gly zeigte weder Erythromycin-Bildung noch ein Signal der mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 758 dem erwarteten propargylierten Produkt entspricht. Val295Leu zeigt über alle vier Transkonjuganten gemittelt eine deutlich reduzierte Enzymaktivität (im Vergleich zum Wildtyp), jedoch wurde die Bildung von Erythromycin nicht komplett unterdrückt. Ein neues Produktsignal konnte nicht detektiert werden. Der Aminosäureaustausch an der Position 295 zu Alanin resultiert in einer weiterhin gleichbleibend aktiven Enzymvariante. Jedoch findet man mit einer Intensität um 1,5 Größenordnungen unter dem Erythromycin-Signal das gesuchte Masse-zu-Ladungsverhältniss von 758 (Abbildung 59).

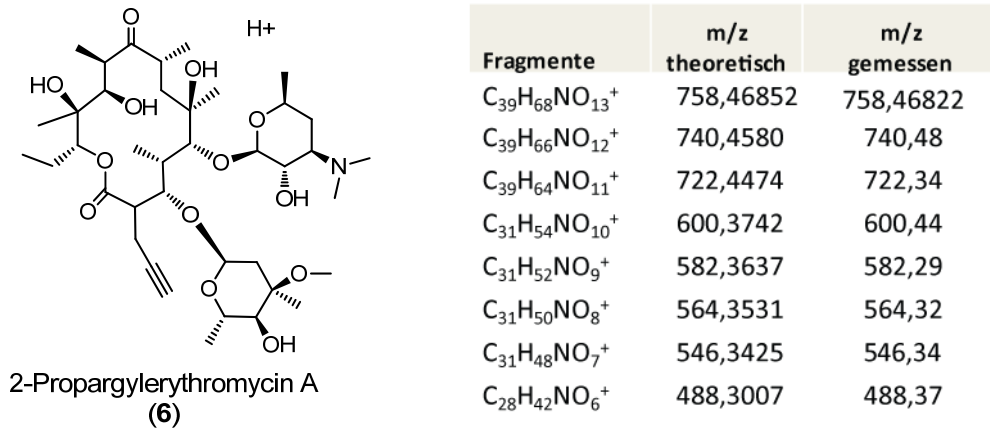
Weitergehend wurde dieses Signal ( $m/z = 758$ ) mittels ESI-MS/MS charakterisiert und die akkurate Masse mittels HR-MS bestimmt. Das Fragmentierungsmuster (Abbildung 60) stimmt vollkommen mit dem von Erythromycin A abgeleiteten Muster für 2-Proparglyerythroymcin A (**6**) überein. Mit einem Masse-zu-Ladungsverhältniss von 758,46852 und einer Abweichung von  $-0,39578$  ppm zumtheoretisch ermittelten Verhältniss, wurde die akkurate Masse und Summenformel bestimmt.

Die zu erwartenden Ausbeuten sind jedoch sehr gering: Hauptsignal im Fermentationsextrakt ist weiterhin Erythromycin A. Eine durchschnittliche Fermentation von *S. erythraea* NRRL-B-24071 liefert, als Schüttelkultur bei einer Fermentationsdauer von fünf Tagen bei 30°C und 180 rpm, rund 10 mg Erythromycin pro Liter Kulturvolumen. Nach genetischer Manipulation schwanken die Ausbeuten zwischen 10 und 50 %. Basierend auf einzelnen Intensitäten der Signale und der

erwarteten Produktmenge für Erythromycin nach genetischer Manipulation eines Stammes, könnten im Idealfall zwischen 0,067 und 0,33 mg Produkt pro Liter Kulturvolumen isoliert werden.

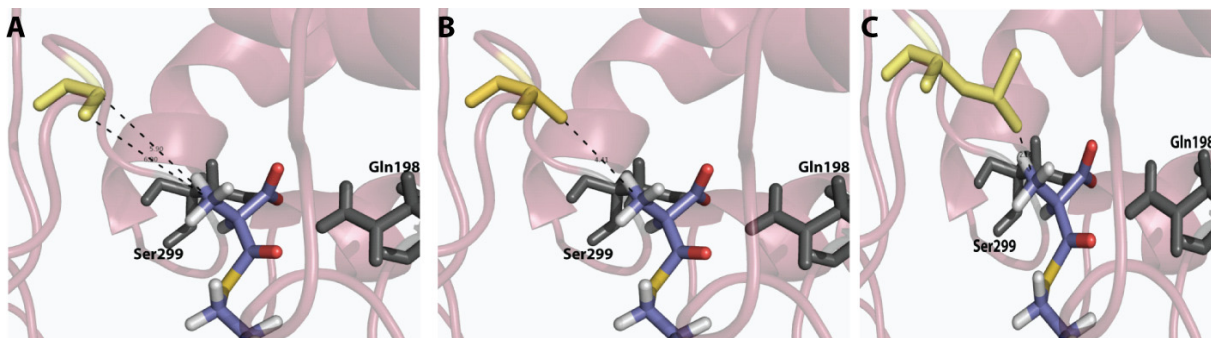


**Abbildung 59: HPLC Chromatogramm des analysierten Ethylacetatextrakt der Variante Val295Ala bei Fütterung von SK 107. A Base Peak, B Massenspur 733,9-734,9 (Erythromycin A m/z= 734), C Massenspur 757,0-758,9 (2-Propargylerythromycin A (6) m/z= 758)**



**Abbildung 60: Weitergehende Identifizierung von 2-Propargylerythromycin.** Links: Struktur 2-Propargylerythromycin A (6); Rechts: Bestimmung der einzelnen Fragmente mittels MS/MS sowie Bestimmung der akkuraten Masse mittels Hr-Ms.

Die Aminosäurenaustausche wurden ebenfalls mittels Pymol in dem Modell der AT6 Region durchgeführt (Abbildung 61). Jedoch wurden hier keine weitergehenden Berechnungen vorgenommen. Diese Darstellungen dienen lediglich der Visualisierung.



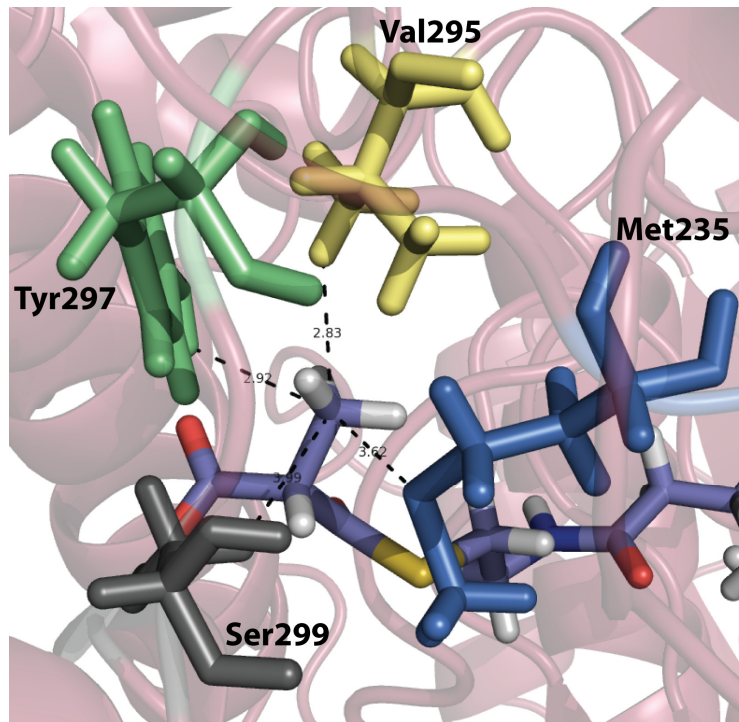
**Abbildung 61: Aminosäurenaustausche Val295.** **A** Val295Gly (Distanz zwischen Methylgruppe und lateraler Kette der Aminosäure 295 5,9 bzw 6,1 Å) **B** Val295Ala (4,41 Å) **C** Val295Leu (2,1 Å). Die Aminosäuren Gln198 und Ser299 sind zur Orientierung innerhalb der Bindetasche in grau dargestellt.

Alle drei Visualisierungen korrelieren mit den zuvor ermittelten Ergebnissen. In der Val295Gly Variante wurde enorm viel Platz in der Bindetasche erzeugt. Die Distanz zwischen Methylgruppe und dem Rest steigt von 2,8 Å auf 6,0 Å. Der Verlust der Wildtypaktivität könnte hier durch nun fehlende Interaktion zwischen der Methylgruppe und dem Rest295 sowie einer möglichen resultierenden Fehlfaltung erklärt werden. Mutationen zu Glycin gehen oftmals mit einer Flexibilisierung der Nachbarn einher, was zu einer Denaturierung des Enzyms und somit zu einer komplett inaktiven Enzymvariante führen kann. Durch die Variante Val29Ala wird

ebenfalls wie erwartet, zusätzlicher Platz in Bindetasche generiert. Laut Pymol-Berechnung beträgt die Distanz zwischen Methylgruppe und Rest beträgt hier nun 4,41 Å, was einen partiellen Einbau von Propargylmalonat ermöglichen könnte. Deutlich geht jedoch hervor, dass nur eine Konformation des Propargylrestes eingenommen werden kann. Eine Rotation der Seitenkette in der Bindetasche ist gehindert. Die geringe Distanz zum Tyr299 (2,9 Å) bietet weitergehend eine Kollisionsmöglichkeit. In der Val295Leu Variante kann die laterale Kette verschiedene Konformationen einnehmen, in der Konformation mit der geringsten Distanz beträgt diese 2,1 Å zur Methylgruppe. Auch dieses passt zu der detektierten, reduzierten Enzymaktivität. Deutlich wird, dass die Leu-Variante weder für die Erythromycin Biosynthese noch für die Bildung eines 2-Propargylerythromycin A (**6**) zu favorisieren wäre. Ob jedoch der Einbau kleinerer, flexiblerer Substrate durch diese Variante möglich ist, bleibt offen.

#### **2.5.2.2 Planung weiterer Mutageneseansatzpunkte**

Zwar konnte die Val295Ala Enzymvariante ein Einbau des SNAC aktiviertem Propargylmalonats in das Polyketid ermöglicht jedoch sind die Ausbeuten an 2-Propargylerythromycin A (**6**) gering und ermöglichen keine Isolation und weitergehende chemische Modifikation. Eine weitere Verschiebung der Substratspezifität der AT6-Domäne gegenüber dem natürlichen Methymalonyl-CoA zu Gunsten von SNAC aktiviertem Propargylmalonat könnte durch die Kombination verschiedener mutierter Reste innerhalb der Bindetasche ermöglicht werden. Die Erzeugung von weiterem Raum im Bereich der Seitenkette, innerhalb der Bindetasche, würde weitere Rotationsgrade der Propargylseitenkette erlauben. Wie bereits unter 3.5.2 erwähnt, würde eine Seitenkettenverlängerung um 2-C-Atome in einer Größenzunahme von ca. 2,7 Å resultieren. In Abbildung 62 sind die Seitenkette-umgebenden-Reste farblich hervorgehoben. Eine Distanz von weniger als 3 Å zwischen C-Atom der Methylgruppe der Substratseitenkette und lateraler Kette der Aminosäure ist bei den Resten Val295 (2,83 Å) sowie Tyr297 (2,93 Å) gegeben. Zu den lateralen Ketten von Ser299 und Met235 liegt eine Distanz von mehr als 3,5 Å vor.

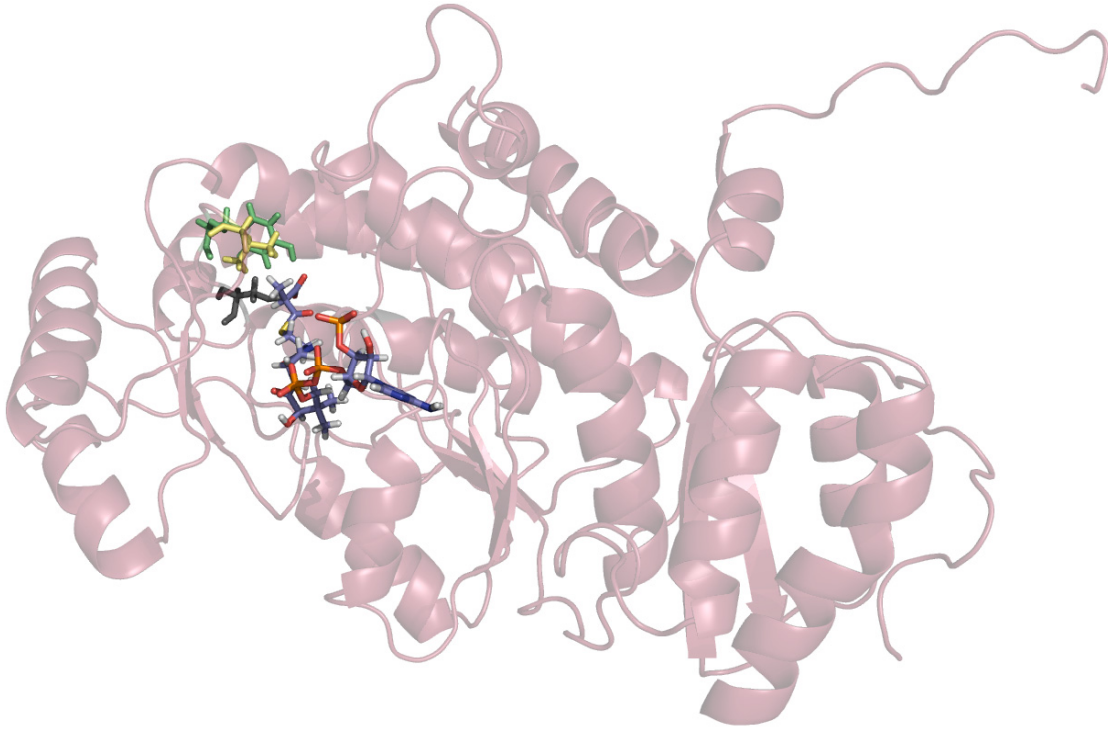


**Abbildung 62: Seitenkette-umgebenden-Reste im Modell der AT6 Region.** Gln198 und Ser299 sind in grau, Met235 in blau, Val295 in gelb und Tyr297 in grün dargestellt.

Die Aminosäure Met235 kann demnach in nachfolgenden Mutageneseplanung vernachlässigt werden. Zwar ist die laterale Kette des Ser299 3,99 Å vom C-Atom der Methylgruppe entfernt, jedoch zeigten Alignments, dass dieser Rest innerhalb der AT-Domäne bei Ethylmalonyl-CoA oder anderen räumlich anspruchsvollen Substraten ausgetauscht ist. Es scheint, als wäre die Aminosäure dieser Position umgekehrt proportional zur Substratgröße. Aus diesem Grund wird Ser299 in den nachfolgenden Planung weitergehend berücksichtigt. In Abbildung 63 sind die drei Reste, Val295 (gelb), Tyr297 (grün) und Ser299 (grau), die Ziel einer kombinierten Mutagenese sind farbig hervor gehoben. Durch ihre Mutation sollte Platz für alle Rotamere der Substratseitenkette geschaffen werden.

Für die Erweiterung einer Bindetasche werden daher folgende Mutationen an den einzelnen Positionen vorgeschlagen:

- Val295: Wildtyp, Ala
- Tyr297: Wildtyp, Val, His, Ala, Gly, Leu
- Ser299: Wildtyp, Ala, Gly, Leu



**Abbildung 63: Modell der der AT6 Region mit gebundenem Methylmalonyl-CoA.** Die Aminosäuren, die in Kombination mutiert werden sollen sind als farbige Stabmodelle dargestellt. Val295 ist in gelb, Tyr297 in grün und Ser299 in grau dargestellt.

Die Bibliothek der neu zu generierenden Enzymvarianten sollte Kombinationen aller Möglichkeiten aufweisen. Dieses resultiert in insgesamt 46 Enzymvarianten, die auf Akzeptanz gegenüber SK 107 getestet werden sollten.

Zur Begründung der einzelnen Reste: 1. Im Fall von Val295 konnte bereits aufgezeigt werden, dass nur die Mutation zu Alanin einen Einbau von SK 107 ermöglicht (s. hierzu Kapitel 3.5.2.1). Die Mutation zu Glycin resultierte in einer nicht mehr aktiven Enzymvariante, die Mutation von Leucin in einer Variante mit reduzierter Wildtypaktivität. Alle anderen Aminosäuren würden weitaus mehr Platz einnehmen und somit keinen größeren, freien Raum innerhalb der Bindetasche ermöglichen. 2. Durch die Mutation von Tyr297 zu Alanin, Glycin oder Leucin wird ebenfalls weiterer Raum für eine verlängerte Substratseitenkette geschaffen. Die zuvor getestete Enzymvariante Tyr297His weist keine reduzierte Enzymaktivität auf, die Tyr297Val Variante eine jedoch signifikante reduzierte Aktivität. Da sich beide Varianten innerhalb der Konsenssequenz für die AT-Domänen finden lassen, die sterisch anspruchsvollere akzeptieren, sollten auch diese Varianten mitkombiniert werden (vgl. hierzu Kapitel 3.4.2.5). 3. Durch die Mutation von Ser299 zu den kleinen Aminosäuren Alanin und Glycin sowie der Aminosäure Leucin würde auch an dieser

Position Platz für eine frei rotierende Seitenkette des Substrates SK 107 geschaffen werden, wobei keine Störung der katalytischen Diade durch eine veränderte Proteinstruktur anzunehmen wäre.

### **3.5.3 Diskussion**

Erstmalig konnte die Akzeptanz eines nicht-natürlichen Substrates durch eine mutierte AT-Domäne einer Polyketidsynthase erreicht werden. Auch wenn Erythromycin A noch immer das Hauptprodukt der Fermentation ist, und das erhaltene Derivat nicht in präparativ nutzbaren Mengen vorliegt, so konnte doch aufgezeigt werden, dass ein gut ausgewählter Einzelaminosäureaustausch den Einbau nicht-natürlicher Bausteine ermöglicht. Mit dieser neuen Strategie des Einzelaminosäureaustausches könnte die Anzahl der funktionellen Gruppen innerhalb von Polyketiden artifiziell signifikant erhöht werden, wodurch vollkommen neue Möglichkeiten für die Semisynthese komplexer Derivate eröffnet werden.

Eine weitere, möglichst vollständige, Verschiebung der Substratspezifität in Richtung des künstlichen Produktes ist wünschenswert, um Zugang zu größeren, synthetisch nutzbaren Produktmengen zu bekommen. Denn einzig die ausreichende Produktbereitstellung kann den Weg zur partialsynthetischen Modifikation und damit zur Diversitätserhöhung ebnen. Weitergehende intensive Betrachtung der Bindetasche sollte auf der Basis der bereits erarbeiteten Erkenntnisse ein rationales Enzymdesign ermöglichen. Die Mutation Val295Leu bietet hierfür einen guten Startpunkt. Die vorgeschlagenen Kombinationsmöglichkeiten der drei Reste, Val297, Tyr297 und Ser299 würden einen Freiraum für verschiedene Bindungsmodi des nicht-natürlichen Malonates innerhalb der Bindetasche bereitstellen. Abzuwarten ist jedoch, inwiefern die einzelnen resultierenden Enzymvarianten noch Aktivität aufweisen. Weitergehend sollte die Val295Ala Variante auf ihre Akzeptanz gegenüber einer Vielzahl von nicht-natürlichen, malonat-abgeleiteten Substraten getestet werden. Man kann davon ausgehen, dass die erzeugte Variante ein insgesamt verbreitertes Substratspektrum aufzeigen wird. Möglicherweise interagieren die einzelnen Reste der Bindetasche spezifischer mit anderen Seitenketten des Substrates, was in einem bevorzugten Einbau im Vergleich zum Methylmalonyl-CoA resultieren könnte.



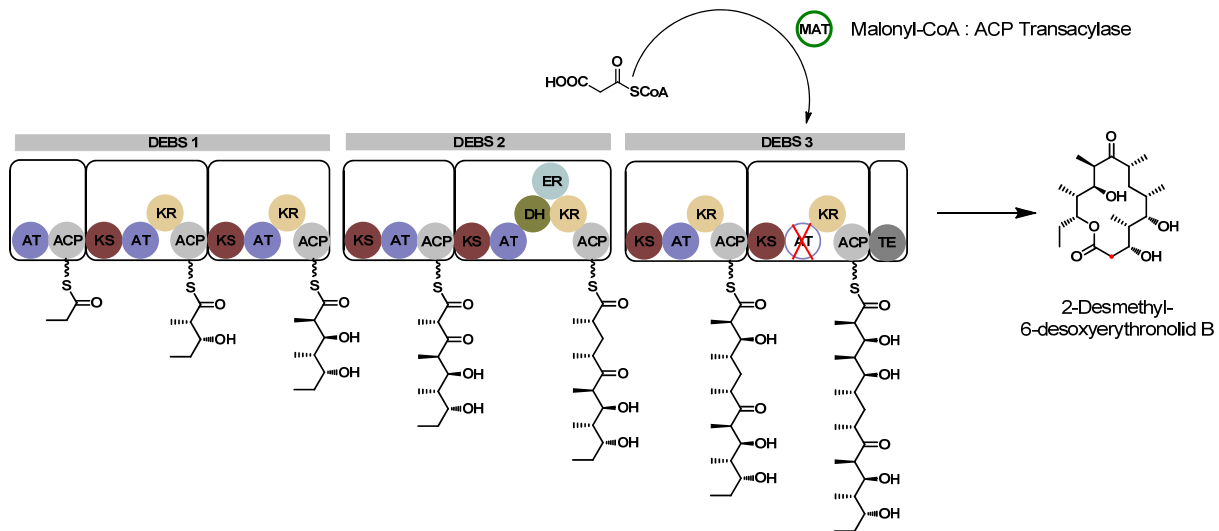
### 3.6 Identifizierung einer moderat thermophilen *trans*-agierenden Acyltransferase

Erst kürzlich wurde ein neuer Subtyp von Polyketidsynthasen identifiziert, bei denen die Acyltransferasen nicht innerhalb des molekularen Fließbandes sondern als freistehende Enzyme vorliegen. Diese Acyltransferasen übertragen bislang exklusiv den Baustein *in trans* auf das entsprechende Acyl Carrier Protein der PKS. Ein prominentes Beispiel ist der Leinamycin Gencluster (Lnm), welcher 2003 von Ben Shen und seinen Mitarbeitern charakterisiert wurde. Individuelle Module der Lnm PKS weisen keine eigene AT-Domäne auf. Stattdessen nutzen sie für die Übertragung der Malonyl-Verlängerungseinheiten, auf die einzelnen ACP Domänen innerhalb der modularen PKS, eine exogene Malonyl-CoA-spezifische Transacylase.<sup>[60]</sup>

Das Prinzip der *trans*-AT-PKS Architektur eröffnet weitere Ansatzpunkte zur gezielten Verbreiterung der Polyketid-Diversität durch die spezifische Manipulation der Polyketid-Biosynthese. Der Einbau einer freistehenden Acyltransferase in einem klassischen *cis*-AT PKS Biosyntheseweg und die Möglichkeit, dieses kleine Enzym unabhängig von der MDA-großen PKS mutieren zu können, ist möglicherweise entschieden einfacher in der experimentellen Durchführung als die Mutation *cis*-agierenden AT-Domänen. Der Preis ist jedoch ein akademisch weniger eleganter Zugang, da die Herausforderung im Verständnis und Manipulation der großen PKS auf diesem Weg nicht gelöst sondern schlicht umgangen werden. Entsprechend würde dadurch zwar der Zugang zu neuen Naturstoffderivaten eröffnet, jedoch wäre der mögliche Wissenszuwachs intrinsisch limitiert.

In dem ersten Experiment dieser Art brachten Mitarbeiter um Chaitan Khosla eine Malonyl-CoA : Acyl Carrier Protein Transacylase (MAT) aus *Streptomyces coelicolor* in die Erythromycin Biosynthesemaschinerie ein, wodurch die gezielte Bildung des Desmethyl-Derivates ermöglicht wurde.<sup>[139]</sup> Die MAT komplementierte hierzu eine Nullmutante der DEBS AT6-Domäne (vgl. Abbildung 64). Basierend auf der veröffentlichten Kristallstruktur dieser MAT führten sie eine strukturgeleitete Mutagenese durch. Hierbei verfolgten sie das Ziel, Mutanten zu erzeugen die eine relaxierte Substratspezifität aufwiesen. Neben wenigen Mutanten, die den Einbau des nicht-nativen Bausteines Methylmalonyl-CoA ermöglichten, blieb der Versuch

den Einbau nicht-natürlicher Substrate zu ermöglichen erfolglos. Die einzelnen Enzymvarianten zeigten eine drastisch reduzierte oder ausgeschaltete Aktivität.<sup>[140]</sup>



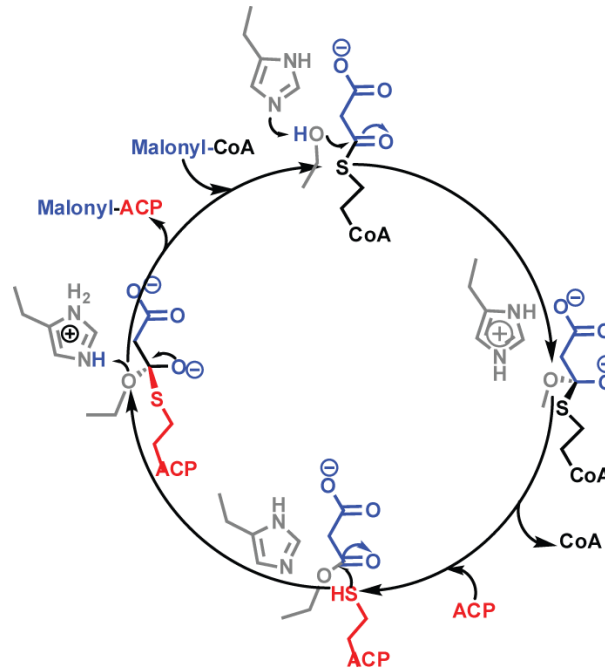
**Abbildung 64: Schematischer Überblick der modifizierten Biosynthese zur Synthese von 2-Desmethyl-6-Desoxyerythronolid B.**<sup>[139]</sup> Die AT6-Domäne aus DEBS3 ist durch zielgerichtete Mutagenese inaktiviert. Eine heterolog exprimierte Transacylase überträgt die nicht-native Verlängerungseinheit Malonyl-CoA auf das ACP6 der Megasyntase.

Wahrscheinlich scheiterten die Versuche auf Grund einer geringen Stabilität des Wildtyp-Enzyms, mit resultierender geringer Toleranz gegenüber den typischerweise schädlichen Mutationen. Ein solches Verhalten ist ein bekanntes Problem in der gerichteten Evolution von Enzymen, wo die geringe Enzymstabilität des Wildtyps oftmals mit einer geringen Evolvierbarkeit einhergeht.<sup>[130,141]</sup> Der Einsatz eines thermostabileren Enzymen als Alternative zur MAT aus *S. coelicolor* könnte diese Problematik umgehen. Im Idealfall käme ein alternatives Enzym aus einem moderat thermophilen Organismus; hier geht die Enzymaktivität bei Raumtemperatur mit einer erhöhten Faltungstabilität einher.

### 3.6.1 MAT aus *Streptomyces coelicolor*

Die MAT aus *S. coelicolor*, ein *fabD*-Homolog, katalysiert sowohl in der Fettsäurebiosynthese als auch in der Polyketidbiosynthese die Übertragung eines Malonylrestes auf ein ACP. Gegenüber ihrem Akzeptorsubstrat, dem ACP, weist die MAT eine gewisse Promiskuität auf. Im Jahr 2003 gelang es den Arbeitsgruppen um Adrian T. Keating-Clay und Robert M. Stroud die Kristallstruktur dieser MAT zu lösen und hierauf basierend Hypothesen über den Katalyse-Mechanismus, die Substratspezifität sowie die ACP-Bindestelle aufzustellen (s. Abbildung 65).<sup>[142]</sup> Die

MAT katalysiert den Malonyl-Transfer mittels einem *ping-pong bi-bi* Mechanismus über eine katalytische Diade aus Histidin und Serin (Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Durch die Arbeitsgruppen um Adrian T. Keating-Clay und Robert M. Stroud postulierter Katalyse-Zyklus der MAT.<sup>[142]</sup>

In der ersten Teilreaktion fungiert der Histidinrestes als Base zur formalen Deprotonierung der Hydroxylgruppe des Serins. Daraufhin kann das entstehende Oxyanion als Nukleophil den Thioester des Malonyl-CoA angreifen. Es entsteht ein tetraedrisches Intermediat, welches durch Abspaltung von CoA zerfällt. In der zweiten Teilreaktion greift das Thiol des phosphopantetheinylierten ACP die Malonyl-Serin-Esterbindung der MAT an. Dieses resultiert in der Ausbildung eines weiteren tetraedrischen Intermediates, was dann durch die Abspaltung von Malonyl-ACP wieder aufgelöst wird.<sup>[142]</sup>

### 3.6.2 MAT aus *Thermofibida fusca*

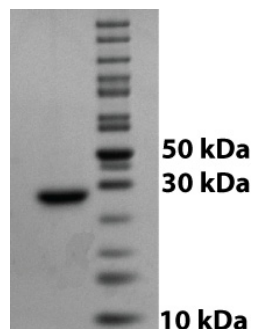
Angetrieben durch die gescheiterten beschriebenen Versuche zur Mutagenese der MAT aus *S. coelicolor*, auf dem Weg zu einer veränderten Substratspezifität, sollte im Rahmen dieser Dissertation ein moderat thermophiles Enzym-Analogon identifiziert werden. Ausgehend von einer Protein BLAST Analyse, in der die Proteinsequenz der MAT aus *S. coelicolor* (NP\_626633) als Templat diente, konnte eine Proteinsequenz aus dem moderat thermophilen Actinomyceten *Thermofibida fusca* YX (YP 290029.1) identifiziert werden. Die identifizierte Sequenz

aus *T. fusca* weist eine Homologie von 69,5 % bei 57,8 % Sequenzidentität zur MAT aus *S. coelicolor* auf (s. hierzu Abbildung 66).

MAT <i>S. coelicolor</i>	MLVIVAPGQGAQT	PGFLTDWLALPGAADRVA	AAWSDATGLD
MAT <i>T. fusca</i>	MLAIVAPGQGAQV	PGFLSAWLELPGMAERFA	EWSDVVGLD
MAT <i>S. coelicolor</i>	LAHFGTKADADE	EIRDTSVAQPLLVAAGILS	AAAALGTQTSV
MAT <i>T. fusca</i>	LVRYGTTADAEE	EIRDTAVAQPLLVSAGIA	AAAIALFGDL--
		*	
MAT <i>S. coelicolor</i>	ADATGPGFT	PGAVAGHSVGEITAAVF	FAGVLDDTAALSIVR
MAT <i>T. fusca</i>	---ESAAASADVV	VAGHSVGEFTA	AAVAGALTPRDALLVA
MAT <i>S. coelicolor</i>	RRGLAMAEAAAVT	ETGMSAILGGDPEVSV	VAHLERLGLTPA
MAT <i>T. fusca</i>	ERGRGMAEASAVT	PTGMTAVLGGDRDEV	LAAIKAAGLTPA
MAT <i>S. coelicolor</i>	NVNGAGQIVAAGT	MEQLAALNEDKPEGV	RKVVPLKVAGAF
MAT <i>T. fusca</i>	NDNGSGQIVAAGT	LEQLEALAAAPP-AR	ARLRPLAVAGAF
		*	
MAT <i>S. coelicolor</i>	HTRHMAPAVDKL	AEEAAKALTPADPKV	TYVSNKDGRAVASG
MAT <i>T. fusca</i>	HTHHMAPAVKR	VEALAAATLTPADPR	TRLLSNRDGAVVTSG
MAT <i>S. coelicolor</i>	TEVLDRLVGVAN	PVRWDLCKETFKEL	GVTAIEVCPGGT
MAT <i>T. fusca</i>	SEYLSRLVLSQI	SSPVRWDACTATLAD	LGVTALMELPPAGT
MAT <i>S. coelicolor</i>	LTGLAKRALPGV	KTALKTDDLDAAREL	VAEHTQA----
MAT <i>T. fusca</i>	LTNLAKRALRGV	ELLAIKSPEDLDRAR	TLVADHAGATSTD
MAT <i>S. coelicolor</i>	-----		
MAT <i>T. fusca</i>	LEGQA		

**Abbildung 66: Proteinsequenzvergleich mittels AlignX der MAT aus *S. coelicolor* und der putativen MAT aus *T. fusca*, die durch die BLAST Analyse identifiziert wurde.** Verwandte Aminosäuren sind grün hinterlegt, identische grau. Das Serin und Histidin der katalytischen Diade sind oberhalb der Sequenz von *S. coelicolor* jeweils durch einen Stern gekennzeichnet.

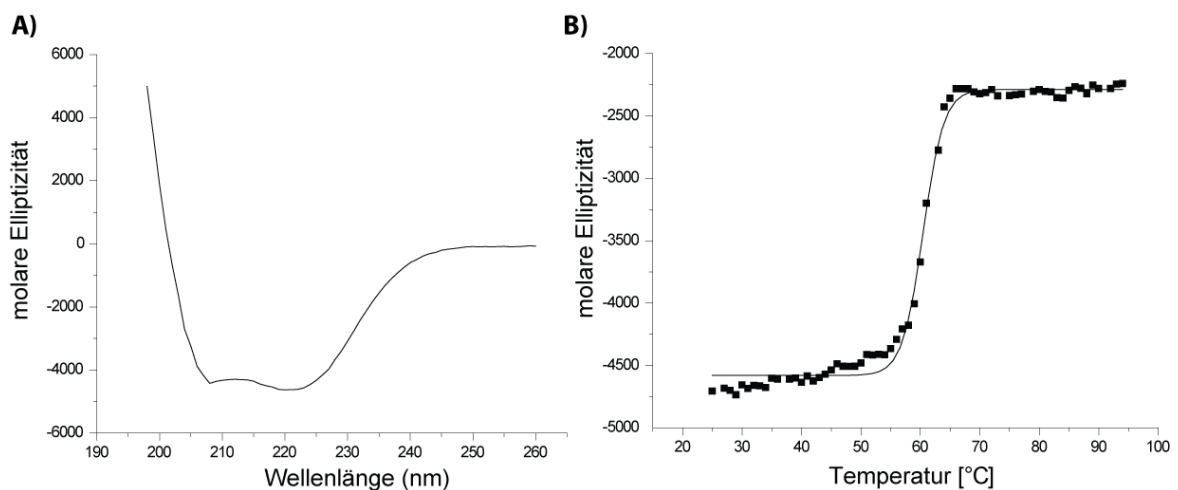
*E. coli*-codonoptimierte synthetische Gene codierend, für die mesostabile und die putative thermostabile MAT, wurden individuell in Expressionsvektoren kloniert und die exprimierten Enzyme über einen N-terminalen Hexahistidin-Tag mittels *Immobilized Metal Ion Chromatography* (IMAC) und Gelfiltration aufgereinigt. Die MAT aus *T. fusca* konnte so mit Ausbeuten von 6,5 mg/L zugänglich gemacht werden.



**Abbildung 67: 15%-iges SDS Gel der aufgereinigten MAT aus *T. fusca***

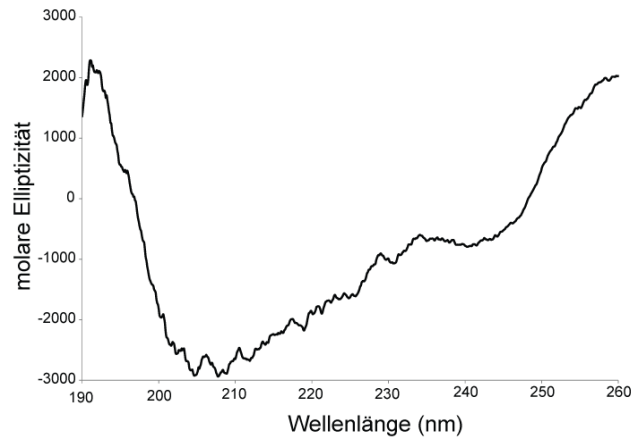
Im Fall der mesophilen MAT konnte der Großteil des Enzyms nur als Chaperon-gebundenes Protein isoliert werden. Die einzelnen Adukte konnten nicht durch die Zugabe von ATP und Magnesiumchlorid (verschiedene Konzentrationen) während der Chromatographie abgetrennt werden. Bei der Anpassung der *Codon-Usage* auf eine geringere Effizienz in *E. coli* konnten die MAT in einem nachfolgendem Experiment als Chaperon-freies Enzym, jedoch unter deutlichem Ausbeuteverlust (0,5 mg/L), isoliert werden.

Die beiden aufgereinigten MAT sollten mittels CD-Spektroskopie charakterisiert werden. Hierbei sollten sowohl die Faltungscharakteristika als auch die Thermostabilität betrachtet werden. Das CD-Spektrum der MAT aus *T. fusca* zeigt ein klar gefaltetes Protein mit einem hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil an. Der Schmelzpunkt wurde mit 60°C bestimmt, was mit der optimalen Wachstumstemperatur des Originalproduzenten übereinstimmt.



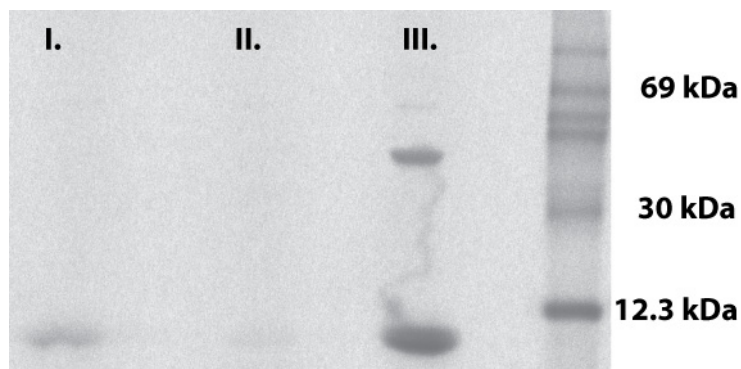
**Abbildung 68: CD-spektroskopische Untersuchungen der MAT. A** CD-Spektrum des gereinigten Enzyms und **B** CD-basierte Schmelzpunktermittlung (MAT aus *T. fusca*).

Das CD-Spektrum der mesophilen MAT (Abbildung 69) zeigt hingegen einen hohen Teil ungefaltetes, wenn auch lösliches Protein. Dieses korrespondiert mit der initialen Chaperon-Aduktbildung sowie mit den von Chaitan Khosla *et al.* berichteten Stabilitätsproblemen bei der Handhabung dieses Enzyms. Eine Schmelzkurve wurde hier nicht aufgenommen, da der erhaltene Wert zu unzuverlässig gewesen wäre.



**Abbildung 69: CD-Spektrum des gereinigten Enzyms (MAT aus *S. coelicolor*)**

Basierend auf ihrer Sequenz wurde von der neuen MAT ebenfalls erwartet als *fabD*-Homolog im nativen Organismus zu agieren. Für die funktionelle Charakterisierung im direkten Vergleich beider MAT wurde das ACP6 aus DEBS als Akzeptorsubstrat eingesetzt. Hierzu wurde ein codonoptimiertes Gen des ACP6 zusammen mit dem Gen der 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase *sfp* aus *B. subtilis* in einen dualen Expressionsvektor kloniert und nachfolgend in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Sfp ist notwendig um das ACP posttranslational zu modifizieren, wodurch ein Zugang zum holo-Protein ermöglicht wird. Die Aktivität der beiden MAT wurde mittels Radioaktiv-Assay nachgewiesen, wobei  $^{14}\text{C}$ -markiertes Malonyl-CoA als Acyl Donor agiert. Hierbei kann die katalytische Aktivität über den Transfer des radioaktiven Malonats auf das DEBS ACP6 visualisiert werden. Nur wenn die MAT dieses  $^{14}\text{C}$ -markierte Malonyl-CoA als Substrat akzeptiert und mit dem ACP6 interagieren kann, wird das Substrat auf das ACP übertragen, was in einer radioaktiven Markierung des Proteins resultiert.



**Abbildung 70: Aktivitätstestung: 15%iges SDS Gel I. MAT aus *S. coelicolor* + ACP6, II. ACP6 (negativ Kontrolle), III. MAT *T. fusca* + ACP6 alle in Anwesenheit von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Malonyl-CoA (Inkubiert für 30° min auf Eis). Selbstmalonierung der MAT wird bei III.) sichtbar.**

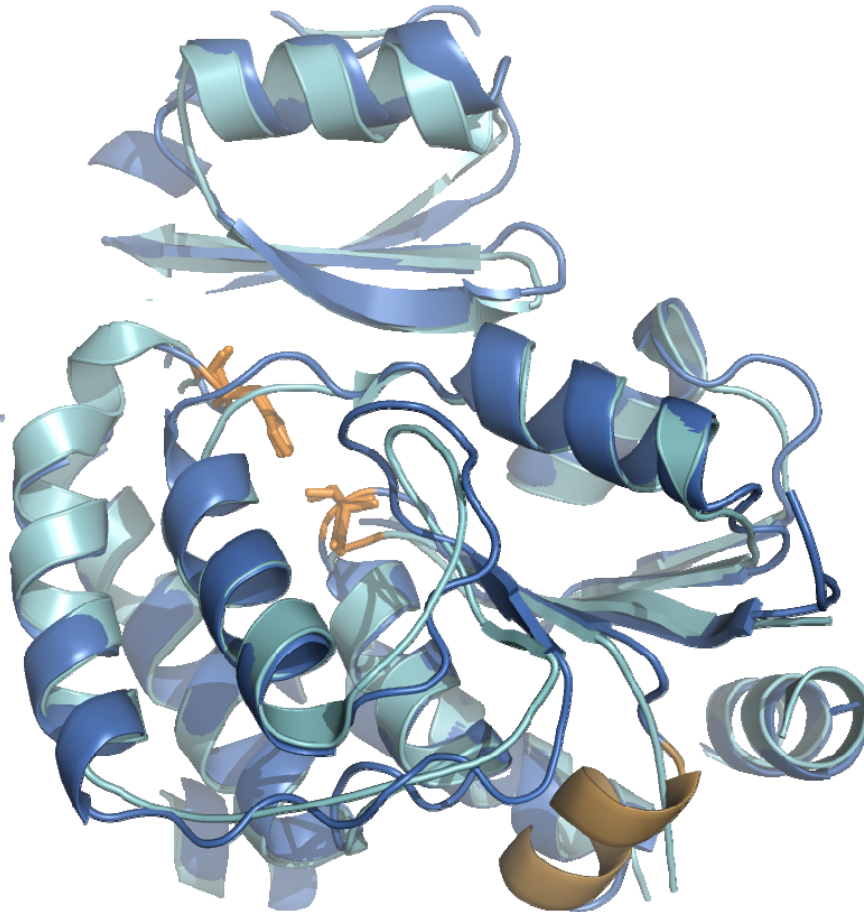
Wie in Abbildung 70 ersichtlich, zeigen beide Enzyme Aktivität. Trotz ihrer Thermostabilität zeigte die MAT aus *T. fusca* bei 0 °C höhere Aktivität als ihr Analogon, was ebenfalls für eine homogene und native Enzympräparation spricht. Die vorhergegangenen CD-spektroskopischen Untersuchungen bestätigen die zuverlässigere Faltung und die daraus resultierende thermale Stabilität der MAT aus *T. fusca*. Darüber hinaus zeigt der Transfer von Malonat auf das DEBS ACP6 die erwartete Akzeptor-Promiskuität.

Um ein rationales Enzymdesign, in Richtung einer veränderter Substratspezifität und der Akzeptanz nicht-natürlicher Bausteine zu ermöglichen, sollte nachfolgend die Kristallstruktur der MAT aus *T. fusca* gelöst werden. Diese wurde durch die Arbeit der von mir betreute Masterstudentin Anika Altenfeld mit Unterstützung von Dr. Ingrid Vetter (MPI Dortmund, Abteilung für Mechanistische Zellbiologie) zugänglich.

### 3.6.2.1 Die Proteinstruktur der MAT aus *T. fusca*

Die Struktur der MAT aus dem moderat thermophilen Organismus *T. fusca*, mit einem molekularen Gewicht von 35 kDa, konnte mit einer Auflösung von 2,7 Å ( $R_{\text{free}} = 26,43$ ) in der Raumgruppe P1 mit achzehn Molekülen in der asymmetrischen Einheit gelöst werden. Der N-terminale Hexahistidin-Tag und die verlinkenden Aminosäuren, resultierend aus der Klonierung in die MCS von pETM11, waren teilweise nur in einer Kette sichtbar. Keines der achzehn Moleküle zeigte den ganzen Linker inklusive Hexahistidin-Tag. Wie auch die MAT aus *S. coelicolor* besteht die MAT aus *T. fusca* aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, wovon beide ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt aufweisen. In der großen Untereinheit (Aminosäuren 1-129 und 188-319), die ein *fabD* Lysophospholipase-ähnliches Faltungsmuster zeigt, sind die fünf parallelen  $\beta$ -Faltblätter von 13  $\alpha$ -Helices umgeben. Die kleine Untereinheit (130-187) beinhaltet vier antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und zwei  $\alpha$ -Helices und weist eine Ferredoxin-ähnliche Faltung auf. Das katalytische Zentrum mit dem Oxyanionloch ist in beiden MAT identisch, was auf einen konservierten Katalysemechanismus hindeutet (Abbildung 65). In beiden Enzymen zeigen die katalytischen Reste den gleichen, nicht präferierten Bereich des Ramachandran-Plot. Das Rückgrad der MAT aus *T. fusca* ist ihrem Analogon aus *S. coelicolor* sehr ähnlich ( $\text{rms } 302C_{\alpha} = 0,87$  Å). Ein deutlicher Unterschied liegt jedoch in einer gut geordneten  $\alpha$ -Helix in der MAT aus *T. fusca* im Gegensatz zu einem ungeordneten *Loop* der mesophilen MAT (Abbildung 71, sandfarben). Diese zusätzliche Helix ist fest in die Proteinfaltung

integriert und trägt zu den einzelnen Kristallkontakten bei. Weitergehend können geringfügige Unterschiede zwischen einzelnen Helices im Bezug auf ihre Größe (Bsp. *T. fusca*  $\alpha 1$  und  $\alpha 12$  sind zwölf Aminosäuren länger) sowie einige leicht verschobene *Loops* und Regionen detektiert werden.



**Abbildung 71:** Überlagerung der Proteinstrukturen der MAT aus *T. fusca* (blau) und der MAT aus *S. coelicolor* (türkis). Die große und die kleine Untereinheit beinhalten jeweils ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt, dass von mehreren  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die MAT aus *T. fusca* weist eine weitere  $\alpha$ -Helix (sandfarbend) im Vergleich zum ungeordneten *Loop* der MAT aus *S. coelicolor* auf. Die postulierten katalytischen Reste Ser97 und His201 finden sich innerhalb der MAT aus *T. fusca* an Position 95 und 195 und sind im Stabmodell gezeichnet.

Einer genauerer Vergleich beider Kristallstrukturen zeigte, dass die MAT aus *T. fusca* mehr Salzbrücken (neun im Vergleich zu sechs) und deren Netzwerke (zwei im Vergleich zu null) ausbildet als die MAT aus *S. coelicolor*. Da Salzbrücken und vor allem deren Netzwerke als stabilisierende Elemente bekannt sind, korrelieren diese Beobachtungen mit der von der MAT aus *T. fusca* ausgehenden, erhöhten Thermostabilität.

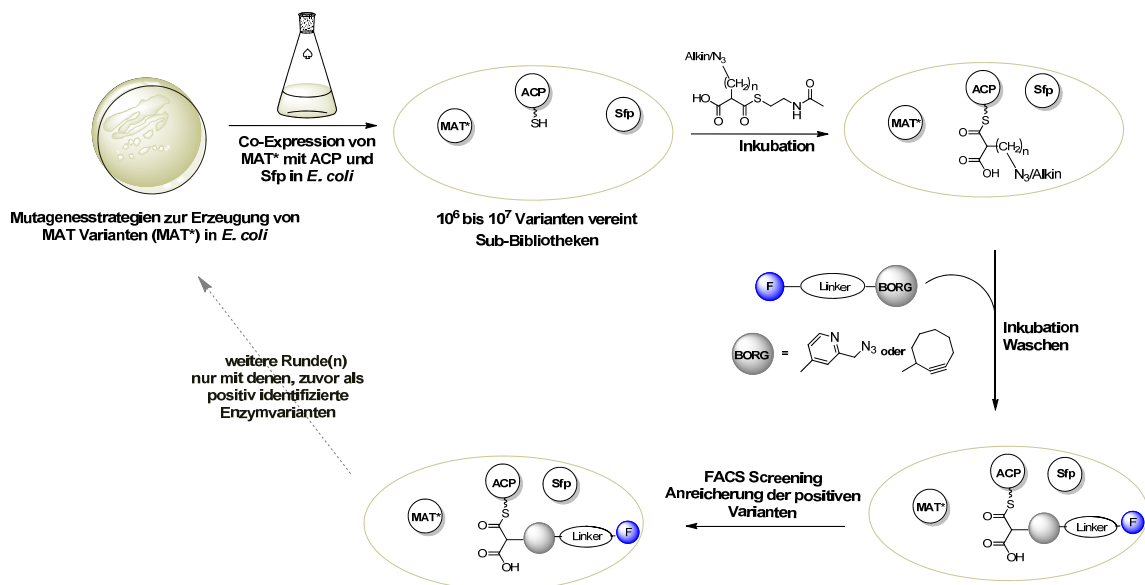


### 3.6.2.2 Eine Plattform für die Gerichtete Evolution der MAT

Mit dem Ziel vor Augen, die Substratspezifität der *trans*-agierenden MAT aus *T. fusca* in Richtung der Akzeptanz nicht-natürlicher Substrate zu verschieben, sollten im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Mutagenesetechniken zur Erzeugung von Enzybibliotheken etabliert werden.

Dabei ist zu erwarten, dass die zuvor identifizierte MAT aufgrund ihrer moderaten Thermostabilität einen geeigneten Startpunkt für diese Experimente bietet.<sup>[143,144,145]</sup>

Die einzelnen Mutagenesetechniken sollten im Rahmen dieser Arbeit für die MAT etabliert werden. Weitergehende Experimente zu Generierung der verschiedenen Varianten-Bibliotheken sollten von Kyra Koopmans während ihrer Masterarbeit durchgeführt werden. Nachfolgend sollen die verschiedenen Bibliotheken mittels FACS Screen (*fluorescence activated cell sorting*) analysiert werden (Abbildung 72).



**Abbildung 72: Schematischer Versuchsaufbau zur gerichteten Evolution der MAT aus *T. fusca*.** Durch verschiedene Mutagenesestrategien werden MAT Varianten erzeugt, die nachfolgend in Bibliotheken unterteilt mit Sfp und ACP6 aus DEBS coexprimiert werden. Hierauf folgt eine Inkubation mit dem alkin- oder azidmodifizierten Malonsäurederivat. MAT Varianten die diesen nicht-natürlichen Baustein als Substrat akzeptieren übertragen ihn auf das ACP. Waschschritte entfernen den nicht gebundenen Baustein aus den Zellen, bevor eine Inkubation mit dem Reportersubstrat erfolgt. Innerhalb der Zellen kann nun eine 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen dem Reportersubstrat und dem auf das ACP übertragenen Baustein stattfinden. Mittels FACS Screening erfolgt eine Anreicherung der positiven Enzymvarianten die das Alkin- oder Azidmodifizierte Malonsäurederivat akzeptiert und es auf das ACP übertragen haben. Es folgen weitere Mutagenese- und Screening-Runden um so durch die Anlegung evolutionären Drucks die Substratspezifität weiter in Richtung des nicht-natürlichen Bausteines zu verschieben. Abkürzungen: Fluorophor (F), Bioorthogonale reaktive Gruppe (BORG).

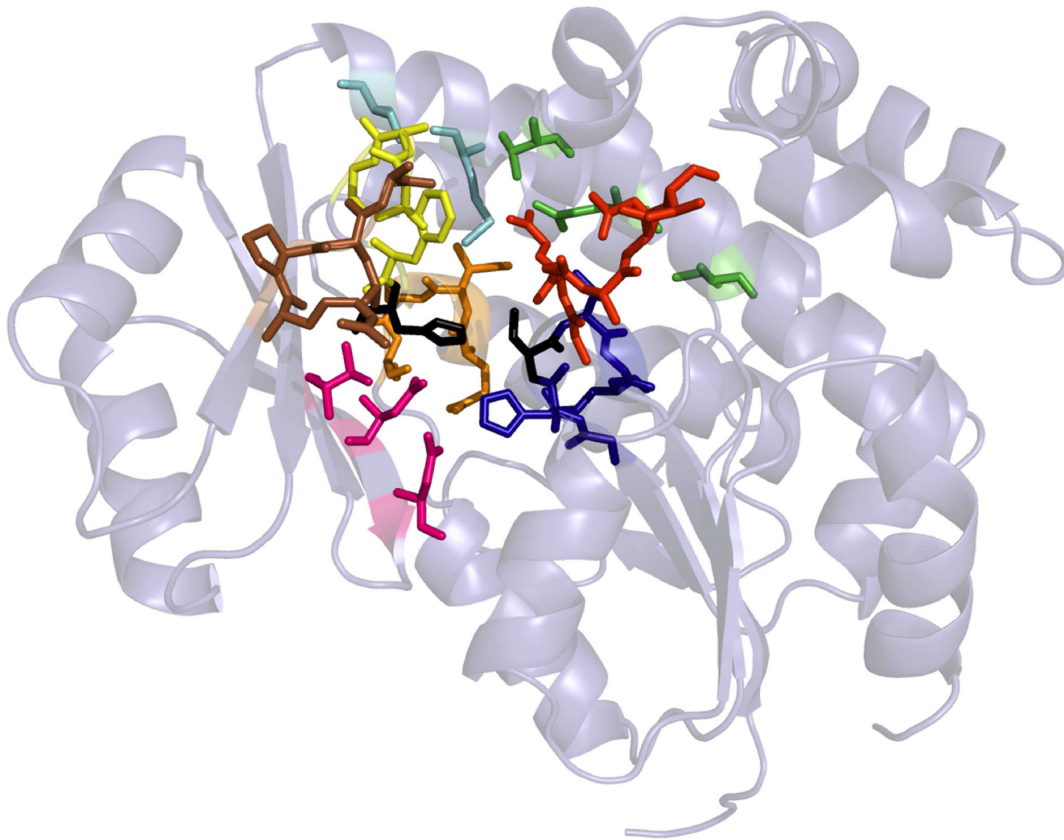
Hierfür sollen die einzelnen MAT Varianten zusammen mit holo ACP exprimiert werden, bevor die Zellen des heterologen Testsystems mit einem Reportersubstrat

inkubiert werden. Positive Zellen (die den Einbau ermöglicht haben) werden durch den FACS Screen aussortiert.

Diese Experimente sind der Start für einer gerichteten Evolution <sup>[146,145,147]</sup> einer MAT in Richtung der Akzeptanz einer nicht-natürlichen Verlängerungseinheit und nachfolgender Einbau in die Polyketid Biosynthese.

### Anwendung der Sättigungsmutagenese

Basierend auf der gelösten Kristallstruktur sowie durchgeführter Sequenzvergleiche aller bisher kristallisierten MAT wurden Reste identifiziert, die möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität (basierend auf der Kristallstruktur) oder auf katalytische Funktionen des Enzyms haben.



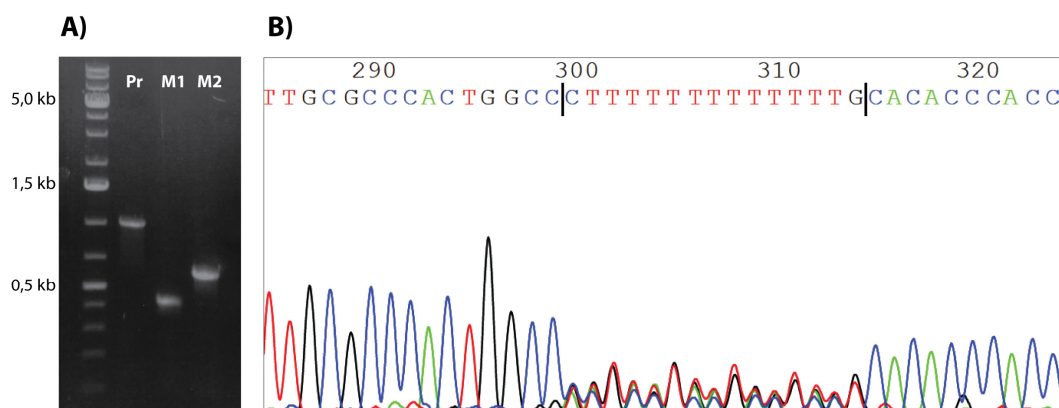
**Abbildung 73: Proteinstruktur der MAT aus *T. fusca* mit markierten Mutagesesezielen (grau).** Die Aminosäuren der einzelnen geplanten Bibliotheken sind als farbige Stabmodelle dargestellt: Bibliothek 1 und 2 rot, 3 gelb, 4 grün, 5 blau, 6 hellblau, 7 pink, 8 braun und 9 orange. Die Aminosäurebereiche der einzelnen Bibliotheken sind in Tabelle 11 aufgezeigt. Die katalytischen Reste, Ser95 und His195 sind als schwarze Stabmodelle hervorgehoben.

Die einzelnen identifizierten Reste umgeben die postulierte Bindetasche des Enzyms (Abbildung 73). Die Sättigungsmutagenese dieser Reste unter Verwendung degenerierter Oligonukleotide, sollte in neun verschiedenen Bibliotheken resultieren.

**Tabelle 11: Geplante Enzymvarianten-Bibliotheken der MAT**

Bibliothek	Farbe der Stabmodelle Abbildung 73	Anmerkung
1	rot	Gly8-Val13
2	rot	Gly8-Val13 ohne Gln9
3	gelb	Val190-Phe194
4	grün	Thr56;Gln60;Val64
5	blau	Gly90-Glu95 ohne Ser92
6	hellblau	Met121;Ser125
7	pink	Asn156;Asn158;Val164
8	braun	Arg186-Ala189
9	orange	Gln244-Ser247

Die Technik der Sättigungsmutagenese sollte anhand der geplanten Enzymvariante Val190-Phe194 etabliert werden. Hierzu wurden mittels PCR die Produkte M1 (C-Terminus) und M2 (N-Terminus) der *mat* unter Verwendung der degenerierten Oligonukleotide mittels PCR amplifiziert (Abbildung 74) und die Produkte nach einem *DpnI* Verdau unter Verwendung von Sure Clean® gefällt. Die in ddH<sub>2</sub>O resuspendierte DNA wurden nachfolgend in eine zweite PCR zur Assemblierung beider Fragmente eingesetzt. Die Sequenzierung des mittels *overlap extension* PCR erhaltenen Produktes zeigte deutlich die gewünschte gleichmäßige Verteilung der einzelnen Nukleotide in dem für Val190 bis Phe194 codierenden Bereich auf (vgl. Abbildung 74).



**Abbildung 74: Sättigungsmutagenese Val190-Phe194.** **A** Gelelektrophorese: die Fragmente M1 und M2 wurden in einer zweiten PCR assembliert (Pr). **B** Sequenzierung des PCR-Produktes zur Generierung der Bibliothek 3, an den Positionen Val190 bis Phe194

Um die deutliche Varianz der einzelnen DNA-Fragmente (*mat*<sup>\*</sup>) weitergehend zu betrachten, wurde das PCR Produkt einem Restriktionsverdau mit *PciI/HindIII* unterzogen werden bevor dieses in die *NcoI/HindIII* Schnittstelle von pETM11 kloniert wurde. Die Plasmid-DNA einzelner Klone wurde isoliert und ebenfalls sequenziert. In Abbildung 75 ist der Sequenzvergleich zwischen der *mat* aus *T. fusca* und fünf dieser Mutanten dargestellt. Es wird sehr gut sichtbar, dass keine Mutante der anderen gleicht (s. Abbildung 75 sowie Abbildung 76). Betrachtet man alleine innerhalb der fünf Mutanten den im Wildtyp für Val190 codierenden Bereich (vgl. Abbildung 75), so weist hier keine der Mutanten eine für Valin codierende Aminosäuresequenz auf.

	Val190 – Phe194
<i>T. fusca</i>	CGTTTGCGCCCACTGGCCGTGGCTGGGGCATTTCACACCCACCATATGGC
1)	CGTTTGCGCCCACTGGCCATGATTGTTAGTATTACACACCCACCATATGGC
2)	CGTTTGCGCCCACTGGCCTAGTGTTTTGTGGAGCACACCCACCATATGGC
3)	CGTTTGCGCCCACTGGCCAGTAATCCTATTTTCGCACACCCACCATATGGC
4)	CGTTTGCGCCCACTGGCCGGTATGAATAGGTTCGCACACCCACCATATGGC
5)	CGTTTGCGCCCACTGGCCGAGGCGGCGCGGTTCGCACACCCACCATATGGC

**Abbildung 75: Sequenzvergleich der Nukleotidsequenz der *mat* aus *T. fusca* im codierenden Bereich von Val190-Phe194 mit den korrespondierenden Sequenzen verschiedener Mutanten.**

<i>T. fusca</i>	Val	Ala	Gly	Ala	Phe
1)	Met	Ile	Val	Ser	Ile
2)	Stop				
3)	Ser	Asn	Pro	Ile	Ser
4)	Gly	Met	Asn	Arg	Ser
5)	Glu	Ala	Ala	Arg	Ser

**Abbildung 76: Translation der Nukleotidsequenz der *mat* aus *T. fusca* im codierenden Bereich von Val190-Phe194 sowie der in Abbildung 75 aufgezeigten Mutanten.**

Die Generierung aller neun Bibliotheken müsste auf dieser Basis unproblematisch durchführbar sein. Die Größe der einzelnen Bibliotheken könnte jedoch kritisch sein, da für eine 95 %ige Abdeckung aller möglichen Kombinationen bei sechs auszutauschenden Aminosäuren alleine  $10^8$  Klone generiert werden müssen.<sup>[148]</sup>

### Anwendung der Error-Prone-PCR

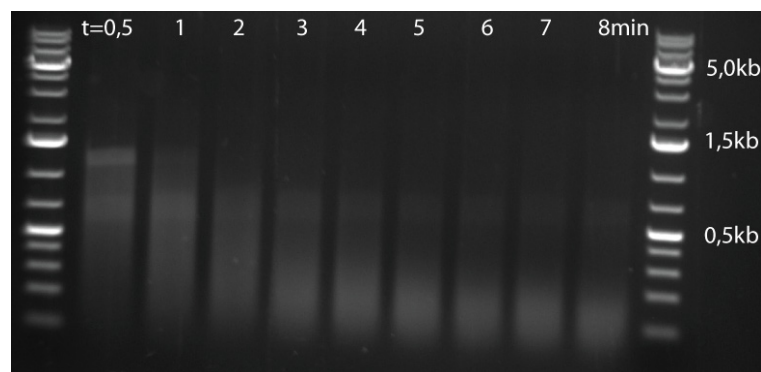
Um ausgeglichene zufallsbasierte Mutantenbibliotheken der *mat* aus *T. fusca* zu generieren, wurde die *error-prone* PCR mit Hilfe des Jena Bioscience *error-prone* Kits durchgeführt. Die Anzahl der Fehler korreliert sowohl mit der Templat-Menge als

auch der PCR Cyclenzahl. Für die Etablierung wurden drei verschiedene Templatkonzentrationen (0,01, 10 und 100 ng) in die PCR eingesetzt und das PCR Produkt nach Gelaufreinigung und Verdau mit den Restriktionsenzymen *PciI/HindIII* in den geschnittenen Vektor (pETM11; *NcoI/HindIII*) kloniert. Jeweils zwei potentiell richtige Klone wurden mittels Kolonie PCR isoliert und die DNA sequenziert. Es konnten Punktmutationen, Deletionen und Insertionen beobachtet werden. Eine weitergehende Optimierung dieser Methode scheint nicht notwendig zu sein.

### **Shuffling Experimente zwischen der MAT aus *T. fusca* und der aus *S. coelicolor***

Das klassische DNA *Shuffling* nach Stemmer basiert auf der homologen Rekombination von DNA *in vitro* durch Fragmentierung und Reassemblierung.<sup>[149]</sup> Die Technik des *Shuffling* ermöglicht somit, die Gene zweier homologer Proteine miteinander auf zufällige Weise zu rekombinieren und eine möglicherweise optimierte Enzymvariante zu erhalten. Jedoch ist ein hoher Grad an Homologie für die Anwendung dieser Mutagenesetechnik erforderlich. Ein Nachteil beim DNA *Shuffling* sind die dabei eingeführten Punktmutationen, die mit ~ 0,7 % auftreten<sup>[150]</sup>, aufgrund der inhärenten Fehlerrate der zur Amplifikation eingesetzten Polymerase. Dieser Nebeneffekt kann durchaus erwünscht sein, wirkt sich jedoch vor allem bei einer hohen Fehlerrate und langen Genen eher negativ aus.

Die Fragmentierung der stöchiometrisch eingesetzten DNA erfolgte durch einen Verdau dieser mit *DnaseI*. Um die optimale Inkubationsdauer zu ermitteln, wurde über einen Zeitraum von 8 min der partielle Abbau der DNA durch das Enzym dokumentiert (s. Abbildung 77). Eine Inkubationsdauer von 3,5 min bei einer finale *DNaseI* Konzentration von 0,025 U wurde für nachfolgende Fragmentierungen gewählt.



**Abbildung 77: Fragmentierung der DNA mittels *DNaseI* Verdau über einen Zeitraum von 8 min.**

Die gereinigten Produkte wurden mittels PCR assembliert und sollten nachfolgend in einer zweiten PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert werden, was zu keiner Produktbildung führte. Nicht einmal eine schwache Produktbande war im Gel sichtbar.

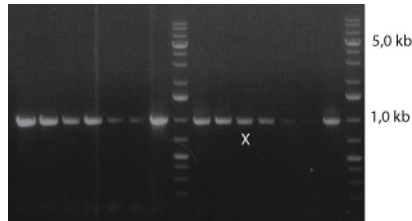
Die Erfolgsquoten eines *Shuffling*-Experimentes stehen und fallen mit der Homologie der einzelnen DNA Sequenzen. Mit einer Sequenzhomologie von 69,5 % der *E. coli* codonoptimierten Gensequenz beider Organismen und einer weitaus geringeren Sequenzidentität von 57,8 % liegen diese Werte unterhalb der laut Literatur erforderlichen. Nachfolgend sollte deshalb die *Codon-usage* der *mat* aus *S. coelicolor* an die der *mat* aus *T. fusca* angepasst werden. Da die kommerziellen Anbieter „MWG Eurofins“ und „life technology“ keine computergestützte Lösung für dieses Problem hatten, wurde die Sequenz eigenständig manuell angepasst. Durch einen Austausch der einzelnen Nukleobasen (unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz) konnte so die Sequenzidentität auf 69,5 % gesteigert werden und liegt nun im Bereich der laut Literatur erforderlichen Sequenzidentität. In Abbildung 78 ist ein Aminosäuresequenzvergleich der *mat* dargestellt. Deutlich ist hier die Steigerung der Homologie erkennbar.

<i>T. fusca mat</i>	ATGCTTGCATTTGTTGCCCTGGTCAAGGTGCGCAAAGTGCCTGGGCTTTCTTAGCCGCTTGGCTGGAACGTG
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	ATGCTGGTGTCTTGTGGCCCTGGTCAAGGTGCGCAAACGCCGGGCTTTCTGACCGATTGGCTGGCACTG
<i>S. coel. mat</i>	ATGCTGGTACTGGTTGCTCTGGTCAAGGTGCACAGACGCCCTGGGTTCTGACTGACTGGTTGGCGGTTA
<i>T. fusca mat</i>	CCGGGTATGGCGAACGTTTTCGGAGTGGTCCGATGTGGTGGGCTTAGACCTGGTGGCCTATGGCACC
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	CCGGGTGCGCGGACCGTGTTCGGCGTGGTCCGATGCGATTGGCTTAGACCTGGCGCATTGGCACC
<i>S. coel. mat</i>	CCGGGTGCAGCCGACCGTGTTCGGCGATGGAGCGATGCGATTGGCCTCGATCTGGCCATTTCGGGACG
<i>T. fusca mat</i>	ACAGCCGATGCGGAAGAGATTTCGCGATACCCTGGTTCGCGAGCCCTTCTGGTGAGT GCTGGCATTGC
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	AAAGCCGATGCG GACGAGATCCGCGATACCCTGGTTCGCCAACCCGCTTCTGGTGGCAGCTGGCATTCT
<i>S. coel. mat</i>	AAAGCCGATGCG GACGAAATCCGCGATACCCTGGTTCGCCAACCCGCTTTCGGTTCGAGCCGGTATCT
<i>T. fusca mat</i>	GGCGCGATAGCCTTATT-----CGGTGACTTGAATC-----AGCGGCTGCGAGTGCAGATGT
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	GTCGGCGGCAAGCCTTGGGCACACAGACTAGTGTGCTGACGCGACAGGACCGGGTTTTACTCCGGTGC
<i>S. coel. mat</i>	GTCAGCGGCTGCGTTGGGCACACAGACTAGTGTTCGGATGCGCACAGGCCGGGTTTTACCCAGGTGC
<i>T. fusca mat</i>	GGTTCGCGGTCATTTCGGTGGCGAATTACCGCGGCAAGCGTTGCAGGCGCGTTGACTCCCCGCGATGC
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	GGTTCGCGGTCATTTCGGTGGCGAATTACCGCGGCAAGTGTTCAGGCGCGTTGGATGATACCCGCGC
<i>S. coel. mat</i>	GGTAGCAGGCCACTTGTGGCGGAGATTACCGCGGCGGTTATTCAGGAGTGCCTGACGATACCCGCGC
<i>T. fusca mat</i>	CCTTCT GCTGGTAGCTGAACTGGTTCGGTGGATGGCGGAGGCTAGTGCCTAACCCGACTGGCATGA
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	CCTTTC GCTGGTAGCTGCTGCTGGGCTTGGATGGCGGAGGCTGCTGCCGTAAAGAAACTGGCATGT
<i>S. coel. mat</i>	CTTATC GCTGGTCCGTGCTGCTGGCTTGAATGGCGGAGCCGCGGCCCTTACCGAAACCGGTATGT
<i>T. fusca mat</i>	CCGGGTATGGGAGGGATCGGGATGAAGTCTTAGCGGCATCAAAGCGCGGGGCTCACGCCGGCGA
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	CCGGCTATGGGAGGGATCCGGAAGTCAGCGTGGCGCACTGGAACGCTTGGGCTCACGCCGGCGA
<i>S. coel. mat</i>	CCGGCTTCTGGGAGGCGATCCGGAAGTCAGCGTGGCACACTGGAACGCTTGGGCTGACTCCAGCGA
<i>T. fusca mat</i>	ATGACAACGGTTCAGCCAGATTGTCGAGCGGGAACCATGGAACAGCTGGCAGCACTGAATGA-GGAC
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	ATGTGAACGGTGTCTGCCAGATTGTCGAGCGGGAACCATGGAACAGCTGGCAGCACTGAATGA-GGAC
<i>S. coel. mat</i>	ACGTGAACGGAGCTGCTCAGATTGTCGAGCGGTTACCATGGAACAGCTGGCCGCTGAATGA-GGAC
<i>T. fusca mat</i>	-CGCCTGCACGGGACGTT---TGCGCCACTGGCCGTGGCTGGGGCATTTCACACCACCATATGGCC
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	AAGCCGGAAGGGGTACGGAAGTCTGACACTGAAAGTGGCTGGGGCATTTCACACCACCATATGGCC
<i>S. coel. mat</i>	AAGCCGAGGGTGTCCGGAAGTGTACCCTGAAAGTGGCGGGGCTTTCACACACGCCATATGGCT
<i>T. fusca mat</i>	CCGGCCGTA---AAAGCGTGAAGCCTTAGCAGCGACACTGACGCTGCCGATCCGCGTACTCGCCT-
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	CCGGCCGTAGACAAGCTCGCAGAAGCCGCGAAAG---CCCTGACGCTGCCGATCCGAAGG-TGACCTA
<i>S. coel. mat</i>	CCGGTGTGGACAAGCTCGCAGAAGCCGCGAAAG---CCCTGACTCCAGCGATCCGAAGG-TGACCTA
<i>T. fusca mat</i>	CCTGAGCAATCGCGATGGCGCCGCTGCTGACTTCCGGAAGCGAGTACCTGAGCCGTCTGGTGGCCAGAT
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	TGTGAGCAATAAAGATGGCCGTGCGGTGGATCCGGAACCGAGGCTCTGGATCGTCTGGTGGCCAGGT
<i>S. coel. mat</i>	TGTGAGCAACAAAGATGGCCGTGCGGTGCAAGTGGCAGGAGGTTAGATCGCTGGTGGCCAGT
<i>T. fusca mat</i>	CTCGTCGCCAGTCCGCTGGGACGCATGCACCGCTACCCTGGCCGACTTGGGTGTGACGGCACTCATGGA
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	CGCAAATCCAGTCCGCTGGGACCTATGCATGGAACCTTCAAAGAATTGGGTGTGACGGCAATCATCGA
<i>S. coel. mat</i>	CGCAAATCCGCTGCGCTGGGATCTGTGCATGGAACGTTCAAAGAACTGGCGGTTACCGGATCATCGA
<i>T. fusca mat</i>	ACTGCCACCGGCGCGCACCCCTACGAACCTGGCTAAACCGCGTTTTACCGGTTGTGAGCTGCTGGCGAT
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	AGTATGTCCGGCGGCGCACCCCTACGGCCCTGGCTAAACCGCGTTTTACCGGTTGTAAACCTGGCGCT
<i>S. coel. mat</i>	AGTATGTCCGGTGGGACCCCTACGGGCTTAGCCAAACCGCGTTACCGCGGTGAAACCTGGCACT
<i>T. fusca mat</i>	CAAGTCTCCGAGGATCTGGACCGTGCCTGACGTTGGTTCAGATCATGGCGGTGCAACGCTTACCGA
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	GAAGACTCCGGACGATCTGGACGCTGCCTGAACTGGTTCAGAGCATAAC-----
<i>S. coel. mat</i>	GAAAACCCCTGACGATCTGGATGCTGCTCGCGAATCGCTGCTGAGCATAAC-----
<i>T. fusca mat</i>	CCTGGAAGGCCAGGCTTAATAA
<i>S. coel. mat_angepasst</i>	-----CCAGGCCTAATAA
<i>S. coel. mat</i>	-----CCAGGCCTAATAA

**Abbildung 78: Sequenzvergleich der *mat*.** Identische Nukleotide aller drei Gensequenzen sind grau hinterlegt, identische Nukleotide zwischen der *mat* aus *T. fusca* und der angepassten *mat* sind darüberhinaus türkis hinterlegt.

Die mittels *DNA*sel fragmentierte DNA der angepassten *mat* aus *S. coelicolor* und der *mat* aus *T. fusca* konnten in einem weiteren Versuchsansatz mittels PCR assembliert und darauf folgend unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide

amplifiziert werden. Unterschiedliche Konzentrationen des assemblierten Reaktionsgemisches wurden hierfür in eine zweite PCR eingesetzt.



**Abbildung 79: Gelelektrophorese der PCR Produkte nach Amplifizierung mit spezifischen Oligonukleotiden unter Verwendung einer Pfu-DNA-Polymerase. Links spezifische Oligonukleotide zur Amplifizierung der *mat* aus *T. fusca*, Rechts spezifisch für *S. coelicolor*. Von links nach rechts abnehmende Templatkonzentration: pur; 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:75 und 1:100.**

Maßgeblich entscheidend war hier der Einsatz der *Pfu*-DNA-Polymerase in beiden PCR. Bei Verwendung der Phusion-Polymerase wurden zwar Produkte amplifiziert, jedoch entsprachen diese nicht der gewünschten Größe von ca. 1 kb. Das mit einem X markierte PCR Produkt (Abbildung 79), amplifiziert mit für *S. coelicolor* spezifischen Oligonukleotiden) wurde gelgereinigt und nach einem Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *PciI* und *HindIII* in den mit *NcoI/HindIII* geschnittenen Vektor pETM11 kloniert. Omnimax Transformanten wurden unter Selektionsdruck kultiviert und potentiell positive Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert. Die Plasmid-DNA von acht dieser Klone wurde isoliert und die Gensequenz mittels Doppelstranganalyse sequenziert. Nur eine der acht sequenzierten Gensequenzen zeigte das erwünschte Bild. Vier der acht Klone zeigten die Gensequenz der *mat* aus *S. coelicolor* (Wt, angepasst). Weitere drei Klone wiesen eine komplett zerstückelte und randomisiert amplifizierte DNA mit großen *non-sense* Bereichen auf. Innerhalb Klon 2 konnten vier *crossover*-Stellen (Abbildung 80 mit roten Ausrufezeichen gekennzeichnet) identifiziert werden. Weitergehend weist die Sequenz drei Punktmutationen auf.

Betrachtet man die Lage der einzelnen *crossover* Bereiche, so liegen diese wie erwartet innerhalb hoch konservierter Regionen. Die Abbildung 81 visualisiert die unterschiedliche Nukleotidähnlichkeit über den Verlauf der Gensequenz. Hierbei entspricht eine Ähnlichkeit von +1 100% Sequenzhomologie. In Anbetracht dieser Grafik ist davon auszugehen, dass die Mehrzahl der *crossover* wohl im Bereich der ersten 200 Nukleotide stattfinden wird.

Es konnte aufgezeigt werden, dass die Methode des Shufflings bei angepasster Aminosäuresequenz gut durchführbar ist. Die Ausbeute von einem Klon aus acht



untersuchten ist zufriedenstellend und sollte für das geplante FACS Screen kein Problem darstellen.

```

!
mat NEU      ATGTTGGCGATTGTTGCCCTGGTCAAGGTGCGCAAAGTCCCGGGCTTTCTGACCGATTGGCTGGCACTGCCGGGTGGCGG
mat T. fusca ATGCTTGGCGATTGTTGCCCTGGTCAAGGTGCGCAAAGTCCCGGGCTTTCTTAGCGCTTGGCTGGAACTGCCGGGTATGGC
mat S. coel.* ATGTTGGTGTCTTGTGCCCTGGTCAAGGTGCGCAAACGCCGGGCTTTCTGACCGATTGGCTGGCACTGCCGGGTGGCGG

mat NEU      GGACCGTGTGGCGCGTGGTCCGATGCGATTGGCTTAGACCTGGCGCACTTTGGCACCAAGCCGATGCGGACGAGATCC
mat T. fusca GGAACGTTTTGCGGAGTGGTCCGATGTTGGTGGCTTAGACCTGGTGGCTATGGCACCAAGCCGATGCGGAAAGATTCC
mat S. coel.* GGACCGTGTGGCGCGTGGTCCGATGCGATTGGCTTAGACCTGGCGCACTTTGGCACCAAGCCGATGCGGACGAGATCC

mat NEU      GCGATACCTCGGTGGCCAAACCGCTTCTGGTGGCAGTGGCATTCTGTGGCGGCAGCCTTGGGCACACAGACTAGTCTC
mat T. fusca GCGATACCGCGGTGGCCAGCCCTTCTGGTGGTGGCATTTCGGCGCGGATAGCCTTAT-----T-----C
mat S. coel.* GCGATACCTCGGTGGCCAAACCGCTTCTGGTGGCAGTGGCATTCTGTGGCGGCAGCCTTGGGCACACAGACTAGTATC

mat NEU      GCTGACCGCACAGGACCGGTTTTACTCCCGTGGCGGTGCGGTCATTCGGTTGGCGAAATTCACCGGGCAGTGTTTGG
mat T. fusca GCTGACTTGAATCAGCGGCTGCGAGTGGTGGTGGCTTGGCGGATTCGGTTGGCGAAATTCACCGGGCAGCGTTTGC
mat S. coel.* GCTGACCGCACAGGACCGGTTTTACTCCCGTGGCGGTGCGGTTGCGGTCATTCGGTTGGCGAAATTCACCGGGCAGTGTTTGG

mat NEU      AGGCGTGTGGATGATACCGCGCCCTTTCGCTGGTACGTCGTGGTGGCTTGGCGATGGCGGAGGCTGCTGCCGTAACAG
mat T. fusca AGGCGGTTGACTCCCGCGATGCCCTTCTGCTGGTAGCTGAACGTGGTGGTGGGATGGCGGAGGCTAGTCCGTAACAC
mat S. coel.* AGGCGTGTGGATGATACCGCGCCCTTTCGCTGGTACGTCGTGGTGGCTTGGCGATGGCGGAGGCTGCTGCCGTAACAG

mat NEU      AAACCTGGCATGTCGCGCTATTGGGAGGGGATCCGGAAGTCAGCGTGGCGCACTGGAAACGCTTGGGGCTCACGCCGGCG
mat T. fusca CGACTGGCATGACCGCGTATTGGGAGGGGATCGGGATGAAGTCTTAGCGGCCATCAAAGCGCGGGGCTCACGCCGGCG
mat S. coel.* AAACCTGGCATGTCGCGCTATTGGGAGGGGATCCGGAAGTCAGCGTGGCGCACTGGAAACGCTTGGGGCTCACGCCGGCG

mat NEU      AATGTGAACGGTCTGGCCAGATTGTCGACGCGGGAACCAATGGAACAGCTGGCAGCACTGAATGAGGACAAGCCGGAAGG
mat T. fusca AATGACAACGGTTTCAGGCCAGATTGTCGACGCGGGAACCCATGGAACAGCTGGAAAGCACTGCTGCAGCACCCTGCACG
mat S. coel.* AATGTGAACGGTCTGGCCAGATTGTCGACGCGGGAACCAATGGAACAGCTGGCAGCACTGAATGAGGACAAGCCGGAAGG

mat NEU      GGTACGGAAAGTCGTGCCACTGAAAAGTGGCTGGGGCATTTCACACCCGCCATATGGCCCCGGCGTAGACAAGCTCGCAG
mat T. fusca GGCACGTT---TGCGCCCACTGGCCGTGGCTGGGGCATTTCACACCCGCCATATGGCCCCGGCGTAAACCGCTCGAAG
mat S. coel.* GGTACGGAAAGTCGTACCACCTGAAAAGTGGCTGGGGCATTTCACACCCGCCATATGGCCCCGGCGTAGACAAGCTCGCAG

mat NEU      AAGCCGCGAAAGCCCTGACGCTGCCGATCCGAAAGTGACCTATGTGAGCAATAAAGATGGCCGTACGGTGGCATCCGGA
mat T. fusca CCTTAGCAGCAGCACTGACGCTGCCGATCCGCGTACTCGCTCCTGAGCAATCGCGATGGCGCGCTGTGACTTCCGGA
mat S. coel.* AAGCCGCGAAAGCCCTGACGCTGCCGATCCGAAAGTGACCTATGTGAGCAATAAAGATGGCCGTACGGTGGCATCCGGA

mat NEU      ACCGAGGTCCTGATCGTCTGGTGGCCAGGTCGCAAAATCCAGTCCGCTGGGACCTATGCAATGAAACCTTCAAAGAATT
mat T. fusca AGCCGATACCTGAGCCGCTCTGGTGGCCAGATCTCGTCGCCAGTCCGCTGGGACCGATGCACCCCTACCCTGGCCGACTT
mat S. coel.* ACCGAGGTCCTGATCGTCTGGTGGCCAGGTCGCAAAATCCAGTCCGCTGGGACCTATGCAATGAAACCTTCAAAGAATT

mat NEU      GGGTGTGACGGCAATCATCGAAGTATGTCCGGCGGGCACCTCACGGGCTGGCTAAACGCGCTTTACCCGGTGTAAAA
mat T. fusca GGGTGTGACGGCACTCATGAACTGCCACCGGCGGCACCTCACGAACTGGCTAAACGCGCTTTACCCGGTGTGTGAGC
mat S. coel.* GGGTGTGACGGCAATCATCGAAGTATGTCCGGCGGGCACCTCACGGGCTGGCTAAACGCGCTTTACCCGGTGTAAAA

mat NEU      CCCTGGCGCTGAAGACTCCGGACGATCTGGACGCTGCCCGTGAACTGGTTCAGAGCATACCCAGGC-----
mat T. fusca TGCTGGCGATCAAGTCTCCGGAGGATCTGGACCGTGGCCGTACGCTGGTTCAGAGCATACCCAGGC-----
mat S. coel.* CCCTGGCGCTGAAGACTCCGGACGATCTGGACGCTGCCCGTGAACTGGTTCAGAGCATACCCAGGC-----

mat NEU      -----CTAATAA
mat T. fusca CTGGAAGCTAATAA
mat S. coel.* -----CTAATAA
    
```

Abbildung 80: Aminosäuresequenzvergleich zwischen *Shuffling*-Produkt des Klons 2 und den beiden *mat*. Identische Nukleotide aller drei Gensequenzen sind grau hinterlegt, identische Nukleotide zwischen der *mat* aus *T. fusca* und der angepassten *mat* sind darüberhinaus türkis hinterlegt.

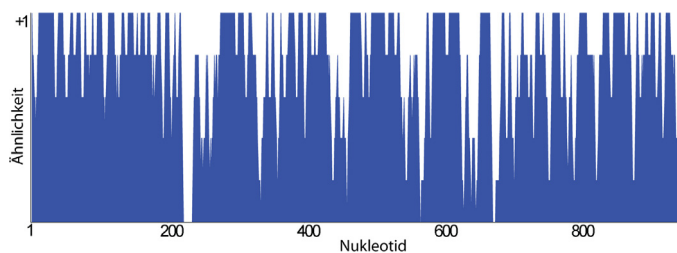


Abbildung 81: Sequenzähnlichkeit der beiden MAT codierenden Bereiche, dargestellt als *similarity plot* aus AlignX (Vector NTI Advance 10.0).

### Anwendung des *Random Priming* zur Rekombination beider MAT

Die 1998 von der Arbeitsgruppe um Frances H. Arnold publizierte Methode des *Random Primings* soll eine effektive Alternative zum *DNA Shuffling* nach Stemmer sein. Hierbei werden randomisierte Oligonukleotide verwendet, um eine große Anzahl von kleinen DNA Fragmenten zu generieren, die komplementär zu verschiedenen Bereichen der Templatsequenz sind.<sup>[151]</sup>

In dieser Arbeit führte diese Methode jedoch auch unter Einsatz verschiedener Konzentrationen randomisierter Oligonukleotid nicht zur Generierung von Genvarianten die eindeutige *crossover* Bereiche aufwiesen. In dem ersten Versuchsansatz wurden 7 nmol randomisiertes Oligonukleotid sowie 0,7 pmol Templat eingesetzt. Die Einzelschritte liefen wie erwartet ab, unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide konnten im letzten Schritt die ca. 1 kb großen PCR Produkte amplifiziert werden. Alles sprach bis zu diesem Punkt für einen Erfolg. Nachdem die PCR Produkte (*PciI/HindIII* geschnitten) in den geschnittenen Vektor (*NcoI/HindIII*) kloniert, und die Plasmid-DNA von potentiell richtigen Einzelklonen (durch Kolonie-PCR ermittelt) sequenziert worden war, musste diese Annahme revidiert werden. Die Sequenz aller 20 untersuchten Klone entsprach eher einer zufällig zusammen gesetzten, als auch nur annähernd einer der beiden *mat* Sequenzen (vgl. Abbildung 83). Zwar gibt es innerhalb der sequenzierten DNA Bereiche, die mit maximal zehn Basen homolog zu einer der beiden *mat*-Sequenzen sind, dazwischen befinden sich aber Bereiche mit mehr als 50 Basen, die scheinbar absolut willkürlich integriert wurden. Hierdurch resultierten Gensequenzen die eine Sequenzidentität von weniger als 30% zu den beiden *mat* aufwiesen.

```

T. fusca mat  GCGGTATTGGGAGGGGATCGGGATGAAGTCTTAGCGGCCATCAAAGCGGCGGGG
S. coel. mat  GCGGTTCTGGGAGGGGATCCGGAAGTCAGCGTGGCACACCTGGAACGCTTGGGG
Klon1        GCGGTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAACATCACCATCACCATCACCATGA
Klon2        GCGGTTTAAGAAGGAGATATACCATGAAACATCACCATCACCATCACCATGA

T. fusca mat  CTCACGCCGCGAATGACAACGGTTCAGGCCAGATTGTCGCAGCGGGAACCATG
S. coel. mat  CTGACTCCAGCGAACGTGAACGGAGCTGGTCAGATTGTTGCAGCGGGTACCATG
Klon1        GCGATTACGAC--ATCCCCACTACTGAGAATCTTTATTTTCA--GGGCGCCATG
Klon2        GCGATTACGAC--ATCCCCACTACTGAGAATCTTTATTTTCA--GGGCGCCATG

```

**Abbildung 82: Ausschnitt des Sequenzvergleiches zwischen den beiden *mat* und einer mittels *random priming* erzeugten Gensequenz.** Identische Nukleotide sind grau hinterlegt, non-sense bereiche in rot hervorgerufen. Nur wenn mindestens drei Aminosäuren der Plasmid-DNA in Folge homolog waren, wurden sie grau hinterlegt.

Zwar konnte, durch die deutliche Reduzierung der Oligonukleotid-Konzentrationen auf 1:1000 die nicht zuordenbaren Sequenzbereiche auf eine Größe von maximal 30 Nukleotide reduziert werden, die homologen Bereiche wiesen jedoch nicht mehr als 50 identische Basen auf. Auf eine weitere Optimierung wurde verzichtet, da die Erfolgsaussichten gering erschienen. Die Technik des *Random Primings* sollte nachfolgend nicht weiter verfolgt werden.

### 3.6.2.3 Diskussion

*Malonyl-CoA:Acyl Carrier Protein Transacylasen* (MAT) bilden eine interessante und vielseitige Enzymfamilie, die jedoch schwer zugänglich für Mutagenesen sind wie u.a. die Mitarbeiter von Chaitan Khosla aufzeigten. Diese Eigenschaft mesophiler MAT's korrespondiert mit dem Konzept der Evolvierbarkeit, die typischerweise mit der Enzymstabilität korreliert. Durch ein Experiment der Arbeitsgruppe um Frances Arnold konnte dieses deutlich aufgezeigt werden.<sup>[143]</sup> Sie verglichen die Ergebnisse einer gerichtete Evolution einer mesophilen und einer moderat thermophilen Variante von P450 BM3. Hierbei resultierte die zufällige Mutagenese der moderat thermophilen Variante im Gegensatz zur mesophilen in neuen Enzymvarianten, die eine verbreiterte Substratspezifität aufwiesen.

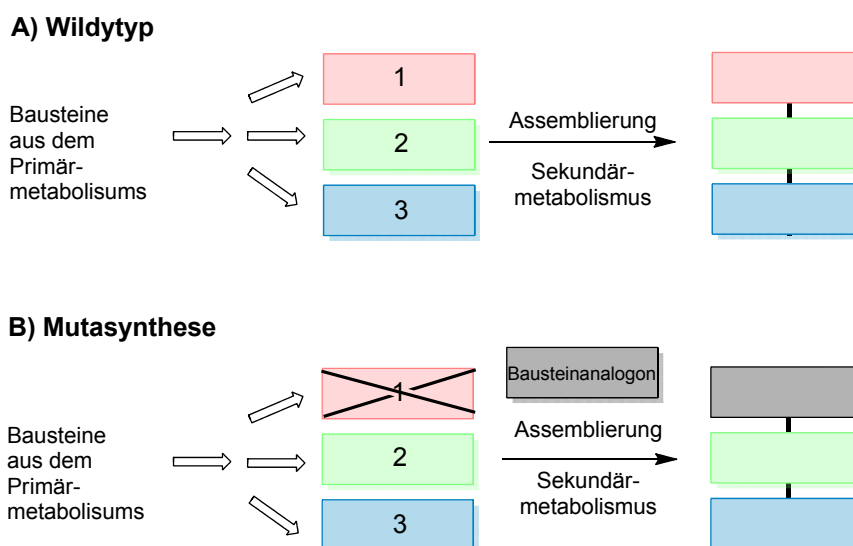
Die hier identifizierte und beschriebene, moderat thermostabile MAT Variante aus *T. fusca* zeigt, im Gegensatz zu der Variante aus *S. coelicolor* eine signifikant höhere Stabilität und ein homogenes Faltungsbild. Basierend auf dem Konzept der Protein Evolvierbarkeit wird vermutet, dass das neue Enzym einen wesentlich besseren Startpunkt für weitergehende Mutageneseprojekte bietet. Dieses wird durch die gelöste Proteinstruktur unterstützt und ebnet so den Weg zu einem rationalem Enzymdesign.

Zusammenfassend scheint die Anwendung einer künstlichen *cis-trans*-AT Hybrid PKS, in der die MAT ein nicht-natürliches Substrat akzeptiert und überträgt, immer greifbarer zu werden. Zwar sind noch eine Vielzahl von Modifikationen (*enzyme engineering*) notwendig, um die Substratspezifität der MAT zu verändern, aber basierend auf der Identifizierung einer moderat thermophilen Enzymvariante und der Etablierung der einzelnen Mutagenesetechniken für dieses Enzym, war man dem Ziel nie näher.



### 3.7 Anwendung der Mutasynthese zur Derivatisierung von Polyketiden

Einen weiteren vielversprechenden Ansatzpunkt in Richtung erhöhter Polyketid-Diversität bietet die Mutasynthese, die die Techniken der organischen Synthese mit der genetischen Manipulation von Biosynthesepfaden vereint (s. Abbildung 83). Der Begriff der Mutasynthese wurde 1977 durch Kenneth Rinehart definiert.<sup>[152]</sup> Diese Technik wurde 1991 erstmalig auf Polyketide angewandt wodurch 36 neue Avermectin Derivate erzeugt werden konnten.<sup>[153]</sup>



**Abbildung 83: Schematischer Überblick über die Mutasynthese. A** Biosynthese des Naturstoffes durch den Wildtyp-Produzenten. **B** Bei der Mutasynthese wird die Biosynthese einer nicht-produzierenden Mutante durch die heterologe Zufuhr eines Bausteines komplementiert. Lediglich das neue Produktanalogon wird bei Akzeptanz des Bausteinanalogons durch die Mutante biosynthetisiert.

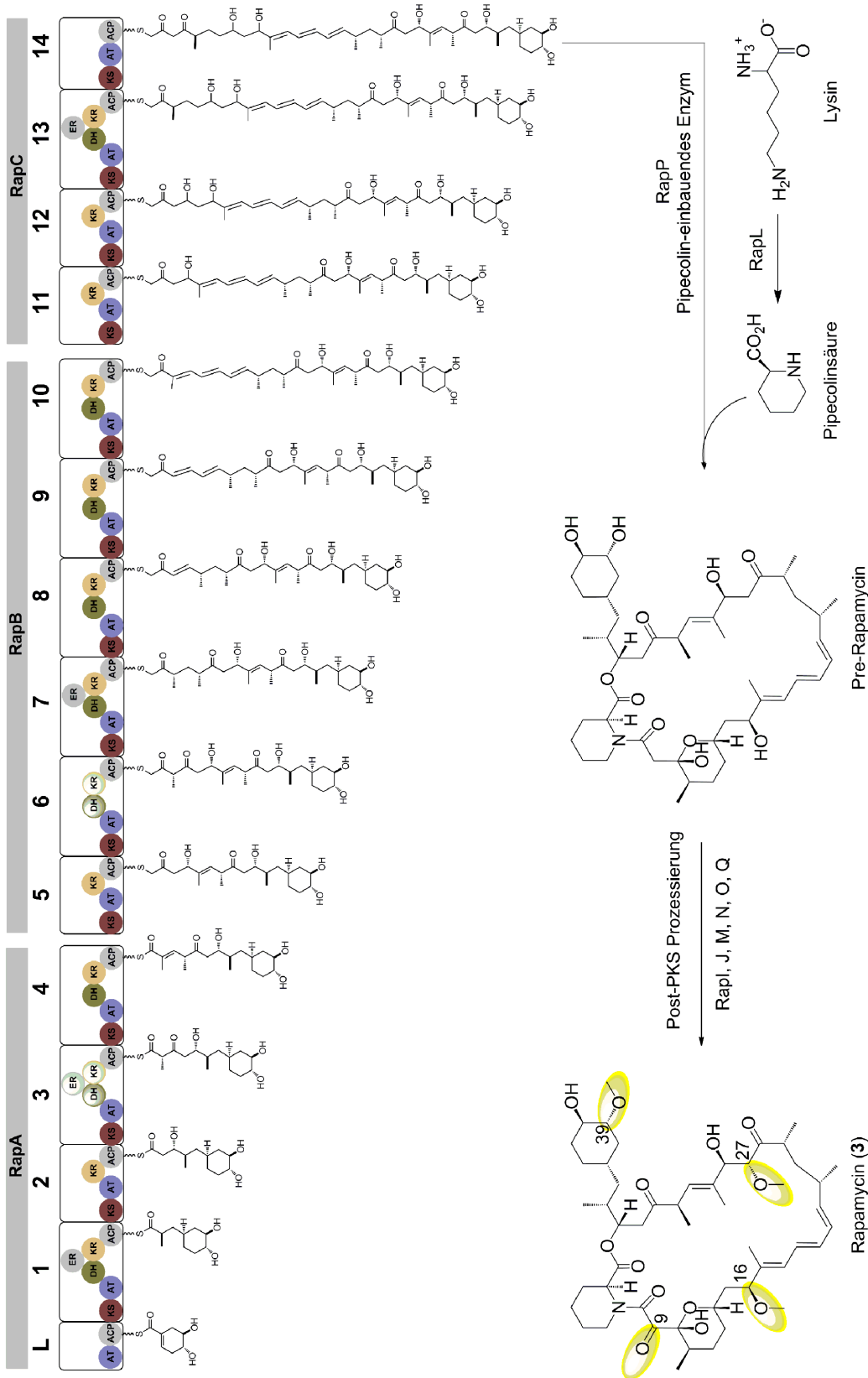
Bei dieser Technik wird eine mutierte PKS erzeugt, in der der Biosyntheseweg an bestimmten Stellen unterbrochen oder die Fähigkeit einen notwendigen Vorläufer zu generieren unterbunden wird. Erstes geschieht typischerweise durch eine Inaktivierung der KS-Domäne des ersten Moduls, so dass die Synthese die Biosynthese nicht durch die Startereinheit initiieren kann.<sup>[26, 154]</sup> Der Kettenaufbau wird dann durch die Zufuhr eines nicht-natürlichen Diketid oder Triketid Intermediats gestartet.<sup>[85]</sup> Wird der nicht-natürliche Synthesebaustein von der PKS erkannt, ist das resultierende Polyketid an der entsprechenden Position verändert. Durch den

immensen Anstieg an verfügbaren Sequenzinformation vieler Naturstoff-Biosynthesewege in den letzten Jahren können eine Vielzahl möglicher Kandidaten für die Konstruktion solcher Nullmutanten identifiziert werden. Dies bietet einen enormen Vorteil gegenüber der altertümlichen zufälligen Mutagenese.

### **3.7.1 Untersuchungen der Substratflexibilität der Rapamycin-Biosynthesemaschinerie**

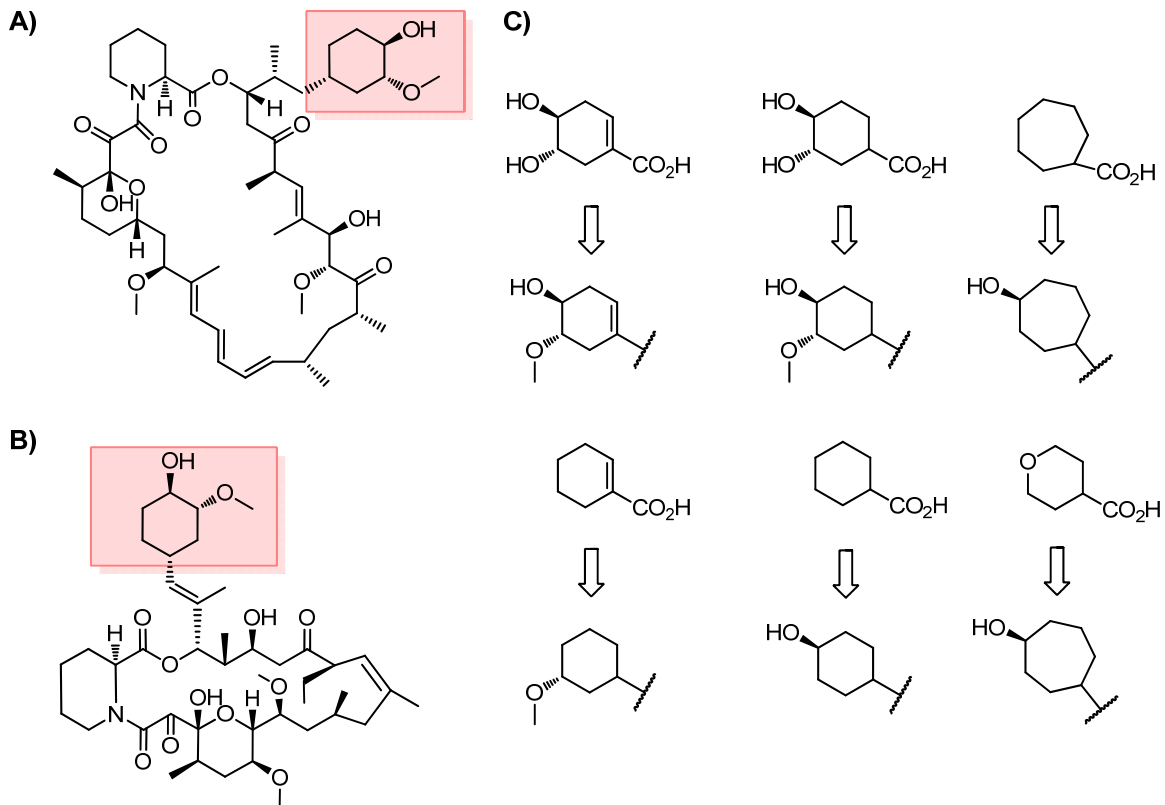
Rapamycin (**3**) ist ein Polypeptide-Polyketid-Hybrid, der durch *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert wird.<sup>[85]</sup> Der biosynthetische Gencluster beinhaltet ein gemischtes Typ-I PKS / nicht-ribosomale Peptid Synthase System (vgl. Abbildung 84).<sup>[155]</sup> Die Biosynthese der Polyketidkette wird durch den Einbau der von Shikimikisäure abgeleiteter 4,5-Dihydroxycyclohex-1-encarbonsäure (DHCHC) Startereinheit initiiert. Es folgen 14 Kondensationschritte in denen sieben Malonyl-CoA und sieben Methylmalonyl-CoA als Bausteine der wachsenden Kette zugeführt werden. Das Kettenwachstum wird durch die Bindung von Pipecolinsäure durch eine nicht-ribosomale Peptid Synthase (NRPS) komplementiert, die ebenfalls den Macrolacton-Ringschluss katalysiert. Nachfolgend erfordert die finale Bildung von Rapamycin post-PKS Modifizierungen, die sowohl Oxidationen durch P450 Monooxygenasen als auch O-Methylierungen durch S-adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen beinhaltet (Abbildung 84).<sup>[156]</sup>

Basierend auf seinen bedeutenden pharmakologischen Eigenschaften (bindet an das Protein mTOR → inhibiert das Signal für Zellzyklusprogression, Wachstum und Proliferation) bietet Rapamycin eine interessante Leitstruktur für die Entwicklung von Substanzen mit anti-karziogen, anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften.<sup>[157]</sup>



**Abbildung 84: Die Rapamycin Biosynthese.** Der notwendige Baustein DHCHC wird durch rapK synthetisiert und initiiert die Rapamycin Biosynthese. Der Rapamycin-Vorläufer Pre-Rapamycin wird durch die Enzyme RapA, B, C, L und P biosynthetisch zugänglich. Die Enzyme RapA, B und C sind aus insgesamt 14 Modulen aufgebaut, wobei die reduktiven Domänen aus Modul 3 und 6 inaktiv sind. Die mittels post-PKS Prozessierung eingebrachten funktionellen Gruppen (gelb hinterlegt) komplementieren die Rapamycin Biosynthese.

Viele Rapamycin-Derivate, die sich in der klinischen Erprobung befinden oder bereits Anwendung finden, sind semi-synthetisch an der Position der Startereinheit (DHCHC) modifiziert.<sup>[85]</sup> Die Mutasyntese bietet hier eine hervorragenden Methode zur chemofermentativen Synthese. Viele dieser „Rapaloga“ wurden erfolgreich von der Firma Biotica erzeugt.<sup>[90,158]</sup> Die Mitarbeiter von Biotica generierten hierzu eine Blockmutante von rapK<sup>[90]</sup> die nicht mehr in der Lage ist den notwendigen Vorläufer DHCHC zu synthetisieren, wodurch die Rapamycin Biosynthese nicht mehr initiiert werden kann. Durch heterologe Zuführung von DHCHC oder nicht-natürlicher Derivate der Startereinheit konnte die Biosynthese komplementiert und eine Vielzahl neuer Polyketide generiert werden (vgl. Abbildung 85). Weitergehend konnte aufgezeigt werden, dass durch die Generation einer rapL-Blockmutante (Pipecolinsäure kann nicht mehr zur Verfügung gestellt werden) und der Bereitstellung von Pipecolinsäure-Derivaten sowie der Modifikation von post-PKS Enzymen weitere Rapaloga biosynthetisch zugänglich sind.<sup>[158]</sup>



**Abbildung 85: Mutasyntese von Rapamycin und Ascomycin.** A Struktur von Rapamycin, die von der Startereinheit abgeleitete Region ist farblich hinterlegt B Struktur von Ascomycin (FK520), die von der Startereinheit abgeleitete Region ist farblich hinterlegt C Struktur der Wildtyp-Startereinheit (DHCHC) und einiger Analoga die mittels Mutasyntese in die Biosynthese von Rapamycin durch eine rapK Blockmutante eingefügt worden sind.<sup>[85,90]</sup>



Darüberhinaus wurden ähnliche Analoga durch heterologe Zuführung (identische Starter- oder Endeinheit) an Blockmutanten des Stamm *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* erreicht, der die mit Rapamycin verwandte Substanz Ascomycin (s. Abbildung 85B) synthetisiert.

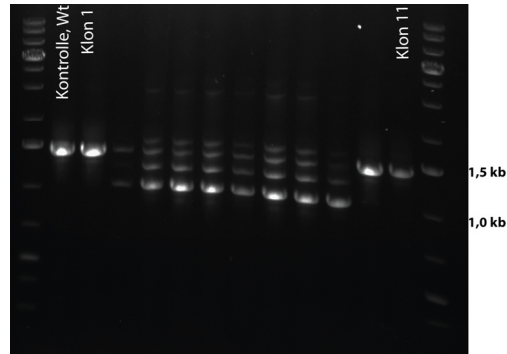
### 3.7.1.1 Generierung von Starter- und Endeinheit-Blockmutanten

Mit dem Ziel vor Augen, neue orthogonale Reaktivitäten in das Polyketid Rapamycin und das Analogon Ascomycin (FK520, *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*) einzuführen, startet die Generierung der Blockmutanten durch *in frame* Deletion mittels homologer Rekombination. Schnell wurde jedoch klar, dass dieses schwieriger als zuvor angenommen ist. Die Handhabung der beiden Stämme kristallisierte sich als besondere Herausforderung. Zum einen war ihr Wachstum sehr langsam. So vergingen meherer Wochen bis eine gut sporulierende Agarplatte verfügbar war, und das obwohl eine Vielzahl von Optimierungen im Bezug auf die Kultivierung vorgenommen wurden. Außerdem tat sich der Organismus sehr schwer, in Flüssigkultur anzuwachsen. Hierbei war es unabhängig davon ob ein aufgetauter, bei -80°C gelagerter Stock oder ein Stück einer gut bewachsenen Agarplatte zur Inokulation diente. Ebenfalls war das Einbringen heterologer DNA sehr zeitaufwändig. Die während dieser Arbeit für *S. erythraea* gut etablierte Methode der Konjugation führte auch bei mehrfacher Protokollvariation zu keinerlei positiven Transkonjuganten. Ermöglicht wurde die genetische Manipulation durch Protoplasten-Transformation, wobei nur wenige positive Transkonjuganten, die eine Apramycin Resistenz aufwiesen generiert, werden konnten. Diese wurden nun über sehr viele Runden bei 28°C und 40°C kultiviert, um das temperatursensitive Replica des Vektors zu entfernen, was in einer stabilen *in frame* Deletion resultierte. Eine Kultivierung bei 42°C waren auf Grund der Stammeigenschaften nicht möglich, selbst bei 40°C war das Wachstum signifikant verlangsamt. Durch Replattierungen wurden die nun Apramycin sensitiven Transkonjuganten identifiziert und sollten mittels PCR und Sequenzierung verifiziert werden.

#### rapK – Blockmutante der Rapamycin-Startereinheit

Rund eineinhalb Jahre vergingen, bis erste, nun Apramycin sensitive Transkonjuganten identifiziert werden konnten. Die rapK codierende Genregion wurde mittels PCR amplifiziert. In Fall der Blockmutante muss diese Region aufgrund

der durchgeführten *in frame* Deletion ca. 300 bp kleiner sein als bei der natürlichen Gensequenz (1,45 kb).



**Abbildung 86: Gelelektrophorese zur Identifizierung potentieller rapK Blockmutanten.**

Die Abbildung 86 zeigt deutlich, dass bei den Klonen zwei bis neun zwar die der Blockmutante entsprechende Gensequenz mit einer Größe von ca. 1,15 kb amplifiziert werden konnte, jedoch weisen diese Klone zusätzlich eine schwache Bande in Höhe der Wildtyp-Größe auf. Es scheint, als existieren Mischkulturen. Die der Blockmutante entsprechenden DNA-Banden wurden ausgeschnitten, die DNA mittels Kit aus dem Agarosegel isoliert und die DNA sequenziert. Durch einen Sequenzvergleich (BLAST Analyse, vgl. Abbildung 87) konnte die *in frame* Deletion bestätigt werden, wobei die rapK Gensequenz (Genebank X86780) als Referenz diente.



**Abbildung 87: Sequenzvergleich (BLAST Analyse). Der delitierte Bereich fehlt in der DNA Sequenz, hier Klon 5.**

Nachfolgend wurden die einzelnen Mutanten ohne Zugabe von künstlichen Bausteinen fermentiert, wobei noch immer Wildtyp-Aktivität bei den vermeintlichen rapK Blockmutanten, wenn auch drastisch reduziert, detektiert werden konnte. Durch Verdünnungsausstriche der Mischkulturen wurde versucht, Reinkulturen der Blockmutante zu generieren. Jedoch wurde schnell deutlich, dass dieses eher kontraproduktiv war. An Stelle der Blockmutante wurde der Wildtyp angereichert, und in Mischkulturen wurde der Anteil der Blockmutante (~ 1,15 kb) immer geringer. Höchstwahrscheinlich hat der Wildtyp einen Wachstumsvorteil gegenüber der Blockmutante und überwächst diese nach und nach mit den einzelnen Mycelien. Für

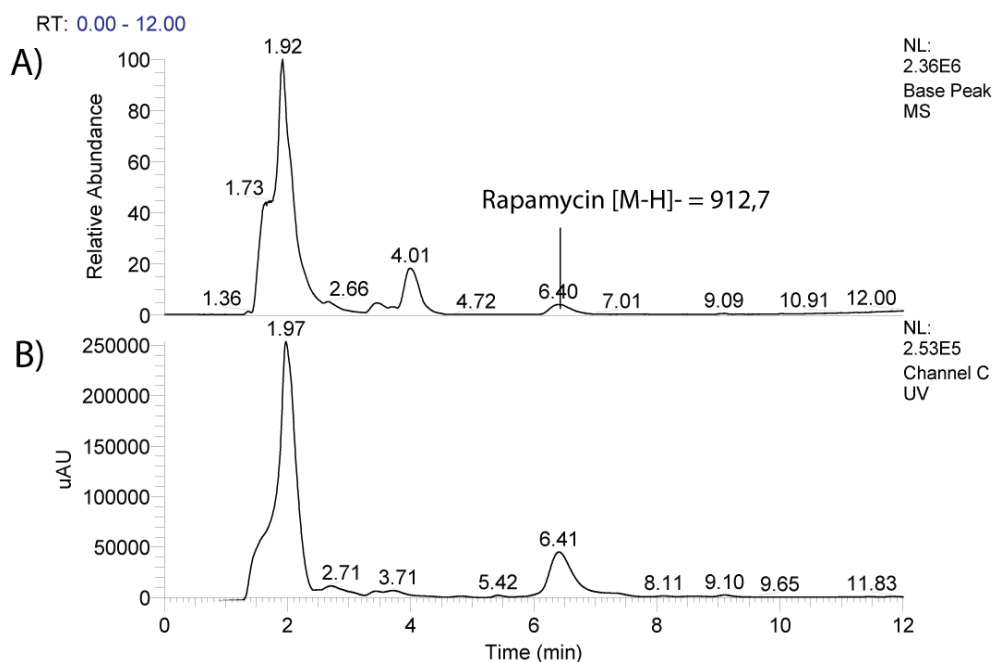
nachfolgende Fermentationen wurden daher die unsprünglichen Mischkulturen eingesetzt. Weitergehend wurde immer noch versucht eine reine Blockmutante zu isolieren, was bis zum Ende der Arbeit nicht gelang.

### fkbL und fkbK – Blockmutanten der Ascomycin Starter- und Endeinheit

Analog zur rapK konnten auch hier nur Mischkulturen erzielt werden. Jedoch scheint der Anteil der Blockmutanten äußerst gering zu sein. In der Fermentation beider Varianten konnten nur eine schwach reduzierte Wildtypaktivität detektiert werden. Weitergehend wurde versucht, den Anteil der Blockmutanten in der Mischkultur anzureichern.

#### 3.7.1.2 Fermentation von NRRL 5491 sowie der rapK Blockmutanten

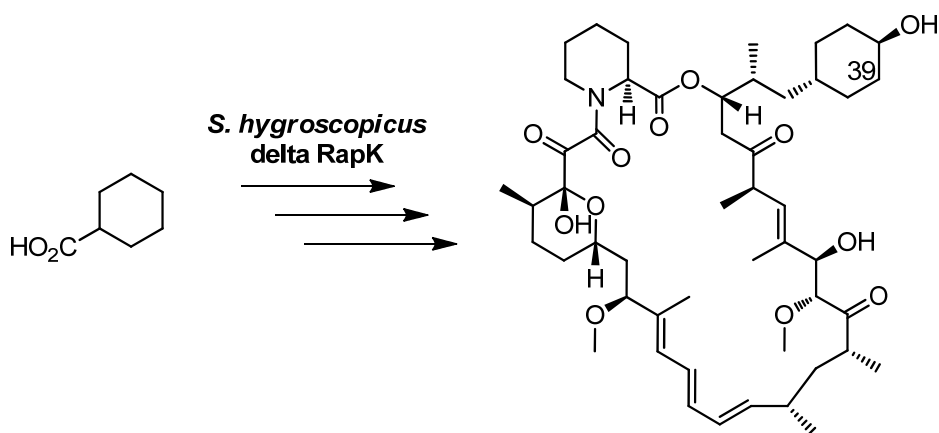
Zur Etablierung der Analytik mittels HPLC/ESI-MS diente kommerziell verfügbares Rapamycin. Hierbei lieferte der Einsatz eines Methanol / Wasser Gradienten und eine Messung im Negativionen-Modus das beste Ergebnis, jedoch ist das Signal ca. 1,5 min breit. Eine weitergehende Optimierung war unter der Verwendung der CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule nicht möglich. Im Negativmodus wird Rapamycin mit einem Masse-zu-Ladungsverhältniss von 912 ( $[M-H]^-$ ) detektiert. Die simultane Detektion mittels UV ermöglicht neben der Massenspur einen sensitiven Produktnachweis und ist vor allem nachfolgend für die Analyse der Fermentationsextrakte unumgänglich.



**Abbildung 88: HPLC Chromatogramm einer Wildtypfermentation; rohes Methanolextrakt. A Massenspur B UV Spur 280 nm**

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass durch die Bereitstellung von Cyclohexancarbonsäure die Biosynthese in rapK Blockmutanten komplementiert werden kann. Dieser Baustein wurde den einzelnen Mischkulturen sowie dem Wildtyp während der Fermentation zugesetzt und die einzelnen Methanolrohextrakte mittels HPCL/ESI-MS untersucht. Das Chromatogramm wurde nachfolgend nur noch im Zeitintervall von 2,5 bis 12 min betrachtet, um die unterhalb 2 min eluierenden Medienbestandteile (wie Zucker) auszuschließen und so deutlichere (intensivere) Signal betrachten zu können.

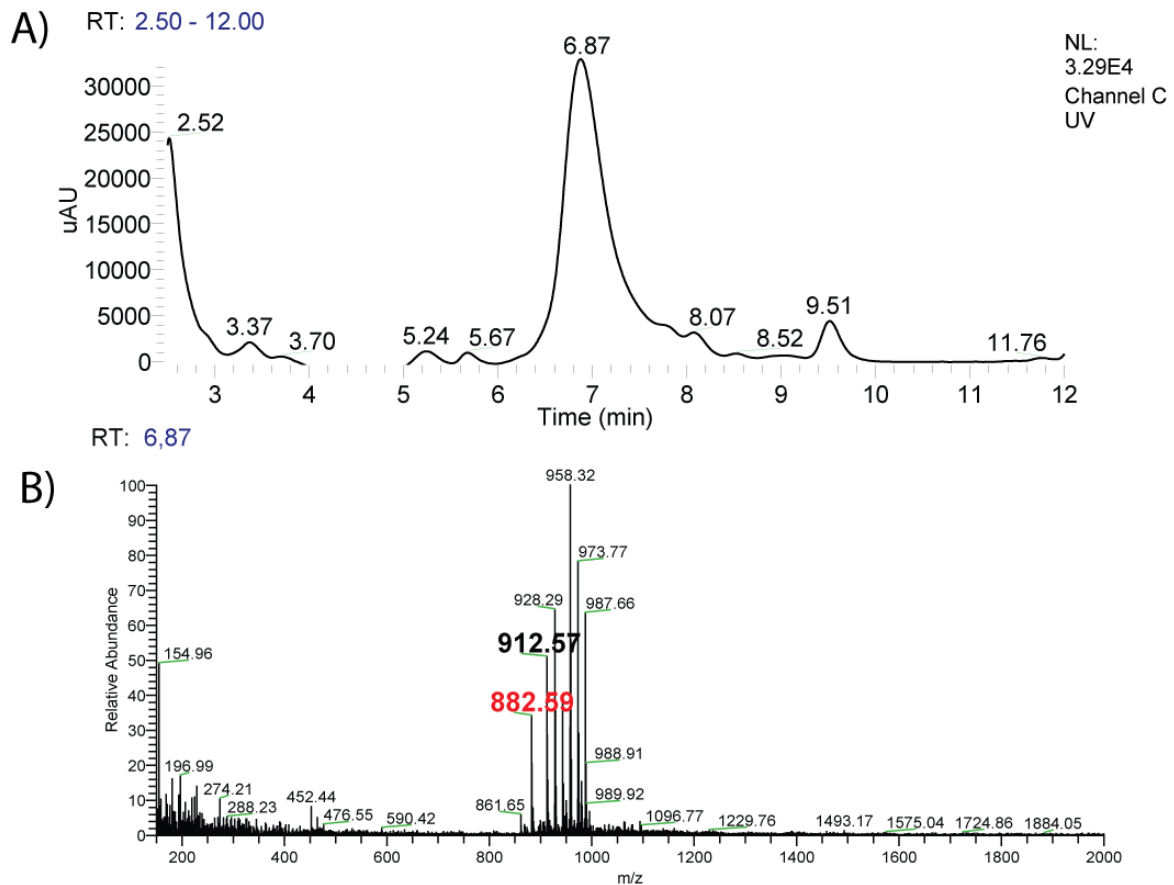
Die Arbeitsgruppe um Peter F. Leadlay waren 2004 die Ersten, die durch eine Fütterung von Cyclohexancarbonsäure an eine rapK Blockmutante das in Abbildung 89 aufgezeigte Rapamycin-Derivat 39-Desmethoxyrapamycin (**7**) erzeugen konnten.<sup>[68]</sup>



**Abbildung 89: Struktur von 39-Desmethoxyrapamycin (**7**), resultiert durch den Einbau von Cyclohexancarbonsäure als Startereinheit.** Die Hydroxylierung an Position 4 der zur Carbonsäure geschieht innerhalb der Zellen vor Synthese der Polyketidkette.<sup>[90]</sup>

Das ungereinigte Methanolextrakt der rapK Mischkultur, bei der dem Fermentationsmedium Cyclohexancarbonsäure (5 mM) zugesetzt wurde, zeigte das gesuchte Masse-zu-Ladungsverhältnis des erwarteten Derivates ( $[M-H]^- = 882$ ) neben dem des Rapamycins (**3**) auf (s. Abbildung 90) und verifiziert damit die gewünschte Mutation.

Jedoch coeluierten beide Substanzen in einem breiten Signal, was auf die strukturelle Ähnlichkeit zurückzuführen ist. Ebenfalls konnte beim Wildtyp ein Einbau der Cyclohexancarbonsäure beobachtet werden, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei den Mischmutanten.

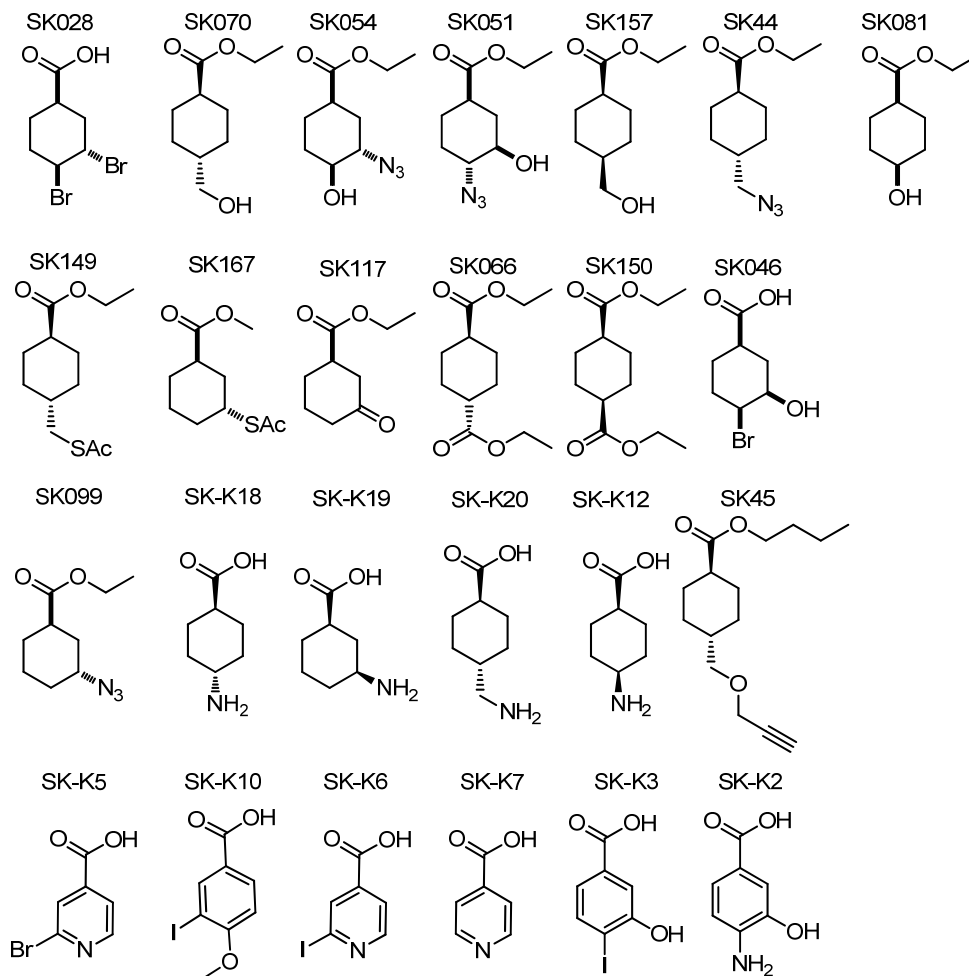


**Abbildung 90: HPLC/ESI-MS Messung einer Mischkultur (Blockmutante rapK\_9) bei Fütterung von 5 mM Cyclohexancarbonsäure; rohes Methanolextrakt. A HPLC Chromatogramm B zugehöriges Massenspektrum.**

Weitergehend wurde eine Vielzahl von Cyclohexancarbonsäure ähnlicher Substanzen als synthetische Bausteine in die Fermentation der rapK-Mischkultur eingesetzt (in Konzentrationen von jeweils 2 und 5 mM). Die einzelnen Substanzen wurden von Stephan Klopries zur Verfügung gestellt.

Für die Beurteilung der einzelnen Fermentationen stellte die Mischkultur einen enormen Vorteil dar, auch wenn hierdurch ein signifikanter Selektivitätsverlust zu erwarten ist. Die Bildung des Rapamycins konnte als interner Standard genutzt werden. Ist in den einzelnen Extrakten kein Rapamycin detektierbar, so kann von einem negativen Effekt des synthetischen Bausteins auf die Biosynthese und das Wachstum des Mikroorganismus ausgegangen werden. Bei Zusatz der Substanzen SK44, 46 und 28 resultierten bereits 2 mM Konzentrationen in reduziertem bzw. inhibierten Wachstum, in keiner der entsprechenden Methanolextrakte konnte Rapamycin nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte während der Fermentation

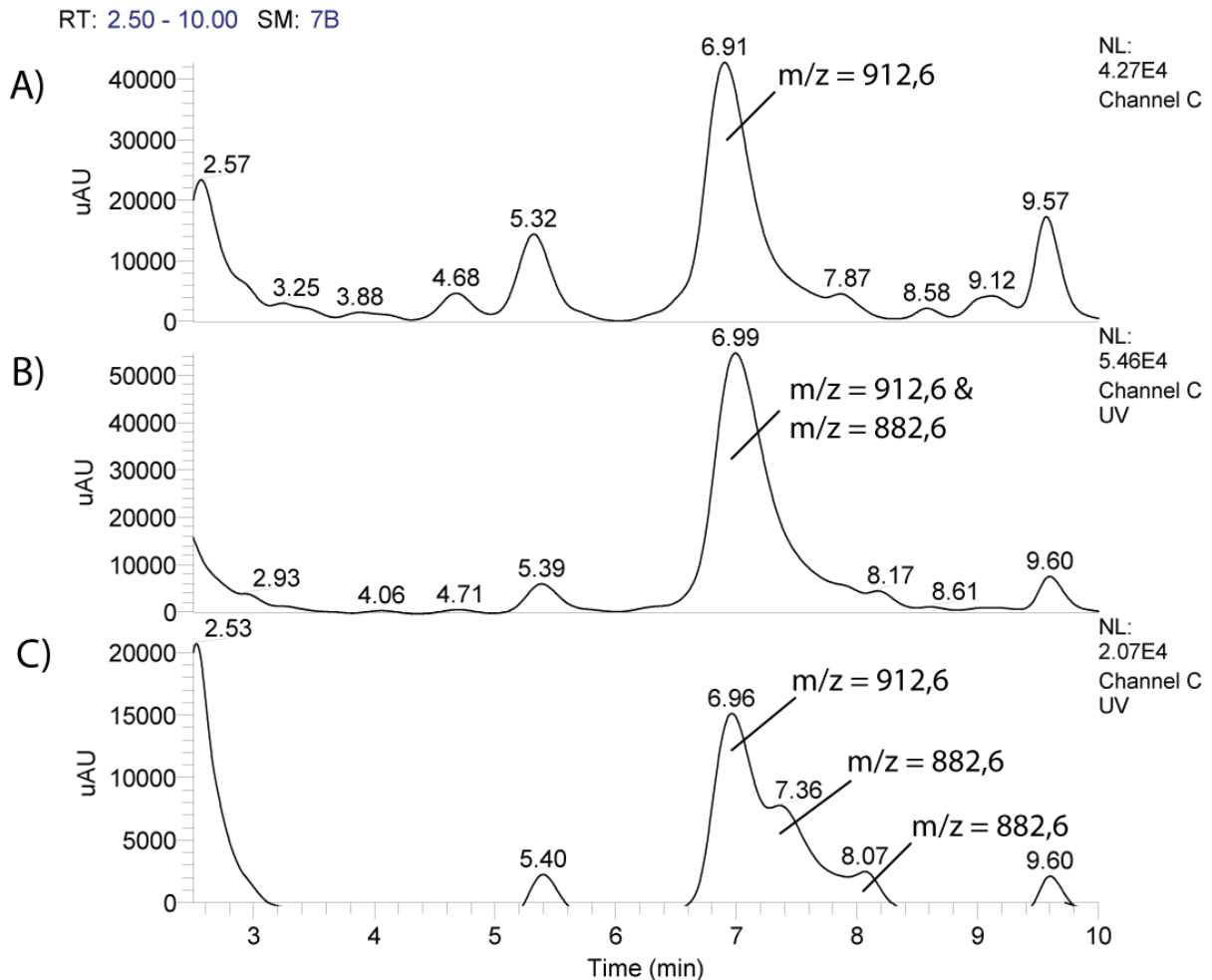
mit Zusatz von 5 mM SK51 ein stark reduziertes Zellwachstum beobachtet und auch keinerlei Spuren von Rapamycin im Extrakt nachgewiesen werden.



**Abbildung 91: Getestete Substanzen als künstliche Bausteine in der Fermentation der rapK Mischkulturen.** Die Bezeichnung der Substanzen setzt sich wie folgt zusammen: SK: Namenkürzel von Stephan Klopries, der die meisten der Substanzen synthetisierte. Ein weiteres K findet sich in den Substanzen die kommerziell bezogen wurden. Die Zahl entspricht Stephans Klopries Nummerierung.

Neben den bereits literaturbekannten, von einer rapK Blockmutante, akzeptierten Substanzen, zeigte nur dass rohe Methanolextrakt der rapK Mischkultur sowie des Wildtyps bei einer Fütterung von 5 mM SK 54 ein neues Signalmuster, dass auf einen Einbau hindeutete (Abbildung 92). Es gibt scheinbar zwei zusätzliche Signale mit Rt-Zeiten von 7,36 und 8,07. Keiner dieser Signale wies jedoch das erwartete Masse-zu-Ladungsverhältniss von 923 oder das der zum Amid reduzierten Variante ( $[M-H]^- = 897$ ) auf. Vielmehr zeigten beide das durch den Einbau von Cyclohexancarbonsäure bekannte Masse-zu-Ladungsverhältniss von 882. Basierend auf den unterschiedlichen Retentionszeiten konnte jedoch eine Verwechsellung mit

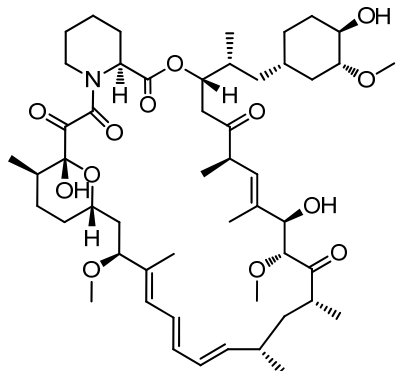
den Extrakten der Fütterung von Cyclohexancarbonsäure sicher ausgeschlossen werden. Die beiden neuen Signale mit unterschiedlichen Rt-Zeiten bei identischen Masse-zu-Ladungsverhältnissen deuten auf die Bildung zweier Epimere hin.



**Abbildung 92: HPLC-Chromatogramme der rohen Methanolextrakte der rapk Fermentation im Negativmodus, die UV-Absorption bei 280nm wurde ebenfalls detektiert. A** ohne synthetischen Baustein, **B** Cyclohexancarbonsäure [5 mM] und **C** SK 54 [5 mM] Die Wildtypfermentation mit Zugabe von 5 mM SK 54 zeigte ein ähnliches Bild.

Um die potentiell neue Substanz weiter zu charakterisieren wurde die akurrate Masse sowie eine akkurate MS/MS Analyse der drei Substanzen (Rapamycin, Derivat durch Fütterung mit Cyclohexancarbonsäure und Derivat durch Fütterung mit SK 54) vorgenommen. Auf Grund der Standardeinstellungen wurden die Messungen im Positionenmodus unter Verwendung eines Acetonitril/Wassergemisches bestimmt. Die erwarteten Masse-zu-Ladungsverhältnisse sind nun: 936 für Rapamycin (**3**) und 906 sowohl für das Produkt der Cyclohexancarbonsäure-Fütterung (39-Desmethoxyrapamycin (**7**)) als auch für das durch Fütterung von SK 54 erzeugte Substanz (jeweils als Natriumaddukt). Die charakteristische

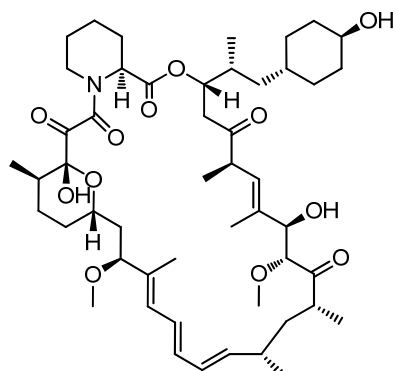
Fragmentierung von Rapamycin ist literaturbekannt<sup>[90,159]</sup> und bildete die Grundlage der nachfolgenden Auswertung. Die Ergebnisse der Fragmentierung Rapmaycin entsprechen dem erwarteten Muster.



Fragmente	m/z	
	theoretisch	gemessen
$C_{51}H_{79}NNaO_{13}^+$	936,5444	936,54405
$C_{44}H_{68}NaO_9^+$	763,4756	763,4734
$C_{43}H_{64}NaO_8^+$	731,4493	731,4473
$C_{36}H_{56}NaO_6^+$	607,3969	607,3950
$C_{25}H_{34}NaO_6^+$	453,2248	453,2235
$C_{25}H_{38}NaO_5^+$	441,2611	441,2599
$C_{24}H_{36}NaO_5^+$	427,2455	427,2443
$C_{24}H_{34}NaO_4^+$	409,2349	409,2341
$C_{19}H_{30}NaO_4^+$	345,2036	345,2029

**Abbildung 93: Rapamycin (1) Struktur (links) sowie Fragmentierungsmuster (rechts) bei der MS/MS Analyse**

Auch das Fragmentierungsmuster des Cyclohexancarbonsäure-basierenden Rapamycin-Derivates 39-Desmethoxyrapamycin entspricht der Voraussage (Abbildung 94).

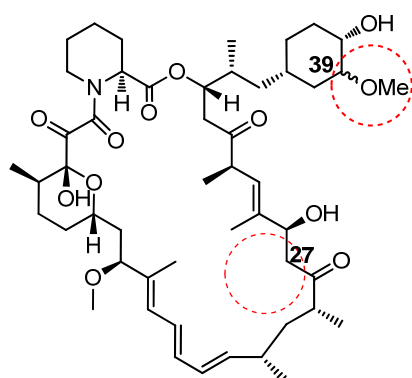


Fragmente	m/z	
	theoretisch	gemessen
$C_{50}H_{77}NNaO_{12}^+$	906,5338	906,5321
$C_{43}H_{66}NaO_8^+$	733,465	733,4623
$C_{42}H_{62}NaO_7^+$	701,4388	701,4362
$C_{35}H_{54}NaO_5^+$	577,3863	577,3840
$C_{25}H_{34}NaO_6^+$	453,2248	453,2231
$C_{25}H_{38}NaO_5^+$	441,2611	441,2595
$C_{24}H_{36}NaO_5^+$	427,2455	427,2440
$C_{24}H_{34}NaO_4^+$	409,2349	409,2336
$C_{18}H_{28}NaO_3^+$	315,1931	315,1921

**Abbildung 94: 39-Desmethoxyrapamycin (7). Struktur (links) sowie Fragmentierungsmuster (rechts)**

Weitergehend wurde basierend auf dem Fragmentierungsmuster des unbekanntem Produktes eine Struktur postuliert.





Fragmente	m/z	
	theoretisch	gemessen
$C_{50}H_{77}NNaO_{12}^+$	906,5338	906,5321
$C_{43}H_{66}NaO_8^+$	733,465	733,4622
$C_{42}H_{62}NaO_7^+$	701,4388	701,4376
$C_{35}H_{54}NaO_5^+$	577,3863	577,3838
$C_{24}H_{32}NaO_5^+$	423,2142	423,2425
$C_{24}H_{36}NaO_4^+$	411,2506	411,2489
$C_{24}H_{36}NaO_4^+$	411,2506	411,2489
$C_{23}H_{32}NaO_3^+$	379,2244	379,2231
$C_{19}H_{30}NaO_4^+$	345,2036	345,2025

**Abbildung 95: Weitergehende Analytik zum unbekanntem Rapamycin-Derivat. Postulierte Struktur (links) sowie Fragmentierungsmuster (rechts)**

Basierend auf der MS/MS Fragmentierung und der daraus postulierten Struktur hat das von der Fütterung von SK 54 (5 mM) ausgehende Derivat genau wie das Rapamycin innerhalb der Startereinheit eine Hydroxygruppe an Position 39 und eine Methoxygruppe an Position 40 (vgl. Abbildung 95). Im Vergleich zu Rapamycin fehlt dem Molekül eine Methoxygruppe am C27. Es handelt es sich somit sehr wahrscheinlich bei der durch die Fütterung mit SK 54 generierten Substanz um 27-Desmethoxy-39 *rac*-rapamycin (**10**). Die Fütterung des Regioisomers SK 51 hingegen zeigte keinen Einbau, sondern hatte wie bereits zuvor aufgeführt einen negativen Effekt auf die Rapamycin Produktion. Wodurch die Bildung von 27-Desmethoxy-39 *rac*-rapamycin (**10**) begründet ist, bleibt weiter fraglich: Wie kann durch den Einbau eines Cyclohexancarbonsäure-Derivates mit einer Azidgruppe an Position 39 und einer Hydroxylgruppe in Position 40 eine Substanz resultieren, die zum einen innerhalb der Startereinheit des Moleküls eine Methoxygruppe an Position 39 und zum anderen keine Methoxygruppe an Position 27 des Moleküls aufweist? Die LC/ESI-MS Analyse weist außerdem auf die Bildung eines Stereoisomers hin. Im Fall von Rapamycin ist die Position 27 durch post-PKS-Prozesse modifiziert: die Cytochrom P450 Monooxygenase RapN katalysiert eine spezifische Oxidation bevor die O-Methyltransferase RapQ diese Hydroxygruppe methyliert.<sup>[156,158]</sup> Wieso kommt diese Prozessierung bei Zugabe von SK 54 nicht zustande?

In dem 1994 von Roger J. Griffin publizierten Übersichtsartikel „The Medicinal Chemistry of the Azido Group“ wird intensiv auf die biologische Aktivität von Aziden eingegangen.<sup>[160]</sup> Hierbei wird hervorgehoben, dass Natriumazid ein weitverbreiteter

Inhibitor von Häm-Enzymen und anderen metallabhängigen Enzymen ist. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass eine Vielzahl von Alkylaziden und einfachen Azid-modifizierten Ringsystem (wie Cyclohexylazid) diese Enzyme in millimolaren Konzentrationen reversibel inhibieren. Im selben Jahr beschrieben die Autoren Roger P. Smith und Dean E. Wilcox ausführlich die Toxikologie von Aziden. In ihrer Veröffentlichung heben sie hervor, dass der exakte Mechanismus der Azid-Toxikologie *in vivo* größtenteils noch unbekannt ist, die Biotransformation von Aziden zu Stickstoffmonoxid (NO) jedoch stark daran beteiligt sei.<sup>[161]</sup> Azide können bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) von Katalase oxidiert werden, was in der Bildung von NO resultiert. Eine Vielzahl von Peroxidasen sind weitergehend ebenfalls in der Lage NO über diesen Weg zu generieren.<sup>[162]</sup> Das entstehende NO moduliert verschiedenste Stoffwechselprozesse durch eine Interaktion mit Thiolen und Hämproteinen bei nahezu diffusionslimitierten Raten.<sup>[163]</sup> Hierbei kann das Stickstoffmonoxid auf zwei Wegen mit Cytochrom P450 interagieren: durch reversible Bindung des Häm-Bereiches, wodurch ein Eisen-Nitrosylkomplex gebildet wird, und eine irreversible Inaktivierung kann durch den Thiol-modifizierenden Stoffwechsel erfolgen.<sup>[163]</sup>

Basierend auf diesen Arbeiten wäre es einerseits möglich, dass die Substanz SK 54 als direkter Inhibitor der RapN Cytochrom P450 Monooxygenase gewirkt haben könnte, wodurch eine post-PKS Prozessierung an dieser Position nicht möglich war. Dieses könnte die Bildung eines an Position C27 nicht prozessierten Derivates neben Rapamycin erklären. In diesem Fall wäre es zu keinem Einbau des synthetischen Bausteins gekommen, sondern eine direkte Inhibition würde vorherrschen. Jedoch kann durch diese direkte Inhibition nicht das neue Doppelsignal (das für Epimerbildung an Position C39 spricht) erklärt werden.

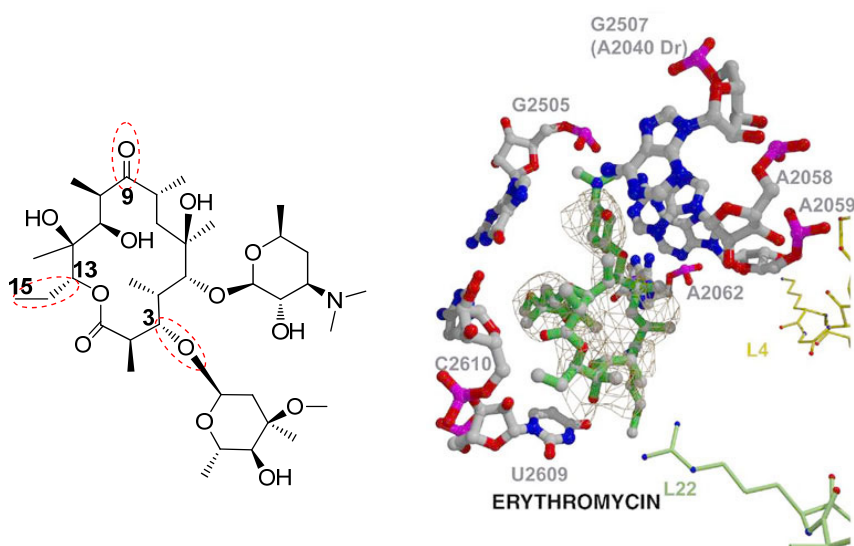
Andererseits könnte das Azid intrazellulär zu Stickstoffmonoxid oxidiert worden sein, wodurch eine Diazonium-Spezies generiert worden wäre. Ob dieses jedoch vor, während oder nach dem Einbau statt findet bleibt unbekannt. In wässriger Umgebung könnte das Diazonium durch eine nicht enantioselektive Substitution zu einer Hydroxylgruppe reagieren, wodurch beide Stereoisomere entstehen können. Die Methylierung dieser Position könnte dann durch RapM erfolgen. Es ist bekannt, dass die post-PKS Maschinerie durch den Einbau nicht-nativer Bausteine gestört werden kann. Weitergehend kann das entstandene NO als Inhibitor der Cytochrom P450 Monooxygenase RapN agieren, was die fehlende post-PKS Prozessierung an

Position C27 erklären kann. Warum jedoch spezifisch diese und nicht die Monooxygenase RapJ (post-PKS Prozessierung der Position C9) inhibiert wird, bleibt weiterhin fraglich.

Letztere Annahme erscheint auf Grund des neuen Doppelsignals jedoch wahrscheinlicher. Dieses Doppelsignal spricht für eine Epimerbildung, die alleine durch direkte Inhibition von RapN nicht erklärbar ist.

### 3.7.2 Untersuchungen zur Substratflexibilität der Erythromycin-Biosynthese

Erythromycin A (**1**) ist ein Makrolid-Antibiotikum das seit mehr als 50 Jahren Einsatz in der Therapie von bakteriellen Infektionen findet. Die spezifische Modifikation dieses Moleküls wird jedoch durch seine Instabilität, schlechte Bioverfügbarkeit, unerwünschte Nebenwirkungen auf den Magen/Darmtrakt sowie ein durch resistente Bakterien zunehmend limitiertes Anwendungsspektrum oftmals notwendig. Wie bereits in Kapitel 3.5 genauer aufgezeigt, erlaubt nur die Ketofunktionalität an Position neun (Abbildung 96, in der Nordhälfte des Moleküls) eine einfache orthogonale Derivatisierung.<sup>[135]</sup> Basierend auf partialsynthetische Ansätze wurden durch die gezielte Modifikation dieser Ketogruppe Erythromycin-Analoga zugänglich, die verbesserte pharmakologische Eigenschaften aufweisen.<sup>[136,137,138]</sup> Darüber hinaus wurde in weiteren Experimenten der Zucker an Position C3, Cladinose, erfolgreich gegen Acylgruppen ausgetauscht.<sup>[164]</sup>



**Abbildung 96: Struktur des Erythromycin A (links), bisher erfolgreich modifizierte Positionen sind rot hervorgehoben. Interaktionen zwischen Erythromycin und der Domäne V der 23S RNA des Ribosom, übernommen aus Schlünzen *et al.*<sup>[165]</sup>**

Die Interaktionen zwischen dem Antibiotikum Erythromycin A und dem bakteriellen Ribosom erfolgt in der sogenannten Makrolid-Bindetasche (Abbildung 96 rechts). Sowohl die Kristallstruktur des Erythromycin in Komplex mit der großen ribosomalen Untereinheit sowie die Kristallstrukturen weitere 14-gliedriger Macrolide in dieser Untereinheit zeigen, dass die Interaktion hauptsächlich zwischen Nukleotiden der Bindetasche mit dem Desosamin-Zucker und dem Lactonring stattfinden.<sup>[166]</sup> Der zweite Zucker der Macrolidantibiotika, Cladinose, interagiert nur in wenigen Fällen direkt mit dem Ribosom.<sup>[167]</sup> Basierend hierauf könnten vor allem Modifikationen im süd/westlichen Bereich des Erythromycin A weitere, bisher noch nicht aufgezeigte Interaktionen innerhalb der Bindetasche mit dem Ribosom ermöglichen.

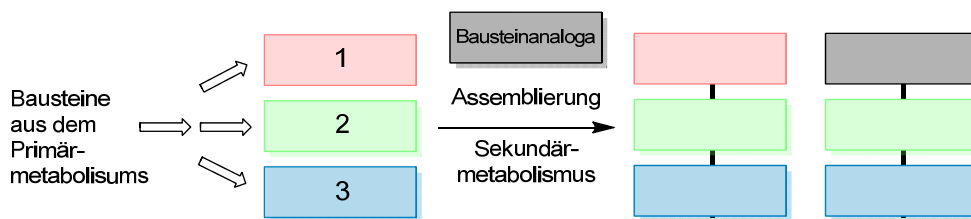
In den vergangenen Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass durch die klassische Mutasynthese Erythromycin-Derivate mit Modifikation am C15 zugänglich gemacht werden können.<sup>[87,168]</sup> Hierbei wurden heterolog zugeführte synthetische Startereinheiten (Di- und Triketide) in das Polyketid eingebaut.<sup>[127]</sup> Basierend auf dieser Technologie wurden konservierte Austausche der Erythromycin Struktur vorgenommen: beispielsweise wurde die natürliche Propionyl-Startereinheit durch eine Butyrylgruppe ersetzt. Die geringen sterischen Modifikationen des Erythromycin A trugen jedoch nicht zu einer signifikant veränderter Bioaktivität bei. 2006 zeigte die Gruppe um G. W. Ashley (Kosan Biosciences in Kooperation mit Johnson & Johnson) das auch funktionelle Gruppen wie Halogene oder reaktive Gruppen (beispielsweise Azide) durch Anwendung der Mutasynthese in Erythromycin A (**1**) eingebracht werden können, wodurch sich die physiochemischen Eigenschaften drastisch verändern die *in vivo* antibakterielle Aktivität der neuen Moleküle jedoch vergleichbar zu Erythromycin A blieb.<sup>[70]</sup> In ihrer Arbeit weisen sie weiterhin auf die Möglichkeit einer nun möglichen selektive Derivatisierung der Azidfunktion hin (vgl. hierzu<sup>[169]</sup>)

### 3.7.2.1 Einfügen einer orthogonalen Reaktivität an Position C15 des Erythromycin A

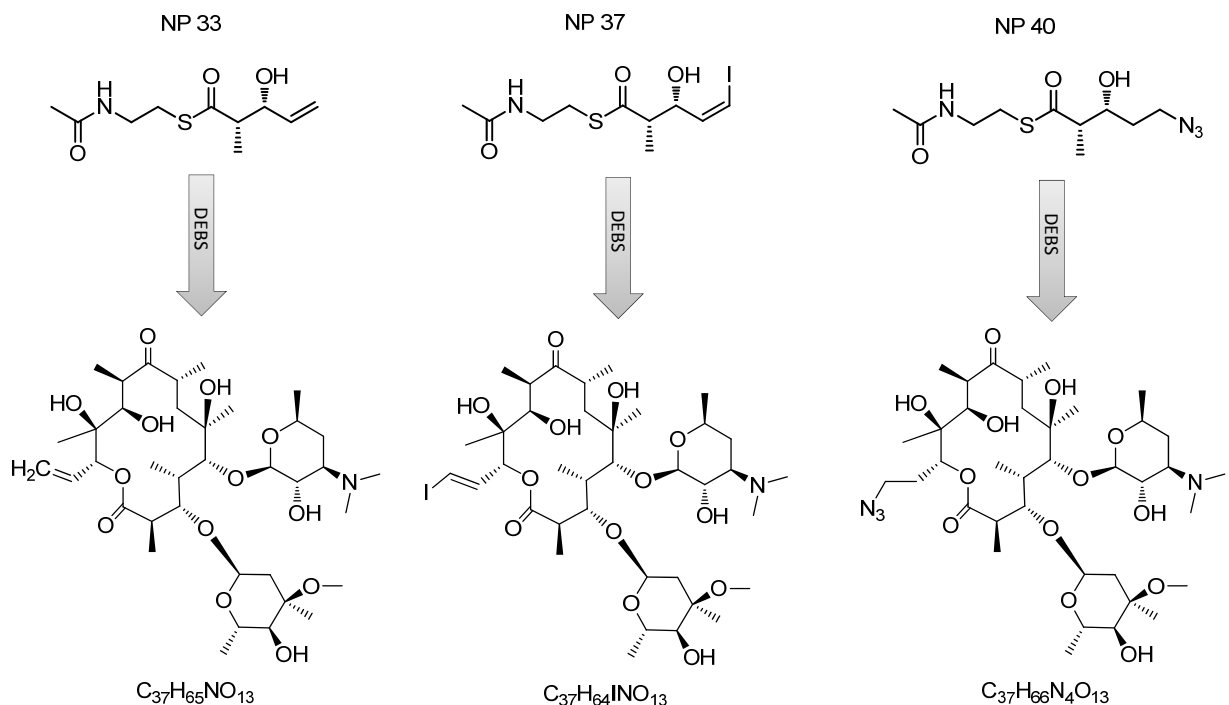
Inspiriert durch die Arbeiten von Kosan Biosciences, die unter anderem den Einbau eines Azid-modifizierten Diketides durch eine DEBS KS1-Nullmutante aufzeigen konnten, sollten auch hier orthogonale Reaktivitäten mittels Mutasynthese in das Polyketid Erythromycin A eingefügt werden. Durch die eingefügten funktionellen Gruppen werden theoretisch eine Vielzahl von Anwendungen ermöglicht, die

nachfolgend sowohl die schnelle chemische Modifikation als auch eine biochemische Untersuchungen erlauben sollten. Die einzelnen getesteten Substanzen wurden von Niclas Pryk synthetisiert und in einer Konzentration von 10 mM als racemisches Gemisch der Fermentation zugesetzt. Im Fall von NP37 wurden mit 5, 2,5 und 1 mM weitere Konzentrationen getestet. Da sich die Generierung einer *S. erythraea* KS1-Nullmutante mittels homologer Rekombination als sehr langwierig herausstellte, wurden die einzelnen Substanzen zunächst am Wildtyp getestet. In diesem Fall spricht man von einer Vorläufer-geleiteten Biosynthese (*precursor directed biosynthesis* vgl. Abbildung 97), nicht von Mutasynthese.

### Vorläufer-geleitete Biosynthese

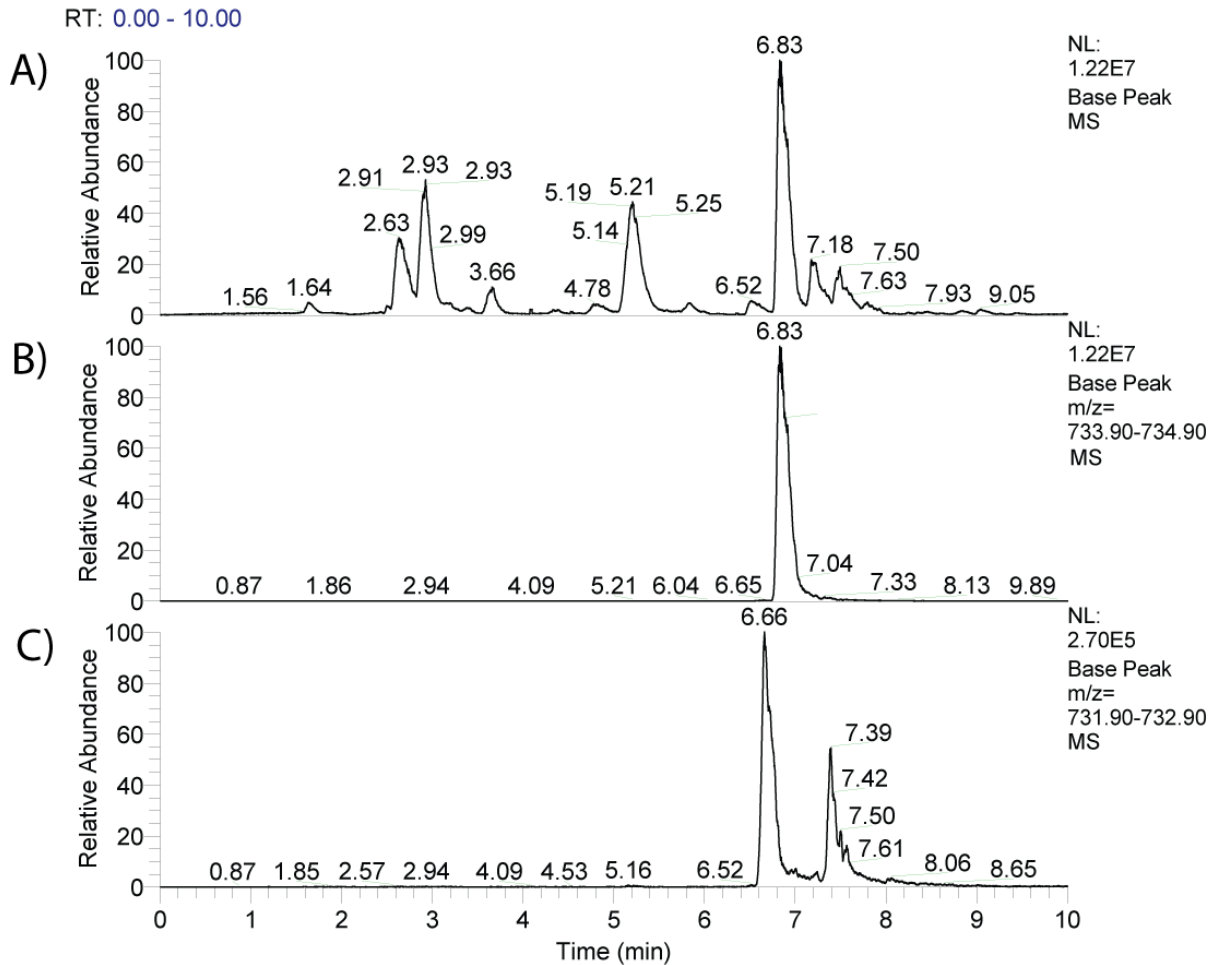


**Abbildung 97: Schematischer Überblick über die Strategie der Vorläufer-geleiteten Biosynthese**

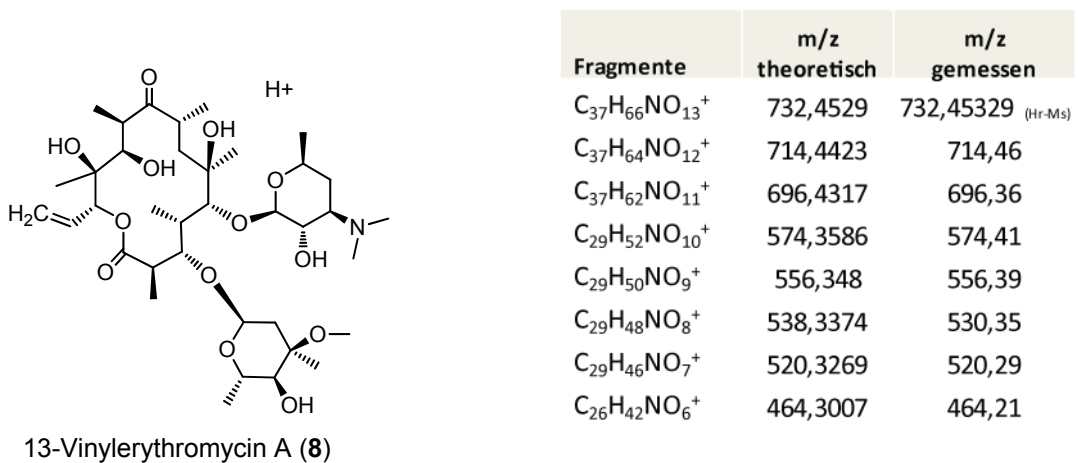


**Abbildung 98: Strukturen der in der Vorläufer-geleiteten Biosynthese von Erythromycin eingesetzten Diketide sowie die Strukturen der vorausgesagten Erythromycin-Derivate.**

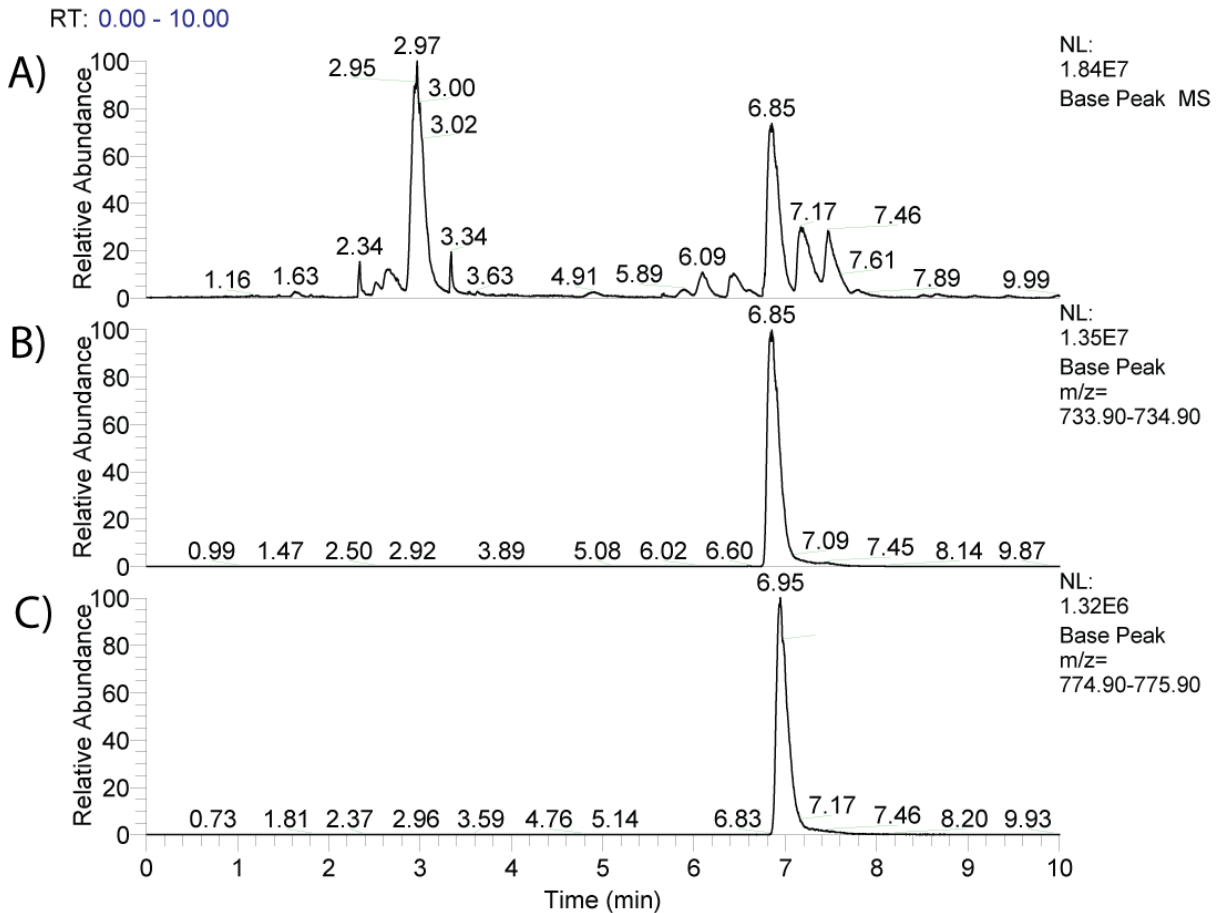
Die einzelnen Fermentationsextrakte wurden mittels HPLC/ESI-MS untersucht. Wie in den Abbildung 99 sichtbar ist, resultiert die Fütterung von 10 mM SK 33 in einem Einbau. Erythromycin A mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 734 ist das intensivste Signal in dem HPLC Chromatogramm. Die Intensität des neuen Signal (6,66 min) mit einem erwarteten Masse-zu-Ladungsverhältnis von 732 ist ca. 2 Größenordnungen geringer als das Erythromycin A zugehörige. Alles deutet auf einen erfolgreichen Einbau des Diketides NP33 durch den *S. erythraea* Wildtyp hin. Die Fütterung von SK 37 (Vinyljodidgruppe) in 10 mM hingegen scheint toxisch für den Erythromycin-Produzenten zu sein. Während der Kultivierung konnte ein drastisch reduziertes Wachstum beobachtet werden. Im Fermentationsextrakt ist Erythromycin A nur in geringen Mengen nachweisbar. Das erwartete Masse-zu-Ladungsverhältnis ließ sich durch LC/ESI-MS/MS nur in nicht signifikanten Mengen nachweisen. Die Zugabe von 1 mM hingegen hat kaum Einfluss auf die Produktivität, jedoch findet sich kein signifikantes Signal, das auf einen Einbau des Diketides NP 37 hindeutet. Das Fermentationsextrakt der Fütterung von SK 40 zeigt im Chromatogramm ein neues Signal auf, das das erwartete Masse-zu-Ladungsverhältnis von 775 anzeigt (s. Abbildung 101). Jedoch ist die Intensität des neuen Signal deutlich schwächer als das Erythromycin A anzeigende. Weitergehende Analytik zur Verifizierung des möglichen Einbaus erfolgte mittels MS/MS und durch die Bestimmung der akkuraten Masse.



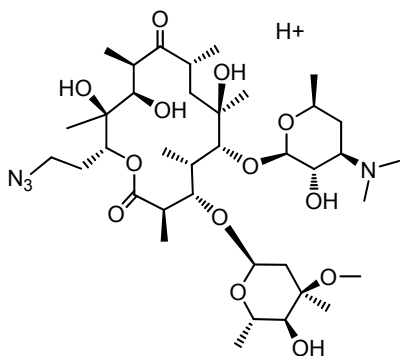
**Abbildung 99: HPLC Chromatogramm des Fermentationsextrakt 10 mM SK 33. A Base Peak Massenspur, B Base Peak mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $734,4 \pm 0,5$  (Erythromycin A) C Base Peak mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $731,4 \pm 0,5$  (erwartetes Derivat).**



**Abbildung 100: Weitergehende Analytik zum neuen Erythromycin A-Derivat 13-Vinylerythromycin (8) durch Fütterung von 10 mM SK 33 an *S. erythraea* NRRL-B-24071. Links Struktur Rechts MS/MS Fragmentierungsmuster**



**Abbildung 101: HPLC Chromatogramm des Fermentationsextrakt mit 10 mM SK 40. A** Base Peak Massenspur, **B** Base Peak mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $734,4 \pm 0,5$  (Erythromycin A) **C** Base Peak mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $775,4 \pm 0,5$  (erwartetes Derivat).



15-Azidoerythromycin A (**9**)

Fragmente	m/z theoretisch	m/z gemessen
$C_{37}H_{67}N_4O_{13}^+$	775,4699	775,4702 (Hr-MS)
$C_{37}H_{65}N_4O_{12}^+$	757,4593	757,43
$C_{37}H_{63}N_4O_{11}^+$	739,4488	739,43
$C_{29}H_{53}N_4O_{10}^+$	617,3756	617,49
$C_{29}H_{51}N_4O_9^+$	599,3651	599,43
$C_{29}H_{49}N_4O_8^+$	581,3545	581,55
$C_{29}H_{47}N_4O_7^+$	563,3439	563,49
$C_{37}H_{67}N_4O_{13}^+$	464,3007	464,21

**Abbildung 102: Weitergehende Analytik zum Erythromycin A-Derivat 15-Azidoerythromycin A (**9**) durch Fütterung von 10 mM SK 40 an *S. erythraea* NRRL-B-24071. Links Struktur Rechts MS/MS Fragmentierungsmuster**



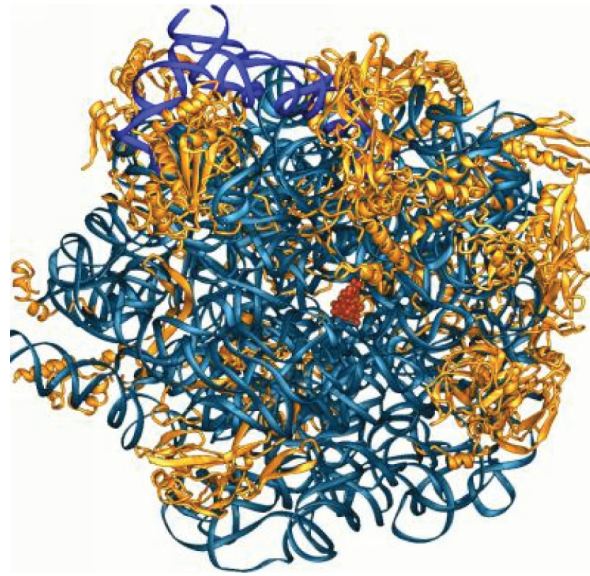
Für die Fütterung mit NP33 und NP40 konnte die erwartete Struktur basierend auf der von Erythromycin A abgeleiteten Fragmentierung bestätigt werden. Darüberhinaus bestätigen die akkuraten Massen die erwartete Summenformel. Eine Fermentation in einem größerem Maßstab würde die Isolation der C15-modifizierten Erythromycin Derivate ermöglichen, die dann spezifisch chemisch modifiziert werden könnten. Im Fall von NP37 konnte in keinem der Extrakte eine akkurate Masse des erwarteten Derivats ( $m/z = 858$ ) bestimmt werden. Auch mittels MS/MS konnte kein Fragmentierungsmuster identifiziert werden, das oberhalb des Rauschen dem erwarteten entsprach. Konzentration von 2,5 sowie 5 und 10 mM scheinen toxisch für den Produzenten zu sein, wodurch es nicht zum erwarteten Einbau kommt. Die Konzentrationen von 1 mM, die keinen Effekt auf die Erythromycin-Produktion hat, scheint im Gegensatz hierzu zu gering zu sein, um mit der natürlichen Startereinheit konkurrieren zu können. Ein Einbau der Substanz könnte möglicherweise durch eine Fütterung von nicht-toxischen Konzentrationen an eine KS1-Nullmutante stattfinden, in der keine Konkurrenzsituation mit dem Einbau der natürlichen Startereinheit besteht.

### **Ausblick**

Der Einbau der Azid-Funktion (NP40) in Erythromycin A ermöglicht eine Vielzahl von chemischen Modifikationen, die zum einen die Suche nach verbesserten Antibiotika vereinfachen könnten (z.B. zur Umgehung von Resistenzen) und zum anderen die Generierung biochemischer Marker ermöglichen können. Chemisch betrachtet wird durch die Azidgruppe eine bioorthogonale Funktion im Polyketid geschaffen, die durch z.B. „Click Chemie“ oder durch die „Staudinger Ligation“ modifiziert werden kann. Es bieten sich so eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten. So könne chemisch der Zugang zu einer Bibliothek von Derivaten mit unterschiedlichem sterischen Anspruch an Position C15 geschaffen werden, die dann auf ihre antimikrobiellen Aktivität untersucht werden können.

Die Ribosomen sind das Target vieler klinisch relevanter Antibiotika. (Bei den Ribosomen handelt es sich um makromolekulare Komplexe die aus Proteinen und Ribonukleinsäure (RNA) aufgebaut sind. Sie katalysieren die sequenzielle Polymeration von Aminosäuren zu Proteinen entsprechend dem genetischen Code.) Die Ribosomen sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, in Prokaryoten sind diese als 30S und 50S benannt. Die kleine Untereinheit beinhaltet das

Dekodierungszentrum, die große das Peptidyl-Transferase-Zentrum und den ribosomalen Tunnel, der einen durchschnittlichen Durchmesser von 15 Å aufweist.<sup>[166]</sup>

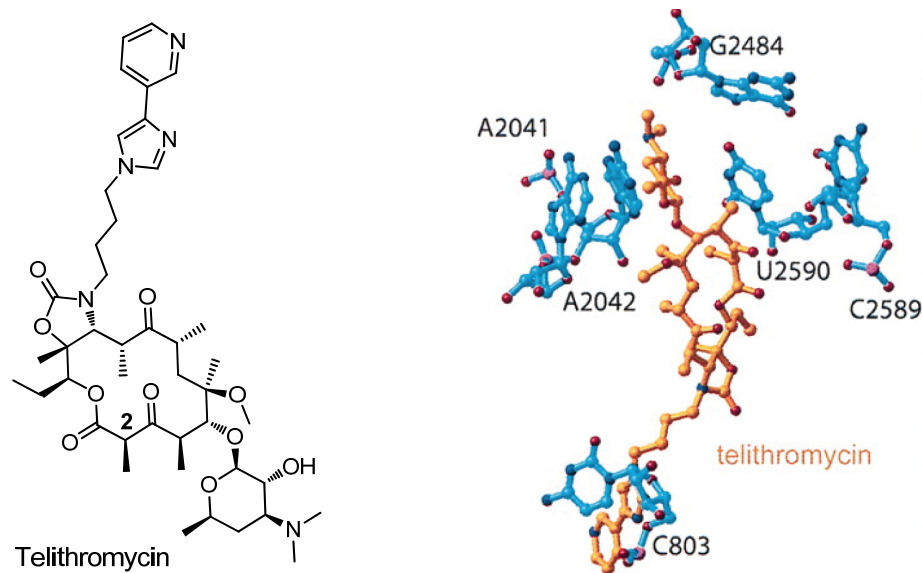


**Abbildung 103: Erythromycin A blockiert den ribosomalen Tunnel durch den die Kette von Aminosäuren das Ribosom gezielt verlässt. Erythromycin A rot, 5S-RNA in blau, 23S-RNA blaumetallic und Proteine in gelb.**<sup>[170]</sup>

Ribosomen zeigen untereinander eine große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit. Trotzdem gibt es einige feine Unterschiede zwischen prokariotischen und eukariotischen Ribosomen, die eine Selektivität der antibiotischen Wirkung und somit therapeutischen Einsatz dieser ermöglichen. Hierzu werden unter anderem Makrolide eingesetzt. Es konnte aufgezeigt werden, dass diese Substanzklasse an einer spezifischen Stelle im bakteriellen Ribosom, der sogenannten Makrolid-Bindetasche, bindet. Durch die Bindung ist der ribosomale Tunnel sterisch blockiert, wodurch eine Progression der wachsenden Kette unterbunden wird.<sup>[167]</sup> Die vorhandenen Kristallstrukturen von makrolidgebundenen Ribosomen implizieren die bedeutende Interaktion zwischen Bindetasche (Nukleotide A2058 und A2059 der 23S RNA, *E. coli*-Nummerierung) und dem Desosaminzucker (siehe hierzu Abbildung 96). Das Nukleotid 2058 ist der Hauptfaktor der zwei prominenten Resistenzmechanismen: Methylierung der Bindungsstellen durch die Methylase Erm (*Erythromycin Ribosom Methylation*) und der Substitution von Adenin zu Guanin.<sup>[166]</sup> Beide Mechanismen resultieren in einer Vergrößerung der Position 2058, wodurch die Interaktionen mit dem Desosaminzucker unterbunden wird und Erythromycin nicht mehr den ribosomalen Tunnel blockieren kann. Basierend auf den Makrolidgebundenen Kristallstrukturen könnten Modifikationen des Kohlenstoffatoms C15 von

Erythromycin A den freien Raum in diesem Bereich der Binderegion überbrücken. Dieses kann dann möglicherweise zu weiteren Interaktionen mit weiteren Resten führen. Sind diese Interaktionen stark genug, könnte so auch die Proteinbiosynthese von ursprünglich Erythromycin-resistenten Bakterien unterdrückt werden.

In den letzten Jahren konnte aufgezeigt werden, dass durch die Applikation von Ketoliden (Macrolidantibiotika der 2. Generation) ausgebildete Erythromycin-Resistenzen überwunden werden können.<sup>[171]</sup> Bei Ketoliden handelt es sich um semisynthetische Erythromycin-Derivate, die im Gegensatz zum Naturstoff eine zusätzliche Carbamatgruppe (fusioniert zwischen C11 und C12) sowie eine heteroaromatische Seitenkette, die durch einen flexiblen Linker mit dem Makrolacton verbunden ist, aufweisen.<sup>[172]</sup> Ein prominentes Beispiel ist das Antibiotikum Telithromycin, das 2001 durch die europäische Kommission zugelassen wurde. Basierend auf der Cokristallisation in der großen ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* konnte die Arbeitsgruppe um Ada Yonath aufzeigen, dass Telithromycin die Proteinbiosynthese in Analogie zu Erythromycin durch Bindung im ribosomalen Tunnel blockiert. Auffällig war jedoch, dass das Ketolid im Gegensatz zu Macrolidantibiotika in zwei Regionen der 23S RNA bindet.<sup>[173]</sup>



**Abbildung 104: Das Ketolid Telithromycin.** Links: die Struktur, rechts: Blick in den ribosomalen Tunnel mit gebundenem Telithromycin. Die Bindung des Moleküls basiert auf Interaktionen des Moleküls mit den Nukleotiden A2041 und A2042 (*Deinococcus radiodurans* Nummerierung) der Domäne V sowie mit dem Nukleotid C803 der Domäne II.<sup>[173]</sup>

Die Arbeitsgruppe um Ada Yonath zeigt im direkten Vergleich der Bindungsmodi von Telithromycin und Macroliden der Erythromycin Familie auf, dass die Telithromycin Bindung nur wenig durch A2058 Modifikationen unterdrückt wird. Eine zusätzliche

Stabilisation der Bindung scheint auf der Ausrichtung der heteroaromatischen Seitenkette und den daraus möglichen Interaktionen dieser mit der Domäne II zu basieren (C803, vgl. Abbildung 104). Auf Grund dieser neuen Interaktionsmöglichkeit können Ketolide wie Telithromycin auch an die Ribosomen Erythromycin-resistenter Bakterien mit modifizierter Bindungsstelle der Domäne V binden und die Proteinbiosynthese dieser unterdrücken.<sup>[173]</sup>

Durch die im Rahmen dieser Arbeit eingebrachte orthogonale Reaktivität des Erythromycin C15 ist ein schneller Zugang zu einer Vielzahl von Erythromycin Derivaten möglich. In Analogie zu der heteroaromatischen Seitenkette des Telithromycin können so eine Reihe neuer Derivate erzeugt werden, die nachfolgend auf ihre antimikrobielle Aktivität, vorallem gegen Erythroymcin-resistente Bakterien, getestet werden sollten. Möglicherweise sind durch die Wahl der Seitenkette auch noch weitere Interaktionen mit anderen Domänen des Ribosoms möglich, die ebenfalls eine Bindung des Moleküls im ribosomalen Tunnels stabilisieren könnten.

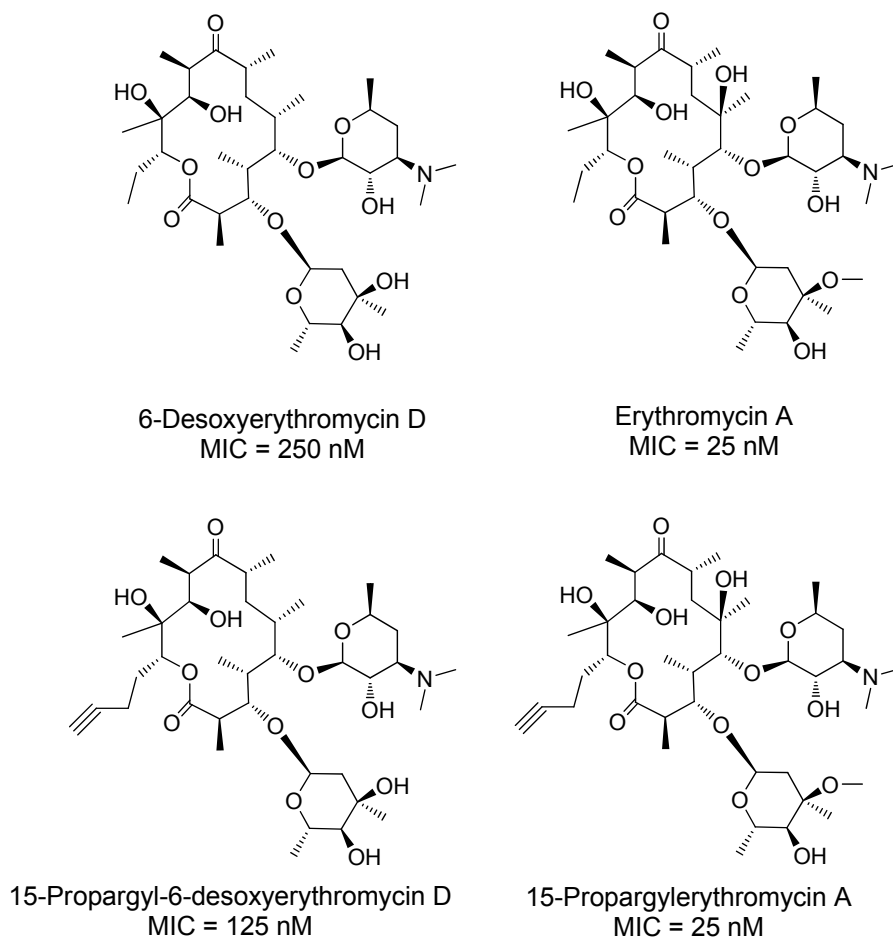
Aus biochemischer Sicht könnte die Reaktion mit einem Biotin, z.B. über eine Staudinger-Ligation, in einem Erythromycin-Derivat resultieren, welches *pull-down* Analysen ermöglicht. Basierend auf diesen *pull-down* Analysen könnten weitere Interaktionspartner identifiziert werden. Denkbar wäre auch eine Anwendung innerhalb der Diagnostik. Wie zuvor aufgeführt ist das *Target* des Erythromycin das Ribosom. Eine Fluorophormarkierung auf Basis der modifizierten C15 Gruppe würde eine spezifische Visualisierung der Ribosome im *life-cell-imaging* ermöglichen. Dieses könnte möglicherweise durch eine Reaktion der C15-Azidgruppe des Derivates mit 2-Ethynylpyridin erreicht werden, so dass ein vorraussehbar fluoreszierendes Molekül entsteht. Diese Reaktion gelang bereits Niclas Pryk mit dem Produkt der Fermentation von *S. erythraea* in Gegenwart von NP40. Basierend auf den Eigenschaften, sollte das markierte Derivat weiterhin zellpermabel sein und sich so im ribosomalen Tunnel lokalisieren können.

### **Neuste Entwicklungen im Bezug auf die Modifikation von Erythromycin A durch Vorläufer-geleiteter Biosynthese**

Am 28. Juni 2012 veröffentlichte das *Journal of the American Chemical Society* die Zuschrift „*Precursor Directed Biosynthesis of an Orthogonally Functional Erythromycin Analogue: Selectivity in the Ribosome Macrolide Binding Pocket*“ der Arbeitsgruppen um David E. Cane und Chaitan Khosla.<sup>[174]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit

konnten durch einen zuvor entwickelten Bioassay<sup>[175,176]</sup> neue alkinyl- und alkenyl-substituierte 6-Desoxyerythromycin D Derivate identifiziert werden, die eine mit dem Naturstoff vergleichbare antimikrobielle Aktivität aufwiesen.

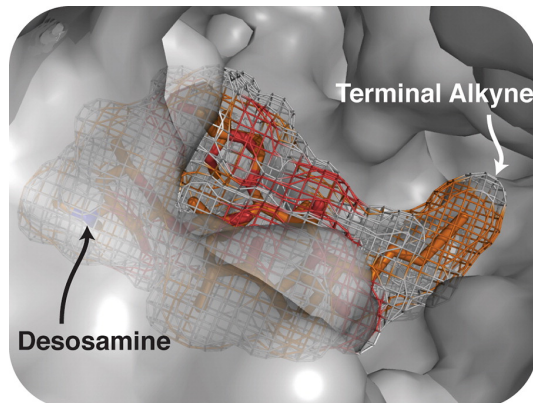
Die aktivste Substanz wies an Position C15 einen Propargylrest auf. Im direkten Vergleich mit dem ebenfalls generierten 6-Desoxyerythromycin D (MIC *B. subtilis* = 250 nM) wies das propargylierte Derivat eine höhere mikrobielle Aktivität auf (MIC *B. subtilis* = 125 nM). Nachfolgend wurde 15-Propargylerythromycin A synthetisiert (vgl. Abbildung 105) und dessen mikrobielle Aktivität sowie die von Erythromycin A ausgehende bestimmt (MIC *B. subtilis* = 25 nM, identisch mit Erythromycin A).



**Abbildung 105: Strukturen einiger der in der Arbeit von David E. Cane und Chaitan Khosla generierten und auf antimikrobielle Aktivität getesteten Substanzen.**

Zur Deutung der ermittelten Struktur-Aktivitätsdaten generierten die Wissenschaftler, basierend auf der Kristallstruktur eines durch Erythromycin A gebundenen Ribosom aus *E. coli*, ein Modell des gebundenen propargylierten Derivates. Während alle wichtigen Interaktionen mit der Domäne II intakt bleiben, unterscheidet sich die Orientierung des C13-Substituenten vom Naturstoff und dem propargylierten Derivat.

Durch die propargylierte Seitenkette kommt es zur Ausbildung zusätzlicher hydrophober Wechselwirkungen mit den Resten der Wandung des ribosomalen Tunnels. Basierend auf diesem Modell konnten der zuvor detektierte, unerwartete Zusammenhang zwischen antimikrobieller Aktivität und Größe sowie Sättigungsgrad der eingebauten Vorläufermoleküle erklärt werden. Bei längeren Seitenketten kam es im Modell zu einem Zusammenstoß (*clash*), was die detektierte, drastisch reduzierte antimikrobielle Aktivität dieser Derivate erklären kann.



**Abbildung 106: Modell des im ribosomalen Tunnel gebundenen propargylierten Erythromycin-Derivates, Abbildung aus Harvey et al.<sup>[174]</sup>**

Durch die zuvor beschriebenen Arbeiten konnte ein orthogonal funktionalisiertes, equipotentes Erythromycin A Derivat generiert werden. Die Autoren schlagen weitergehend vor, den flexiblen Alkyllinker zu nutzen um aromatische Heterocyclen an das Molekül zu binden. Hierdurch könnten, in Analogie zu den von Telithromycin<sup>[172]</sup> ausgehenden Interaktionen, Interaktionen mit weiter entfernten Resten des Ribosoms ausgebildet werden, die zu deutlich verbesserter Bioaktivität führen könnten und möglicherweise Resistenzen umgehen würden. Diese Publikation nimmt einzelne in dieser Dissertation anvisierte Arbeiten vorweg und hat entsprechende Implikationen für die zukünftigen Arbeiten.

### 3.7.3 Diskussion

Sowohl die Vorläufer-geleitete Biosynthese als auch die Mutasyntese weisen aus akademischer biochemischer Sicht keine große Eleganz auf, jedoch ermöglicht sie einen potentiell schnellen Zugang zu neuen Derivaten. Die Erfolgchancen sind jedoch nicht vorraussagbar. Die Fütterung von synthetischen Bausteinen in Fermentationen von Bakterien wie *Streptomyces* oder *Saccharopolyspora* die natürlicherweise bioaktive Polyketide produzieren, ist mit einer Vielzahl von

Herausforderungen verbunden.<sup>[68,88,168]</sup> Im Gegensatz hierzu ist der Einbau dieser heterologen Bausteine in *E. coli* exprimierte Polyketid-Biosynthesewege relativ einfach zu bestimmen, jedoch resultieren solche Systeme oftmals in inaktiven Polyketid-Intermediaten die nicht post-PKS modifiziert wurden.<sup>[176,177]</sup>

Im Fall der Mutasyntese von Rapamycin wurde nur eins der vielen künstlichen Synthesebausteine eingebaut. In der Literatur wurden bereits die Strukturen einiger Rapaloga beschrieben. Seit den ersten Publikationen, durch die Arbeitsgruppe um Peter F. Leadlay und der Firma Biotica hierzu, wurden in regelmäßigen Abständen die Strukturen einiger weniger neuer akzeptierter Synthesebausteine und die resultierenden Derivate publiziert. Wie durch persönliche Kommunikation mit Barrie Wilkinson von Biotica festgestellt wurde, sind neben den publizierten, akzeptierten Bausteinen eine Vielzahl von Substanzen getestet worden, die nicht von der PKS akzeptiert worden sind. Es gilt auch hier das Prinzip von Versuch und Irrtum. Weitergehend konnte in der Literatur aufgezeigt werden, dass der Ascomycin-Produzent *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* empfänglicher für die Mutasyntese zu sein scheint und ein breiteres Spektrum von Substanzanaloga als Bausteine akzeptiert. Es bleibt abzuwarten, ob die Fütterung der einzelnen SK-Substanzen in einigen Fällen für Ascomycin erfolgreich ist.

Die Vorläufer-geleitete Biosynthese von C15 Erythromycin-Derivaten resultierte in einem Einbau von zwei der drei getesteten Substanzen. Diese zwei Diketide wurden bereits in Experimenten von Kosan Bioscience erfolgreich durch eine heterolog exprimierte PKS mit inaktivierter KS1 Domäne akzeptiert und eingebaut.<sup>[70]</sup> Jedoch konnte in dieser Arbeit erstmalig die Vorläufer-geleitete Biosynthese dieser Substanzen im Originalproduzenten mit kompletter post-PKS Prozessierung aufgezeigt werden, so dass modifiziertes Erythromycin A anstatt des einfachen Erythronolids biosynthetisch zugänglich wurde. Die Modifikation an Position C15 des Erythromycins gelang auf Anhieb durch Fütterung mit NP33 und NP40 an den Originalproduzenten *S. erythraea*. Hier scheinen beide Substanzen kompetitiv zum nativen Baustein zu sein. Durch den Einbau wurde jeweils eine funktionelle Gruppe in das Molekül eingebracht, die eine selektive chemische Modifikation dieser Position ermöglichen sollte. Die geschaffene orthogonale Reaktivität im Erythromycin ermöglicht nachfolgend eine spezifische Modifikation des Moleküls mit neuen chemischen Ansatzpunkten. Es bleibt spannend, wohin dieser Weg führen wird.





### 3.8 Studien zur Veränderung des Redox-Profiles von Polyketiden

Der Hauptteil dieser Versuche mit der Generierung der einzelnen Mutanten wurde von Dr. Susanna Kushnir durchgeführt. Mein Fokus lag in diesem Projekt in der Etablierung der Analytik. Als große Problematik erwies sich hier die Reproduzierbarkeit. Erste Versuche zeigten hierzu auf, dass die Verwendung der Standard-Säule „CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule“ unzuverlässige Resultate lieferte. Jedoch allein eine robuste Anwendung würde die Identifizierung von Pre-Monensin-Derivaten aus den Fermentationsextrakten der einzelnen Mutanten ermöglichen.

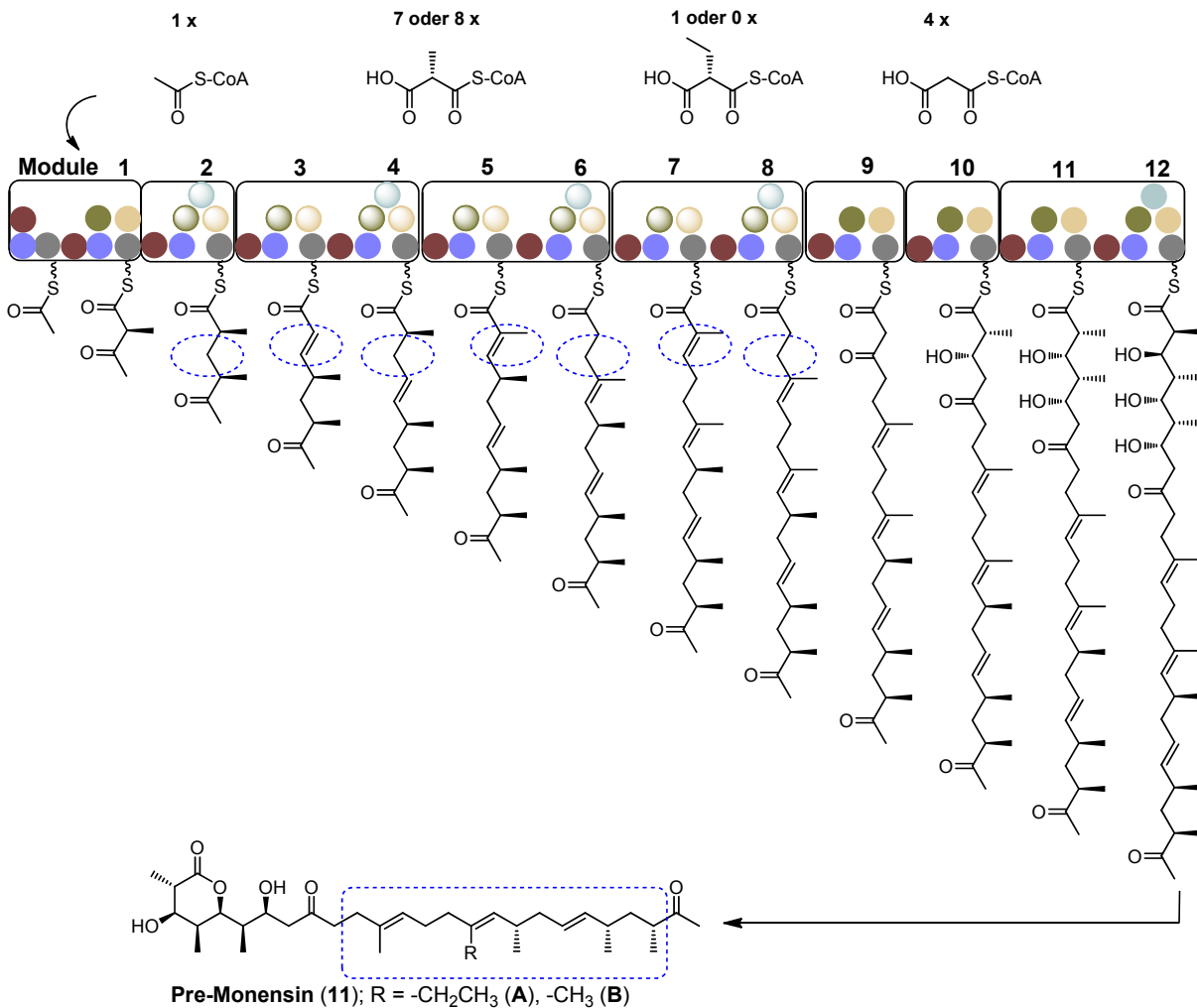
#### 3.8.1 Zielgerichtete Mutagenese zur Generierung erhöhter Polyketid-Diversität

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde die Polyketid-Diversität in den meisten Fällen durch den artifiziellen Austausch (*swapping*) einzelner Fragmente zwischen verschiedenen PKS erhöht. Wie jedoch bereits in den vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit aufgeführt, resultieren diese Versuche oftmals in stark reduzierten Enzymaktivitäten oder in komplett inaktiven Hybrid-PKS. Abhilfe könnten zielgerichtete Einzelaminosäureaustausche schaffen, die die jeweilige Enzymstruktur kaum verändern, wodurch die Problematik der Fehlfaltung umgangen werden könnte. In diesem Projekt sollte durch spezifische Mutagenese (*site-directed*) Zugang zu einer Bibliothek von reduzierten Polyketiden geschaffen werden.

**Tabelle 12: Zielaminosäuren innerhalb der einzelnen Redoxdomänen Domänen-Inaktivierungen.**

Domän Typ	Mutation ( <i>active site</i> )	Funktion der natürlichen Aminosäure	Referenz
Ketoreduktase	Tyr → Phe	H-Bindung Aktivierung der Carbonylgruppe für den nukleophilen Angriff	[178]
Dehydratase	His → Phe	Imidazolring argiert als Base in der Eliminierung von Wasser	[39]
Enoylreduktase	Gly, Gly → Ser, Pro	Reduzierung der Bindung von NADPH-Kofaktor als Teil des Rossman-Motivs	[179]

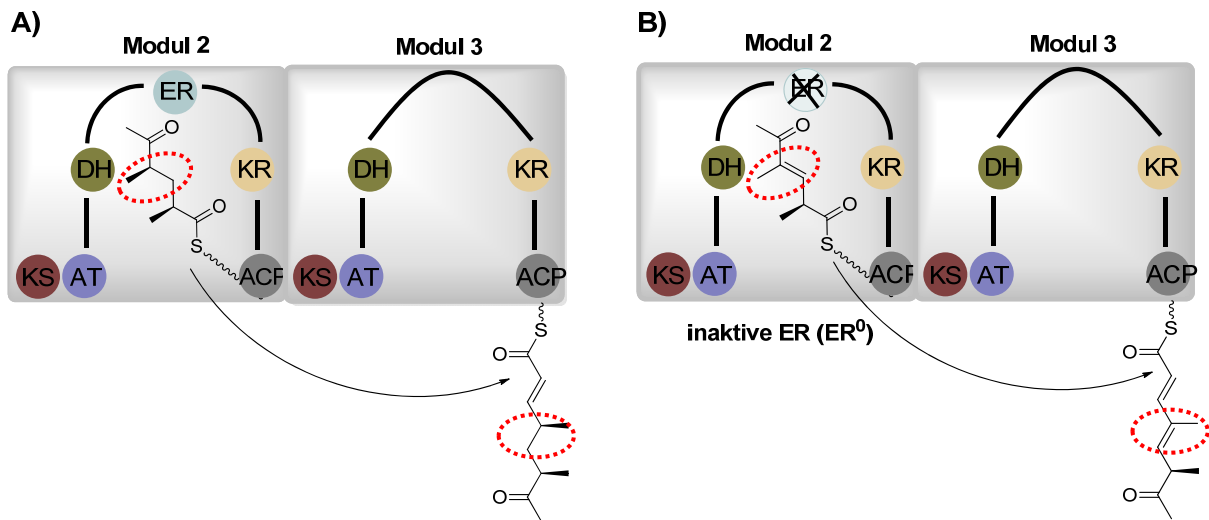
Als repräsentatives Beispiel wurde hier der Polyether Monensin gewählt. Der Gencluster der Monensin PKS umfasst ~ 80.000 Basenpaare, mit großen *open reading frames*, und unterschiedlich aktiven Redoxdomänen (vgl. Abbildung 107).



**Abbildung 107: Organisation der Monensin PKS.** Die Blockierung der post-PKS Prozessierungen führt zu den Shuntprodukten Pre-Monensin (11) A und B. Die Module 2 bis 8 waren Ziel der durchgeführten Experimente. Die mutierten reduktiven Domänen dieser Module sind farblich hervorgehoben.

Durch systematische Sequenzvergleich wurden die katalytisch kritischen Reste der *active site* innerhalb der einzelnen reduktiven Domäne der Monensin PKS identifiziert. Darüber hinaus wurde eine Mutagenesestrategie entwickelt, die zu einem gezielten Aktivitätsverlust der einzelnen katalytischen Domänen, Ketroreduktase (KR), Dehydratase (DH) oder Enoylreduktase (ER), führen sollte. Ziel war es, den Transfer eines entstehenden Polyketides auf das nachfolgende Modul in einem höheren Oxidationsstatus, verglichen mit dem Wildtyp, durch das Blockieren einzelner reduktiver Domänen zu ermöglichen (s. Abbildung 108). Dieses sollte mit

einer minimalen Veränderung der Gesamtproteinstruktur erfolgen, was eine klare Analyse der substratspezifischen Effekte durch nachfolgenden Domänen ermöglicht.



**Abbildung 108: Organisation der Module 2 und 3 der Monensin PKS.** **A** Wildtyp: die wachsende Polyketidkette ist an ein flexibles ACP verankert, welches die Kette mutmaßlich in einer stochastischen Art und Weise zu den einzelnen Domänen der katalytischen Schleife bewegt (hier finden die reduktiven Schritte statt). Nachfolgend auf diese findet eine Transthoesterifizierung statt, wodurch die Polyketidkette auf das nachfolgende Modul übertragen wird. **B** Die angewandte Mutagenesestrategien führt zu einer Verlangsamung des reduktiven Schrittes innerhalb des entsprechenden Domän-Typ. Dieses führt zu einer PKS Variante in der die Transthoesterifizierung zu nachfolgenden Modul schneller abläuft als die Reduktion im jetzigen Modul. Resultat ist eine einer weniger reduzierte Polyketidkette die weiter prozessiert wird.<sup>[106]</sup>

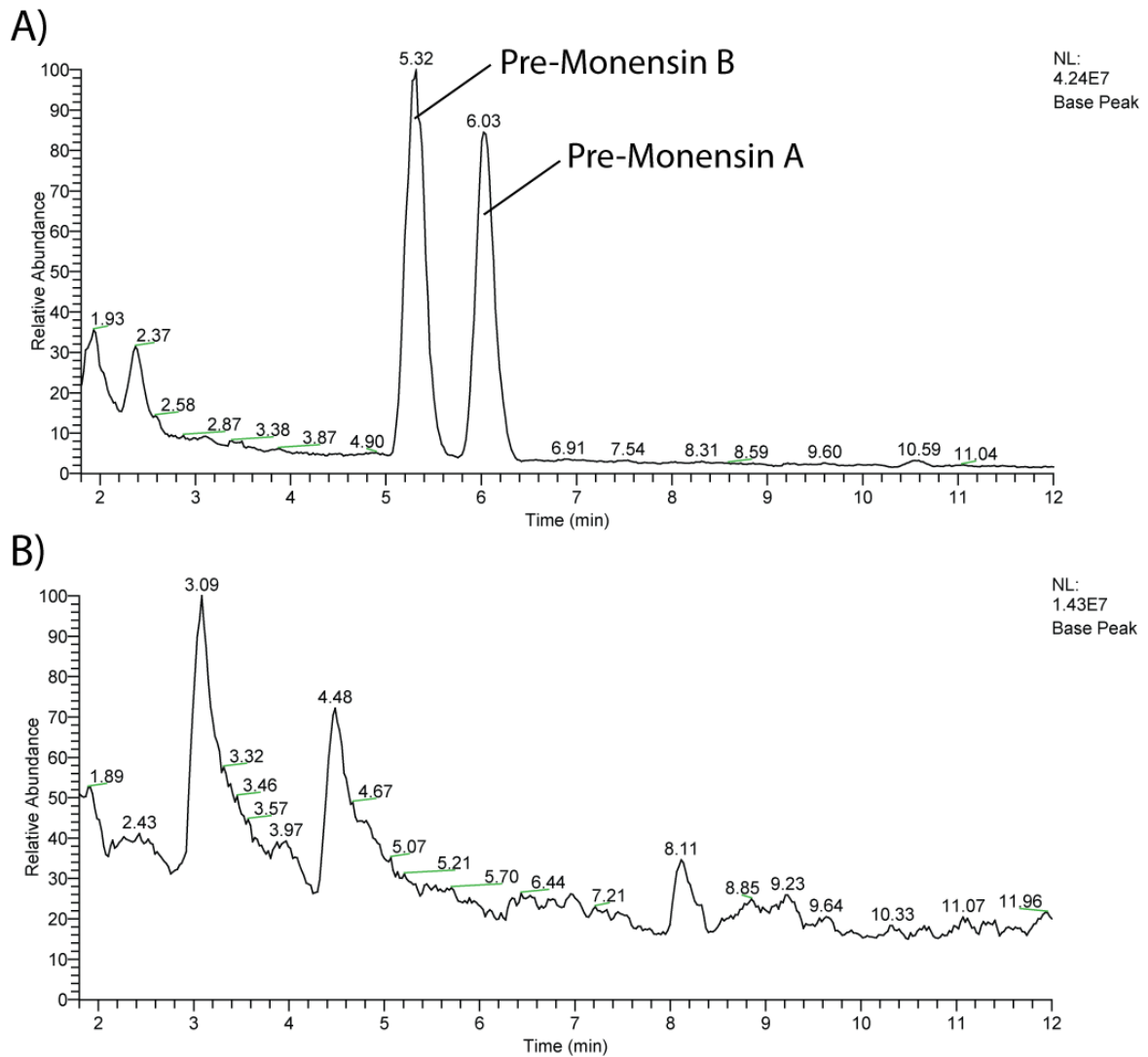
Als initiale Ziele dieser Mutagenese wurden die Verlängerungsmodule zwei bis acht der Monensin PKS (vgl. Abbildung 107) ausgewählt. Zusammen tragen diese Module 18 reduktive Domänen. Die Mutagenese dieser PKS Fragmente könnte somit in einer theoretischen Bibliothekgröße von 36 unterschiedlichen Polyketiden, als Mischung von Redoxvarianten des Pre-Monensin A und B, resultieren. Die ausgewählten Module der Monensin PK beinhalten die Mehrzahl der reduktiven Domänen des gesamten Clusters und zusätzlich wird der charakteristische hydrophile Teil des Moleküls trotz der Mutagenese beibehalten. Basierend auf diesen Experimenten sollten so Derivate mit unterschiedlichem Reduktionslevel des Monensin Shuntproduktes Pre-Monensin erzeugt werden.

Die einzelnen Mutanten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese in Kombination mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SLIC-MIX Methode erzeugt. Um die von der genetischen Manipulation des Produktionsstammes ausgehenden Effekte auf die Polyketid-Produktion zu reduzieren, wurden die mutierten *pks*-Gene durch homologe Rekombination in den Pre-Monensin Produzenten

*Streptomyces cinnamonensis* A495 eingebracht. Mit Ausnahme der erwarteten Mutanten in Modul drei konnten alle Mutationen durch DNA Sequenzierung der resultierenden *Streptomyces* Varianten bestätigt werden. Im Fall von Modul drei konnte auch durch mehrfache, variierte Versuchsdurchführung keiner der erwarteten Mutantenerzeugt werden. Die 16 erzeugten Varianten resultieren somit in einer theoretischen Bibliotheksgröße von 32 Derivaten. Die verschiedenen bakteriellen Varianten wurden fermentiert und die einzelnen Kulturextrakte mittels LC/ESI-MS analysiert.

### **3.8.2 Analytische Untersuchung der Kulturextrakte mittels LC/ESI-MS**

Allen Fermentationsansätzen wurde Amberlite XAD-16 zugesetzt, welches während der Produktion das Produkt absorbieren und somit mögliche Feedback-Hemmung unterdrücken sollte. Bei Fermentationsende wurde der Absorber und die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration von dem wässrigen Anteil getrennt und mit zwei Volumen-äquivalenten Ethylacetat extrahiert. Erst schien es, als würde die Fermentation absolut unzuverlässig erfolgen. In einigen Extrakten konnte erfolgreich Produktbildung von Pre-Monensin A und B nachgewiesen werden, in analogen Versuchsansätzen war jedoch keine Spur der beiden Substanzen detektierbar. Auch Protokollmodifikationen in Bezug auf die Fermentationsdurchführung und die Extraktion führten zu analogen Ergebnissen. Erst als das Extrakt eines Fermentationsansatzes direkt mehrfach hintereinander injiziert wurde, deutete alles auf ein Problem in der Analytik hin (s. Abbildung 109).



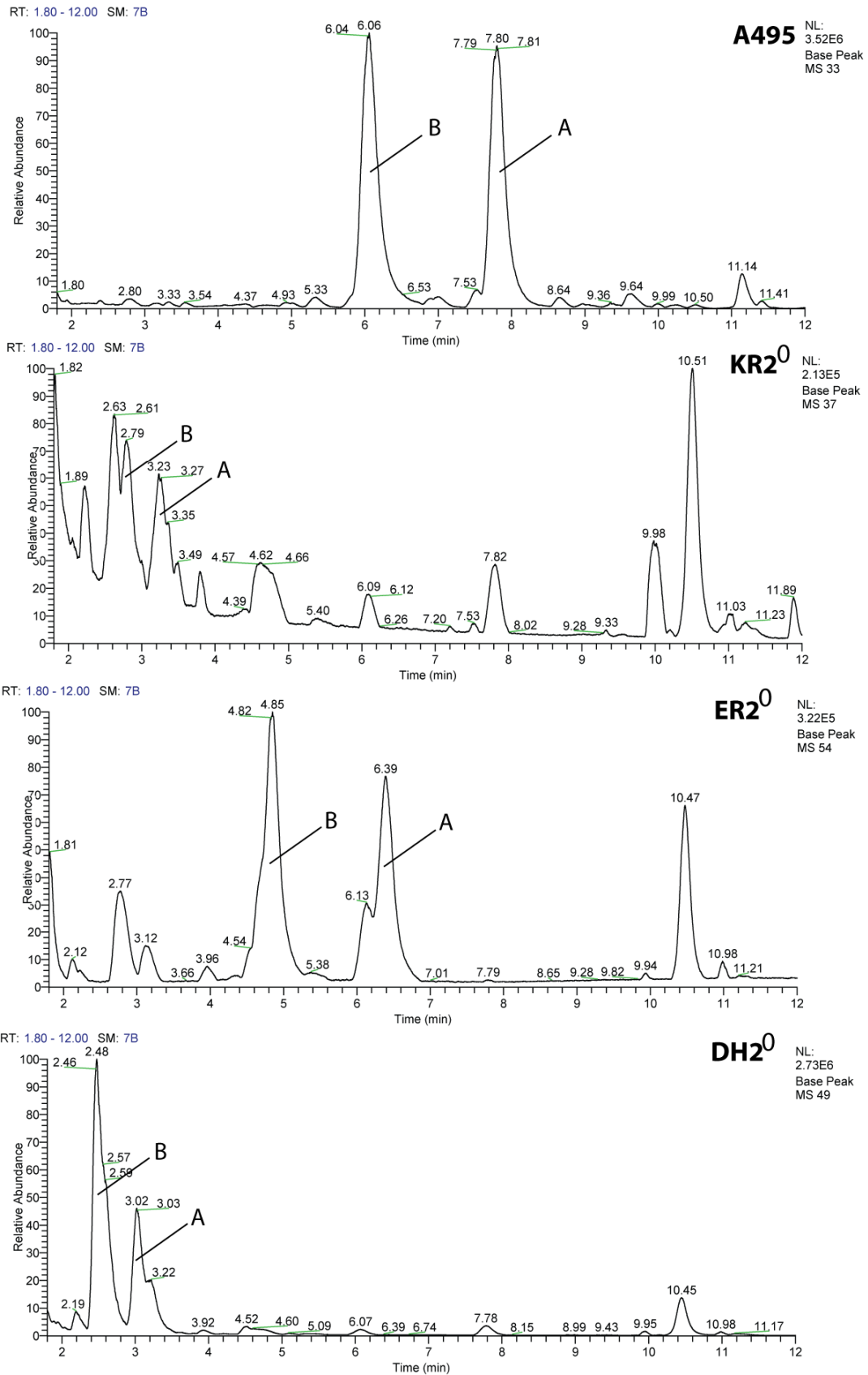
**Abbildung 109: HPLC Chromatogramm eines Fermentationsextraktes zum Nachweise von Pre-Monensin unter Verwendung der CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule. A erste injektion: Produktbildung kann deutlich detektiert werden B zweite Injektion: keinerlei Produktbildung nachweisbar.**

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde die routinemäßig in der Abteilung eingesetzte „CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule“ (Macherey-Nagel) für die einzelnen Messungen verwendet. Nach Rücksprache mit dem technischen Support der Firma Macherey-Nagel wurde die EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule für den Nachweis von Pre-Monensin getestet. Durch den Einsatz dieser Säule konnte robust Pre-Monensin sowie dessen Derivate nachgewiesen werden und entsprechend wurde diese Säule nachfolgend für die komplette Analytik eingesetzt. Nach ca. 500 Injektionen war jedoch die Lebensdauer der Säule erreicht. Mit jeder weiteren Injektion wurden die Messungen unzuverlässiger und die Säule wurde deshalb ausgetauscht.

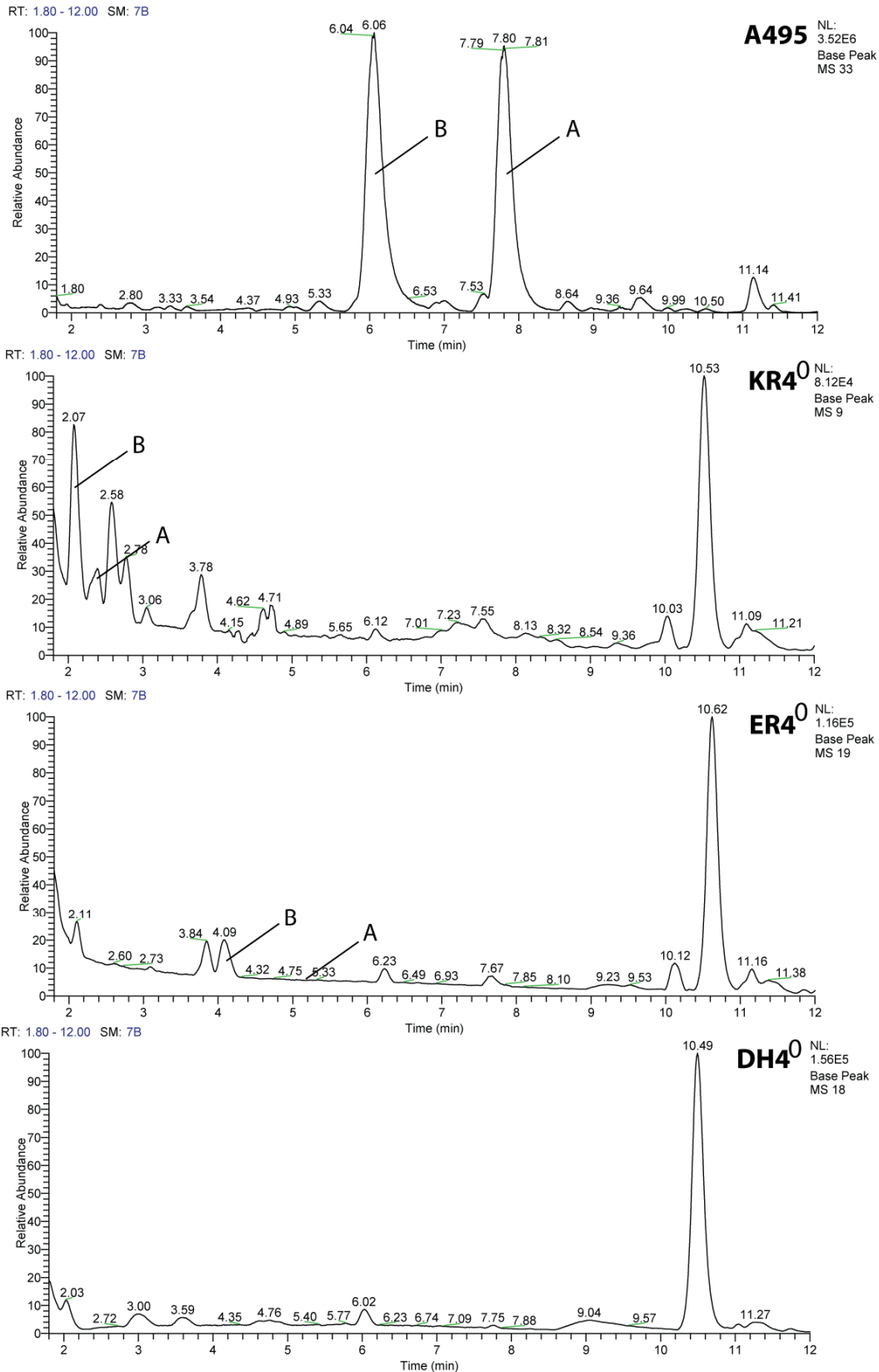
Das gesamte initiale Screening auf Bildung von Redoxderivaten des Pre-Monensin wurde mit dem für das Pre-Monensin optimierten Gradienten (Start = 72% Acetonitril) im positiven Modus durchgeführt. Eine simultane Messung verschiedener Gradienten wäre zwar zu bevorzugen, da von deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten der einzelnen Derivate auszugehen war, konnte aber auf Grund der hohen Auslastung der ESI/MS nicht realisiert werden. Die einzelnen Chromatogramme der Fermentationsextrakte sind in Abbildung 110 bis Abbildung 113 dargestellt.

**Tabelle 13: Übersicht der detektierten Substanzen im HPLC-Screen (n.d. = nicht detektiert)**

Substanz	B		A	
	R=-CH <sub>3</sub>		R=-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Retentionszeit [min]	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Retentionszeit [min]
Pre-Monensin (11)	561	6,06	575	7,8
KR2 <sup>0</sup>	575	2,79	589	3,23
DH2 <sup>0</sup>	577	4,85	591	6,39
ER2 <sup>0</sup>	559	2,48	573	3,03
KR4 <sup>0</sup>	575	2,57	589	2,40
DH4 <sup>0</sup>	n.d. (577)	n.d.	n.d. (591)	n.d.
ER4 <sup>0</sup>	559	4,09	573	6,33
DH5 <sup>0</sup>	579	2,69	593	3,19
KR6 <sup>0</sup>	575	4,68	589	6,02
ER6 <sup>0</sup>	n.d. (559)	n.d.	n.d. (573)	n.d.
DH8 <sup>0</sup>	577	2,82	591	3,56
ER8 <sup>0</sup>	559	4,95	573	7,82

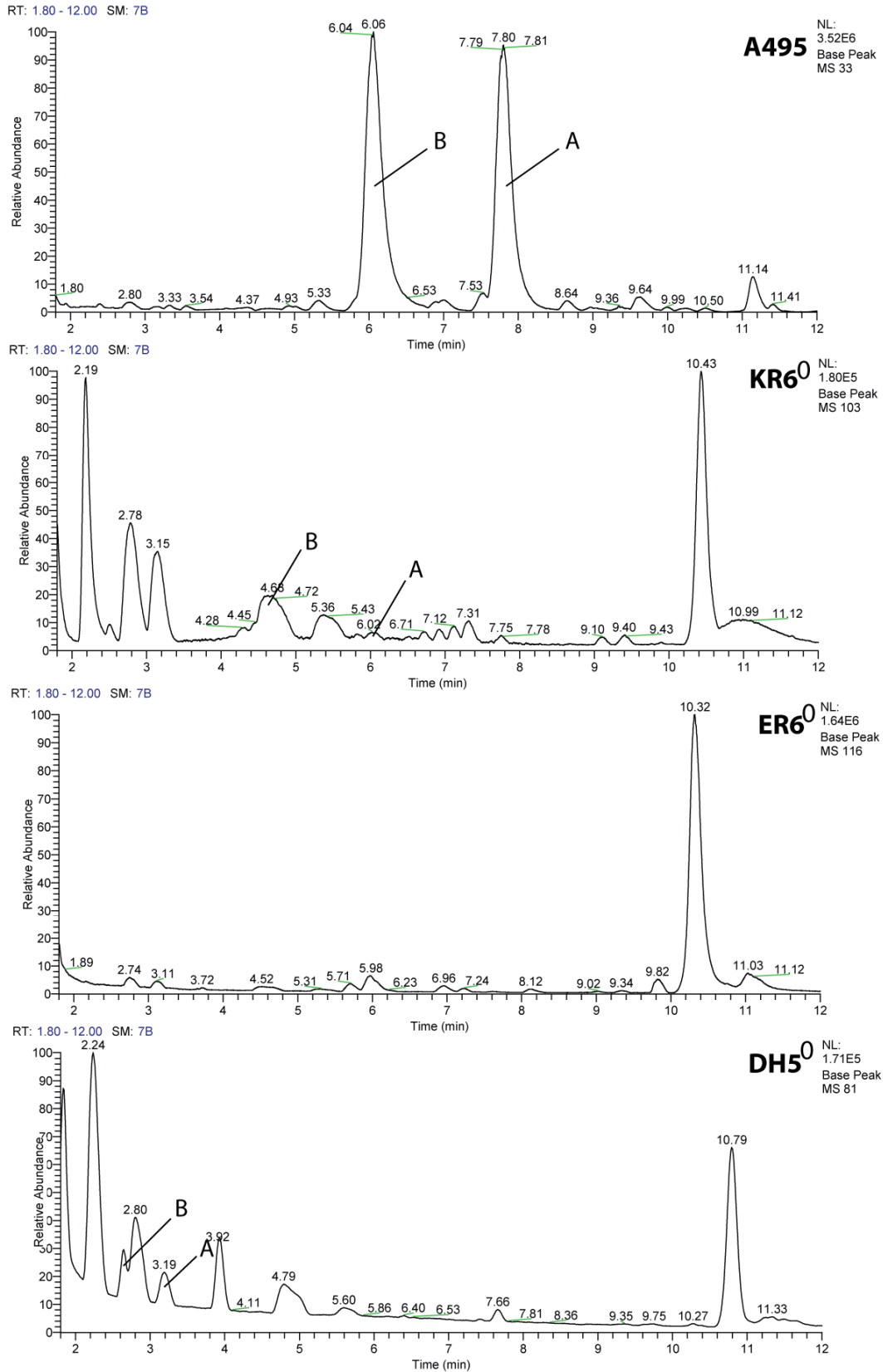


**Abbildung 110: Initiales Screening der Fermentationsextrakte der einzelnen *S. cinnamomensis* A495 Varianten mittels HPLC/ESI-MS unter Verwendung eines identischen Gradienten im Positionen-Modus. Varianten des Moduls 2 im Vergleich mit den Wildtyp.**

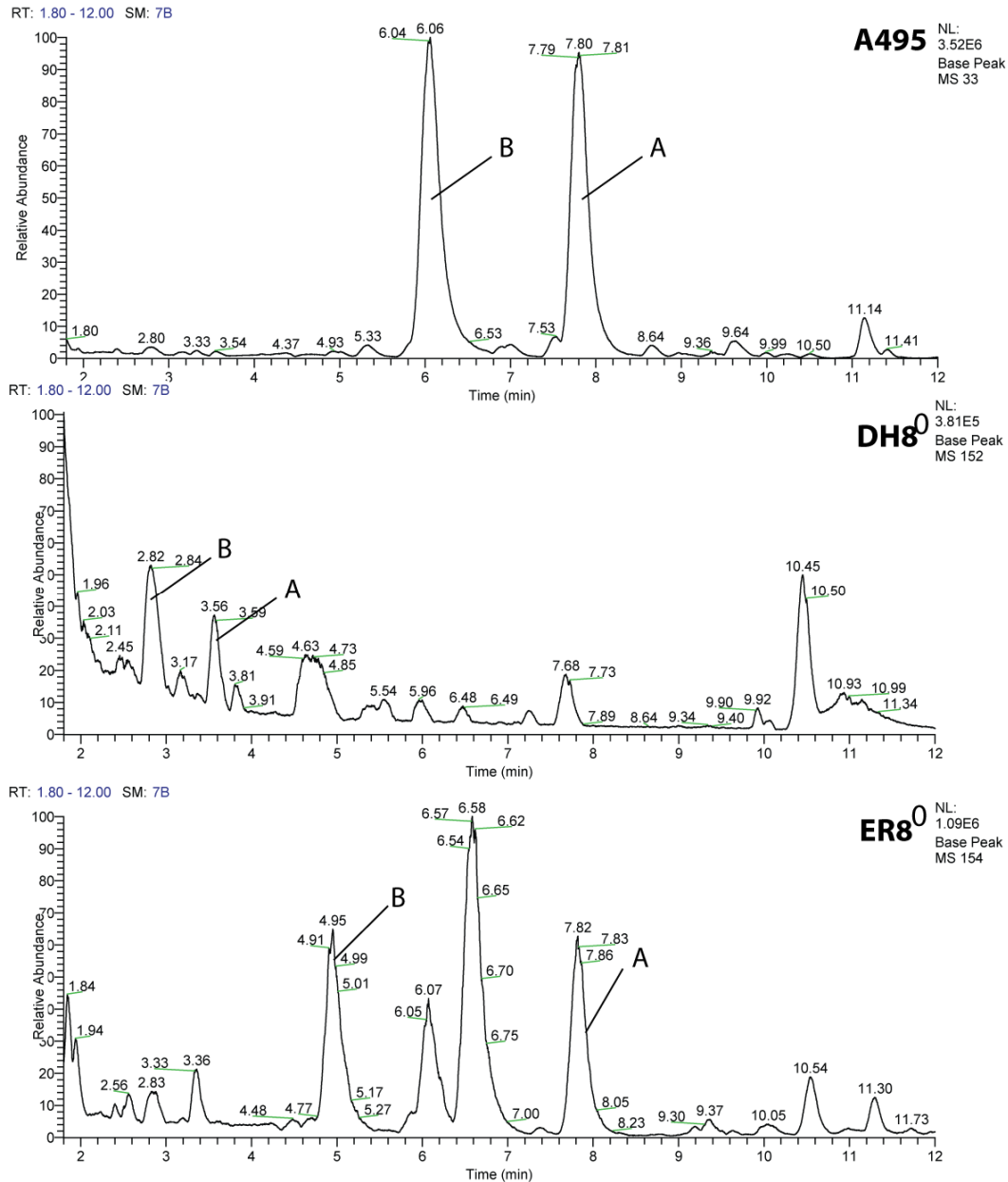


**Abbildung 111:** Initiales Screening der Fermentationsextrakte der einzelnen *S. cinnamonensis* A495 Varianten mittels HPLC/ESI-MS unter Verwendung eines identischen Gradienten im Positionen-Modus. Varianten des Moduls 4 im Vergleich mit den Wildtyp.





**Abbildung 112: Initiales Screening der Fermentationsextrakte der einzelnen *S. cinnamonensis* A495 Varianten mittels HPLC/ESI-MS unter Verwendung eines identischen Gradienten im Positionen-Modus. Varianten der Module 5 und 6 im Vergleich mit den Wildtyp.**

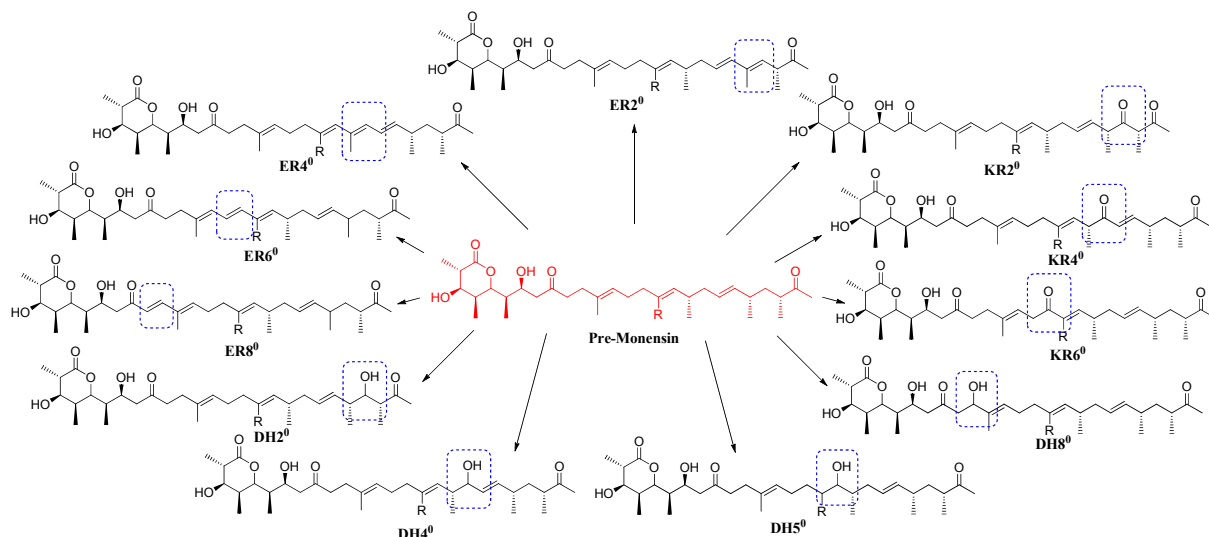


**Abbildung 113: Initiales Screening der Fermentationsextrakte der einzelnen *S. cinnamensis* A495 Varianten mittels HPLC/ESI-MS unter Verwendung eines identischen Gradienten im Positionen-Modus. Varianten des Moduls 8 im Vergleich mit den Wildtyp.**

Die Intensitäten des jeweiligen Produktsignale sind sehr unterschiedlich, sie bewegen sich von Pre-Monensin vergleichbaren Intensitäten (ER2<sup>0</sup>, DH4<sup>0</sup>) über reduzierte bis hin zu nicht nachweisbaren (DH4<sup>0</sup> und ER6<sup>0</sup>). Bei letzteren bleibt fraglich, ob es überhaupt zu Produktbildung kam (Analytik nicht sensitiv genug?) oder ob eine vollständig inaktive Enzymvariante vorliegt.

### 3.8.3 Weitergehende Verifizierung der gebildeten Substanzen

Die initiale Analyse wurde durch die Bestimmung der akkuraten Masse bestätigt. Hier konnten auch die akkuraten Massen der erwarteten DH4 und ER6 Produkte (wenn auch nur als sehr schwache Signale) bestimmt werden, was die Bildung von 22 der vorausgesagten Pre-Monensin Redox-Derivate untermauert.



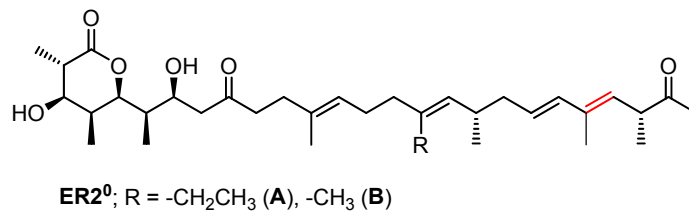
**Abbildung 114: Übersicht der erzeugten Pre-Monensin Redox-Derivate.** R = -CH<sub>3</sub> Pre-Monensin B, R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> Pre-Monensin A. Die Substanzen sind nach ihrem Domän-Typen (KR, DH, ER) und der jeweiligen Modulnummer benannt.

Die einzelnen Ergebnisse zeigen, dass die Erfolgsrate abhängig von den drei verschiedenen Domänen-Typen sowie ihrer Lokalisation ist. Die Akzeptanz der nachfolgenden Module gegenüber der veränderten Kette hängt von der funktionellen Gruppe ab, die durch die Mutagenese eingebracht wurde. Dieser Trend wurde auch schon für die kürzlich beschriebene *trans*-AT PKS Familie beobachtet, wo die KS-Domänen sehr stark zwischen den Redoxniveau des eingehenden Substrates unterscheiden.

Die Domän-überspringende Mutagenese war vollkommen zuverlässig für die Enoylreduktasen des Monensin-Clusters, was in vier mal zwei verschiedenen Polyketiden mit neu gebildeten Alken-Gruppen (ER2<sup>0</sup>, ER4<sup>0</sup>, ER6<sup>0</sup> und ER8<sup>0</sup>) resultierte. Die sekundären Alkohole, die aus der Inaktivierung der Dehydratase-Domänen resultierten, führten zu der Formation von vier der sechs vorhergesagten Produkte (DH2<sup>0</sup>, DH4<sup>0</sup>, DH5<sup>0</sup> und DH8<sup>0</sup>). In Fall der Ketoreduktasen führte die Mutagenese nur in drei der sechs getesteten Domänen zu der Bildung der vorausgesagten Ketone (KR2<sup>0</sup>, KR4<sup>0</sup> und KR6<sup>0</sup>). Zusätzlich und im Gegensatz zu

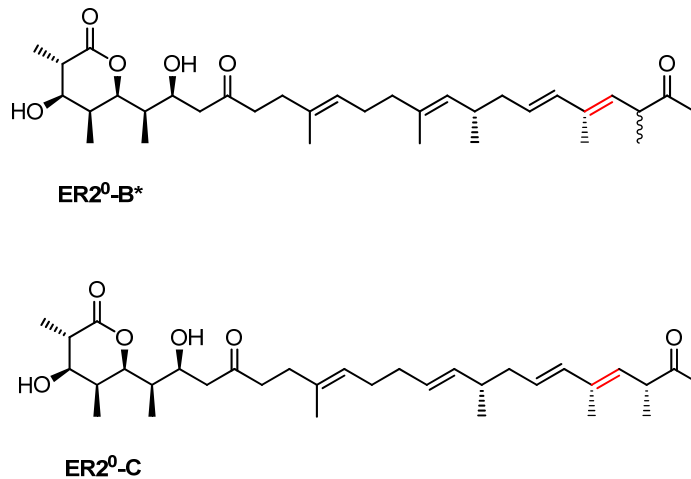
allen anderen Modulen, führte keine der Mutationen innerhalb des Modul sieben zu einem detektierbaren Pre-Monensin Analogon.

Um die Strukturen der vorausgesagten Derivate zu validieren wurden die Fermentationsprodukte des Wildtyps sowie der inaktivierten ER2 Variante durch Dr. Samir Yahiaoui mittels präparativer HPLC aufgereinigt und durch 1D- und 2D-NMR bestimmt. Diese Analyse bestätigte die Strukturen von Pre-Monensin A und B des Wildtyps<sup>[133]</sup> und die der korrespondierenden oxidierten Derivate, ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-A und ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-B, der ER<sub>2</sub><sup>0</sup> Mutante (s. Abbildung 115).



**Abbildung 115: Struktur der Pre-Monensin Derivate ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-A und -B.**

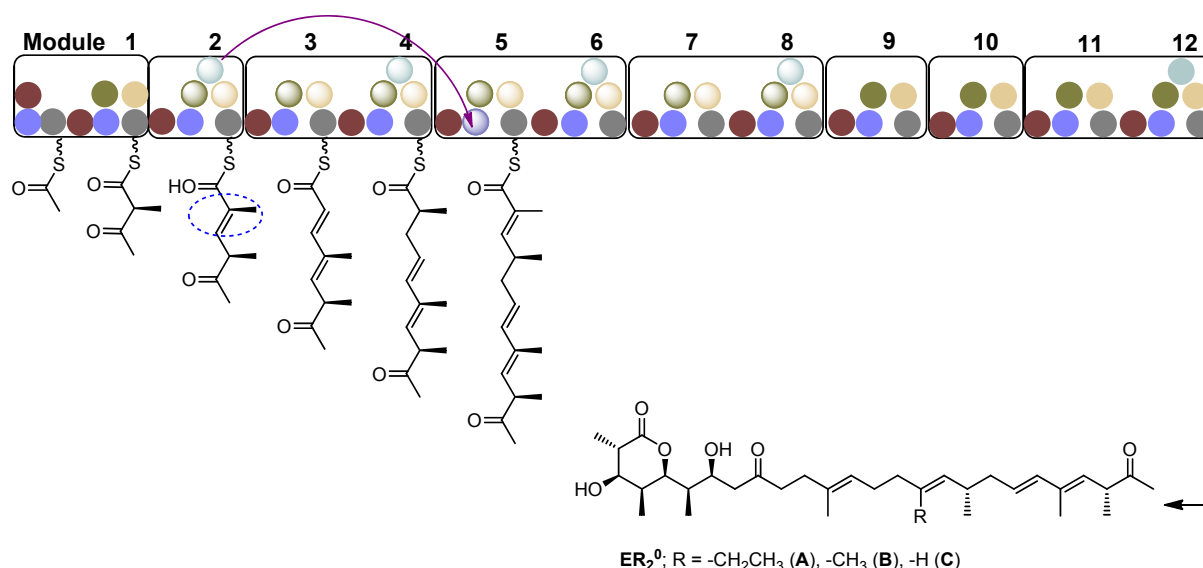
Weitergehend zeigte eine detailliertere Analyse der präparativen Fermentation unerwartete Ergebnisse auf, wodurch ein neuer Einblick in einen möglichen *crossstalk* verschiedener PKS Segmente ermöglicht wird. Neben den erwarteten ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-A und -B Varianten konnten zwei weitere Derivate, genannt B\* und C, isoliert und charakterisiert werden (s. Abbildung 116).



**Abbildung 116: Strukturen der Pre-Monensin Derivate ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-B\* und -C.**

Die ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-B\* Variante ist mutmaßlich die Konsequenz einer erhöhten Tendenz der Tautomerisation des terminalen Keton zu dem korrespondierenden Enol, was in dem Epimer als Nebenprodukt resultiert. ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-C ist ein unerwartetes Desmethyl-Derivat, welches in Milligramm-Mengen ausgehend von der Fermentation der

*S. cinnamomensis* Variante erzeugt werden kann. Im Extrakt des Wildtypes findet sich das analoge Derivat hingegen nicht. Das neue Produkt hat eine Struktur die für einen Einbau von Malonyl-CoA an Stelle von Methylmalonyl- oder Ethylmalonyl-CoA Verlängerungseinheiten in Modul 5 spricht (s. Abbildung 117). Dieses könnte das Resultat einer erweiterten Substratpromiskuität von Modul 5 als Folge des zu prozessierenden nicht-natürlichen Substrates sein.



**Abbildung 117: Schematischer Überblick über den unbekanntem *crosstalk* zwischen den Modulen 2 und 5 als Resultat der Mutagenese der Domäne ER2.** Die durch die Inaktivierung der ER2 Domäne resultierende Veränderung in der wachsenden Polyketidkette ist blau umkreist. Die wachsende Polyketidkette die zu den Pre-Monensin Derivaten ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-A und -B führen sind bis zu Modul 5 aufgezeigt. In der DH5<sup>0</sup> Variante konnte ein weiterer *crosstalk* detektiert werden. Hierdurch veränderte sich das Verhältniss der Pre-Monensin Derivate ER<sub>2</sub><sup>0</sup>-A und -B von sinkt ungefähr 2/3 auf ein Verhältniss von <1/100 in dieser Variante. Für alle anderen, im Rahmen dieser Studie betrachteten PKS Varianten bleibt das Produktverhältniss im Bezug auf den Wildtyp unverändert.

Ein Analoges Verhalten ist bereits für biokatalytische Reaktionen beschrieben, aber war vollkommen unerwartet für eine Typ-I PKS.<sup>[37,180]</sup> Alternativ könnte dieser Effekt auf einen noch zu identifizierenden *proofreading* Mechanismus innerhalb der Monensin Biosynthesemaschinerie basieren, der nicht-native Produkte hydrolisieren könnte.<sup>[181,182]</sup> Auch wenn der exakte Mechanismus unbekannt ist, deutet vieles auf einen *crosstalk* zwischend den Modulen 2 und 5 der Monensin PKS hin. Ob dieser auf Protein-Protein oder Substrat-Interaktionen basiert bleibt zu untersuchen.

Weitergehend konnte ein zweiter unerwarteter *crosstalk* durch die Mutation der DH5<sup>0</sup> Mutante detektiert werden. Durch diese Mutation kommt es so gut wie ausschließlich zur Bildung der Pre-Monensin B Redoxvariante, wobei des Ethyl-Analogon nur in sehr geringen Mengen produziert wird. Das Verhältniss der Pre-Monensin Derivate

ER2<sup>0</sup>-A und -B von sinkt ungefähr 2/3 zu <1/100 in dieser Variante. Für alle anderen, im Rahmen dieser Studie betrachteten PKS Varianten bleibt das Produktverhältniss im Bezug auf den Wildtyp unverändert. Die Mutation der KR5 Domäne führte zu einer vollständig unproduktiven Variante.

Das heutige Verständniss der PKS Enzymologie legt nahe, dass Acyltransferase-Domänen exklusiv zwischen den verschiedenen Malonyl-abgeleiteten Verlängerungseinheiten wählen und für den Einbau verantwortlich sind. In Kapitel 3.4 und 3.5 dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass spezifische Aminosäureaustausche innerhalb der AT6-Domäne zu einer relaxierten Substratspezifität dieser führen, was diese Annahme unterstützt. Die nun erzielten Ergebnisse zum *crossstalk* innerhalb der mutierten Monensin-PKS implizieren jedoch, dass die reduktive Schleife über einen unbekanntem Mechanismus zur Auswahl der Verlängerungseinheiten beiträgt.

Basierend auf ihren strukturellen Ähnlichkeiten zu bekannten, aktiven Polyketiden konnte angenommen werden, dass das nicht-natürliche Pre-Monensin und dessen Redox-Derivate privilegierte Strukturen<sup>[183]</sup> aufweisen. Resultierend wurde ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber einen Satz verschiedener Indikatorstämme bestimmt. Hierbei zeigte Pre-Monensin einen bakterio-statischen Effekt gegen das Gram-negative Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* DSM1117 (MIC = 228 µg/ml). Interessanterweise zeigten die Extrakte verschiedener Redox-Derivate, im direkten Vergleich mit dem Wildtyp, Veränderungen in der Bioaktivität. Darüber hinaus wurden die gereinigten Derivate der ER2<sup>0</sup> Variante genauer untersucht. Die Derivate ER2<sup>0</sup>-A, -B, und -C zeigten alle eine um zwei Größenordnungen erhöhte antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa* (MIC = 1,8 µg/ml für ER2<sup>0</sup>-A). Ferner zeigten diese Derivate Aktivität gegen das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* DSM10 (MIC = 7,2 µg/ml für ER2<sup>0</sup>-A) gegen das Pre-Monensin keinen inhibitorischen Effekt aufwies.

### 3.8.3 Diskussion

Der Ansatz einer systematisch angewandten zielgerichteten Mutagenese zur Erzeugung von Polyketid-Derivaten konnte erstmalig für die einzelnen reduktiven Domänen einer PKS aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen, vermeidet dieser minimal invasive Eingriff den Austausch von Modulen oder ganzen Domänen (*swapping*) und reduziert hierdurch die schädlichen

Effekte der Manipulation. Hierbei hat die spezifische Mutagenese den Zugang zu bisher nicht beschriebenen Polyketiden mit einer hohen Komplexität ermöglicht. 22 der 32 theoretisch vorausgesagten Substanzen konnten detektiert werden, was einer Erfolgsrate von 69 % entspricht. Diese Erfolgsrate ist vor allem deswegen signifikant, weil sie im nativen Produzenten und nicht in einem vereinfachten Modellsystem erzielt wurde. Die Mutagenese wurde in einer PKS mit zwölf Verlängerungsmodulen angewandt und alle so erzeugten Derivate wurden über zehn bis 33 nachfolgende Reaktionsschritte prozessiert. Die Anwendung der zielgerichteten Mutagenese ist ausschließlich Mechanismus-basiert und ist nicht von homologen Bereichen innerhalb der Proteinsequenz abhängig. Dieses macht die Strategie intrinsisch auf alle verwandten PKS und sogar FAS übertragbar, ohne zuvor zeitaufwändig die entsprechende Bereiche identifizieren oder optimieren zu müssen.<sup>[30]</sup>

Die einzelnen Versuche zeigten auf, dass die Erfolgsrate der Mutagenese und die daraus resultierenden neuen Produktvarianten abhängig von den drei verschiedenen Domäntypen sind. Es scheint, als sei die Akzeptanz der nachfolgenden Module gegenüber der modifizierten, wachsenden Polyketidkette von denen durch die Mutagenese eingebrachten funktionellen Gruppen abhängig. Dieser Trend wurde bereits für die kürzlich beschriebene *trans*-AT-Familie<sup>[34]</sup> beschrieben. Hier konnte im Rahmen einer *in-silico* Analyse aufgezeigt werden, dass die einzelnen KS-Domänen scheinbar basierend auf dem Redoxprofil des Substrates die wachsende Polyketidkette akzeptieren oder ablehnen.<sup>[61,184]</sup> Dieses impliziert, dass diese Ablehnung nicht-natürlicher naszierender Polyketidketten durch nachfolgende Domänen nicht nur ein Merkmal der *trans*-AT-PKS ist, sondern auch mit einem weniger kritischen Anteil in den besser untersuchten *cis*-AT-PKS gefunden werden kann. Trotzdem zeigte die hier untersuchte *cis*-AT-PKS eine wesentlich größere Substratpromiskuität.





### 3.9 Zusammenfassende Diskussion

Mikroorganismen produzieren eine Fülle von Metaboliten, die eine sekundäre Aufgabe in ihrer Ontogenese ausüben. Vor allem im Hinblick auf die Behandlung von Infektionskrankheiten stellen diese Sekundärmetaboliten ein breites Spektrum aussichtsreicher Wirkstoffkandidaten und Leitstrukturen zur Verfügung. Die biologisch aktiven Sekundärmetaboliten zeigen eine gut abgestimmte Reaktivität gegenüber ihren molekularen Zielen auf und sind oftmals privilegierte Strukturen.<sup>[183]</sup> Dennoch ist die Zukunft dieser Antibiotika oder andere natürlich vorkommender Arzneistoffe vor allem durch die weitverbreiteten und zunehmenden Resistenzen ungewiss.<sup>[19]</sup> Obwohl regelmäßig eine Vielzahl von mikrobiellen Metaboliten durch kontinuierliche Screeningprogramme identifiziert werden, werden immer weniger fundamental neue Substanzen auf diesem Weg gefunden.<sup>[185]</sup>

Durch die Anwendung der kombinatorischen Biosynthese kann eine Möglichkeit geschaffen werden, neue nicht in der Natur vorkommende Substanzen zugänglich zu machen. Hierzu werden einzelne Reaktionen der Biosynthesekaskade abgewandelt, weggelassen oder ersetzt, so dass ein alternatives Produkt am Ende der Biosynthese steht. Die Anwendung dieser Strategie zur Erweiterung der Polyketid-Diversität bietet einen interessanten und komplexen Forschungsschwerpunkt, der mit großem Engagement sowohl von der akademischen als auch teilweise von der industriellen Seite verfolgt wird. Die bis heute erfolgreichsten Ansatzpunkte sind hier die Generierung von Hybrid-PKS sowie die Mutasythese. Basierend auf beiden Techniken konnten bis heute eine Vielzahl neuer Polyketid-Derivate zugänglich gemacht werden. Jedoch zeigen beide Ansatzpunkte signifikante Limitationen. So resultiert die Generierung von Hybrid-PKS oftmals in Enzymen die eine drastisch reduzierter Aktivität aufweisen oder vollkommend inaktiv sind. Es scheint als fehle dieser Methodik ein rationaler Ansatz der die Übertragbarkeit der Strategie verallgemeinerbar auf alle oder zumindest auf die Mehrheit aller Typ-I PKS ermöglicht. Vielmehr scheint das Prinzip von Versuch und Irrtum zu dominieren. Die Anwendung der Mutasythese hingegen ist intrinsisch limitiert, da nicht jede Position des Moleküls sondern in der Regel nur Start- und Endeinheit modifiziert werden können. Außerdem verlässt sie sich auf eine intrinsische Substratpromiskuität einer

gesamten Biosynthese-Reaktionskaskade, ohne die Möglichkeit, diese zu beeinflussen.

Die größte konzeptionelle Herausforderung zur erfolgreichen gezielten Erweiterung der Diversität bleibt somit weiterhin die Identifikation grundlegender Regeln, die eine Umprogrammierung der Biosynthesemaschinerie erlauben. Ein fundamentales Verständnis der Interaktionen zwischen den einzelnen Enzymen untereinander und mit ihren jeweiligen Substraten ist hierfür notwendig.<sup>[83]</sup>

Die Fähigkeit nicht-natürliche Bausteine in die Polyketide Biosynthese einbauen zu können, würde den Spielraum zur gezielten Diversitätserhöhung drastisch erweitern. So würde der Einbau einer orthogonalen Reaktivität in ein einzelnes Polyketide eine weitergehende spezifische Derivatisierung ermöglichen. Verschiedene Ansatzpunkte wurden im Rahmen dieser Arbeit verfolgt, um unter Anwendung klassischer Strategien (*Shuffling* und Mutasynthese) aber auch exploratorischer Versuchsführungen (beispielsweise zielgerichtete Mutagenese einer Acyltransferase zur Relaxierung der Substratspezifität) neue Wege zu erhöhter Polyketid-Diversität zu ebneten. Der maßgebliche Grundstein wurde hier durch die Etablierung einer Methode zur zielgerichteten Modifikation von Polyketiden geschaffen. Ziel der Etablierung war es, die spezifische Modifikation komplexer Enzyme wie Polyketidsynthasen experimentell in mittlerem Durchsatz zugänglich zu machen. Die geschaffene Methode ermöglicht eine nahezu fehlerfreie Amplifikation unterschiedlicher Gensequenzen bis zu einer Größe von ca. 12 kb sowie die nachfolgende Klonierung mittels SLIC-MIX. In Kombination mit der kleinen erzeugten pKSSU-Vektorfamilie wurde die effiziente Modifikation von biosynthetischen Pfaden mit deutlich verringertem experimentellen Aufwand ermöglicht. (Unter Anwendung der klassischen Klonierungsstrategien vergehen oftmals Monate um Expressionskonstrukte einzelner *pks*-Gene zugänglich zu machen. Unter Anwendung des SLIC-MIX sind solche Konstrukte nun in zwei Tagen nach Gen-Amplifikation zugänglich.)

Nachfolgend konnte durch die Versuche zur Generierung einer Hybrid-PKS einmal mehr aufgezeigt werden, dass bei Anwendung dieser Strategie oftmals das Prinzip von Versuch und Irrtum vorherrscht. Obwohl alle Überlappbereiche aus erfolgreichen Experimenten zum Austausch dieser Domänen übertragen wurden, resultierte der Austausch der DEBS AT6-Domäne gegen die Nid AT5 nicht wie erhofft in 2-Ethylerythromycin sondern in einer vollständig inaktiven Hybrid-PKS. (In der Literatur

sind sowohl entsprechende Austausche der DEBS AT6-Domäne gegen verschiedene Acyltransferasen sowie der NID AT5 an Position der DEBS AT4-Domäne beschrieben.) Dieses untermauert einmal mehr die Notwendigkeit der Identifizierung von grundlegenden Regeln, um so die Erfolgsquoten einzelner Experimente zu erhöhen.

Um einen rationalen Ansatzpunkt zur Diversitätserhöhung in der Zukunft zu ermöglichen, wurden erstmalig im Rahmen dieser Arbeit Studien zu Sequenz-Funktionsbeziehungen von PKS-Acyltransferasen durchgeführt. Die AT6-Domäne des DEBS Clusters diente hier als Modellsystem. Die 14 identifizierten Reste, die möglicherweise Einfluss auf den Prozess der Substratwahl haben, wurden hierzu genauer betrachtet, wodurch neue Erkenntnisse über die Substratspezifität dieser Enzyme gewonnen werden konnten. Die in der Biotechnologie routinemäßig eingesetzte Sättigungsmutagenese konnte erfolgreich auf die Manipulation der katalytischen AT-Domäne in ihrer natürlichen Umgebung übertragen werden. Die so gewonnenen 266 Enzymvarianten ermöglichten ein Screening, wodurch eine Datensammlung generiert wurde, die den Einfluss der Sequenz der einzelnen Varianten auf die Gesamtzym-Aktivität sichtbar macht. Ein totaler Verlust der Enzymaktivität durch diesen minimal invasiven Eingriff konnte nur in relativ wenigen Fällen detektiert werden. Weitergehend konnte in drei der getesteten Varianten eine relaxierte Substratspezifität nachgewiesen werden. Alle drei Varianten produzierten neben dem Hauptprodukt Erythromycin A (**1**) noch die 2-Desmethyl-Variante, welche aus dem partiellen Einbau von Malonyl-CoA an Stelle des natürlichen Substrates Methylmalonyl-CoA resultiert. Die gewonnenen Daten wurden weitergehend verwendet, um ein Modell der substratgebundenen AT6-Domäne zu verifizieren. Hierbei stehen die experimentellen Daten in vollständigen Einklang mit den theoretischen Berechnungen. Weitergehend erlaubten die einzelnen Modelle des substratgebundenem Wildtyp-Enzyms sowie ausgewählter Mutanten eine Erklärung der einzelnen Phänomene. Erstmals konnte so eine Hypothese vorgeschlagen werden, die die Bildung von 2-Desmethylerythromycin (**5**) neben Erythromycin A durch ein YAFH-Hybridmotiv begründet.

Nachfolgend wurde das Modell verwendet, um weitere Reste zu identifizieren, die potentiell entscheidend für eine Reduktion der Substratspezifität sind. Zuvor wurde durch keine der 266 generierten Varianten der Einbau einer propargylierten SNAC-aktivierten Malonsäure ermöglicht. Durch die Mutation der mittels Modell

identifizierten Aminosäure Val295 konnte die Bildung eines selektiv propargylierten Erythromycin-Derivates nachgewiesen werden. Doch scheint auch hier die gegenwärtig größte Herausforderung der kombinatorischen Biosynthese präparativ nützliche Mengen erstellen zu können, noch nicht überwunden worden zu sein. Hauptprodukt der Fermentation ist noch immer Erythromycin A, vom generierten Derivat hingegen sind nur geringe Mengen nachweisbar. Trotz allem und wirklich hervorzuheben ist die Tatsache, dass erstmalig aufgezeigt werden konnte, dass durch eine gezielt platzierte spezifische Mutation die Substratspezifität relaxiert werden kann und so ein Einbau eines nicht-natürlichen Substrates ermöglicht wird. Möglicherweise kann die Substratspezifität durch eine kombinierte Mutation der Positionen Val295, Tyr297 und Ser299 weiter in Richtung des propargylierten Substrates verschoben werden, wodurch synthetisch nützliche Mengen des Derivates zugänglich werden könnten. Die eingebaute Propargylgruppe stellt eine leicht modifizierbare funktionelle Gruppe dar, die wiederum einen erleichterten Zugang zu einer weitergehenden chemischen Modifikation des Polyketids und einer enormen Diversitätserhöhung ermöglichen würde. Diese bleibt jedoch abzuwarten und zu hoffen, dass die simultane Mutation dieser drei Reste nicht mit einem drastischem Aktivitätsverlust einher geht. Bedeutsam ist die Tatsache, dass sich diese Strategie im Gegensatz zur sequenz-homologie basierten Strategie intrinsisch auf alle verwandten Enzyme übertragen lässt. In welchem Ausmaß sich das experimentell realisieren lassen wird, bleibt gegenwärtig noch offen.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung einer *trans*-agierenden moderat thermophilen MAT aus *Thermobifida fusca* wurde der Grundstein für die Generierung einer artifiziellen *cis/trans* agierenden Hybrid-PKS gelegt. Im Gegensatz zu *cis* (sprich im modularem Fließband gelegene) agierenden Acyltransferasen handelt es sich bei den *trans*-agierenden um eigenständige Enzyme, wodurch viele experimentelle Ansätze drastisch vereinfacht werden. Zwar ist dieser Ansatz akademisch gesehen weniger elegant, da das Verständnis der PKS nicht vorangetrieben wird. Er ebnet möglicherweise aber schneller den Weg zu einer erhöhten Polyketid-Diversität. Durch die gelöste Kristallstruktur wurde der Zugang zu einem rationalen Enzymdesign geschaffen, das neben dem Einsatz zufälliger Mutagenesetechniken zu einer MAT Variante führen soll, die den Einbau eines nicht-natürlichen Substrates in ein Polyketid ermöglicht. Neben der Sättigungsmutagenese konnten weitere Mutagenesetechniken erfolgreich für die Modifizierung der MAT

etabliert werden. Die einzelnen Hürden zur Generation von verschiedenen Bibliotheken und der nachfolgenden Testung mittels FACS Screening sind aus molekularbiologischer Sicht überwunden worden sein.

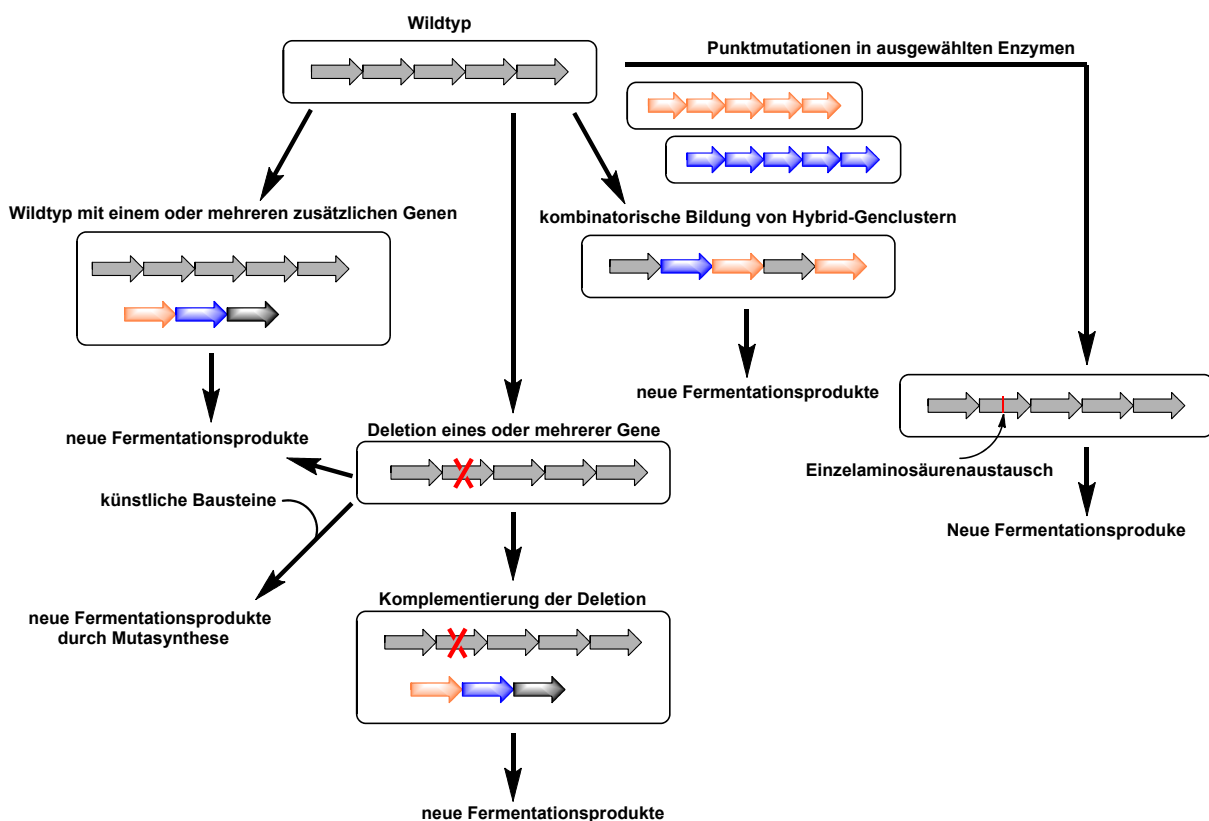
Beide Ansätze verfolgen primär das Ziel, gezielt eine nicht-natürliche Verlängerungseinheit in Polyketide einzufügen. Auch wenn im Fall der zielgerichteten Modifikation der AT6-Domäne und dem dadurch ermöglichten Einbau von propargylierter SNAC activierter Malonsäure (SK107) der erste große Schritt in Richtung Ziel geebnet wurde, bleibt abzuwarten, welcher der zwei Ansätze letztlich zu einer präparativen chemofermentativen Synthese führt und welcher der beiden Ansätze darüber hinaus verallgemeinerbar auf weitere PKS sein wird.

Die klassische Mutasynthese wurde ebenfalls zur Generierung von Rapamycin und Erythromycin Derivaten angewandt. In beiden Fällen sollte durch die heterologe Zufuhr synthetischer Bausteine Zugang zu einer orthogonalen Reaktivität im Polyketid geschaffen werden. Die bevorzugte funktionelle Gruppe war in diesen Versuchsansätzen eine Azidfunktion, darüber hinaus wurden aber auch weitere getestet. Im Fall von Rapamycin war der Ansatz der Mutasynthese jedoch nicht erfolgreich. Lediglich eine der getesteten Substanzen scheint akzeptiert und eingebaut worden zu sein. Jedoch konnte hierdurch nicht wie erwartet, eine Azidfunktion in das Molekül eingebracht werden. Die Azidgruppe scheint statt dessen oxidativ abgebaut worden zu sein. Durch die dadurch mögliche Freisetzung von Stickstoffmonooxid könnte die post-PKS Prozessierung inhibiert worden sein, was in einer 27-Desmethoxyvariante des Rapamycin resultierte. Das neue Derivat bietet keine zusätzlichen funktionellen Gruppen, die durch chemische Modifikation einen schnellen Zugang zur Diversitätserhöhung ebnet würde. Erfolgreicher konnte diese Technik zur Erzeugung von Erythromycin-Derivaten eingesetzt werden. Da die Generierung der KS1-Nullmutante nicht so schnell wie erhofft möglich war, wurden die synthetischen Diketide an den *S. erythraea* Wildtyp verfüttert (man spricht dann von einer Vorläufer-geleiteten Modifikation). Zwei der drei getesteten Diketide wurden bereits erfolgreich von diesem eingebaut. Alles deutet darauf hin, dass einer erfolgreichen Produktisolation in synthetisch nutzbaren Mengen nach einer Skalierung der Fermentation unter Verwendung einer KS1-Nullmutante nichts im Wege steht. Die Grundlage für eine weitergehend Derivatisierung an Position C15 des Erythromycins sollte hiermit geebnet sein, insbesondere da es bereits im analytischen Maßstab gelang, durch eine Cu(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

ein fluorophormarkiertes Erythromycin in kleinen, analytisch nachweisbaren Mengen darzustellen.

Mit der zielgerichteten Mutagenese der einzelnen reduktiven Domänen des Monenin Biosyntheseclusters wurde Zugang zu einer Vielzahl neuer Derivate geschaffen. Erstmals wurde hier systematisch aufgezeigt, dass durch einen gezielt platzierten Einzelaminosäureaustausch reduktive Domänen in der Polyketid-Prozessierung übersprungen werden können. Die Erfolgsrate von mehr als 60% spricht eindeutig für diese Strategie, die im Originalproduzenten angewandt wurde. Diese Technik der spezifischen Inaktivierung der reduktiven Domänen kann hervorragend eingesetzt werden, um die Eigenschaften und das Wirkspektrum eines Polyketides zu verändern, allerdings nur im Rahmen des natürlichen Spektrums funktioneller Gruppen.

Basierend auf unterschiedlichen Ansatzpunkten wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Wege geebnet, die entscheidend zur Diversitätserhöhung von Polyketid-Strukturen beitragen können. Die Modifikation von Polyketiden ist nach wie vor eine Herausforderung und nicht alle Ansatzpunkte waren von Erfolg gekrönt.



**Abbildung 118: Übersicht über die Methoden der kombinatorischen Biosynthese zur Erweiterung der Polyketid Diversität.** In der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, die ortsgerechte Mutagenese ausgewählter Abschnitte aus PKS als fundamental neue Strategie in der kombinatorischen Biosynthese nutzen zu können.

Trotz all dieser Ergebnisse steht nach wie vor ein holpriger und steiniger Weg bevor, der bewältigt werden muss um die komplexe Modifikation von Polyketid Biosynthesewegen weiter voran zu treiben.

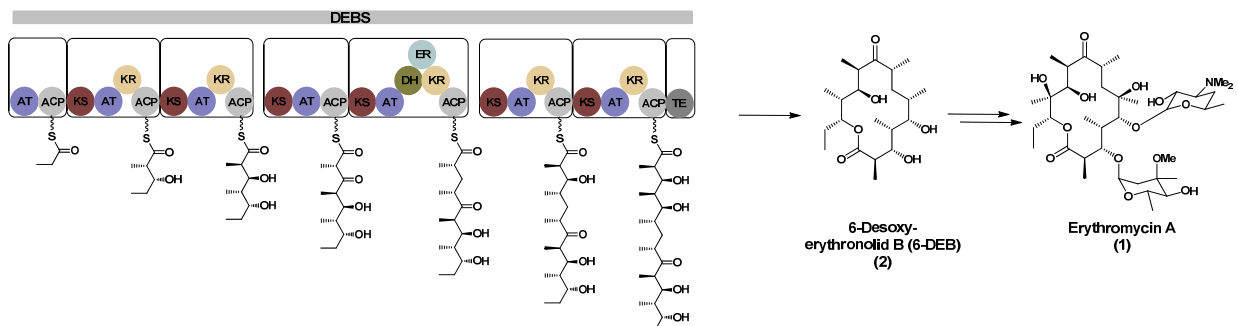




## 4 Zusammenfassung

Polyketide bilden eine der größten Naturstoffklassen. Viele von ihnen wurden im Rahmen von Hochdurchsatz-Screens auf der Suche nach biologisch aktiven Substanzen identifiziert und aus Pilzen, Pflanzen oder Bakterien isoliert.<sup>[20]</sup> Viele dieser Substanzen oder deren Derivate sind von enormer Bedeutung in der modernen Medizin. Das Antibiotikum Erythromycin, das Immunsuppressivum Rapamycin und das in der Krebstherapie eingesetzte Epothilon Derivat ZK-EPO sind prominente Vertreter dieser Stoffklasse. Die biologisch aktiven Polyketide weisen eine gut abgestimmte Reaktivität gegenüber ihren molekularen Zielen auf und sind oftmals privilegierte Strukturen.<sup>[106,183]</sup> Dennoch ist die Zukunft dieser Antibiotika oder anderer natürlich vorkommender Arzneistoffe vor allem durch die weit verbreiteten und zunehmenden Resistenzen von Krankheitserregern ungewiss.<sup>[19]</sup>

Auch wenn Polyketide eine hohe strukturelle und funktionelle Diversität aufweisen teilen sie einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung. Die Biosynthese des Polyketids Erythromycin wurde in den Jahren 1990/91 unabhängig von den Arbeitsgruppen um P. F. Leadlay<sup>[43]</sup> und L. Katz<sup>[44]</sup> aufgeklärt und ist seitdem das zentrale Modellsystem der Forschung rund um PKS (vgl. Abbildung 119).



**Abbildung 119: Schematische Übersicht der Biosynthese von Erythromycin A.** Der Multienzymkomplex ist aus drei nicht kovalent miteinander verbundenen Enzymen (DEBS 1, 2 und 3) aufgebaut. Jedes dieser Enzyme ist aus sogenannten Modulen konstruiert (schwarze Kästen). Ein minimales Modul beinhaltet eine Ketosynthase (KS), die eine decarboxylierende Claisenkondensation katalysiert, eine Acyltransferase (AT), die das Substrat auswählt und es auf das Acylcarrierprotein (ACP) überträgt, welches die wachsende Polyketidkette während der Prozessierung trägt. Zusammen katalysieren diese Domänen eine Verlängerung um zwei C-Atome zuzüglich Seitenkette, was in einem  $\beta$ -Ketoester resultiert. In variablen nachfolgenden Schritten kann der Ester innerhalb der reduktiven Schleife weiter prozessiert werden: durch eine Ketoreduktase (KR) zum korrespondierenden Alkohol, durch eine Dehydratase (DH) zum Alken und final durch eine Enoylreduktase (ER) zum Alkan. Final katalysiert eine terminale Esterase (TE) die Abspaltung vom Enzym und ermöglicht so eine Cyclisierung. Post-PKS Prozesse wie Glykosilierungen komplementieren die Biosynthese des Antibiotikums Erythromycin A.

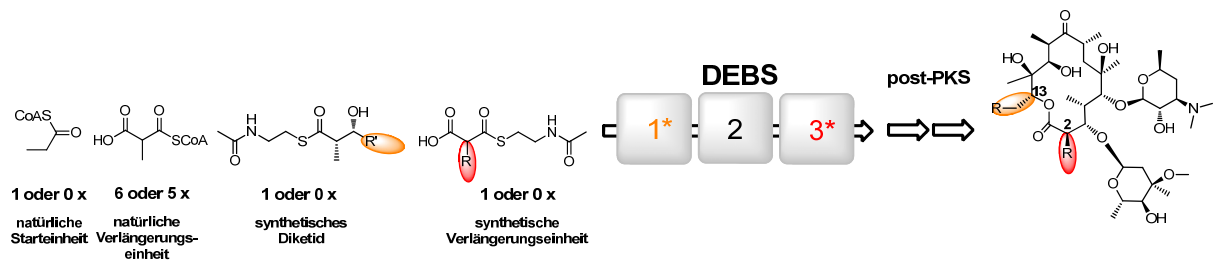
Die Biosynthese verläuft über sogenannte Polyketidsynthesen, die metabolisch verfügbare Acyl-CoA Bausteine durch einen schrittweisen Mechanismus in komplexe Polyketide umwandeln.<sup>[22,49,186]</sup> Polyketidsynthesen gehören zu den größten bekannten Proteinen; Monomere erreichen oftmals über 300 kDa und die Größe des funktionalen Komplexes liegt im Mega-Dalton Bereich. Ihre Größe, sowie ihre Multidomänen-Architektur machen herkömmliche *enzyme engineering* Strategien wie sie für kleinere biokatalytisch genutzte Enzyme angewandt werden ineffizient. Darüber hinaus sind die Polyketid-produzierenden Bakterien oftmals nur schwer genetisch zu manipulieren und die heterologe Fermentation dieser Systeme ist meistens unproduktiv.<sup>[79,81,126]</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Strategien zur kombinatorischen Biosynthese von Polyketiden entwickelt und angewandt, um so einen Beitrag zur gesteuerten Diversitätserhöhung in dieser Substanzklasse zu leisten. Im Fokus standen hierbei Mechanismus-basierte Strategien die verallgemeinerbar und auch auf andere Polyketide anwendbar sein sollten. Um sinnvolle Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen zuziehen und eine Übertragung dieser zu ermöglichen, wurden die Modifikationen innerhalb der Originalproduzenten der einzelnen Polyketide durchgeführt. Hierbei wurde ausschließlich mit den Hauptproduzenten von Typ-I-Polyketiden gearbeitet: filamentös wachsende Bakterien der Ordnung Actinomycetales.

Als Basis nachfolgender Arbeiten wurde eine Methode entwickelt und etabliert, die eine rasche und zuverlässige Manipulation der für Polyketide codierenden Gencluster ermöglicht. Diese sind in den untersuchten Fällen durchweg sehr groß und von hohem GC-Gehalt, was klassische Mutagenesetechniken in der Regel an ihre Grenzen bringt. Ausgehend von einem systematischen Screening wurde ein robustes PCR-Protokoll für eine fehlerarme Amplifikation von bis zu 12 kb GC-reicher Amplikone etabliert. Nachfolgend wurde mit dem SLIC-MIX eine Klonierungsstrategie entwickelt, die eine schnelle und zuverlässige Klonierung von großen Fragmenten mit zufriedenstellender Klonierungseffizienz ermöglicht. Komplementiert wurde diese Entwicklung durch die kleine pKSSU-Vektorfamilie, die eine simultane Integration manipulierter Gene an bis zu drei Loci in das Genom von Actinomyceten ermöglicht. Diese kombinierte Technik bildet eine neue Plattform, die Wege für eine signifikante

Beschleunigung aller anfallenden Arbeitsschritte während der Manipulation von biosynthetischen Pfaden auf dem Weg zu Naturstoffderivaten ermöglicht.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Modifikation der Erythromycin Biosynthesemaschinerie DEBS (s. Abbildung 119). Hierzu wurden durch verschiedene Ansatzpunkte wegweisende Schritte für den Einbau orthogonaler Reaktivitäten in das Polyketid Erythromycin beschriftet.

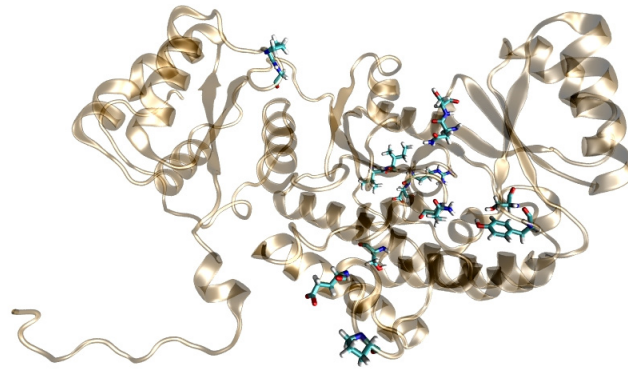


**Abbildung 120: Modifikationen von DEBS zur Derivatisierung von Erythromycin A. Angewandte Strategien:** **A** Basierend auf der Vorläufer-geleiteten Biosynthese sollten durch den Einbau eines synthetischen Diketides der westliche Bereich des Moleküls (orange) modifiziert werden. **B** Durch den Austausch der AT6-Domäne gegen die Nid AT5 (*Swapping*) sollte der Einbau eines nicht-nativen Substrates ermöglicht werden. **C** Durch die zielgerichtete Mutation der AT6-Domäne sollte die Substratflexibilität der Domäne relaxiert werden. **D** Generierung einer cis/trans Hybrid-PKS, durch die Mutation einer trans agierenden AT-Domäne sollte auch hier die Substratspezifität relaxiert werden. Durch die Strategien 2 bis 6 sollte jeweils das C2 (rot) des Erythromycin modifiziert werden.

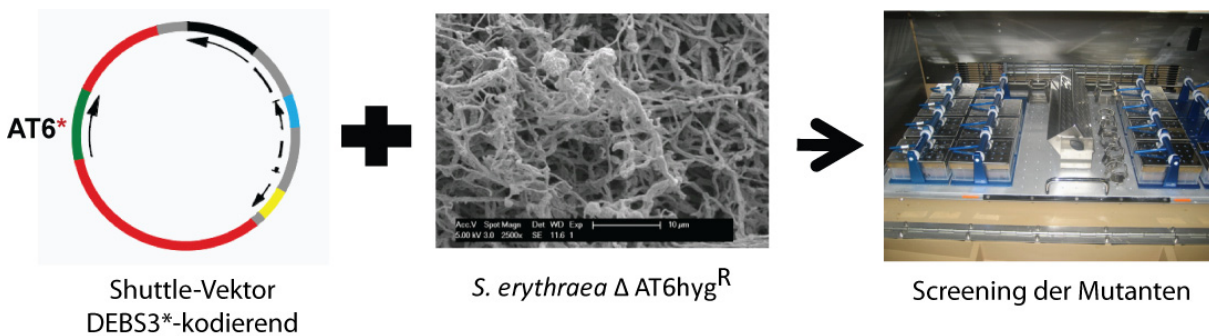
Die Entwicklung und Anwendung moderner Strategien zur Flexibilisierung der Substratspezifität von Acyltransferasen, die so den Weg für einen Einbau eines nicht-natürlichen Substrates ebnet, standen im direkten Fokus dieser Arbeit. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt:

### 1. Zielgerichtete Mutagenese einer *cis* agierenden Acyltransferase

Durch die direkte zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren innerhalb der DEBS AT6-Domäne wurden Sequenz-Funktionsbeziehungen studiert. Initiiert wurde das Projekt durch Sequenzvergleiche und die Betrachtung von Kristallstrukturen verwandter Acyltransferasen. Hierdurch wurden 14 Aminosäuren identifiziert, die potentiell Einfluss auf die Substratspezifität haben könnten (vgl. Abbildung 121). Diese Reste wurden in einem semi-rationalen Ansatz einer Sättigungsmutagenese unterzogen und der Einfluss der Aminosäurenaustausche auf die Erythromycin-Produktivität analysiert (Abbildung 122). Das Screening im mittleren Durchsatz resultierte in einer klaren Korrelation zwischen eingefügter Mutation und Aktivität des Multienzymkomplexes, wodurch neue Erkenntnisse über den Prozess der Substraterkennung gewonnen werden konnten.



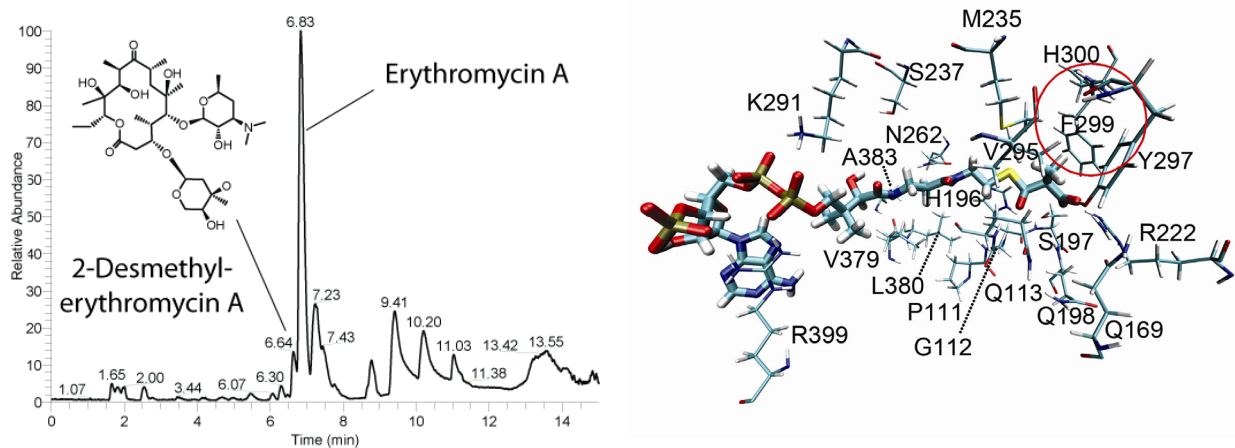
**Abbildung 121: Modellstruktur der DEBS AT6 Region.** Die 14 identifizierten Reste, die möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität haben sind als Stabmodell dargestellt. Modell und Abbildung stammen vom Kooperationspartner Kenny Bravo-Rodriguez.



**Abbildung 122: Versuchsaufbau des Screenings auf Erythromycin-Produktion durch die Sättigungsbibliotheken.** Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde von der *S. erythraea* Genome Project Web Site (<http://131.111.43.95/gnmweb/index.html>) übernommen.

Oftmals sind es nur wenige Mitglieder einer Aminosäureklasse, die negative Effekte auf die Erythromycin-Produktion ausüben, jedoch ohne offenkundige Systematik. Insgesamt scheint eine sehr hohe Spezifität vorzuliegen, auf die die einzelnen Mutationen bedeutend Einfluss nehmen. Darüber hinaus konnte eine Relaxierung der Substratspezifität und ein hieraus resultierender Einbau des nicht-nativen Substrates Malonyl-CoA in drei der 266 untersuchten Enzymvarianten detektiert werden. Durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Elsa Sanchez-Garcia vom MPI für Kohlenforschung wurde ein Modell der substratgebundenen AT6-Domäne zugänglich, das im Einklang mit den experimentellen gewonnenen Daten steht. Die MD-Simulationen der ebenfalls modellierten Varianten ermöglichten eine Interpretation der experimentellen Resultate. So konnte durch Berechnungen beispielsweise aufgezeigt werden, worauf die Relaxation der Substratspezifität und

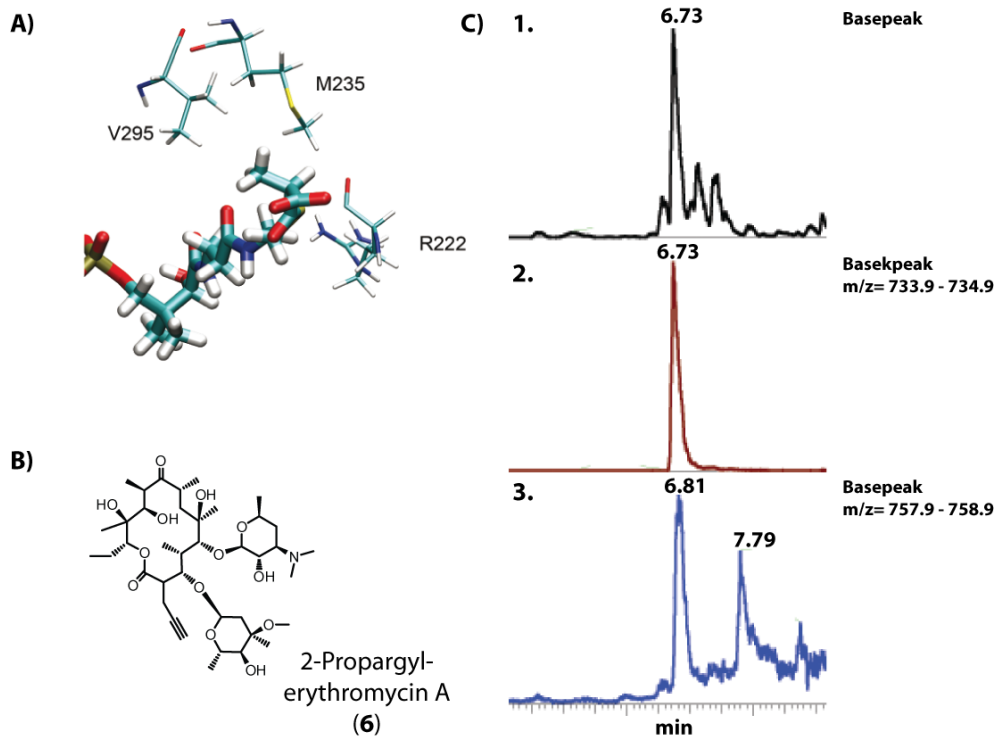
der dadurch ermöglichte Einbau des nicht-nativen Bausteines Malonyl-CoA basiert (vgl Abbildung 123).



**Abbildung 123: Relaxierung der Substratspezifität durch die Enzymvariante Ser299Phe.** Links: HPLC/ESI-MS Chromatogramm des Ethylacetatextraktes der Fermentation der entsprechenden *S. erythraea* Mutante. Rechts: MD-Simulation der Enzymvariante mit dem nativen Substrat Methylmalonyl-CoA. Der Benzylrest des Phenylalanin (F299) ist in der Lage in die Bindetasche der Acyltransferase zu rotieren. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Reduktion des frei verfügbaren Raumes in der Bindetasche, wodurch ein Einbau von Methylmalonyl-CoA unterdrückt wird und Malonyl-CoA als Verlängerungseinheit akzeptiert wird.

Mit dem Ziel, einen nicht-natürlichen Baustein in die Biosynthese von Erythromycin einzubringen, wurde die gesamte Bibliothek in Anwesenheit von propargylierter, SNAC-aktivierter Malonsäure (SK 107, synthetisiert durch Stephan Klopries) rekultiviert. Durch keine der Mutanten konnte ein signifikantes nicht-natives Produktsignal detektiert werden. Basierend auf einer genaueren Betrachtung des zuvor generierten Modells konnte mit Val295 eine Aminosäure innerhalb des aktiven Zentrums identifiziert werden, die möglicherweise mit einer verlängerten Seitenkette des natürlichen Methylmalonyl-CoA korrelieren würde. Die Aminosäure Val295 war in der initialen Phase des Projektes nicht durch Sequenzvergleiche von Acyltransferasen mit unterschiedlicher Substratspezifität identifiziert worden. Um eine mögliche sterische Hinderung ausgehend von Val295 zu umgehen, wurde die Aminosäure ebenfalls mutiert. Durch die zielgerichtete Mutation Val295Ala wurde ein signifikanter Einbau des nicht natürlichen Substrates erreicht, wodurch die Bildung von 2-Propargylerythromycin A (**6**) ermöglicht wurde. Auch wenn Erythromycin noch immer das Hauptprodukt der Fermentation ist, und das erhaltene Derivat nicht in präparativ nutzbaren Mengen vorliegt, so konnte doch aufgezeigt werden, dass ein gut platzierter Einzelaminosäureaustausch den Einbau nicht-natürlicher Bausteine

ermöglicht. Eine weitere - möglichst vollständige - Verschiebung der Substratspezifität in Richtung des künstlichen Produktes könnte in Zukunft den Zugang zu größeren, synthetisch nutzbaren Produktmengen ebnen. Hierzu wurden verschiedene weitere Mutageneseansätze, die die Kombination von bis zu drei Aminosäuren beinhalten, aufgezeigt.



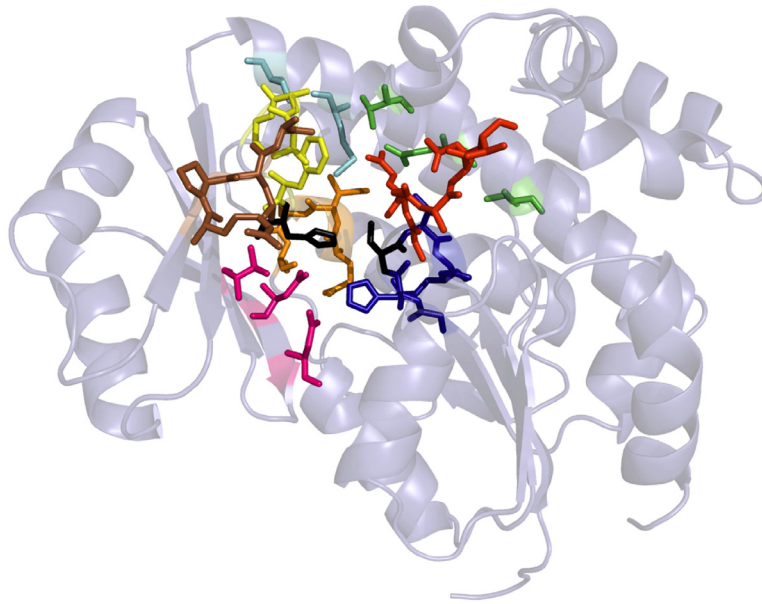
**Abbildung 124: Einzelaminosäureaustausch Val295Ala ermöglicht den Einbau eines nicht-natürlichen Substrates.** **A** MD Simulationen identifizierten die Aminosäure Val295 als für die Substratspezifität potentiell kritische Aminosäure innerhalb von DEBS3. **B** Struktur des 2-Propargylerythromycin A (6). **C** Chromatogramm des Fermentationsextraktes Val295Ala bei Fütterung von SK 107. Das Signal mit dem erwarteten Masse zu Ladungsverhältniss ( $m/z=758$ ) coeluiert mit deutlich schwächerer Intensität mit dem des Erythromycin A zugehörigen.

## 2. Generierung einer *cis/trans* Hybrid-PKS

In Analogie zu den *cis*-agierenden AT-Domänen, wie beispielsweise innerhalb der Erythromycin Biosynthese zu finden sind, gibt es in verwandten PKS *trans*-agierende Acyltransferasen, die als freistehendes Enzym die einzelnen Bausteine auf die PKS übertragen. Jedoch sind bisher nur Enzyme beschrieben, die Malonyl-CoA als Acyldonor akzeptieren. Ferner sind diese Enzyme Teil einer sehr substratspezifischen und komplexen Enzymmaschinerie.

Ein vergleichbares aber einfacher aufgebautes System findet sich innerhalb der bakteriellen Fettsäurebiosynthese. Hierbei übertragen Malonyl-CoA:Acyl Carrier

Protein Transacylasen (MAT) das Substrat und könnten möglicherweise mit ACP Domänen von PKS als Acylakzeptoren interagieren. Der Einbau solch einer MAT in das Erythromycin Gencluster würde in einer artifiziellen *cis/trans*-AT Hybrid PKS resultieren. Die eigenständige Modifikation des substratauswählenden und übertragenden Enzyms erleichtert den experimentellen Aufwand signifikant. Vorgegangene, in der Literatur aufgeführte, Versuche die Substratspezifität einer mesophilen MAT signifikant zu verändern, wurden durch die mangelnde Stabilität des Wildtypenzymes unterbunden. Viele dieser Mutationen führten zu missgefalteten oder andersartig inaktiven Enzymvarianten. Ein Enzym eines moderat thermophilen Mikroorganismus weist typischerweise eine höhere Toleranz gegen Aminosäureaustausche auf. Dieses Phänomen war die Motivation für nachfolgende Arbeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste MAT aus einem moderat thermophilen Mikroorganismus identifiziert und charakterisiert, ein Enzym aus *Thermobifida fusca*. Das Projekt startete mit der Identifikation der Proteinsequenz durch eine BLAST Analyse. Eine synthetische Gensequenz wurde in einen Expressionsvektor kloniert und das Enzym in *E. coli* exprimiert und nachfolgend aufgereinigt. Die Enzymaktivität wurde basierend auf dem Transfer von <sup>14</sup>C-markiertem Malonyl-CoA durch die MAT auf das ACP6 von DEBS bestimmt. Hierdurch konnten sowohl die Aktivität, sowie auch die erhoffte Substratpromiskuität aufgezeigt werden. Die weitergehende Charakterisierung der MAT mittels CD-Spektroskopie offenbarte einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil des Enzyms. Die Schmelztemperatur der MAT wurde auf 60 °C bestimmt, was mit der optimalen Wachstumstemperatur dieses Organismus im Einklang steht. Die Kristallstruktur konnte durch eine von mir betreute Masterstudentin gelöst werden. Strukturelle Besonderheiten erklären und bestätigen hierbei die erhöhte Thermostabilität. Nachfolgend wurde eine Plattform für die gerichtete Evolution dieses im Vergleich zu PKS winzigen Enzyms geschaffen, die sowohl semi-rationale, als auch randomisierte Versuchsansätze beinhaltet. Mit der zielgerichteten Mutagenese einzelner Aminosäuren die basierend auf der gelösten Kristallstruktur identifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 125), sowie den randomisierenden Techniken *error-prone* PCR und *DNA Shuffling* wurden verschiedene Methoden für die Mutagenese der MAT aus *T. fusca* etabliert, die in der Zukunft den Einbau eines nicht-natürlichen Bausteins in das Polyketid Erythromycin ermöglichen könnten.



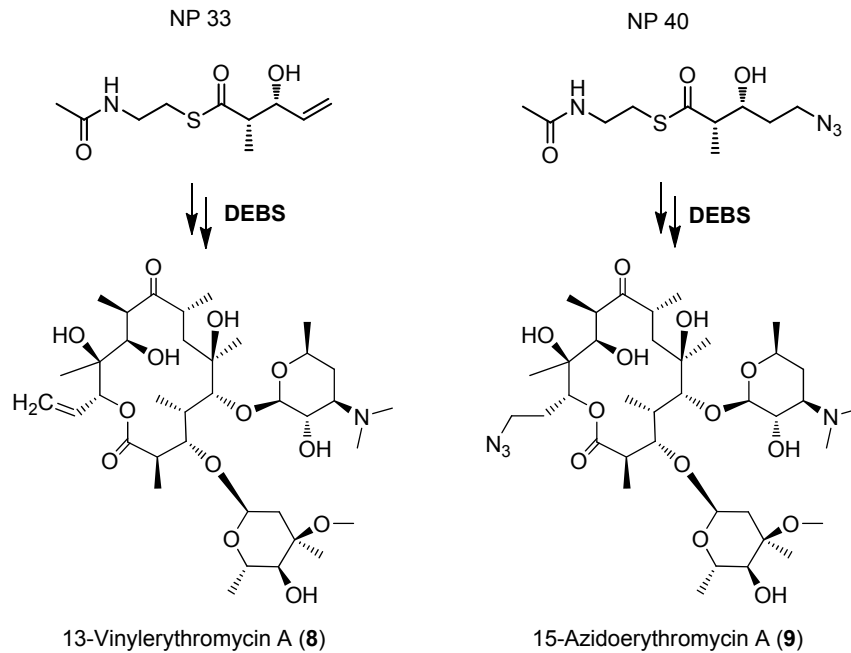
**Abbildung 125: Kristallstruktur der MAT aus *T. fusca*.** Die katalytischen Reste Ser95 und His195 sind als schwarze Stabmodelle dargestellt. Die Ziele der semi-rationalen Mutagenese sind ebenfalls als Stabmodelle sichtbar gemacht.

Die momentan erzeugten Enzybibibliotheken sollen weitergehend auf die Akzeptanz eines nicht-natürlichen Substrates mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) untersucht werden. Hierzu sollen die MAT Varianten mit holo ACP in Anwesenheit eines nicht-natürlichen Bausteines coexprimiert werden. Durch eine nachfolgende auf „Click“-Chemie basierende intrazelluläre Reaktion zwischen eingebautem nicht-natürlichen Substrat und einem Reportersubstrat werden positive Zellen markiert und können durch eine FACS-Messung identifiziert und separiert werden. Diese Experimente sind der Start für eine gerichtete Evolution der MAT in Richtung Akzeptanz und des Einbaus einer nicht-natürlichen Verlängerungseinheit in die PKS.

Ferner wurde die Vorläufer-geleitete Biosynthese zur Erzeugung von Erythromycin-Derivaten etabliert. Hierbei konnten in ersten Versuchen durch den Einbau synthetisch erzeugter Diketide neue orthogonale Reaktivitäten im westlichen Bereich des Moleküls geschaffen werden. Die von Niclas Pryk synthetisierten Diketide scheinen hierbei kompetitiv zum nativen Baustein zu sein. Erstmals wurde diese Technik im Originalproduzenten mit kompletter post-PKS Prozessierung aufgezeigt, so dass modifiziertes Erythromycin A anstatt des bereits literaturbekannten einfachen Erythronolid-Derivates biosynthetisch zugänglich wurde. Die geschaffene

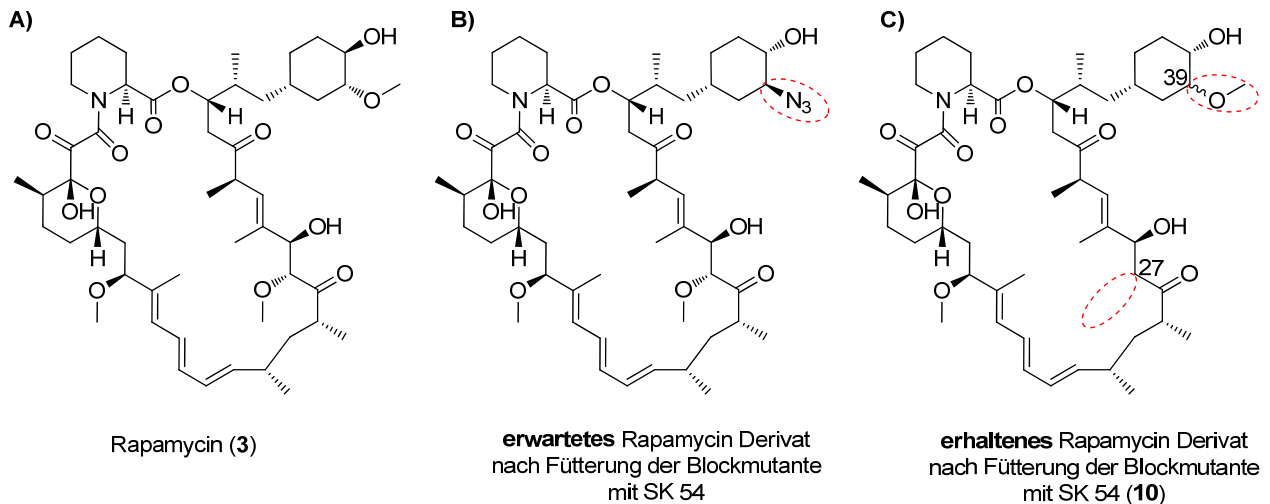


orthogonale Reaktivitäten können nachfolgend eine spezifische Modifikation unter Anwendung nicht-natürlicher chemischer Umsetzungen ermöglichen.



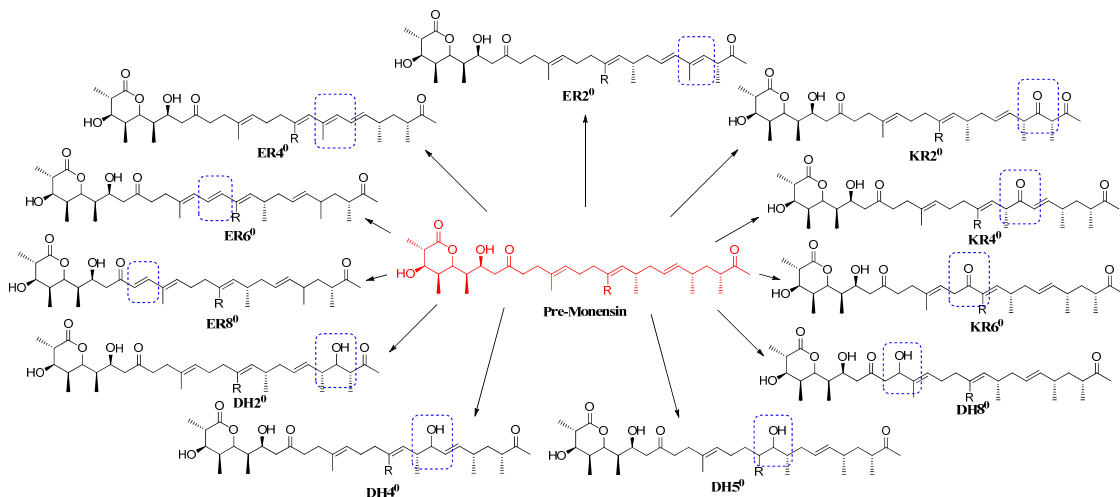
**Abbildung 126: Vorläufer-geleitete Biosynthese.** Durch die Fütterung mit synthetischen Diketiden erzeugte Erythromycin A Derivate.

Durch die klassische Mutagenese sollte das Immunsuppressivum Rapamycin an der Start- und Endeinheit des Moleküls modifiziert werden. Das Hauptaugenmerk wurde hier auf den Einbau von Bausteinen mit orthogonalen Reaktivitäten gelegt, die nachfolgend eine vereinfachte partialsynthetische Modifikation ermöglichen könnten. Lediglich einer der getesteten, durch Stephan Klopries synthetisierten, Bausteine wurde durch eine Blockmutante der Starteinheit eingebaut. Der Baustein wies in Position 2 des synthetischen Cyclohexancarbonsäure-Derivates eine Azidfunktion und an Position 3 eine Hydroxygruppe auf. Anders als erwartet resultierte der Einbau jedoch nicht in einem Rapamycin-Derivat mit neuer orthofunktionaler Reaktivität (vgl. Abbildung 127). Vielmehr scheint die Azidfunktion oxidativ abgebaut worden zu sein.



**Abbildung 127: Mutasyntese von Rapamycin.** **A** Struktur des Polyketids Rapamycin. **B** Struktur des erwarteten Rapamycin Derivates nach Fütterung von SK 54 an eine rapK Blockmutante. **C** Struktur des erhaltenen Derivates nach Fütterung von SK 54 an die Blockmutante, zu beachten ist die wahrscheinliche Racematisierung des Stereozentrums am C39.

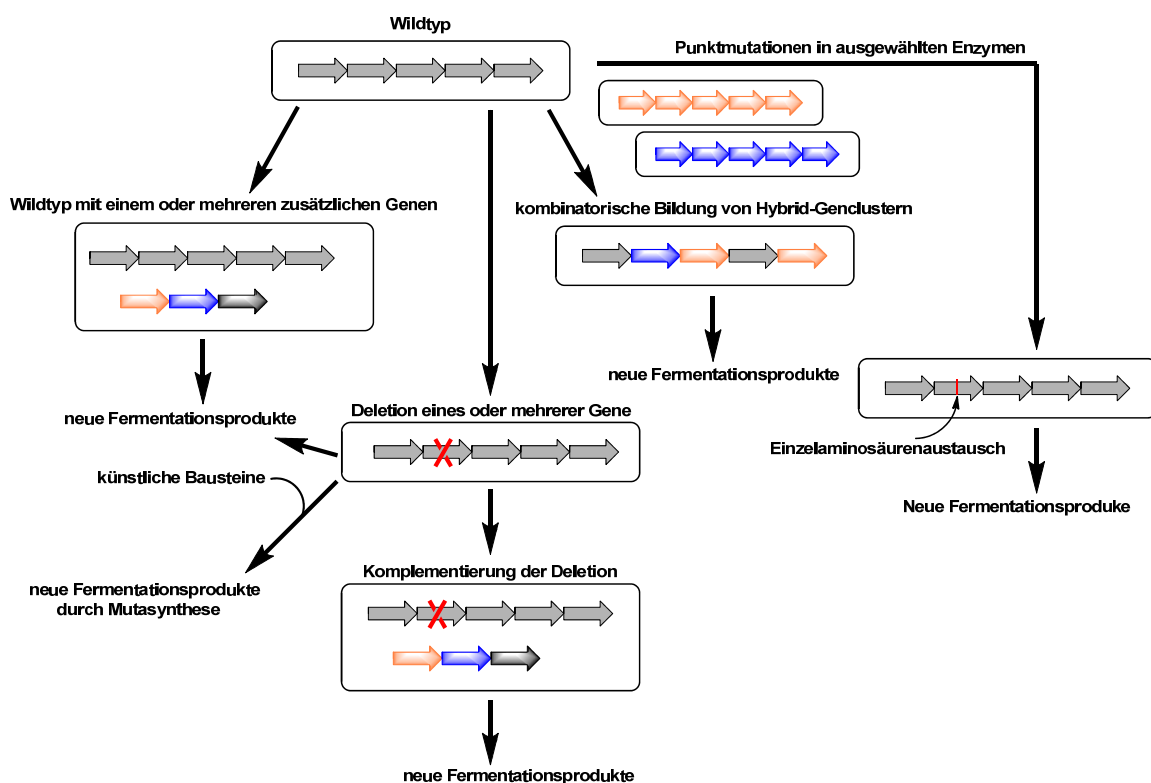
Zusätzlich wurden Beiträge zur gerichteten Redox-Derivatisierung des Polyketids Pre-Monensin geleistet. Den Schwerpunkt meines Beitrages bildete hier die Etablierung der Analytik, die eine robuste Identifizierung des Naturstoffes Pre-Monensin und der neuen Derivate erlaubt. Die größte Problematik bestand hierbei in der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Final konnte eine robuste Plattform generiert werden, die die Identifizierung von derzeit 24 neuen Redox-Derivaten ermöglichte.



**Abbildung 128: Strukturen der durch die Anwendung der zielgerichteten Mutagenese der reduktiven Domänen erzeugte Redoxvarianten des Pre-Monensin.**

Erstmalig konnte mit dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass durch gezielt platzierte Einzelaminosäureaustausche reduktive Domänen in der Polyketid-Prozessierung systematisch übersprungen werden können.

Zusammenfassend beschäftigte sich diese Arbeit mit der Biosynthese von reduzierten Polyketiden und der genetischen Manipulation der daran beteiligten komplexen Enzyme. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf die Substratspezifität von Acyltransferasen gelegt. Die Möglichkeit nicht-natürliche Bausteine in die Polyketid Biosynthese einzubringen könnte signifikant zur Diversitätssteigerung beitragen. Kritische wegweisende Schritte in diese Richtung wurden im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt. Die Modifikation von Polyketiden ist nach wie vor eine Herausforderung und nicht alle Ansatzpunkte waren von Erfolg gekrönt. Jedoch ist es gelungen, den Austausch weniger Aminosäuren in ausgewählten PKS Abschnitten als fundamental neue Strategie in der kombinatorischen Biosynthese zu nutzen, womit die Abbildung 11 an dieser Stelle wieder aufgegriffen und als Schlussfolgerung der gesamten vorliegenden Dissertation erweitert werden kann. Es bleibt spannend, wohin dieser Weg in Zukunft führen wird.



**Abbildung 129: Mögliche Strategien der kombinatorischen Biosynthese.** Die zielgerichtete Mutagenese konnte als neue Strategie etabliert werden.



## 5 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden die Arbeitstechniken basierend auf Sambrook *et al.*<sup>[187]</sup> und Kieser *et al.*<sup>[188]</sup> durchgeführt.

### 5.1 Mikroorganismen

#### 5.1.1 Bakterienstämme

**Tabelle 14: Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Bakterienstämme.** n.a. = nicht verfügbar

Stamm	Genotyp/Phenotyp	Herkunft
OmniMAX™ 2 T1 Phage-Resistant	F' { <i>proAB+ lacIq lacZ</i> ΔM15 <i>Tn10</i> (TetR) Δ( <i>ccdAB</i> )} <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80( <i>lacZ</i> )ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)	B F <sup>-</sup> <i>omp T hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , D ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), F80 <i>lacZD</i> M15, D <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , D( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (STr <sup>R</sup> ) <i>endA</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)[pKSSU467]		Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	F <sup>-</sup> , <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6 hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>zjj-202::Tn10</i> , <i>recF143</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyI15</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>his64</i> , <i>tsx78</i> , <i>mtl</i> , <i>glnV44</i>	AK Leadlay
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL-B-24071	n.a.	ARS Culture Col.
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL-B-24072	n.a.	ARS Culture Col.
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> NRRL5491	n.a.	ARS Culture Col.
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> DSM40822	n.a.	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM-10	DSMZ
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> ΔAT6hyg <sup>R</sup>	NRRL-B-24071 mit Austausch der AT6-Domäne innerhalb von <i>eryAIII</i> gegen ΩhyrR	Diese Arbeit
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495	Δ <i>monCI</i> , <i>monBII</i> , <i>monBI</i>	AK Leadlay
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 ER2 <sup>0</sup>	ER2 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 KR2 <sup>0</sup>	KR2 Nullmutante	Dr. S. Kushnir

Stamm	Genotyp/Phenotyp	Herkunft
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 ER4 <sup>0</sup>	ER4 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 KR4 <sup>0</sup>	KR4 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 ER6 <sup>0</sup>	ER6 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 KR6 <sup>0</sup>	KR6 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 ER8 <sup>0</sup>	ER8 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 DH8 <sup>0</sup>	DH8 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 DH2 <sup>0</sup>	DH2 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 DH4 <sup>0</sup>	DH4 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> A495 DH5 <sup>0</sup>	DH5 Nullmutante	Dr. S. Kushnir
XI10(Gold)	Tetr Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> AT6 <sup>0</sup>	NRRL-B-24071 mit Einzelaminosäureaustausch innerhalb der AT6-Domäne; Ser197Ala	diese Arbeit
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> AT6 <sup>0</sup> Glu154Trp	NRRL-B-24071 mit Einzelaminosäureaustausch innerhalb der AT6-Domäne; Glu154Trp	diese Arbeit

### 5.1.2 Plasmide & Vektoren

Tabelle 15: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide & Vektoren.

Vektor/ Plasmid	kb		Resistenz	Herkunft
pETDuet1	5,42	Dualer Expressionsvektor	Ampicillin	Novagene
pETM11	6,2	Expressionsvektor	Kanamycin	EMBL
pIB23	36,8	Kompletter DEBS Cluster	Apramycin	AK Leadlay
pKC1139	6,5	Temperature-sensitives Streptomyceten <i>origin of replication</i> von pSG5 <sup>[189]</sup>	Apramycin	AK Leadlay
pKShyg	5,3	Hyg Resistenzkassette in pKSBluescript+	Hygromycin	AK Leadlay
pKSSU129	17,2	pKC1139_DEBS3ΔAT6hyg <sup>R</sup>	Apramycin, Hygromycin	diese Arbeit
pKSSU171-189	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Pro94*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU190-208	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Gly95*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU209-227	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Glu154*	Apramycin	diese Arbeit

Vektor/ Plasmid	kb		Resistenz	Herkunft
pKSSU228-246	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Pro157*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU247-265	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Ser174*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU266-284	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val193*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU285-303	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Ile194*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU304-322	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Asn262*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU323-341	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Ser263*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU342-360	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Arg336*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU361-379	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Asp337*	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU38	5,4	Basierend auf pKT801; lacZ	Apramycin	Dr. S. Kushnir
pKSSU380-398	16,9	pKSSU89 mit AS Mutation: Gln198	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU39	6,56	Basierend auf pKT02; lacZ	Ampicillin	Dr. S. Kushnir
pKSSU40	6,1	Basierend auf pSET152; lacZ	Apramycin	Dr. S. Kushnir
pKSSU400	6,4	pRT801_Perme_dsRed	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU401	6,4	pRT801_Perme_eCFP	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU402	7,6	pKT02_Perme_Citrine	Ampicillin, Thiostrepton	diese Arbeit
pKSSU403	8,4	pSET152_Perme_eGFP	Hygromycin	diese Arbeit
pKSSU404	7,8	pSET152_Perme_Citrine	Hygromycin	diese Arbeit
pKSSU405	8,2	pKT02_Perme_EGFP	Ampicillin, Thiostrepton	diese Arbeit
pKSSU406	16,4	pKSSU96_Nid AT5	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU41	7,3	Basierend auf pSET152; lacZ	Hygromycin	Dr. S. Kushnir
pKSSU435	6,3	pETM11_MAT( <i>T. fusca</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )_Pcil	Kanamycin	diese Arbeit
pKSSU438	16,8	Austausch der AT6 gegen Nid AT5 innerhalb von pKSSU89	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU439	16,8	Austausch der AT6 gegen Nid AT5 innerhalb von pKSSU89 Variante II	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU444	16,8	Austausch der AT6 gegen Nid AT5 innerhalb von pKSSU89 Variante III	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU446	5,4	pETDuet	Ampicillin	Novagene
pKSSU451	5,61	pETDuet_ACP6 (codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Ampicillin	diese Arbeit
pKSSU453	6,3	pETM11_MAT( <i>T. fusca</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Kanamycin	diese Arbeit
pKSSU455	6,6	pET30_MAT( <i>T. fusca</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Kanamycin	diese Arbeit
pKSSU456	6,6	pET30_MAT( <i>S. coelicolor</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Kanamycin	diese Arbeit

Vektor/ Plasmid	kb		Resistenz	Herkunft
pKSSU467	6,3	pETDuet_ACP6_Sfp (codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Ampicillin	diese Arbeit
pKSSU468	6,3	pETDuet_ACP6_Sfp (ohne Tag, codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Ampicillin	diese Arbeit
pKSSU471	5,6	pETDuet_ACP2	Ampicillin	diese Arbeit
pKSSU472	5,6	pETDuet_ACP2_Sfp	Ampicillin	diese Arbeit
pKSSU473	8,3	pSET152_MAT( <i>S. coelicolor</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU474	8,3	pSET152_MAT( <i>T. fusca</i> , codonoptimiert für <i>E. coli</i> )	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU475	6,6	pETM11_MAT( <i>S. coelicolor</i> )	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU476	11,62	pKC1139_DEBS3_Glu154Trp	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU519	10,83	pKC1139~1,8kb flankierend KS1Swal	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU541-560	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Ser299	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU561-580	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Tyr297	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU590	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Glu	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU591	17,7	pKC1139_Ser197Ala+~1,8kb	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU595	11,41	pKC1139_ΔKS1hgy <sup>R</sup>	Apramycin, Hygromycin	diese Arbeit
pKSSU61	7,2	pSET_PactIII	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU62	15,8	pMU3_lacZ_DEB3	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU623	8,3	pST152_MAT( <i>S.coelicolor</i> )	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU631	16,9	pKC1139_KS1Cys729Ala	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU655	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Gly	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU656	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Ala	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU657	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Leu	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU658	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Met	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU659	16,9	pKSSU89 mit AS Austausch: Val295Glu	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU89	16,9	Basierend auf pKSSU40, DEBS3 codierend unter Kontrolle von PactIII	Apramycin	diese Arbeit
pKSSU96	16,8	Austausch der AT6 Kasette innerhalb von pKSSU89 gegen Ωhyg	Apramycin	diese Arbeit



## 5.2 Medien und Antibiotika

Alle Medien wurden nach ihrer Zubereitung für 20 min bei 121 °C autoklaviert, um Kontaminationen mit unerwünschten Keimen zu vermeiden.

Für die Bereitstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligem Medium 20 g Agar pro Liter Kulturmedium vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Das jeweilige Antibiotikum wurde unter sterilen Bedingungen erst im Nachhinein kurz vor dem Gießen der Agarplatten oder vor der Verwendung der Nährmedien hinzugegeben. Für alle Medien wurde doppelt deionisiertes Wasser benutzt. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

### 5.2.1 Medien

#### 5.2.1.1 Nährmedien zur Kultivierung von Actinomyceten

<b>TSB</b>	Tryptic Soybroth (Sigma Aldrich)	30,00 g/l	
<b>ABB13<sup>[190]</sup></b>	Pepton aus Soja	5,00 g/l	pH = 7,2
	CaCO <sub>3</sub>	3,00 g/l	
	MOPS	2,10 g/l	
	Lösliche Stärke	5,00 g/l	
<b>SY<sup>[188]</sup></b>	Lösliche Stärke	10,00 g/l	
	Hefeextrakt	2,00 g/l	
<b>SM3<sup>[191]</sup></b>	Glucose	5,00 g/l	pH = 7,0
	Glucidex	50,00 g/l	
	Sojamehl	25,00 g/l	
	Rübenkraut	3,00 g/l	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g/l	
	CaCO <sub>3</sub>	2,50 g/l	
<b>ISP3<sup>[192]</sup></b>	Haferflocken gemahlen	20,00 g/l	20 min kochen, filtrieren
	Spurenelementlösung	1 ml/l	

<b>Rap V7 Seed</b> <sup>[193]</sup>	Sojamehl	30,00 g/l	pH = 7 ,5
	Dextrin	35,00 g/l	Vor der Verwendung werden
	Corn steep solids	4,00 g/l	0,16 ml Glucose (40%) pro 7ml
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00 g/l	Kulturvolumen zugesetzt
	Milchsäure (80 %)	1,6 ml/l	
	CaCO <sub>3</sub>	7,00 g/l	
	Glucose	10,00 g/l	
	Glucose (40 %ig)		
<b>MD6</b> modifiziert nach <sup>[193]</sup>	Toasted Nutrisoy	5,00 g/l	pH = 6,0
	Stärke aus Mais	35,00 g/l	Vor der Verwendung werden
	Hefe	3,00 g/l	0,35 ml sterile Fructose und
	Dextrin	19,00 g/l	0,10 ml L -Lysin (sterilfiltriert) pro
	Corn steep solids	1,00 g/l	7ml Kulturvolumen zugesetzt.
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,50 g/l	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,50 g/l	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,00 g/l	
	NaCl	5,00 g/l	
	MES	21,20 g/l	
	CaCO <sub>3</sub>	10,00 g/l	
	α-Amylase	0,40 ml/l	
	Spurenelementlösung	1,00 ml/l	
	L-Lysin (40 %ig)		
Fructose (40 %ig)			
<b>GYM</b> <sup>[188]</sup>	Glucose	4,00 g/l	
	Hefeextrakt	4,00 g/l	
	Malzextrakt	10,00 g/l	
	CaCO <sub>3</sub>	10,00 g/l	

### 5.2.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

<b>LB</b>	Hefeextrakt	5,00 g/l	pH = 7
	Natriumchlorid	1,00 g/l	
	Trypton	10,00 g/l	

<b>TB</b>	Hefeextrakt	24,00 g/l	pH = 7
	Trypton	12,00 g/l	
	Glycin	4 ml/l	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,13 g/l	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g/l	
<b>SOB</b>	Hefeextrakt	5,00 g/l	
	Trypton	20,00 g/l	
	NaCl	0,6 g/l	
	KCl	0,2 g/l	
	MgCl <sub>2</sub> (10 mM)	10 ml/l	
	MgSO <sub>4</sub> (10 mM)	10 ml/l	
<b>SOC</b>	SOB-Medium		
	Glucose	20 mM	

### 5.2.1.3 Nährmedien zur Kultivierung von *Bacillus subtilis*

<b>Nutrient Media</b>	Pepton	5,00 g/l	pH = 7
	Fleischextrakt	3,00 g/l	
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg/l	Zugabe zur Sporenbildung
<b>Physiologische Lsg.</b>	NaCl	9,00 g/l	pH = 7
	MgSO <sub>4</sub>	4,00 g/l	

### 5.2.1.4 Spurenelementlösung

<b>Spurenelementlsg.</b>	ZnCl <sub>2</sub>	40 mg/l	Lagerung bei 4 °C
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200 mg/l	
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	9 mg/l	
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9 mg/l	
	NaB <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	9 mg/l	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	9 mg/l	

## 5.2.2 Antibiotika

Um selektiv Bakterien kultivieren zu können, wurde mit Antibiotika als Selektionsmarker gearbeitet. Die genetische Information für den entsprechenden Resistenzmechanismus lag auf Vektoren, Plasmiden oder in dem Bakteriengenom selbst vor.

**Tabelle 16: in der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [µg/ml]	Herkunft
Apramycin	100	ddH <sub>2</sub> O	25-50	Sigma-Aldrich
Carbenicillin	50	ddH <sub>2</sub> O	50	Carl-Roth
Chloramphenicol	35	Ethanol	35	Carl-Roth
Doxocyclin	10	ddH <sub>2</sub> O	10	Carl-Roth
Kanamycin	50	ddH <sub>2</sub> O	50	Carl-Roth
Nalidixinsäure	100	ddH <sub>2</sub> O	100	Carl-Roth
Hygromycin	100	ddH <sub>2</sub> O	100	Carl-Roth
Phosphomycin	100	ddH <sub>2</sub> O	80	Sigma-Aldrich
Thiostrepton	50	DMSO	50	Sigma-Aldrich

### 5.3 Puffersysteme, Lösungen, Enzyme und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle eingesetzten Puffer und Lösungen vor der Verwendung bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert und der Lösung oder dem Puffer nach dem Erkalten zugesetzt. Für alle Puffer und Lösungen wurde doppelt deionisiertes Wasser benutzt. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozent (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozent (v/v).

#### 5.3.1 Verwendete Lösungen

**Tabelle 17: Lösungen für die Blau/Weiß Selektion**

Additiv	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [µg/ml]	Herkunft
IPTG	40	ddH <sub>2</sub> O	40	Applichem
X-Gal	40	DMSO	40	Applichem

**Tabelle 18: Lösungen für die Plasmid Isolation**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
MP 1	Tris pH=8	25 mM	bei 4 °C lagern
	EDTA	10 mM	
	Glucose	50 mM	
	RNAse	200 µg/ml	
MP 2	NaOH	0,2 M	
	SDS	1 %	
MP 3	NaOAc	3 M	pH = 4,8-5,2
MP 4	Lithiumchlorid	5 M	

**Tabelle 19: Lösungen für die Konjugation**

Lösung	Mengenangabe (Stammlösung)	Pro Liter Medium	Anmerkung
Thiamin	1 %	1 ml	Lagerung bei 4 °C
FeSO <sub>4</sub>	1,2 %	1 ml	Zugabe einiger Tropfen HCl
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	10 ml	

**Tabelle 20: DNaseI Puffer**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
DNaseI-Puffer	Tris pH = 7,4	0,167 M	15°C
	MnCl <sub>2</sub>	0,0833 M	

**Tabelle 21: Lösungen für die Protoplastenpräparation**

Lösung	Bestandteile	Pro Liter	Anmerkung
Saccharoselsg.	Saccharose	103 g	
Puffer P	Saccharose	103 g	
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g	
	MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	2,02 g	
	Spurenelementlösung	2 mL	
Lysozymlsg.	Lysozym	Spatelspitze	Gelöst in P

**Tabelle 22: Lösungen für die Isolation genomischer DNA**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
L1	Tris-HCl, pH = 8	50 mM	Lösung bei 4 °C lagern
	EDTA	10 mM	
	RNase A	200 µg/ml	
	Lysozym	Spatelspitze	
L2	SDS	10 %	
L3	Kaliumacetat	3 M	

**Tabelle 23: Lösungen für die Preperation ultra-kompetenter Zellen**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
TB-Puffer	PIPES	10 mM	pH= 6,7
	CaCl <sub>2</sub>	15 mM	
	KCl	250 mM	
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM	

**Tabelle 24: Lösungen für die Vorbereitung zur Mikroskopie**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
10x PBS	NaCl	1,37 M	
	KCl	27 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 M	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	

**Tabelle 25: Lösungen für die Gelelektrophorese**

Lösung	Bestandteile	Mengenangabe	Anmerkung
50xTAE	Tris	2 M	pH-Wert= 6,7
	EDTA	50 mM	
	Essigsäure	2 M	
0,7 % Agarose	Agarose	3,5 g	In der Mikrowelle aufkochen
	1xTAE Puffer	Ad 500 ml	
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	10 µg/ml	
6x DNA Ladepuffer	Saccharose	30%	Sterilfiltrieren
	Glycerin	20%	
	Orange G	0,2%	

**Tabelle 26: Lösungen für die Southern Hybridisierung**

Lösung	Bestandteile	Mengenangabe	Anmerkung
Depurinierungspuffer	Salzsäure	0,25 M	
Denaturierungspuffer	Natriumhydroxid	0,5 M	
Prähybridisierungspuffer	RHB	20 ml	
	SS-DNA	20µl [10mg/ml]	
Hybridisierungspuffer	RHB	10 ml	
	DIG-markierte Sonde	50 µl	
Waschpuffer 1	SSC	2x	>50 ml/100 cm <sup>2</sup>
	SDS	0,1x	
Waschpuffer 2	SSC	0,1x	>50 ml/100 cm <sup>2</sup>
	SDS	0,1x	
Puffer 3	Maleinsäure	0,1 M	pH-Wert= 7,5
	Natriumchlorid	0,15 M	
	Tween	0,3 %	
Blockpuffer	Milchpulver	5 %	Gründlich lösen!
	Puffer 3		
CSP-Detektionspuffer	Tris pH=9,5	0,1 M	CSPD in 1 ml Puffer mischen
	Natriumchlorid	0,1 M	
	CSPD	10 µl	
20x SSC	Tris pH=7,0	0,3 M	
	Natriumchlorid	3 M	

**Tabelle 27: Lösungen für Proteinaufreinigung**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
Lyse-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	pH = 7,5
	NaCl	150 mM	
	Lysozym	1 mg/ml	
Waschpuffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	pH = 7,5
	NaCl	150 mM	
	Imidazol	20 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
Hochsalzpuffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	pH = 7,5
	NaCl	150 mM	
	Imidazol	20 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
E250-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	pH = 7,5
	NaCl	150 mM	
	Imidazol	250 mM	
	β-Mercaptoethanol	2 mM	
Größenausschluss- chromatographie	Tris-HCl	20 mM	pH = 7,5
	NaCl	100 mM	
	DTT	5 mM	

**Tabelle 28: Verwendete Puffer für die CD Spektroskopie**

Lösung	Bestandteile	Konzentration	Anmerkung
Puffer I (T <sub>m</sub> )	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	pH= 7,4
	NaCl	50 mM	
Puffer II	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mM	pH= 7,5
	NaCl	25 mM	



Tabelle 29: Lösungen für die SDS-Page

Lösung	Bestandteile	Mengenangabe	Anmerkung
SDS	SDS	15%	
Acrylamid / Bisacrylamid	Acrylamid / Bisacrylamid	30% / 0,8%	
APS	APS	1%	
Trenngele, 15%	Tris-HCl	1 M	pH= 8,2
	Acrylamid / Bisacrylamid	15 %	
	APS	1 µg/ml	
	SDS	0,15 %	
	TEMED	1 µg/ml	
Sammelgel; 4%	Tris-HCl	1 M	pH= 6,8
	Acrylamid / Bisacrylamid	3 %	
	APS	1 µg/ml	
	SDS	0,15 %	
	TEMED	1 µg/ml	
10x Laufpuffer	Tris-HCl	25 mM	pH= 8,2
	Glycin	192 mM	
4x Ladepuffer	Tris-HCl	200 mM	pH= 6,8
	SDS	8 %	
	Glycerol	40 %	
	β-Mercaptoethanol	4 %	
	EDTA	20 mM	
	Bromphenolblau	0,01 %	
2x Laemli Puffer	Tris-HCl	62,5 mM	
	Glycerol	25 %	
	SDS	2 %	
	Bromphenolblau	0,01 %	

### 5.3.2 Verwendete kommerzielle Enzyme

Tabelle 30: In der vorliegenden Arbeit verwendete, kommerzielle Enzyme

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
ET-SSB	500 µg/ml	NEB
Phire Hot-Start DNA Polymerase		Biozym
PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase	20 U/µl	Biotac

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
High fidelity polymerase ( <i>Expand long template</i> )		Roche
Pfu Polymerase	2,5 U / $\mu$ l	Fermentas
Klenow Fragment	10 U / $\mu$ l	Fermentas
Phusion Flash High-Fidelity Master Mix		Biozym
RecA	5 $\mu$ g/ $\mu$ l	Biozym
$\alpha$ -Amylase	~200 U /mg	Sigma-Aldrich
Restrictionsendonucleasen		NEB
Restrictionsendonucleasen <i>fast digest</i>		Fermentas
<i>RNaseA</i>	70 U /mg	Applichem
<i>DNaseI</i>	3000 U/mg	Applichem
Shrimp alkaline phosphatase	1 U/ $\mu$ l	Fermentas
Lysozym aus Hühnereiweiß	100000 U/mg	Sigma-Aldrich
Exonuclease I	20 U/ $\mu$ l	Fermentas
T4 DNA Ligase	5 U/ $\mu$ l	Fermentas
T4 DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	Fermentas

### 5.3.3 Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

- peqGold Gel Extraction Kit (Pepylab, Deutschland)

## 5.4 Größenstandards

### 5.4.1 DNA Längenstandards

Routinemäßig wurde die „1kb plus Ladder“ von Fermentas verwendet, welche einen Größenbereich von 75 bis 20.000 Basenpaaren abdeckt. Seltener findet die 1 kb Ladder von Fermentas (250 bis 10.000 Basenpaaren) Einsatz.

### 5.4.2 Protein Größenstandard

Routinemäßig wurde der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (~20-120 kDa der Firma Fermentas verwendet. Für den Radioaktiv-Assay wurde der „Protein Molecular Marker [methyl-<sup>14</sup>C]“ der Firma Perkin Elmer verwendet.

## 5.5 Oligonukleotide

Standardmäßig wurden die Oligonukleotide mit dem vom Hersteller angegebenen Volumina für die Einstellung einer 100 µM Stammlösung, in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und dann bei -20 °C gelagert. Zum Einsatz kamen in der PCR 10 µM, in der Sequenzierungsreaktion 30 µM Lösungen, die durch 1:10 bzw. 1:3,33 Verdünnungen mit ddH<sub>2</sub>O der Stammlösungen erreicht wurden.

Die Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNA-Club berechnet ( $T_m$ ). Im Falle von Oligonukleotiden mit Vektor-flankierenden Bereichen wie sie für das *in vivo cloning* bzw. für die Klonierung mittels SLIC-MIX erforderlich sind, wurde zwischen 2 Schmelztemperaturen unterschieden:  $T_m$  Spezifisch (Gen) und  $T_m$  Gesamt (kompletter Oligonucleotid). Des weiteren sind die unterschiedlichen Bereiche durch Groß- (Vektorflankierender Bereich) und Klein-Schreibweise (Genspezifischer Bereich) gekennzeichnet.

### 5.5.1 Standard-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden als entsalzenes Lyophilisat (HPLS) von der Firma MWG Operon bezogen.

**Tabelle 31: In der vorliegenden Arbeit eingesetzte Standard-Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Sequenz	$T_m$ Spezifisch [°C]	$T_m$ Gesamt [°C]
213_hygSca-100_fwd	ATCACGGGCGCGGATGTGGCCGTGG		69
214_hygSca+100_rev	TTCTCGACTGCGCTGGTCAGCGACTCC		65
184_DEBS3-seq19-rev	TTCTCGACTGCGCTGGTCAGCGACTCC		65
64_DEBS3-seq10-fw	CGGTCCCCGTCTTCGCCGAG		62
63_DEBS3-seq1-fw	ATGAGCGGTGACAACGGCATG		56
66_DEBS3-seq12-fw	GGACGGCGAGGCGTTCGTCTCG		62
67_DEBS3-seq13-fw	ATGGCCACCGGCGACCTCGAG		63
68_DEBS3-seq14-fw	CTCCGGTCCGCACGAGTTCAC		59
69_DEBS3-seq2-fw	GATGACCGTCGACACCGCCT		58
DEBS3-seq3-fw	CGCTGCACTTCGACGAGCCC		59
DEBS3-seq4-fw	CTCGCAGGGCGAGATCGCCC		61
DEBS3-seq5-fw	TGGAGCCCCGCCTTCGCCGA		65
DEBS3-seq6-fw	GCACGCACCCGCTGGAGCCC		65

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> Spezifisch [°C]	T <sub>m</sub> Gesamt [°C]
DEBS3-seq9-fwd	GAGGCGTCGGCGTTGCTGGC		62
180_DEBS3-seq15-rev	ATCCCGCCCAGCCGCGCG		64
181_DEBS3-seq16-fwd	ATGCGGGCGCAGGCGGGACGGCTGG		73
182_DEBS3-seq17-rev	TCGCAGGCGGCGATGGTCACG		63
183_DEBS3-seq18-fwd	ATCGACCGCGACCGCGCCTCCG		67
184_DEBS3-seq19-rev	ACAGCCGCGCCAGCGACACC		63
185_DEBS3-seq20-fwd	AACGGTGGGGCGGTCTGGTGG		64
186_DEBS3-seq21-rev	ATCGCCGCGACGTGCGAGTGCG		64
187_DEBS3-seq22-fwd	AAGCCGACGTGGCCCTTCGAGC		63
189_DEBS3_Seq23	GCTGCGGAGGAGCTGCTGACCG		65
190_DEBS3_Seq24	GTGGGAGAGCGCTTCGCTGGC		58
191_DEBS3_Seq25	CGTCGATCCGGTCGCTGGCCGC		66
192_DEBS3_Seq26	GACGTCCGTGTGCGTCTGGAC		61
193_DEBS3_Seq27	GAAGGCCCGCGGTACGGTGG		64
194_DEBS3_Seq28	CGGTGGAGGCGTCGGCGTTGCTGG		64
195_DEBS3_Seq30	CGCAGTGGACGACTCGGTTCCGTTG		59
196_DEBS3_Seq31	GGCGCGTCATGGCCTGGAG		61
197_DEBS3_Seq32	GTCGGTCTGCGCGGCGAAGG		59
198_DEBS3_Seq33	CGCGAGCACTTCGACGGCTCCG		61
199_DEBS3_Seq34	CTGCTCGATCGCGGGCACCCGC		64
206_DEBS3_AT6-for	TTACGGCAAGTCGCGCGGGTCGTCGGGCCCGGTGCTGCT GGGTTCCGGTG		82
207_DEBS3_AT6-rev	AAGCCGCCTTCAGGTCCACCGGCGTGGTGGCCAGCGGTC GCCAGTCG		83
232_hyg_Scal2_for	GCGGGTCTGTCGGGCCCGGTGCTGCTGGGTTCCGGTGAAGT actaaatccagatccttgaccgcagttgcaaaccctcactgatccg	71	84
233_hyg_Scal2_rev	CGCCTTCAGGTCCACCGGCGTGGTGGCCAGCGGTCGCCA GTactacaaattctccaactgatctgcgcgatcgatccttgccgagctg	71	84
293_Seq_DEBS3_AT6_fwd	TGGGTCGTTGCGTGACGG		55
294_Seq_DEBS3_AT6_rev	AGGCGACGAACGCCTCGC		56
317_fkbL_SphI-for	ATTAGCATGCTGaccggcggtccggcaccctcgc		72
318_fkbL_BglII-rev	ATTAGATCTtcggcgccgagccggacgagcagg		71
321_fkbK_SphI-for	ATTAGCATGCTGtcagcgacaccgaccccgcc		66
322_fkbK_BglII-rev	ATTAGATCTacgagccccaggcgaccgac		66
323_RapsK_SphI_for	ATTAGCATGCTGtccgcttgatgtcacgctggcacagaacc		65

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> Spezifisch [°C]	T <sub>m</sub> Gesamt [°C]
324_RapsK_rev	aggccgcgccgcaagtagcaccgc		75
471_PermE_Cherry_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATatgggtcctcccctggctagcttatcg	63	76
472_Cherry_PermE_fwd	TAGCCAGGGGAGGACCCATatgggtgagcaagggcgaggagg	60	77
473_Cherry_vektor_rev	TCACTATAGGGCAGATCTAATTTcacttgtagcagctcgccatgccg	59	67
474_PermE_Citrine_rev	TTGCTCACACCGCTGCTCATatgggtcctcccctggctagcttatcg	63	74
475_Citrine_PermE_fwd	TAGCCAGGGGAGGACCCATatgagcagcggtgtgagcaag	55	73
476_Citrine_vektor_rev	TCACTATAGGGCAGATCTAATTTctagaagcttgctgtacagctcgctc	55	65
477_PermE_eGFP_rev	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATatgggtcctcccctggctagcttatac	61	76
478_eGFP_PermE_fwd	TAGCCAGGGGAGGACCCATatgggtgagcaagggcgaggag	58	76
479_eGFP_vektor_rev	TCACTATAGGGCAGATCTAATTTtacttgtagcagctcgccatgcc	54	65
480_PermE_DSRedX_rev	ATGACGTCCTCGGTGTGTCCATatgggtcctcccctggctagcttatac	63	75
481_DSRedX_PermE_fwd	TAGCCAGGGGAGGACCCATatggacaacaccgaggacgtcatc	58	74
482_DSRedX_vektor_rev	TCACTATAGGGCAGATCTAATTTctactgggagccggagtgggcg	61	69
483_PermE_eCRP_rev	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATatgggtcctcccctggctagcttatac	63	77
484_eCRP_PermE_fwd	TAGCCAGGGGAGGACCCATatgggtgagcaagggcgaggagctg	62	77
485_eCRP_vektor_rev	TCACTATAGGGCAGATCTAATTTtatctagatccgggtgatcccgagg	60	68
511_LICPact-NID3_rev	GGACACGGTTCTCCTCTGCGTCATgggtgtcctccttaattaatcgatcg	57	72
512_LICNID3-Pact_fwd	CGCATCGATTAATTAAGGAGGACACCCatgacgcagaggagaaac	57	72
514_MP_NID3_DEBS3_rev	cgagccctggccgggaacacgaacacgacgcccgccggcgaggcggttc	74	87
516_MP_NID3_DEBS3_Version2_fwd	gtggagttgcccacatcctcctcctcgccggaggtgtccgaccag	73	79
531_Pact_Ccr_rev	AGGATGTCCTTCACGGTCATgggtgtcctccttaattaatcgatg	52	68
532_Ccr_Pact_fwd	CATCGATTAATTAAGGAGGACACCCatgaccgtgaaggacatcct	51	68
533_Ccr_LICpMU3_rev	agggcagatctaattttcagacgttgccgaagcggttg		66
537_MP_NID3_DEBS3_rev	TGCCCGGGGAACACGAACACGACgcccgccggcgaggcggttcgg	74	84

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> Spezifisch [°C]	T <sub>m</sub> Gesamt [°C]
500_fkbl_rev	TTGCTGGTACTCGCCCTCGGCcatcggtccgacgatcgctcgg	60	81
501_fkbl_fwd	CCGACGATCGTCGGCACGATGgcccaggggcgagtaccagcaa	60	81
502_fkbl_rev	GTCGTTGATCATCGGGTgtccgagaccgtggcgagtacctc	64	73
503_fkbl_fwd	GAGGTAAGTACGACGGTCTCGGCacacccgatgatcaacgac	50	73
507_rapK_fwd	GCACCGCGCCGTCTACAccggagtcggtcaggagacggtgcacc	69	80
508_rapK_rev	GGTGACCGTCTCTGACCGACTccggtgtagacggccggtgc	66	80
582_pETUpstream	ATGCGTCCGGCGTAGA		49
583_DuetDown1	GATTATGCGGCCGTGTACAA		50
584_DuetUp2	TTGTACACGGCCGATAATC		50
585_T7_Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		47
586_MAT2_pET_fwd	TTTATTTTCAGGGCGCCatgctgttactggttctcctg	55	67
587_MAT2_pET_rev	AGTGC GGCCGAAGCTTttattagcctgggtatgctc	49	69
588_MAT1_pET_fwd	TTTATTTTCAGGGCGCCatgcttgcattgttcccctgg	59	69
589_MAT1_pET_rev	AGTGC GGCCGAAGCTTttattaagcctggccttccaggtc	55	71
591_Sfp_Duet_rev	GGTTTCTTTACCAGACTCGAGttattacagcagttcctcatagc	47	63
611_Sfp_fwd	AGAAGGAGATATACATATGatgaaaatctatggcatctacatgg	48	58
612_ACP6_rev	CTTAAGCATTATGCGGCCGcttattacagctgttgaccgatgtgac c	55	67
615_ACP6_Duet_fwd	TCATCACCACAGCCAGGATCCatggctcctgcacgtgagatgacc tc	61	75
616_Sfp_fwd	AGAAGGAGATATACATATGaaaatctatggcatctacatgg	45	57
627_Pact_MAT2_rev	CAGGAGCAACCAGTACCAGCATgggtgtcctccttaattaatcgat gcg	57	70
628_MAT2_Pact_fwd	CGCATCGATTAATTAAGGAGGACACCCatgctgttactggttgc cctg	55	70
629_Mat2_pSET_rev	ACTATAGGGCAGATCTAATTTTCAttattagcctgggtatgctc	49	63
630_Pact_MAT1_rev	CCAGGGGCAACAATCGCAAGCATgggtgtcctccttaattaatcga tgcg	57	71
631_MAT1_Pact_fwd	CGCATCGATTAATTAAGGAGGACACCCatgcttgcattgttgc cctgg	59	71
632_MAT1_pSet_rev	ACTATAGGGCAGATCTAATTTTCATTATTAagcctggccttccag gtc	55	65
670_MAT1Pcil_fwd	TAATTTACatgttggcgattgttcccctggcaaggtgcg	68	
705_MAT1Pcil_fwd	TAATTTACatgttggcgattgttcccctggcaaggtgcgcaagtgccg	74	
706_MAT1_rev	ATATAAGCTTttattaagcctggccttccaggtcggtagacgttgcacc	70	

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> Spezifisch [°C]	T <sub>m</sub> Gesamt [°C]
711_MAT2b_pET_fwd	TTTATTTTCAGGGCGCCatgctggtgcttgttggcccctgg	61	71
712_MAT2b_pET_rev	AGTGCGGCCCAAGCTTtattaggcctgggtatgctctgcaaccag	61	73
713_MAT2b_Pci_pET_fwd	TAATTTCCACatgttggtgcttggccctgggtcaaggtgcgcaaacg	71	71
814_MAT_S.col-fwd	TAATTTACatgctcgtactcgtcgtcccgg	61	61
815_MAT_S.col-rev	ATATAAGCTTtattaggcctgggtgtgctcggcg	62	63
816_Pact_MATS.col_rev	CCGGGAGCGACGAGTACGAGCATgggtgtcctccttaattaatcg atgcg	57	73
817_MATS.col_Pact_fwd	CGCATCGATTAATTAAGGAGGACACCCatgctcgtactcgtcgtc cccgg	61	73
818_MatS.col_pSET_rev	ACTATAGGGCAGATCTAATTTTCattattaggcctgggtgtgctcg gcg	62	68
682_hyg_DEBS1_rev	TCCCCCTGAGCACGGCGAGCACCGGGTGGcgcggatcgatcct tgccgagctggg	67	85
683_hyg_DEBS1-fwd	ACCCGCAGCAGCGGCTCATGCTCGAcccgagttgcaaaccctc actgatccg	65	79
701_Ser2107Ala_fwd	tcggccgtcatcgccattcggccggcgagatcgccgccg	56	80
702_Ser2107Ala_rev	cggcggcgatctcgccggcgaatggccgatgacggccga	56	80
623_DEBS3-mut1_for	ATGACATGATTACGAATTgtgacgtccatgcctggggctctgggc cgg	77	76
624_DEBS3-mut2_rev	ACGGCCAGTGCCAAGCTcgtcgcgaagagcgtgctcgtctcccggg cgg	76	82

### 5.5.2 Oligonukleotide zur semi-rationalen Mutagenese der Ery AT6-Domäne

#### Sequenz-Funktions Beziehungen

Die Oligonukleotide wurden als entsalzenes Lyophilisat in 96 Lochplatten von der Firma Invitrogen bezogen. Die Auswahl der jeweiligen Codons für die semi-rationale Mutagenese in *S. erythraea* erfolgte nach <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. In der Oligonucleotidsequenz representieren **XXX** den Platz der Punktmutation, der zum gewünschten Aminosäureaustausch innerhalb der AT6-Domäne führt. **XXX** wurde in den entsprechenden Oligonukleotiden gegen die Codons für die jeweiligen Aminosäuren ausgetauscht (siehe Tabelle 32).

**Tabelle 32: In den Oligonukleotiden zur semi-rationalen Mutagenese verwendete Codon Usage.**

Aminosäure	Codon fwd	Codon rev
Ala	gcc	ggc
Arg	cgc	gcg
Asn	aac	gtt
Asp	gac	gtc
Cys	tgc	gca
Gln	cag	ctg
Glu	gag	ctc
Gly	ggc	gcc
His	cac	gtg
Ile	atc	gat
Leu	ttg	caa
Lys	aag	gtt
Met	atg	cat
Phe	ttc	gaa
Pro	ccg	cgg
Ser	tcg	cga
Thr	acc	ggt
Trp	tgg	cca
Tyr	tac	gta
Val	gtc	gac

**Tabelle 33: Sequenzen der in der semi-rationalen Mutagenese verwendeten Oligonukleotiden (Einzelaminosäurenaustausch)**

Position	Sequenz	T <sub>m</sub> spezifisch [°C]
Pro94_fwd	TCGCCGAGGGCGTTGCGGCTXXXGGTGCCACCACCGGAAC	55
Pro94_rev	TTCCGGTGGTGGCACCXXXAGCCGCAACGCCCTCGGCGACCGC	53
Gly95_fwd	AGGGCGTTGCGGCTCCCXXXGCCACCACCGGAACCGCCTC	63
Gly95_rev	AGGCGGTTCCGGTGGTGGCXXXGGGAGCCGCAACGCCCTCGGC	67
Glu154_fwd	TTCTCGGCCTCCXXXGTGCTGGAGCAGCGTCCGGAC	61
Glu154_rev	GTCCGGACGCTGCTCCAGCACXXXGGAGGCCGAGAACCCGGCC	63
Pro157_fwd	AAGTGCTGGAGCAGCGTXXXGACGCGCCGTCGCTGGAGC	61
Pro157_rev	GCTCCAGCGACGGCGGTCXXXACGCTGCTCCAGCACTTCGGAG	60
Ser174_fwd	AGCCGGTGTGTTCCXXXGTGATGGTGTGCTGGCGCGGC	64
Ser174_rev	AGCCGCGCCAGCGACACCATCACXXXGAACAACACCGGCTG	64
Val193_fwd	AGTCAGCCCCTCGGCCXXXATCGGCCATTCGCAGGGCGAG	61
Val193_rev	TCGCCCTGCGAATGGCCGATXXXGGCCGAGGGGCTGACTCCG	60
Ile194_fwd	AGCCCCTCGGCCGTCXXXGGCCATTCGCAGGGCGAG	57



Position	Sequenz	T <sub>m</sub> spezifisch [°C]
Ile194_rev	TCGCCCTGCGAATGGCC <b>XXX</b> GACGGCCGAGGGGCTGAC	56
Gln198_fwd	TCGGCCGTCATCGGCCATTCG <b>XXX</b> GGCGAGATCGCCGCCGCGG	65
Gln198_rev	ACCGCGGCGGCGATCTCGCC <b>XXX</b> CGAATGGCCGATGACGGCCG	65
Asn262_fwd	TCCGTGCGGGCGGT <b>XXX</b> TCCCCGTCTCGGTCTGTG	59
Asn262_rev	ACGACCGAGGACGGGG <b>XXX</b> GACGCCCGCGACGGAG	57
Ser263_fwd	TCGCGGCGGTCAAC <b>XXX</b> CCGTCTCGGTCTGTGCTC	59
Ser263_rev	AGACCACGACCGAGGACGG <b>XXX</b> GTTGACCGCCGCGACGGAGA	58
Tyr297_fwd	AAGACGCTCCCGGTGGAC <b>XXX</b> GCCTCGACTCCCGCCAC	60
Tyr297_rev	TGGCGGGAGTGCAGGGC <b>XXX</b> GTCACCGGGAGCGTC	58
Ser299_fwd	ACGCTCCCGGTGGACTACGCC <b>XXX</b> CACTCCCGCCACGTGAGGAG	62
Ser299_rev	ATCTCTCGACGTGGCGGGAGT <b>XXX</b> GGCGTAGTCCACCGGGAGCG	61
Arg336_fwd	ACGCTGCACGGCGAACGG <b>XXX</b> GACGGCGCCGACATGGGTCT	60
Arg336_rev	ACCCATGTGCGGCGCCGTC <b>XXX</b> CCGTTGCGCGTGCAGCG	58
Asp337_fwd	ACGGCGAACGGCGC <b>XXX</b> GGCGCCGACATGGGTCCG	60
Asp337_rev	ACCCATGTGCGGCGCC <b>XXX</b> GCGCGTTGCGCGTGCA	52

T<sub>m</sub> gesamt liegt bei allen Oligonukleotiden >72 °C.

**Tabelle 34: Oligonukleotide zur Mutation des YASH Motives (Austausch zweier Aminosäuren → HAFH)**

Position	Sequenz	T <sub>m</sub> spezifisch [°C]
630_Q297H_S299F_fwd	ACGCTCCCGGTGGAC <b>CACGCCTT</b> CACTCCCGCCACGTGCG AGGAG	55
631_Q297H_S299F_rev	CTCCTCGACGTGGCGGGAGT <b>GGAAGGCGT</b> GGTCCACCGGG AGCGT	53

## Mutation von Val295

**Tabelle 35: Mutagenes von Val295 innerhalb der AT6-Domäne**

Position	Sequenz	T <sub>m</sub> spezifisch [°C]
861_Val295Gly_fwd	CGCGCCAAGACGCTCCCG <b>GG</b> CGACTACGCCTCGCACTCC	66
862_Val295Gly_rev	GGAGTGCGAGGCGTAGTC <b>GCCC</b> GGGAGCGTCTTGGCGCG	64
863_Val295Ala_fwd	CGCGCCAAGACGCTCCCG <b>GCC</b> GACTACGCCTCGCACTCC	66
864_Val295Ala_rev	GGAGTGCGAGGCGTAGTC <b>GGCC</b> GGGAGCGTCTTGGCGCG	64
865_Val295Leu_fwd	CGCGCCAAGACGCTCCCG <b>TTG</b> GACTACGCCTCGCACTCC	66
866_Val295Leu_rev	GGAGTGCGAGGCGTAGT <b>CAAC</b> GGGAGCGTCTTGGCGCG	64
857_Val295Met_fwd	CGCGCCAAGACGCTCCCG <b>ATG</b> GACTACGCCTCGCACTCC	66
858_Val295Met_rev	GGAGTGCGAGGCGTAGT <b>CCAT</b> CGGGAGCGTCTTGGCGCG	64
859_Val295Glu_fwd	CGCGCCAAGACGCTCCCG <b>GAG</b> GACTACGCCTCGCACTCC	66
860_Val295Glu_rev	GGAGTGCGAGGCGTAGT <b>CCTC</b> CGGGAGCGTCTTGGCGCG	64

### 5.5.3 Oligonukleotide zur semi-rationalen Mutagenese der MAT

Die Oligonukleotide wurden als entsalzenes Lyophilisat von der Firma MWG Operon bezogen. NNK: degenerierte Codons wobei N laut IUPAC Abkommen für jede der vier möglichen Nukleobasen (A, C, T oder G) und K für die Nukleotide T oder G steht.

**Tabelle 36: Bibliotheksdesign der MAT Mutagenese**

Bibliothek	Reste	Anzahl AS	Kolonie
1	Gly8 - Val13	6	10 <sup>8</sup>
2	Gly8 - Val13-Q	5	10 <sup>7</sup>
3	Val190 - Phe194	5	10 <sup>7</sup>
4	Gly90 - Glu95	6	10 <sup>8</sup>
5	Thr56, Gln60, Val64	3	9,82*10 <sup>4</sup>
6	Met121, Ser125	2	3,1*10 <sup>3</sup>
7	Gln244 - Ser247	4	3,0*10 <sup>6</sup>
8	Arg186 - Ala189	4	3,0*10 <sup>6</sup>
9	Asn156, Asn158, Val164	3	9,82*10 <sup>4</sup>



## **5.6 Allgemeine Methoden der Mikrobiologie**

### **5.6.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli***

Die verwendeten Kulturen von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden zur längerfristigen Aufbewahrung nach Zugabe von 10 % Glycerol als Gefrierkulturen bei -80 °C gelagert.

Zur routinemäßigen Kultivierung, z.B. vor Plasmidisolation, wurden 2 ml Kulturmedium mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer Kolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte standardmäßig über Nacht bei 37 °C.

#### **5.6.1.1 Präparation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen**

Die Präparation der ultra kompetenten Zellen basiert auf dem Protokoll von Inoue *et.al.* <sup>[194]</sup> mit einigen Modifikationen.

*E. coli* Zellen wurden mit Hilfe einer Impföse auf LB Agarplatten, versetzt mit entsprechendem Antibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Nachmittag wurden 10 bis 12 große Kolonien von der Agarplatte abgestrichen und in 250 ml SOB Medium bei 19 °C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 im Schüttler bei 150 rpm inkubiert (dieses dauert i.d.R. 24-36 h). Nach Erreichen der OD werden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellsuspension für 10 min bei 4000 g (4 °C) pelletiert wurde. Das Pellet wurde gründlich in 80 ml eiskalter TB-Lösung resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min 4000 g 4 °C) wurde das Pellet in 10 ml eiskalter TB-Lösung die 0,7 ml DMSO (zuvor o/n -20°C) enthielt resuspendiert, im Anschluss in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (50 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Nach diesem Protokoll können Kompetenzen mit einer cfu/µg von > 10<sup>9</sup> (Omnimax) erreicht werden.

#### **5.6.1.2 Präparation elektro-kompetenter *E. coli* Zellen**

Die benötigten *E. coli* Zellen (± transformiertes Plasmid) wurden mit Hilfe einer Impföse auf LB Agarplatten, mit entsprechendem Antibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgendem Abend wurden 50 ml LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Mit 25 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml vorgewärmtes, mit Antibiotika versehendes, LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und

150 rpm in einem 2 L Kolben inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600}=0,4$  wurde die Kultur für 30 min in ein Eisbad gestellt und im Anschluss für 15 min bei 1000xg und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, bevor die Zellsuspension erneut pelletiert wurde. In folgenden Schritten wurde das Pellet in 250 ml 10 %igem Glycerol und in 10 ml 10 %igem Glycerol gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 1 ml eiskaltem GYT-Medium suspendiert, bevor die  $OD_{600}$  einer 1:100 Verdünnung der Zellsuspension bestimmt wurde. Im Anschluss wurde die Zellzahl auf eine Konzentration zwischen  $2$  und  $3 \cdot 10^{10}$  Zellen/ml durch Verdünnungen mit GYT-Medium eingestellt ( $OD_{600}=1$  entspricht  $\sim 2,5 \cdot 10^8$  Zellen/ml) bevor die Zellsuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 5.6.2 Kultivierung von *Bacillus subtilis* zur Sporenpräparation

Für die Sporenpräparation von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), welche für die Testung auf antimikrobielle Aktivität (Hemmzonen-Assay) benötigt werden, wurde dieser auf Nutrient-Agarplatten ausgestrichen und für 2 Tage bei 35 °C inkubiert. Die Agarplatten wurden jeweils mit 4 ml physiologischer Lösung (s. 5.2.1.3) benetzt und die Zellen mit Hilfe eines Einwegspatels von der Platte gewaschen. Die Suspension wurde im Anschluss durch eine mit steriler Watte befüllte Spritze in ein 15 ml Reaktionsgefäß filtriert und für 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde !schnell! abdekantiert und die Sporen im verbleibenden Tropfen (~0,4 ml) resuspendiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 5.6.3 Kultivierung und Lagerung von Actinomyceten

Die über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder „ARS Culture Collection“ (NRRL) bezogenen Lyophilisate der jeweiligen Actinomyceten wurden mit 0,5 ml TSB innerhalb von 30 min rehydriert. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspensionen wurden auf getrockneten (20 min unter dem laminaren Luftstrom) ABB13- (*S. erythraea*, *S. cinnamonensis*) bzw. SY- (*S. hygroscopicus*) Agarplatten ausgestrichen und bei 30 bzw. 28 °C bis zur Sporenbildung inkubiert. Die Sporen wurden mit TSB Medium von den Platten gewaschen, mit 20 % Glycerol versetzt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und zur längerfristigen Aufbewahrung als Gefrierkulturen bei -80 °C gelagert. Zusätzlich

wurden mit jeweils 200 µl rehydrierter Zellsuspension 5 ml-Flüssigkulturen angeimpft um ebenfalls Glycerolstocks (final 20 %) aus der gut angewachsenen Zellsuspension anfertigen zu können.

Für den regelmäßigen Gebrauch wurden die Actinomycetenstämme auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und bis zur Sporenbildung bei 30 °C bzw. 28 °C inkubiert. Mit den jeweiligen Sporen bzw. kleinen Agarstücken konnten so Flüssigkulturen angeimpft werden um frische Kulturen zu erhalten, wie sie für Konjugationen bzw. Vorkulturen benötigt wurden.

Die Kultivierung der Actinomyceten in Flüssigkultur erfolgte in Erlenmeyerkolben, denen zur besseren Belüftung und zur Zerteilung der Mycelien eine Stahlfeder am Boden angebracht war, und die mit einem Papierstopfen verschlossen wurden. Wurden nur kleine Volumina benötigt, z.B. für die Mikroskopie, so erfolgte die Kultivierung in 13 ml Röhrchen (2 ml Kulturvolumen) in denen sich kleine Glasperlen befanden.

#### **5.6.3.1 Sporenisolation von Actinomyceten**

Für die Isolation von Sporen wurde der jeweilige Actinomycetenstamm auf ISP3 Agarplatten bei 28 °C bis zur Sporenbildung herangezogen, in Abhängigkeit vom Stamm konnte dieses bis zu drei Wochen dauern. Die mit sporulierenden Actinomyceten bewachsene Agarplatte wurde dann mit 9 ml sterilem Wasser benetzt und die Sporen mit Hilfe einer sterilen Impföse suspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss durch eine mit steriler Watte befüllte Spritze in ein 15 ml Reaktionsgefäß filtriert und für 10 min bei 1000xg sedimentiert. Der Überstand wurde !schnell! abdekantiert und die Sporen im verbleibenden Tropfen (~0,4 ml) resuspendiert und aliquotiert (die Sporenmenge von einer Agarplatte reicht für vier Konjugationen), ggf. wurde der Sporensuspension Glycerol zugesetzt (20 % final), was die Lagerung als Gefierkulturen bei -80 °C ermöglicht. Vor ihrer weiteren Verwendung musste die gelagerte Sporensuspension einmal mit physiologischer Lösung (s. 5.2.1.3) gewaschen werden. Vor Verwendung der Sporenlösung für Konjugationen wurde für 10 min ein Hitzeschock bei 50 °C durchgeführt. Nach weiteren 5 min auf Eis konnten die Sporen dann in weitergehenden Experimenten eingesetzt werden.

#### 5.6.4 Fermentation von Actinomyceten zum Nachweis von Fermentationsprodukten

Generell ist bei der Fermentation von Actinomyceten ihr ausgeprägte Mycelienwachstum sowie die benötigte hohe Sauerstoffversorgung zu beachten. Um die Bildung großer Mycelienaggregate zu reduzieren wurde bei Fermentationen im Erlenmeyerkolben eine Stahlfeder an dem Boden des Kolbens angebracht, bei Fermentationen in 24-Lochplatten 3 Glasperlen in jedes Loch gegeben. Eine hohe Sauerstoffversorgung und somit gute Fermentationsbedingungen wurden in den Multilochplatten durch Kultivierung im System Duetz erreicht und generell bei hohen Drehzahlen (180 - 200 rpm) inkubiert.

##### 5.6.4.1 Fermentation von *S. erythraea*

Die Fermentation von *S. erythraea* wurde routinemäßig in Erlenmeyerkolben, in unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Für die Vorkultur wurde TSB Medium mit einem Glycerolstock angeimpft und für 48 h bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die in SM3 durchgeführte Hauptkultur wurde mit 1/10 Volumen Vorkultur angeimpft (ggf. mit 10 mM Testsubstanz NP33, 37 oder 40 komplementiert; NP steht für durch Niclas Pryk synthetisierte Diketide) und für einen Zeitraum von 3-6 Tagen bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Nach Ende der Kultivierung wurden die Kulturen bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Extraktion der Fermentationsbrühe wurde mit 2 Vol. Ethylacetat durchgeführt. Hierzu wurde die Kulturlösung aufgetaut, mit Ethylacetat versetzt und nach Zugabe von Glasperlen für 3 h bei 20 °C und 200 rpm geschüttelt. Die zwei Phasen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 g) getrennt und die organische Phase durch anlegen eines Vakuums bis zur Trockne eingengt und bei -20 °C gelagert. Zum Nachweis von Erythromycin wurde der Rückstand in Methanol resuspendiert und mittels ESI/MS Messung analysiert. Zum Nachweis von antimikrobieller Aktivität wurde die geklärte Fermentationsbrühe (10 min, 4000 g) direkt eingesetzt.

##### 5.6.4.2 Fermentation der *S. erythraea* AT6\* Varianten

Für die initialen Screens der *S. erythraea* AT6\* Mutanten wurden die Fermentationen im System Duetz in 24-Loch Platten durchgeführt (Leervolumen pro Loch: 5 ml). Die Vorkulturen wurden in 2 ml TSB mit entsprechendem Antibiotikum (Apramycin) bei 30 °C für 48 h bei 180 rpm inkubiert, hierzu wurde das Flüssigmedium mit einem ca.

0,5x0,5 cm großen Agarstückchen der auf ABB13 Agar ausgestrichenen Transkonjugante ausgeschnitten und in ein Loch überführt. Die Lochplatten wurden mit einem luftdurchlässigen Verschlussfilm für Zellkulturen verschlossen und in den Halterungen des System Duetz kultiviert. Die Hauptkultur wurde in 3 ml SM3 (ggf. mit 5 mM Diethylethylmalonat oder 10 mM SK 107) durchgeführt. Hierzu wurde das SM3 Medium mit 1/10 Vol. Vorkultur angeimpft und für 5 Tage bei 30 °C und 180 rpm kultiviert, der Rest der Vorkultur wurde mit Glycerol versetzt (20 % final) und bei -80 °C gelagert. Pro Mutante wurden jeweils vier einzelne Klone kultiviert. Als Referenz diente die Kultivierung des *S. erythraea* Wildtyps (NRRL-B-24071) sowie die des wiederhergestellten Wildtyps (Konjugation von pKSSU89 in *S. erythraea*  $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup>) die analog im System Duetz kultiviert wurden.

Nach Ende der Kultivierungsdauer wurden die Platten bei -20 °C o/n eingefroren, bevor die einzelnen Kulturen in 15 ml Röhrchen überführt und mit 7 ml Ethylacetat versetzt über Nacht im Schüttler bei 180 rpm und 18 °C extrahiert wurden. Nach einem folgenden Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, 4 000g) wurde die organische Phase in Reagenzgläser überführt und durch anlegen eines Vakuums bis zur Trockne eingengt. Die in 0,5 ml Methanol resuspendierten Rückstände wurden für 30 min bei 12000 g zentrifugiert, dann in Probenröhrchen überführt und für die Analytik mittels LC/ESI-MS und MS/MS eingesetzt werden.

#### **5.6.4.3 Fermentation von *S. cinnamomensis* sowie dessen Mutanten**

Die Fermentation von *S. cinnamomensis* BH $\Delta$ CIBIBII (A495) wurde standardmäßig in einem Kulturvolumen von 12,5 ml in einem 250 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Kleine Stücke (~0,5 x 0,5 cm) gut bewachsene ABB13 Agarplatten dienten zum animpfen der Vorkulturen. Die Vorkulturen wurden für 24-48 h bei 30 °C und 180 rpm in TSB kultiviert, bevor diese als Inoculum für die Hauptkultur verwendet wurden. 10 ml SM16 Medium wurden mit 2 % Vorkultur angeimpft und für 5 Tage bei 180 rpm und 30°C kultiviert. Zur Produktbindung wurden 0,5 g XAD-16 dem Medium zugegeben. Nach Ende der Kultivierungsdauer wurde sowohl das XAD-16 als auch die Kulturlösung jeweils mit 2 Volumen Ethylacetat extrahiert (im Schüttler o/n 180 rpm 18 °C) und die organische Phase durch anlegen eines Vakuums bis zur Trockne eingengt. Die in 0,5 ml Methanol resuspendierten Rückstände wurden für 30 min bei 12000 g zentrifugiert, Rückstände wurden in Probenröhrchen überführt und konnten dann für die Analytik mittels LC/ESI-MS eingesetzt werden.



#### 5.6.4.4 Fermentierung von *S. hygrosopicus* NRRL5491 sowie dessen Mutante $\Delta$ RapK

Die Fermentation von *S. hygrosopicus* NRRL 5491 wurde standardmäßig in 7 ml Kulturvolumen in 50 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt; eine Hochskalierung bis zur Fermentation im 2 L Kolben (Kulturvolumen = 280 ml) ist problemlos durchführbar.

Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden Sporen des Stammes von einer gut gewachsenen SY Agarplatte abgestrichen und in ein mit 2 ml TSB und 4 Glasperlen gefülltes 13 ml Kulturröhrchen überführt. Es erfolgte Kultivierung für 48 h bei 28 °C und 160 rpm bevor mit 0,5 ml dieser Kultur eine 7 ml Vorkultur in RapV Seed Medium angeimpft und für weitere 48 h inkubiert wurde. Mit dieser Vorkultur wurde dann das Produktionsmedium MD6 angeimpft (1/20 Vol.) und die Hauptkultur für 5 Tage bei 26 °C und 180 rpm inkubiert.

Wurden synthetische Bausteine während der Fermentation dem Medium zugesetzt, erfolgte dieses in der Regel 24 h nach dem Animpfen der Hauptkultur, einzige Ausnahme stellt die Fütterung der deuterisierten Malonsäuren dar, die bereits direkt zu Beginn mit in die Hauptkultur gegeben wurde.

Für die Analytik der jeweiligen Produkte wurden 10 ml Methanol sowie einige Glasperlen zu der jeweiligen Kultur gegeben und für 3 h bei 26 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min 4000 g wurde ein Teil des Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert bevor dieser in Probenröhrchen für die ESI/MS überführt wurde.

#### 5.6.4.5 Fermentierung von *S. hygrosopicus* DSM40822 sowie dessen Mutanten $\Delta$ Fkbl und $\Delta$ Fkbl

Die Fermentation von *S. hygrosopicus* DSM 40822 wurde standardmäßig in 7 ml in 50 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt; eine Hochskalierung bis zur Fermentation im 2 L Kolben (Kulturvolumen = 280 ml) ist problemlos durchführbar.

Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurden Sporen des jeweiligen Stammes von einer gut gewachsenen SY Agarplatte abgestrichen und in ein mit 2 ml TSB und 4 Glasperlen gefülltes 13 ml Kulturröhrchen überführt. Es erfolgte die Kultivierung für 48 h bei 28 °C und 160 rpm bevor mit 0,5 ml dieser Kultur eine 7 ml Vorkultur in SY Medium angeimpft und für weitere 48 h inkubiert wurde. Mit dieser Vorkultur wurde dann das

Produktionsmedium TSB+MES+Glc angeimpft (mit 1/20 Vol.) und die Hauptkultur für 4 Tage bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Wurden synthetische Bausteine während der Fermentation dem Medium zugesetzt, erfolgte dieses 24 h nach dem Animpfen der Hauptkultur. Für die Analytik der jeweiligen Produkte wurden 10 ml Methanol sowie einige Glasperlen zu der jeweiligen Kultur gegeben und für 3 h bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4000 g wurde ein Teil des Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 30 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert bevor dieser in Probenröhrchen für die ESI/MS pipettiert wurde.

## **5.7 Allgemeine Methoden zur Analytik polyketidischer Naturstoffe**

### **5.7.1 ESI/MS Analytik**

Fermentationsextrakte wurden mittels HPLC untersucht an welche ein Massenspektrometer gekoppelt war. Die Separationen der Fermentationsextrakte wurden an einem Accela HPLC-System (bestehend aus Pumpe, Autosampler, Säulenofen und PDA Detektor) durchgeführt, welches online an ein Orbitrap Massenspektrometer (ausgestattet mit einer LTQ XL linear ion trap; Thermo Electron Corporation Deutschland) gekoppelt war. Parallel erfolgte eine UV Detektion bei 210 nm und 254 nm. Alle eingesetzten Eluenten waren LC-MS rein (Chromasolv Deutschland). Bis zu 15 µl der jeweiligen Probe wurden mittels Autosampler (T= 10 °C) bei einer Flußrate von 500 µl/min auf eine CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule (3 µm, Macherey-Nagel Deutschland) oder bei einer Flußrate von 250µl/min auf eine EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule (3 µm, Macherey-Nagel Deutschland) aufgetragen.

Erythromycin und dessen Derivate: CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule; Verwendung eines linearen Gradienten, Start bei 80 % Eluent A / 20 % Eluent B welcher innerhalb von 10 min zu 0 % Eluent A / 100 % Eluent B ansteigt. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 5 min mit 0 % Eluent A / 100 % Eluent B gewaschen bevor sie während weiterer 5 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde. (Eluent A: doppeltdeionisiertes Wasser mit 0,1 % HCOOH; Eluent B: Acetonitril mit 0,1 % HCOOH).

Rapamycin und dessen Derivate: CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule; Verwendung eines linearen Gradienten, Start bei 18 % Eluent A2 / 82 % Eluent B2 welcher innerhalb von 10 min zu 0 % Eluent A2 / 100 % Eluent B2 anstieg. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 5 min mit 0 % Eluent A2 / 100 % Eluent B2 gewaschen bevor sie während weiterer 5 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde. (Eluent A2: doppeldeionisiertes Wasser mit 10 mM THF; Eluent B2: Methanol mit 10 mM NH<sub>4</sub>OH und 125 ml THF / 2,5 l).

Pre-Monensin und dessen Derivate: EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule; Verwendung eines linearen Gradienten, Start bei 28 % Eluent A / 72 % Eluent B welcher innerhalb von 16 min zu 0 % Eluent A / 100 % Eluent B anstieg. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 4 min mit 0 % Eluent A / 100 % Eluent B gewaschen bevor sie während weiterer 4 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde. (Eluent A: doppeldeionisiertes Wasser mit 0,1 % HCOOH; Eluent B: Acetonitril mit 0,1 % HCOOH).

Für die massenspektrometrische Detektion wurde die Elektronensprayionisation im positiven (Erythromycin; Prä-Monensin) / negativen (Rapamycin) Ionisationsmodus bei Verwendung einer Spannung von 4 kV eingesetzt. Die Spannung der Kapillare wurde auf 18 V und die Kapillartemperatur auf 275 °C gesetzt. Die Spektren wurden in einer Scan-Methode mit einer Massen-zu-Ladung-Spanne von 200 bis 2000 aufgenommen.

### Ms/Ms

Die Fragmentierung wurde mittels *collisoin induced dissociation* (CID) bei 35 % durchgeführt. Diesem ging ein normaler Scan vor raus (200-2000). Zerschlagen wurden in der vorliegenden Arbeit die Massen:

m/z= 734 (Erythromycin A, C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup> (1))

m/z= 936 (C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>NNaO<sub>13</sub><sup>+</sup>; Rapamycin (3))

m/z= 720 (Desmethylethromycin A, C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup> (5))

m/z= 758 (2-Propargylethromycin A, C<sub>39</sub>H<sub>68</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup> (6))

m/z= 906 (C<sub>50</sub>H<sub>77</sub>NNaO<sub>12</sub><sup>+</sup>; RapK Mutante nach Fütterung mit Cyclohexancarbonsäure (7) bzw. SK 54)

m/z= 732 (13-Vinylethromycin A, C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup> (8))

m/z= 775 (15-C modifiziertes Erythromycin A, C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>)

m/z= 858 (15-Azidoerythromycin A, C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>INO<sub>13</sub><sup>+</sup> (9))

### **5.7.2 Bestimmung der akkuraten Masse**

Die Separationen wurden an einem Accela HPLC-System (bestehend aus Pumpe, Autosampler, Säulenofen und PDA Detektor) durchgeführt, welches online an ein Orbitrap Massenspektrometer (ausgestattet mit einer LTQ XL linear ion trap; Thermo Electron Corporation Deutschland) gekoppelt war. Alle eingesetzten Eluent waren LC-MS grade (Chromasolv Deutschland). 5 µl der jeweiligen Probe wurden mittels Autosampller (T= 10 °C) bei einer Flußrate von 500 µl/min der Eluente A und B im Verhältniss 1:1 injiziert. Wurde die Probe mit vorgeschalter Säule gemessen, wurde die Probe auf eine Nucleodur C18 Säule (3 µm, Macherey-Nagel Deutschland) aufgetragen unter Verwendung eines linearen Gradientes (80 % Eluent A / 80 % Eluent B über einen Zeitraum von 10 min zu 0 % Eluent A / 100 % Eluent B) eluiert. (Eluent A: doppeldeionisiertes Wasser mit 0,1 % HCOOH; Eluent B: Acetonitril mit 0,1 % HCOOH).

Für die massenspektrometische Detektion wurde die Elektronensprayionisation im positiven Modus bei Verwendung einer Spannung von 4 kV verwendet. Die Spannung der Kapillare wurde auf 18 V und die Kapillartemperatur auf 275 °C gesetzt. Die Spektren wurden in einer Scan-Methode mit einer Massen-zu-Ladung-Spanne von 100 bis 2000 aufgenommen.

### **5.7.3 Testung auf antimikrobielle Aktivität; Hemmhof-Test**

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurde der Hemmhof-Test mit dem Gram<sup>+</sup> Bakterium *B. subtilis* (DSM10) durchgeführt.

200 µl der *B. subtilis* Sporensuspension (s. 5.6.2) wurden zu 200 ml abgekültem, flüssigen LB-Agar pipettiert und in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

Mit Hilfe einer umgekehrten 50 µl Pipettenspitze wurden 4 Löcher pro Platte im Agar erzeugt. In diese Löcher wurden 50µl Fermentationssuspension (Vortest) oder 10 µl Testsubstanz (in Methanol) pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die vom Wachstum ausgesparten Hemmhöfe erlauben eine Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität der zu testenden Substanzen.

## 5.8 Allgemeine Methoden der Molekularbiologie

### 5.8.1 Isolation von Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse

1,5 ml Übernachtskultur wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgte das Resuspendieren des Pellets in 50 µl MP1 und Zugabe von 100 µl MP2. Nach gründlichem Invertieren und kurzer Inkubation von max. 5 min (bis die Lösung klar wurde) wurde nach Zugabe von 75 µl MP3 und 225 µl MP4 wiederum invertiert und dann für 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA nach Zugabe von 900 µl EtOH<sub>abs.</sub> während Zentrifugation bei 10000 g für 15 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Das trockene Pellet wurde dann in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Lagerung erfolgte bei -20 bzw. -80 °C.

### 5.8.2 Isolation genomischer DNA aus Actinomyceten

Genomische DNA wurde ausgehend von frischer Kulturlösung isoliert. Die von Josef Altenbuchner und John Cullum beschriebene Methode<sup>[195]</sup> wurde modifiziert und an die Eigenschaften der verwendeten Actinomyceten angepasst.

2 ml Zellsuspension wurden mittels Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert, in 0,3 ml L1 resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 37 µl 10 % SDS und gründlichem Invertieren wurde für 30 min bei 95 °C inkubiert. Es folgte Zugabe von 125 µl 3 M Kaliumacetatlösung pH=5,2, gründliches Invertieren und ein weiterer Inkubationsschritt für 1 h auf Eis. Im Anschluss an einen Zentrifugationsschritt von 15 min bei 12000 g und 4 °C wurde der Überstand in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Es folgt Phenol-Chlorophorm Aufreinigung, s. 5.8.4.1. und Ethanol-Präzipitation der DNA woran die DNA im Anschluss in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert wurde.

### 5.8.3 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen

Die Konzentration von Plasmid oder genomischer DNA wurde standardmäßig mit dem NanoDrop D-1000 der Firma PEQLab Biotechnologie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zudem wurden die Absorptionsquotienten 260/280 sowie 260/230 ermittelt, welche ein Maß für die Reinheit der jeweiligen Probe darstellen. Das zur

Messung eingesetzte Probenvolumen betrug 1,1 µl die ermittelte DNA-Konzentration wurde von der Computersoftware in ng/µl angezeigt.

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde alternativ mittels Gelelektrophorese bestimmt, wobei die Konzentration der Bandenintensität im Vergleich mit der Intensität der Markerbanden abgeschätzt werden konnte.

#### **5.8.4 Aufreinigung und Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen**

##### **5.8.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion (PCI-Extraktion)**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine Methode der DNA Aufreinigung da, in der Proteine und andere Verunreinigungen effektiv entfernt werden können. Hierzu wurden 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) zu 1 Volumen wässriger DNA Lösung pipettiert, durch vortexen gründlich durchmischt und die Phasen mittels zentrifugation (12000 g, 5 min) getrennt. Der Überstand wurde in einem zweiten Schritt mit einem Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und die 2 Phasen analog durch Zentrifugation getrennt. Die im wässrigen Überstand befindliche DNA konnte dann durch Ethanol präzipitiert werden.

##### **5.8.4.2 Ethanol-Fällung der DNA**

Zur Präzipitation der DNA wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (pH = 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol zu der wässrigen DNA Lösung pipettiert, gründlich durchmischt und für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Präzipitat mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen, bevor dieses bei Raumtemperatur getrocknet und dann in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert wurde.

##### **5.8.4.3 Sure Clean – DNA-Fällung**

Für die Fällung wurde ein Volumen SureClean (Bioline) mit einem Volumen wässriger DNA Lösung gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor dieses Gemisch für 30 min bei 12000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entnommen, das Präzipitat mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Sure Clean basierende DNA Fällung wurde vorallem zur Fällung von PCR Produkten eingesetzt, die nachfolgend mittels einer weiteren PCR assembliert werden sollten.

## 5.8.5 Einbringen von DNA in Mikroorganismen; Gentransfer

### 5.8.5.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Reaktionsgefäße mit entsprechenden chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (50 µl) wurden schonend auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid-DNA hinzu pipettiert, durch schnipsen an das Gefäß gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Bevor der eigentliche Hitzeschock für 60 s bei 42 °C in einem Termoblock durchgeführt wurde, musste die Suspension nochmals durch schnipsen gemischt werden. Das Reaktionsgefäß wurde im Anschluss an die Inkubation bei 42 °C schnell auf Eis gestellt und für 5 min dort gelagert, bevor 200 µl SOC Medium hinzu pipettiert und die Zellsuspension für 45 min bei 37 °C inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 5.8.5.2 Elektroporation von *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden schonend auf Eis aufgetaut, 1 µl der zu DNA (50 ng/µl ggf. verdünnt) hinzu pipettiert, durch schnipsen an das Reaktionsgefäß durchmischt und für einige Minuten auf Eis inkubiert bevor die Zellsuspension in ein auf Eis gekühlte 0,2 µm Elektroporationsküvetten (Biorad) überführt wurde. Die Küvette wurde in den Elektroporationsaparat (Biorad) gestellt und ein elektrischen Puls von 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω durchführte. Schnellstmöglich wurde 0,7 ml SOC Medium in die Küvette pipettiert und die gesamte Zellsuspension dann in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C wurde die Zellsuspension entweder auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, überführt und inkubiert.

### 5.8.5.3 Konjugation in Actinomyceten

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

### **Vorbereitung des *E. coli* Donorstammes**

Das zu übertragende Plasmid wurde mittels Hitzeschocktransformation in chemisch kompetente *E. coli* 12567/pUZ8002 eingebracht und über Nacht auf LB-Platten Cam/Kana (Resistenz durch pUZ8002 vermittelt) und entsprechendes Antibiotikum (Resistenz durch transformiertes Plasmid vermittelt) für inkubiert. Am darauf folgenden Abend wurde 1 Kolonie mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte abgestrichen und diese in ein Kulturröhrchen mit 2 ml LB Medium (Kanamycin sowie dem spezifischen Antibiotikum) überführt. Die Anzucht der Kultur erfolgte über Nacht bei 30 °C. Am nächsten Morgen wurde die Flüssigkultur 1:5 mit frischem LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) verdünnt und für weitere 2 Stunden bei 37 °C bzw. 30 °C (temperatursensitives Vektorrückrad) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellsuspension durch Zentrifugation (5 min, 4000 g) pelletiert und das Pellet zweimal mit 4 ml TSB Medium gewaschen, bevor es dann in 125 µl TSB Medium resuspendiert wurde.

### **Rezipientenvorbereitung**

Die Konjugation von *S. erythraea* und *S. cinnamonensis* wurde mit frischem Mycelium, die Konjugation von *S. hygroscopicus* mit Sporen durchgeführt. Bei der Verwendung von Mycelium wurden pro Konjugationsansatz 2 ml Kulturlösung durch zentrifugation pelletiert (5 min, 4000 g) und zweimal mit TSB gewaschen. Beim Einsatz von Sporen, konnten diese nach dem Hizeschock (s. 5.6.3.1) direkt eingesetzt werden.

### **Konjugation und Selektion**

Für einen Konjugationsansatz wurden 125 µl *E. coli* Kultur mit 200µl Mycelium bzw. 100 µl Sporenlösung durch auf und ab pipettieren gemischt und die Suspension punktuell auf sehr trockene SY<sup>+</sup>-Agarplatten (SY Agar komplementiert mit Thiamin, FeSO<sub>4</sub> und MgCl<sub>2</sub>) pipettiert.

Die Platten wurden für fünf Minuten offen im laminaren Luftstrom der Sterilbank getrocknet, bevor die Suspension mit Hilfe eines Einwegspatels gründlich auf der Platte verteilt und für weitere 15 min getrocknet wurde. Die Platten wurden für 16 Stunden bei 30 °C inkubiert bevor sie dann mit Soft-Agar (0,5%), der das Antibiotikum Phosphomycin (100 µg/ml) und ein Antibiotikum dessen Resistenz die zu konjugierende Plasmid-DNA vermittelte enthielt, überschichtet wurden. Eine



Ausnahme stellte die Konjugation in *S. hygroscoptisus* da, hier wurden die Platten für 16 Stunden bei 28 °C inkubiert, bevor 0,5 ml Nalidixinlösung (25 mg/ml) mit Hilfe eines Spatels gründlich auf den Platten verteilt wurde. Die Platten wurden für weitere fünf Stunden bei 28 °C inkubiert und dann mit Soft-Agar (0,5%), der mit einem Antibiotikum dessen Resistenz die zu konjugierende Plasmid-DNA vermittelte, enthielt überschichtet. Die Agarplatten wurden bis zum Wachstum kleiner Kolonien bei der entsprechenden Temperaturen weiter inkubiert und diese dann mit Hilfe eines Zahnstochers auf eine antibiotikahaltige ABB13-, GYM-, bzw. SY-Agarplatte übertragen und für fünf bis zehn Tage inkubiert. Die Überprüfung der Transkonjugaten erfolgte mittels PCR und Sequenzierung oder Southern Blot.

#### **5.8.5.4 Protoplastentransformation**

Bei der Protoplastentransformation wird die Zellwand Gram<sup>+</sup> Bakterien vor dem DNA-Transfer abgebaut; diese stellt sonst eine Barriere für die Aufnahme der Fremd-DNA da. Der sukzessive Abbau der Zellwand erfolgt durch Inkubation mit Lysozym, was zur Freisetzung der Protoplasten aus dem Mycelium führt, welche dann PEG-vermittelt Fremd-DNA aufnehmen können. Eine direkte Plattierung auf Regenerationsmedium (R2YE) ermöglicht im Anschluss an die Transformation einen Wiederaufbau der Zellwand.

#### **Protoplastenpräparation (Protoplastierung)**

Der Actinomycet wurde unter Zusatz von 5 % Glycin in TSB Medium hochgezogen (36 - 48 h) und 20 ml Kulturlösungen bei 4000 g für 10 min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 15 ml 10,3 % Saccharoselösung wurde das Pellet in 4 ml Lysozymbilösung gründlich resuspendiert, wodurch die Zellwandlyse gestartet wurde. Nach einem Inkubationsschritt von 15 - 60 min bei RT wurde 3 mal auf und ab pipettiert und für weitere 15 min inkubiert (der Fortschritt der Protoplastenbildung wurde alle 10 min lichtmikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung verfolgt).

Nach Zugabe von 5 ml eiskaltem Puffer P1 und wiederholtem Pipettieren wurde die Reaktion abgestoppt und die Lösung durch sterile Watte filtriert (um verbleibende Mycelien abzutrennen) und die Protoplasten bei 3000 g für 10 min vorsichtig sedimentiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abdekantiert und nach Zugabe von 50 ml Puffer P1 erneut sedimentiert wurde, konnten die Protoplasten in 1 ml Puffer P1 resuspendiert werden (wegen der zu hohen Scherkraft nicht pipettieren sonder

nur vorsichtig gegen das Gefäß schnipsen). Aliquote a 50 µl wurden bei -80 °C gelagert.

### **Protoplastentransformation und Selektion**

Vorbereitend wurden 1 g PEG (PEG 6000) in einem Reagenzglas mittels Autoklav sterilisiert und in 3 ml Puffer P1 suspendiert – PEG-Lösung.

50 µl Protoplastensuspension wurden mit 1 µl DNA (~500 ng/µl) gemischt und nach Zugabe von 50 µl PEG-Lösung vorsichtigen auf und ab pipettieren mit Hilfe eines Einwegspatels auf R2YE Agarplatten ausgestrichen. Ebenfalls wurde dieses mit verschiedenen Verdünnungstufen (1:10 bis 1:1000 in Puffer P1) durchgeführt. Die Platten wurden für 24 h bei 28 °C inkubiert und dann mit 2 ml Soft-Agar (0,5%), versehen mit dem entsprechenden Antibiotikum dessen Resistenz die zu transformierende Plasmid-DNA vermittelte, überschichtet.

### **5.8.6 Agarosegelelektrophorese**

Für die Agarosegelelektrophorese wurden in Abhängigkeit von der aufzutrennenden Fragmentgröße 0,7 bis 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, abkühlt, mit Ethidumbromid versetzt und in Gelkammern gegossen. Nach dem Erhärten der Gele konnten diese in Frischhaltefolie gewickelt bei 4 °C für einige Tage gelagert werden.

Für die Elektrophorese wurde ein Gel in die Elektrophoresekammer (BioRad) gelegt und vollständig mit 1xTAE-Puffer bedeckt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer versetzt und in die einzelnen Taschen pipettiert, als Referenz wurden 5 µl Größenstandard in eine weitere Tasche pipettiert. Es erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente bei 110 mV für ca. 30 min. Im Anschluss folgte Dokumentation des Geles (Kodak, Gel Logic 200) bei 306 nm, wo die Interkalation von Ethidumbromid in den DNA-Doppelstrang im UV-Licht sichtbar wurde. Die Dokumentation erfolgte mit dem Programm MI von Kodak.

### **Isolierung von DNA aus Agarosegelen mittels Gel Extraktions Kit**

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Kit „peqGOLD Gel extraction“ der Firma PeqLab verwendet. Die DNA wurde mit einem sauberen Skalpell nach Auftrennung der Fragmente mittels Elektrophorese aus der Gelmatrix

unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, die DNA so kurz wie möglich dem UV-Licht auszusetzen. Die Isolierung wurde dann nach Herstellerangaben durchgeführt. Durchschnittliche, so isolierte DNA-Konzentrationen in Größenbereichen bis 5 kb liegen zwischen 25 und 50 ng/µl. Bei Fragmenten größer 6 kb können oftmals nur Spuren isoliert werden.

### **Isolierung von DNA aus Agarosegelen mittels wiederholtem Einfrieren**

Die DNA wurde mit einem sauberen Skalpell nach Auftrennung der Fragmente mittels Elektrophorese aus der Gelmatrix unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierbei wurde darauf geachtet, die DNA so kurz wie möglich dem UV-Licht auszusetzen. Im Anschluss wurde das Agarosestück (im Reaktionsgefäß) im flüssigen Stickstoff schockgefroren bevor es durch eine 1 ml Spritze gedrückt wurde. Die Agarose wurde in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen, mit 100 µl Wasser versetzt und erneut schockgefroren und durch die Spritze gedrückt. Der Prozess des Schockgefrierens und das Einwirken der mechanischen Kraft wurden 4 mal wiederholt. Final wurde die die Agarose mittels Zentrifugation von der Flüssigkeit getrennt. Die in der Flüssigkeit vorhandenen DNA wurde mittels Ethanol-Fällung präzipitiert und dann resuspendiert. Großer Vorteil, trotz der zeitraubenden Prozedur, dieser Methode ist die isolierte DNA Konzentration (> 100 ng/µl, unabhängig von der Fragmentgröße).

### **5.8.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Ausgehend von Plasmid-DNA, genomischer DNA oder lysierten Zellen wurden die gewünschten Gene oder Sequenzbereiche mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Das jeweilige PCR Programm wurde an die gegebenen Anforderungen angepasst, die durch Wahl der Polymerase, der Additive sowie der spezifischen Oligonukleotide begründet waren. Hierbei wurde die Annealing Temperatur jeweils durch die verwendeten Oligonukleotide ( $T_m + 3^\circ\text{C}$ ) bestimmt, ebenfalls die Wahl des Programmes: 2- oder 3-Schritt PCR. Die jeweilige Inkubationsdauer pro PCR Schritt wurde von der verwendeten Polymerase festgelegt.

Die PCR wurden in der vorliegenden Arbeit in dem Eppendorf Thermal Cycler oder im Piko Cycler der Firma Finnzymes durchgeführt, wobei es sich bei letzterem um einen

so genannten High Speed Cycler handelt der vorallem für die Amplifikation von längeren Gensequenzen (> 5 kb) einige Vorteile mit sich bringt.

Die jeweiligen PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert, die finale Konzentration der PCR Additive lag bei Betain bei 1 M, bei DMSO bei max. 10%. Wurde genomische DNA als Templat eingesetzt (~ 150 µg), so wurde diese zuvor mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonucleasen geschnitten, um die PCR-Reaktion zu erleichtern. Bei der Verwendung von Plasmid-DNA wurden in der Regel ~50 µg Template eingesetzt, einzige Ausnahme bildet die *Error-Prone* PCR, bei der unterschiedliche Templat-Mengen eingestezt wurden. Bei der Verwendung des Phusion PCR Master Mixes wurde in der Regel erst eine Testreaktion in einem Volumen von 10 µl durchgeführt, welche dann bis zu einem Volumina von max. 50 µl hochsakaliert werden konnte. Im Anschluss an jede PCR wurde eine Gelelektrophorese mit nachfolgender Visualisierung der DNA Banden mittels UV Licht durchgeführt. Wurde das PCR Produkt für nachfolgende Schritte (Klonierungen o.ä.) benötigt, wurde dieses in Abhängigkeit von entstandenen Nebenprodukten Gelgereinigt oder direkt mit Ethanol präzipitiert.

#### “PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase” der Frima BIOCAT

**Tabelle 37: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei Verwendung der Precisor High-Fidelity Polymerase von Biocat**

Lösung	Mengenangabe
5x HiFi Puffer	10 µl
dNTP Mix (jeweils 25 mM)	0,5 µl
Templat DNA	1 µl
Oligonukleotide (jeweils 10 µM) je	5 µl
DNA Polymerase	1 µl
PCR Additive (Betain o. DMSO)	
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl

**Tabelle 38: Standard PCR Temperaturprofil bei Verwendung der PRECISOR High-Fidelity DNA Polymerase im Eppendorf Cycler.**

Temp.	98 °C	98 °C	(T <sub>m</sub> +3) °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	2 min	30 s	30 s	20 s/kb	4 min	∞
Zyklen	1	25			1	

## Phusion® Flash High-Fidelity DNA Polymerase (Mastermix) der Firma Finnzyme

**Tabelle 39: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei Verwendung der Phusion® Flash High-Fidelity DNA Polymerase (Mastermix)**

Lösung	Mengenangabe
5x Phusion Flash Master Mix	5 µl
Templat DNA	1 µl
Oligonukleotide (jeweils 10 µM) je	5 µl
Betain (5 M)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

**Tabelle 40: 2 Schritt PCR Temperaturprofil bei Verwendung des Phusion Flash PCR Master Mixes im Pikocycler.**

Temp.	99 °C	99 °C (T <sub>m</sub> +3)°C	72 °C	72 °C	4 °C	
Dauer	3 min	15 s	1 s	25 s/kb	60 s	∞
Zyklen	1	25			1	

**Tabelle 41: 3-Schritt PCR Temperaturprofil bei Verwendung des Phusion Flash PCR Master Mixes im Pikocycler.**

Temp.	99 °C	99 °C (T <sub>m</sub> +3)°C	72 °C	99 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
Dauer	3 min	15 s	1 s	25 s/kb	15 s	25 s/kb	60 s	∞
Zyklen	1	5			20			

Diese 3-Schritt Temperaturprofil wurden insbesondere bei der zielgerichteten Mutagenese mittels PCR sowie bei Assemblierungen durchgeführt, bei denen flankierende Bereiche an die Gensequenz angebracht werden sollten.

Bei Einsatz des Eppendorf Cyclers wurde die Annealing Dauer von 1 auf 10 Sekunden erhöht, die Extension von 25 s/kb auf 35 s/kb.

**Expand Long Template PCR System der Firma Roche****Tabelle 42: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes bei Verwendung des *Expand Long Template System* der Firma Roche**

Lösung	Mengenangabe
10xPuffer	5 µl
dNTP Mix (2 mM)	1 µl
Oligonukleotide (jeweils 10 µM) je	5 µl
Polymerase	0,5 µl
DMSO	2 µl
Templat	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

**Tabelle 43: Temperaturprofil bei Verwendung des *Expand Long Template System* der Firma Roche im Eppendorf Cyclcr**

Temp.	95 °C	93 °C	50 °C	71 °C	93 °C	69 °C	71 °C	71 °C	4 °C
Dauer	2 min	10 s	30 s	240 s	15 s	30 s	240 s	7 min	∞
Zyklen	1	10			20				

**5.8.7.1 Kolonie PCR**

Die Kolonie-PCR wurde zur ersten Identifikation potentiell positiver (d.h. gewünschtes Plasmid tragender) *E. coli* Klone eingesetzt. Zum Einsatz kam hier die Phire Hot Start DNA Polymerase (Finnzyme) und als Additiv wurde standardmäßig 1 M Betain eingesetzt. Für die PCR wurde ein Teil des jeweiligen *E. coli* Klons mit Hilfe einer 10 µl Pipette von der Agarplatte gestrichen, in 5 µl ddH<sub>2</sub>O in einem geeignetem PCR Reaktionsgefäß resuspendiert und dann für 15 min bei 99 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurden 2 µl dieses Ansatzes für die nachfolgende PCR verwendet. In Abhängigkeit von der Probenmenge wurde die Kolonie PCR in beiden Cyclern durchgeführt. Bei Einsatz des Eppendorf Cyclers wurde die Annealing Dauer von 1 auf 10 Sekunden erhöht, die Extension von 25 s/kb auf 35 s/kb.

**Tabelle 44: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Durchführung einer Kolonie PCR**

Lösung	Mengenangabe
5xPhire Puffer	2 µl
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	0,2 µl
Templat DNA	1 µl
Oligonukleotide (jeweils 10 µM) je	1 µl
DNA Polymerase	0,2 µl
Betain (5 M)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 µl

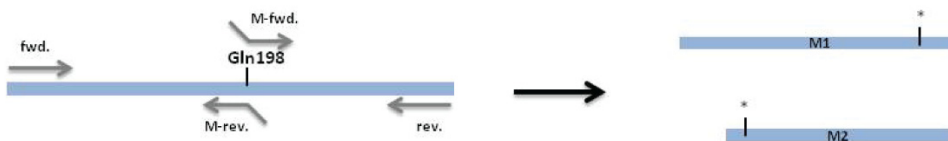
**Tabelle 45: Standard Temperaturprofil für die Kolonie PCR, Phusion Polymerase.**

Temp.	99 °C	4 °C	99 °C	99 °C (T <sub>m</sub> +3) °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	10 min	∞	3 min	15 s	1 s	25 s/kb	60 s
Zyklen	1	1	1	5			

### 5.8.7.2 Zielgerichtete Mutagenese via *overlap extension* PCR

Mittels zielgerichtete Mutagenese sollten spezifische Mutationen einzelner Aminosäuren in Gensequenzen eingebracht werden (vgl. Abbildung 130). Dazu wurden in einem ersten Amplifikationsschritt mit zwei außen und zwei innen hybridisierenden Oligonukleotiden zwei Fragmente generiert. Die beiden inneren Oligonukleotide wurden hierfür so definiert, dass die gewünschte Mutation von jeweils 10-15 Basen umgeben wurde. Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und nach einem *DpnI* Verdau in Ethanol präzipitiert, getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Im Anschluss wurden die Fragmente in equimolaren Mengen in eine zweite PCR-Reaktion mit den beiden äußeren Oligonukleotiden eingesetzt. In den PCR-Reaktionen wurde immer Betain (1 M final) als Additiv eingesetzt sowie der Phusion Flash Master-Mix verwendet.

## I. Zwei separate PCR jeweils mit einem Mutagenese-Oligonukleotid



## II. Assemblierung von M1 &amp; M2 mittels PCR

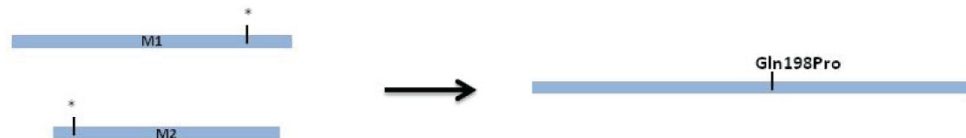


Abbildung 130: Überblick des Arbeitsablauf zur zielgerichteten Mutagenese

## 5.8.7.3 DIG-Markierung von PCR Produkten (Sonden für den Southern Blot)

Die Methode der nicht-radioaktiven DIG-Markierung basiert auf dem Steroid Digoxigenin welches ursprünglich aus dem Fingerhut (*Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*) isoliert wurde. Da die Blüten und Blätter dieser Pflanzen die einzige, bekannte natürliche Quelle für Digoxigenin sind, bindet der anti-DIG Antikörper spezifisch an das DIG, nicht an andere biologischen Substrate. Für die Generierung einer DIG-markierten Sonde (wie sind für das Southern blotting s. 5.8.12 benötigt wird) wird ein PCR-Fragment amplifiziert in welches DIG-dUTP eingebaut wird. Hierzu wurde der PCR DIG Labeling Mix (2 mM dATP, dCTP, dGTP (jeweils), 1,9 mM dTTP, 0,1 mM DIG-11-dUTP in ddH<sub>2</sub>O, pH= 7.0) der Firma Roche verwendet. Der Reaktionsansatz wird anlog zum nachfolgenden Pipettierschema zusammen gesetzt, zusätzlich wird eine Negativkontrolle pipettiert (in dieser befindet sich an Stelle des DIG-Mixes 5µl dNTP-Mix (2mM)).

Tabelle 46: Pipettierschema zur Generierung einer DIG markierten Sonde

Lösung	Mengenangabe
10x Taq Polymerase Puffer	5 µl
10x PCR DIG-Mix	5 µl
Templat DNA (~10ng/µl)	1 µl
Oligonukleotide (jeweils 10 µM) je	5 µl
Taq DNA Polymerase	0,4 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl



**Tabelle 47: Temperaturprofil zur Assemblierung einer DIG-markierten Sonde**

Temp.	95 °C	95 °C (T <sub>m</sub> +3)°C	72 °C	72 °C	4 °C	
Dauer	3 min	15 s	30 s	60 s/kb	60 s	∞
Zyklen	1	25			1	

Jeweils 2 µl der PCR-Produkte wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und mittels Gelelektrophorese analysiert. Basierend auf dem Einbau von DIG-11-dUTP kann die Produktgröße signifikant höher sein. Die DIG-Markierte Sonde wird bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### 5.8.8 Sequenzierung

Die einzelnen Sequenzierungsergebnisse wurden mittels dem Programm VectorNTI der Firma Invitrogen und dem Programm Blast (Basic local alignment search tool) über die Internetseite "[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)" analysiert um so die Identität der Konstrukte zu bestätigen und so Mutationen oder Leserasterverschiebung (*frameshifts*) ausschließen zu können (Homologievergleiche auf Nucleinsäure- und Aminosäureebene).

Für die Sequenzierungen wurde entweder Plasmid-DNA (100 ng/µl, ggf. zuvor linearisiert) oder aufgereinigtes PCR-Produkt (mittels Gelelektrophorese oder Inkubation mit Exonuclease/SAP gereinigt; siehe 5.8.9.3) eingesetzt.

### Innerhalb des MPI's

Bei Sequenzierungen innerhalb des MPI wurden die Sequenzierungs-PCR eigenständig durchgeführt. Die weitergehende Sequenzierungsprozedur, ausgehend von der präzipitierten DNA wurde dann in den „zentralen Einheit Biotechnologie“ durchgeführt.

**Tabelle 48: Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes – *in house***

Lösung	Mengenangabe
DNA-Template	3 µl
Oligonucleotid (30µM)	1 µl
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4 µl
Betain (5 M)	2 µl

Die Sequenzierreaktion wurde dann bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

**Tabelle 49: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR.**

Temp.	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
Dauer	4 min	30 s	15 s	40 s	∞
Zyklen	1	25			

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde die amplifizierte DNA mittels Ethanol-Fällung isoliert und aufgereinigt. Die präzipitierte DNA wurde zur Sequenzierung abgegeben, die Analyse erfolgte mittels ABI 3130 x 1 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems und der Software Sequencing Analysis 5.2.

### Sequenzierungen bei der Firma StarSeq

Für die Sequenzierungen bei der Firma StarSeq wurde folgender 7 µl-U-Mix in einzelnen PCR Reaktionsgefäßen oder in 96 well-Platten erstellt, und der Firma geschützt in gepolsterten Briefumschlägen per Post zugestellt.

**Tabelle 50: Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes – StarSeq®**

Lösung	Mengenangabe
DNA-Template	4 µl
Oligonucleotid (30 µM)	1 µl
Betain (5 M)	2 µl

### 5.8.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Wurde bei der PCR plasmid- oder genomische DNA als Templat eingesetzt, so ging der jeweiligen Aufreinigung ein *DpnI* Verdau voraus. Das Restriktionsenzym erkennt die Sequenz GATC, schneidet im Gegensatz zu anderen Typ-II-Restriktionsendonukleasen die DNA aber nur dann, wenn bei dieser Adenin methyliert ist. Diese außergewöhnliche Aktivität kann man sich zur Entfernung der Templat DNA zu nutze machen jedoch nur wenn das Ausgangsplasmid aus einem Stamm isoliert wurde, der die dam-Methylase synthetisiert - diese methyliert Adenin im Sequenzmotiv GATC.

Der *DpnI* Verdau des PCR Ansatzes wurde gemäß folgendem Ansatz zusammen pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor dieser einer der nachfolgenden Aufreinigungsmethoden unterzogen wurde.

**Tabelle 51: Reaktionsansatz für den *DpnI* Verdau nach einer PCR**

Lösung	Mengenangabe
PCR Produkt	8,5 µl
<i>DpnI</i> , <i>Fast Digest</i>	0,5 µl
10x <i>Fast Digest</i> Puffer	1 µl

#### 5.8.9.1 Aufreinigung des *DpnI* verdauten PCR Produktes mittels SureClean

Bei der Aufreinigung handelt es sich um eine säulenfreie Aufreinigungsmethode der Firma Bioline bei der das PCR Produkt (>75 bp) präzipitiert wird - Proteine, Primer und Nucleotide wurden so aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt.

Für die Aufreinigung wurde ein Volumen SureClean mit einem Volumen PCR Ansatz, der zuvor *DpnI* verdaut wurde, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor dieses Gemisch für 20 min bei 12000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entnommen, das Präzipitat mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 5.8.9.2 Aufreinigung des mittels Gelelektrophorese

Das PCR Produkt wurde mit 6x DNA Ladepuffer versetzt und in einem der Größe angepasstem Prozentigen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA mittels dem „peqGOLD Gel extraction“ der Firma PeqLab isoliert (s. 5.8.6).

#### 5.8.9.3 Aufreinigung mittels ExoI/SAP – speziell vor Sequenzierreaktionen

Die Aufreinigung mittels Exonuclease I / Shrimp Alkine Phosphatase stellt eine zeitsparende Aufreinigungsmethode für PCR-Produkte vor Ihrem Einsatz bei Sequenzierreaktionen da, wobei freie Oligonukleotide entfernt und nicht eingebaute Nucleotide degradiert werden.

Für die Aufreinigung wurde folgender Mix präpariert und dann für 15 min bei 37 °C inkubiert bevor die Reaktion für 15 min bei 85 °C gestoppt wurde.

**Tabelle 52: Reaktionsansatz für die Aufreinigung von PCR-Produkten mittels ExoI/SAP**

Lösung	Mengenangabe
PCR Produkt	5 µl
Exonuclease I	0,5 µl
Shrimp Alkine Phosphatase	1 µl

Im Anschluss konnte die gereinigte DNA direkt in Sequenzierreaktionen eingesetzt werden.

### 5.8.10 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

#### Kontrollverdau

Restriktionsverdau zur Verifizierung von Konstrukten wurde in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich mit den *Fast Digest* Enzymen der Firma Fermentas durchgeführt. Großer Vorteil dieser Restriktionsendonucleasen ist die enorme Zeitersparnis bei Reaktionsansätzen; der Hersteller wirbt mit hoher Reaktionsgeschwindigkeiten dieser Enzyme von bis zu 1 µg DNA in 5 min.

Pro Kontrollverdau kamen in der Regel zwei Restriktionsendonucleasen zum Einsatz, die so gewählt wurden, dass sie die Richtigkeit des Konstruktes durch die resultierenden Fragmentgrößen bestätigen werden konnten (Bsp. eine Schnittstelle im Insert und eine Schnittstelle im Vektorrückrad).

Der Reaktionsansatz wurde analog zu Tabelle 53 pipettiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor 6x DNA Ladepuffer hinzugegeben wurde und die DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt sowie unter UV Licht sichtbar gemacht wurden.

**Tabelle 53: Reaktionsansatz für einen Kontrollverdau**

Lösung	Mengenangabe
Plasmid-DNA	3 µl
10x <i>Fast Digest</i> Puffer	1 µl
<i>Fast Digest</i> Enzym I	0,5 µl
<i>Fast Digest</i> Enzym II	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	5 µl

## Präparativer Verdau

Für präparative Verdaue, wie sie für Klonierungen mittels Restriktion/Ligation oder SLIC-MIX notwendig sind, kamen Restriktionsendonukleasen der Firma New England Bioscience zum Einsatz. Restriktionsverdaue wurden in einem Volumina von 50 µl durchgeführt, wobei maximal 2,5 µg DNA eingesetzt wurden. Entsprechend der jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurde in dem von der Firma NEB empfohlenen Puffer mit oder ohne BSA für 3 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert (25 – 37 °C).

**Tabelle 54: Reaktionsansatz für einen präparativen Restriktionsverdau**

Lösung	Mengenangabe
DNA	2,5 µg
Puffer	5 µl
BSA (optional)	0,5 µl
Enzym I	2,5 µl
Enzym II (optional)	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Add 50 µl

War der Verdau mit zwei nicht kompatibel Restriktionsendonukleasen notwendig, wurde erst mit einem Enzym inkubiert, die DNA präzipitiert und im Anschluss hieran mit dem zweiten Enzym inkubiert. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde die DNA aufgereinigt; in Abhängigkeit vom Produkt entweder gelgereinigt oder mittels Ethanol-Fällung präzipitiert.

## 5.8.11 Klonierungsstrategien

### 5.8.11.1 Klonierung mittels Ligation

Für die Klonierung mittels Liagtion wurden die Konzentrationen von Vektorrückrad und Insert nach vorhergegangenen präparativen Verdau und Aufreinigung mittels NanoDrop bestimmt. Für den Ligationsansatz wurden Vektorrückrad und Insert im molaren Verhältniss von 1:2 eingesetzt.

**Tabelle 55: Pipettierschema für einen Ligationsansatz**

Lösung	Mengenangabe
Vektorrückrad	50 ng
Insert	1:2
T4 DNA Ligase [5 Weiss]	0,5 µl
10x Ligase Puffer	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Add 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 22 °C inkubiert bevor 2 µl des Ansatzes in chemisch kompetente OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup> oder in XL10 Gold Zellen transformiert wurden.

#### 5.8.11.2 Klonierung mittels *in vivo cloning*

Das *in vivo cloning* (IVC) ist eine von Vogelstein im Jahr 1993 etablierte Methode, mit der sich PCR-Amplifikate mit verdautem Vektor mittels homologer Rekombination ligieren lassen.<sup>[196]</sup> Dieses wird realisiert, indem mittels geeigneter PCR-Oligonukleotide innerhalb einer PCR das Insert an beiden flankierenden Enden zum Vektor homologe Sequenzen enthält. Die dabei homologen Sequenzabschnitte sollten mindestens 15 nt lang sein.

Hierzu wurden jeweils 1 µl des gereinigten PCR Produkt sowie des verdauten, gelgereinigten Vektors in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt (Vororientierung). Anschließend erfolgte eine Transformation in One Shot OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup>-Zellen.

#### 5.8.11.3 Klonierung mittels SLIC-MIX

Beim dem von Li und Elledge entwickeltem *sequence and ligation independent cloning* (SLIC) werden äquimolare Mengen Vektor und Insert in Abwesenheit von Nucleotiden gleichermaßen mit T4-DNA Polymerase behandelt.<sup>[110]</sup> Es entstehen kurze einsträngige, komplementäre DNA Fragmente. Diese werden zunächst aneinander gelagert und durch Transformation in *E. coli* werden die Doppelstrangbrüche (Nicks) geschlossen. Voraussetzung ist die Amplifikation des Zielgens mit speziellen Oligonukleotiden, die flankierend Sequenzhomologa zum verdauten Vektor enthalten. Analog zum *in vivo cloning* müssen die flankierenden Enden mindestens 15 nt lang sein, mit steigender Nucleotidzahl kann ein Anstieg der

Klonierungseffizienz vor allem bei größeren zu klonierenden DNA-Fragmente beobachtet werden.

Bei dem SLIC-MIX handelt es sich um eine weiterentwickelte Methode des Sequenz- und Ligationsunabhängigen Klonieren. Hauptaugenmerk dieser Weiterentwicklung ist die Einzelstrangstabilisierung während der T4-DNA-Polymerase-Behandlung durch ET-SSB und die damit verknüpfte erhöhte Klonierungseffizienz.

Im ersten Schritt wurden der linearisierte Vektor (gründlicher Restriktionsverdau – keine *Fast Digest* Enzyme) und das mittels PCR amplifizierte Zielgen bzw. die Zielgene (bei der simultanen Klonierung von mehreren Fragmenten wie beispielsweise Gen- & Promotersequenz) unabhängig voneinander mit T4 DNA-Polymerase für 60 min bei 22 °C in äquimolaren Mengen inkubiert. In der Regel wurden im ersten SLIC-MIX Schritt 0,5 µg Vektor DNA eingesetzt, für eine erfolgreiche mussten jedoch mindestens Klonierung 0,1 µg eingesetzt werden. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert.

**Tabelle 56: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes SLIC-MIX I**

Lösung	Vektor	Insert
DNA	500 ng	äquimolar
10x T4-DNA Polymerase Puffer	1 µl	1 µl
BSA (1:10)	0,1 µl	0,1 µl
ET-SSB (1:10)	1,6 µl	0,8 µl
T4-DNA Polymerase (Fermentas)	0,33 µl	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl	Ad 10 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumina dCTP (10mM) abgestoppt und jeweils 2 µl von Vektor und Insert in den zweiten SLIC-MIX Schritt eingesetzt (bei der simultanen Klonierung von 2 Fragmenten und in das Vektorrückrad wurden alle 3 Komponenten in den zweiten Schritt eingesetzt). Der Reaktionsansatz wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 57: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes SLIC-MIX II**

Lösung	Mengenangabe
Vektor-DNA	2 µl
Insert-DNA	2 µl
10x T4 DNA Ligase Puffer (Fermentas)	1 µl
RecA (1:25)	0,1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl

Nach einer Inkubation wurden maximal 5 µl für die Transformation in OmniMAX™ 2T1<sup>R</sup>-Zellen eingesetzt.

### 5.8.12 Southern Blot

Vorbereitend musste für die Southern Blot eine DIG-markierte Sonde synthetisiert werden (s. 5.8.7.3), welches mittels PCR erreicht wurde.

2-3 µg verdaute genomische DNA wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,7 %) über die gesamte Gellänge bei 100 mV aufgetrennt – das Gel enthielt kein Ethidiumbromid. Als Standard wurde 1 µl 1 kb plus Ladder aufgetragen. Es folgten durch Schwenken des Geles in der jeweiligen Lösung ein Depurinierungsschritt (15 min), zwei Waschschrte (je 5 min), ein Denaturierungsschritt (30 min) und wiederum zwei Waschschrte. Bevor der eigentliche Blot (60 min 125 mm Hg) der DNA auf eine Hydond-N Nylonmembran (Amersham Pharmacin) durchgeführt wurde, musste das Gel kurz in Transferpuffer geschwenkt werden. Im Anschluss wurde die DNA mittels UV Licht auf der Membran fixiert (120 s). An dieser Stelle ist Lagerung möglich.

Die folgenden Schritte wurden in einem auf temperierten Hybridisierungssofen durchgeführt, wo die Membran ständig unter Rotation von der jeweiligen Lösung benetzt wurde. Hierzu wurde die Membran mit Hilfe einer Pinzette luftblasenfrei in ein Hybridisierungsrohr gerollt – die Membran verteilt sich mit Hilfe von wenig Wasser über die Innenseite des Gefäßes. Es ist darauf zu achten, dass die Membran nicht trocken wird und nur mit einer Pinzette angefasst wird – da sonst später „Flecken“ auf dem Blot entstehen. Für die Prehybridisierung wurden 20 ml Roti-Hybridisierungspuffer (zuvor aufgekocht und dann auf 68 °C temperiert) mit 20 µl denaturierter (10 min 99 °C, dann Lagerung auf Eis) *Salomon-Sperm*-DNA versetzt und die Membran hierin (Prähybridisierungspuffer) für 3 h bei 68 °C inkubiert.



Während des folgenden Hybridisierungsschritts der für mindestens 16 h bei 68 °C durchgeführt wurde, wurde die Membran mit 20 ml auf 68 °C temperiertem Roti-Hybridisierungspuffer der 50 µl denaturierte, DIG markierte Sonde enthielt (Hybridisierungspuffer) inkubiert. Am folgenden Vormittag wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT in Waschpuffer 1, zweimal für 15 min bei 68 °C in Waschpuffer 2 und für 2 min in Puffer 3 unter Rotation gewaschen. Für das Blocken der Membran wurde diese für 30 min bei RT in 20 ml Blockingpuffer benetzt bevor 4 µl anti-DIG-AP Antikörper hinzu pipettiert und für weiter 60 min rotiert wurde. Im Anschluss hierran wurde die Membran vorsichtig mit Hilfe einer Pipette aus dem Glasgefäß in eine Schale überführt, wo sie dreimal für 10 min bei RT in Puffer 3 gewaschen wurde. Nachdem die Membran in CSPD-Puffer equilibriert wurde, konnte sie in Folie gepackt und mit 1 ml CSPD-Puffer der 10 µl CSPD enthielt benetzt werden. Es folgte ein Inkubationsschritt für 10 min bei RT (dunkel) bevor überschüssiger Puffer abgestrichen, und für 10 min bei 37 °C inkubiert wurde.

Für die Visualisierung der DNA-Banden, wurde die in Folie gepackte Membran in eine Photomappe gegeben und in der Dunkelkammer zur Exposition auf einen Röntgenfilm gelegt (fand die Exposition über Nacht statt, so wurden zwei übereinander liegende Röntgenfilme verwendet). Da die Expositionsdauer nicht vorhersehbar war, wurde der erste Film jeweils nach 1,5 Stunden entwickelt. Waren die DNA-Banden gar nicht oder nur schwach sichtbar (als Referenz dienten die Markerbanden) musste eine erneute Exposition für einen verlängerten Zeitraum stattfinden.

### **5.8.13 Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Mikroskopie wurden 200 µl der jeweiligen Zellsuspension in TSB Medium bei 3000 g sedimentiert und mit TSB gewaschen. 200 µl TSB mit 6 % Formaldehyd wurden als Fixierlösung verwendet. Im Anschluss wurden die Zellen in 50 µl SuperMount (BioGenex) resuspendiert und 10 µl dieser Lösung wurden auf ein Glasträger pipettiert, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Roti Histokitt (Carl Roth) abgedichtet.

Alle Aufnahmen erfolgten mit einem Axiovert observer microscope Z1 (Carl Zeiss, Germany) unter Verwendung einer angebrachten AxioCamHR3 bei einer Auflösung von 0.16 µm/pixel (1443520 pixels) unter Verwendung eines EC Plan Neofluar 40x/1.3 oil M27 Objektivs.

## **5.9 Allgemeine Proteinchemische Arbeitstechniken**

### **5.9.1 Heterologe Expression in *E. coli***

#### **5.9.1.1 Testexpressionen in *E. coli* BL21-Gold(DE3)**

Für die Validierung geeigneter Kultivierungsbedingungen für die heterologe Expression der einzelnen Plasmide wurden diese in chemisch kompetente BL21-Gold(DE3) transformiert, auf LB Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika kultiviert und eine 2 ml Vorkultur (LB + Antibiotika) mit einem Einzelklon angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10 ml TB Medium mit entsprechenden Antibiotika mit 200 µl Vorkultur angeimpft und bei 30 °C bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  inkubiert. Nach Erreichen der OD wurde Expression durch die Zugabe von IPTG (100 µM final) induziert. Die Expression erfolgte für 3h bei 30 °C, wobei in Abstand von 30 min Proben genommen wurden, die mittels Zentrifugation pelletiert und dann bis zur Analyse mittels SDS-Page bei -20 °C gelagert wurden.

#### **5.9.1.2 Expression in *E. coli* BL21-Gold(DE3)**

Analog zur Testexpression wurde das gewünschte Plasmid in chemisch kompetente BL21-Gold(DE3) transformiert, die Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde das entsprechende Volumen TB Medium mit Antibiotikazusatz mit der Vorkultur im Verhältniss 1:50 angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,5$  bei 28 °C und 150 rpm kultiviert. Die Inkubator Temperatur wurde auf 18°C reduziert, die Expression durch Zugabe von IPTG (100 µM final) induziert und für 20 Stunden inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 g wurden die Zellen pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **5.9.2 Proteinaufreinigung**

#### **5.9.2.1 Zellaufschluss**

Die Zellpellets wurden zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend in Lyse-Puffer resuspendiert (pro 5 ml Pellet 10 ml Puffer) und auf Eis für maximal 1 Stunde inkubiert. In Abhängigkeit des Volumens erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall-Homogenisierung (Sonoplus, Bandelin) oder durch die Anwendung eines

Mikrofluidizers. Unabhängig von der Art des Zellaufschlusses wurden die Suspensionen im Anschluss für 40 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde für nachfolgende Experimente verwendet.

### **Ultraschall-Homogenisierung**

Für den Aufschluss von Zellsuspensionen von bis zu 20 ml wurden drei Zyklen Sonifikation für 30 s bei 85 %iger Intensität auf Eis (fest gepresst) angewandt (Sonoplus, Bandelin).

### **Zellaufschluss mittels Mikrofluidizer**

Es wurden drei Durchläufe vollzogen, wobei ein Druck von 800 kPa auf die Zellen ausgeübt wurde (M-110S Microfluidics Corp.).

#### **5.9.2.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophores (SDS-Page)**

Standardmäßig wurde in der hier vorliegenden Arbeit die SDS-Page unter Verwendung von 15 %igen Gelen durchgeführt. Diese wurde in Biorad Laufkammern in 1x Laufpuffer bei konstanten 200 V für ~55 min in Anlehnung an Leammli <sup>[197]</sup> durchgeführt. Die Gele wurden in ca. 20 ml Comassie-Lösung für 30 min auf einem Schüttler angefärbt bevor sie über Nacht in ddH<sub>2</sub>O entfärbt wurden.

#### **5.9.2.3 Aufreinigung mittels Ni-NTA Agarose Beads**

Pro 50 ml Expressionskultur wurden hier 1,5 ml prä-equilibrierte Ni-NTA Agarose Beads (Quiagen) eingesetzt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten bei 4 °C unter Rotation. Zur Beladung wurde das Trägermaterial für 2 h mit dem Zelllysate inkubiert, bevor dieses für 30 min mit Hochsalz-Puffer (13 ml / 1 ml Ni-NTA) und im Anschluss über Nacht mit Wasch-Puffer (13 ml / 1 ml Ni-NTA) inkubiert wurde. Die Elution erfolgte über vier 30-minütige Inkubationsschritte mit jeweils 1,5 ml E250 Puffer. Jede Fraktion wurde mittels SDS-Page analysiert.

#### **5.9.2.4 Aufreinigung mittels Ni-NTA Säule**

Das Zelllysate einer 3,5 l Kultur wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf eine mit Wasch-Puffer äquilibrierte 5 ml-Ni-NTA Säule (HiTrap, GE Healthcare) geladen. An der FPLC (Pharmacia Biotech, GradiFrac, Pump P-50, Optical Unit UV-1, LKB-Rec 102) wurde folgende Einstellung gewählt:

- Flussrate 2 ml/min; Fraktionsgröße 5 ml

- 30 ml Hochsalz-Puffer
- 60 ml Wasch-Puffer
- Gradient von 0 bis 100 % E250 über 300 ml

Die Protein beinhaltenden Fraktionen wurden in einem SDS-Gel analysiert, die relevanten Fraktionen vereint und mittels Konzentrationsröhrchen (Amnicon Ultra 10 kDa) auf ein Volumen von 2 ml eingengt und diese für die Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

#### **5.9.2.5 Größenausschlusschromatographie**

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Superdex S75 16/60 Säule verwendet. Nach Äquilibration wurde diese mit der aufkonzentrierten Proteinlösung beladen und bei einer Flussrate von 2 ml/min und Fraktionsgrößen von 3 ml über den Zeitraum einer Stunde eluiert. Die einzelnen Signal-Fraktionen wurden mittels SDS-Page analysiert und die reines Protein enthaltenden Fraktionen vereint, aufkonzentriert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **5.10 Kompatibilität der Integrativen Vektoren**

Um die Kompatibilität der drei verschiedenen integrativen *Shuttle*-Vektoren (pKSSU38, 39 und 41) zueinander zu testen, wurde ein Expressionssystem für verschiedene fluoreszierende Proteine erstellt. Hierzu wurden die mittels PCR amplifizierten Gene, codierend für eGFP (~0,7 kb, basierend auf pEGFP-C3 Clontech, Oligonukleotide 478/479), Citrine (~0,7 kb, basierend auf pEYFP-C1 mit Mutation Q69M Clontech, 475/476), und DsRed (~0,65 kb, basierend auf pDsRed-Monomer-N1 Clontech, 481/482) unter Kontrolle des starken Promoter  $PermE^{[115]}$  (~0,4 kb, 137/478;474;480) mittels SLIC-MIX in die drei Vektoren kloniert. Alle möglichen Kombinationen an Vektoren und Inserts wurden hierzu erstellt.

Die resultierenden Expressionsplasmide wurden einzeln sowie in Kombinationen von verschiedenen Vektoren und Inserts in *S. cinnamonensis* A495, *S. coelicolor* A3(2), und *S. lividans* TK24 konjugiert. Transkonjuganten wurden auf ABB13 bzw. GYM Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin und Phosphomycin nach 24 h, mit Hygromycin nach weiteren 16 h und final mit Thiostrepton nach 46 h. Die Expression der einzelnen Proteine wurde dann mittels Fluoreszenz-Mikroskopie einzelner Flüssigkulturen nachgewiesen.

## 5.11 Protokolle zur Untersuchung der AT6-Domäne in DEBS3

### 5.11.1 pKSSU89: DEBS3 codierender Expressionsvektor

Bei dem Plasmid pKSSU89 handelt es sich um einen Actinomyceten-*E. coli* Shuttle-Vektor, der das *eryAIII* Gen unter der Kontrolle des starken Actinorhodin Promoter (*actII-orf4*)<sup>[198]</sup> trägt.

Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte mittels SLIC-MIX (siehe 5.8.11.3). Hierzu wurden im ersten Schritt das ca. 10,5 kb große *eryAIII* Gen (Oligonukleotide 136/179) aus dem *HindIII* linearisierten Plasmid pIB23 und die Promotersequenz (Oligonukleotide 177/178) aus pMU3<sup>[107]</sup> amplifiziert. Die 2 Schritt PCR wurde im PikoCycler unter Verwendung des Phusion Flash Master Mixes mit einer Elongationszeit von 25 s/kb und 25 Zyklen in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 µl durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgte ein *DpnI* Verdau, bevor die DNA mittels Ethanol-Fällung präzipitiert wurde. Als Vektorrückrad wurde pKSSU40 eingesetzt, welches durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *SwaI* linearisiert wurde. Basierend auf den einzelnen Fragmentgrößen wurden ausgehend von *eryAIII* (0,45 µg) equimolare Mengen die jeweils erste Reaktion des SLIC-MIXes in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Nach 45 min Inkubation bei 22 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von dCTP abgestoppt und jeweils 2 µl in den zweiten Reaktionsschritt eingesetzt (1 h 37 °C). 5 µl des Reaktionsansatzes wurden in ultra kompetente Ominmax Zellen (cfu/µg >10<sup>9</sup>) transformiert und die Zellsuspension auf LB-Agarplatten versetzt mit X-Gal, IPTG, Doxocyclin und Apramycin ausplattiert und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

Mit einigen der weißen Kolonien wurden je 2 ml LB Medium + Apramycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am drauf folgenden Tag wurde die Plasmid DNA mittels Alkalischer Lyse isoliert und die DNA mittels Restriktionsverdau analysiert. Mit den verbleibenden 0,5 ml der Übernachtskultur eines positiven Klones wurden weiter 100 ml angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Es folgte Isolation der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse, sowie Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Fällung bevor die DNA in 1x TAE Puffer resuspendiert wurde und bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert wurde. Zur Verifizierung wurde die *eryAIII* Genregion nach Restriktion der Plasmid-DNA mit *EcoRV* innerhalb des MPI sequenziert.

### 5.11.2 pKSSU96: $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup> eryAIII

Der Austausch der AT6 Region mit der Hygromycin Resistenz vermittelnden Gensequenz erfolgte mittels homologer Rekombination. *REDIRECT PCR-targeting technology*<sup>[108]</sup> wurde hierfür angewandt. Im ersten Schritt wurden zwei AT6 flankierende Fragmente (A: 213/184 & B: 214/64) mittels PCR ausgehend von pIB23 amplifiziert. Das  $\Omega$ hyg Gen wurde ausgehend von Plasmid pKShyg<sup>[199]</sup> (232/233) amplifiziert. Die für nachfolgende Klonierungen notwendige *Scal* Restriktionsschnittstellen wurden durch die zwei Oligonukleotide flankierend an die  $\Omega$ hyg Gensequenz eingefügt. Fragment A wurde mittels *NotI*, Fragment B mit *Sall* verdaut. Die resultierenden 150 bp (A), 100 bp(B), und  $\Omega$ hyg wurden mittels Gelextraktion gereinigt und in eine *overlap-extension* PCR mit den Oligonukleotiden 213/214 eingesetzt. Die so generierte Kasette wurde in elektrokompetente *E. coli* BW25113 (pIJ790)/pKSSU89 eingebracht und die  $\lambda$ Red Funktion durch die Zugabe von Arabinose induziert. Das resultierende rekombinante Plasmid pKSSU96 wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung (293; 294) bestätigt.

### 5.11.3 *S. erythraea* $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup>

Die  $\Delta$ AT6hyg<sup>R</sup> Variante von *S. erythraea* NRRL-B-24071 wurde durch homologe Rekombination erzeugt. Hierzu wurde die hyg<sup>R</sup> beinhaltende eryAIII Sequenz aus pKSSU96 über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *HindIII* in pKC1139<sup>[189]</sup> kloniert. Das resultierende Plasmid pKSSU129 wurde in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und in *S. erythraea* konjugiert. Transkonjuganten wurden auf ABB13 Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin, Hygromycin und Phosphomycin. Stämme in denen ein einzelner *crossover* zwischen pKSSU129 und dem Chromosom von *S. erythraea* statt gefunden hatte wurden durch die Kultivierung bei 40°C (in der Anwesenheit der zwei Antibiotika (Hyg<sup>R</sup>, Apr<sup>R</sup>) selektiert. Nach 3 Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 30 °C (erlaubt einen zweiten Cross-over) und 42 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien die den zweiten Cross-over aufwiesen (Hyg<sup>R</sup> Apr<sup>S</sup>) durch Replica-Plattierung identifiziert. Der Verlust der Fähigkeit Erythromycin zu produzieren wurde durch Analyse der Fermentationsbrühe durch biologische Testung (Hemmhof-Assay) an *B.subtilis* und durch ESI/MS Messungen bestätigt.

#### 5.11.4 Wildtyp-Wiederherstellung von *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>

Das DEBS3 codierende Plasmid pKSSU89 (erlaubt Integration mit hoher Effizienz in das Chromosom des Empfängers in die  $\Phi$ C31 Position) wurde in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und dann in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden bei 30 °C auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin und Phosphomycin. 60 Transkonjuganten wurden dann in Lochplatten (5.6.4.1) fermentiert und ihr Erythromycin-Produktionsniveau mit dem *S. erythraea* Wildtyp verglichen.

#### 5.11.5 Mutagenese der AT6-Domäne

##### **eryAIII\* - Einzelaminosäureaustausche zur Identifizierung von Sequenz-Funktionsbeziehungen innerhalb der AT6-Domäne**

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden Einzelaminosäureaustausche innerhalb der AT6-Domäne von DEBS3 durchgeführt. Ausgetauscht wurden die Aminosäuren Pro94, Gly95, Glu154, Pro157, Ser174, Val193, Ile194, Gln198, Asn262, Ser263, Tyr297, Ser299, Arg336 und Asp337.

Die PCR wurde in 96-well Platten im 10  $\mu$ l Ansatz im Eppendorf Cycler durchgeführt. Für die Amplifikation der Fragmente M1 wurde die spezifische Oligonukleotid fwd. (tragen Mutation in der Sequenz, Tabelle 33) mit dem Oligonukleotid 207 und für die Fragmente M2 die spezifische Oligonukleotide rev. (Tabelle 33) mit dem Oligonukleotid 206, ausgehend von pKSSU89 als Templat, eingesetzt. Es folgte eine Temperaturprofil der PCR bei der das Annealing während der ersten 5 Cycles bei 60 °C und in den folgenden 25 Zyklen bei 72 °C stattfand; Elongation erfolgte jeweils für 30 s.

1,5  $\mu$ l PCR Produkt wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und zur Kontrolle einer Gelelektrophorese unterzogen. Die verbleibenden 8,5  $\mu$ l wurden *DpnI* verdaut und mittels SureClean aufgereinigt. Die präzipitierte DNA wurde in 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 2  $\mu$ l in die nachfolgende PCR (50  $\mu$ l Ansatz) eingesetzt in der die jeweils 2 überlappenden Fragmente unter Verwendung der Oligonukleotide 206 und 207 fusioniert wurden (25 2-Schritt PCR Cycles mit einer Elongationszeit von 40 s).

Die finalen PCR Produkte wurden gelgereinigt und mittels SLIC-MIX in den durch Scal linerisierten Vektor pKSSU96 kloniert. Potentiell richtige Klone wurden mittels

Kolonie PCR identifiziert (Oligonukleotide 184/213), über Nacht in LB-Medium mit Apramycin bei 37 °C und 150 rpm kultiviert und die Plasmid DNA isoliert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

#### **eryAIII\* - Doppelmutation im YASH-Fingerabdruckmotiv**

Analog zu den obigen Einzelmutanten wurden Tyr297 und Ser299 im YASH Motiv auch gemeinsam zu Tyr297His und Ser299Phe ausgetauscht. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden Aminosäureaustausche innerhalb der AT6-Domäne von DEBS3 durchgeführt.

Die PCR wurde im 10 µl Ansatz im Eppendorf Cyclyer durchgeführt. Für die Amplifikation des Fragmentes M1 wurde der spezifische Oligonukleotid fwd. (631) mit dem Oligonukleotid 207 und für das Fragment M2 der spezifische Oligonukleotid rev. (632) mit dem Oligonukleotid 206 ausgehend von pKSSU89 als Templat, eingesetzt. Es folgte ein Temperaturprofil der PCR bei der das Annealing während der ersten 5 Cychlen bei 60 °C und in den folgenden 25 Zychlen bei 72 °C stattfand; Elongation erfolgte jeweils für 30 s.

1,5 µl PCR Produkt wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und zur Kontrolle einer Gelelektrophorese unterzogen. Die verbleibenden 8,5 µl wurden *DpnI* verdaut und mittels SureClean aufgereinigt. Die präzipitierte DNA wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 2 µl in die nachfolgende PCR (50 µl Ansatz) eingesetzt in der die jeweils 2 überlappenden Fragmente unter Verwendung der Oligonukleotide 206 und 207 fusioniert wurden (25 2-Schritt PCR Cychlen mit einer Elongationszeit von 40 s).

Das finale PCR Produkt wurden gelgereinigt und mittels SLIC-MIX in den durch *Scal* linerisierten Vektor pKSSU96 kloniert. Potentiell richtige Klone wurden mittels Kolonie PCR identifiziert (Oligonukleotide 184/213), über Nacht in LB-Medium mit Apramycin bei 37 °C und 150 rpm kultiviert und die Plasmid DNA isoliert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

#### **eryAIII\* - Einzelaminosäureaustausch Val295**

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden Einzelaminosäureaustausche innerhalb der AT6-Domäne von DEBS3 durchgeführt. Ausgetauscht wurde die Aminosäure Val295 gegen Leu, Ala, Gly, Glu und Met.



Für die Amplifikation der Fragmente M1 wurde die spezifischen Oligonukleotid fwd. (tragen Mutation in der Sequenz, Tabelle 35) mit dem Oligonukleotid 207 und für die Fragmente M2 die spezifische Oligonukleotide rev. (Tabelle 35) mit dem Oligonukleotid 206, ausgehend von pKSSU89 als Templat, eingesetzt. Es folgte eine Temperaturprofil der PCR bei der das Annealing während der ersten 5 Cycles bei 60 °C und in den folgenden 25 Zyklen bei 72 °C stattfand; Elongation erfolgte jeweils für 30 s.

1,5 µl PCR Produkt wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und zur Kontrolle einer Gelelektrophorese unterzogen. Die verbleibenden 8,5 µl wurden *DpnI* verdaut und mittels SureClean aufgereinigt. Die präzipitierte DNA wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 2 µl in die nachfolgende PCR (50 µl Ansatz) eingesetzt in der die jeweils 2 überlappenden Fragmente unter Verwendung der Oligonukleotide 206 und 207 fusioniert wurden (25 2-Schritt PCR Cycles mit einer Elongationszeit von 40 s).

Die finalen PCR Produkte wurden gelgereinigt und mittels SLIC-MIX in den durch *Scal* linearisierten Vektor pKSSU96 kloniert. Potentiell richtige Klone wurden mittels Kolonie PCR identifiziert (Oligonukleotide 184/213), über Nacht in LB-Medium mit Apramycin bei 37 °C und 150 rpm kultiviert und die Plasmid DNA isoliert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

### ***S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> AT6\***

Die DEBS3 codierenden Plasmide, die einen Aminosäureaustausch innerhalb der AT6-Domäne aufweisen wurden in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin und Phosphomycin.

Stichprobenartig wurde genomische DNA der resultierenden Transkonjuganten isoliert und die eingefügte Mutation mittels Sequenzierung (StarSeq) bestätigt.

## **5.11.6 Komplementierung von *S. erythraea* AT6-Nullmutanten mittels MAT**

### **5.11.6.1 pKSSU665: MAT (*S. coelicolor*) codierender Shuttle-Vektor**

Bei dem Plasmid pKSSU665 handelt es sich um einen *E. coli*-Actinomyceten Shuttle-Vektor, der das *mat* Gen unter der Kontrolle des starken Actinorhodin Promoters (*actII-orf4*)<sup>[198]</sup> trägt.

Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte mittels SLIC-MIX (siehe 5.8.11.3). Gen- und Promotersequenz wurden ausgehend von pKSSU623 (Oligonukleotide 177/818, ~ 2,5 kb) mittels PCR amplifiziert und mittels SLIC-MIX in den mittels *Swal* linearisierten *Shuttle*-Vektor pKSSU39 kloniert. Blau/weiß Screening (LB-Agar + Cbn + IPTG + X-Gal) ermöglichte eine Vorauswahl; 6 weiße Klone wurden von der Platte abgestrichen und über Nacht in 2 ml Medium bei 37°C und 150 rpm kultiviert. Es folgte Plasmid-Isolation und Verifizierung dieser mittels Restriktionsanalyse.

#### **5.11.6.2 *S. erythraea*ΔAT6hygR\_AT6Glu154Trp\_pKSSU665**

Die zwei *E. coli*-Actinomyceten *Shuttle*-Vektoren pKSSU477 und pKSSU665 wurden separat in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und dann simultan in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY-Agar, überschichte Apramycin, Thiostrepton und Phosphomycin, selektiert. Einzelne Transkonjuganten wurden im Anschluss fermentiert.

#### **5.11.6.3 *S. erythraea*ΔAT6hygR\_pKSSU168\_pKSSU665**

Die zwei *E. coli*-Actinomyceten *Shuttle*-Vektoren, pKSSU168 und pKSSU665, wurden separat in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und dann simultan in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY-Agar, überschichte Apramycin, Thiostrepton und Phosphomycin, selektiert. Einzelne Transkonjuganten wurden im Anschluss fermentiert.

### **5.12 Protokolle zur Generierung einer Hybrid-PKS**

Zur Generierung einer Hybrid PKS sollte die AT6-Domäne aus dem Erythromycin Cluster (Methylmalonyl-CoA-spezifisch) gegen die AT5-Domäne aus dem Niddaymcin Cluster (akzeptiert sowohl Methylmalonyl-CoA als auch Ethylmalonyl-CoA) ausgetauscht werden. Hierzu wurden mittels SLIC-MIX vier Actinomyceten-*E. coli Shuttle*-Vektoren (pKSSU438, 439, 442 und 444) basierend auf pKSSU96 konstruiert, die eine *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> Mutante komplementieren sollten.

### 5.12.1 Austausch der AT6-Domäne gegen Nid AT5

#### pKSSU438 & pKSSU439

In der Literatur findet man drei Sequenzen für die AT5-Domäne des Niddamycin Clusters (Modul 3) aus *Streptomyces caelestis* (NRRL-2821), die sich in ihrer Länge um bis zu 2 Aminosäuren unterscheiden: Nt. 25293-26318 (Gene-Bank AAC46025.1) (I.), Nt. 25293-26312<sup>[75]</sup> (II.) sowie Nt. 25293-26315<sup>[200]</sup>. Als Grundlage für diesen Domänenaustausch wurde das Plasmid pKSSU96 (s. 5.11.2) gewählt; ein DEBS3 codierender *E. coli*-Actinomyceten *Shuttle*-Vektor in dem die AT6 sowie flankierende Bereiche gegen eine hyg Resistenzkassette ausgetauscht wurden.

Um die AT6-flankierenden Bereiche aus DEBS3 wieder einzufügen, wurden Megaprimer generiert mit denen die ~ 0,9 kb große Nid AT5-Domäne ausgehend von genomischer DNA aus *Streptomyces caelestis* mittels PCR amplifiziert wurde. (Megaprimer fwd: 206/514 ~0,6 kb; Megaprimer rev: I. 207/512 sowie II. 207/516 und III. 207/537 jeweils ~ 0,1 kb, pKSSU89 als Template, gelgereinig). Die zwei amplifizierten, gelgereinigten PCR-Produkte wurden mittels SLIC-MIX in den mit *Scal* linearisierten Vektor pKSSU96 kloniert, in Omnimax Zellen transformiert (LB + Apramycin) und potentiell positive Klone mittels Kolonie-PCR identifiziert (195/207). Die Plasmid-DNA der resultierenden *Shuttle*-Vektoren: pKSSU438 (basierend auf der Nid AT5 Nukleotidsequenz I), pKSSU439 (basierend auf der Nid AT5 Nukleotidsequenz II) sowie pKSSU442 (basierend auf der Nid AT5 Nukleotidsequenz III) wurde mittels alkalischer Lyse isoliert und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung (Oligonukleotide 213 & 214 innerhalb des MPI) verifiziert.

#### 5.12.2 *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup>\_Nid AT5

Die Nid AT5-codierenden Plasmide, wurden separat in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin und Phosphomycin.

#### 5.12.3 pKSSU441: Ccr codierender Expressionsvektor

Bei dem Plasmid pKSSU441 handelt es sich um einen Actinomyceten-*E. coli Shuttle*-Vektor, der für die Crotonylreduktase-Carboxylase (Ccr) unter der Kontrolle des starken Actinorhodin Promoter (*actII-orf4*)<sup>[198]</sup> codiert. Die Klonierung dieses Konstruktes erfolgte mittels SLIC-MIX (siehe 5.8.11.3). Hierzu wurden im ersten

Schritt das ~ 1,3 kb große *ccr* Sequenz (532/533) aus genomischer DNA (*Streptomyces anulatus*; DSM40128) und die Promotersequenz (Oligonukleotide 177/178) aus pMU3<sup>[107]</sup> amplifiziert. Die 3- Schritt PCR wurde im PikoCycler unter Verwendung des Phusion Flash Master Mixes mit einer Elongationszeit von 25 s/kb und 25 Zyklen in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 µl durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgte ein *DpnI* Verdau, bevor die DNA mittels Ethanol-Fällung präzipitiert wurde. Als Vektorrückrad wurde pKSSU39 eingesetzt, welches durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *SwaI* linearisiert wurde. Ausgehend von *ccr* (0,5 µg) wurden equimolare Mengen in die jeweils erste Reaktion des SLIC-MIXes in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Nach 45 min Inkubation bei 22 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von dCTP abgestoppt und jeweils 2 µl in den zweiten Reaktionsschritt eingesetzt (1 h 37 °C). 5 µl des Reaktionsansatzes wurden in ultra-kompetente Ominmax Zellen (cfu/µg >10<sup>9</sup>) transformiert und die Zellsuspension auf LB-Agarplatten versetzt mit X-Gal, IPTG, Doxocyclin und Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Mit einigen der weißen Kolonien wurden je 2 ml LB Medium + Apramycin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am drauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse isoliert und die DNA mittels Restriktionsverdau analysiert. Zur Verifizierung wurde die *Ccr* Genregion innerhalb des MPI sequenziert.

#### **5.12.4 S. erythraeaΔAT6hyg<sup>R</sup>\_Nid AT5\_Ccr**

Da das Substrat für die heterolog exprimierte AT möglicherweise limitierend ist, sollte eine Crotonylreductase (ein Enzym des Primärstoffwechsels, welches in die Butyryl-CoA Produktion in Streptomyceten involviert ist)<sup>[75]</sup> simultan mit der AT5-Domäne exprimiert werden.

Hierzu wurden die DEBS3ΔAT6 Nid AT5-codierenden Plasmide sowie pKSSU441 separat in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert. Im nächsten Schritt wurden dann das Crotonylreductase-codierende Plasmid sowie eins der drei Nid AT5-codierend Plasmide simultan in *S. erythraea*ΔAT6hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin, Thiostrepton und Phosphomycin.

## 5.13 Protokolle zur Untersuchung der *trans*-agierenden MAT

### 5.13.1 Gernerierung benötigter Konstrukte

#### 5.13.1.1 pKSSU467: Dualer Expressionsvektor ACP6 & Sfp basierend auf pETDuet-1

Die Konstruktion des Hexahistidin-markierten *acp6* (aus dem DEBS cluster, NC\_009142) und *sfp* (*Bacillus subtilis*, YP\_004206313.1) beinhaltenden, dualen Expressionsplasmides erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde *acp6* (~250 bp, Oligonukleotide 612/615) ausgehend von synthetischer codonoptimierter DNA) amplifiziert und in die erste MCS (mit *BamHI/NotI* geschnitten) des Expressionsvektors pETDuet1 mittels *in vivo cloning* eingebracht. Transformierte Omnimax Zellen wurden auf LB-Agar Platten mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mittels Kolonie-PCR (612/582) konnten potentiell richtige Klone identifiziert werden, die dann in LB Medium + Amp inkubiert wurden. Nachfolgend wurde die Plasmid DNA (pKSSU451) mittels alkalischer Lyse isoliert, mittels Restriktionsverdau verifiziert und nachfolgend sequenziert (innerhalb des MPI; Oligonukleotide585).

Im zweiten Schritt wurde pKSSU451 mittels *NdeI/Xho* geschnitten, gelgereinigt und *sfp* (~0,7 kb, 616/591 ausgehend von synthetischer codonoptimierter DNA) in die 2. MCS mittels *in vivo cloning* eingebracht. Transformation erfolgte in Omnimax Zellen, die dann auf LB Agar + Amp über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Potentiell richtige Klone wurden mittels Kolonie PCR identifiziert (584/591) und Plasmid DNA aus deren Übernachtkulturen isoliert. Nachfolgende Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung wurde zur Verifizierung eingesetzt.

Die Expression der zwei Proteine erfolgte analog zu Abschnitt 5.9.1.2 in *E. coli* BL21(DE)Gold. Die Aufreinigung des holo ACP erfolgte mittels Ni-NTA Agarose bevor dieses für die Aktivitätsbestimmung der MAT eingesetzt wurde.

#### 5.13.1.2 pKSSU453: Expressionsvektor für die MAT aus *T. fusca* basierend auf pETM11

Für die Konstruktion des Expressionsvektors pKSSU453, der die codonoptimierte *mat* Sequenz (Gene ID: 3581304) aus *T. fusca* (~1 kb 588/589 ausgehend von synthetischer DNA) sowie Hexahistidin-Linker beinhaltend, wurde die *mat* mittels *in vivo cloning* in die MCS (*NcoI/HindIII*) des gelgereinigten, linearisierten Expressionsvektor pETM11 kloniert. Durch Kolonie PCR (Oligonukleotide 612/625)

konnten potentiell richtige Transformanten (Omnimax, LB-Agar + Kanamycin) identifiziert werden, die dann über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in 2 ml LB Medium + Kanamycin hochgezogen wurden. Es folgte Isolation der Plasmid DNA, sowie Restriktionsanalyse und Sequenzierung (621; innerhalb des MPI) dieser.

Die Expression der zwei Proteine erfolgte analog zu Abschnitt 5.9.1.2 in *E. coli* BL21(DE)Gold. Die Aufreinigung der MAT aus *T. fusca* erfolgte mittels Ni-NTA Säule und Gelfiltration bevor dieses für weitere Charakterisierungen eingesetzt wurde.

#### **5.13.1.3 pKSSU475 & pKSSU399: Expressionsvektoren für die MAT aus *S. coelicolor* basierend auf pETM11**

Die Expressionsvektoren pKSSU475 und pKSSU399 beinhalten jeweils die Sequenz der MAT aus *S. coelicolor* (586/587 codonoptimiert; 711/713 codonangepasst an die mat aus *T. fusca*), die mittels *in vivo cloning* in die MCS (*NcoI/HindIII*) des gelgereinigten, linearisierten pETM11 kloniert wurden. Potentiell positive Transformanten (Omnimax, LB-Agar + Kanamycin) wurden mittels Kolonie PCR identifiziert und diese dann genutzt um Übernachtskulturen (2ml LB Medium + Kanamycin) anzuimpfen. Die Plasmid DNA wurde mittels alkalischer Lyse isoliert, es folgten Restriktionsanalyse und Sequenzierung (621) zur Verifizierung der Konstrukte.

Die Expression der zwei Proteine erfolgte analog zu Abschnitt 5.9.1.2 in *E. coli* BL21(DE)Gold. Die Aufreinigung der codonoptimierten MAT erfolgte mittels Ni-NTA Säule und Gelfiltration bevor dieses für weitere Charakterisierungen eingesetzt wurde. Im Gegensatz hierzu wurde die codonangepasste MAT mittels Ni-NTA Agarose aufgereinigt.

#### **5.13.1.4 MAT codierende Shuttle-Vektoren basierend auf pKSSU40**

Die MAT codierenden *Shuttle*-Vektoren unter Kontrolle von *PactIII*, pKSSU473, pKSSU474 sowie pKSSU623, wurden mittels SLIC-MIX konstruiert. Hierzu wurde der Vektor pKSSU40 durch *SwaI* linearisiert und im Anschluss mittels Ethanol-Fällung präzipitiert. Der in ddH<sub>2</sub>O resuspendierte, linearisierte Vektor wurde nachfolgend mit den vorbereiteten PCR Produkten (codierend für die MAT und den Promoter) in den Klonierungsschritt eingesetzt.

**pKSSU474: MAT aus *T. fusca* (codonoptimiert für *E. coli*)**

Die mittels PCR amplifizierte Gensequenz codierend für die MAT (~1 kb; 631/632) und den Promoter P<sub>actIII</sub> (~0,7 kb; 177/630) wurden nach *DpnI* Verdau, in equimolaren Mengen in den Klonierungsschritt eingesetzt. Das Produkt wurde in Omnimax Zellen transformiert, auf LB Platten mit Apramycin, IPTG & X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit sechs der weißen Klonen angeimpft und die Plasmid DNA (pKSSU474) nach Isolation mittels alkalischer Lyse durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

**pKSSU473: MAT aus *S. coelicolor* (codonoptimiert für *E. coli*)**

Die mittels PCR amplifizierte Gensequenz codierend für die MAT (~1 kb; 628/629) und den Promoter P<sub>actIII</sub> (~0,7 kb; 177/627) wurden nach *DpnI* Verdau, in equimolaren Mengen in den Klonierungsschritt eingesetzt. Das Produkt wurde in Omnimax Zellen transformiert, auf LB Platten mit Apramycin, IPTG & X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit sechs der weißen Klonen angeimpft und die Plasmid DNA (pKSSU473) nach Isolation mittels alkalischer Lyse durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

**pKSSU623: MAT aus *S. coelicolor***

Die mittels PCR amplifizierte Gensequenz codierend für die MAT (814/815) und den Promoter P<sub>actIII</sub> (177/816) wurden nach *DpnI* Verdau, in equimolaren Mengen in den Klonierungsschritt eingesetzt. Das Produkt wurde in Omnimax Zellen transformiert, auf LB Platten mit Apramycin, IPTG & X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden mit einigen der weißen Klonen angeimpft und die Plasmid DNA (pKSSU623) nach Isolation mittels alkalischer Lyse durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

**5.13.2 Charakterisierung der MAT****5.13.2.1 CD-Messungen****CD-basierte Schmelzpunktbestimmung**

Um Aufschluss über die Thermostabilität der Proteine zu bekommen, wurde der jeweilige Schmelzpunkt CD-spektroskopisch ermittelt. Hierzu wurde ein Aliquot der Proteinpräparation aufgetaut und mittels Zentrifugenultrafiltration ein Pufferaustausch

durchgeführt; in entgasten, eiskalten Puffer CD1. Die Messung wurde an einem CD-Spektrometer vom Typ Jasco J-815 mit der Messeinstellungen „Variable Temperatur“ bei 222 nm ein Temperaturgradient von 25 bis 95 °C, wobei die Temperatur pro Minute um ein Grad Celsius erhöht wurde. Hier wurde eine 0,2 cm Messküvette verwendet, als Referenz diente der eingesetzte Puffer.

Die Umrechnung in molare Elliptizität  $\theta$  erfolgte nach Formel 1:

$$\theta = \frac{(\text{mg deg Protein} - \text{mg deg Puffer}) * 100}{\text{Anzahl Aminosäuren} * 0,2 (\text{Küvettendicke}) * 21,8 * 0,001 (\text{Konz. in mM})}$$

### **Aufnahme eines CD-Spektrums**

Um Aufschluss über die Zusammensetzung Sekundärstrukturteile des Proteins zu erlangen, wurde ein CD-Spektrum mit der Messeinstellung „Spektrum Messung“ von 190 bis 260 nm aufgenommen. Analog zur Schmelzpunktbestimmung erfolgte dieses nach Pufferwechsel, hier jedoch in entgasten, eiskalten Puffer CD2. Das Spektrum wurde drei Mal aufgenommen und die Werte gemittelt bevor die molare Elliptizität berechnet wurde.

#### **5.13.2.2 Aktivitätsbestimmung mittels Übertrag von Malonyl-[<sup>14</sup>C] Coenzym A**

Die Fähigkeit der MAT, Malonyl-CoA auf ein holo-ACP übertragen zu können, wurde mittels radiokativ markiertem Substrat nachgewiesen. Hierzu wurde Malonyl-[<sup>14</sup>C] Coenzym A (American Radiolabeled Chemicals) mit einer spezifischen Aktivität von 50-60 mCi/mmol und einer Konzentration von 0,1 mCi/ml eingesetzt. Die Reaktion wurde analog zu Tabelle 58 in einem Gesamtvolumen von 8  $\mu$ l angesetzt, bei der Negativkontrolle wurde anstelle von MAT-Proteinlösung ddH<sub>2</sub>O verwendet, und für 30 min auf Eis inkubiert.

**Tabelle 58: Ansatz zur Aktivitätsbestimmung der MAT mittels Malonyl-[<sup>14</sup>C] Coenzym A**

Lösung	Finale Konzentration
MAT	8 $\mu$ M
ACP	40 $\mu$ M
Malonyl-[ <sup>14</sup> C] Coenzym A	100 $\mu$ M



Im Anschluss wurden die Proben mit 8 µl 2x Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 70 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und die gesamte Menge in ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen und für 40 min 200 V ausgesetzt. Der Protein Molecular Weight Marker [methyl-<sup>14</sup>C] von Perkin Elmer diente als Referenz. Anschließend wurde das Gel mit dem Gel Dryer 583 von Biorad mit angeschlossener Vakuumpumpe für 1 h getrocknet, bevor ein radioaktiv-sensibler Fotofilm (Imaging Plate BAS-MS; Fujifilm) über Nacht mit dem Gel in einer Fotomappe inkubiert und am darauf folgenden Tag mittels Fotoimager FLA-500 (Fujifilm) entwickelt wurde.

### 5.13.3 Mutagenese der MAT

#### 5.13.3.1 Error Prone PCR

Für die *Error Prone* PCR wurde das *Error Prone* Kit der Firma Jena Bioscience nach Herstellerangaben verwendet. Die Template DNA wurde in Bereichen von 10 pg bis 10 µg pro PCR Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit *PciI* und *HindIII* geschnitten und durch Ligation in den mittels *NcoI* und *HindIII* linearisierten Expressionsvektor pETM11 kloniert.

#### 5.13.3.2 Random Priming

Das *Random Priming* wurde in Anlehnung an die Protokolle von Arnold *et. al.*<sup>[151]</sup> und Zhao *et. al.*<sup>[201]</sup> zur Rekombination sequenzhomologer Gene eingesetzt. Bei dieser Methode wird die Template-DNA zunächst mit unspezifisch bindenden Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend wieder reassembliert.

Im ersten Schritt wurden 0,7 pmol der jeweiligen DNA (*mat*) mit verschiedenen Konzentrationen dp(N)<sub>6</sub> randomisierter Oligonukleotide (0,01 pmol bis 7 nmol) in einem Volumen von 65 µl für 6 min bei 100 °C denaturiert und im Anschluss direkt auf Eis gelagert. Dann wurden 10 µl 10x Reaktionspuffer, 10 µl dNTP-Mix (jeweils 5 mM), 14 µl ddH<sub>2</sub>O und 1 µl vom Klenow Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I hinzu pipettiert und der Ansatz für 3-5 h bei 22 °C inkubiert. Mittels Gelelektrophorese wurde anhand eines Aliquots die Bildung von niedermolekularem Schmier nachgewiesen. Nach Zugabe von 100 µl eiskaltem ddH<sub>2</sub>O wurden die randomisierten Produkte mittels Microcon-100 Zentrifugationsfilter (10 min, 2500 g) von Templat-DNA, Proteinen und großen DNA Fragmenten abgetrennt. Der Durchfluss wurde im folgenden Schritt durch Zentrifugation mittels Microcon-3 Filter (30 min 10000 g) weiter aufgereinigt und für die Reassemblierungsreaktion (vgl.

Tabelle 59) eingesetzt. In diesem Schritt wurden die Oligonukleotide, kurze DNA <30 bp Fragmente sowie von nichteingebauten dNTP's als Filtrat abgetrennt.

**Tabelle 59: Reaktionsansatz Reassemblierungsreaktion; *Random Priming***

Lösung	Mengenangabe
Gereinigte DNA Fragmente	10 µl
10x <i>Pfu</i> Polymerase Puffer	5 µl
dNTP-Mix; jeweils	2 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl

**Tabelle 60: Temperaturprofil für die Reassemblierungsreaktion; *Random Priming***

Temp.	96 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	3 min	30 s	60 s	1 min + 5 s/cycle	7 min	∞
Zyklen	1	50			1	

Die Reassemblierungsreaktion wurde anhand eines 5 µl Aliquots mittels Gelelektrophorese überprüft („Schmier“ in Bereich der zu erwartenden Produktgröße) bevor folgender PCR Ansatz pipettiert wurde (vgl. Tabelle 61):

**Tabelle 61: Reaktionsansatz für die Produkt-Amplifikation (*Random-Priming*)**

Lösung	Mengenangabe
5x Phusion Flash MM	20 µl
Produkt der Reassemblierung	0,5 µl
Oligonukleotide (jeweils 10µM) je	4 µl
Betain (5M)	8 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 40 µl

Als Oligonukleotide kamen hier sowohl die spezifischen Paare als auch Mischungen zum Einsatz, diese sollten zu mindest einen *Cross-over* garantieren.

**Tabelle 62: Temperaturprofil Amplifikation (*Random-Priming*)**

Temp.	99 °C	99 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	3 min	15 s	1 s	40 s	60 s	∞
Zyklen	1	25			1	

Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit *PciI* und *HindIII* geschnitten, gelgereinigt und durch Ligation in den mittels *NcoI* und *HindIII* linearisierten Expressionsvektor pETM11 kloniert.

### 5.13.3.3 DNA Shuffling

Das DNA *Shuffling* ist eine Methode für die *in vitro* rekombination von homologen Genen, die 1994 von W. Stemmer eingeführt wurde.<sup>[149]</sup> Hierzu werden Gene mittels *Dna*sel randomisiert fragmentiert und die Fragmente der gewünschten Größe gelgereinigt und mittels PCR wieder reassembliert. Rekombination findet statt, wenn Fragmente unterschiedlicher Herkunft in Regionen hoher Sequenzhomologie assemblieren. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Rekombination der *mat* wurde basierend auf der Methode nach J. Joern<sup>[150]</sup> durchgeführt. Die *Codon Usage* der *mat* aus *S. coelicolor* wurde manuell an die der *mat* aus *T. fusca* angepasst, wodurch die Sequenzhomologie auf ~ 70% gesteigert werden konnte.

Im ersten Schritt wurden die gewünschten Gene mittels PCR amplifiziert, wobei Oligonukleotide eingesetzt wurden, die das Gen mit flankierenden Bereichen von jeweils ~100bp amplifizieren (Oligonukleotide 612/625). Die mittels Sure Clean gereinigten PCR-Produkte wurden in equimolaren Mengen mit einer Konzentration von 100 ng/µl in einem totalen Volumen von 70 µl für den partiellen Abbau mittels *DNA*sel bei 15 °C eingesetzt. Die *DNA*sel Stammlösung (10 U/µl) wurde 1:200 verdünnt, 0,4 µl hiervon mit 29,6 µl *DNA*se-Puffer (15°C) versetzt, diese 30 µl zu der DNA-Lösung pipettiert und für ein zu bestimmendes Zeitintervall inkubiert (1-10 min); bis gewünschte Fragmentgrößen erreicht sind. Die Reaktion wird durch die Überführung in ein, auf Eis gekühltes, und 6 µl EDTA (0,5 M pH= 8) beinhaltendes Reaktionsgefäß gestoppt. Die DNA Fragmente wurden in Anschluss mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Größenbereiche aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarosestückchen wurden mehrfach eingefroren und aufgetaut, bevor sie durch eine Spritze gedrückt und so weiter zerkleinert wurden. Die Gelmasse wurde für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA mittels Kit aus dem Gel eluiert. Die sich nach der Zentrifugation im Überstand befindene DNA wurde mittels Ethanol-Fällung präzipitiert, in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und wie die mittels Kit eluierte DNA über G25 Säulen (GE healthcare) weiter aufgereinigt. Hierzu wurde die Säule laut Herstellerangaben vorbereitet, mit maximal 100 µl Probenlösung beladen und die DNA durch Zentrifugation (2 min

735xg) eluiert. Die so gereinigte DNA konnte dann im nächsten Schritt für die Reassemblierungsreaktion (Tabelle 63, Tabelle 64) eingesetzt werden.

**Tabelle 63: Reaktionsansatz Reassemblierungsreaktion; *DNA Shuffling***

Lösung	Mengenangabe
Gereinigte DNA Fragmente	42 µl
10x <i>Pfu</i> Polymerase Puffer	5 µl
dNTP-Mix; jeweils	2 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	1 µl

**Tabelle 64: Temperaturprofil Reassemblierungsreaktion; *DNA Shuffling***

Temp.	96 °C	94 °C	65 °C	62 °C	59 °C	56 °C	53 °C	50 °C	47 °C	44 °C	41 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	90 s	3 0s	90 s	90 s	90 s	90 s	90 s	90 s	90 s	90 s	90 s	4 min	7 min	∞
Zyklen	1	35											1	

Im Anschluss an die Reassemblierung wurde die Gesamtsequenz (~1 kb) unter Verwendung von paarigen (705/706; 712/713) als auch gemischten Oligonukleotiden (705/712; 706/713), die zu mindest einen Cross-over garantieren sollten, amplifiziert. Eingesetzt wurden jeweils 1 µl unterschiedlicher Verdünnungen der assemblierten DNA Fragmente (pur; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:50, 1:75 und 1:100; vgl. Tabelle 65).

**Tabelle 65: Reaktionsansatz für die PCR; *DNA Shuffling***

Lösung	Mengenangabe
Assemblierte DNA Fragmente	1 µl
10x <i>Pfu</i> Polymerase Puffer	10 µl
dNTP-Mix; jeweils	2 µl
DMSO	3 µl
Oligonukleotid fwd	5 µl
Oligonukleotid rev	5 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 100 µl

Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil im Eppendorf-Cycler durchgeführt:

Tabelle 66: Temperaturprofil für die PCR; *DNA Shuffling*

Temp.	96 °C	94 °C	66 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Dauer	3 min	30 s	20 s	2:30 min	3 min	∞
Zyklen	1	25			1	

Nach Überprüfung der resultierenden PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wurden diese mit *PciI* und *HindIII* geschnitten, Gelgereinigt und durch Ligation in den mittels *NcoI* und *HindIII* linearisierten Expressionsvektor pETM11 kloniert und in XL10 Gold transformiert. (Die Plasmid DNA einzelner Klone wurde stichprobenartig sequenziert.)

#### 5.13.3.4 Zielgerichtete Mutagenese – Semi-rational

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden Aminosäureaustausche innerhalb der MAT aus *T. fusca* von den Aminosäuren Gly8-Val13, Gly8-Val13 ohne Gln9 Thr56/Gln60/Val64, Gly90-Glu95 ohne Ser92, Met121/Ser125, Asn156/Asn158/Val194, Arg186-Ala189, Val190-Phe194 und Gln244-Ser247 durchgeführt. Diese Austausche resultierten in neun Bibliotheken. Die PCR wurde im Pikocycler durchgeführt: für die Amplifikation der Fragmente M1 wurde die spezifischen Oligonukleotide fwd (NNK in der Sequenz, Tabelle 33) mit dem Oligonukleotid 706 und für die Amplifikation der Fragmente M2 die spezifischen Oligonukleotid rev. (Tabelle 33) mit dem Oligonukleotid 705, ausgehend von pKSSU435 als Templat, eingesetzt. Es folgte ein Temperaturprofil der PCR bei dem das Annealing während der ersten 5 Zyklen bei 60 °C und in den folgenden 25 Zyklen bei 72 °C stattfand.

1,5 µl PCR Produkt wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und zur Kontrolle einer Gelelektrophorese unterzogen. Die verbleibenden 8,5 µl wurden *DpnI* verdaut und mittels SureClean aufgereinigt. Die präzipitierte DNA wurde in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils 2 µl in die nachfolgende PCR (50 µl Ansatz) eingesetzt in der die jeweils 2 überlappenden Fragmente unter Verwendung der Oligonukleotide 705 und 706 fusioniert wurden (2-Schritt PCR 25 Cyclen mit einer Elongationszeit von 40 s).

Die finalen PCR Produkte wurden *PciI/HindIII* verdaut, Gelgereinigt und mittels Ligation in den durch *NcoI* und *HindIII* linearisierten Vektor pETM11 kloniert und in XL10 Gold transformiert. Die Plasmid DNA einzelner Klone wurde stichprobenartig sequenziert.

## 5.14 Mutasynthese zur Erzeugung von Polyketid-Derivaten

### 5.14.1 Untersuchungen der Substratflexibilität der Ascomycin- und Rapamycin-Biosynthesemaschinerie

Die Geninaktivierung wurde mittels homologer Rekombination durchgeführt, hierzu wurde ein Teil der Gensequenz *in frame* deletiert.

#### 5.14.1.1 pKSSU437 – Suizid-*Shuttle*-Vektor codierend für $\Delta rapK$

Ausgehend von genomischer DNA (NRRL 5491) wurden mittels PCR zwei Fragmente amplifiziert (A: 323/508 & B: 324/507) die dann nach Aufreinigung in einer zweiten PCR assemblierten (323/324). Das resultierende PCR Produkt weist Teile der *rapK* Gensequenz aus *Streptomyces hygroscopicus* sowie flankierende Bereiche dieser auf, wobei ca. 250 Basenpaare der Gensequenz mittig *in frame* deletiert wurden. Das PCR Produkt wurde mit *Bgl*II geschnitten und mittels Ligation in den linearisierten, gelgereinigten Suizid-Vektor pKC1139 (*EcoRV/Bam*HI) kloniert. Potentiell positive Kolonien wurden nach erfolgreicher Transformation und Selektion auf LB-Agar + Apramycin (30 °C o/n) mittels Kolonie-PCR identifiziert bevor diese zum Animpfen von 2 ml Übernachtskulturen eingesetzt wurden. Es folgte Isolierung der Plasmid-DNA und deren Verifizierung mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung.

#### 5.14.1.2 pKSSU436 – Suizid-*Shuttle*-Vektor codierend für $\Delta fkbK$

Analog zu der Konstruktion von pKSSU437 wurden in einem ersten Schritt mittels PCR zwei Fragmente amplifiziert (A: 322/506 & B: 321/502) die dann nach Aufreinigung in einer zweiten PCR assembliert wurden (321/322). Das resultierende PCR Produkt weist Teile der *fkbK* Gensequenz aus *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* und sowie flankierender Bereiche dieser auf, wobei ca. 250 Basenpaare der Gensequenz mittig *in frame* deletiert wurden. Das PCR Produkt wurde mit *Bgl*II geschnitten und mittels Ligation in den linearisierten, gelgereinigten Suizid-Vektor pKC1139 (*EcoRV/Bam*HI) kloniert. Potentiell positive Kolonien wurden nach erfolgreicher Transformation und Selektion auf LB-Agar + Apramycin (30 °C o/n) mittels Kolonie-PCR identifiziert bevor diese zum animpfen von 2ml Übernachtskulturen eingesetzt wurden. Es folgte Isolierung der Plasmid-DNA und deren Verifizierung mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung.

#### 5.14.1.3 pKSSU449 – Suizid-Shuttle-Vektor codierend für $\Delta$ fbI

Analog zu der Konstruktion von pKSSU437 wurden in einem ersten Schritt mittels PCR zwei Fragmente amplifiziert (A: 318/500 & B: 317/501) die dann nach Aufreinigung in einer zweiten PCR assembliert wurden (317/318). Das resultierende PCR Produkt weist Teile der fkbK Gensequenz aus *Streptomyces hygroscopicus* var. *asco myceticus* sowie flankierende Bereiche dieser auf, wobei ca. 250 Basenpaare der Gensequenz mittig *in frame* deletiert wurden. Das PCR Produkt wurde mit *Bgl*II geschnitten und mittels Ligation in den linearisierten, gelgereinigten Suizid-Vektor pKC1139 (*EcoRV/Bam*HI) kloniert. Potentiell positive Kolonien wurden nach erfolgreicher Transformation und Selektion auf LB-Agar + Apramycin (30 °C o/n) mittels Kolonie-PCR identifiziert bevor diese zum animpfen von 2 ml Übernachtkulturen eingesetzt wurden. Es folgte Isolierung der Plasmid-DNA und deren Verifizierung mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung.

#### 5.14.1.4 *Streptomyces hygroscopicus* $\Delta$ rapK

Die  $\Delta$ rapK Variante von *S. hygroscopicus* (NRRL-5491) wurde durch homologe Rekombination erzeugt. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt um die Plasmid-DNA pKSSU437 in *S. hygroscopicus* einzubringen. Zum einen wurde das Plasmid mittels Protoplasten-Transfer und zum anderen mittels Konjugation ausgehend von Sporen in *S. hygroscopicus* eingebracht. Resultierende Transkonjuganten wurden auf ISP3-Agar, überschichtet mit Nalidixinsäure und Apramycin, identifiziert. Stämme in denen ein Einzel-cross-over zwischen pKSSU139 und dem Chromosom von *S. hygroscopicus* statt gefunden hatte wurden durch die Kultivierung bei 40 °C (in der Anwesenheit von Antibiotika ( $\text{Apr}^{\text{R}}$ ) selektiert. Nach 5 Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 28 °C und 40 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien potentiell positive Mutanten ( $\text{Apr}^{\text{S}}$ ) durch Replica-Plattierung identifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt.

#### 5.14.1.5 *Streptomyces hygroscopicus* $\Delta$ fbkK

Die  $\Delta$ fbkK Variante von *S. hygroscopicus* (DSM 40822) wurde durch homologe Rekombination erzeugt. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt um die Plasmid-DNA pKSSU436 in *S. hygroscopicus* einzubringen. Zum einen wurde das Plasmid mittels Protoplasten-Transfer und zum anderen mittels Konjugation ausgehend von Sporen in *S. hygroscopicus* eingebracht. Resultierende Transkonjuganten wurden auf ISP3-Agar, überschichtet mit Nalidixinsäure und Apramycin identifiziert. Stämme in denen

ein Einzel-*cross-over* zwischen pKSSU139 und dem Chromosom von *S. hygrosopicus* statt gefunden hatte wurden durch die Kultivierung bei 40 °C (in der Anwesenheit von Antibiotika (Apr<sup>R</sup>) selektiert. Nach 6 Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 28 °C und 40 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien potentiell positive Mutanten (Apr<sup>S</sup>) durch Replica-Plattierung identifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt.

#### **5.14.1.6 *Streptomyces hygrosopicus* ΔfbL**

Die ΔfbL Variante von *S. hygrosopicus* (DSM 40822) wurde durch homologe Rekombination erzeugt. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt um die Plasmid-DNA pKSSU436 in *S. hygrosopicus* einzubringen. Zum einen wurde das Plasmid mittels Protoplasten-Transfer und zum anderen mittels Konjugation ausgehend von Sporen in *S. hygrosopicus* eingebracht. Resultierende Transkonjuganten wurden auf ISP3-Agar, überschichtet mit Nalidixinsäure und Apramycin, identifiziert. Stämme in denen ein Einzel-*cross-over* zwischen pKSSU139 und dem Chromosom von *S. hygrosopicus* statt gefunden hatte wurden durch die Kultivierung bei 40°C (in der Anwesenheit von Antibiotika (Apr<sup>R</sup>) selektiert. Nach 6 Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 28 °C und 40 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien potentiell positive Mutanten (Apr<sup>S</sup>) durch Replica-Plattierung identifiziert und mittels Sequenzierung bestätigt.

### **5.14.2 Untersuchungen der Erythromycin-Biosynthesemaschinerie; Fütterung von Diketiden als Bausteine**

#### **5.14.2.1 Einbringen einer Ωhyg<sup>R</sup> Resistenzkassette in DEBS1**

##### **pKSSU519 – Suizid-*Shuttle*-Vektor mit flankierenden Bereichen der KS1**

Die jeweils ~ 2kb großen flankierende Bereiche der KS1 Domäne aus DEBS3 wurden mittels PCR ausgehend von pLB23 amplifiziert (727/676 & 726/677; überlappender Bereich mit *SwaI* Schnittstelle), *DpnI* verdaut und mit Hilfe der 3 Fragment SLIC-MIX Methode in den linearisierten Vektor pKC1139 (*EcoRV* und *HindIII*) kloniert. Die DNA wurde in Omnimax Zellen transformiert und die resultierende Plasmid DNA (pKSSU519) einzelner Klone mittels Restriktionsanalyse verifiziert.



### **pKSSU595 – Suizid-Shuttle-Vektor mit $\Omega$ hyg in Position der KS1**

Die Resistenzkassette  $\Omega$ hyg wurde mittels PCR amplifiziert ausgehend von pKShyg (678/679) amplifiziert und nach Aufreinigung durch *DpnI* Verdau und Ethanol Präzipitation mittels SLIC-MIX in den *Swal* linearisierten Vektor pKSSU519 kloniert. Die DNA wurde in Omnimax Zellen transformiert und die resultierende Plasmid DNA (pKSSU595) einzelner Klone mittels Restriktionsanalyse verifiziert.

#### ***S. erythraea* $\Delta$ KS1hyg<sup>R</sup>**

Das Plasmid pKSSU595 wurde in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und in *S. erythraea* konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin, Hygromycin und Phosphomycin. Stämme in denen ein einzelner *crossover* zwischen pKSSU591 und dem Chromosom von *S. erythraea* statt gefunden hatte wurden durch die Kultivierung bei 40 °C (in der Anwesenheit der zwei Antibiotika (Hyg<sup>R</sup>, Apr<sup>R</sup>) selektiert. Nach sechs Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 30 °C (erlaubt einen zweiten Cross-over) und 42 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien die den zweiten Cross-over aufwiesen (Hyg<sup>R</sup> Apr<sup>S</sup>) durch Replica-Plattierung identifiziert. Der ausgetauschte Bereich wurde mittels Sequenzierung in positiven Klonen verifiziert.

### **5.14.2.2 KS<sup>0</sup>: Einzelaminosäureaustausch innerhalb der KS1 in DEBS1**

#### **pKSSU631 – Suizid-Shuttle-Vektor Cys729Ala**

Der Einzelaminosäureaustausch innerhalb der KS1 Domäne wurde mittels Sättigungsmutagenese durchgeführt. Hierzu wurden zwei ~0,3kb große, 20 Nukleotide überlappende Fragmente mit Einzelaminosäureaustausch durch PCR amplifiziert (727/680; 726/681) und durch SLIC-MIX in den *Swal* linearisierten Vektor pKSSU519 kloniert. Nach Transformation in Omnimax Zellen wurde die Plasmid DNA (pKSSU631) isoliert und mittels Restriktionsanalyse verifiziert.

#### ***S. erythraea* KS1<sup>0</sup>**

Plasmid-DNA pKSSU631 wurde in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und in *S. erythraea*  $\Delta$ KS1hyg<sup>R</sup> konjugiert. Transkonjuganten wurden auf SY Agar selektiert; überschichtet mit Apramycin, Hygromycin und Phosphomycin. Stämme in denen ein einzelner *crossover* zwischen pKSSU631 und dem Chromosom von *S. erythraea* statt gefunden hatte, wurden durch die Kultivierung bei 40 °C (in der Anwesenheit

der zwei Antibiotika (Hyg<sup>R</sup>, Apr<sup>R</sup>) selektiert. Nach sechs Kulturrunden in Abwesenheit der Antibiotika bei 30 °C (erlaubt einen zweiten Cross-over) und 42 °C (um das Plasmid-Rückrad zu entfernen) wurden Kolonien die den zweiten Cross-over aufwiesen (Hyg<sup>S</sup> Apr<sup>S</sup>) durch Replica-Plattierung identifiziert.

## 6 Abkürzungen and Akronyme

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm ( $10^{-6}$ g)
μl	Mikroliter ( $10^{-6}$ L)
6-dEB	6-Desoxyerythronolid
α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
<b>A</b>	
A	Adenin, Adenosin
Å	Angström
ACP	Acyl Carrier Protein
Amp	Ampicillin
Apr	Apramycin
AS	Aminosäure
AT	Acyltransferase
<b>B</b>	
BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
C	Cytosin, Cytidin
Cam	Chloramphenicol
Cbn	Carbenicillin
CD	Circulardichroismus
CoA	Coenzym A
<b>D</b>	
D	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEBS	6-Desoxyerythronolid B Synthase
Den.	Denaturierung
DH	Dehydratase

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure,
<i>DNase</i>	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol

**E**

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Epo	Epothillon
ER	Enosylreduktase
Ery	Erythromycin
ET-SSB	Einzelstrangstabilisierendes Protein

**F**

<i>fabD</i>	
FACS	<i>Fluorescenc activated cell sorting</i>
FAS	Fettsäurebiosynthese
fwd	Vorwärts (forward)

**G**

G	Guanin, Guanosin
g	Gramm
GC	Guanin Cytosin

**H**

h	Stunden
HF	High fidelity
HPSF	Hochreinheitsentsalzung

**I**

IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IVC	<i>in vivo cloning</i>

**K**

Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KR	Ketoreduktase

KS	Ketosynthase
<b>L</b>	
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LIC	<i>ligation-independent cloning</i>
LnM	Leinamycin
<b>M</b>	
M	Molar
m	Milli
m/z	Masse- zu Ladungsverhältniss
MAT	Malonyl-CoA:Acyl Carrier Protein Transacylase
MCoA	Malonyl-CoA
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
Met	Methionin
mg	Milligramm ( $10^{-3}$ g)
min	Minuten
ml	Milliliter ( $10^{-3}$ L)
MM	<i>Molecular Mechanics</i>
MS	Massenspektrometrie
MCoA	Malonyl-CoA
MMCoA	Methylmalonyl-CoA
<b>N</b>	
n	nano
NaAc	Natriumacetat
Nid	Niddamycin
Ni-NTA	Nickel- Nitrilotriessigsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Namenskürzel Niclas Pyrk
NRRL	ARS Culture Collection
nt	Nukleotide
<b>O</b>	
o/n	Über Nacht ( <i>over night</i> )
OD	Optische Dichte
Ori	Replikationsursprung

**P**

p	Pico
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Phe	Phenylalanin
Phm	Phosphomycin
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PK	Polyketid
PKS	Polyketid Synthase
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase

**Q**

QM	Quantenmechanik
----	-----------------

**R**

R	Resistenz
Rap	Rapamycin
RecA	Rekombinase A
rev	Rückwärts (reverse)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur (ca. 20°C)

**S**

s	Sekunde
s.	siehe
<i>S. cinnamomensis</i>	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. erythraea</i>	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
<i>S. hygrosopicus</i>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid Gelelektrophorese
SK	Namenskürzel Stephan Klopries
SNAC	S-Nitroso-N-acetylcysteine
SOB	<i>Super Optimal broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite</i>
SSB	Salmon sperm DNA

**T**

T	Thymin, Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	
U	Unit
UV	Ultra-Violettstrahlung
<b>V</b>	
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
vgl.	Vergleiche
<b>W</b>	
w/v	Gewicht / Volumen
wt	Wildtyp

Darüber hinaus verwendete Abkürzungen sind IUPAC- bzw. SI-konform. Die Aminosäuren wurden nach dem international üblichen Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt (IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, Pure Appl. Chem. 1982, 54, 1517 und 1525).





## 7 Referenzen

- [1] T. C. Cordon, H. W. Jones, I. D. Clarke, J. Naghski, *Appl. Microbiol.* 1958, 6, 293-297.
- [2] A. Fleming, *Br J. Exp. Pathol.* 1929, 10, 226–236.
- [3] C. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.* 2003, 1, 65-70.
- [4] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* 1944, 79, 137-158.
- [5] S. N. Cohen, A. C. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1973, 70, 3240-3244.
- [6] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell Vol. 5*, New York, 2007.
- [7] C. T. Walsh, *ChemBioChem* 2002, 3, 125-134.
- [8] K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and Enzyme Technology*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- [9] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* 2012, 485, 185-194.
- [10] S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* 2011, 13, 3007-3047.
- [11] N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* 2008, 10, 361-372.
- [12] A. C. Murphy, *Nat. Prod. Rep.* 2011, 28, 1406-1425.
- [13] D. E. Cane, C. T. Walsh, C. Khosla, *Science* 1998, 282, 63-68.
- [14] B. Shen, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, 2004, pe14.
- [15] C. Cuevas, M. Pérez, M. J. Martín, J. L. Chicharro, C. Fernández-Rivas, M. Flores, A. Francesch, P. Gallego, M. Zarzuelo, F. de la Calle, J. García, C. Polanco, I. Rodríguez, I. Manzanares, *Org. Lett.* 2000, 2, 2545-2548.
- [16] N. Penel, M. Van Glabbeke, S. Marraud, M. Ouali, J. Y. Blay, P. Hohenberger, *Ann. Oncol.* 2011, 22, 1266-1272.
- [17] T. Schmitt, E. Keller, S. Dietrich, P. Wuchter, A. D. Ho, G. Egerer, *Marine drugs* 2010, 8, 2647-2658.
- [18] J. Clardy, C. Walsh, *Nature* 2004, 432, 829-837.
- [19] C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, 96, 3336-3338.
- [20] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 925-936.
- [21] S. G. Van Lanen, B. Shen, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2008, 11, 186-195.
- [22] C. Hertweck, *Ange. Chem. Int. Edit.* 2009, 48, 4688-4716.
- [23] C. Khosla, *Chem. Rev.* 1997, 97, 2577-2590.
- [24] U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachr. Chem.* 2011, 59, 29-35.
- [25] B. Shen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, 7, 285-295.
- [26] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18, 380-416.
- [27] J. N. Collie, *J. Chem. Soc. Transactions* 1893, 63, 329-337.
- [28] R. Bentley, J. W. Bennett, *Annu. Rev. Microbiol.* 1999, 53, 411-446.
- [29] D. A. Hopwood, D. H. Sherman, *Annu. Review Genet.* 1990, 24, 37-66.
- [30] H. G. Menzella, R. Reid, J. R. Carney, S. S. Chandran, S. J. Reisinger, K. G. Patel, D. A. Hopwood, D. V. Santi, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 1171-1176.
- [31] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* 2006, 106, 3468-3496.

- [32] K. Magnuson, S. Jackowski, C. O. Rock, J. E. Cronan, Jr., *Microbiol. Rev.* 1993, 57, 522-542.
- [33] D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* 1997, 97, 2465-2498.
- [34] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* 2010, 27, 996-1047.
- [35] R. Müller, *ChemBiol* 2004, 11, 4-6.
- [36] K. J. Weissman, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 459* (Ed.: A. H. David), Academic Press, 2009, pp. 3-16.
- [37] K. J. Weissman, *Vol. 51* (Eds.: W. Wohlleben, T. Spellig, B. Müller-Tiemann), Springer Berlin Heidelberg, 2005, pp. 43-78.
- [38] K. J. Weissman, R. Muller, *ChemBioChem* 2008, 9, 826-848.
- [39] S. Donadio, L. Katz, *Gene* 1992, 111, 51-60.
- [40] C. Khosla, *J. Org. Chem.* 2009, 74, 6416-6420.
- [41] U. Rix, C. Fischer, L. L. Remsing, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* 2002, 19, 542-580.
- [42] C. Khosla, P. B. Harbury, *Nature* 2001, 409, 247-252.
- [43] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* 1990, 348, 176-178.
- [44] S. Donadio, M. Staver, J. McAlpine, S. Swanson, L. Katz, *Science* 1991, 252, 675-679.
- [45] J. Staunton, B. Wilkinson, *Chem. Rev.* 1997, 97, 2611-2630.
- [46] K. J. Weissman, H. Hong, M. Oliynyk, A. P. Siskos, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* 2004, 5, 116-125.
- [47] J. F. Aparicio, P. Caffrey, A. F. Marsden, J. Staunton, P. F. Leadlay, *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 8524-8528.
- [48] K. J. Weissman, M. Bycroft, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Biochemistry* 1998, 37, 11012-11017.
- [49] C. Khosla, R. S. Gokhale, J. R. Jacobsen, D. E. Cane, *Annu. Rev. Biochem.* 1999, 68, 219-253.
- [50] L. Katz, G. W. Ashley, *Chem. Rev.* 2005, 105, 499-528.
- [51] I. O. Kibwage, J. Hoogmartens, E. Roets, H. Vanderhaeghe, L. Verbist, M. Dubost, C. Pascal, P. Petitjean, G. Levöl, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985, 28, 630-633.
- [52] C. Olano, C. Mendez, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* 2010, 27, 571-616.
- [53] P. M. Dewick, *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*, 3rd ed. ed., Wiley-Blackwell, Oxford, 2009.
- [54] B. Wilkinson, G. Foster, B. A. Rudd, N. L. Taylor, A. P. Blackaby, P. J. Sidebottom, D. J. Cooper, M. J. Dawson, A. D. Buss, S. Gaisser, I. U. Bohm, C. J. Rowe, J. Cortes, P. F. Leadlay, J. Staunton, *Chem. Biol.* 2000, 7, 111-117.
- [55] J. He, C. Hertweck, *Chem. Biol.* 2003, 10, 1225-1232.
- [56] Y. Xue, D. H. Sherman, *Nature* 2000, 403, 571-575.
- [57] S. J. Moss, C. J. Martin, B. Wilkinson, *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21, 575-593.
- [58] B. J. Beck, Y. J. Yoon, K. A. Reynolds, D. H. Sherman, *Chem. Biol.* 2002, 9, 575-583.
- [59] J. Moldenhauer, X. H. Chen, R. Borriss, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007, 46, 8195-8197.
- [60] Y.-Q. Cheng, G.-L. Tang, B. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, 100, 3149-3154.
- [61] T. Nguyen, K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck, J. Piel, *Nat. Biotechnol.* 2008, 26, 225-233.
- [62] B. I. Rini, *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 1286-1290.
- [63] S. Park, A. Han, Y.-H. Ban, Y. Yoo, E. Kim, Y. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85, 1227-1239.

- [64] C. R. Hutchinson, *Curr. Opin. Microbiol.* 1998, 1, 319-329.
- [65] C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2001, 2, 1681-1690.
- [66] S. Kuhstoss, M. Huber, J. R. Turner, J. W. Paschal, R. N. Rao, *Gene* 1996, 183, 231-236.
- [67] A. F. A. Marsden, B. Wilkinson, J. Cortés, N. J. Dunster, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Science* 1998, 279, 199-202.
- [68] P. A. S. Lowden, G. A. Böhm, S. Metcalfe, J. Staunton, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* 2004, 5, 535-538.
- [69] L. E. Khaw, G. A. Bohm, S. Metcalfe, J. Staunton, P. F. Leadlay, *J. Bacteriol.* 1998, 180, 809-814.
- [70] G. W. Ashley, M. Burlingame, R. Desai, H. Fu, T. Leaf, P. J. Licari, C. Tran, D. Abbanat, K. Bush, M. Macielag, *J. Antibiot.* 2006, 59, 392-401.
- [71] C. M. Kao, M. McPherson, R. N. McDaniel, H. Fu, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 11339-11340.
- [72] C. M. Kao, M. McPherson, R. N. McDaniel, H. Fu, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 2478-2479.
- [73] M. Oliynyk, M. J. B. Brown, J. Cortés, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* 1996, 3, 833-839.
- [74] J. Lau, H. Fu, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochem.* 1999, 38, 1643-1651.
- [75] D. L. Stassi, S. J. Kakavas, K. A. Reynolds, G. Gunawardana, S. Swanson, D. Zeidner, M. Jackson, H. Liu, A. Buko, L. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1998, 95, 7305-7309.
- [76] R. McDaniel, C. M. Kao, S. J. Hwang, C. Khosla, *Chem. Biol.* 1997, 4, 667-674.
- [77] J. Cortes, K. Wiesmann, G. Roberts, M. Brown, J. Staunton, P. Leadlay, *Science* 1995, 268, 1487-1489.
- [78] I. Böhm, I. E. Holzbaur, U. Hanefeld, J. Cortési, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* 1998, 5, 407-412.
- [79] L. B. Pickens, Y. Tang, Y.-H. Chooi, *Annu. Rev. Chem. Biomol.* 2011, 2, 211-236.
- [80] J. Staunton, B. Wilkinson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 5, 159-164.
- [81] B. A. Pfeifer, C. Khosla, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. : MMBR* 2001, 65, 106-118.
- [82] H. G. Menzella, C. D. Reeves, *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, 10, 238-245.
- [83] A. Jäschke, R. Micura, A. Grünweller, R. Hartmann, M. Helm, W. Liebl, L. Merkel, N. Budisa, U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachr. Chem.* 2011, 59, 297-318.
- [84] M. V. Mendes, E. Recio, R. Fouces, R. Luiten, J. F. Martin, J. F. Aparicio, *Chem. Biol.* 2001, 8, 635-644.
- [85] K. J. Weissman, *Trends Biotechnol.* 2007, 25, 139-142.
- [86] K. J. Weissman, M. Bycroft, A. L. Cutter, U. Hanefeld, E. J. Frost, M. C. Timoney, R. Harris, S. Handa, M. Roddis, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* 1998, 5, 743-754.
- [87] J. R. Jacobsen, C. R. Hutchinson, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* 1997, 277, 367-369.
- [88] J. R. Jacobsen, A. T. Keatinge-Clay, D. E. Cane, C. Khosla, *Bioorg. Med. Chem.* 1998, 6, 1171-1177.
- [89] K. Kinoshita, P. G. Williard, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 2495-2502.
- [90] M. A. Gregory, H. Petkovic, R. E. Lill, S. J. Moss, B. Wilkinson, S. Gaisser, P. F. Leadlay, R. M. Sheridan, *Angew. Chem. Int. Edit.* 2005, 44, 4757-4760.
- [91] R. J. M. Goss, S. Lanceron, A. Deb Roy, S. Sprague, M. Nur-e-Alam, D. L. Hughes, B. Wilkinson, S. J. Moss, *ChemBioChem* 2010, 11, 698-702.
- [92] J. González-Lergier, L. J. Broadbelt, V. Hatzimanikatis, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 9930-9938.

- [93] S. F. Haydock, J. F. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, L. E. Khaw, A. König, A. F. A. Marsden, I. S. Galloway, J. Staunton, P. F. Leadlay, *FEBS Letters* 1995, **374**, 246-248.
- [94] H. Petkovic, A. Sandmann, I. R. Challis, H. J. Hecht, B. Silakowski, L. Low, N. Beeston, E. Kuscer, J. Garcia-Bernardo, P. F. Leadlay, S. G. Kendrew, B. Wilkinson, R. Muller, *Org. Biomol. Chem* 2008, **6**, 500-506.
- [95] D. H. Kwan, Y. Sun, F. Schulz, H. Hong, B. Popovic, J. C. C. Sim-Stark, S. F. Haydock, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* 2008, **15**, 1231-1240.
- [96] R. McDaniel, A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, M. Betlach, G. Ashley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, **96**, 1846-1851.
- [97] X. Ruan, A. Pereda, D. L. Stassi, D. Zeidner, R. G. Summers, M. Jackson, A. Shivakumar, S. Kakavas, M. J. Staver, S. Donadio, L. Katz, *J. Bacteriol.* 1997, **179**, 6416-6425.
- [98] C. D. Reeves, S. L. Ward, W. P. Revill, H. Suzuki, M. Marcus, O. V. Petrakovsky, S. Marquez, H. Fu, S. D. Dong, L. Katz, *Chem. Biol.* 2004, **11**, 1465-1472.
- [99] S. Gaisser, L. Kellenberger, A. L. Kaja, A. J. Weston, R. E. Lill, G. Wirtz, S. G. Kendrew, L. Low, R. M. Sheridan, B. Wilkinson, I. S. Galloway, K. Stutzman-Engwall, H. A. McArthur, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Org. Biomol. Chem.* 2003, **1**, 2840-2847.
- [100] C. P. Ridley, H. Y. Lee, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008, **105**, 4595-4600.
- [101] C. D. Reeves, S. Murli, G. W. Ashley, M. Piagentini, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* 2001, **40**, 15464-15470.
- [102] K. Robert, H. Matthias, B. Uwe, *Chem. unserer Zeit* 2009, **43**, 132-142.
- [103] F. LEADLAY, Peter, Cambridge CB2 2BH, GB; J. STAUNTON, Cambridge CB2 ET, GB; J. CORTES, Cambridge CB4 1PZ, GB; A. McARTHUR, Hamish, Gales Ferry, CT 06335, US, (Ed.: C. Biotica Technology Ltd., GB), AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE, 2006.
- [104] M. Hans, A. Hornung, A. Dziarnowski, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**, 5366-5374.
- [105] K. T. Nguyen, D. Ritz, J. Q. Gu, D. Alexander, M. Chu, V. Miao, P. Brian, R. H. Baltz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006, **103**, 17462-17467.
- [106] S. Kushnir, U. Sundermann, Y. Samir, B. Andreas, P. Janning, F. Schulz, *Angew. Chem. und Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012, **2012**, in press doi: 10.1002/anie.201202438.
- [107] K. J. Weissman, *ChemBioChem* 2006, **7**, 485-494.
- [108] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2003, **100**, 1541-1546.
- [109] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nat. Meth.* 2009, **6**, 343-345.
- [110] M. Z. Li, S. J. Elledge, *Nat. Meth.* 2007, **4**, 251-256.
- [111] S. Kushnir, Y. Marsac, R. Breitling, I. Granovsky, V. Brok-Volchanskaya, R. S. Goody, C. F. Becker, K. Alexandrov, *Bioconj. Chem.* 2006, **17**, 610-617.
- [112] M. M. Cox, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2007, **42**, 41-63.
- [113] R. Roy, A. G. Kozlov, T. M. Lohman, T. Ha, *Nature* 2009, **461**, 1092-1097.
- [114] C. J. Rowe, J. Cortes, S. Gaisser, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Gene* 1998, **216**, 215-223.
- [115] M. Chevillotte, R. Menges, G. Muth, W. Wohlleben, E. Stegmann, *J. Biotechnol.* 2008, **135**, 262-265.
- [116] J. Willemsse, G. P. van Wezel, *PLoS One* 2009, **4**, e4242.
- [117] B. Ostash, R. Makitrinsky, S. Walker, V. Fedorenko, *Plasmid* 2009, **61**, 171-175.
- [118] F. Del Vecchio, H. Petkovic, S. G. Kendrew, L. Low, B. Wilkinson, R. Lill, J. Cortes, B. A. Rudd, J. Staunton, P. F. Leadlay, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 2003, **30**, 489-494.
- [119] Y. Tang, A. Y. Chen, C.-Y. Kim, D. E. Cane, C. Khosla, *Chem. Biol.* 2007, **14**, 931-943.

- [120] Y. Tang, C.-Y. Kim, I. I. Mathews, D. E. Cane, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006, **103**, 11124-11129.
- [121] L. Serre, E. C. Verbree, Z. Dauter, A. R. Stuitje, Z. S. Derewenda, *J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 12961-12964.
- [122] H. Ikeda, T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta, S. Ōmura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999, **96**, 9509-9514.
- [123] H. Jenke-Kodama, A. Sandmann, R. Müller, E. Dittmann, *Mol. Biol. Evol.* 2005, **22**, 2027-2039.
- [124] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, *Nat. Protocols* 2010, **5**, 725-738.
- [125] Y. Zhang, *BMC bioinformatics* 2008, **9**, 40.
- [126] C. M. Kao, L. Katz, C. Khosla, *Science* 1994, **265**, 509-512.
- [127] R. McDaniel, M. Welch, C. R. Hutchinson, *Chem Rev* 2005, **105**, 543-558.
- [128] W. A. Duetz, L. Ruedi, R. Hermann, K. O'Connor, J. Buchs, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**, 2641-2646.
- [129] K. L. Morley, R. J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* 2005, **23**, 231-237.
- [130] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, Q. G. S. Mc, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* 2005, **37**, 73-76.
- [131] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, **10**, 498-508.
- [132] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu Rev Biochem* 2010, **79**, 471-505.
- [133] A. Bhatt, C. B. Stark, B. M. Harvey, A. R. Gallimore, Y. A. Demydchuk, J. B. Spencer, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005, **44**, 7075-7078.
- [134] A. Deubel, A. S. Fandino, F. Sorgel, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr.. A* 2006, **1136**, 39-47.
- [135] H. A. Kirst, in *Progress in Medicinal Chemistry, Vol. Volume 30* (Eds.: G. P. Ellis, D. K. Luscombe), Elsevier, 1993, pp. 57-88.
- [136] D. J. Birkett, R. A. Robson, N. Grgurinovich, A. Tonkin, *Ther. Drug Monit.* 1990, **12**, 65-71.
- [137] F. Fraschini, F. Scaglione, G. Demartini, *Clinical pharmacokinetics* 1993, **25**, 189-204.
- [138] K. A. Rodvold, *Clin. Pharmacok.* 1999, **37**, 385-398.
- [139] P. Kumar, A. T. Koppisch, D. E. Cane, C. Khosla, *Journal of the American Chemical Society* 2003, **125**, 14307-14312.
- [140] A. T. Koppisch, C. Khosla, *Biochemistry* 2003, **42**, 11057-11064.
- [141] T. L. O'Loughlin, W. M. Patrick, I. Matsumura, *Protein Eng. Des. Sel.* 2006, **19**, 439-442.
- [142] A. T. Keatinge-Clay, A. A. Shelat, D. F. Savage, S. C. Tsai, L. J. Miercke, J. D. O'Connell, 3rd, C. Khosla, R. M. Stroud, *Structure* 2003, **11**, 147-154.
- [143] J. D. Bloom, S. T. Labthavikul, C. R. Otey, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006, **103**, 5869-5874.
- [144] J. D. Bloom, M. M. Meyer, P. Meinhold, C. R. Otey, D. MacMillan, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, **15**, 447-452.
- [145] C. Jackel, P. Kast, D. Hilvert, *Annu. Rev. Bioph* 2008, **37**, 153-173.
- [146] M. T. Reetz, K. E. Jaeger, *Chemistry* 2000, **6**, 407-412.
- [147] M. T. Reetz, *Ange. Chem.* 2011, **123**, 144-182.
- [148] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protocols* 2007, **2**, 891-903.
- [149] W. P. Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994, **91**, 10747-10751.
- [150] J. M. Joern, *Methods Mol. Biol.* 2003, **231**, 85-89.
- [151] Z. Shao, H. Zhao, L. Giver, F. H. Arnold, *Nucleic Acids Res.* 1998, **26**, 681-683.

- [152] K. Rinehart, L., Jr., *Pure Appl. Chem.* 1977, 49, 1361-1384.
- [153] C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, M. K. Richards, *J. Antibiot.* 1991, 44, 357-365.
- [154] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Edit.* 2012, 51, 4012-4022.
- [155] T. Schwecke, J. F. Aparicio, I. Molnar, A. Konig, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, J. B. Lester, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995, 92, 7839-7843.
- [156] S. R. Park, Y. J. Yoo, Y.-H. Ban, Y. J. Yoon, *J. Antibiot.* 2010, 63, 434-441.
- [157] C. M. Hartford, M. J. Ratain, *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 82, 381-388.
- [158] M. A. Gregory, H. Hong, R. E. Lill, S. Gaisser, H. Petkovic, L. Low, L. S. Sheehan, I. Carletti, S. J. Ready, M. J. Ward, A. L. Kaja, A. J. Weston, I. R. Challis, P. F. Leadlay, C. J. Martin, B. Wilkinson, R. M. Sheridan, *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 3565-3568.
- [159] U. Christians, R. Kupfer, in *Metabolite structure elucidation from Q-TOF MS and MS/MS data with the Metabolite Identification software*, Agilent Technologies, Aurora, Colorado.
- [160] R. J. Griffin, *Prog. Med. Chem.* 1994, 31, 121-232.
- [161] R. P. Smith, D. E. Wilcox, *Crit. Rev. Toxicol.* 1994, 24, 355-377.
- [162] B. E. VanUffelen, J. Van der Zee, B. M. de Koster, J. VanSteveninck, J. G. R. Elferink, *Life Sciences* 1998, 63, 645-657.
- [163] Y. Minamiyama, S. Takemura, S. Imaoka, Y. Funae, Y. Tanimoto, M. Inoue, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, 283, 1479-1485.
- [164] T. Tanikawa, T. Asaka, M. Kashimura, Y. Misawa, K. Suzuki, M. Sato, K. Kameo, S. Morimoto, A. Nishida, *J. Med. Chem.* 2001, 44, 4027-4030.
- [165] F. Schlunzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* 2001, 413, 814-821.
- [166] A. Yonath, *Annu. Rev. Biochem.* 2005, 74, 649-679.
- [167] A. Yonath, Vol. 14 (Ed.: J. Puglisi), Springer Netherlands, 2007, pp. 127-153.
- [168] S. Frykman, T. Leaf, C. Carreras, P. Licari, *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 76, 303-310.
- [169] S. J. Shaw, D. Abbanat, G. W. Ashley, K. Bush, B. Foleno, M. Macielag, D. Zhang, D. C. Myles, *J. Antibiotics* 2005, 58, 167-177.
- [170] J. Harms, [www.riboworld.com](http://www.riboworld.com), Access Date: 14.06.2012, 2012.
- [171] A. M. Nilius, Z. Ma, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002, 2, 493-500.
- [172] G. Ackermann, A. C. Rodloff, *J. Antimicrob. Chemot.* 2003, 51, 497-511.
- [173] R. Berisio, J. Harms, F. Schlunzen, R. Zarivach, H. A. S. Hansen, P. Fucini, A. Yonath, *J. Bacteriology* 2003, 185, 4276-4279.
- [174] C. J. Harvey, J. D. Puglisi, V. S. Pande, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* 2012.
- [175] H. Y. Lee, C. Khosla, *PLoS biology* 2007, 5, e45.
- [176] H. Y. Lee, C. J. Harvey, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Antibiotics* 2011, 64, 59-64.
- [177] K. Kinoshita, B. A. Pfeifer, C. Khosla, D. E. Cane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3701-3704.
- [178] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* 2003, 42, 72-79.
- [179] J. Wu, T. J. Zaleski, C. Valenzano, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17393-17404.
- [180] M. Avi, R. M. Wiedner, H. Griengl, H. Schwab, *Chemistry* 2008, 14, 11415-11422.
- [181] K. Jensen, H. Niederkruger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P. Poplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, M. Oldiges, C. Hertweck, J. Piel, *Chem. Biol.* 2012, 19, 329-339.

- [182] B. S. Kim, T. A. Cropp, B. J. Beck, D. H. Sherman, K. A. Reynolds, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 48028-48034.
- [183] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* 2002, 114, 3002-3015.
- [184] K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. A. van der Sar, S. A. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, P. Crews, J. Piel, *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 494-501.
- [185] W. R. Strohl, in *Biotechnology of Antibiotics* (Ed.: S. W. R.), Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 1-48.
- [186] C. T. Walsh, *Science* 2004, 303, 1805-1810.
- [187] J. Sambrook, D. W. Russel, *Molecular Cloning - A laboratory manual, Vol. 3*, CSH Press, New York, 2001.
- [188] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical streptomyces genetics*, John Innes Foundation, 2000.
- [189] G. Muth, B. Nußbaumer, W. Wohlleben, A. Pühler, *Mol. Gen. Genet.* 1989, 219, 341-348.
- [190] N. B. Fitzgerald, R. S. English, J. S. Lampel, T. J. Vanden Boom, *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 1580-1583.
- [191] A. Ranganathan, M. Timoney, M. Bycroft, J. Cortés, I. P. Thomas, B. Wilkinson, L. Kellenberger, U. Hanefeld, I. S. Galloway, J. Staunton, P. F. Leadlay, *ChemBiol* 1999, 6, 731-741.
- [192] E. B. Shirling, D. Gottlieb, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966, 16, 313-340.
- [193] R. M. S. Mingqiang Zhang, *Vol. US 7,183,289 B2*, BIOTICA TECH LTD GB 2007.
- [194] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, *Gene* 1990, 96, 23-28.
- [195] J. Altenbuchner, J. Cullum, *Mol. Gen. Genet.* 1984, 195, 134-138.
- [196] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 5192-5197.
- [197] U. K. Laemmli, *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [198] M. A. Fernandez-Moreno, E. Martinez, J. L. Caballero, K. Ichinose, D. A. Hopwood, F. Malpartida, *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 24854-24863.
- [199] E. S. Dieken, R. L. Miesfeld, *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12, 589-597.
- [200] S. J. Kakavas, L. Katz, D. Stassi, *J. Bacteriol.* 1997, 179, 7515-7522.
- [201] O. Esteban, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Vol. 231*, 2003, pp. 99-104.





## 8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Coesfeld, den 14. 08. 2012

---



## 9 Curriculum vitae

### Persönliches

Geburtsdatum: 18.04.1983 in Coesfeld

Nationalität: deutsch

### Hochschulbildung

10/2008 bis heute: Doktorarbeit

Studien zur Typ-I Polyketid Synthesen in der Nachwuchsgruppe von Prof. Dr. Frank Schulz am MPI für molekulare Physiologie und der Technischen Universität Dortmund

09/2007 – 03/2008 Diplomarbeit

Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin, Hannover, Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Borlak

09/2003 – 03/2008 Fachhochschule Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, Ingenieurstudium Biotechnologie/Chemietechnik (Dipl.-Ing. FH)

09/2005 – 06/2006 Athlone Institute of Technology, Irland, Toxikologie Toxikologiestudium (B.Sc)

### Berufsausbildung

08/2001 – 07/2003 Ausbildung zur Chemisch technischen Assistentin (CTA) Adolph-Kolping-Schule Münster

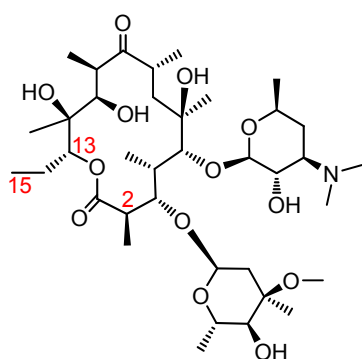
### Stipendien und Auszeichnungen

12/2008 Doktorandenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie

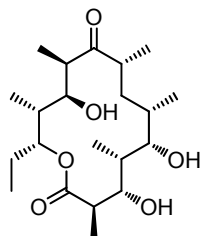
10/2008 Aufnahme in die *International Max-Planck-Research School in Chemischer Biologie* (Doktorandenprogramm)

09/2005 ERASMUS Stipendium der Europäischen Union

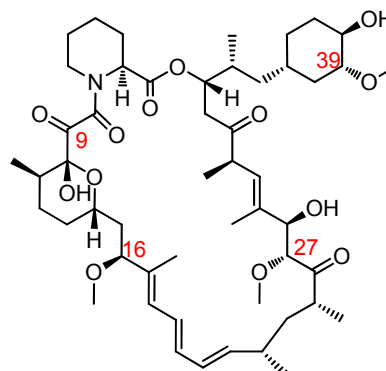




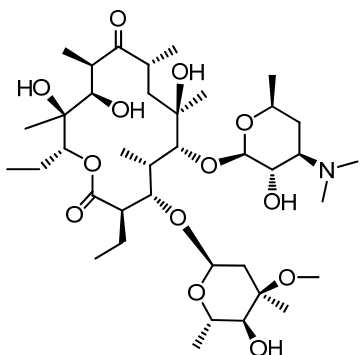
Erythromycin A (1)



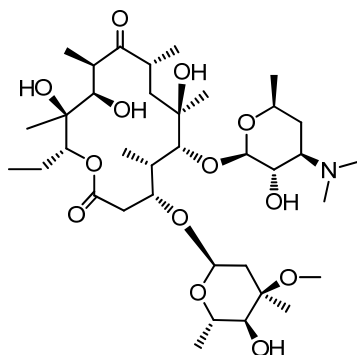
6-dEB (2)



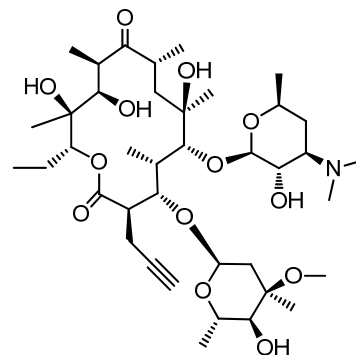
Rapamycin (3)



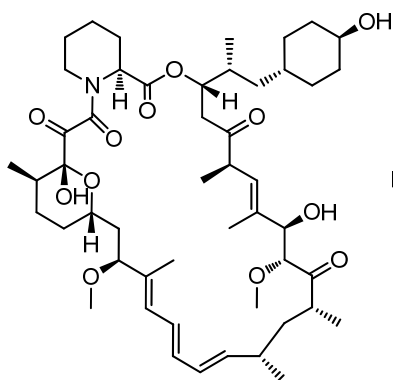
2-Ethylerythromycin A (4)



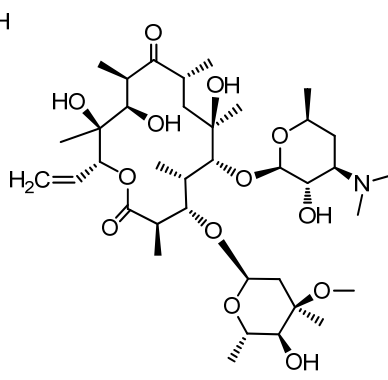
2-Desmethylerythromycin A (5)



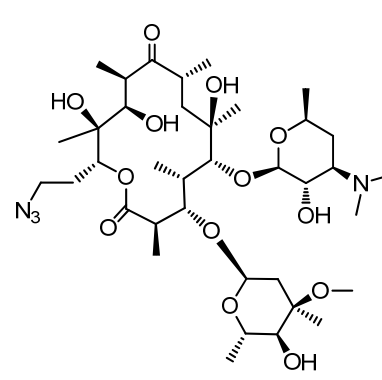
2-Propargylerythromycin A (6)



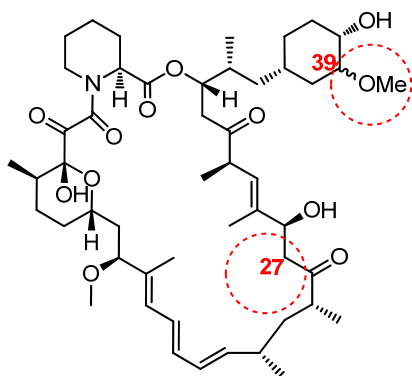
39-Desmethoxyrapamycin (7)



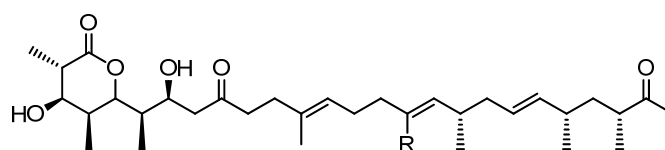
13-Vinylerythromycin A (8)



15-Azidoerythromycin A (9)



27-Desmethoxy-39 *rac*-rapamycin (10)



Pre-Monensin (11) A=CH<sub>3</sub>, B=CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>