

# **Polyketidbiosynthese in Myxobakterien**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

Bettina Frank

Saarbrücken

Mai 2007

Tag des Kolloquiums: 19.07.2007  
Dekan: Prof. Dr. Uli Müller  
Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Müller  
Prof. Dr. Friedrich Giffhorn

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikation**

B. Frank, J. Knauber, H. Steinmetz, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Beyer, R. Müller, Spiroketal formation in *Sorangium*: Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes, *Chemistry and Biology* 2007 (14) 221-233

## **Tagungsbeiträge**

B. Frank, B. Silakowski, S.C. Wenzel, H.B. Bode, R. Müller, Aurafurone: post-PKS biosynthesis makes the difference (Poster), *Biology of Bacteria Producing Natural Products*, Jena 2004

B. Frank, B. Silakowski, S.C. Wenzel, H.B. Bode, R. Müller, Functional analysis of the aurafurone biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (Poster), *BioPerspectives*, Wiesbaden 2005

B. Frank, J. Knauber, S. Beyer, R. Müller, Modern natural product research exemplified by the myxobacterial secondary metabolite spirangien (Poster), *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Frankfurt 2006

B. Frank, J. Knauber, S. Beyer, H. Steinmetz, R. Müller, Biosynthesis of the spiroketal polyketide spirangien in *Sorangium cellulosum* So ce90 (Poster), *Chemical Biology: Directing Biosynthesis*, Cambridge, UK 2006

B. Frank, J. Knauber, H. Steinmetz, M. Scharfe, H. Blöcker, S. Beyer, R. Müller, Biosynthesis of the spiroketal polyketide spirangien in *Sorangium cellulosum* So ce90 (Vortrag), *Biology of Bacteria Producing Natural Products*, Tübingen 2006

---

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |      |
|---|------|
| Inhaltsverzeichnis.....   | I    |
| Abbildungsverzeichnis.....  | VII  |
| Tabellenverzeichnis .....   | XI   |
| Abkürzungsverzeichnis.....  | XIII |
| 1 Einleitung.....   | 1    |
| 1.1 Naturstoffe als Wirkstoffe .....  | 1    |
| 1.2 Was kann Naturstoffforschung leisten? .....                                 | 1    |
| 1.3 Myxobakterien als Naturstoffproduzenten .....                               | 3    |
| 1.4 Molekulare Grundlagen der Polyketidbiosynthese.....                         | 5    |
| 1.5 Zielsetzung.....  | 9    |
| 2 Material und Methoden.....  | 11   |
| 2.1 Chemikalien .....   | 11   |
| 2.2 Lösungen und Puffer.....  | 12   |
| 2.2.1 Lösungen und Puffer für Southern Blots und Kolonie-Hybridisierungen<br>13 |      |
| 2.2.2 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten .....               | 14   |
| 2.2.3 Lösungen für den Zusatz zu Medien.....                                    | 16   |
| 2.2.4 Antibiotika-Stocklösungen .....   | 16   |
| 2.3 Medien .....  | 16   |
| 2.3.1 Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....                      | 17   |
| 2.3.2 Medien für die Kultivierung von Myxobakterien.....                        | 17   |
| 2.4 Enzyme, „Kits“ und Marker .....   | 18   |
| 2.5 Geräte und Materialien .....  | 19   |
| 2.6 Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide.....                          | 21   |
| 2.6.1 Bakterienstämme .....   | 21   |
| 2.6.2 In dieser Arbeit hergestellte Mutanten.....                               | 22   |
| 2.6.3 Verwendete Vektoren .....   | 23   |
| 2.6.4 Plasmide und deren Konstruktion.....                                      | 23   |
| 2.6.5 Oligonukleotide .....   | 25   |

---

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.7    | Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen.....             | 27 |
| 2.7.1  | <i>E. coli</i> .....   | 27 |
| 2.7.2  | <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 und <i>S. cellulorum</i> So ce90 .....  | 27 |
| 2.8    | Isolierung von DNA .....   | 28 |
| 2.8.1  | Isolierung genomischer DNA aus Myxobakterien.....                    | 28 |
| 2.8.2  | Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA (alkalische Lyse).....        | 28 |
| 2.8.3  | Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA.....                           | 28 |
| 2.9    | Trennung und Reinigung von DNA .....                                 | 29 |
| 2.9.1  | Agarosegelelektrophorese .....                                       | 29 |
| 2.9.2  | Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....                             | 29 |
| 2.9.3  | Direkte Aufreinigung von Restriktionen und PCR-Ansätzen .....        | 29 |
| 2.9.4  | Phenol-Chloroform-Extraktion .....                                   | 29 |
| 2.9.5  | Fällung von DNA .....  | 30 |
| 2.10   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....                                 | 30 |
| 2.10.1 | Auswahl der DNA-Polymerase.....                                      | 30 |
| 2.10.2 | Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes.....                       | 31 |
| 2.10.3 | „Overlap-extension“ PCR .....  | 32 |
| 2.11   | Enzymatische Manipulation von DNA .....                              | 33 |
| 2.11.1 | Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....                | 33 |
| 2.11.2 | Dephosphorylierung von DNA .....                                     | 33 |
| 2.11.3 | Ligation von DNA.....  | 34 |
| 2.11.4 | Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem Topo-TA-Cloning Kit.....       | 34 |
| 2.12   | Transformation von Bakterien .....                                   | 34 |
| 2.12.1 | Transformation von <i>E. coli</i> .....                              | 34 |
| 2.12.2 | Transformation von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 .....                | 35 |
| 2.12.3 | Konjugation von <i>S. cellulorum</i> So ce90.....                    | 38 |
| 2.13   | Konstruktion einer Cosmidbank von <i>S. cellulorum</i> So ce90 ..... | 38 |
| 2.13.1 | Herstellung des Ligationsansatzes .....                              | 38 |
| 2.13.2 | Verpackung in Phagenköpfe .....                                      | 39 |
| 2.13.3 | Phageninfektion und Titerbestimmung .....                            | 39 |
| 2.13.4 | Generierung der Cosmidbank.....                                      | 39 |

---

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.13.5 | Transfer auf Nylonmembranen und deren Prozessierung.....                              | 40 |
| 2.14   | DNA-Hybridisierungen .....  | 41 |
| 2.14.1 | Southern Blot .....   | 41 |
| 2.14.2 | Kapillarblot .....  | 41 |
| 2.14.3 | Sondenmarkierung .....  | 41 |
| 2.14.4 | Hybridisierung und Detektion .....  | 42 |
| 2.14.5 | Wiederverwendung hybridisierter Membranen („Stripping“).....                          | 42 |
| 2.14.6 | Kolonie-Hybridisierung .....  | 42 |
| 2.15   | Heterologe Expression von <i>deoRA</i> und Proteinanalytik.....                       | 43 |
| 2.15.1 | Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte.....  | 43 |
| 2.15.2 | Aufreinigung des Zielproteins .....   | 43 |
| 2.15.3 | Konzentrationsbestimmung mittels Bradford.....  | 43 |
| 2.15.4 | Ankonzentrierung von Proteinextrakten.....  | 43 |
| 2.15.5 | SDS-PAGE .....  | 44 |
| 2.16   | Protein-DNA Bindungsstudien.....  | 45 |
| 2.16.1 | Herstellen von markierten Promotor-Regionen.....                                      | 45 |
| 2.16.2 | DNA-Protein Bindung .....   | 45 |
| 2.16.3 | Elektrophoretische Auftrennung und „Blotting“ .....                                   | 45 |
| 2.16.4 | Detektion.....  | 46 |
| 2.17   | <i>In silico</i> Analyse von DNA- und Proteinsequenzen .....                          | 46 |
| 2.18   | Gewinnung von Sekundärmetaboliten.....  | 46 |
| 2.18.1 | Kultivierung in Produktionsmedium .....   | 46 |
| 2.18.2 | Fütterung von Biosynthesevorläufern.....  | 47 |
| 2.18.3 | Herstellung von Kulturextrakten .....   | 47 |
| 2.18.4 | Aufreinigung von Sekundärmetaboliten.....   | 47 |
| 2.19   | Analytik von Sekundärmetaboliten .....  | 48 |
| 2.19.1 | Dünnschichtchromatographie .....  | 48 |
| 2.19.2 | HPLC-UV/VIS, HPLC-MS, HPLC-MS/MS .....  | 48 |
| 2.19.3 | NMR .....   | 48 |
| 3      | Ergebnisse I: Analyse der Aurafuron-Biosynthese in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 ..... | 49 |
| 3.1    | Annotation des Aurafuron-Biosyntheseegenclusters.....                                 | 49 |

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2   | <i>In silico</i> -Analyse der Polyketidsynthasen .....   | 51 |
| 3.3   | Inaktivierungsexperimente zur Analyse der Polyketidsynthasen.....  | 53 |
| 3.3.1 | Generierung und genotypische Analyse der PKS-Mutanten.....   | 54 |
| 3.3.2 | Phänotypische Analyse der markerlosen Mutante .....  | 56 |
| 3.4   | <i>In silico</i> -Analyse der kodierten Post-PKS-Enzyme .....  | 57 |
| 3.5   | Inaktivierungsexperimente zur Analyse der Post-PKS-Enzyme.....   | 57 |
| 3.5.1 | Inaktivierung von <i>aufA</i> .....  | 57 |
| 3.5.2 | Inaktivierung von <i>aufB</i> .....  | 58 |
| 3.5.3 | Inaktivierung von <i>aufH</i> .....  | 59 |
| 3.5.4 | Inaktivierung von <i>aufJ</i> .....  | 60 |
| 3.6   | Identifizierung von möglichen Aurafuronderivaten.....  | 61 |
| 3.7   | Vergleich des Aurafuron-Biosyntheseegenclusters mit ausgewählten<br>aktinobakteriellen Biosyntheseegenclustern .....                         | 65 |
| 3.7.1 | Vergleich der Organisation der Biosyntheseegencluster .....  | 65 |
| 3.7.2 | Homologievergleich der Post-PKS-Enzyme .....   | 66 |
| 3.7.3 | Phylogenetische Analyse der KS-Domänen .....   | 67 |
| 4     | Ergebnisse II: Untersuchungen zur Sekundärstoff-Biosynthese in <i>S. cellulorum</i><br>So ce90 .....   | 69 |
| 4.1   | Spirangien-Biosynthese in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1.....  | 69 |
| 4.1.1 | Identifizierung des 5'-Endes des Spirangien-Biosyntheseegenclusters....  | 69 |
| 4.1.2 | Annotation des Spirangien-Biosyntheseegenclusters .....  | 71 |
| 4.1.3 | <i>In silico</i> -Analyse der Polyketidsynthasen .....   | 73 |
| 4.1.4 | Inaktivierungsexperimente zur funktionalen Analyse der Post-PKS<br>Enzyme 76   |    |
| 4.1.5 | Untersuchung der Sequenzwiederholungen im PKS kodierenden Teil des<br>Spirangien-Biosyntheseegenclusters.....                                | 83 |
| 4.2   | Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in <i>S. cellulorum</i><br>So ce90 .....   | 85 |
| 4.2.1 | Die UV-Mutante <i>S. cellulorum</i> So ce90D48.....  | 86 |
| 4.2.2 | Untersuchungen von regulatorischen Proteinen, welche durch<br>biomagnetische Separation von Promotorbindeproteinen identifiziert wurden..... | 86 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.2.3 | Untersuchungen zu Proteinen in <i>S. cellulorum</i> So ce90, welche signifikante Homologien zu bekannten regulatorischen Proteinen aus <i>S. cellulorum</i> So ce56 aufweisen ..... | 89  |
| 4.3   | Untersuchungen zur Produktion von Spirangienderivaten der Mutante BFA3KO .....  | 94  |
| 4.3.1 | Phänotypische Analyse der Mutante BFA3KO .....  | 94  |
| 4.3.2 | Fütterungsversuch zur Strukturaufklärung der Derivate .....   | 95  |
| 4.3.3 | Genotypische Charakterisierung der Mutante BFA3KO .....   | 95  |
| 5     | Diskussion .....  | 99  |
| 5.1   | Aurafuron-Biosynthese in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 .....   | 99  |
| 5.1.1 | PKS-Biosynthese .....   | 99  |
| 5.1.2 | Post-PKS Biosynthese .....  | 105 |
| 5.1.3 | Identifizierung möglicher Aurafuron-Derivate .....  | 110 |
| 5.2   | Metabolische Einheit trotz genomischer Diversität - Vergleich von Biosynthesewegen Aurafuron-ähnlicher Strukturen .....   | 112 |
| 5.3   | Spirangien-Biosynthese in <i>S. cellulorum</i> So ce90 .....  | 115 |
| 5.3.1 | Identifizierung der unbekanntes Biosynthesegene .....   | 115 |
| 5.3.2 | PKS-Biosynthese .....   | 116 |
| 5.3.3 | Post-PKS Biosynthese .....  | 119 |
| 5.3.4 | Inaktivierung der Typ II Thioesterase .....   | 125 |
| 5.4   | Überlegungen zur Entwicklung des Spirangien-Biosynthesegenlocus .....   | 126 |
| 5.5   | Evolution im Schüttelkolben? Produktion verkürzter Spirangiene durch die Mutante BFA3KO .....   | 129 |
| 5.5.1 | Neue Spirangien-Derivate der Mutante BFA3KO .....   | 129 |
| 5.5.2 | Genotypische Analyse von BFA3KO .....   | 130 |
| 5.6   | Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in <i>S. cellulorum</i> So ce90 .....   | 133 |
| 5.7   | Myxobakterielle Naturstoffforschung und der Beitrag der vorliegenden Arbeit<br>138  |     |
| 6     | Zusammenfassung .....   | 141 |
| 7     | Abstract .....  | 143 |
| 8     | Literatur .....   | 145 |



## Abbildungen

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1.1:</b> Strukturen ausgewählter Naturstoffe, welche therapeutisch eingesetzt werden  | 2  |
| <b>Abbildung 1.2:</b> Biologisch aktive Naturstoffe aus Myxobakterien und deren Produzenten  | 4  |
| <b>Abbildung 1.3:</b> Strukturen der Aurafurone und Spirangiene  | 4  |
| <b>Abbildung 1.4:</b> Fruchtkörper von <i>Chondromyces crocatus</i> , <i>S. cellulorum</i> und eine schwärmende Kultur von <i>S. cellulorum</i>  | 5  |
| <b>Abbildung 1.5:</b> Das Prinzip der Polyketidbiosynthese   | 8  |
| <b>Abbildung 2.1:</b> Schematischer Ablauf der „overlap-extension“ PCR   | 33 |
| <b>Abbildung 2.2:</b> Stempelmuster der Mikrotiterplatten 1-6 auf den Kolonie-Membranen  | 40 |
| <b>Abbildung 3.1:</b> Organisation des Aurafuron-Biosyntheseegenclusters und abgeleitete Funktionen der Genprodukte                              | 50 |
| <b>Abbildung 3.2:</b> Domänenorganisation der Aurafuron PKS  | 51 |
| <b>Abbildung 3.3:</b> Sequenzbereiche der konservierten Motive in den Domänen der Aurafuron PKS53  |    |
| <b>Abbildung 3.4:</b> Prinzip der Generierung markerloser Mutanten durch zweifache homologe Rekombination  | 54 |
| <b>Abbildung 3.5:</b> Mutagenese der KR-Domänen der Module AufD2 und AufF1 und genotypische Analyse der Mutante BFAKR3-3                         | 56 |
| <b>Abbildung 3.6:</b> Inaktivierung von <i>aufA</i>  | 58 |
| <b>Abbildung 3.7:</b> Mutagenese von <i>aufB</i>   | 59 |
| <b>Abbildung 3.8:</b> Inaktivierungskonstrukte für <i>aufH</i> und <i>aufJ</i>   | 60 |
| <b>Abbildung 3.9:</b> PCR-Kontrolle der nach Elektroporation von pBFA1 erhaltenen Mutanten   | 61 |
| <b>Abbildung 3.10:</b> HPLC-UV/VIS-MS/MS Analytik der Aurafurone   | 63 |
| <b>Abbildung 3.11:</b> Mögliche Fragmente von Aurafuron A und B nach MS/MS-Kopplung  | 65 |
| <b>Abbildung 3.12:</b> Organisation des Aurafuron-Biosyntheseegenclusters im Vergleich zu den Biosyntheseegenclustern für E837, E492/875 und Pke | 66 |
| <b>Abbildung 3.13:</b> Phylogenetische Analyse von myxo- und aktinobakteriellen KS-Domänen   | 68 |
| <b>Abbildung 4.1:</b> Teilsequenz des Spirangien-Biosyntheseegenclusters, die zu Beginn der Arbeit vorlag  | 70 |
| <b>Abbildung 4.2:</b> Ergebnis der Hybridisierung der Cosmisbank mit einem 257 bp Fragment des T7-Endes von Cosmid c48                           | 70 |
| <b>Abbildung 4.3:</b> Organisation des Spirangien-Biosyntheseegenclusters und Lage der Cosmid- bzw. Plasmid-Inserts                              | 72 |
| <b>Abbildung 4.4:</b> Anordnung der einzelnen Domänen in der Spirangien PKS  | 74 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 4.5:</b> Sequenzbereiche der konservierten Motive in den Domänen der Spirangien PKS   | 75  |
| <b>Abbildung 4.6:</b> Das Inaktivierungskonstrukt pBFS_A und die genotypische Analyse der Insertionsmutanten   | 77  |
| <b>Abbildung 4.7:</b> Inaktivierungskonstrukte für <i>spiB</i> und <i>spiK</i> und Southern Blot Analyse der Mutanten  | 78  |
| <b>Abbildung 4.8:</b> HPLC-MS-UV/VIS Analyse von Extrakten der Mutante BFSB-11, des Wildstammes und der Mutante BFSK-2   | 79  |
| <b>Abbildung 4.9:</b> Ausschnitt der <sup>13</sup> C NMR Spektren der isolierten Spirangien-Fractionen des Wildtypen und der Mutanten BFSB-11 und BFSK-2 nach Fütterung von L-[ <i>Methyl</i> - <sup>13</sup> C]-Methionin | 81  |
| <b>Abbildung 4.10:</b> Inaktivierungskonstrukt für <i>spiA</i> und Southern Blot Analyse der Mutanten  | 82  |
| <b>Abbildung 4.11:</b> Konstrukt zur Kontrolle der Expression der PKS-kodierenden Gene durch den <i>aphII</i> -Promotor und Southern Blot Analyse der Mutanten   | 83  |
| <b>Abbildung 4.12:</b> Analyse von Sequenzwiederholungen im Spirangien-Biosynthesegencluster   | 85  |
| <b>Abbildung 4.13:</b> Southern Blot Analyse der Cosmide c31 und c33, das Inaktivierungskonstrukt pPbP3KO und Southern Blot Analyse von mit pPbP3KO erhaltenen Mutanten von <i>S. cellulorum</i> So ce90A1                 | 89  |
| <b>Abbildung 4.14:</b> HPLC-MS-UV/VIS Analyse von Kulturextrakten der Mutante BFDA2 und des Wildtypen  | 90  |
| <b>Abbildung 4.15:</b> Konstrukte für die Überexpression von <i>deoRA</i> in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | 92  |
| <b>Abbildung 4.16:</b> SDS-Gelelektrophorese nach heterologer Expression von <i>deoRA</i> und DNA-Bindungsstudie   | 93  |
| <b>Abbildung 4.17:</b> HPLC-MS-UV/VIS Analyse des Wildtypen und der Mutante BFA3KO und UV-Spektren von Spirangien A und der neuen Verbindungen   | 95  |
| <b>Abbildung 4.18:</b> Southern Blot Analytik der Mutante BFA3KO im Vergleich zum Wildstamm  | 97  |
| <b>Abbildung 5.1:</b> Einbau von markierten Biosynthesestufen in Aurafuron A   | 100 |
| <b>Abbildung 5.2:</b> Biosynthesehypothesen für das Aurafuron-Polyketidgerüst  | 103 |
| <b>Abbildung 5.3:</b> Durch MtmOIV katalysierte Reaktionen der Mithramycin-Biosynthese   | 106 |
| <b>Abbildung 5.4:</b> Aurafuron A, B und verwandte Strukturen  | 107 |
| <b>Abbildung 5.5:</b> Mögliche Reaktionsfolgen der Furanon-Bildung   | 108 |
| <b>Abbildung 5.6:</b> Sequenzvergleich von AufJ, JadH, MtmOIV, Orf8 (E837) und Orf13 (E492)  | 109 |
| <b>Abbildung 5.7:</b> Strukturvorschlag für Aurafuron C  | 111 |
| <b>Abbildung 5.8:</b> Biosynthesemodell des Polyketidgerüsts von E-837 in <i>S. aculeolatus</i>  | 113 |
| <b>Abbildung 5.9:</b> Modell der Spirangien A-Biosynthese  | 117 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abbildung 5.10:</b> Desmethyl-Spirangienderivate der <i>spiK</i> Mutante und der <i>spiB</i> Mutante   | 120 |
| <b>Abbildung 5.11:</b> Azyklische Spirangienderivate der <i>spiL</i> Mutante JKB19  | 121 |
| <b>Abbildung 5.12:</b> Organisation von <i>spiC</i> und <i>spiD</i> im Wildstamm und in Mutanten von <i>S. cellulorum</i><br>So ce90                          | 122 |
| <b>Abbildung 5.13:</b> Mechanismen der Spiroketalbildung bei der Avermectin- und Monensin-Biosynthese   | 123 |
| <b>Abbildung 5.14:</b> Mögliche Mechanismen der Spiroketalbildung in der Spirangien-Biosynthese,<br>ausgehend vom azyklischen Derivat der <i>spiL</i> Mutante | 124 |
| <b>Abbildung 5.15:</b> Biologisch aktive Naturstoffe mit Spiroketalstrukturen   | 125 |
| <b>Abbildung 5.16:</b> Der Spirangien-Biosynthesegenlocus und mögliche Vorläufer  | 127 |
| <b>Abbildung 5.17:</b> Strukturen von Spirangien A und möglicher Derivate der Mutante BFA3KO  | 130 |
| <b>Abbildung 5.18:</b> Rekombination in dem NysC kodierenden Bereich der Nystatin PKS   | 132 |
| <b>Abbildung 5.19:</b> Biosynthese von Epothilon A und B ausgehend von Epothilon C und D durch EpoF   | 133 |
| <b>Abbildung 5.20:</b> Sequenzvergleich von DeoRA aus <i>S. cellulorum</i> So ce90 und <i>S. cellulorum</i> So ce56   | 135 |



## Tabellen

|                      |   |    |
|----------------------|---|----|
| <b>Tabelle 2.1:</b>  | Chemikalien und ihre Bezugsquellen  | 11 |
| <b>Tabelle 2.2:</b>  | Lösungen und Puffer für Southern Blots und Kolonie-Hybridisierungen   | 13 |
| <b>Tabelle 2.3:</b>  | Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten   | 14 |
| <b>Tabelle 2.4:</b>  | Lösungen für den Zusatz zu Medien   | 16 |
| <b>Tabelle 2.5:</b>  | Antibiotika-Stocklösungen   | 16 |
| <b>Tabelle 2.6:</b>  | Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>  | 17 |
| <b>Tabelle 2.7:</b>  | Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von Myxobakterien   | 17 |
| <b>Tabelle 2.8:</b>  | Verwendete Enzyme, „Kits“ und Marker  | 18 |
| <b>Tabelle 2.9:</b>  | Eingesetzte Bakterienstämme   | 21 |
| <b>Tabelle 2.10:</b> | Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Mutanten von <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1  | 22 |
| <b>Tabelle 2.11:</b> | Im Rahmen dieser Arbeit generierte Mutanten des Spirangien-Biosyntheseegenclusters  | 22 |
| <b>Tabelle 2.12:</b> | Weitere Mutanten von <i>S. cellulosum</i> So ce90   | 22 |
| <b>Tabelle 2.13:</b> | Verwendete Vektoren   | 23 |
| <b>Tabelle 2.14:</b> | Im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide und deren Konstruktion  | 23 |
| <b>Tabelle 2.15:</b> | Im Rahmen dieser Arbeit generierte Oligonukleotide  | 25 |
| <b>Tabelle 2.16:</b> | Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels bei der SDS-PAGE Elektrophorese   | 44 |
| <b>Tabelle 2.17:</b> | Zusammensetzung des 6% igen nativen Polyacrylamidgels in 0,25x TBE  | 45 |
| <b>Tabelle 3.1:</b>  | Vermutete Funktionen der im Aurafuron-Biosyntheseegencluster kodierten Proteine   | 50 |
| <b>Tabelle 3.2:</b>  | Fragmentierung der Aurafurone bei MS/MS-Kopplung  | 63 |
| <b>Tabelle 3.3:</b>  | Homologievergleich von Cytochrom P <sub>450</sub> Monooxygenasen des Aurafuron-Biosyntheseegenclusters mit den aktinobakteriellen Cytochrom P <sub>450</sub> Monooxygenasen | 67 |
| <b>Tabelle 3.4:</b>  | Homologievergleich von AufJ mit den Monooxygenasen der aktinobakteriellen Biosyntheseegencluster  | 67 |
| <b>Tabelle 4.1:</b>  | Im Spirangien-Biosyntheseegencluster kodierte Proteine und deren abgeleitete Funktion   | 73 |
| <b>Tabelle 4.2:</b>  | Lage und Länge der Sequenzwiederholungen im Spirangien-Biosyntheseegencluster   | 84 |

**Tabelle 4.3:** Amplifizierte und sequenzierte Fragmente von *spiH* aus der Mutante BFA3KO 96

**Abkürzungsverzeichnis**

|      |  |
|------|--|
| ACP  | Acyl-Carrier-Protein                             |
| Amp  | Ampicillin                                       |
| AT   | Acyltransferase                                  |
| ATP  | Adenosintriphosphat                              |
| bzw. | beziehungsweise                                  |
| bp   | Basenpaare                                       |
| BSA  | Rinderserumalbumin                               |
| BPC  | „base peak chromatogram“                         |
| C    | Kohlenstoff                                      |
| ca.  | circa  |
| cm   | Zentimeter                                       |
| Cm   | Chloramphenicol                                  |
| CoA  | Coenzym A  |
| d    | desoxy   |
| Da   | Dalton   |
| DC   | Dünnschichtchromatographie                       |
| DH   | Dehydratase                                      |
| DIG  | Digoxigenin                                      |
| DMSO | Dimethylsulfoxid                                 |
| DNA  | Desoxyribonukleinsäure                           |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosidtriphosphat                    |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure          |
| ER   | Enoylreduktase                                   |
| Fa.  | Firma  |
| Fe   | Eisen  |
| GBF  | Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH |
| h    | Stunde   |
| HGT  | horizontaler Gentransfer                         |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie         |
| Hyg  | Hygromycin B                                     |
| Kan  | Kanamycin  |
| kb   | Kilobasenpaare                                   |
| KR   | Ketoreduktase                                    |
| KS   | Ketosynthase-                                    |
| kV   | Kilovolt   |
| l    | Liter  |
| M    | Molar  |
| Mbp  | Megabasenpaare                                   |
| Me   | Methyl   |
| Mg   | Magnesium  |
| mg   | Milligramm                                       |
| min  | Minute   |
| ml   | Milliliter                                       |
| mM   | Millimolar                                       |
| MS   | Massenspektrometrie                              |

---

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie          |
| N     | Stickstoff                          |
| NRPS  | nichtribosomale Peptid synthetase   |
| O     | Sauerstoff                          |
| OD    | Optische Dichte                     |
| P     | Phosphor                            |
| p.A.  | pro analysis                        |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese     |
| PCP   | Peptidyl-Carrier-Protein            |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion           |
| PKS   | Polyketidsynthase                   |
| Ppant | Phosphopantethein                   |
| RBS   | Ribosomenbindestelle                |
| RNA   | Ribonukleinsäure                    |
| rpm   | Umdrehungen pro Minute              |
| RT    | Raumtemperatur                      |
| Rt    | Retentionszeit                      |
| S     | Schwefel                            |
| SAM   | S-Adenosyl-Methionin                |
| SAP   | Alkalische Phosphatase              |
| sec   | Sekunde                             |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                |
| TAE   | Tris-Acetat-EDTA-Puffer             |
| TE    | Thioesterase                        |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin |
| Tob   | Tobramycin                          |
| U     | Units                               |
| UV    | Ultraviolett                        |
| ÜN    | über Nacht                          |
| V     | Volt                                |
| VT    | Volumenteile                        |
| WT    | Wildtyp                             |
| °C    | Grad Celcius                        |
| μF    | mikro-Farad                         |
| μ     | mikro                               |
| Ω     | Ohm                                 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Naturstoffe als Wirkstoffe

Ein Großteil der Therapeutika, die täglich das Leben und das Überleben einer Vielzahl von Patienten verbessern und ermöglichen, sind Naturstoffe oder davon abgeleitete Strukturen (1). Das Wirkspektrum dieser Substanzen ist vielfältig, sie werden als Zytostatika eingesetzt wie Paclitaxel, als Immunsuppressiva wie Cyclosporin, als Cholesterolsenker wie Lovastatin, bei Malaria wie Artemisin, bei systemischen Pilzinfektionen wie Amphotericin oder als Antibiotika wie Penicillin (Abbildung 1.1). Alle genannten Beispiele stellen wichtige Entwicklungen in der Therapie der jeweiligen Krankheitsbilder dar. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Entwicklung von Naturstoffen zu Antibiotika (2;3). Seit der Einführung von Penicillin G 1940 ist die Mortalität bei bakteriellen Infekten zwar drastisch gesunken (4), Infektionskrankheiten stellen aber immer noch weltweit die zweithäufigste Todesursache dar und die dritthäufigste Todesursache in Industrieländern (5). Zunehmende Resistenzen gegen die bereits eingesetzten Antibiotika machen die Entwicklung neuer Antinfektiva nötig (6). Außer als Humantherapeutika werden Naturstoffe und Naturstoffanaloga auch in der Tierhaltung und im Pflanzenschutz eingesetzt (7;8).

Naturstoffe können als privilegierte Strukturen verstanden werden, die durch evolutionären Druck entstanden sind und mit einer Vielzahl von Zielstrukturen in spezifischer Weise interagieren (9). Dem Vorteil der natürlichen Vorauswahl nach biologischer Aktivität stehen bei der Entwicklung zum Wirkstoff zwei Herausforderungen gegenüber: Die in der Regel komplexen Strukturen sind synthetisch oft nur unter großem Aufwand herzustellen, und die natürlichen Ressourcen sind häufig begrenzt.

## 1.2 Was kann Naturstoffforschung leisten?

Wirkstofforientierte Naturstoffforschung heute fokussiert neben der Entwicklung von Total- und Partialsynthesen in der medizinischen Chemie im Wesentlichen auf drei große Ziele: Erstens die Identifizierung von neuen, biologisch aktiven Verbindungen, die zu neuen Therapeutika entwickelt werden können. Zweitens die Aufklärung der Biosynthesewege der Verbindungen, um gezielt enzymatische Aktivitäten für die Entwicklung von Derivaten nutzen zu können. Drittens die Untersuchung von regulatorischen Mechanismen der Biosynthese und die Entwicklung neuer und verbesserter Wirte für die Expression der komplexen Biosynthesemaschinerien, um die Produktausbeuten zu steigern.

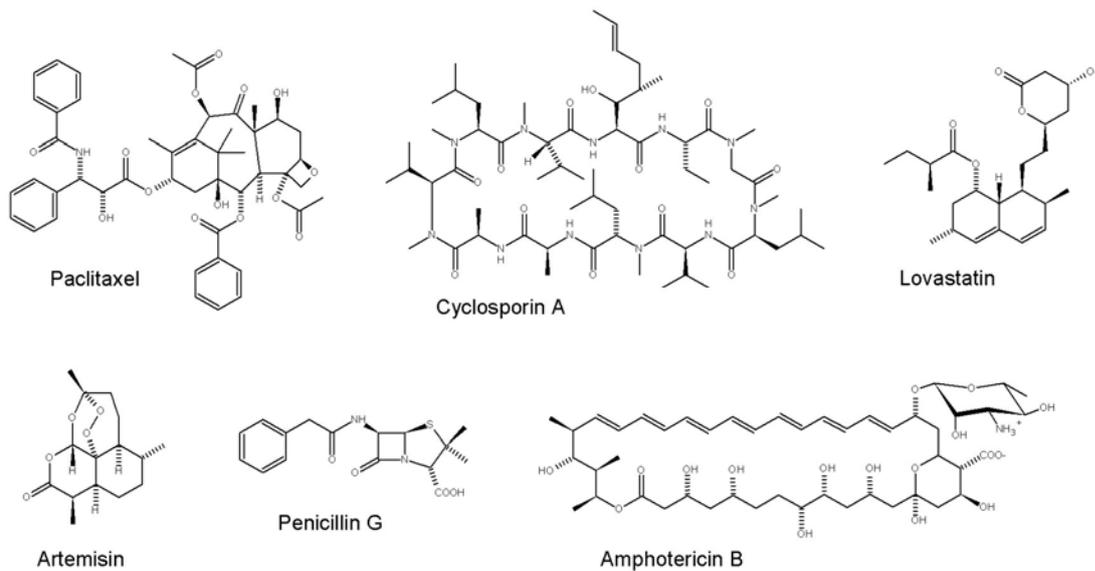


Abbildung 1.1: Strukturen ausgewählter Naturstoffe, welche therapeutisch eingesetzt werden

Besonders Bodenbakterien waren und sind eine reiche Quelle an biologisch aktiven Substanzen (10). In den letzten Jahrzehnten wurden vor allem Mitglieder der Gattung *Streptomyces* intensiv untersucht (11). Wegen der zunehmenden Wiederfindungsrate bereits bekannter Strukturen gerieten in den letzten Jahren verstärkt auch alternative bakterielle Produzenten wie Pseudomonaden, Cyanobakterien oder Myxobakterien in den Fokus (2;12). Wenn eine neue Verbindung mit biologischer Aktivität isoliert wird, ist oft eine Derivatisierung nötig, um durch die Verbesserung der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften die Anwendung als Wirkstoff zu ermöglichen. Durch Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, sei es systematisch oder mit „Schrotschuß“-Methoden, können Naturstoffe oder Struktur motive von Naturstoffen auch als Leitstrukturen in der Entwicklung synthetischer Wirkstoffe dienen (9;13). Strukturelemente von Naturstoffen können auch bei der Generierung von Substanzbibliotheken für Hochdurchsatz-Tests („High-Throughput-Screenings“) Berücksichtigung finden (14).

Naturstoffe haben im Vergleich zu synthetischen Verbindungen in der Regel weniger Schwefel- und Stickstoff-, aber mehr Sauerstoffatome, mehr chirale Zentren und eine erhöhte sterische Komplexität (9). Viele der von Bakterien (oder auch von Pilzen) produzierten Substanzen sind nicht-ribosomal gebildete Peptide, Polyketide oder Hybride beider Klassen. Die dazugehörigen Biosyntheseenzyme sind meist von nahe beieinander liegenden Genen kodiert, was die Identifizierung, Analyse und Manipulation dieser Biosyntheseenzyme erleichtert (15). Das gewonnene biosynthetische Wissen kann für die gezielte Produktion von Strukturderivaten eingesetzt werden, sei es durch genetische Manipulation des Primär-oder

Sekundärstoffwechsels der bakteriellen Produzenten oder durch Nutzung einzelner enzymatischer Aktivitäten *in vitro* (16;17).

Bakterien können als nachwachsende Rohstoffe angesehen werden. Die Ausbeuten an produziertem Naturstoff sind trotzdem häufig gering. Durch Untersuchung und gezielte Manipulation der zellulären regulatorischen Mechanismen ist es möglich, die Produktion um ein Vielfaches zu steigern (18). Auch durch den Transfer der Biosynthesegene in schneller wachsende und leichter zu kultivierende Wirte kann die Ausbeute verbessert werden (19). Die Entwicklung solcher Systeme zur heterologen Expression ermöglicht auch die Erschließung des genetischen Potentials der großen Gruppe der unter Standardbedingungen unkultivierbaren Organismen (20).

Ein breites Spektrum an modernen Techniken und Methoden aus Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie und Chemie wird eingesetzt, um letztlich potente Naturstoffe wie die bakteriellen Polyketide als Therapeutika verfügbar zu machen.

### 1.3 Myxobakterien als Naturstoffproduzenten

Myxobakterien sind in den letzten drei Jahrzehnten verstärkt in den Blickpunkt der Naturstoffforschung geraten. In einem Screening-Programm der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (heute Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung) von etwa 6000 Stämmen wurden über 500 neue Naturstoffe isoliert, davon etwa 100 mit neuartigen Grundstrukturen (21;22). Nach wie vor werden neue Verbindungen aus Myxobakterien isoliert (23). Für viele der Verbindungen wurde bereits eine biologische Wirkung beschrieben, sei es antifungal wie bei Stigmatellin und Myxothiazol, antibiotisch wie bei Myxovirescin und Sorangicin oder zytostatisch wie bei Chondramid und Tubulysin, um nur einige Beispiele zu nennen. Das ebenfalls zytostatisch wirkende Epothilon interagiert mit dem Tubulin-Gerüst eukaryontischer Zellen und befindet sich zur Zeit nach erfolgreich abgeschlossener Phase III der klinischen Prüfungen kurz vor der Zulassung als Brustkrebstherapeutikum ((24;25) Abbildung 1.2). Viele der isolierten Substanzen sind nicht-ribosomal synthetisierte Peptide oder Hybride von nicht-ribosomal hergestellten Peptiden mit Polyketiden. Selten findet man reine Polyketide wie die Aurafurone und die Spirangiene (Abbildung 1.3). Aurafuron wird von *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 produziert, Spirangien vom Epothilon-Produzenten *Sorangium cellulosum* So ce90. Die Substanzen zeigen eine moderate antifungale bzw. cytotoxische und antifungale Wirkung (26;27). Die beiden Stämme gehören verschiedenen Unterordnungen der Myxobakterien an, *S. aurantiaca* DW4/3-1 gehört zu den Cystobacterineae, *S. cellulosum* Soce90 zu den Sorangineae in der Ordnung Myxococcales der  $\delta$ -Proteobakterien.

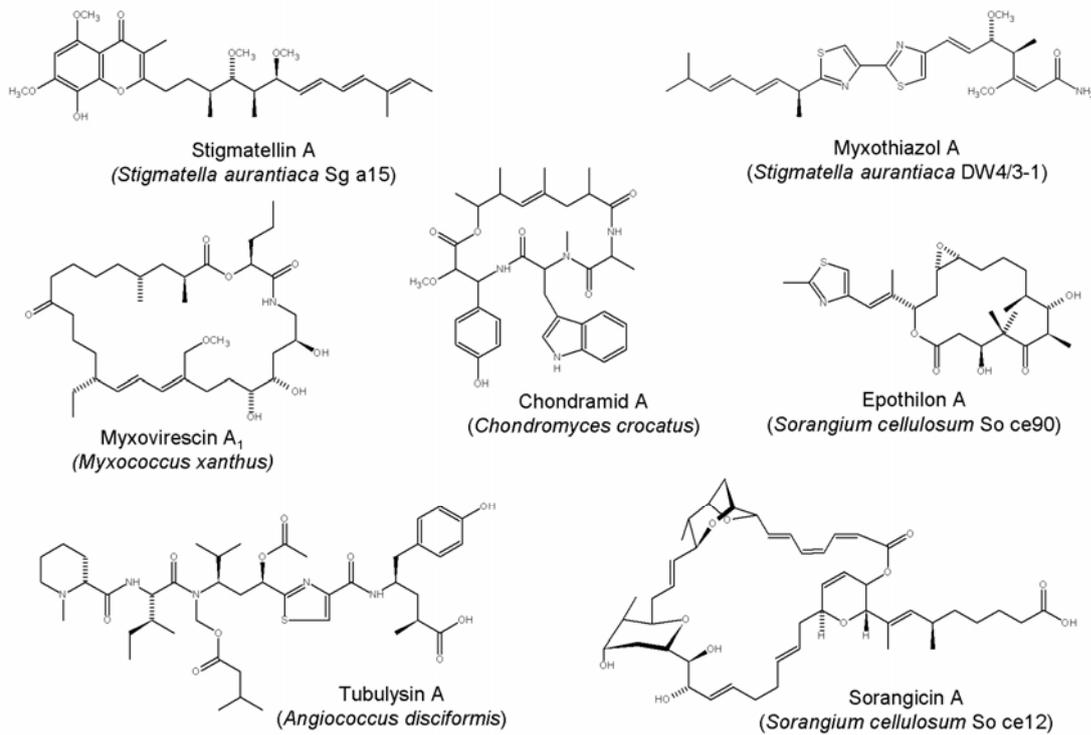


Abbildung 1.2: Biologisch aktive Naturstoffe aus Myxobakterien und deren Produzenten

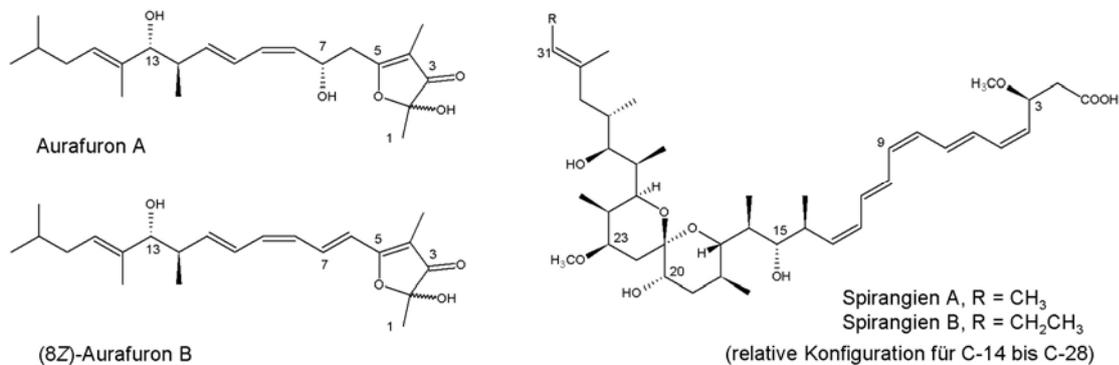


Abbildung 1.3: Strukturen der Aurafurone und Spirangiene. Aurafuron B existiert als (8Z)- und (8E)-Isomer

Myxobakterien sind nicht nur potente Naturstoffproduzenten, sondern auch aus mikrobiologischer Sicht interessant. Sie sind Gram-negative, stäbchenförmige Bodenbakterien und ubiquitär verbreitet. Ungewöhnlich ist ihre Fähigkeit, sich sozial zu verhalten: sie schwärmen auf festem Kulturmedium in einem geordneten Gefüge und bilden unter Mangelbedingungen Fruchtkörper aus, in denen einzelne Zellen zu widerstandsfähigen Myxosporen werden. Die Fruchtkörper können vielfältige Formen annehmen und werden auch für die Klassifizierung der einzelnen Arten herangezogen (Abbildung 1.4) (22). Der Modellstamm *S. cellulosum* So ce56 hat das größte bisher

bekannte bakterielle Genom (13,01 Mbp), charakteristisch ist auch der hohe GC-Gehalt (71 %) und der große Anteil von Genen, die für regulatorische Proteine und Proteine der Sekundärstoffbiosynthese kodieren (*S. cellulosum* Genomprojekt, zur Publikation eingereicht). Herausforderungen für das praktische Arbeiten mit diesen Organismen sind lange Generationszeiten (6 bzw. 16 h für *S. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. cellulosum* So ce90), das Fehlen von extrachromosomalen replikativen Elementen und die geringe Auswahl an geeigneten Selektionsmarkern. Methoden zur Mutagenese müssen meist für jeden Stamm individuell etabliert werden (28).

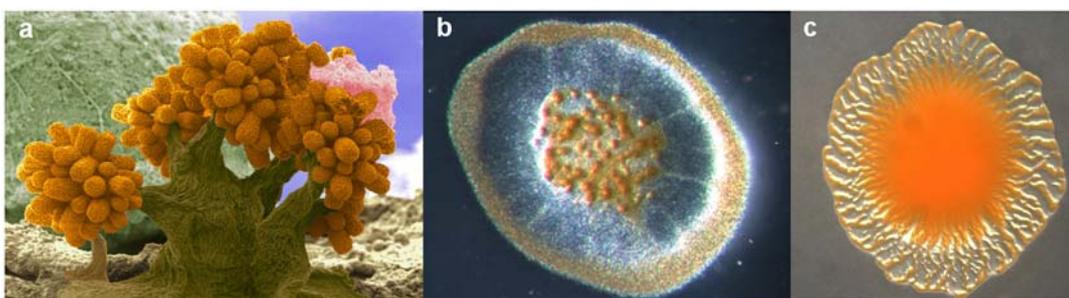


Abbildung 1.4: Fruchtkörper von *Chondromyces crocatus* (a), *S. cellulosum* (b) und eine schwärmende Kultur von *S. cellulosum* (c).  
Bildnachweis: Manfred Rohde (a), Klaus Gerth (b, c)

## 1.4 Molekulare Grundlagen der Polyketidbiosynthese

Die Polyketidbiosynthese wird an multimodularen Enzymkomplexen durchgeführt, den Polyketidsynthasen (PKS). Diese Biosynthesemachinerien unterliegen einem streng geordneten Aufbau. Die katalytischen Aktivitäten entsprechen dabei im Prinzip denen der Fettsäuresynthasen des Primärstoffwechsels (FAS, (29)). Die wohl am Besten untersuchte Polyketidsynthase DEB-Synthase (DEBS) ist verantwortlich für die Biosynthese des Erythromycin-Grundgerüsts 6-Deoxyerythronolid B (DEB) im Bakterium *Saccharopolyspora erythraea* (vergleiche Abbildung 1.5 a) (30). Bei der DEB-Biosynthese wird eine als CoA-Ester aktivierte Propionat-Startereinheit sukzessive mit insgesamt sechs (ebenfalls als CoA-Ester aktivierten) Methylmalonat-Einheiten verlängert. Die wachsende Polyketidkette bleibt währenddessen kovalent am Multienzymkomplex gebunden. Die DEBS besteht aus drei großen Proteinen (je ~200 kD, (31)), die in insgesamt sieben Module unterteilt sind. Das erste Modul ist für die Auswahl und das „Laden“ der Startereinheit verantwortlich, die weiteren Module katalysieren jeweils die Kettenverlängerung um eine Polyketideinheit. Jedes Modul ist untergliedert in separate Domänen, die in einer definierten Reihenfolge angeordnet und katalytisch aktiv sind. Die minimale Domänenausstattung eines Verlängerungs-Modules besteht aus einer Ketosynthase (KS)-Domäne, einer Acyltransferase (AT)-Domäne und einem Acyl-Carrier-Proteins (ACP). Das ACP wird durch Transfer einer Phosphopantetheinyl (Ppant)-gruppe auf einen konservierten Serinrest durch eine

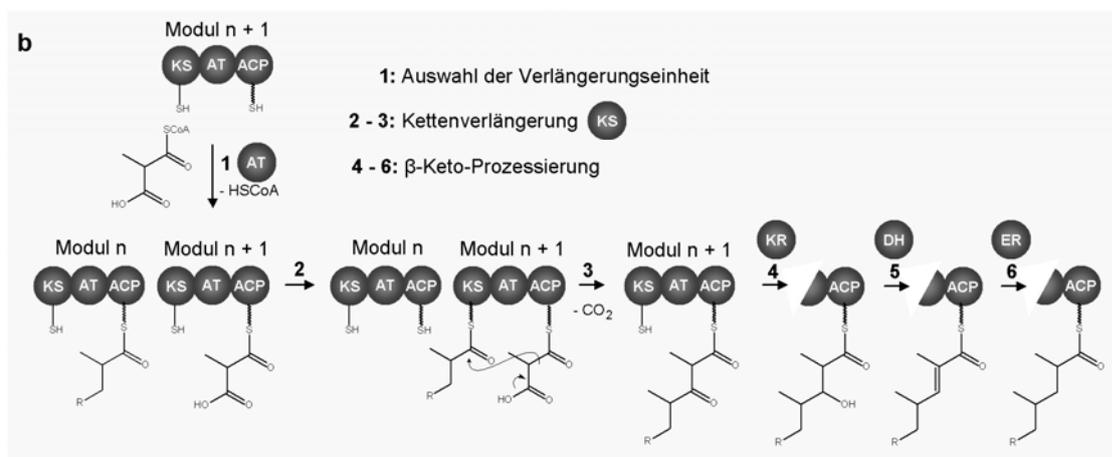
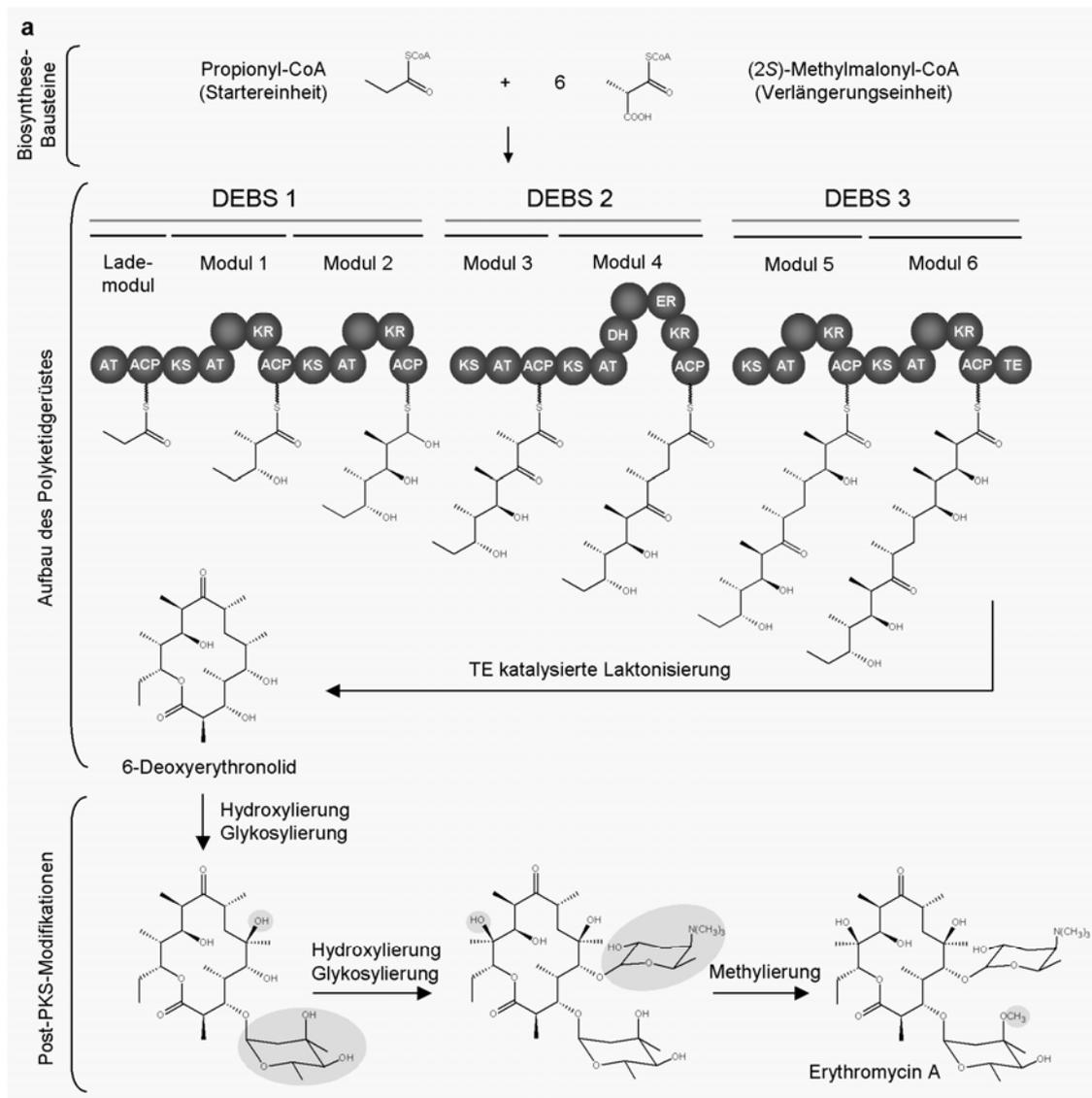
Ppant-Transferase von der inaktiven apo- in die aktive holo-Form überführt. Das ACP mit der prosthetischen Ppant-Gruppe ist beweglich und dient als schwingender „Arm“ während der Biosynthese, hier wird die wachsende Polyketidkette als Thioester gebunden und den jeweiligen katalytischen Einheiten präsentiert (32). Die AT-Domäne wählt die korrekte Starter- bzw. Verlängerungseinheit aus und belädt damit das ACP (Abbildung 1.5 b, 1). Im Fall der DEB-Biosynthese sind das Propionyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA, die Polyketidbiosynthese ist allgemein jedoch nicht auf diese Einheiten beschränkt. Als Startereinheiten werden auch andere CoA-Ester kurzkettiger aliphatischer oder aromatischer Säuren verwendet, die Verlängerungseinheiten sind in aller Regel Methylmalonyl- oder Malonyl-CoA (33). Die KS-Domäne katalysiert in einer der Claisen-Kondensation ähnlichen Reaktion den nukleophilen Angriff des  $\alpha$ -Kohlenstoffs der Verlängerungseinheit an den Carbonyl-Kohlenstoff der bestehenden Polyketidkette, dabei ist das zu verlängernde Polyketidintermediat an einen konservierten Cysteinrest der KS-Domäne gebunden. Während der Kettenverlängerung kommt es zur Decarboxylierung der Verlängerungseinheit, so daß letztlich um eine (im Fall von Methylmalonyl-CoA) methylierte C2-Einheit verlängert wird (Abbildung 1.5 b, 2 und 3). Das Lademodul führt keine Verknüpfung durch, hier fehlt die KS-Domäne. Weitere, optionale Domänen der Biosynthese sind Ketoreduktase (KR)-Domänen, Dehydratase (DH)-Domänen und Enoylreduktase (ER)-Domänen. Diese katalysieren die stereospezifische Reduktion des  $\beta$ -Carbonylkohlenstoffs zum Alkohol, die nachfolgende Dehydratation zur Doppelbindung und die Reduktion zum  $\alpha$ ,  $\beta$ -Methylen (Abbildung 1.5 b, 4 -6) (33). Diese Domänen sind abweichend von der Reihenfolge der katalysierten Reaktionen in der Reihenfolge DH-ER-KR angeordnet und werden auch als „reduktive Schleife“ bezeichnet (29). Große Linkerdomänen sind zwischen den AT- und KR-(bzw. DH-KR oder DH-ER, wenn vorhanden) Domänen zu finden, sie haben vermutlich nur eine strukturelle und keine katalytische Funktion ((34), in Abbildung 1.5 ohne Beschriftung dargestellt). Andere, kleinere Linkerregionen sind wahrscheinlich an der intra- und intermolekularen Kommunikation der PKS beteiligt, die als Homodimere auftreten (34;35) und stets mit den korrekten biosynthetischen Partnern assoziieren (36). Die Abspaltung der fertig prozessierten Polyketidekette vom Multienzymkomplex wird in aller Regel durch eine Thioesterase (TE)-Domäne katalysiert, welche am C-Terminus des letzten Modules liegt. Durch nukleophilen intra- oder extramolekularen Angriff (letzteres in der Regel durch Wasser) kommt es zur Zyklisierung zum Lakton oder zur Abspaltung der freien Säure (33).

Nach der Biosynthese des Polyketidgerüsts durch die PKS werden oft Post-PKS-Modifikationen vorgenommen, die in aller Regel die biologische Aktivität der Verbindungen stark beeinflussen (33). Im Fall der DEBS wird das PKS Produkt 6-Deoxyerythronolid durch zweifache Hydroxylierung, Glykosylierung und anschließende Methylierung zum biologisch aktiven Endprodukt Erythromycin B metabolisiert (Abbildung 1.5 a, (16)).

Das „Kolinearitäts-Prinzip“ (16) der PKS Biosynthese besagt, daß die Anordnung der katalytischen Domänen in den einzelnen Modulen direkt mit der Struktur des

biosynthetisierten Polyketides korreliert. Im Fall der DEBS trifft dies zu, es werden aber immer mehr Beispiele bekannt, wo Module übersprungen oder Module und einzelne Domänen mehrfach, „iterativ“ genutzt werden (33;37;38). Auch die Gene der Biosyntheseproteine sind nicht immer kollinear zur Biosynthese im Gencluster angeordnet (z.B. (39)).

Die beschriebene DEBS ist eine modulare Typ I PKS, die katalytischen Domänen sind in Modulen zusammengefaßt, welche nacheinander biosynthetisch aktiv sind. Dieser Typ ist in Bakterien am weitesten verbreitet (33). Pilzliche Typ I PKS funktionieren ähnlich, hier wird jedoch ein Modul, welches die oben beschriebenen Domänen enthält, mehrfach hintereinander genutzt, was auch als iterativ bezeichnet wird (40). Bei bakteriellen Typ II PKS-Systemen ist für die Biosynthese des Polyketides nur ein Satz der beschriebenen katalytischen Einheiten verantwortlich, die zudem als individuelle Proteine vorliegen (33). Typ III PKS-Systeme ähneln den pflanzlichen Chalkonsynthasen, Biosyntheseintermediate sind dabei nicht über Ppant-Gruppen an das Enzym gebunden (41;42). Inzwischen sind jedoch in Bakterien neben pilzähnlichen Typ I PKS auch modulare Typ I PKS-Systeme beschrieben, in denen eine der katalytischen Aktivitäten (die AT-Domäne) außerhalb der PKS auf einem einzelnen Protein liegt (z.B. (43;44)). Die Grenzen der bisherigen Klassifizierung von PKS-Systemen schwinden (38;45), und die Aufklärung neuer Biosynthesewege gewährt weitere Einsichten in die Funktionsweise dieser komplexen Biosynthesysteme.



**Abbildung 1.5: Das Prinzip der Polyketidbiosynthese.** a: Das DEBS-System. Die Startereinheit Propionyl-CoA wird unter Decarboxylierung mit sechs Einheiten Methylmalonyl-CoA verlängert, dabei wird jeder Verlängerungsschritt von einem anderen Modul durchgeführt. Die Module sind in Domänen unterteilt, welche die einzelnen Schritte der Kettenverlängerung und weitere Reaktionen katalysieren. Nach der Abspaltung von der Polyketidsynthase finden Post-PKS-Modifikationen wie Hydroxylierung, Glykosylierung und Methylierung statt, welche schließlich zum Endprodukt Erythromycin A führen. b: Detaillierter Ablauf der Kettenverlängerung inklusive  $\beta$ -Keto-Prozessierung. Erläuterung im laufenden Text.

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Biosynthesewege der Polyketide Aurafuron aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Spirangien aus *S. cellulorum* So ce90. Beide Verbindungen tragen interessante funktionelle Gruppen: Aurafuron eine ungewöhnliche Furanongruppe und Spirangien eine ebenfalls ungewöhnliche Spiroketalfunktion (Abbildung 1.3). Die Sequenzinformation des Aurafuron-Biosynthesegenclusters lag zu Beginn dieser Arbeit vor, vom Spirangien Biosynthesegenlocus war nach Schätzungen nur etwa die Hälfte der Sequenzinformation vorhanden (~40 kb). Um das Spirangien-Biosynthesegencluster zu vervollständigen, sollten entsprechende Cosmide aus einer Cosmidbank von *S. cellulorum* So ce90 identifiziert und sequenziert werden. Beide Biosynthesegencluster sollten annotiert und *in silico* analysiert werden. Durch gezielte Mutagenesen sollten die aufgestellten Hypothesen überprüft und die einzelnen Biosyntheseschritte im Detail untersucht werden. Dabei generierte neue Derivate sollten strukturell charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von regulatorischen Proteinen der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulorum* So ce90. Dabei sollte die nahe Verwandtschaft zum sequenzierten Modellstamm *S. cellulorum* So ce56 ausgenutzt werden, um solche Proteine zu identifizieren. Zum einen sollte versucht werden, regulatorische Proteine aus *S. cellulorum* So ce90, welche an die Epthilon-Promotorregion binden (identifiziert von Dr. Shwan Rachid), anhand der Ähnlichkeit zu Proteinen aus *S. cellulorum* So ce56 zu identifizieren. Zum anderen sollte versucht werden, in *S. cellulorum* So ce90 homologe Gene zu bereits experimentell charakterisierten Genen mit regulatorischer Funktion in *S. cellulorum* So ce56 zu finden. Potentielle regulatorische Gene sollten sequenziert, durch Insertionsmutagenese inaktiviert und der Effekt der Mutagenese auf die Sekundärstoffproduktion untersucht werden. Durch genetische Manipulation von identifizierten regulatorischen Genloci sollte zudem versucht werden, die Epthilonproduktion in *S. cellulorum* So ce90 zu steigern.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von den in Tabelle 2.1 angegebenen Firmen in p. A. Qualität bezogen.

*Tabelle 2.1: Chemikalien und ihre Bezugsquellen*

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Hersteller</b>                   |
|---|-------------------------------------|
| Aceton<br>Acetonitril<br>Chloroform<br>Ethanol<br>Ethylacetat<br>Methanol<br>2-Propanol   | J.T. Baker, Niederlande             |
| Casitone-Pepton (Caseinpepton)<br>Phyto-Pepton (Sojabohnenmehl)   | Becton Dickinson and Co., USA       |
| L-(Methyl- <sup>13</sup> C)-Methionin   | Cambridge Isotope Laboratories, USA |
| L-D <sub>3</sub> (5,5,5)-Leucin   | Deutero GmbH, Kastellaun            |
| Bacto-Agar<br>Casiton<br>Hefeextrakt<br>Trypton   | Difco, Augsburg                     |
| Agarose ultra PURE ®  | GIBCO/BRL, Eggenstein               |
| Ammoniumacetat<br>Natrium-EDTA<br>Kaliumhydroxid<br>Xylencyanol   | Fluka, Neu-Ulm                      |
| Bromphenolblau<br>Calciumchlorid-Dihydrat<br>Essigsäure<br>D(+)-Glucose-Monohydrat<br>Glycerin (87%)<br>Kaliumacetat<br>Kaliumdihydrogenphosphat<br>Kaliumnitrat<br>Magnesiumsulfat-Heptahydrat<br>Maltose-Monohydrat<br>Natriumacetat<br>Natriumchlorid<br>Natriumcitrat-Dihydrat<br>Natriumdithionit<br>Natriumhydroxid<br>Pepton | Merck, Darmstadt                    |

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Hersteller</b>                         |
|---|---|
| Salzsäure, 37% ig<br>Stärke, löslich  |   |
| BSA (Rinderserumalbumin)  | New England Biolabs (NEB), Schwalbach     |
| Magermilchpulver  | Oxoid, UK                                 |
| Amberlite ® XAD 16  | Rohm & Haas, Frankfurt                    |
| Ammoniumperoxidsulfat<br>Ampicillin<br>5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal)<br>Coomassie Brilliantblau 250R<br>Dimethylformamid<br>Dithioerythrol<br>Ethidiumbromidlösung (1%)<br>Formamid, deionisiert<br>HEPES<br>Hygromycin B<br>Maleinsäure<br>Natriumlaurylsulfat (SDS)<br>Roti® Phenol-Chloroform<br>Rotiphorese® Gel 30<br>TEMED<br>Triton ×100 | ROTH, Karlsruhe                           |
| Chloramphenicol<br>Gentamycinsulfat<br>Kanamycin A (Monosulfat)<br>Magnesiumsulfat<br>Natrium-Eisen-EDTA<br>Natriumsuccinat-Hexachlorat<br>N-Lauroylsacrosin, Na-Salz<br>Saccharose<br>Tetrazyklin<br>Tobramycin<br>Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIZMA ®<br>Base)   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen/St. Lewis, USA |

## 2.2 Lösungen und Puffer

Zur Herstellung sämtlicher in der vorliegenden Arbeit angegebenen Lösungen und Puffer wurde Reinstwasser verwendet, das mit einer MilliQ-Ionenaustauscheranlage der Firma Millipore bzw. Purelab ultra Anlage der Firma ELGA hergestellt wurde. Bei Bedarf wurde das Wasser für 20 min bei 121°C sterilisiert. War das Autoklavieren einer Lösung nicht möglich, wurde sie unter Verwendung eines Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Zusammensetzung und Lagerung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen ist in den folgenden Tabellen angegeben. Die pH-Werte sämtlicher Lösungen und Puffer wurden mit einem pH-Meter vom Typ Digital pH-Meter der Firma Knick eingestellt.

## 2.2.1 Lösungen und Puffer für Southern Blots und Kolonie-Hybridisierungen

Tabelle 2.2: Lösungen und Puffer für Southern Blots und Kolonie-Hybridisierungen

| Bezeichnung   | Bestandteile   |  | Sterilisationsverfahren und Lagerung                                       |
|---|--|--|--|
| Depurinierungslösung                                | HCl (1 M)<br>H <sub>2</sub> O  | 250 ml<br>ad 1 l                                       | bei RT lagern  |
| Denaturierungslösung 1                              | NaOH<br>NaCl (5 M)<br>H <sub>2</sub> O   | 20 g<br>333 ml<br>ad 1 l                               | bei RT lagern  |
| Denaturierungslösung 2<br>(Koloniehybridisierung)   | NaOH<br>NaCl<br>SDS (10 %)<br>H <sub>2</sub> O   | 20 g<br>87,7 g<br>10 ml<br>ad 1 l                      | bei RT lagern  |
| Neutralisierungslösung 1                            | Tris-HCl<br>(1M, pH 7,4)<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O   | 500 ml<br>175,4 g<br>ad 1 l                            | autoklavieren, bei RT lagern   |
| Neutralisierungslösung 2<br>(Koloniehybridisierung) | Trizma Base<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O  | 121,1 g<br>87,7 g<br>ad 1 l                            | pH mit HCl (10 M) auf 7,5<br>einstellen, autoklavieren, bei<br>RT lagern   |
| SSC (20x)   | NaCl<br>Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O   | 155,3 g<br>88,2 g<br>ad 1 l                            | pH mit NaOH (10 M) auf<br>7,0 einstellen, autoklavieren                    |
| N-Lauroylsarcosin (5 %)                             | N-Lauroylsarcosin<br>H <sub>2</sub> O  | 5 g<br>ad 100 ml                                       | autoklavieren, bei 4°C lagern  |
| Hybridisierungslösung                               | SSC (20x)<br>Blockierungslösung<br>(10 %)<br>SDS (10 %)<br>N-Lauroylsarcosin<br>(5 %)<br>Formamid (50 %)<br>H <sub>2</sub> O | 25 ml<br>20 ml<br>0,2 ml<br>2 ml<br>50 ml<br>ad 100 ml | autoklavieren, bei 4°C lagern  |
| 2x Waschlösung                                      | SSC (20x)<br>10 % SDS<br>H <sub>2</sub> O  | 100 ml<br>10 ml<br>ad 1 l                              | autoklavieren, bei RT lagern   |
| 1x Waschlösung                                      | SSC (20x)<br>10 % SDS<br>H <sub>2</sub> O  | 25 ml<br>10 ml<br>ad 1 l                               | autoklavieren, bei RT lagern   |
| Maleinsäurepuffer                                   | Maleinsäure<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O  | 11,61 g<br>8,8 g<br>ad 1 l                             | pH 7,5 mit NaOH einstellen,<br>autoklavieren, bei RT lagern                |
| Detektionspuffer                                    | Tris-HCl 1M<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O  | 100 ml<br>5,8 g<br>ad 1 l                              | mit 10 N NaOH auf pH 9,5<br>einstellen, autoklavieren und<br>bei RT lagern |
| “Stripping” Puffer                                  | NaOH<br>SDS (10%)<br>H <sub>2</sub> O  | 8 g<br>10 ml<br>ad 1 l                                 | bei RT lagern  |

## 2.2.2 Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 2.3: Lösungen und Puffer für molekularbiologische Arbeiten

| Bezeichnung                           | Bestandteile  |   | Sterilisationsverfahren und Lagerung |
|---------------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| Coomassie Brilliant Blue Lösung       | Brilliant Blue 250<br>H <sub>2</sub> O<br>Methanol<br>Essigsäure                    | 2 g<br>450 ml<br>450 ml<br>100 ml       | bei RT lagern                        |
| DNA-Auftragspuffer (6fach)            | Glycerin (87 %)<br>Bromphenolblau<br>Xylencyanol<br>H <sub>2</sub> O                | 3 ml<br>25 mg<br>25 mg<br>ad 10 ml      | bei RT lagern                        |
| EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)           | EDTA<br>NaOH<br>H <sub>2</sub> O  | 186 g<br>20 g<br>ad 1 l                 | autoklavieren, bei RT lagern         |
| Entfärbelösung                        | Essigsäure  | 10 %                                    | bei RT lagern                        |
| Glycerin 10%                          | Glycerin<br>H <sub>2</sub> O  | 115 ml<br>ad 1 l                        | autoklavieren, bei RT lagern         |
| Glycerin 50%                          | Glycerin (87%)<br>H <sub>2</sub> O  | 57,5 ml<br>ad 100 ml                    | autoklavieren, bei RT lagern         |
| GYT-Lösung                            | Glycerin<br>Hefeextrakt<br>Trypton<br>H <sub>2</sub> O                              | 20 ml<br>250 mg<br>500 mg<br>ad 200 ml  | autoklavieren, bei 4°C lagern        |
| IPTG-Lösung (0,1 M)                   | IPTG<br>H <sub>2</sub> O  | 240 mg<br>ad 10 ml                      | sterilfiltrieren, bei -20°C lagern   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M) | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O                                 | 174 g<br>ad 100 ml                      | bei RT lagern                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O                                 | 136 g<br>ad 100 ml                      | bei RT lagern                        |
| Lysispuffer                           | NaOH<br>SDS (10 %)<br>H <sub>2</sub> O  | 20 mM<br>10 ml<br>ad 100 ml             | bei RT lagern                        |
| Natriumacetat (1 M, pH 5,2)           | NaOAc x 3 H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O                                      | 41 g<br>ad 100 ml                       | pH-Wert mit Eisessig einstellen      |
| Natriumchlorid (5 M)                  | NaCl<br>H <sub>2</sub> O  | 580 g<br>ad 100 ml                      | autoklavieren, bei RT lagern         |
| Neutralisierungspuffer (P3-Puffer)    | 3 M Kaliumacetat<br>Eisessig<br>H <sub>2</sub> O                                    | 60 ml<br>11,5 ml<br>ad 100 ml           | autoklavieren, bei RT lagern         |
| RNase A-Lösung (1%)                   | RNase A (DNase-frei)<br>Tris-Puffer (1 M; pH 7,4)<br>NaCl (5 M)<br>H <sub>2</sub> O | 10 mg<br>10 µl<br><br>3 µl<br>ad 1 ml   | sterilfiltrieren, bei 4°C lagern     |
| SDS-Lösung (10 %)                     | SDS<br>H <sub>2</sub> O   | 10 g<br>ad 100 ml                       | bei RT lagern                        |
| SET-Puffer                            | Tris-HCl (1 M, pH 7,4)<br>NaCl (5 M)<br>EDTA (0,5 M, pH 8,0)<br>H <sub>2</sub> O    | 5 ml<br>3,75 ml<br>12,5 ml<br>ad 250 ml | autoklavieren, bei RT lagern         |

| <b>Bezeichnung</b>                                 | <b>Bestandteile</b>   |  | <b>Sterilisationsverfahren und Lagerung</b>   |
|--|---|--|---|
| SM-Puffer  | Tris-HCl (1 M, pH 7,4)<br>NaCl<br>MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O<br>Gelatine-Lösung (2 %)<br>H <sub>2</sub> O | 50 ml<br>5,4 g<br>2 g<br>5 ml<br>ad 1 l      | autoklavieren, bei RT lagern  |
| STET-Puffer  | Saccharose<br>Tris-HCl (1 M, pH 7,4)<br>EDTA (0,5 M, pH 8,0)<br>Triton X-100<br>H <sub>2</sub> O                      | 8,55 g<br>5 ml<br>10 ml<br>5 ml<br>ad 100 ml | autoklavieren, bei RT lagern  |
| TAE-Puffer (50fach)                                | TRIZMA®Base<br>Eisessig<br>EDTA (0,5 M, pH 8,0)<br>H <sub>2</sub> O   | 242 g<br>57,1 ml<br>100 ml<br>ad 1 l         | bei RT lagern   |
| TBE-Puffer (1x), pH 8                              | TRIZMA®Base<br>Borsäure<br>Na-EDTA<br>H <sub>2</sub> O  | 89 mM<br>89 mM<br>2 mM<br>ad 1 l             | Autoklavieren, bei RT lagern  |
| TE-Puffer (pH 7,4)                                 | Tris-HCl (1 M, pH 7,4)<br>EDTA (0,5 M, pH 8,0)<br>H <sub>2</sub> O  | 5 ml<br>1 ml<br>ad 500 ml                    | Autoklavieren, bei RT lagern  |
| Tris-HCl (1 M, pH 7,4)                             | TRIZMA®Base<br>H <sub>2</sub> O   | 60,5 g<br>ad 500 ml                          | Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern |
| Tris-HCl (1 M, pH 8,0)                             | TRIZMA®Base<br>H <sub>2</sub> O   | 60,5 g<br>ad 500 ml                          | Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern |
| Waschpuffer (für elektrokompetente Zellen), pH 7,2 | CaCl <sub>2</sub><br>HEPES<br>H <sub>2</sub> O  | 0,5 mM<br>5 mM<br>ad 1 l                     | pH Wert mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei RT lagern   |
| X-Gal-Lösung                                       | X-Gal<br>Dimethylformamid   | 400 mg<br>ad 10 ml                           | Bei -20°C lagern  |
| Zelllysispuffer (P2 Puffer)                        | NaOH<br>10 % SDS<br>H <sub>2</sub> O  | 20 mM<br>10 ml<br>ad 100 ml                  | autoklavieren, bei RT lagern  |
| Zellsuspensionspuffer (P1 Puffer)                  | Glucose<br>Tris<br>EDTA<br>H <sub>2</sub> O   | 5 mM<br>2,5 mM<br>1 mM<br>ad 100 ml          | autoklavieren, bei RT lagern  |

### 2.2.3 Lösungen für den Zusatz zu Medien

Tabelle 2.4: Lösungen für den Zusatz zu Medien

| Bezeichnung                                 | Bestandteile   |                                  | Sterilisationsverfahren und Lagerung |
|---|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| 8 g/l NaFe-EDTA                             | NaFe-EDTA<br>H <sub>2</sub> O                              | 800 mg<br>100 ml                 | Autoklavieren, bei RT lagern         |
| 0,65 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O        | 650 mg<br>100 ml                 | Autoklavieren, bei RT lagern         |
| 35 % Glucose                                | Glucose<br>H <sub>2</sub> O                                | 35 g<br>100 ml H <sub>2</sub> O  | Sterilfiltrieren, bei RT lagern      |
| 10 % CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O | 10 g<br>100 ml H <sub>2</sub> O  | Autoklavieren, bei RT lagern         |
| 5 % (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>       | (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub><br>H <sub>2</sub> O      | 5 g<br>100 ml H <sub>2</sub> O   | Autoklavieren, bei RT lagern         |
| 1,04 % Na-Dithionit                         | Na-Dithionit<br>H <sub>2</sub> O                           | 104 mg<br>10 ml H <sub>2</sub> O | Sterilfiltrieren, frisch herstellen  |

### 2.2.4 Antibiotika-Stocklösungen

Von den in dieser Arbeit eingesetzten Antibiotika wurden Stocklösungen hergestellt, die sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert wurden. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurden sie bis zur gewünschten Endkonzentration zugegeben.

Tabelle 2.5: Antibiotika-Stocklösungen

| Antibiotikum    | Stocklösung                | Endkonzentration   | Herstellung und Lagerung                          |
|-----------------|----------------------------|--|---|
| Ampicillin      | 100 mg/ml H <sub>2</sub> O | 100 µg/ml<br>50 µg/ml (low copy Vektor)                        | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Chloramphenicol | 25 mg/ml EtOH              | 25 µg/ml   | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Gentamycin      | 15 mg/ml H <sub>2</sub> O  | 15 µg/ml   | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Hygromycin      | 100 mg/ml H <sub>2</sub> O | <i>S. cellulosum</i> : 150 µg/ml<br><i>E. coli</i> : 100 µg/ml | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Kanamycin       | 50 mg/ml H <sub>2</sub> O  | 50 µg/ml   | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Tetrazyklin     | 12,5 µg/ml<br>MeOH         | 12,5 µg/ml   | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |
| Tobramycin      | 100 µg/ml                  | 120 µg/ml  | Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern |

## 2.3 Medien

Sämtliche Flüssig- und Festmedien wurden durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den jeweiligen Medien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Zur Herstellung von Softmedien wurde 0,75 % (w/v) Agar zugesetzt.

### 2.3.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Tabelle 2.6: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von *E. coli*

| Medium              | Zusammensetzung                                    |                               | Sterilisationsverfahren und Lagerung                              |
|---------------------|--|-------------------------------|---|
| LB-Medium           | Trypton<br>Hefeextrakt<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O | 10 g<br>5 g<br>5 g<br>ad 1 l  | mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern |
| 2YT                 | Trypton<br>Hefeextrakt<br>NaCl<br>H <sub>2</sub> O | 20 g<br>10 g<br>5 g<br>ad 1 l | mit 10 M NaOH pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern     |
| 2YT + 7,5% Glycerin | 2YT Medium<br>Glycerin 50 %ig                      | 425 ml<br>75 ml               | mit 10 M NaOH pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern     |

### 2.3.2 Medien für die Kultivierung von Myxobakterien

Für die Herstellung der Medien wurden die nach dem Autoklavieren zugegebenen Substanzen als 100 x bzw. 1000 x Stocklösungen eingesetzt.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Medien zur Kultivierung von Myxobakterien

| Medium                           | Zusammensetzung   |   | Sterilisationsverfahren und Lagerung                                  |
|----------------------------------|---|---|---|
| Trypton-Medium                   | Trypton<br>MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O   | 10 g<br>2 g<br>ad 1 l                                       | pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern |
| Trypton-Medium mit 5% Saccharose | Saccharose<br>Trypton-Medium  | 50 g<br>ad 1 l  | pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern |
| Probion-Medium                   | Stärke<br>Probion<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O<br>HEPES<br>H <sub>2</sub> O                       | 3 g<br>3 g<br>2 g<br>0,5 g<br>12 g<br>ad 1 l                | pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern |
| G51t-Medium                      | Stärke<br>Trypton<br>Probion<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O<br>HEPES<br>Glucose<br>H <sub>2</sub> O | 5 g<br>2 g<br>1g<br>0,5 g<br>0,5 g<br>12 g<br>2 g<br>ad 1 l | pH mit KOH (10 M) auf 7,4 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern |

| Medium                  | Zusammensetzung  | Sterilisationsverfahren und Lagerung  |  |
|-------------------------|--|---|--|
| E-Medium                | Magermilchpulver<br>Sojabohnenmehl<br>Hefeextrakt<br>Stärke<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O<br>8 g/l Fe-EDTA<br>HEPES<br>Glycerol 87 % ig<br>H <sub>2</sub> O   | 4 g<br>4 g<br>2 g<br>10 g<br>1 g<br>1 g<br>1 ml<br>12 g<br>5 g<br>Ad 1l                                     | pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen, autoklavieren und bei RT gelagert  |
| P-Agar                  | Probion<br>Pepton<br>Stärke<br>CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O<br>Glucose<br>Agar<br>HEPES<br>H <sub>2</sub> O  | 1 g<br>2 g<br>5 g<br>0,5 g<br>0,5 g<br>2g<br>15 g<br>12 g<br>Ad 1l  | pH mit KOH (10 M) auf 7,6 einstellen, autoklavieren und bei RT gelagert  |
| Plattierungs-Agar (PMM) | Agar<br>Casein-Pepton<br>MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O<br>HEPES<br>H <sub>2</sub> O<br><br>5 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>10 % CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>8 g/l Fe-EDTA<br>0,65 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>35 % Glucose<br>1,04 % Natriumdithionit<br>Autoklavierte Flüssigkultur von <i>S. cellulosum</i> So ce90 (5 Tage gewachsen, G51t-Medium) | 15 g<br>0,5 g<br>1,5 g<br>12 g<br>ad 1 l<br><br>10 ml<br>10 ml<br>1 ml<br>10 ml<br>10 ml<br>10 ml<br>100 ml | Grundmedium mit KOH (10 M) auf pH 7,4 einstellen. Zusätze nach dem Autoklavieren steril zugeben und den Agar sofort verarbeiten, Platten kurzzeitig bei 4°C lagern |

## 2.4 Enzyme, „Kits“ und Marker

Die verwendeten Enzyme und „Kits“ wurden von den in Tabelle 2.8 angegebenen Firmen bezogen und nach Anweisungen der Hersteller eingesetzt.

Tabelle 2.8: Verwendete Enzyme, „Kits“ und Marker, sowie deren Bezugsquellen

| Produkt  | Hersteller                                |
|--|---|
| Prestained Protein Marker  | Biorad, München                           |
| 1kb-DNA Ladder<br>Klenow Large Fragment of DNA Polymerase I<br>Oligonukleotide<br>Proteinase K<br>Taq DNA-Polymerase | GIBCO/BRL (Life Technologies), Eggenstein |
| Puregene TM DNA Isolation Kit  | Gentra Systems, USA                       |
| TOPO TA Cloning® Kit, Version K<br>TOPO XL Cloning® Kit  | Invitrogen, USA                           |

| <b>Produkt</b>  | <b>Hersteller</b>                     |
|---|---------------------------------------|
| Nucleospin® Extract<br>Nucleospin® Plasmid  | Macherey und Nagel, Düren             |
| Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)<br>100 bp-DNA Ladder  | New England Biolabs (NEB), Schwalbach |
| Restriktionsendonukleasen<br>T4-DNA Ligase  | MBI Fermentas, St. Leon-Rot           |
| Ribonuklease A (RNase, DNase frei)  | ROTH, Karlsruhe                       |
| Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade<br>DIG-Labeling and Detection "Kit"<br>DIG labelled DNA Molecular Weight Marker III<br>DIG Easy Hyb<br>DIG PCR Labeling Mix<br>DIG Gel Shift Kit | Roche, Penzberg                       |
| Cloned Pfu DNA-Polymerase<br>Gigapack®II XL Packaging Extract   | Stratagene, USA                       |
| HotStar Taq Polymerase  | Qiagen, Hilden                        |

## 2.5 Geräte und Materialien

### Agarosegelelektrophorese

|  |                |
|--|----------------|
| Standard Power Pack 25                 | (Fa. Biometra) |
| Elektrophoresekammer SUB-CELL® GT      | (Fa. Biorad)   |
| Elektrophoresekammer MINI-SUB-CELL® GT | (Fa. Biorad)   |
| Elektrophoresekammer TYP Minigel       | (Fa. Biometra) |

### Bilddokumentation

|  |             |
|--|-------------|
| UV-System Version1.73a digit store duo | (Fa. Intas) |
|--|-------------|

### Elektroporator

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Gene pulser/Pulse Kontroller     | (Fa. Biorad) |
| Elektroporationsküvetten, 0,1 cm | (Fa. Biorad) |

### Elektroblotter

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell | (Fa. Biorad) |
|--------------------------------------|--------------|

### French Press

(Fa. SLM Aminco)

### HPLC

|                     |              |
|---------------------|--------------|
| DAD-gekoppelte HPLC | (Fa. Dionex) |
|---------------------|--------------|

### HPLC-MS

|                                |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| Agilent 110 series HPLC system | (Fa. Agilent)         |
| Bruker HCTplus                 | (Fa. Bruker)          |
| Bruker micrOTOF                | (Fa. Bruker)          |
| LTQ-Orbitrap                   | (Fa. Thermo Finnigan) |

**NMR**

Bruker Advance 500 (Fa. Bruker)

**DC**

Alugram®SL G/UV<sub>254</sub> TLC Platten (Fa. Macherey & Nagel)

**Inkubatoren**

Inkubationsschränke (Fa. Binder)

Hybridisierungsöfen APT Line Series BFED (Fa. Binder)

Schüttelinkubatoren (Fa. Infors)

**PCR**

Mastercycler Gradient (Fa. Eppendorf)

**pH-Messungen**

pH-Meter 766 Calimatic (Fa. Knick)

**Photometer**

Ultrospec 2100 pro (Fa. Pharmacia)

BioPhotometer (Fa. Eppendorf)

**Sterilisation**

Autoclav Fedegari (Fa. Tecnomara AG)

Systec V150 (Fa. Systec)

**Ultraschallbad**

Sonarex (Fa. Bandelin)

**Wasseraufbereitung**

Milli-Q water purification system (Fa. Milipore)

PURELAB *ultra* (Fa. ELGA)

**Werkbank**

HeraeusLaminAir® (Fa. Kendro)

Hera Safe (Fa. Kendro)

**Zentrifugen**

Kühlzentrifuge 5805R (Fa. Eppendorf)

Tischzentrifuge 5415D (Fa. Eppendorf)

RC-5B Kühlzentrifuge (Fa. DuPont Instruments)

Kühlzentrifuge Avanti JE (Fa. Beckmann Coulter)

## Sonstige Materialien

|                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| InCert Diagnose               | (FMC Bioproducts)        |
| SeaKem LE Agarose             | (FMC Bioproducts)        |
| GTG SeaPlaque Agarose         | (FMC Bioproducts)        |
| Membranfilter 0,22 µm         | (Fa. Milipore)           |
| Nylonmembran, positiv geladen | (Fa. Roche)              |
| Microspin Column              | (Fa. Amersham Pharmacia) |

## 2.6 Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide

### 2.6.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.9: Eingesetzte Bakterienstämme

| Organismus                     | Genotyp bzw. Eigenschaft  | Referenz   |
|--------------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> SURE®           | <i>e14 (McrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac rec B rec J sbcC umuC::Tn5(Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB laqIq ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup></i> | Greener <i>et al.</i> (1990),<br>Stratagene, USA |
| <i>E. coli</i> TOP10           | <i>F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZAM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i>   | Invitrogen, USA                                  |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue        | <i>F::Tn10 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacF<sup>l</sup> Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Tet<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac</i>     | Bullock <i>et al.</i> (1987)                     |
| <i>E. coli</i> DH10B           | <i>F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZAM15 ΔlacZΔX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λrpsL nupG</i>   | Grant <i>et al.</i> (1990)                       |
| <i>E. coli</i> BI21            | <i>B FP-P ompT hsdS (rBBPB-P mBBPB-P) gal dcm</i>   | Studier <i>et al.</i> , (1986)                   |
| <i>E. coli</i> ET12567         | <i>dam dcm hsdS Cm<sup>I</sup></i>  | MacNeil <i>et al.</i> (1988)                     |
| <i>E. coli</i> SCS110          | <i>rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZAM15]</i>  | Stratagene, USA                                  |
| <i>E. coli</i> HB101           | <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Strr) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS-(r-m-)</i>  | Stratagene, USA                                  |
| <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1   | Gentamycin-resistent, Produzent von Aurafuronen, DKxanthenen, Myxochromiden, Myxothiazol  | Qualls <i>et al.</i> (1978)                      |
| ERM4                           | Markerlose Deletionsmutante von <i>mtaF</i> in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1, keine Myxothiazol-Produktion   | S. Weinig (Dissertation 2003)                    |
| <i>S. cellulorum</i> So ce90A1 | Einzelklon des Wildisolates, Produzent von Spirangienen und Epothilonen, Tobramycin-resistent   | Stammsammlung HZI (ehemals GBF)                  |

| Organismus                         | Genotyp bzw. Eigenschaft  | Referenz                         |
|------------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>S. cellulorum</i><br>So ce90D48 | UV-Mutante von So ce90A6, produziert keine Spirangiene und nur Spuren Epothilon A und B, aber Epothilon C und D | K. Gerth, persönliche Mitteilung |

## 2.6.2 In dieser Arbeit hergestellte Mutanten

### 2.6.2.1 Mutanten von *S. aurantiaca* DW4/3-1

Tabelle 2.10: Im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Mutanten von *S. aurantiaca* DW4/3-1

| Mutante                 | Mutagenese  | Beschreibung                                    |
|-------------------------|---|---|
| BFAKR3                  | Insertion von pBF_AKR3 in ERM4  | <i>aufD</i> ::pBF_AKR3                          |
| BFAKR3-3                | Markerlose Mutante von BFAKR3 nach Elimination des insertierten Vektors („Doppelcrossover“-Mutante) | KR AufD2 (Y3189F)                               |
| BFAKR5-2                | Insertion von pBF_AKR5 in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1  | <i>aufF</i> ::pBF_AKR5                          |
| E3-2                    | Insertion von pBFA3 in ERM4   | <i>aufA</i> ::pBFA3                             |
| BFAPA<br>(alias E3-2-3) | Markerlose Mutante von E3-2 nach Elimination des insertierten Vektors („Doppelcrossover“-Mutante)   | $\Delta$ <i>aufA</i> (303 bp Deletion, 560-863) |
| BFABK                   | Insertion von pBF_ABS in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1   | <i>aufB</i> ::pBF_ABS                           |
| BFAPC                   | Insertion von pBF_APC in <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1   | <i>aufH</i> ::pBF_APC                           |
| BFAPC2-3                | Markerlose Mutante von BFAPC nach Elimination des insertierten Vektors („Doppelcrossover“-Mutante)  | $\Delta$ <i>aufH</i> (312 bp Deletion, 538-850) |
| E1-4                    | Insertion von pBFA1 in ERM4   | <i>aufJ</i> ::pBFA1                             |
| BFAMD<br>(alias E1-4-1) | Markerlose Mutante von E1-4 nach Elimination des insertierten Vektors („Doppelcrossover“-Mutante)   | $\Delta$ <i>aufJ</i> (306 bp Deletion, 586-892) |

### 2.6.2.2 Mutanten von *S. cellulorum* So ce90

#### 2.6.2.2.1 Mutanten des Spirangien-Biosynthesegenlocus

Tabelle 2.11: Im Rahmen der Arbeit generierte Mutanten des Spirangien-Biosynthesegenlocus

| Mutante | Mutagenese  | Beschreibung               |
|---------|---|----------------------------|
| BFSA-12 | Insertion von pBFS_A in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | <i>spiA</i> ::pBFS_A       |
| BFSB-11 | Insertion von pBFS_B in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | <i>spiB</i> ::pBFS_B       |
| BFSC    | Insertion von pBFS_C in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | <i>spiC</i> ::pBFS_C       |
| BFSCP-6 | Insertion von pBFS_CP in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1 | siehe Ergebnisse 4.1.4.3.3 |
| BFSK-2  | Insertion von pBFS_K in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | <i>spiK</i> ::pBFS_K       |

#### 2.6.2.2.2 Weitere Mutanten von *S. cellulorum* So ce90

Tabelle 2.12: Weitere Mutanten von *S. cellulorum* So ce90

| Mutante | Mutagenese   | Beschreibung          |
|---------|--|-----------------------|
| BFA3KO  | (Insertion von pPbP3KO in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1)          | siehe Ergebnisse, 4.2 |
| BFDA1   | Insertion von pSChiR in <i>S. cellulorum</i> So ce90D48            | <i>deoRA</i> ::pSChiR |
| BFDA2   | Insertion von pSChiR (S. Rachid) in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1 | <i>deoRA</i> ::pSChiR |

| Mutante                         | Mutagenese   | Beschreibung                                  |
|---------------------------------|--|---|
| PbP3KO1,<br>PbP3KOA,<br>PbP3KOE | Insertion von pPbP3KO in <i>S. cellulorum</i> So ce90D48 | <i>deoRB</i> ::pPbP3KO                        |
| A3KO-5, -6,<br>-10              | Insertion von pPbP3KO in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1  | <i>deoRB</i> ::pPbP3KO                        |
| PbP4KO                          | Insertion von pPbP4KO in <i>S. cellulorum</i> So ce90D48 | <i>pbp4</i> ::pPbP4KO                         |
| BF_PDA2-1,<br>-2, -4, -5, -6    | Insertion von pBF_PDA2 in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1 | <i>deoRA</i> unter Kontrolle von <i>ptet</i>  |
| BF_PDA3                         | Insertion von pBF_PDA3 in <i>S. cellulorum</i> So ce90A1 | <i>deoRA</i> unter Kontrolle von <i>pT7A1</i> |

### 2.6.3 Verwendete Vektoren

Tabelle 2.13: Verwendete Vektoren

| Vektor                  | Beschreibung   | Referenz                                      |
|-------------------------|--|---|
| pCR®2.1 Topo            | LacZ $\alpha$ , T7 Promotor, fl ori, <i>neoR</i> , <i>bla</i> , pUC origin | Invitrogen, USA                               |
| pBSII (+) (pBluescript) | <i>bla</i> , LacZ', ColE1 ori  | Stratagene, USA                               |
| SuperCosI               | <i>neoR</i> , <i>bla</i> , pUC origin, cos, SV40 promotor, T3              | Stratagene, USA                               |
| pSUPHyg                 | pSUP102 Derivat mit Hygromycin-Resistenzgen                                | J. Knauber (Dissertation 2005)                |
| pSUPKan                 | pSUP102 Derivat mit Kanamycin-Resistenzgen                                 | Y. Chai, A. Sandmann (persönliche Mitteilung) |
| pSWU41                  | pBluescript-Derivat, <i>kanR</i> , <i>sacB</i>                             | Wu und Kaiser (1996)                          |
| pTopoPro                | aphII Promotor in pCR®2.1 Topo   | Pradella et al. (2002)                        |
| pGEX-6P-1               | tac Promotor, lac Operator, lacI <sup>q</sup> , <i>ampR</i> , GST          | Amersham Biosciences, Freiburg                |

### 2.6.4 Plasmide und deren Konstruktion

Tabelle 2.14: Im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide und deren Konstruktion

| Plasmid  | Konstruktion  |
|----------|---|
| pBFA3    | 559 bp PCR-Amplifikat Aur9/Aur10 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>SacI/PstI</i> und 572 bp PCR-Amplifikat Aur11/Aur12 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>PstI/XbaI</i> in pSWU41 $\downarrow$ <i>SacI/XbaI</i>  |
| pBF_ABS  | 874 bp PCR-Amplifikat BF_AB1/BF_AB2 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>HindIII</i> ergibt ein 581 bp Fragment, ligiert in pSUPKan $\downarrow$ <i>HindIII</i>  |
| pBF_APC  | 883 bp PCR-Amplifikat BF_APC1/Aur6 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>NotI/KpnI</i> und 702 bp PCR-Amplifikat Aur7/BF_APC2 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>KpnI/SpeI</i> in pSWU41 $\downarrow$ <i>NotI/SpeI</i>   |
| pBFA1    | 585 bp PCR-Amplifikat Aur1/Aur2 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 $\downarrow$ <i>SacI/PstI</i> und 617 bp PCR-Amplifikat von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 Aur3n/Aur4 $\downarrow$ <i>PstI/XbaI</i> in pSWU41 $\downarrow$ <i>SacI/XbaI</i>  |
| pBF_AKR3 | pKR3-5 (1,55kb overlap-extension PCR-Amplifikat BFAKR3-1/BFAKR3-4 von 801 bp PCR-Amplifikat BFAKR3-1/BFAKR3-2 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 und 783 bp PCR-Amplifikat BFAKR3-3/BFAKR3-4 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 in pCR®2.1 Topo) $\downarrow$ <i>BamHI/XbaI</i> in pSWU41 <i>BamHI/XbaI</i> |

| Plasmid                 | Konstruktion   |
|-------------------------|--|
| pBF_AKR5                | pKR5-5 (1,58 kb overlap-extension PCR-Amplifikat BFAKR5-1/BFAKR5-4 von 582 bp PCR-Amplifikat BFAKR5-1/BFAKR5-2 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 und 924 bp PCR-Amplifikat BFAKR5-3/BFAKR5-4 von gDNA <i>S. aurantiaca</i> DW4/3-1 in pCR®2.1 Topo) $\downarrow$ BamHI/XbaI in pSWU41 BamHI/XbaI |
| pSpiL                   | 3,8 kb PCR-Amplifikat (BFS1/BFS2) von Cosmid c48 in pCR®-XL-Topo®  |
| pBFS_A                  | 489 bp PCR-Amplifikat (BF_SA1/BF_SA2) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ HindIII/NdeI und 408 bp PCR-Amplifikat (BF_SA3/BF_SA4) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ NdeI/BamHI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pBFS_B                  | 654 bp PCR-Amplifikat (BF_SB1/BF_SB2) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ HindIII/NdeI und 319 bp PCR-Amplifikat (BF_SB3/BF_SB4) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ NdeI/BamHI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pBFS_C                  | 880 bp PCR-Amplifikat (BF_SC1/BF_SC2) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ NdeI/BamHI und 356 bp Fragment vom pTopoPro $\downarrow$ HindIII/NdeI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII   |
| pBFS_CP                 | 1279 bp PCR-Amplifikat (BF_SC1/BF_SC3) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ NdeI/BamHI und 356 bp Fragment von pTopoPro $\downarrow$ HindIII/NdeI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pBFS_K                  | 432 bp PCR-Amplifikat (BF_SK1/BF_SK2) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ HindIII/NdeI und 450 bp PCR-Amplifikat (BF_SK3/BF_SK4) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 $\downarrow$ NdeI/BamHI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pEpoF1, 2, 3            | 1260 bp Amplifikat (EpoFF/EpoFR) von gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90D48 in pCR®2.1Topo   |
| pPbP4                   | 2,2 kb PCR-Amplifikat (His-reg2-.up/His-reg2-dn) von c43 in pCR®2.1Topo  |
| pPbP4KO                 | 905 bp Amplifikat (PbP4KOup/PbP4KOdn) von pPbP4 $\downarrow$ BamHI/HindIII in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII   |
| pPbP3                   | 0,9 kb Amplifikat (DeoR-like-up/DeoR-like-dn) von c31 in pCR®2.1Topo   |
| pPbPA3                  | 3,9 kb Fragment von c31 $\downarrow$ BamHI in pBSII(+) $\downarrow$ BamHI  |
| pPbP3KO                 | 661 bp Amplifikat (PbP3KO1/PbP3KO2) von c31 $\downarrow$ BamHI/NdeI und 528 bp Amplifikat (PbP3KO3/PbP3KO4) von c31 $\downarrow$ NdeI/HindIII in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pDA-RM                  | gDNA BFDA2 $\downarrow$ MluI, religiert und transformiert in <i>E. coli</i> DH10B, <i>deoRA</i> Sequenz  |
| pDA-RMBS-2              | 3 kb Fragment von pDA-RM $\downarrow$ BamHI/HindIII in pBSII(+) $\downarrow$ BamHI/HindIII   |
| pDA90-1, -2, -3, -4     | 0,9 kb PCR Amplifikat (DA5'/DA3') gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 in pCR®2.1Topo   |
| pBF_PDA2                | 0,55 kb Insert pPDA2.2 $\downarrow$ NdeI/HindIII und 0,8 kb Insert pTopoPtetR $\downarrow$ BamHI/NdeI in pSUPHyg $\downarrow$ BamHI/HindIII  |
| pPDA2.2                 | 550 bp Amplifikat (BF_PDA3/BF_PDA4) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 in pCR2.1Topo  |
| pTopoPtetR (= pPDA2.-8) | 792 bp Amplifikat (BF_PDA5/BF_PDA6) von pCT2 (H.B.Bode/T. Mignot; pBJ113-Derivat mit <i>tetR</i> und <i>ptet</i> ) in pCR2.1Topo   |
| pBF_PDA3                | 0,9 kb Insert pPDA5X6 $\downarrow$ HindIII in pSUPHyg $\downarrow$ HindIII   |
| pPDA3-25                | 830 bp Amplifikat (BF_PDA7/BF_PDA8) gDNA <i>S. cellulorum</i> So ce90 in pCR®2.1Topo   |
| pPDA4-24                | 0,8 kb Insert pPDA3-25 $\downarrow$ EcoRI in pPDA3-25 $\downarrow$ EcoRI (andere Orientierung)   |
| pPDA5X6                 | 0,8 kb Insert pPDA4-24 $\downarrow$ NdeI/XbaI in pEpo-1b $\downarrow$ NdeI/XbaI  |
| pEpo-1b                 | 945 bp PCR Amplifikat (BFEPa1/BFEPa2) in pCR2.1Topo  |
| pGEX-DA                 | 0,8 kb Insert pTopoDAGEX $\downarrow$ BglII/EcoRI in pGEX-6P-1 $\downarrow$ BamHI/EcoRI  |
| pTopoDAGEX              | 825 bp PCR Amplifikat (DAGEXu/DAGEXl) in pCR®2.1Topo   |

## 2.6.5 Oligonukleotide

Tabelle 2.15: Im Rahmen dieser Arbeit generierte Oligonukleotide

| Oligonukleotid | Oligonukleotidsequenz (5' – 3')    |
|----------------|------------------------------------|
| Aur9           | GACGAGAGCTCCTATGTCGACAACGACCC      |
| Aur10          | GCGCGTCTGCAGATACCTCCACCAGCAGGC     |
| Aur11          | CGTTCGCTGCAGACCACGTCATCCGGACTG     |
| Aur12          | CGATCGTCTAGATGTCAGAGTCGCTCGACC     |
| BF_AB1         | AGGTCTTCGCCCCGCCTG                 |
| BF_AB2         | CGTGTACGAATCCGGATG                 |
| BF_APC1        | GCGGCG GCGGCCGCTCGGCTCGACGAAGAG    |
| BF_APC2        | TGCGCCACTAGTCTTACGAACCAGCGCGATC    |
| Aur6           | AGAGTTGGTACCCGAACGCGCTGCTTGAG      |
| Aur7           | TGCACCGGTACCCGGAGAC                |
| Aur1           | CAGATGGAGCTCGAGGGCAATGACATG        |
| Aur2           | TTCGCGCTGCAGCGAATTCGCCCTCCACC      |
| Aur3n          | TCGGGACTGCAGCAGGACGTTTCGCAACCTG    |
| Aur4           | GATCAGTCTAGACAGCGCTTTGGGTTGCTG     |
| BFAKR3-1       | GTGGCTGTATGCTGTTAGAG               |
| BFAKR3-2       | GCCAAGCAAGCTTTGCGGCTGCCAACGCATTC   |
| BFAKR3-3       | GCCGCAAAGCTTGCTTGGCCGTGAGGGC       |
| BFAKR3-4       | ACGAGGATCGAGCGCCACT                |
| BFAKR5-1       | GACGGTGCCGCCGTTTG                  |
| BFAKR5-2       | GGCCGCGAAGCTTGCTTGACCGGGCGATCCC    |
| BFAKR5-3       | GTCAAGCAAGCTTCGCGGCCGCCAATGCC      |
| BFAKR5-4       | GCATCACGATCCCACCTGTC               |
| BFS1           | AGCGCGGAGACGTGGAC                  |
| BFS2           | CGTGACGTGAGCTCCGG                  |
| BF_SA1         | GATCACAAGCTTAGGAGGGACCACGGTGTC     |
| BF_SA2         | GTTGCTCATATGATCGTCCTCGATCGCCGCAC   |
| BF_SA3         | ATGCAGCATATGACCACAATGGCCTCTGCC     |
| BF_SA4         | GGGCGGGGATCCTCGTCTCCTCACGGAC       |
| BF_SB1         | TGCGCGAAGCTTGCGCAAGTCCGTGAGGAG     |
| BF_SB2         | CAGTTCATATGAGCGTCGCAAGCGCAGTG      |
| BF_SB3         | CTTTGACATATGTGGGCTGAATCCACGAGAGC   |
| BF_SB4         | GGGAGGGGATCCACGGAGACGTGCGCCGTC     |
| BF_SC1         | TCGACCCATATGAGGCCTCACCCCGCCCA      |
| BF_SC2         | GACGACGGATCCGCGCCCCAGGCTGATCGAC    |
| BF_SC3         | CGCGACGGATCCGACGCTTG               |
| BF_SK1         | TCCCGCAAGCTTGAGCTCGGGCACCAGATCT    |
| BF_SK2         | AATTGTTTCATATGTACGCGGGATCTCTCATGAC |
| BF_SK3         | TACGAACATATGATTTCGCGGGCGGCTACGT    |
| BF_SK4         | GGAAAGACCTCGGGATCCAG               |
| EpoFF          | TAGGAGATCATATGACACAGGAGCAAGCGA     |
| EpoFR          | CGCGAATTCTCCAGCTTTGGAGGGCTTC       |
| His-reg2-.up   | GGCGGCTTCGACGACCACTA               |
| His-reg2-.dn   | TCCTTCACCTCCCCTCCAG                |
| PbP4KUp        | TCGCGGATCCTGAGTCATCCAGCCCATG       |
| PbP4KOn        | GTGTGCAAGCTTGTCGACCGAGATCATC       |
| DeoR-like-up   | CCCGCGGGATGAGAGGAAGCTA             |
| DeoR-like-dn   | AACCCGAGGTGGAACGCGAG               |
| PbP3KO1        | CAGTTCGGATCCGTTGATCGAGCAGTACTC     |
| PbP3KO2        | CCGGGGCATATGGCGTGCACCGGGTAC        |
| PbP3KO3        | GCGGCCCATATGGGGCATCGGCGGGG         |

| <b>Oligonukleotid</b> | <b>Oligonukleotidsequenz (5' – 3')</b>  |
|-----------------------|---|
| PbP3KO4               | GACACGAAGCTTGGCGGCCACGTCCTC   |
| DA5'                  | TGTTGGAACGCCGGTGTC  |
| DA3'                  | CGCAAGCAAGTACGTGCAC   |
| BF_PDA3               | TACGTGCATATGCAAATAGGAACAAACGTGC   |
| BF_PDA4               | TGCACAAAGCTTCCGAGATAGCAGAGGTC   |
| BF_PDA5               | TACCAACATATGTTTCGCGA AGGCCTCCCG   |
| BF_PDA6               | CTCCGGGGATCCGCGGTCCT GATCAATCGTC  |
| BF_PDA7               | AGATCT TTATCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTA<br>ACCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGCATATGCAAA<br>TAGGAACAAACGTGC          |
| BF_PDA8               | AACGCCAAGCTTTGTCTGGAGCGCCGCTAC  |
| BFEPA1                | GGATCC TTATCAAAA GAGTATTGACTTAAAGTCTA<br>ACCTATAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGCATATGCTGA<br>GGATGTGCCCCGTC           |
| BFEPA2                | AAGCTTCCATTAAATACTAGTTAACCAATTGTCGGATCA<br>CCGCCAATATCAAGCTTCCATTTAAATACTAGTTAACCAA<br>TTGTCGGATCACCGCCAATATC |
| PSUPHyg rev           | GGTGATGTCCGCGATATAGG  |
| BF_PDA3-2             | CGCCTGCGTGATGGTGAC  |
| BFSP1                 | GATGCCGATGATACACGTG   |
| BFSP2                 | TGCGTTCCGCCGAAGAC   |
| BFSP3                 | CACGTGGGCGCGCTCAC   |
| BFSP4                 | CGGACCGCGAGCGCA   |
| BFSP5                 | ATTTGACCCGCGGGTG  |
| BFSP6                 | CAAGCGAGAAGGAGCGAG  |
| BFEP1                 | CTTCCGCACCTCGAGCGAG   |
| Epo-non-biotin-dn     | GCACATCCTCAGCGGCTGAC  |
| DAGEXu                | GAACAAAGATCTGTGCAAAATAACGCAGACAA  |
| DAGEXl                | CCGCTGGAATTCCTACGCCGGCTCCTCC  |
| BF_SH1                | CGGAGATCGCATCGATGTC   |
| BF_SH2                | GCCATCCCCGACCCACTG  |
| BF_SH3                | GCAGGGTCGTGTTCTCGTGTTT  |
| BF_SH4                | TGGAGCTCGCCTGCCGAG  |
| BF_SH7                | GGCGACCTCGAGCGCTTC  |
| BF_SH8                | GAGCCATCGCGCCACGTG  |
| BF_SH9                | GTTTCGGGACCGTGATCCC   |
| BF_SH10               | GGGATCACGGTCCCGAAC  |
| BF_SH11               | GCTCCATCGCCGCGAAAC  |
| BF_SH14               | CCTTCGACGTGCGCGAG   |
| BF_SH15               | GGGAGCGCGTTCGAGAAG  |
| BF_SH16               | TCTTCGCACGGAGGCTC   |
| PSWU41l               | TCTACGTGTTCCGCTTCCTT  |
| PSWU41u               | GTTTTCCAGTCACGACGTT   |
| BFAPC-3               | CGTTCTCTCGTCATGCTGTC  |
| BFAPC-4               | ATGCGCAGGGTCTCGTTG  |
| 48T7F                 | GACGGATGCCGCCCGTG   |
| 48T7R3                | GCCGCTTGCCCGCGGAGC  |
| Spi1U                 | GTGCACGACGCGCCCTGATG  |
| Spi1L                 | GCTGGTGCGGCGAAAGTGCG  |

## 2.7 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

### 2.7.1 *E. coli*

Die Anzucht der *E. coli* Stämme (Tabelle 2.9) erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie. Die Vereinzlung der Zellen wurde durch das 13-Strichverfahren (Schlegel, 1992) erhalten. Eine Einzelkolonie wurde in 3-5 ml LB-Flüssigmedium transferiert und für 12-16 h bei 30 bzw. 37°C und 170 rpm kultiviert. Bei Anzucht auf Festmedien wurden die jeweiligen Petrischalen ebenfalls bei 30 bzw. 37°C kultiviert. Plasmidhaltige Stämme wurden unter Selektionsbedingungen mit den jeweiligen Antibiotika in den Medien angezogen.

Für eine Langzeit-Konservierung (Stammhaltung) wurden 2 ml Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 1 ml einer über Nacht-Kultur in ein 2 ml Kryoröhrchen der Fa. NalGene (USA) überführt und mit 1 ml einer sterilen 50 %igen Glycerin-Stocklösung vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Cosmidbänke wurden in sterilen Mikrotiterplatten mit 50 %iger Glycerin-Stocklösung konserviert. Die Klone wurden zunächst mit einem sterilen Metallstempel in die Vertiefungen mit je 150 µl LB-Medium transferiert und über Nacht kultiviert. Nach Zugabe von je 100 µl Glycerin-Stocklösung wurden die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert und danach bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein Tropfen der Glycerinkultur auf LB-Festmedium aufgebracht und vereinzelt. Die nach einer über Nacht-Inkubation bei 37°C gewachsenen Einzelkolonien konnten für weitere Analysen herangezogen werden.

### 2.7.2 *S. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. cellulorum* So ce90

*S. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. cellulorum* So ce90 wurden bei 30°C kultiviert und, falls nicht anders beschrieben, in Trypton-bzw. G51t-Medium angezogen. Für Flüssigkulturen von *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurde zunächst eine Einzelkolonie in 10 ml Medium angezogen, bis eine Zelldichte von  $1-2 \times 10^8$  Zellen pro ml erreicht wurde. Einzelkolonien von *S. cellulorum* So ce90 wurden auf etwa 1 cm<sup>2</sup> P-Agar ausgestrichen und 5-10 Tage bei 30°C inkubiert. Mit etwa 1/3 der Zellmasse und etwas Agar wurden 10 ml G51t-Medium beimpft und bis eine Zelldichte von  $2 \times 10^8$  -  $2 \times 10^9$  Zellen pro ml kultiviert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand) mit einer Kammertiefe von 0,01 mm. Von diesen Kulturen ausgehend wurden dann 50 ml Medium in einer Verdünnung 1:10 bis 1:20 angeimpft und in 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttelinkubator bei 170 rpm kultiviert (1-5 Tage für *S. aurantiaca* DW4/3-1 und 4-16 Tage für *S. cellulorum* So ce90). Je nach Resistenzeigenschaften des Stammes bzw. der Mutante wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kultivierung von *S. aurantiaca*

DW4/3-1 in Mikrotiterplatten (96 well) erfolgte in 200 µl Medium pro Vertiefung und bei 30°C. Nach Beimpfung mit Einzelkolonien wuchsen die Kulturen 5-7 Tage (ohne Schütteln) bzw. 3-5 Tage (mit Schütteln).

Für eine Langzeit-Konservierung wurden 15 ml der jeweiligen Kultur mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^8$ /ml abzentrifugiert (15 min, 5.000 g) und in 1 ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und mit 1 ml einer 50 %igen Glycerin-Stocklösung vermischt. Diese Röhrchen wurden bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein großer Tropfen der Glycerinkultur auf P-Agar gebracht und für mindestens 48 h bei 30°C inkubiert. Die aus der Inkubation resultierenden Zellen wurden mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und damit eine 10 ml Ausgangskultur inokuliert. Alternativ wurden 10 ml Medium direkt mit einem großen Tropfen aus der Dauerkultur beimpft.

## **2.8 Isolierung von DNA**

### **2.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Myxobakterien**

Die Isolierung genomischer DNA von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und *S. cellulorum* So ce90 erfolgte mit dem PUREGENE® Genomic DNA Purification Kit der Firma Gentra. Ausgehend von ca.  $0,5-1,5 \times 10^9$  Zellen wurde die DNA nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Hierfür wurden Zellen aus Flüssig- und Agarkulturen als Ausgangsmaterial eingesetzt.

### **2.8.2 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA (alkalische Lyse)**

Das Zellpellet von 3 ml Übernachtskultur wurde in 250 µl Puffer P1 (siehe jeweils Tabelle 2.3) resuspendiert. 250 µl Puffer P2 wurden zugegeben, gut gemischt und für max. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl P3 Puffer wurde 5 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß mit 600 µl Isopropanol gegeben und nach Mischen 6 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und etwa 9 min bei 55°C getrocknet. Zum Lösen der DNA wurden 20-30 µl Reinstwasser eingesetzt.

### **2.8.3 Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA**

Die Isolierung hochreiner Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey und Nagel nach dem Standardprotokoll des Herstellers.

## **2.9 Trennung und Reinigung von DNA**

### **2.9.1 Agarosegelelektrophorese**

Diese Methode (Sambrook *et al.* 1989) trennt DNA-Fragmente in einer Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe. Je nach zu trennender DNA-Größe (100 bp – 40 kb) werden dabei Agarose-Konzentrationen von 0,4 – 1,2 % eingesetzt.

Die benötigte Agarosemenge wurde in 1 x TAE (siehe Tabelle 2.3) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Auf 50°C abgekühlte Agaroselösung wurde in einen mit Probenkamm versehenen Gelschlitten gegossen und mit 1 µl 1 %iger Ethidiumbromidlösung versetzt. Das erstarrte Gel wurde anschließend mit Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Laufpuffer gesetzt und der Probenkamm entnommen. Zum Auftragen der Proben wurden diese mit ca. 1/6 VT 6x DNA\_Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgte bei 1-5 Volt/cm bis zur gewünschten Trennung der Fragmente. Die Detektion erfolgte bei 312 nm aufgrund der Fluoreszenz des in die DNA-Doppelstränge interkalierten Farbstoffs. Über den Vergleich mit DNA-Größenstandards wurden die Fragmentgrößen bestimmt und photographisch dokumentiert.

### **2.9.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Nach der gelelektrophoretischen Trennung der Fragmente wurden die benötigten Banden auf einem „darkreader“ sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA wurde das NucleoSpin® Extract Kit der Firma Macherey und Nagel nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.9.3 Direkte Aufreinigung von Restriktionen und PCR-Ansätzen**

War eine gelelektrophoretische Auftrennung zur Aufreinigung des Restriktions- oder PCR-Ansatzes nicht notwendig, konnten diese nach Anweisung des Herstellers auch direkt zur Aufreinigung mit dem NucleoSpin® Extract Kit der Firma Macherey und Nagel eingesetzt werden.

### **2.9.4 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine Methode zur Abtrennung von Verunreinigungen, wie z. B. Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Das Volumen der Probe wurde mit TE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) auf mindestens 50 µl vergrößert, mit 1 VT Phenol/Chloroform-Gemisch (siehe Tabelle 2.1) versetzt und gründlich gemischt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Durch eine anschließende Fällung mit Isopropanol (siehe 2.9.5) wurden verbleibende Phenolreste mit der Lösung entfernt.

### 2.9.5 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde zum Reinigen, Konzentrieren oder Überführung in einen anderen Puffer durchgeführt. Nach Zusatz von 2,5 VT absolutem Ethanol und 0,1 VT 3 M Natriumacetat-Lösung (siehe Tabelle 2.3) wurde der Ansatz zum Fällern der DNA 60 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Durch Zentrifugation für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm wurde die DNA sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das erhaltene DNA-Pellet getrocknet. Abschließend wurde die DNA in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE-Puffer (siehe Tabelle 2.3) gelöst.

## 2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion kann ein von zwei Oligonukleotiden begrenzter DNA-Bereich *in vitro* amplifiziert werden. Dabei wird eine Folge von drei Temperaturschritten etwa 30 x durchlaufen.

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf  $95^{\circ}\text{C}$  bis  $98^{\circ}\text{C}$  wird doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge getrennt.
2. Annealing: Die Temperatur wird knapp unter die Schmelztemperatur der Oligonukleotide gesenkt. Die Oligonukleotide binden dabei an die komplementären Abschnitte der einzelsträngigen Matrizen-DNA.
3. Extension: Bei  $72^{\circ}\text{C}$  erfolgt ausgehend von den Oligonukleotiden in  $5' \rightarrow 3'$  Richtung die Synthese des Komplementärstranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

### 2.10.1 Auswahl der DNA-Polymerase

Neben der üblicherweise eingesetzten Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* gibt es noch sogenannte „long range“-Polymerasen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu 50 kb, sowie „proof reading“-Polymerasen mit geringer Synthesefehlerrate (z.B. Pfu-Polymerase). Diese Polymerasen besitzen neben der  $5' \rightarrow 3'$ -Polymerase-Aktivität eine  $3' \rightarrow 5'$ -Exonuklease-Funktion, die die Korrektur von Synthesefehlern erlaubt. Die verschiedenen kommerziell erhältlichen Polymerasen unterscheiden sich bezüglich ihrer Synthesegeschwindigkeit, Fehlerrate und der maximalen Länge des synthetisierten DNA-Stranges. Die spezifischen Anforderungen an das PCR-Programm sind den entsprechenden Anweisungen der Hersteller zu entnehmen. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase, die unabhängig von der DNA-Matrize einen  $3'$ -A-Überhang erzeugt, generiert die Pfu-Polymerase glattendige PCR-Amplifikate.

### 2.10.2 Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit einem Thermoblock der Firma Eppendorf in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Reaktionsansatz:

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Plasmid-, Cosmid-DNA             | ~ 10 µg      |
| genomische DNA                   | bis zu 40 ng |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)        | 2,5 µl       |
| 10 x PCR-Puffer                  | 2,5 µl       |
| Glycerin (50 %ig)                | 1,25 µl      |
| DMSO (100 %)                     | 1,25 µl      |
| dNTP's (1,25 mM pro dNTP)        | 4,0 µl       |
| Oligonukleotid 1 (50 pmol/µl)    | 0,25 µl      |
| Oligonukleotid 2 (50 pmol /µl)   | 0,25 µl      |
| Polymerase                       | 0,1 µl       |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 25 µl     |

Um die Bildung unspezifischer Amplifikate zu vermeiden, erfolgte die Zugabe der DNA-Polymerase immer nach dem initialen Denaturierungsschritt (95°C, 5 min). „Hot start“-Polymerasen wurden von Beginn an der Reaktion zugesetzt und einem initialen 15 minütigen Denaturierungsschritt unterworfen. Hierbei wird die zunächst inaktive Polymerase in ihre aktive Form überführt.

Üblicherweise wurde das folgende PCR-Programm durchgeführt.

1. Denaturierung 5 min 95°C
2. Zugabe der DNA-Polymerase 95°C
3. Denaturierung 30 s 95°C
4. „Annealing“ 30 s variabel
5. Extension variabel 72°C
6. finale Extension 10 min 72°C

Die Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_M = 69,9 + 0,41 \times [\text{GC}\%] - 650/n$$

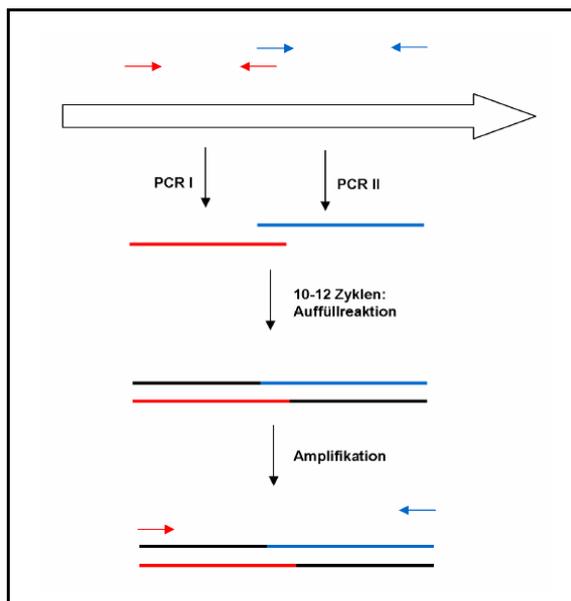
GC% = Prozentualer Anteil der Nukleotide G und C im Oligonukleotid

n = Anzahl der Nukleotide des Oligonukleotides

Die Zeit der Extension hing von der gewählten DNA-Polymerase, sowie der zu erwartenden Größe des Amplifikates ab. Um den Anteil unvollständig amplifizierter PCR-Produkte zu minimieren, wurde eine finale Extension von 10 min durchgeführt. Lieferte die PCR außer dem Zielfragment auch unspezifische Amplifikate, wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.9.1) und das Zielfragment aus dem Agarosegel extrahiert (siehe 2.9.2). Bei der Amplifikation eines spezifischen PCR Produktes der erwarteten Größe konnte dieses direkt gereinigt werden (siehe 2.9.3).

### **2.10.3 „Overlap-extension“ PCR**

Bei der „overlap-extension“ PCR (Ho *et al.* 1989) werden zwei PCR-Amplifikate, die über einen homologen Bereich verfügen, in weiteren PCR-Zyklen verbunden. Hierdurch kann innerhalb eines DNA-Fragments eine Mutation erzeugt werden. Da die beiden PCR-Amplifikate unabhängig von Restriktionserkennungssequenzen zusammengefügt werden können, weist das erzeugte Fragment nur die zur Mutagenese unbedingt notwendigen Basenaustausche auf. Die „overlap-extension“ PCR verläuft in drei Schritten, wie in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. In der ersten Reaktion werden die beiden zu verbindenden DNA-Fragmente in getrennten PCR-Ansätzen amplifiziert (siehe 2.10). Nach Aufreinigung des Ansatzes (siehe 2.9) werden 20-100 ng der beiden Amplifikate in einem PCR-Ansatz, der keine Primer enthält, bei einer Annealing-Temperatur von 50-60°C eingesetzt. Dieser Schritt dient dem Auffüllen der Amplifikate ausgehend von dem homologen Bereich der beiden Amplifikate. Dieser Ansatz dient als Matritze in der folgenden PCR, bei der die äusseren Primer für die Amplifikation des zusammengefügt Fragments eingesetzt werden.



*Abbildung 2.1:* **Schematischer Ablauf der „overlap-extension“ PCR.** Im ersten Schritt werden mit zwei Oligonukleotidpaaren ( $\rightarrow\leftarrow$ ) die beiden Fragmente getrennt voneinander amplifiziert. In den mittleren Oligonukleotiden wurde durch Basenaustausch innerhalb eines überlappenden Bereichs die Mutation erzeugt. Die Amplifikate werden in einem zweiten Schritt aufgefüllt und im Anschluß unter Verwendung der äusseren Oligonukleotide amplifiziert.

## 2.11 Enzymatische Manipulation von DNA

### 2.11.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Puffer bei der empfohlenen Temperatur eingesetzt. 1-5  $\mu\text{g}$  genomische DNA, bzw. 0,2-1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden in einem Endvolumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 1/10 VT des empfohlenen 10-fach Puffers und 0,5-1 U des Enzyms versetzt und für 1,5-3 h inkubiert. Gegebenenfalls wurde nochmals Enzym zum Ansatz pipettiert. Enthielten die DNA-Präparationen RNA, so wurde dem Ansatz 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNase zugesetzt. Um die erfolgreiche Hydrolyse der DNA zu überprüfen, wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.9.1). Die Reaktion wurde beendet, indem die Enzyme, wenn möglich, hitzeinaktiviert wurden und die DNA für weitere Anwendungen mittels NucleoSpin®Extrakt (siehe 2.9.3) oder Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung (siehe 2.9.4; 2.9.5) gereinigt wurde.

### 2.11.2 Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Klonierung unter Verwendung nur einer Restriktionsendonuklease die Religation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt. Das Enzym hydrolisiert die 5'-Phosphatgruppe der DNA, so daß keine

Selbstligation mit dem 3'-OH-Ende des DNA-Fragmentes katalysiert werden kann. Die Dephosphorylierung wurde im Restriktionsansatz durchgeführt. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde erneut 1 µl SAP in den Ansatz gemischt und wiederum 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 15 min auf 65°C erhitzt. Zur vollständigen Entfernung der Proteine wurde der Ansatz entweder mit 1 VT Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 2.9.4) oder über eine Nucleospin-Säule (siehe 2.9.3) aufgereinigt.

### 2.11.3 Ligation von DNA

Zur Ligation von Insert- und Vektor-DNA wurde eine T4-DNA Ligase verwendet. Diese DNA-Ligase bildet in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen und mit ATP als Kofaktor den Phosphodiester zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen und der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Endes. Die einzusetzende Vektor- und Insert-DNA wurde nach durchgeführter Restriktion entweder direkt oder über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.9). Für eine Ligation wird ein molares Verhältnis von Vektor-zu Insert-DNA von 1:5 angestrebt. Hierzu wurde die Konzentration der beiden Reaktionspartner photometrisch oder über ein Agarosegel bestimmt. Die benötigten Mengen DNA wurde gemischt, mit 0,1 VT 10x Ligasepuffer und 1U T4 DNA-Ligase versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und konnte direkt zur Transformation von *E. coli* Stämmen eingesetzt werden.

### 2.11.4 Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem Topo-TA-Cloning Kit

Die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem TOPO-TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Hierfür wurde der am 3'-Ende matrizenunabhängig eingeführte A-Überhang an den durch die Taq-Polymerase erzeugten DNA-Fragmenten ausgenutzt. Durch den 3'-T-Überhang am pCR®2.1-TOPO Vektor kommt es zusammen mit dem 3'-A-Überhang des PCR-Amplifikats zu einer der Ligation ähnlichen Reaktion. Die 3'-Enden des Vektors sind über einen Phosphatrest kovalent mit Topoisomerase I verbunden. Diese katalysiert den nukleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe des PCR-Amplifikats an den 3'-Phosphatrest des Vektors. Unter Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung werden das PCR-Produkt und der Vektor kovalent verbunden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

## 2.12 Transformation von Bakterien

### 2.12.1 Transformation von *E. coli*

#### 2.12.1.1 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH10B Zellen richtete sich nach dem Protokoll von Birren *et al.* (1997). 3 ml LB-Medium (siehe 2.3.1) wurden mit einer

Einzelkolonie inokuliert und wie unter 2.7.1 beschrieben über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 800-1000 ml LB-Medium 1:1000 in einem 3 Liter-Kolben angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Die Zellen wurden in gekühlten Zentrifugenbechern bei 5.000 rpm für 10 min bei 4°C im GSA-Rotor abzentrifugiert und das Pellet in eisgekühltem 10 %igem Glycerin resuspendiert, wobei die Menge an 10 %igem Glycerin dem vorherigen Volumen der Kultur entsprach. Es wurde erneut zentrifugiert und mit dem erhaltenen Pellet der Waschschrift wiederholt. Anschließend wurden die Pellets vereinigt und mit 25 ml 10 %igem Glycerin in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde bei 7.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml eisgekühltem GYT (siehe 2.2.2) resuspendiert, zu 40 µl in vorgekühlte Eppendorfgläser aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden anschließend bei -80°C gelagert.

#### 2.12.1.2 Transformationsbedingungen

Die bei -80°C gelagerten elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-4 µl des jeweiligen Ligationsansatzes (siehe 2.11.3), bzw. 0,2 µl gereinigter Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1cm) pipettiert und unter folgenden Bedingungen transformiert:

Widerstand 200 Ω

Spannung 1,25 kV

Kapazität 25 µF.

Hierbei wurden üblicherweise Zeitkonstanten von 3,8-4,5 ms erhalten. Der Ansatz wurde mit 500 µl LB-Medium (siehe 2.3.1) versetzt und 1 h bei 37°C und 950 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz entsprechend der vektorvermittelten Resistenz auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.12.2 Transformation von *S. aurantiaca* DW4/3-1

#### 2.12.2.1 Elektroporation

##### 2.12.2.1.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Eine 50 ml Übernachtskultur von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit etwa  $2 \times 10^8$  Zellen/ml wurde zentrifugiert (10 min, 5.000 rpm) und das Zellpellet in 50 ml Waschpuffer (siehe Tabelle 2.3) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm) wurde das Zellpellet zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen (3 min, 13.000 rpm) und schließlich in 200 µl Waschpuffer resuspendiert. 50µl dieser Zellsuspension wurden für die Elektroporation eingesetzt.

### 2.12.2.1.2 Transformationsbedingungen

50  $\mu$ l Zellsuspension und etwa 1  $\mu$ g zu transformierende DNA wurden gemischt, in eine Elektroporations-Küvette mit 0,1 cm Spaltbreite pipettiert und unter folgenden Bedingungen transformiert:

Widerstand 200  $\Omega$

Spannung 0,85 kV

Kapazität 25  $\mu$ F.

Hierbei wurden Zeitkonstanten von 3,8-4,5 ms erhalten. Der Ansatz wurde mit 1 ml Trypton-Medium (siehe Tabelle 2.7) versetzt, steril zu 44 ml Trypton-Medium zugegeben und 18 h bei 30°C und 170 rpm inkubiert.

### 2.12.2.1.3 Selektion von Transformanten

Nach der phänotypischen Expression wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 5.000 rpm), in 1 ml Trypton mit Kanamycin-Zusatz resuspendiert und in 2-3 Aliquots mit Trypton-Softagar auf Kanamycin-haltigen Tryptonagarplatten plattiert. Dafür wurde der Softagar aufgekocht, auf etwa 55°C abkühlen gelassen und mit Kanamycin-Stocklösung versetzt. Je 3 ml Softagar wurden zu den aliquotierten Zellsuspensionen gegeben, durch Vortexen kräftig gemischt und auf eine Agarplatte gegossen. Nach Erstarren des Softagars wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden nach 8-10 Tagen sichtbar.

Nach Elektroporation von pSWU41-Derivaten erhaltene Klone wurden nach Anzucht in Kanamycin-haltigem Trypton auf Trypton-Agar mit Kanamycin und auf Trypton-Agar mit 5 % Saccharose aufgetropft. Klone, die nicht den gewünschten Kanamycin-resistenten und Saccharose-sensitiven Phänotyp zeigten (siehe auch 2.12.2.3), wurden verworfen.

### 2.12.2.2 Triparentale Konjugation

#### 2.12.2.2.1 Konjugationsbedingungen

Von Übernachtskulturen von *E. coli* SCS110/pBF\_ABS und dem Helferstamm *E. coli* HB101/pRK600 wurden 30 ml LB-Medium mit Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Zusatz 1:100 angeimpft und bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Die exakte Zelldichte der Kulturen wurde nach 1:10 Verdünnung unter Zugabe von 1 % Formaldehyd bestimmt. Parallel dazu wurde von einer Übernachtskultur von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit etwa  $2 \times 10^8$  Zellen/ml die exakte Zellzahl bestimmt. Je  $2 \times 10^9$  Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm) und dreimal mit 1 ml LB- bzw. Trypton-Medium gewaschen (3 min, 13.000 rpm). Die Zellen wurden in je 200  $\mu$ l LB- bzw. Trypton-Medium resuspendiert und zweimal jeweils 100  $\mu$ l der Zellsuspensionen vereinigt. Die vereinigten Zellen wurden zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm), in 100  $\mu$ l Trypton resuspendiert und als ein Tropfen auf eine P- bzw. Trypton-Agarplatte ohne

Selektionsmarker aufgebracht. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und 19 Stunden bei 30°C inkubiert.

#### 2.12.2.2 Selektion von Konjuganten

Nach der 19 stündigen Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe einer trockenen 1 ml Pipettenspitze von den Agarplatten abgekratzt und in 1ml Trypton resuspendiert. Fünf unterschiedlich große Aliquots der Zellsuspensionen wurden mit Softagar (siehe 2.12.2.1.3) auf Tryptonplatten mit Kanamycin- und Gentamycinzusatz plattiert. Nach Erstarren des Softagars wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden nach 12-16 Tagen sichtbar.

#### 2.12.2.3 Selektion von markerlosen Mutanten

Der Vektor pSWU41 (siehe Tabelle 2.13) trägt neben dem Kanamycin-Resistenzgen auch das *sacB*-Gen. SacB wandelt Saccharose in einen für die Zelle toxischen Metaboliten um. Nach längerer Passage von Insertionsmutanten des pSWU41 Vektors und Derivaten davon kann es über den eingeführten homologen Bereich zum Auskreuzen der Vektorsequenz kommen, dem „Doppel-Crossover“. Dabei wird entweder der durch den Vektor eingeführte, mutierte homologe Bereich deletiert, wodurch eine dem Wildstamm entsprechenden Revertante resultiert, oder aber genomische Sequenz des Wildstammes wird deletiert, so daß eine Mutante mit der gewünschten eingeführten Mutation erhalten wird (siehe Abbildung 3.4). Doppel-Crossover Mutanten zeigen einen Kanamycin-sensitiven und Saccharose-unempfindlichen Phänotyp, was für ihre Selektion genutzt wird.

Verifizierte Insertionsmutanten von pSWU41-Derivaten wurden mindestens drei Wochen ohne Selektionsdruck in Trypton passagiert, dabei wurde alle 2 Tage 1:50 überimpft. 1 ml einer solchen Kultur wurde abzentrifugiert (3 min 13.000 rpm) und das erhaltene Pellet in gleichem Volumen Trypton-Medium mit 5 % Saccharose resuspendiert. Aliquots dieser Zellsuspension (0,1–100 µl) wurden mit Trypton-Medium mit 5 % Saccharose auf 100 µl aufgefüllt, mit 3 ml flüssigem Softagar (Trypton mit 5 % Saccharose) versetzt und auf Trypton-Agarplatten mit 5 % Saccharose plattiert (vergleiche 2.12.2.1.3). Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 30°C für 8 bis 20 Tage inkubiert. Erhaltene Einzelklone wurden mit Hilfe von sterilen Zahnstochern in 96er Mikrotiterplatten mit 200 µl Trypton mit 5 % Saccharose pro Vertiefung überimpft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert, die Kulturen wuchsen 5-7 Tage (ohne Schütteln) bzw. 3-5 Tage (mit Schütteln). Je 30 µl dieser Kulturen wurden auf Trypton-Agar mit Kanamycin und Trypton-Agar mit 5 % Saccharose aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Klone mit dem gewünschten Kanamycin-resistenten und Saccharose-sensitiven Phänotyp wurden in 10 ml Trypton angezogen und erneut Aliquots auf Trypton-Agar mit Kanamycin und Trypton-Agar mit 5 % Saccharose aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Bestätigte sich

der Phänotyp, wurden die Mutanten mittels PCR (siehe 2.10) oder Southern Blot (siehe 2.13.4) genotypisch verifiziert.

### **2.12.3 Konjugation von *S. cellulosum* So ce90**

#### **2.12.3.1 Konjugationsbedingungen**

Von einer Übernachtskultur von *E. coli* ET12567/pUZ8002/Inaktivierungskonstrukt wurden 30 ml LB-Medium mit Kanamycin- und Hygromycinzusatz 1:100 angeimpft und bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Die genaue Zelldichte der Kulturen wurde nach 1:10 Verdünnung unter Zugabe von 1 % Formaldehyd bestimmt. Parallel dazu wurde von einer fünf Tage alten Kultur von *S. cellulosum* So ce90 in G51t Medium mit etwa  $2 \times 10^8$  -  $2 \times 10^9$  Zellen/ml die genaue Zellzahl bestimmt. Je  $1 \times 10^9$  Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5.000 rpm) und dreimal mit 1 ml LB-bzw. G51t-Medium gewaschen (3 min, 13.000 rpm). Die Zellen wurden in je 100 µl LB-bzw. G51t-Medium resuspendiert und vereinigt. Die vereinigten Zellen wurden zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm), in 100 µl G51t resuspendiert und als ein Tropfen auf eine P-Agarplatte ohne Selektionsmarker aufgebracht. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und 40-44 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für eine triparentale Konjugation wurde *E. coli* ET12567/Inaktivierungskonstrukt unter Hygromycin-Zusatz und der Helferstamm *E. coli* HB101/pRK600 unter Chloramphenicol-Zusatz angezogen. Auch in diesem Fall wurden  $1 \times 10^9$  Zellen von jedem Stamm vereinigt und in 100 µl G51T resuspendiert.

#### **2.12.3.2 Selektion von Konjuganten**

Nach der mindestens 40-stündigen Inkubation wurden die Zellen von der Agarplatte abgekratzt und in 1 ml G51t-Medium resuspendiert. Fünf verschieden große Aliquots der Zellsuspension wurden mit Glasperlen oder Drigalski-Spatel auf PMM-Agarplatten mit Tobramycin- und Hygromycinzusatz plattiert. Als Überlebens-Kontrolle der Sorangien wurde 10 µl der Zellsuspension auf PMM-Agar mit Tobramycin-, aber ohne Hygromycinzusatz aufgetropft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien waren nach 8-18 Tagen sichtbar.

### **2.13 Konstruktion einer Cosmidbank von *S. cellulosum* So ce90**

Diese Methode dient der Klonierung von 40-45 kb großen Fragmenten genomischer DNA in einen Cosmid-Vektor (Sambrook *et al.* 1989) unter Verwendung phagenvermittelter Transfektion.

#### **2.13.1 Herstellung des Ligationsansatzes**

Ein Ligationsansatz für die Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Cosmidbank von *S. cellulosum* So ce90 war zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden

(Rolf Müller). Die Arbeitsschritte für dessen Herstellung werden deshalb im Folgenden nur kurz skizziert.

Genomische DNA von *S. cellulosum* So ce90 wurde mit *Sau3A* partiell hydrolysiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Restriktionsansatzes wurden Fragmente im Größenbereich von 35-45 kb aufgereinigt und dephosphoryliert (siehe 2.11.2). Der Vektor SuperCosI (siehe Tabelle 2.8) wurde mit *XbaI* hydrolysiert, dephosphoryliert und anschließend mit *BamHI* hydrolysiert. Der so behandelte Vektor und die genomische DNA wurden über die von *Sau3A/BamHI* generierten kompatiblen Überhänge ligiert.

### 2.13.2 Verpackung in Phagenköpfe

Die Verpackung des vorhandenen Ligationsansatzes in Phagenköpfe erfolgte mit Hilfe des Gigapack®II XL Verpackungsextraktes der Firma Stratagene entsprechend der Herstellerempfehlungen. Dabei werden nur DNA Fragmente mit einer Größe von etwa 35-45 kb verpackt.

### 2.13.3 Phageninfektion und Titerbestimmung

*E. coli* Sure wurde in LB-Medium unter Zusatz von 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 0,2% Maltose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 inkubiert. Zur Infektion wurden 25 µl dieser Kultur mit 1 µl, bzw. 2,5 µl des Gigapack®II XL Verpackungsextraktes (siehe Tabelle 2.8) gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluß mit 200 µl LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C und 165 rpm phänotypisch exprimiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (siehe Tabelle 2.6) mit 50 µg Ampicillin/ml plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Auszählen der erhaltenen Kolonien wurde der Titer und die einzusetzende Menge Verpackungsextrakt bestimmt. Der ermittelte Titer der Verpackung betrug 20.367 Klone pro 500 µl.

### 2.13.4 Generierung der Cosmidbank

Entsprechend einer sechs- bis achtfachen Abdeckung bei einer geschätzten Genomgröße von 10 bis 14 Mbp sollte die Cosmidbank etwa 2000 Klone umfassen. Die dafür ermittelte Menge Verpackungsextrakt wurde mit SM-Puffer (siehe Tabelle 2.3) auf 1250 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen einer *E. coli* Sure Kultur gemischt. Es wurde wie unter 2.7.1 beschrieben inkubiert und im Anschluß der Ansatz mit 4 VT LB Medium versetzt. Nach einer Stunde phänotypischer Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze auf LB-Agar in 22 cm x 22 cm großen NUNC-Schalen der Firma Nalgene mit 50 µg Ampicillin/ml plattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 32°C inkubiert und die Klone mit Hilfe des Qbot-Roboters (Firma Genetix) der Abteilung Genomanalyse des HZI in Braunschweig in sechs 384er Mikrotiterplatten mit 50 µl 2YT Medium mit 7,5 % Glycerin und 50 µg Ampicillin/ml gepickt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden alle Klone in neue (Replika-) Mikrotiterplatten überimpft. Die Original-Platten wurden bei -80°C konserviert.

### 2.13.5 Transfer auf Nylonmembranen und deren Prozessierung

Die Replika-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und mit Hilfe eines Roboterstempels auf sechs neue NUNC-2YT-Agarplatten mit 50 µg Ampicillin/ml gestempelt, auf die zuvor luftblasenfrei eine 22 cm x 22 cm große Nylonmembran gelegt wurde. Um eine eindeutige Zuordnung der transferierten Kolonien zu den sechs Mikrotiterplatten zu gewährleisten, wurde jede Kultur der Platten 1-6 zweimal und in einem bestimmten Muster gestempelt („4x4 array“, siehe Abbildung 2.2).

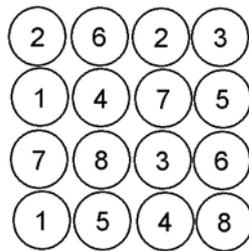


Abbildung 2.2: Stempelmuster der Mikrotiterplatten 1-6 auf den Kolonie-Membranen, „4x4 array“

Die Mikrotiterplatten wurden anschließend mit 50 %igem Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Die NUNC-Schalen mit den Nylonmembranen wurden nebeneinander stehend (um den Luftaustausch zu gewährleisten) 16 h bei 37°C inkubiert. Für die Prozessierung der Membranen mit je sechs Kopien der Cosmidbank wurde je ein Whatman-Filterpapier (Whatman 3MM) mit Denaturierungslösung 2, Neutralisierungslösung 2 und 2xSSC (siehe Tabelle 2.2) zur Vorbereitung getränkt und zusätzlich eine Proteinase K-Lösung vorbereitet. Die Membranen wurden luftblasenfrei mit der Unterseite auf das mit Denaturierungslösung getränkte Whatmanpapier gelegt, 15 min inkubiert, abgezogen und kurz auf trockenes Whatmanpapier gelegt, um überschüssige Denaturierungslösung zu entfernen. Es folgten 15 min Inkubation auf dem mit Neutralisierungslösung getränkten Whatmanpapier und 10 min Inkubation auf dem mit 2xSSC getränkten Whatmanpapier, schließlich wurden die Membranen auf trockenem Whatmanpapier antrocknen gelassen. Während der ganzen Prozedur wurde darauf geachtet, die Kolonien auf der Membranoberseite nicht zu fluten oder zu verwischen. Durch zweistündige Inkubation der Membranen bei 80°C wurden die Kolonien auf der Membran fixiert. Die Membranen wurden mit je 14 ml Proteinase K-Lösung 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Zelltrümmer mit ddH<sub>2</sub>O getränkten Papiertüchern abgenommen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die fertig prozessierten Membranen A-E (je Filter OL, OR, ML, MR, UL, UR) beschriftet und die einzelnen hochdichten Kolonie-Filter auseinander geschnitten. Die Filter wurden bei Raumtemperatur in einer Papierkiste gelagert.

## 2.14 DNA-Hybridisierungen

### 2.14.1 Southern Blot

Mit dieser Methode, die 1975 von E. M. Southern entwickelt wurde (46), können spezifische DNA-Sequenzen innerhalb chromosomaler DNA identifiziert werden. Durch einen Transfer der DNA-Fragmente aus einem Elektrophoresegel auf eine Membran kann dabei eine genaue Größenbestimmung des identifizierten Fragments, auf dem sich die gesuchte DNA-Sequenz befindet, durchgeführt werden.

Ca. 5 µg genomische DNA wurden wie unter 2.11.1 beschrieben mit einem geeigneten Enzym hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.9.1). Nach Dokumentation des Gels wurde 10 min in 0,25 N HCl unter leichtem Schwenken bei RT depuriniert. Das Gel wurde kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und anschließend für zweimal 20 min in Denaturierungslösung sowie zweimal 20 min in Neutralisierungslösung (siehe Tabelle 2.2) bei RT inkubiert. Zwischen den verschiedenen Lösungen wurde das Gel kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Danach wurde die DNA mittels Kapillarblot auf die Membran transferiert.

### 2.14.2 Kapillarblot

Das vorbehandelte Gel wurde luftblasenfrei auf zwei Lagen mit 10xSSC (siehe Tabelle 2.2) getränktem Whatman-Papier gelegt. Dieses befand sich auf einem Träger oberhalb eines Pufferreservoirs, das mit 10xSSC gefüllt und über eine Brücke aus Whatman-Papier mit dem Träger verbunden war. Auf das Gel wurde die Nylonmembran sowie zwei weitere Lagen trockenes Whatman-Papier und eine genügend dicke Schicht eines saugfähigen Materials (z. B. 5 cm Papierhandtücher) gelegt. Darauf wurde zur Verstärkung des Saugdruckes ein Gewicht von ca. 1 kg gelegt und die DNA 5 h oder über Nacht transferiert.

### 2.14.3 Sondenmarkierung

Für die Präparation einer Sonde wurde der DIG-High-Prime-Mix der Fa. Roche Diagnostics verwendet. Die Herstellung der DIG-markierten DNA-Fragmente wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 16 µl DNA (1-1,5 µg DNA) und 4 µl DIG High Prime Mix wurde zusammen pipettiert und für 20 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 M EDTA (pH 8,0) und /oder 10 minütiger Hitzeinaktivierung bei 65°C abgestoppt.

Alternativ dazu wurden in einer etablierten PCR (siehe 2.10) Digoxigenin-markierte Desoxynukleotide eingesetzt (DIG PCR Labeling Mix der Firma Roche).

Die markierte Sonde konnte bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

#### 2.14.4 Hybridisierung und Detektion

Bei den Hybridisierungsexperimenten und der Detektion der gesuchten DNA-Fragmente wurde das Protokoll des DIG-Systems der Fa. Roche Diagnostics angewendet. Nachdem die hydrolysierte DNA-Probe nach Kapillarblot und zweistündiger Inkubation bei 80°C auf einer Nitrocellulosemembran fixiert wurde, konnte diese in Hybridisierungslösung (siehe Tabelle 2.2) für 1-2 h inkubiert (Prähybridisierung) werden. Danach wurde frische Hybridisierungslösung (1 ml/10 cm<sup>2</sup>) auf die Membran gegeben und mit der jeweiligen Sonde, die vorher durch 10 minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert wurde, versetzt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 40-42°C durchgeführt. Die Prä- bzw. Hybridisierung und folgende Detektionsschritte wurden in einem Hybridisierungssofen durchgeführt.

Die mit der jeweiligen Sonde hybridisierten DNA-Fragmente wurden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion detektiert. Hierzu wurde die Membran mit Fab-Fragmenten eines polyklonalen Schaf-Anti-Digoxigenin inkubiert. Die an den Antikörpern gekoppelte alkalische Phosphatase spaltet CDP<sup>®</sup>, so dass es beim Zerfall des Substrates zu einer Lichtemission kommt, die mit Hilfe einer Bilddokumentation nachgewiesen werden kann. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte bis zur endgültigen Detektion angegeben. Die Membran wurde zunächst 2 x 5 min bei RT in 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend 2 x 15 min bei 58-68°C in 0,5x SSC-Puffer. Bei letzteren Waschschrinen wird durch Erhöhung der Temperatur die Stringenz der DNA-DNA Bindung erhöht und unspezifisch gebundene DNA entfernt. Nach dem Äquilibrieren der Membran in Maleinsäure-Puffer wurde diese für 30-60 min in Blockierungslösung inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation in Anti-DIG-AP-Lösung (1:10.000 verdünnter Antikörper in Blockierungslösung) und Waschen mit Maleinsäurepuffer (2 x 15 min) wurde die Membran 2 x 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit CDP-Star-Lösung beschichtet (1 ml/100 cm<sup>2</sup>), für 1 min bei RT inkubiert und in Folie eingeschweißt. Die Detektion der Chemoluminiszenz erfolgte mit Hilfe einer Bilddokumentation der Firma Intas.

#### 2.14.5 Wiederverwendung hybridisierter Membranen („Stripping“)

Bereits hybridisierte Membranen konnten nach Entfernen der gebundenen Sonde erneut hybridisiert werden. Hierfür wurde die Membran zweimal für 20 min mit „Stripping“ Puffer bei 37°C unter leichtem Schwenken gewaschen. Nach kurzem Äquilibrieren der Membran in 2xSSC konnte diese erneut zu Hybridisierungen eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

#### 2.14.6 Kolonie-Hybridisierung

Für die Hybridisierung der hochdichten Filter (Membrankopien) der *S. cellulosum* So ce90 Cosmidbank wurde DIG Easy Hyb (Roche) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

## 2.15 Heterologe Expression von *deoRA* und Proteinanalytik

Um *deoRA* heterolog als GST-Fusionsprotein zu exprimieren, wurde das Gen in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert (pGEX-DA, vergleiche Tabelle 2.14), sequenziert und in *E. coli* B121 transformiert.

### 2.15.1 Gewinnung zellfreier Proteinrohextrakte

Eine Einzelkolonie von *E. coli* B121/pGex-DA wurde über Nacht bei 37°C in LB mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen und am nächsten Morgen 1:100 in 100 ml Ampicillinhaltiges LB-Medium überimpft. Die Kultur wurde etwa 3 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 30°C, 170 rpm inkubiert, dann mit 500 µl 100 mM IPTG-Lösung versetzt und weitere 1,5 h inkubiert. Durch 5 min Zentrifugation bei 4°C und 5.000 rpm wurden die Zellen vom Medium abgetrennt und in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Die Zellsuspension wurde zweimal mit einer French Press mit 700 psi aufgeschlossen und anschließend 40 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter aufgereinigt.

### 2.15.2 Aufreinigung des Zielproteins

Der Überstand mit dem löslichen Zellprotein wurde mit Glutathion-Affinitätschromatographie mit MicroSpin GST-Säulen der Firma Amersham Biosciences entsprechend den Herstellerempfehlungen aufgereinigt. Dabei wurden im zweiten Waschschrift dem Puffer 50mM ATP zugesetzt (pH 7,4). Zuletzt wurden die Säulen mit 150 µl Spaltungspuffer mit 10 µl PreScission Protease (Amersham Biosciences) 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend das Zielprotein ohne GST-Rest eluiert.

### 2.15.3 Konzentrationsbestimmung mittels Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde der „Protein Assay“ der Firma Biorad eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurde die saure Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung mit der Proteinlösung versetzt. Durch die Bindung des Farbstoffes an Proteine kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs auf 595 nm, die UV-spektroskopisch erfasst wird. Die Erstellung der Eichgerade erfolgte mit dem im Kit enthaltenen Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers in einem Konzentrationsbereich von 1-8 µg/ml.

### 2.15.4 Ankonzentrierung von Proteinextrakten

Zur Konzentrierung der Proteinextrakte wurden „Microcon™-Konzentratoren“ mit einer Ausschlussgröße 10000 Da der Firma Amicon eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 2.15.5 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einem diskontinuierlichem SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli 1970). Als Größenstandard diente der „Prestained Protein Marker“ der Firma Biorad.

#### 2.15.5.1 Herstellung des SDS-Gels und Elektrophorese

Zum Herstellen eines Polyacrylamidgels wurden die Bestandteile des Sammel- und des Trenngels wie in Tabelle 2.16 angegeben gemischt und die Polymerisation durch Zugabe der Ammoniumpersulfat-Lösung (APS-Lösung) gestartet. Die Lösung des Trenngels wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten der Proteingelapparatur gegossen und mit 70 %igem Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol gründlich entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Aus dem vollständig polymerisierten Sammelgel wurde der Probenkamm entfernt und die Gelreste mit Laufpuffer aus den Taschen gespült. Zur Elektrophorese wurden ca. 100 µg Protein von Rohextrakten eingesetzt. Von den aufgereinigten Proteinlösungen wurden ca. 5-7 µg auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgeköcht. Die Trennung der Proteine erfolgte zunächst bei 80 V im Bereich des Sammelgels um eine Ankonzentrierung der Banden zu erreichen. Im Anschluß wurde die Spannung auf 120 V erhöht, bis die Lauffront aus dem Trenngel ausgetreten war.

Tabelle 2.16: Zusammenstellung des Sammel- und Trenngels bei der SDS-PAGE Elektrophorese

| 10 % iges Trenngel  |        | Sammelgel           |        |
|---------------------|--------|---------------------|--------|
| 30 % Acrylamid-Mix  | 5 ml   | 30 % Acrylamid-Mix  | 1,7 ml |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 3,8 ml | 1,5 M Tris (pH 6,8) | 3,8 ml |
| 10 % SDS            | 150 µl | 10 % SDS            | 100 µl |
| H <sub>2</sub> O    | 5,9 µl | H <sub>2</sub> O    | 7,0 ml |
| 10 % APS            | 150 µl | 10 % APS            | 100 µl |
| TEMED               | 6 µl   | TEMED               | 10 µl  |

#### 2.15.5.2 Detektion der Proteinbanden

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur genommen und das Sammelgel entfernt. Zur Färbung der Proteine wurde das Trenngel zunächst ca. 2 h in Färbelösung (Coomassie-Lösung, Tabelle 2.3) geschwenkt. Zur Verkürzung der Färbezeit konnte das Gel in dieser Lösung kurzzeitig erwärmt werden. Im Anschluß wurde für ca. 2 h durch wiederholtes Schwenken in Entfärbelösung (Tabelle 2.3) entfärbt.

## 2.16 Protein-DNA Bindungsstudien

### 2.16.1 Herstellen von markierten Promotor-Regionen

Für die Protein-DNA Bindungsstudien wurden drei Fragmente des Spirangien-Biosynthesegenclusters aus dem Bereich zwischen *spiB* und *spiC* amplifiziert, welche nach *in silico*-Analyse Promotoren beinhalten. Dabei wurden die Oligonukleotidpaare BFSP1/BFSP2, BFSP3/BFSP4 und BFSP5/BFSP6 eingesetzt, welche ein 262 bp (SP12), 214 bp (SP34) und 231 bp (SP56) großes Amplifikat ergaben. Für die Amplifizierung der Promotorregion des Epothilon-Biosynthesegenclusters wurde das Oligonukleotidpaar BFEP1/Epo-non-biotin-dn eingesetzt, welches ein 231 bp großes Fragment ergab (EPnonB).

Die Markierung der mit PCR generierten Promotorregionen mit Digoxigenin und die Kontrolle der Markierungseffizienz erfolgte mit Hilfe des DIG Gel Shift „Kits“ der Firma Roche entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.16.2 DNA-Protein Bindung

Protein und DIG-markierte DNA wurden entsprechend den Herstellerangaben und dem DIG Gel Shift „Kits“ der Firma Roche inkubiert. Dabei wurden die Menge an Protein, die Konzentration des Puffers und die Inkubationstemperatur variiert: es wurden bis zu 180 pmol Protein pro 30 fmol DNA eingesetzt, der Puffer 2 x und 0,5 x konzentriert verwendet und bei 18°C und 30°C inkubiert.

### 2.16.3 Elektrophoretische Auftrennung und „Blotting“

Die Auftrennung des DNA-Protein-Gemisches erfolgte in einem 6 % igen nativen Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE bei 80 Volt über etwa 1,5 h. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 2.17 angegeben.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des 6 % igen nativen Polyacrylamidgels in 0,25x TBE

| Bestandteil        | Menge  |
|--------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O   | 5,4 ml |
| 30 % Acrylamid-Mix | 2 ml   |
| 1x TBE             | 2,5 ml |
| 10 % APS           | 100 µl |
| TEMED              | 4 µl   |

Nach der Trennung wurde das Polyacrylamidgel luftblasenfrei auf eine gleich große, positiv geladene Nylonmembran gelegt, welche zuvor in 0,25x TBE äquilibriert wurde. Mit je vier Lagen passend zugeschnittenem 0,25x TBE getränktes Whatmanpapier darauf und darunter wurden Gel und Membran auf einen Elektrobloetter (Firma ) gelegt. Der Transfer von DNA und Protein erfolgte über 30 min bei 400 mA. Durch UV-Bestrahlung für 6 -8 min wurde die DNA auf der Membran fixiert.

### 2.16.4 Detektion

Die Detektion der DIG-markierten DNA-Banden erfolgte mit Hilfe des DIG Gel Shift „Kits“ der Firma Roche entsprechend den Herstellerangaben.

## 2.17 *In silico* Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Sequenzdaten wurden unter Verwendung des Programmpaketes „DNASTAR“ (DNASTAR, London UK), bzw. mit Hilfe des Programmpaketes VectorNTI (Fa. InforMax, USA) ausgewertet. Weitere Programme für Homologievergleiche, Sequenzalignments, Strukturvorhersagen etc. waren über das Internet zugänglich und sind im folgenden aufgeführt:

|                     |   |
|---------------------|---|
| BLAST               | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>   |
| Blast2              | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html</a>   |
| Frame plot          | <a href="http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl">http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl</a>   |
| PKS Analysis        | <a href="http://www.tigr.org/jravel/nrps/">http://www.tigr.org/jravel/nrps/</a>   |
| ClustalW            | <a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>   |
| InterPro            | <a href="http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/">http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/</a>   |
| Phylogendron        | <a href="http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html">http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html</a>   |
| Promoter Prediction | <a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</a><br><a href="http://dbtbs.hgc.jp/">http://dbtbs.hgc.jp/</a><br><a href="http://bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/">http://bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/</a> |

## 2.18 Gewinnung von Sekundärmetaboliten

### 2.18.1 Kultivierung in Produktionsmedium

Für die Analyse des Metabolitenspektrums von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Mutanten wurden diese mit etwa  $2 \times 10^8$  Zellen (Trypton-Vorkultur) in 50 ml Probion-Medium angeimpft. Es wurde 1 % (v/v) XAD 16 zugesetzt. Die Kulturen wurden bei 30°C und 170 rpm 3-5 Tage inkubiert.

Für die Analyse des Metabolitenspektrums von *S. cellulorum* So ce90 und Mutanten wurden diese aus einer E-Medium bzw. G51t-Medium-Vorkultur mit etwa  $1 \times 10^9$  Zellen/ml in E-Medium mit 1 % (v/v) XAD 16 überimpft. Dabei war das Verhältnis Vorkultur zu Hauptkultur in der Regel 1:50, für quantitative Produktionsvergleiche wurde mit gleicher Zellzahl angeimpft. Die Kulturen wurden bei 30°C und 170 rpm für 7 bzw. 14-16 Tage inkubiert.

### 2.18.2 Fütterung von Biosynthesevorläufern

Für die Fütterung von L-[5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Leucin zu *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Mutanten wurde eine sterile, wässrige L-[5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Leucin-Stocklösung hergestellt (100 mM) und nach 18, 26, 42 und 50 h Inkubation zu den Kulturen gegeben, so daß eine Endkonzentration von 1 mM erreicht wurde.

Für die Fütterung von L-[Methyl-<sup>13</sup>C]-Methionin und L-[Methyl-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Methionin zu *S. cellulosum* So ce90 und Mutanten wurden sterile, wässrige Stocklösungen hergestellt (100 mM) und nach 5, 7 und 9 Tagen Inkubation zu den Kulturen gegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 mM erreicht wurde.

### 2.18.3 Herstellung von Kulturextrakten

Nach Kultivierung in Produktionsmedium wurden die Kulturen bei Raumtemperatur zentrifugiert (15 min, 5.000 rpm) und der Überstand verworfen. XAD und Zellpellets von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Mutanten wurden erst mit 10 ml Aceton, dann mit 30 ml Methanol extrahiert. Dabei wurden das XAD und die Zellen je etwa 30 min im Lösungsmittel gerührt. XAD und Zellpellets von *S. cellulosum* So ce90 und Mutanten wurden analog mit Methanol (etwa ½ VT Kulturvolumen) extrahiert. Die (vereinigten) Kulturextrakte wurden filtriert und *in vacuo* bei 40°C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in Methanol (1% des Kulturvolumens) im Ultraschallbad resuspendiert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. 100 µl der Kulturextrakte wurden bis zur weiteren Analyse bei Raumtemperatur gelagert, der Rest wurde lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

### 2.18.4 Aufreinigung von Sekundärmetaboliten

Für die Aufreinigung der Spirangiene und Spirangien-Derivate nach Fütterung von L-[Methyl-<sup>13</sup>C]-Methionin (vergleiche 2.18.2) wurden XAD und Zellen aus je 500 ml Kultur zweimal etwa 30 min mit Methanol gerührt. Der methanolische Extrakt wurde filtriert, die organische Phase abdestilliert und der wässrige Rückstand dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde bei 40°C zur Trockne eingengt, der Rückstand in Methanol gelöst und mit Heptan ausgeschüttelt. Die methanolische Phase wurde *in vacuo* auf wenige ml eingengt und nach dem Prinzip der Größenausschlußchromatographie mit Methanol als Laufmittel auf einer Sephadex LH20 Säule (Amersham Biosciences) chromatographiert. Per DC-Kontrolle (siehe 2.19.1) wurde bestimmt, welche Fraktionen Spirangiene enthielten, diese wurden vereinigt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand per NMR (siehe 2.19.3) analysiert.

## 2.19 Analytik von Sekundärmetaboliten

### 2.19.1 Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Untersuchung von Extrakten von *S. cellulorum* So ce90 und Mutanten wurden Aluminium-Silicagel-Platten verwendet. Als Laufmittel diente ein Dichlormethan-Methanol-Gemisch (9:1 v/v). Die Detektion erfolgte bei 254 nm (Epothilone) und 360 nm (Spirangiene).

### 2.19.2 HPLC-UV/VIS, HPLC-MS, HPLC-MS/MS

Für die HPLC-Analytik mit einem Agilent 1100 System und einem DAD-Detektor wurde eine 125 x 2 mm Nucleodur C18/3  $\mu\text{m}$  RP-Säule und ein Lösungsmittelgemisch von H<sub>2</sub>O (A) und Acetonitril (B) verwendet, dabei enthielten die Lösungsmittel je 0,1 % Ameisensäure. Nach Elektrosprayionisation erfolgte die Detektion mit einem Bruker HCT plus Massenspektrometer im positiven und negativem Ionisationsmodus bei einer Massenbreite von  $m/z = 100-1000$ .

Für Extrakte von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Mutanten wurde die Methode BF\_Aurfl verwendet, die im Folgenden beschrieben wird: 0-2 min 5 % B, 2-32 min linear von 5 % B zu 95 % B, 32-36 min isokratisch mit 95 % B. Aurafuron A und B wurden per MS Analyse identifiziert: Aurafuron A:  $R_t$  20,6 min,  $[M-H]^- = 377,2$ ; Aurafuron B:  $R_t$  24,6 min,  $[M-H]^- = 359,2$ .

Für Extrakte von *S. cellulorum* So ce90 und Mutanten wurde die Methode BF\_Alt90 verwendet: 0-2 min 35 % B, 2-15 min linear von 35 % B zu 75 % B, 15-25 min isokratisch mit 75 % B, 25-30 min linear von 75 % B zu 95 % B, 30-33 min isokratisch bei 95 % B. Epothilone und Spirangiene wurden per MS Analyse identifiziert: Epothilon A:  $R_t$  7,4 min,  $[M+H]^+ = 494,3$ ; Epothilon B:  $R_t$  8,8 min,  $[M+H]^+ = 508,2$ ; Epothilon C:  $R_t$  13,5 min,  $[M+H]^+ = 478,1$ ; Epothilon D:  $R_t$  14,8 min,  $[M+H]^+ = 492,2$ ; Spirangien A und *cis/trans* Isomere:  $R_t$  19,5 – 20,4 min,  $[M-H]^- = 701,5$ ; Spirangien B und *cis/trans* Isomere:  $R_t$  21,6 – 22,8 min,  $[M-H]^- = 715,5$ .

Für die Messung präziser Massen erfolgte die Detektion mit einem Bruker micrOTOF Massenspektrometer.

### 2.19.3 NMR

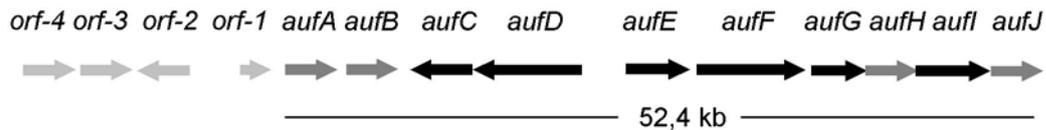
NMR Spektren wurden mit einem Bruker Advance 500 bei 125,7 MHz und CD<sub>3</sub>OD als Lösungsmittel und internem Standard aufgenommen.

## 3 Ergebnisse I: Analyse der Aurafuron-Biosynthese in *S. aurantiaca* DW4/3-1

Das Aurafuron-Biosynthesegencluster wurde durch ein systematisches Screening einer Cosmidbank von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit KS-kodierenden Sequenzen identifiziert (47) und von zwei Cosmiden und einem ausklonierten Plasmid (S. Wenzel) sequenziert (GBF, Abteilung Genomanalyse). Zu Beginn dieser Arbeit lagen 82,6 kb Sequenzinformation aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 vor, welche das Aurafuron-Biosynthesegencluster beinhaltet. Bereiche mit geringer Abdeckung und/oder vermuteten Sequenzfehlern wurden durch weitere Sequenzierung verifiziert.

### 3.1 Annotation des Aurafuron-Biosynthesegenclusters

Das Aurafuron-Biosynthesegencluster ist 52,4 kb groß und hat ein G+C-Gehalt von 67,6 %. Für die Annotation des Biosynthesegenlocus wurden mit Hilfe des Programmes Frame Plot (2.17) offene Leserahmen (ORFs) identifiziert und die Genprodukte mit dem Programm BLAST (2.17) mit bekannten Proteinen in Datenbanken verglichen. Auf diese Weise wurden sechs PKS kodierende Gene (*aufCDEFGI*), drei Cytochrom P<sub>450</sub> kodierende Gene (*aufABH*) und ein eine Monooxygenase kodierendes Gen identifiziert (*aufJ*) (vergleiche Abbildung 3.1, Tabelle 3.1). Die Gene sind vermutlich in drei transkriptionalen Einheiten organisiert: zum einen die Cytochrom P<sub>450</sub> kodierenden Gene *aufAB*, dann auf dem komplementären Strang die PKS kodierenden Gene *aufDC* und schließlich die verbleibenden PKS kodierenden Gene *aufEFGI* mit dem Cytochrom P<sub>450</sub> kodierenden Gen *aufH* und dem Monooxygenase kodierenden Gen *aufJ*. Die Start- und Stopp-Kodons von *aufHIJ* im letzten Operon überlappen, so dass die Gene vermutlich translational gekoppelt sind. Stromaufwärts des Biosynthesegenclusters liegen vier Gene *orf-1234*, deren Genprodukte Ähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein, einer Acyl-CoA-Synthetase, einer Acyl-CoA-Dehydrogenase und einer Histidinkinase zeigen .



orf-4: Histidinkinase                      orf-1: Hypothetisches Protein      aufCDEFGI: PKS  
 orf-3: Acyl-CoA-Dehydrogenase      aufA: Cytochrom P<sub>450</sub>              aufH: Cytochrom P<sub>450</sub>  
 orf-2: Acyl-CoA-Synthetase            aufB: Cytochrom P<sub>450</sub>              aufJ: Monooxygenase

**Abbildung 3.1: Organisation des Aurafuron-Biosynthesegenclusters und abgeleitete Funktionen der Genprodukte.** Gene, die für PKS kodieren, sind als schwarze Pfeile dargestellt. Gene, die für Post-PKS-Enzyme kodieren sind als dunkelgraue Pfeile und andere Proteine kodierende Gene als hellgraue Pfeile dargestellt.

**Tabelle 3.1: Vermutete Funktionen der im Aurafuron-Biosynthesegencluster kodierten Proteine**

| PKS-Teil des Biosynthesegenclusters                               |                     |  |  |                        |  |
|---|---------------------|--|--|------------------------|--|
| Protein (Gen)   | Größe/Länge (Da/bp) | Annotierte Funktion (Domänen und ihre Position innerhalb der Proteinsequenz)<br>Nach <i>in silico</i> -Analyse vermutlich inaktive Domänen sind mit einem Stern markiert |  |                        |  |
| AufC ( <i>aufC</i> )  | 1.867/5.601         | KS (29-455), AT (568-860), DH (923-1093), KR (1463-1641), ACP (1743-1809)  |  |                        |  |
| AufD ( <i>aufD</i> )  | 3.450/10.350        | KS (96-518), AT (626-919), DH (959-1164), KR (1506-1684), ACP (1808-1851), KS (1897-2322), AT (2435-2723), KR (3044-3220), ACP (3322-3391)                               |  |                        |  |
| AufE ( <i>aufE</i> )  | 1.827/5.481         | KS (24-443), AT* (549-800), ER (1095-1410), KR* (1431-1610), ACP (1704-1770)   |  |                        |  |
| AufF ( <i>aufF</i> )  | 3.361/10.083        | KS (20-439), AT (543-835), DH (899-1074), KR (1414-1592), ACP (1709-1759), KS (1831-2255), AT (2373-2666), KR* (2977-3155), ACP (3249-3316)                              |  |                        |  |
| AufG ( <i>aufG</i> )  | 2.125/6.375         | KS (25-451), AT (560-853), DH (911-1078), ER (1441-1752), KR* (1772-1939), ACP (2030-2096)   |  |                        |  |
| AufI ( <i>aufI</i> )  | 2.709/8.127         | ACP (11-77), KS (102-528), AT (620-916), AT (1047-1343), DH (1402-1575), ER* (1998-2268), KR (2290-2468), ACP (2574-2640)  |  |                        |  |
| Stromauf- und stromabwärts von <i>aufCDEFGI</i> kodierte Proteine |                     |  |  |                        |  |
| Protein (Gen)   | Größe (Da/bp)       | Vermutete Funktion des homologen Proteins  | Quelle des homologen Proteins          | Ähnlichkeit/Ide-ntität | Kenn-Nummer des zugehörigen Datenbankeintrages |
| AufA ( <i>aufA</i> )  | 477/1.431           | Cytochrome P <sub>450</sub>  | <i>Frankia sp.</i> Cc13                | 48%/32%                | YP_481755.1                                    |
| AufB ( <i>aufB</i> )  | 413/1.239           | Cytochrome P <sub>450</sub>  | <i>Saccharopolyspora erythraea</i>     | 74%/59%                | AAQ94244.1                                     |
| AufH ( <i>aufH</i> )  | 470/1410            | Cytochrome P <sub>450</sub>  | <i>Nostoc punctiforme</i> PCC731       | 56%/36%                | ZP_00111619.1                                  |
| AufJ ( <i>aufJ</i> )  | 507/1.521           | Monooxygenase  | <i>Saccharopolyspora erythraea</i>     | 62%/47%                | AAQ94250.1                                     |
| Orf-4( <i>orf-4</i> )   | 450/1.350           | PAS/PAC Sensor Hybrid Histidine Kinase   | <i>Geobacter metallireducens</i> GS-15 | 68%/47%                | ABB33685.1                                     |
| Orf-3( <i>orf-3</i> )   | 347/1.041           | Acyl-CoA-Dehydrogenase   | <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304 | 46%/29%                | NP_069505.1                                    |
| Orf-2( <i>orf-2</i> )   | 625/1.875           | Acyl-CoA-Synthetase  | <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102    | 66%/49%                | ZP_00345760.1                                  |
| Orf-1( <i>orf-1</i> )   | 163/489             | Hypothetical Protein   | <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622       | 69%/49%                | YP_634318.1                                    |

### 3.2 *In silico*-Analyse der Polyketidsynthasen

Mit Hilfe des Programmes „NRPS/PKS Analysis“ (vergleiche 2.17) wurden die einzelnen Domänen in der Aurafuron PKS annotiert (Tabelle 3.1, Abbildung 3.2). Die sechs PKS kodieren für ein kombiniertes Lade- und Elongationsmodul und sieben weitere Module für die Einführung von Extensionseinheiten.

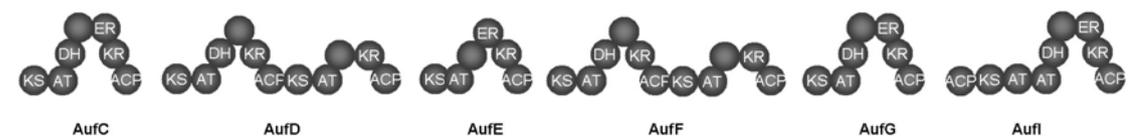


Abbildung 3.2: **Domänenorganisation der Aurafuron PKS.** Die einzelnen Domänen sind durch Kugeln dargestellt. Linker-Regionen sind nicht beschriftet.

In dem kombinierten Lade- und Elongationsmodul AufI ist die KS-Domäne des Elongationsmoduls zwischen dem ACP und der AT-Domäne des Startermoduls positioniert ( $ACP_L$ -KS- $AT_L$ -AT-DH-ER-KR-ACP). Diese Domänenorganisation ist ungewöhnlich, aber auch in anderen myxobakteriellen PKS zu finden (48-51). Alle Elongationsmodule besitzen eine KS-, eine AT- und eine ACP-Domäne. Dabei weisen alle KS-Domänen den hochkonservierten Cysteinrest und weitere Reste des beschriebenen DxxCSSxL-Motivs auf, ebenso einen weiteren, konservierten Histidinrest (vergleiche Abbildung 3.3, (52;53). In allen AT-Domänen ist das beschriebene konservierte GxSxG-Motiv zu finden (54). Weitere Motive wurden nach extensiven Sequenzvergleichen von Malonyl- und Methylmalonyl-CoA selektierenden AT-Domänen beschrieben (55). Dabei scheint ein Serin-Rest in einem YASH-Motiv an Position ~200 bzw. ein Phenylalanin-Rest in einem HAFH-Motiv an gleicher Stelle spezifisch für Methylmalonyl-CoA bzw. Malonyl-CoA transferierende AT-Domänen zu sein. Von den acht im Aurafuron-Biosynthesegencluster kodierten AT-Domänen weisen fünf AT-Domänen an entsprechender Stelle einen Serin-Rest auf (die AT-Domänen der Module AufC, AufD1, AufF2, AufG und AufI), während zwei einen Phenylalanin-Rest beinhalten (die AT-Domänen der Module AufD2 und AufF1). Die AT-Domäne von AufE trägt an dieser Position einen Leucin-Rest und weicht auch in weiteren Positionen von den anderen AT-Domänen ab. Die  $AT_L$ -Domäne des Lademoduls, welche wahrscheinlich die Startereinheit auswählt, weist in dieser Position einen Prolin-Rest auf. Neben der Minimalausstattung KS-AT-ACP sind in allen Elongationsmodulen verschiedene Kombinationen der optionalen KR-, DH- und ER-Domänen vorhanden. Die Module AufD2 und AufF2 besitzen eine KR-Domäne, die Module AufC, AufD1 und AufF1 eine DH-KR-Domäne und die Module AufG und AufI schließlich weisen die komplette reduktive Schleife mit DH-, ER- und KR-Domäne auf. Die konservierte NADPH-Bindestelle GxGxxG (56) ist in allen KR-Domänen zu finden, mit Ausnahme der KR-Domänen von AufE, AufF2 und AufG (vergleiche Abbildung 3.3). Diese KR-

Domänen weisen auch Abweichungen in den konservierten Serin-, Tyrosin- und Asparaginresten auf (57). Abhängig von der Präsenz eines Aspartat-Restes in einem LDD-Motiv können KR-Domänen einem A-oder B-Typ zugeordnet werden. KR-Domänen, in denen der Aspartat-Rest vorhanden ist, werden als B-Typ klassifiziert und katalysieren häufig die Reduktion der intermediären Ketofunktion zu einem D-Alkohol. A-Typ-Domänen katalysieren die Reduktion zum L-Alkohol (57;58). Der entsprechende Aspartat-Rest ist in der Aurafuron PKS in den KR-Domänen der Module AufC, AufD2, AufF1 und AufI vorhanden. In den DH-Domänen ist jeweils das konservierte HxxxGxxxxP vorhanden (30). Eine Ausnahme ist die DH-Domäne von AufC, in welcher der Glycin-Rest des konservierten Motives durch einen Aspartat-Rest ersetzt ist (vergleiche Abbildung 3.3). Die ER-Domänen der Module AufG und AufE weisen mit einigen Abweichungen das beschriebene HxxxGGVGxxAxxxxA-Motiv auf (59), die ER-Domäne von AufI weicht in vielen Positionen von den konservierten Resten funktionaler ER-Domänen ab und ist wahrscheinlich inaktiv (Abbildung 3.3). Alle Module enthalten größere „Linker“-Domänen, welche N-terminal der KR- bzw. der ER-Domänen liegen. Diese Domänen weisen gemeinsame Motive auf, wie ein GLxRxxxxE Motiv an Position ~359 (Ausnahme: DH-KR-Linker Region von AufG) und ein E/DxxxxxR Motiv an Position ~413. Eine TE-Domäne, welche üblicherweise die Freisetzung des Polyketides vom Multienzymkomplex katalysiert (33), konnte in der Aurafuron PKS nicht identifiziert werden.

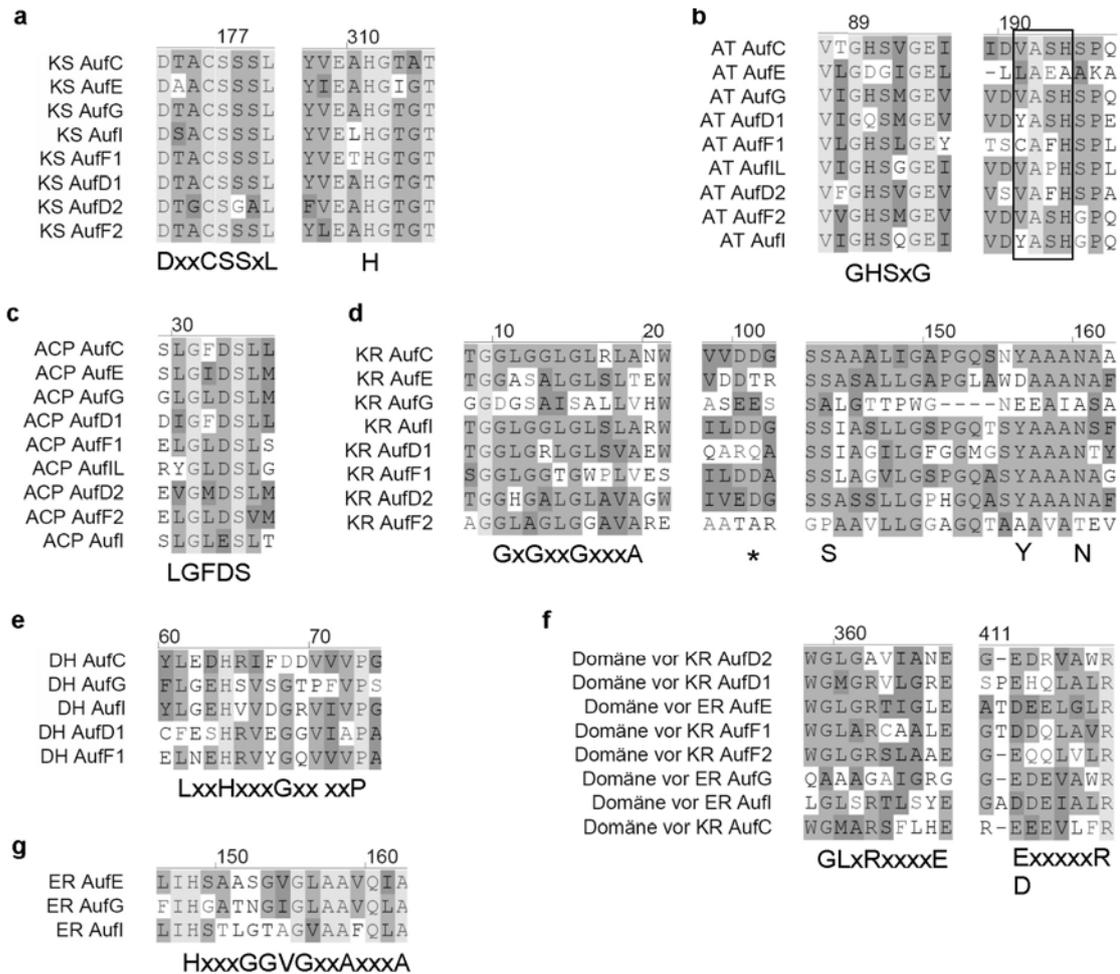


Abbildung 3.3: Sequenzbereiche der konservierten Motive in den Domänen der Aurafuron PKS. a: KS-Domänen, b: AT-Domänen, c: ACP-Domänen, d: KR-Domänen, e: DH-Domänen, f: AT-KR/DH-KR/DH-ER-Linker g: ER-Domänen. Die konservierten Motive sind unterhalb der Sequenzvergleiche angegeben. Der Motivbereich, welcher in Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA transferierenden AT-Domänen unterschiedlich ist, ist durch einen schwarzen Rahmen markiert.

### 3.3 Inaktivierungsexperimente zur Analyse der Polyketidsynthasen

Die *in silico* Analyse der AT-Domänen des Aurafuron-Biosynthesegenclusters legt nahe, daß entweder AufD2 oder AufF1 in der Biosynthese iterativ genutzt wird (vergleiche 5.1.1). Um zu untersuchen, welches der beiden Module iterativ genutzt wird, sollten die KR-Domänen der beiden Module unabhängig voneinander inaktiviert werden. Die Inaktivierung markerlos erfolgen, damit die Funktionalität der restlichen Domänen erhalten bleibt. Für die Einführung der markerlosen Mutation wurde das *ntpII/sacB*-Gegenselektionssystem gewählt, welches auf dem Vektor pSWU41 vorhanden ist und bereits erfolgreich für markerlose Mutagenesen in *S. aurantiaca* DW4/3-1 verwendet wurde (60). Ein pSWU41 basiertes Inaktivierungskonstrukt kann

über einen homologen Bereich, der gegenüber der Wildstammsequenz eine Deletion oder Punktmutation aufweisen kann, in das Chromosom von *S. aurantiaca* DW4/3-1 integrieren. Durch das *ntpII*-Gens des Vektors wird Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt, anhand derer Integrationsmutanten selektiert werden können. Das ebenfalls auf dem Vektor vorhandene *sacB*-Gen vermittelt Sensitivität gegenüber Saccharose, welche vom zugehörigen Genprodukt in einen für die Zelle toxischen Metaboliten umgewandelt wird. Nach längerer Passage ohne Selektionsdruck können deshalb durch Zusatz von Saccharose solche Mutanten selektiert werden, in denen die Vektorsequenz über den homologen Bereich deletiert wurde („Doppelcrossover-Mutante“). Die Mutanten entsprechen entweder im Genotyp dem Wildstamm (Revertanten), oder weisen die Deletion/Punktmutation des homologen Bereiches des pSWU41-Derivates auf.

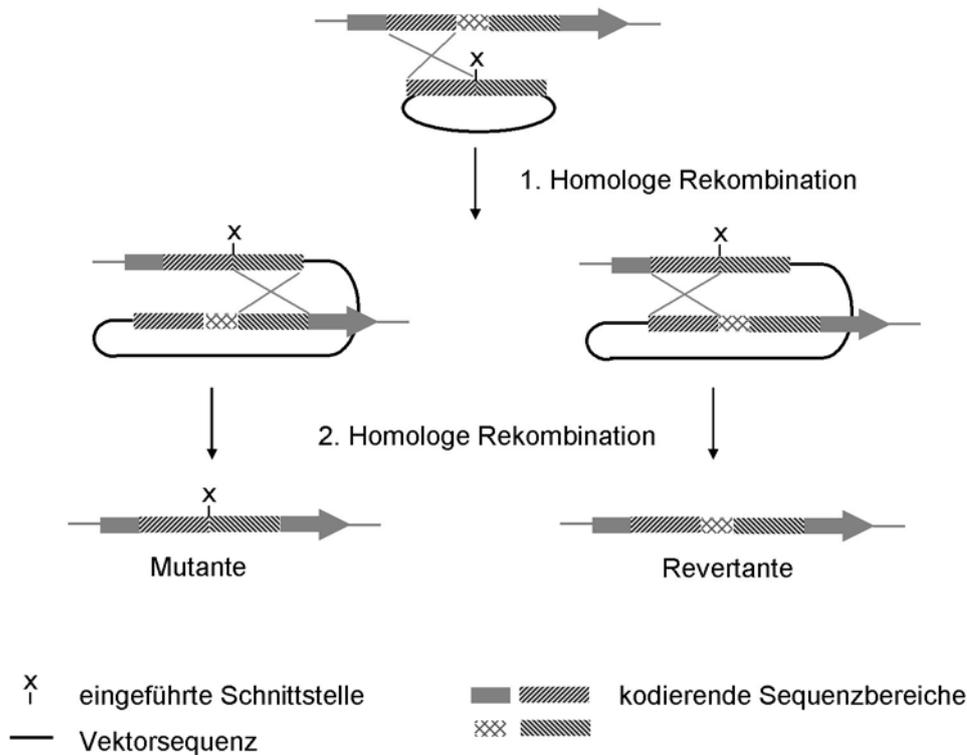


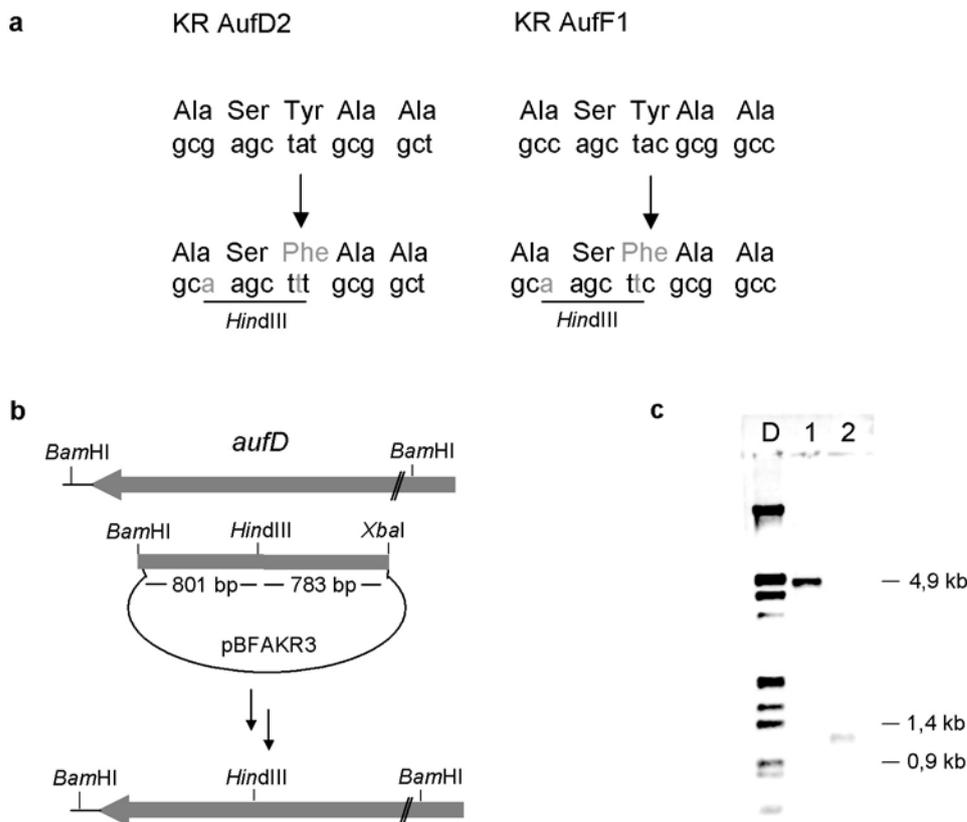
Abbildung 3.4: **Prinzip der Generierung markerloser Mutanten durch zweifache homologe Rekombination.** Zur Erläuterung siehe den laufenden Text.

### 3.3.1 Generierung und genotypische Analyse der PKS-Mutanten

Für die markerlose Inaktivierung der KR-Domänen von AufD2 und AufF1 wurden die pSWU41 basierten Konstrukte pBFAKR3 und pBFAKR5 entworfen und kloniert (vergleiche 2.6.4). Der 1,55 kb bzw. 1,58 kb große homologe Bereich der Konstrukte beinhaltet je zwei Punktmutationen, die zum Austausch eines hochkonservierten Tyrosin-Restes gegen einen Phenylalanin-Rest führen (Y3189F und Y1561F).

Zusätzlich wurden durch die Punktmutationen *Hind*III-Schnittstellen eingeführt (vergleiche Abbildung 3.5 a). pBFAKR3 und pBFAKR5 wurden in die *S. aurantiaca* DW4/3-1-Mutante ERM4 elektroporiert. Diese markerlose Mutante trägt eine Deletion im Gen *mtaF* des Myxothiazol-Biosyntheseegenclusters, welche zum Ausfall der Myxothiazolproduktion führt (61). Die erhaltenen Kanamycin-resistenten und Saccharose-sensitiven Klone wurden mittels PCR verifiziert, dabei wurde der gesamte homologe Bereich der Inaktivierungskonstrukte amplifiziert (Oligonukleotidpaare BFAKR3-1/BFAKR3-4 und BFAKR5-1/BFAKR5-4) und anschließend mit *Hind*III hydrolysiert. Wie erwartet wurden je etwa 50 % des erhaltenen Amplifikates mit *Hind*III zu den 801 bp und 783 bp bzw. 582 bp und 924 bp großen Fragmenten hydrolysiert: die Mutante besitzt zwei Kopien des Genbereiches, und der ursprüngliche Genbereich enthält keine *Hind*III-Schnittstelle. Die verifizierten Mutanten BFAKR3 (Integration von pBFAKR3) und BFAKR5-2 (Integration von pBFAKR5) wurden über mehrere Wochen bis Monate ohne Selektionsdruck in flüssigem Medium passagiert. Schließlich konnte durch Selektion auf Saccharose eine markerlose Mutante der KR-Domäne von AufD2 isoliert werden. Nach Restriktion der genomischen DNA der Mutante BFAKR3-3 und des Wildstammes ERM4 mit *Bam*HI/*Hind*III und gelelektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA mit einem Southern Blot analysiert und die Mutante bestätigt. Als Sonde diente das 801 bp Fragment des Vektors pBFAKR3 (vergleiche Abbildung 3.5 b, c). Nach Restriktion des Wildstammes hybridisiert ein 4,7 kb großes Fragment (*Bam*HI-*Bam*HI). In der Mutante ist durch die eingeführten Punktmutationen eine zusätzliche *Hind*III-Schnittstelle vorhanden und das hybridisierende Fragment ist somit nur 1,1 kb groß (*Hind*III-*Bam*HI).

Trotz intensiven Bemühens konnte keine markerlose KR-Mutante von AufF1 isoliert werden.



**Abbildung 3.5: Mutagenese der KR-Domänen der Module AufD2 und AufF1 (a, b) und genotypische Analyse der Mutante BFAKR3-3 (c).** a: Sequenzbereiche der eingeführten Punktmutationen im Wildstamm (oben) und den Mutanten (unten). Die Punktmutationen sind in grau dargestellt, gleichzeitig wurde eine *HindIII*-Schnittstelle eingeführt. b: Lage des Inaktivierungskonstruktes der KR-kodierenden Sequenz von AufD2 und resultierender Genotyp der markerlosen Mutante. c: Southern Blot Analyse des Wildstammes (Spur 1) und der Mutante BFAKR3-3 (Spur 2) nach Restriktion mit *BamHI/HindIII* im Vergleich zu einem DIG-markierten DNA-Größenstandard (D). Als Sonde diente das 801 bp Fragment von pBFAKR3 (siehe b). Durch die eingeführte *HindIII*-Schnittstelle ist das hybridisierende Fragment der Mutanten-DNA deutlich kleiner als das der Wildstamm-DNA.

### 3.3.2 Phänotypische Analyse der markerlosen Mutante

Die markerlose Mutante BFAKR3-3 wurde parallel zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz kultiviert und anschließend wurden Zellen und XAD extrahiert (vergleiche 2.18). Im Gegensatz zum Wildstamm enthielten die Extrakte der Mutante weder Aurafuron A noch Aurafuron B. Veränderte Aurafuronderivate konnten nicht identifiziert werden.

### 3.4 *In silico*-Analyse der kodierten Post-PKS-Enzyme

Im Aurafuron-Biosynthesegencluster sind vier Post-PKS-Enzyme kodiert, welche vermutlich an der Biosynthese des Furanonringes beteiligt sind: drei Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen AufABH und eine Monooxygenase AufJ. Alle Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen weisen die für diese Enzymklasse beschriebenen Motive auf (A/GGxD/ETT/S, ExxR, FxxGxRxCxG, (62)). Um Hinweise auf die Funktion der Post-PKS-Enzyme bei der Aurafuron-Biosynthese zu erhalten, wurde mit Hilfe des Programmes Blast (vergleiche 2.17) nach experimentell charakterisierten homologen Proteinen gesucht. AufA zeigt 21 % identische und 36 % ähnliche Aminosäuren zu einer „*ent*-kaurenoic acid oxidase“ KAO aus *Pisum sativum*, die an der Biosynthese des Pflanzenhormons Giberellin beteiligt ist (63). Diese Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase katalysiert die Hydroxylierung eines Cyclohexanderivates, die nachfolgende Oxidation und Ringkontraktion zu einem Cyclopentanal-Derivat und möglicherweise auch die weitere Oxidation des Aldehyds zu Carboxylgruppe. AufB zeigt Ähnlichkeit zu den Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen NikQ und NovI aus *Streptomyces* sp. (35 % identische und 52 % ähnliche Aminosäuren bzw. 34 % identische und 50 % ähnliche Aminosäuren über die gesamte Proteinlänge). NikQ und NovI katalysieren die  $\beta$ -Hydroxylierung von Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) gebundenem Histidin bzw. Tyrosin in der Nikkomycin-bzw. Novobiocin-Biosynthese (64;65). Für AufH konnten keine signifikanten Homologien zu experimentell charakterisierten Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen ermittelt werden. Die Monooxygenase AufJ ist zu 27 % idenisch mit MtmOIV (38 % ähnliche Aminosäuren über die gesamte Proteinlänge), welche an der Mithramycin-Biosynthese in *Streptomyces argillaceus* beteiligt ist (66). MtmOIV katalysiert in einer biologischen Bayer-Villiger Oxidation die Transformation des Cyclohexanon-Derivates Premithramycin B zum entsprechenden Caprolacton, gefolgt von Ringöffnung und Decarboxylierung (67).

### 3.5 Inaktivierungsexperimente zur Analyse der Post-PKS-Enzyme

Um die Funktion der Post-PKS-Enzyme in der Aurafuron-Biosynthese näher zu untersuchen, wurden alle vier Gene *aufABHJ* durch Insertionsinaktivierung bzw. markerlose Deletionen inaktiviert.

#### 3.5.1 Inaktivierung von *aufA*

*aufA* sollte inaktiviert werden, ohne gleichzeitig die Transkription des direkt stromabwärts folgenden Gens *aufB* zu beeinflussen, dafür wurde das pSWU41 basierte Konstrukt pBFA3 entworfen und kloniert. pBFA3 enthält einen 1,1 kb großen homologen Bereich zu *aufA*, in dem jedoch 303 bp aus der Mitte des Gens deletiert sind (vergleiche Abbildung 3.6 a, 2.6.4). Nach Integration von pBFA3 in das *S. aurantiaca* DW4/3-1 Chromsomen und nachfolgender Deletion der Vektorsequenz resultiert eine Doppelcrossovermutante (vergleiche Abbildung 3.1) mit einer verkürzten Kopie von *aufA*, in der die zentralen 303 bp deletiert sind. Dem abgeleiteten Genprodukt fehlen so

101 Aminosäuren in der Mitte des Proteins, was zum Verlust von Raumstruktur und Funktion des Proteins führen sollte. Nach Elektroporation von pBFA3 in ERM4 wurden Klone erhalten und mittels PCR verifiziert. Dabei wurde das Oligonukleotidpaar Aur9/PSWU411 eingesetzt, welches in der homologen Sequenz und in der Vektorsequenz bindet. Genomische DNA der Mutante E3-2 ergab ein 1,1 kb großes Amplifikat, entsprechend einer Integration des Vektors über das homologe Fragment zum 3'-Ende von *aufA*. Die Mutante E3-2 wurde ohne Selektionsdruck passagiert und schließlich konnte ein Klon isoliert werden, der nach Deletion der Vektorsequenz den gewünschten Genotyp zeigte. In einer PCR mit dem Oligonukleotidpaar Aur9/Aur12, welches am 5'- und 3'-Ende von *aufA* bindet, wurde nur das um 303 bp verkürzte Amplifikat erhalten. Eine PCR mit Oligonukleotiden, die Vektorsequenz nachweisen würden (Aur9/PSWU411), ergab kein Amplifikat.

Die verifizierte markerlose Mutante BFAPA und die Parallelmutanten E3-2-7 und E3-2-16 wurde parallel zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz angezogen und anschließend die Sekundärstoffproduktion analysiert. BFAPA und die anderen Mutanten produzierten weder Aurafuron A noch Aurafuron B (vergleiche Abbildung 3.6 b).

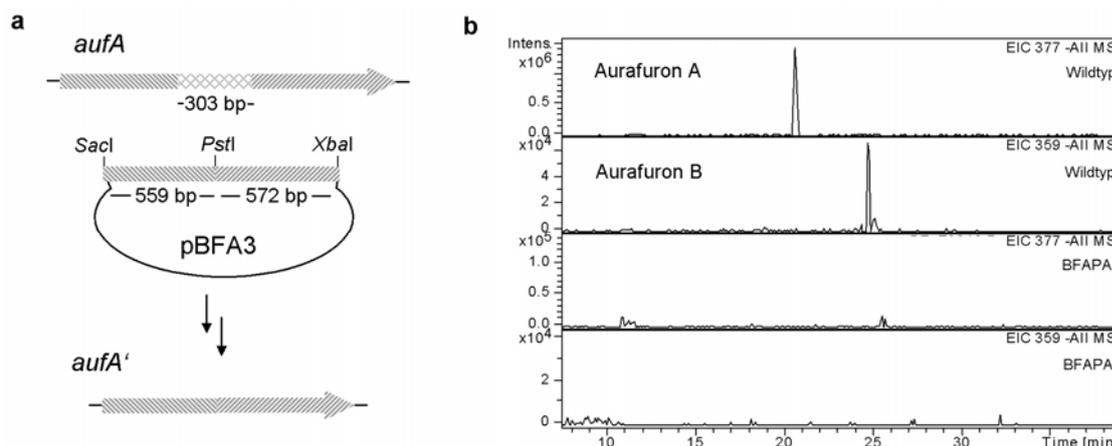


Abbildung 3.6: **Inaktivierung von *aufA***. a: Prinzip der Mutagenese (vergleiche Text) b: Phänotypische Analyse der markerlosen Mutante BFAPA im Vergleich zum Wildstamm (WT) mit HPLC-MS. Dargestellt sind extrahierte Chromatogramme von Ionen mit einem Masse-Ladungsverhältnis  $m/z$  von 377 und 359 nach negativer Ionisierung, jeweils von Extrakten des Wildstammes (WT) und der Mutante (BFAPA). Aurafuron A zeigt nach negativer Ionisierung ein Molekülion mit  $m/z$  377, Aurafuron B 359 (je [M-H]).

### 3.5.2 Inaktivierung von *aufB*

Nach mehrfach erfolgloser Elektroporation von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit Inaktivierungskonstrukten für *aufB* wurde das konjugierbare Inaktivierungskonstrukt pBFABS entworfen und kloniert (vergleiche Abbildung 3.7 a, 2.6.4). Nach Konjugation von pBFABS konnten Kanamycin-resistente Klone erhalten werden. Diese wurden angezogen und mit einem Southern Blot genetisch verifiziert. Dafür wurde die genomische DNA der Mutanten mit *Bam*HI hydrolysiert, gelelektrophoretisch

aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem DIG markierten Kanamycin-Resistenzgen hybridisiert. Es hybridisierte das erwartete 7,1 kb Fragment (vergleiche Abbildung 3.7 b). Die verifizierte Mutante BFABK wurde parallel zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz kultiviert und anschließend die Sekundärstoffproduktion untersucht. Die Mutante produziert weder Aurafuron A noch Aurafuron B. Stattdessen wird eine Verbindung produziert, welche ein vergleichbares Laufverhalten in der HPLC zeigt wie Aurafuron B, nach negativer Ionisierung die gleiche Molekülmasse hat wie Aurafuron B ( $[M-H]^- = 359$ ), jedoch ein anderes Fragmentierungsmuster zeigt (vergleiche Abbildung 3.7 c, 3.6). Das Ausmaß der Produktion von Aurafuron B und der unbekanntenen Verbindung ist vergleichbar (etwa 0,3 mg/l (8Z)-Aurafuron (26)).

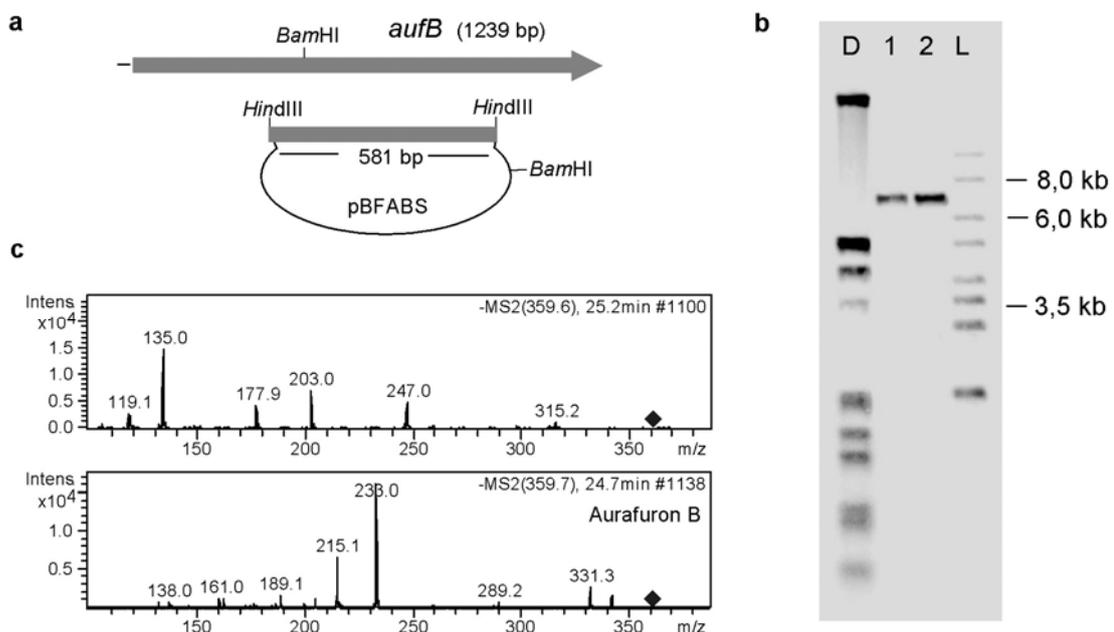


Abbildung 3.7: **Mutagenese von *aufB***. a: Lage des Inaktivierungskonstruktes zum Gen, b: Southern Blot Analyse der Mutante BFABK. D: DIG markierter DNA-Größenstandard, L: DNA-Größenstandard (durch unspezifische Hybridisierung sichtbar), Spuren 1 und 2: gDNA (chromosomale DNA) von BFABK-1 und BFABK-2. Die DNA wurde mit *Bam*HI hydrolysiert. Als Sonde diente das Kanamycin-Resistenzgen des Vektors. c: Fragmentierung von Aurafuron B und der von BFABK produzierten Verbindung mit  $m/z$  359 (negative Ionisierung).

### 3.5.3 Inaktivierung von *aufH*

Für die markerlose Inaktivierung von *aufH* wurde das Inaktivierungskonstrukt pBF\_APC entworfen und kloniert (vergleiche Abbildung 3.8 a). Nach Elektroporation von pBF\_APC in *S. aurantiaca* DW4/3-1 wurden Kanamycin-resistente Klone erhalten und mit PCR analysiert. Dabei wurde mit dem im Vektorrückgrat und im homologen

Fragment bindenden Oligonukleotidpaar PSWU411/BF\_APC1 das erwartete Amplifikat erhalten. Nach Passage der verifizierten Mutante BFAPC ohne Selektionsdruck konnten Klone isoliert werden, in denen die Vektorsequenz deletiert worden war. Mutanten mit der gewünschten 312 bp Deletion in *aufH* wurden mittels PCR identifiziert. Mit dem Oligonukleotidpaar BFAPC-3/BFAPC-4, welches außerhalb des homologen Bereichs bindet, wurde das gegenüber dem Wildstamm um 312 bp verkürzte Amplifikat erhalten. Die verifizierte Mutante BFAPC2-3 wurde parallel zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz angezogen. BFAPC2-3 produziert weder Aurafuron A noch Aurafuron B, aber wie BFABK eine Verbindung, die nach negativer Ionisierung ein Molekulation von  $m/z = 359$  aufweist. Diese Verbindung entspricht von Masse und Laufverhalten in der HPLC Aurafuron B, fragmentiert jedoch anders (vergleiche 3.5.2, 3.6).

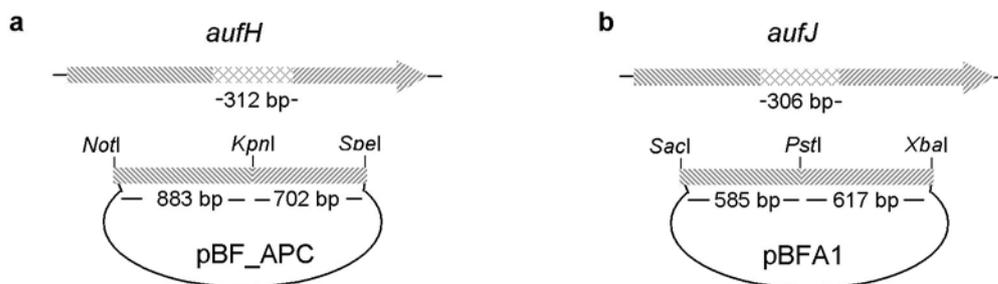


Abbildung 3.8: Inaktivierungskonstrukte für *aufH* (a) und *aufJ* (b)

### 3.5.4 Inaktivierung von *aufJ*

*aufJ* kodiert eine Monooxygenase. Für die Inaktivierung wurde das pSWU41 basierte Konstrukt pBFA1 entworfen und kloniert (vergleiche Abbildung 3.8, 2.6.4). Nach Elektroporation von pBFA1 in ERM4 wurden Kanamycin-resistente und Saccharose-sensitive Klone erhalten und mittels PCR verifiziert. Dafür wurde das Oligonukleotidpaar PSWU41u/Aur4, welches im Vektorrückgrat und im homologen Fragment bindet, und das Oligonukleotidpaar Aur1/Aur4, welches direkt am 5'-bzw. 3'-Ende von *aufJ* bindet, eingesetzt (vergleiche Abbildung 3.9). Die verifizierte Mutante E1-4 wurde ohne Selektionsdruck passagiert, schließlich konnten Kanamycin-sensitive und Saccharose-tolerante Einzelkolonien erhalten werden. Die Klone wurden angezogen und mittels PCR kontrolliert. Dabei wurde mit dem Oligonukleotidpaar Aur1/Aur4 ein 1,4 kb Fragment (Revertanten) bzw. ein 1,1 kb Fragment (Mutanten) amplifiziert. Das von Mutanten-DNA erhaltene 1,2 kb Fragment wurde mit *PstI* zu zwei 585 bp bzw. 617 bp großen Fragmenten hydrolysiert.

Die verifizierte markerlose Mutante BFAMD und die Parallelmutanten E1-4-4 und E1-4-6 wurden parallel zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz kultiviert, anschließend wurden Kulturextrakte hergestellt. Die Mutanten produzieren

weder Aurafuron A noch Aurafuron B, aber wie BFABK und BFAPC eine Verbindung, die nach negativer Ionisierung ein Molekulation von  $m/z = 359$  besitzt. Diese Verbindung entspricht von Masse und Laufverhalten (auch nach Veränderung des Gradienten) in der HPLC Aurafuron B, fragmentiert jedoch anders. Die unbekannt Verbindungen der Mutanten BFABK, BFAPC und BFAMD mit  $m/z$  von 359 (nach negativer Ionisierung) fragmentieren gleich (vergleiche 3.5.2, 3.6).

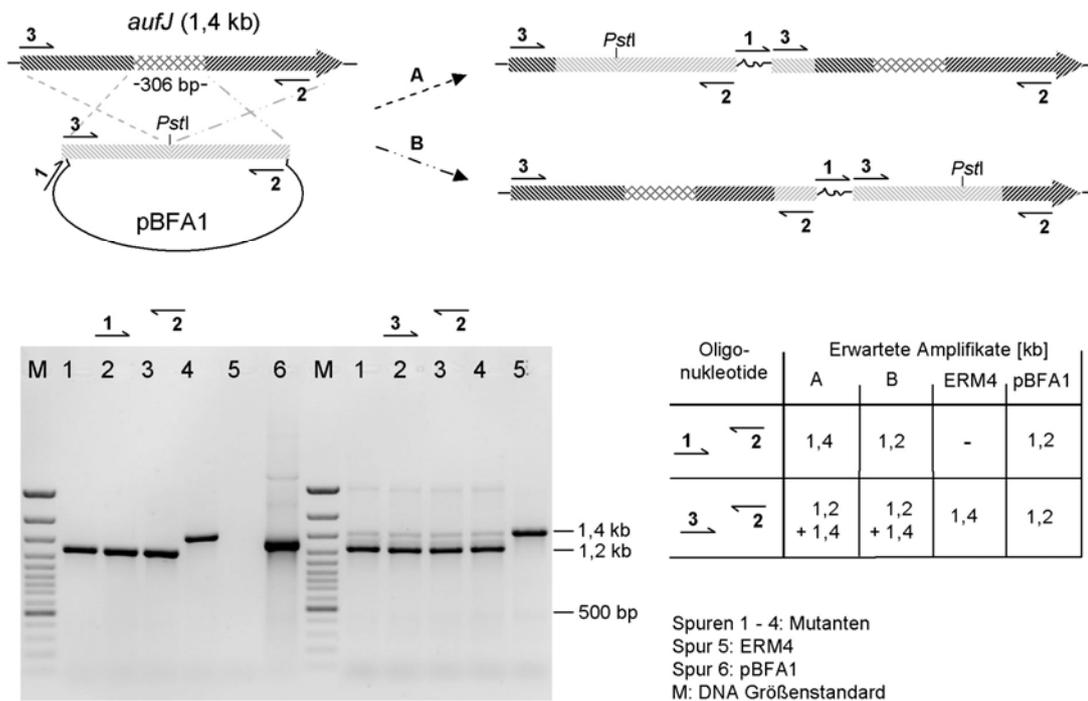


Abbildung 3.9: PCR-Kontrolle der nach Elektroporation von pBFA1 erhaltenen Mutanten.

Abhängig davon, über welches der homologen Fragmente von pBFA1 die Integration stattfindet, resultiert eine Mutante des A-Typs (oben rechts) oder eine B-Typ Mutante. Das Oligonukleotidpaar 1/2 (PSWU41u/Aur4) bindet im Vektorrückgrat und im homologen Fragment, so dass von der Mutanten-DNA je nach Integration ein 1,4 kb (A-Typ, Spur 4) oder 1,2 kb (B-Typ, Spuren 1-3) großes Amplifikat erhalten wird. Von pBFA1 wird das 1,2 kb Amplifikat erhalten, von Wildstamm-DNA wird kein Amplifikat erhalten. Das Oligonukleotidpaar 3/2 (Aur1/Aur4) bindet am 5'- und 3'-Ende von *aufJ* im Bereich des homologen Fragmentes. Mit diesem Oligonukleotidpaar werden von Wildstamm-DNA das erwartete 1,4 kb Fragment erhalten. Die Mutanten-DNA enthält je eine verkürzte und lange Kopie, so dass ein 1,2 kb und (schwach) ein 1,4 kb großes Amplifikat erhalten wird.

### 3.6 Identifizierung von möglichen Aurafuronderivaten

Bei der genauen Auswertung der HPLC-Läufe von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und der generierten Mutanten fielen vier bisher unbekannte Verbindungen auf, die wahrscheinlich Aurafuronderivate darstellen. In Kulturextrakten des Wildstammes sind zwei Verbindungen vorhanden, die nach 18,3 min und 19,0 min von der HPLC-Säule eluieren (Methode: BF\_Aurfl, vergleiche 2.19.2), also vor den bekannten Aurafuronen

A und B. Diese Verbindungen haben nach negativer Ionisierung die Massen  $[M-H]^- = 395,2$ . Nach Bestimmung der präzisen Massen mit einem micrOTOF Massenspektrometer der Firma Bruker wurde mit einer geringen Abweichung von 1,0 ppm für das Molekülion die Summenformel  $C_{22}H_{35}O_6$  berechnet (theoretische Masse: 395,24282; gefunden: 395,24322 und 395,24323). Das Fragmentierungsmuster der beiden Verbindungen nach MS/MS-Kopplung ist nahezu identisch (vergleiche Abbildung 3.10). Einige der Fragmente werden nach Fragmentierung unter gleichen Bedingungen auch von Aurafuron A erhalten. Nach Fütterung von L-[5,5,5- $^2H_3$ ]-Leucin wurde eine Massenverschiebung von +3 festgestellt, was konsistent mit der Verwendung von Isovaleryl-CoA als Startereinheit der Aurafuronbiosynthese ist. Ein UV-Spektrum konnte nicht zugeordnet werden. Die beiden Verbindungen konnten in keinem der Mutanten-Kulturextrakte detektiert werden. Sie wurden Aurafuron D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> genannt.

Eine weitere Verbindung, die bei sorgfältiger Analyse von HPLC-Chromatogrammen von Kulturextrakten auffiel, eluiert nach 26,2 min (Methode: BF\_Aurf1) und hat nach negativer Ionisierung die Masse  $[M-H]^- = 373,2$ . Nach Bestimmung der präzisen Masse des Molekülions wurde die Summenformel  $C_{23}H_{34}O_4$  berechnet (8.3 ppm Verschiebung; theoretische Masse: 373,23789, gefunden: 373,23820). Die nach MS/MS-Kopplung detektierten Fragmente (vergleiche Abbildung 3.10) werden von keinem der bekannten Aurafurone erhalten. Nach Fütterung von L-[5,5,5- $^2H_3$ ]-Leucin wurde eine Massenverschiebung des Molekülions von +3 festgestellt. Die Verbindung wurde vorläufig Aurafuron C genannt, das zugeordnete UV-Spektrum ist in Abbildung 3.10 abgebildet. Aurafuron C wird vom Wildstamm und allen in dieser Arbeit generierten Mutanten produziert, mit Ausnahme der Mutante BFAKR3-3 (KR -Mutante von AufD2).

In Kulturextrakten der Mutanten BFABK (*aufB*-Mutante), BFAPC2-3 (*aufH*-Mutante) und BFAMD (*aufJ*-Mutante) ist eine Verbindung zu finden, die von der Masse nach negativer Ionisierung und dem Laufverhalten Aurafuron B entspricht, jedoch bei MS/MS-Kopplung unter gleichen Bedingungen in andere Fragmente zerfällt. Das Fragmentierungsmuster dieser Aurafuron B' genannten Verbindung ist stattdessen dem der Aurafuron C genannten Verbindung sehr ähnlich (vergleiche Abbildung 3.10). Nach Bestimmung der präzisen Masse des Molekülions von Aurafuron B' ( $m/z$  359, negative Ionisierung) ist die berechnete Summenformel identisch mit der Summenformel des Molekülions von Aurafuron B ( $C_{22}H_{31}O_4$ ; theoretische Masse des des Molekülions: 359,22169, gefunden: 359,22153; negative Ionisierung).

Von allen Verbindungen wurden nach MS/MS-Kopplung die präzisen Fragmentmassen bestimmt und anhand dessen die Summenformeln der Fragmente ermittelt (Tabelle 3.2). Die möglicherweise zuzuordnenden Fragmente der Moleküle sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

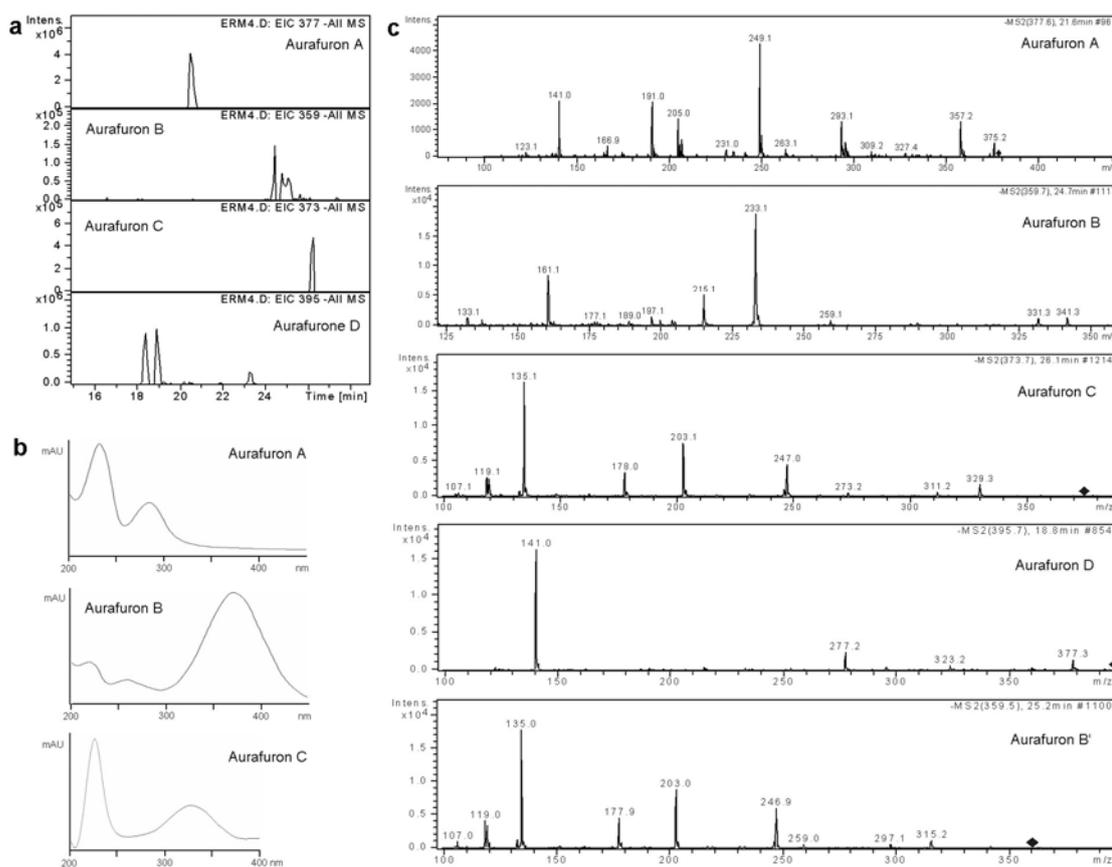


Abbildung 3.10: **HPLC-UV/VIS-MS/MS Analytik der Aurafurone.** a) Ausschnitt aus einem HPLC-Chromatogramm von ERM4. b) UV-Spektren von Aurafuron A, B und C. c) Fragmentierungsmuster der Aurafurone A, B und der neuen Derivate C, D, B'. (8Z) und (8E) Aurafuron B (vergleiche Abbildung 1.3) fragmentieren gleich, ebenso Aurafuron D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub>.

Tabelle 3.2: **Fragmentierung der Aurafurone bei MS/MS-Kopplung (negative Ionisierung)**

| Verbindung  | Mutterion [M-H] <sup>-</sup> | Summenformel Mutterion (theoretische Masse)                   | Frag-ment [M-H] <sup>-</sup> | Summenformel Frag-ment (theoretische Masse)                   | Differenz Fragment-Mutterion                  | Differenz Fragment-nächst-größtes Fragment | Bemer - kung                         |
|-------------|------------------------------|---|------------------------------|---|---|--|--------------------------------------|
| Aurafuron A | 377,23271                    | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub><br>(377,23225) | -                            | -   | -   | -  | *                                    |
|             |                              |   | 359,22098                    | C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub><br>(359,22169) | H <sub>2</sub> O                              | -  | entspricht Aurafuron B, <sup>*</sup> |
|             |                              |   | 277,17972                    | C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub><br>(277,17982) | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>  | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O            | *                                    |
|             |                              |   | 233,11717                    | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub>                | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>              | #                                    |

\* nach Fütterung von L-[5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Leucin ist eine Massenverschiebung von +3 zu beobachten

# nach Fütterung von L-[5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Leucin ist keine Massenverschiebung zu beobachten

| Verbindung                  | Mutterion<br>[M-H] <sup>-</sup> | Summen-<br>formel<br>Mutterion<br>(theoretische<br>Masse)     | Frag-<br>ment<br>[M-H] <sup>-</sup> | Summen-<br>formel Frag-<br>ment<br>(theoretische<br>Masse)    | Differenz<br>Fragment-<br>Mutterion            | Differenz<br>Fragment-<br>nächst -<br>größtes<br>Fragment | Bemer -<br>kung              |
|-----------------------------|---------------------------------|---|-------------------------------------|---|--|---|------------------------------|
|                             |                                 |   |                                     | (233,11722)   |  |   |                              |
|                             |                                 |   | 141,05536                           | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub><br>(141,05462)   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>                             |                              |
| Aurafuron B<br>(8Z)         | 359,22060                       | C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub><br>(359,22169) | -                                   | -   | -  | -   |                              |
|                             |                                 |   | 233,11713                           | C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub><br>(233,11722) | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O               | -   | #                            |
|                             |                                 |   | 215,10654                           | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub><br>(215,10666) | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | H <sub>2</sub> O  | #                            |
|                             |                                 |   | 161,09655                           | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O<br>(161,09609)              | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O                           | #                            |
| Aurafuron C                 | 373,23820                       | C <sub>23</sub> H <sub>33</sub> O <sub>4</sub><br>(373,23789) | -                                   | -   | -  | -   | *                            |
|                             |                                 |   | 329,24691                           | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub><br>(329,24751) | CO <sub>2</sub>                                | -   |                              |
|                             |                                 |   | 247,13273                           | C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub><br>(247,13287) | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O               | -   | #                            |
|                             |                                 |   | 203,14327                           | C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O<br>(203,14304)              | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>  | CO <sub>2</sub>   | #                            |
|                             |                                 |   | 178,06292                           | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub><br>(178,06245) | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O              | -   | #                            |
|                             |                                 |   | 135,08070                           | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O<br>(135,08044)               | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> | -   | #                            |
| Aurafuron<br>D <sub>1</sub> | 395,24322                       | C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>6</sub><br>(395,24282) | -                                   | -   | -  | -   | *                            |
|                             |                                 |   | 377,23130                           | C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub><br>(377,23225) | H <sub>2</sub> O                               | -   | entspricht<br>Aurafuron<br>A |
|                             |                                 |   | 323,18774                           | C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>5</sub><br>(323,18530) | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub>                             | *                            |
|                             |                                 |   | 295,19010                           | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub><br>(295,19039) | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | CO  | *                            |
|                             |                                 |   | 277,17959                           | C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub><br>(277,17982) | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>  | H <sub>2</sub> O  | *                            |
|                             |                                 |   | 141,05543                           | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub><br>(141,05462)   | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                           | #                            |
| Aurafuron<br>B'             | 359,22153                       | C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub><br>(359,22169) | -                                   | -   | -  | -   |                              |
|                             |                                 |   | 315,23151                           | C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub><br>(315,23186) | CO <sub>2</sub>                                | -   |                              |
|                             |                                 |   | 247,13290                           | C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub><br>(247,13287) | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O               | -   |                              |
|                             |                                 |   | 203,14336                           | C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O<br>(203,14304)              | C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>  | CO <sub>2</sub>   | #                            |
|                             |                                 |   | 178,06293                           | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub><br>(178,06245) | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O              | -   |                              |
|                             |                                 |   | 135,08128                           | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O<br>(135,08044)               | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> | -   | #                            |

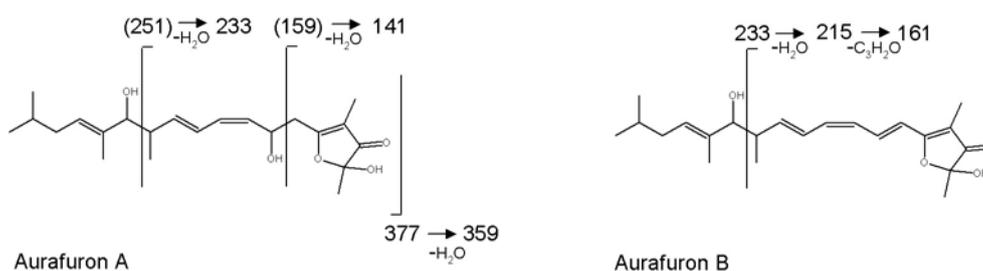


Abbildung 3.11: Mögliche Fragmente von Aurafuron A und B nach MS/MS-Kopplung (negative Ionisierung). Theoretische, aber nicht gefundene Fragmente sind in Klammern angegeben. Vermutete Sekundärabspaltungen sind durch Reaktionspfeile angegeben.

### 3.7 Vergleich des Aurafuron-Biosynthesegenclusters mit ausgewählten aktinobakteriellen Biosynthesegenclustern

Bei der *in silico* Analyse von AufB und AufJ fiel eine große Ähnlichkeit zu Post-PKS-Enzymen aus zwei Biosynthesegenclustern aus *Streptomyces aculeolatus* NRRL 18422 und *Streptomyces* sp. Eco86 auf. Diese Gencluster kodieren die Biosynthesemachinerien für drei Polyketide mit einer Furanongruppe (E837 und E492/E875), welche den Aurafuronen sehr ähnlich sind ((68), vergleiche 5.2). Ein drittes Biosynthesegencluster (Pke), welches ebenfalls sehr ähnliche Enzyme kodiert, wurde aus *Saccharopolyspora erythraea* sequenziert. Ein dazugehöriges Biosyntheseprodukt konnte bisher nicht identifiziert werden (69).

#### 3.7.1 Vergleich der Organisation der Biosynthesegencluster

Die Organisation der vier Biosynthesegencluster ist in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt. Das Biosynthesegencluster aus *S. aculeolatus* NRRL 18422 (im folgenden E837 genannt) kodiert fünf Typ I PKS (ORF34567), die Gene sind stromaufwärts von zwei Genen, die für Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen kodieren (*orf1* und *orf2*), und stromabwärts von dem Monooxygenase-kodierenden Gen (*orf8*) flankiert. Die acht Gene stellen vermutlich ein Operon dar, dabei überschneiden sich die Start- und Stopp-Kodons der *orfs5678*. Der Biosynthesegenlocus aus *Streptomyces* sp. Eco86 (im folgenden E492 genannt) beinhaltet die vier Typ I PKS kodierende Gene *orf9*, *10*, *11* und *12*. Stromaufwärts liegt ein Gen, das für eine Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase-kodiert (*orf8*), stromabwärts ein Monooxygenase kodierendes Gen (*orf13*) und zwei weitere Gene, die für Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase-kodierenden Gene (*orf14* und *orf15*). Alle Gene liegen in einem Operon und das Stopp-bzw. Start-Kodon von *orf12* und *orf13* überschneiden sich. Der Biosynthesegenlocus von *S. erythraea* (im folgenden Pke genannt) enthält vier Typ I PKS kodierende Gene *pkeAI*, *pkeAII*, *pkeAIII* und *pkeAIV*, flankiert von den Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase-kodierenden Genen *pkeI*, *pkeII* und *pkeIII* am 5'-Ende und einem Monooxygenase kodierenden Gen (*orf8*) und ein weiteres Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase-kodierendes Gen (*orf9*) am 3'-Ende. Mit

Ausnahme von *orf9* auf dem komplementären Strang sind die Gene in einem Operon organisiert, und das Stopp-Kodon von *pkeAIV* überschneidet sich mit dem Start-Kodon von *orf8*. Die beschriebenen E837 und E492 Biosynthesegencluster sind 50,1 kb und 50,5 kb groß, was etwa der Größe des Aurafuron-Biosynthesegenclusters entspricht (52,4 kb). Stromaufwärts- und stromabwärts dieser Cluster sind weitere Enzyme kodiert, darunter regulatorische Proteine und weitere Proteine, die vermutlich nicht direkt an der Biosynthese beteiligt sind. Der zentrale Teil des Pke Biosynthesegenclusters aus *S. erythraea* ist 51,8 kb groß. Da für diesen Biosynthesegenlocus kein Produkt beschrieben ist, kann über eine Beteiligung der weiteren kodierten Proteine an einer eventuellen Biosynthese keine Aussage getroffen werden (69).

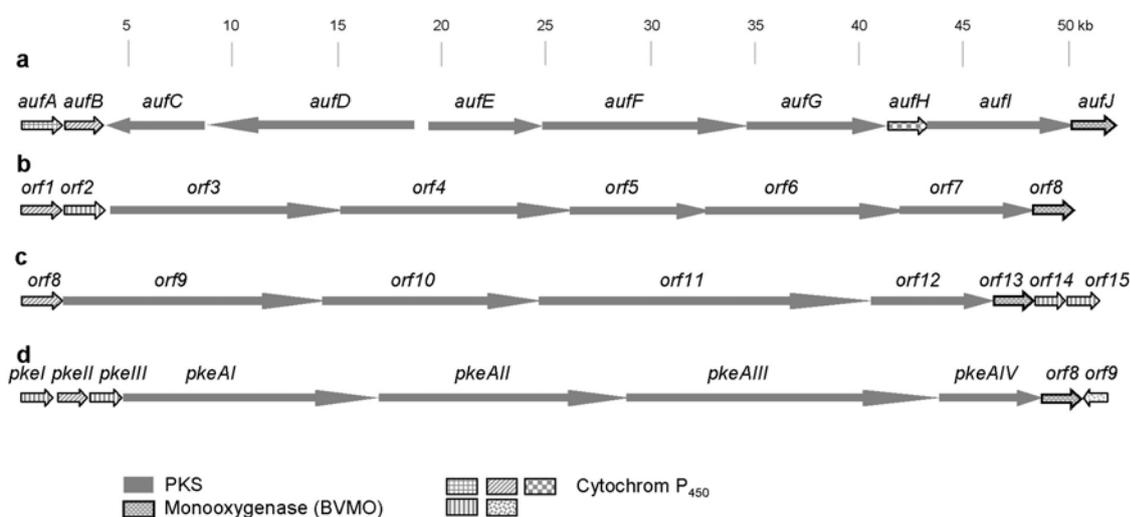


Abbildung 3.12: Organisation des Aurafuron-Biosynthesegenclusters (a) im Vergleich zu den Biosynthesegenclustern für E837 (b), E492/875 (c) und (Pke) (d).

### 3.7.2 Homologievergleich der Post-PKS-Enzyme

In allen drei Biosynthesegenclustern sind Homologe von *AufB* und *AufJ* kodiert. Die Cytochrom P<sub>450</sub> Monoxygenasen *Orf1* (E837), *Orf8* (E492/E875) und *PkeII* zeigen jeweils über 50 % identische Aminosäuren zu *AufB*. Die Monoxygenasen *Orf8* (E837), *Orf13* (E492/E875) und *Orf8* (Pke) zeigen zwischen 42-48 % identische Aminosäuren zu *AufJ*, jeweils bezogen auf das gesamte Protein. Homologe von *AufA* und *AufH* sind nicht kodiert. Innerhalb der aktinobakteriellen Biosynthesegencluster gibt es weitere homologe Cytochrom P<sub>450</sub> Monoxygenasen, nämlich *Orf2* (E837), *Orf14* (E492/E875)/*Orf15* (E492/E875) und *PkeI*/*PkeII*. *Orf9* aus dem Pke-Cluster zeigt keine signifikante Homologie zu den anderen Cytochrom P<sub>450</sub> Monoxygenasen. Die Ergebnisse der Homologievergleiche der Post-PKS-Enzyme sind in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3: Homologievergleich von Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen des Aurafuron-Biosynthesegenclusters mit den aktinobakteriellen Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen.** Aufgeführt ist der Anteil an identischen/ähnlichen Resten in %.

|             | AufA  | AufB         | AufH  | Orf1 (837)   | Orf2 (837)   | Orf8 (492)   | Orf14 (492) | Orf15 (492)  | Pkel         | PkeII        | PkeIII       |
|-------------|-------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| AufA        | x     | 20/23        | 18/30 | 18/29        | 19/31        | 18/29        | 19/29       | 17/30        | 19/29        | 16/26        | 19/29        |
| AufB        | 20/23 | x            | 18/30 | <b>52/67</b> | 25/37        | <b>50/64</b> | 26/41       | 23/36        | 26/37        | <b>57/69</b> | 29/40        |
| AufH        | 18/30 | 18/30        | x     | 15/27        | 21/34        | 16/27        | 19/31       | 20/31        | 20/29        | 17/30        | 19/28        |
| Orf1 (837)  | 18/29 | <b>52/67</b> | 15/27 | x            | 26/38        | <b>52/65</b> | 27/39       | 24/36        | 27/40        | <b>53/65</b> | 26/36        |
| Orf2 (837)  | 19/31 | 26/38        | 21/34 | 26/38        | x            | 27/40        | 31/44       | <b>65/73</b> | <b>53/66</b> | 25/38        | <b>50/63</b> |
| Orf8 (492)  | 18/29 | <b>50/64</b> | 16/27 | <b>52/65</b> | 27/40        | x            | 15/25       | 14/23        | 15/26        | 13/23        | 15/22        |
| Orf14 (492) | 19/29 | 26/41        | 19/31 | 27/39        | 31/44        | 15/25        | x           | 31/45        | 35/47        | 27/40        | 32/45        |
| Orf15 (492) | 17/30 | 24/36        | 20/31 | 24/36        | <b>65/73</b> | 14/23        | 31/45       | <b>X</b>     | <b>54/67</b> | 25/36        | <b>53/67</b> |
| Pkel        | 19/29 | 27/40        | 20/29 | 27/40        | <b>53/66</b> | 15/26        | 35/47       | <b>54/67</b> | x            | 28/39        | <b>53/65</b> |
| PkeII       | 16/26 | <b>57/69</b> | 17/30 | <b>53/65</b> | 25/38        | 13/23        | 27/40       | 25/36        | 28/39        | x            | 28/38        |
| PkeIII      | 19/29 | 29/40        | 19/28 | 26/36        | <b>50/63</b> | 15/22        | 32/45       | <b>53/67</b> | <b>53/65</b> | 28/38        | x            |

**Tabelle 3.4: Homologievergleich von AufJ mit den Monooxygenasen der aktinobakteriellen Biosynthesegencluster.** Aufgeführt ist der Anteil an identischen/ähnlichen Resten in %.

|                 | AufJ  | Orf8 (837) | Orf13 (492/875) | Orf8 (Pke) |
|-----------------|-------|------------|-----------------|------------|
| AufJ            | x     | 48/60      | 42/52           | 45/57      |
| Orf8 (837)      | 48/60 | x          | 46/56           | 49/61      |
| Orf13 (492/875) | 42/52 | 46/56      | x               | 53/61      |
| Orf8 (Pke)      | 45/57 | 49/61      | 53/61           | x          |

### 3.7.3 Phylogenetische Analyse der KS-Domänen

Mit den KS-Domänen der Aurafuron PKS und den KS-Domänen der E837, E492 und Pke PKS wurde ein phylogenetischer Baum erstellt (vergleiche Abbildung 3.13). Zusätzlich wurden weitere myxobakterielle und aktinobakterielle KS-Domänen aus modularen Typ I PKS in die Analyse eingeschlossen. Insgesamt wurden 20 KS-Domänen von verschiedenen myxobakteriellen Stämmen und 30 KS-Domänen von aktinobakteriellen Arten analysiert. KS<sub>Q</sub>-Domänen, welche lediglich die Decarboxylierung der Startereinheit und keine Verknüpfung mit einer Verlängerungseinheit katalysieren, wurden nicht in die Analyse mit einbezogen. Für diese Domänen wurden Abweichungen zu KS-Domänen aus Elongationsmodulen beschrieben, die zu einer getrennten Gruppierung in der phylogenetischen Analyse führen (70). Die KS-Domänen aus *S. erythraea* gruppieren mit denen aus *Streptomyces*-Arten. Die KS-Domänen der Aurafuron-PKS zeigen deutlich größere Ähnlichkeit zu anderen myxobakteriellen KS-Domänen, wie z.B. zu der Stigmatellin-PKS (50) aus *S. aurantiaca* Sg a15 oder der Ambrucitin PKS (71) aus *S. cellulorum* So ce10.

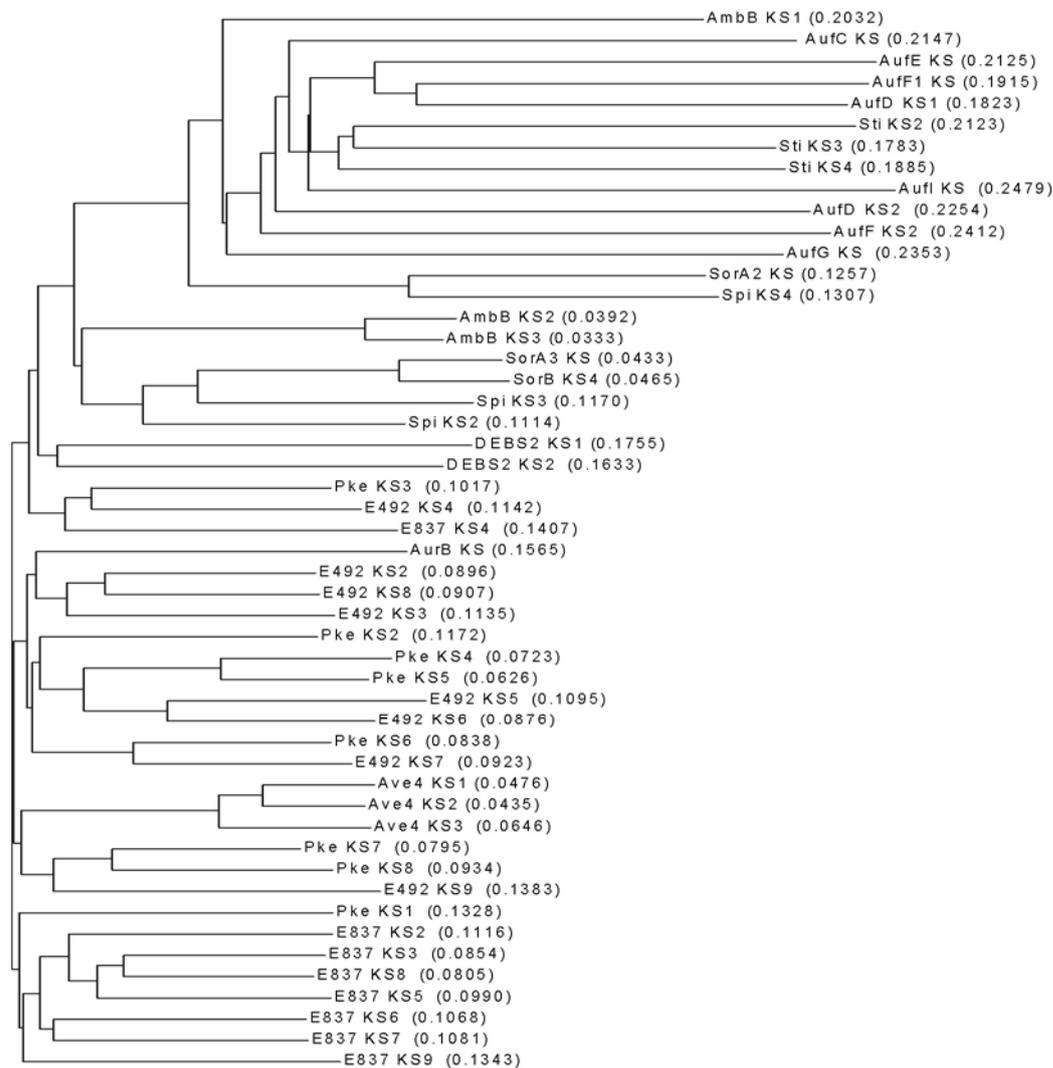


Abbildung 3.13: **Phylogenetische Analyse von myxo- und aktinobakteriellen KS-Domänen.** Amb: Ambrucitin PKS (*Sorangium cellulosum* So ce10), Auf: Aurafuron PKS (*Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1), Sti: Stigmatellin PKS (*Stigmatella aurantiaca* Sga15), Sor: Soraphen PKS (*Sorangium cellulosum* So ce10), Spi: Spirangien PKS (*Sorangium cellulosum* So ce90), DEBS: 6-Deoxyerythronolid B Synthase (*Saccharopolyspora erythraea*), Aur: Aureothin PKS (*Streptomyces thioluteus*), Pke: Pke PKS (*Saccharopolyspora erythraea*), E492: E492 PKS (*Streptomyces* sp.), Ave: Avermectin PKS (*Streptomyces avermitilis*), E837: E837 PKS (*Streptomyces aculeolatus*)

## 4 Ergebnisse II: Untersuchungen zur Sekundärstoff-Biosynthese in *S. cellulosum* So ce90

### 4.1 Spirangien-Biosynthese in *S. cellulosum* So ce90A1

Zu Beginn dieser Arbeit lagen von zwei Cosmiden (c71 und c66) 44 kb Sequenzinformation aus *S. cellulosum* So ce90 vor, welche das 3'-Ende des Spirangien-Biosynthesegenclusters beinhalten (72). Am 5'-Ende der vorhandenen Sequenz sind 8 Typ I PKS-Module kodiert. Da Spirangien aus 16 Acetat-bzw. Propionat-Einheiten aufgebaut ist, wurden mindestens Gene für 8 weitere PKS-Module erwartet, die etwa 40 kb Sequenz entsprechen sollten.

#### 4.1.1 Identifizierung des 5'-Endes des Spirangien-Biosynthesegenclusters

##### 4.1.1.1 Strategie zur Identifizierung des 5'-Endes des Spirangien-Biosynthesegenclusters

Um Cosmide mit weiterer Sequenz des 5'-Endes des Spirangien-Biosynthesegenclusters zu identifizieren, wurde das Oligonukleotidpaar Spi1U/Spi1L verwendet, welches direkt am 5'-Ende des sequenzierten Bereiches des Genclusters bindet. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide sollte per PCR-Screen ein Cosmid identifiziert werden, welches das unbekannte 5'-Ende des Clusters trägt. Je 32 Klone der bestehenden *S. cellulosum* So ce90 Cosmidbank wurden vereinigt und als Matritze für eine PCR mit dem Oligonukleotidpaar Spi1U/Spi1L eingesetzt. Gaben die Ansätze das gewünschte 1,0 kb Amplifikat, wurden die enthaltenen Klone einzeln angezogen und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise konnten allerdings nur die bekannten Cosmide c71, c66, c48 und c7 identifiziert werden. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass etwa 30 kb des T3-Endes von Cosmid c48 mit dem 5'-Ende des bis dahin bekannten Spirangien-Biosynthesegenclusters überlappen. Vom T7-Ende des Cosmids c7 überlappen etwa 28 kb mit der bekannten Sequenz (vergleiche Abbildung 4.1), eine vollständige Sequenzierung der Cosmide schien aufgrund der geringen zu erwartenden neuen Sequenzinformation nicht sinnvoll. Das T7-bzw. T3-Ende der Cosmide wurde ansequenziert und anhand dieser Sequenzinformation vom T7-Ende von c48 ein Oligonukleotidpaar (48T7F und 48T7R3) entworfen, welches spezifisch ein 257 bp Fragment amplifiziert. Mit diesen Oligonukleotiden wurde erneut ein PCR-Screening der Cosmidbank durchgeführt. Wieder konnten nur die bereits bekannten Cosmide c48 und c7 bestätigt und keine neuen Cosmide mit dieser Sequenz gefunden werden. Deshalb wurde eine zweite genomische Bibliothek von *S. cellulosum* So ce90 erstellt.

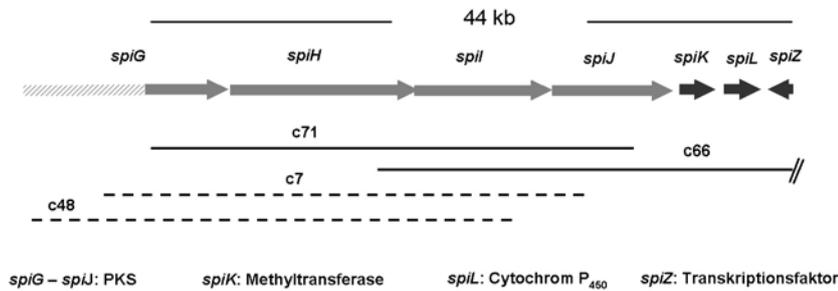


Abbildung 4.1: Teilsequenz des Spirangien-Biosyntheseclustering, die zu Beginn der Arbeit vorlag. Gene sind durch Pfeile symbolisiert, die abgeleiteten Genprodukte sind darunter aufgeführt. Die Lage der sequenzierten (schwarz) und ansequenzierten Cosmide (gestrichelt) ist durch Linien markiert.

#### 4.1.1.2 Erstellung einer zweiten Cosmidgenbank von *S. cellulorum* So ce90

Für die Erstellung der zweiten Cosmidgenbank von *S. cellulorum* So ce90 konnte der Ligationsansatz der ersten Cosmidbank erneut verwendet werden. Zur genauen Erstellung der Cosmidbank vergleiche 2.13. Die zweite Cosmidbank umfasst etwa 2300 Klone in sechs 384er Mikrotiterplatten. Für Hybridisierungsexperimente wurde die neu angelegte Cosmidbank mehrfach auf 11 x 7 cm große Nylon-Membranen aufgebracht.

#### 4.1.1.3 Identifizierung und Charakterisierung von Anschlußcosmiden

Um in der neuen Cosmidbank Anschlußcosmide zum bekannten Spirangien-Biosyntheseclustering zu finden, wurde ein hochdicht bedruckter Filter hybridisiert. Als Sonde diente das DIG-markierte 257 bp Amplifikat (vergleiche 4.1.1.1). In Abbildung 4.2 ist das Ergebnis der Hybridisierung dargestellt. Da alle Klone der sechs Mikrotiterplatten doppelt und in einem bestimmten Muster (vergleiche 2.13) repräsentiert sind, ist eine sichere Zuordnung der Signale zu einzelnen Klonen möglich.

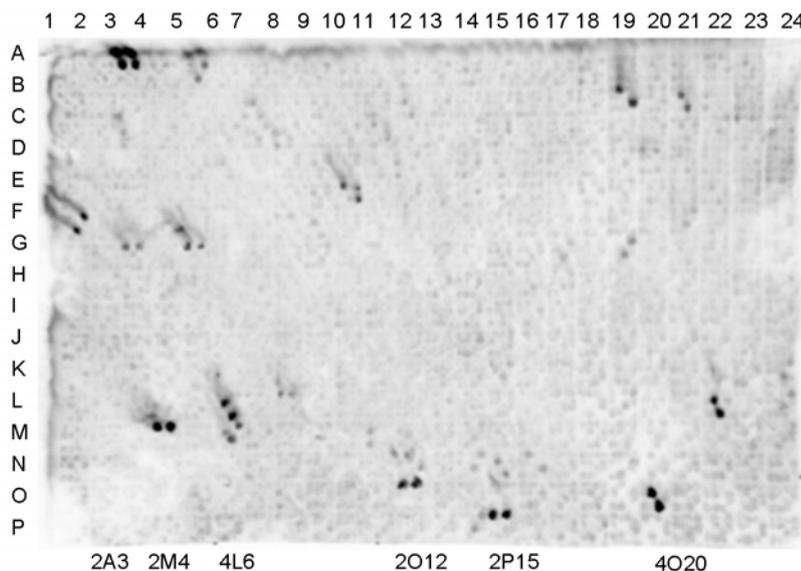


Abbildung 4.2: Ergebnis der Hybridisierung der Cosmidbank mit einem 257 bp Fragment des T7-Endes von Cosmid c48

Sechs hybridisierende Klone wurden angezogen und die Cosmid-DNA isoliert (Cosmide 2A3, 2M4, 4L6, 2O12, 2P15 und 4O20). PCR mit dem Oligonukleotidpaar 48T7F und 48T7R3 ergab bei allen Cosmiden das erwartete 257 bp Amplifikat. Eine weitere PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für das 5'-Ende der bekannten Sequenz (Spi1U und Spi1L) ergab nur bei Cosmid 2P15 das erwartete 1033 bp Amplifikat. Die anderen Cosmide, welche nur neue Sequenzinformation trugen, wurden in *E. coli* DH10B retransformiert und erneut isoliert. Da in den Zellen mehrere Kopien der Cosmide vorliegen, deren Inserts identisch sind, kommt es wegen des großen homologen Bereiches häufig zu Neuordnungen der Insert-DNA. Um dies für die identifizierten Cosmide auszuschließen, wurde die isolierte Cosmid-DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und mit ebenso behandelter genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce90 nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Southern Blot verglichen. Dabei wurde mit der bereits beschriebenen 257 bp Sonde hybridisiert. Bei den Cosmiden, in denen keine Neuordnung der Insert-DNA stattgefunden hat, sollten die Größen der hybridisierenden Fragmente denen der Wildtyp-DNA entsprechen. Nur für das Cosmid 4O20 konnten eindeutig dem Wildtypen entsprechende Fragmente identifiziert werden. Das Cosmid 4O20 wurde in der Abteilung Genomanalyse des HZI (ehemals GBF) sequenziert, es enthält 39,5 kb genomische DNA von *S. cellulosum* So ce90 mit bis dahin unbekannter Sequenz des Spirangien-Biosyntheseegenclusters.

#### 4.1.1.4 Klonierung der Sequenzlücke

Die Sequenzlücke von Cosmid 4O20 zur bekannten Sequenz wurde nach Restriktionsanalyse von 4O20 und c48 auf etwa 3,8 kb geschätzt. Anhand der Sequenzinformation vom T3-Ende von c7 und der bereits bekannten Cluster-Sequenz wurde ein Oligonukleotidpaar BFS1 und BFS2 entworfen und mit diesem der 3,8 kb große Sequenzbereich amplifiziert. Nach Klonierung in pCR®2.1Topo wurden drei unabhängige Klone von pSpiL (pSpiL1,2,3) sukzessive von beiden Seiten sequenziert („Primer Walking“).

### 4.1.2 Annotation des Spirangien-Biosyntheseegenclusters

Die von Cosmid 4O20 und pSpiL erhaltenen 43,3 kb Sequenzinformation erweitert die bekannte Sequenz des Spirangien-Biosyntheseegenclusters auf 89,4 kb. Mit Hilfe der im Internet frei zugänglichen Programme FramePlot und BLAST (siehe 2.17) wurden offene Leserahmen (ORFs) identifiziert und anhand von Ähnlichkeiten der kodierten Proteine zu bekannten Proteinen annotiert (siehe Abbildung 4.3, Tabelle 4.1). Die Gene *spiD* bis *spiJ* im Zentrum des Biosyntheseegenclusters kodieren für sieben Polyketidsynthasen. Sie werden auf beiden Seiten von drei weiteren Genen flankiert. *spiA* und *spiB* am 5'-Ende des Clusters liegen auf dem komplementären Strang und kodieren für Proteine mit Ähnlichkeit zu Typ II Thioesterasen bzw. Methyltransferasen. *spiC* liegt direkt stromaufwärts von *spiD* und kodiert ein Protein, welches Homologien

zu Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen zeigt. Hinter *spiJ* liegen *spiK* und *spiL*, die kodierten Proteine zeigen Homologien zu Methyltransferasen bzw. Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen. *spiZ* schließlich liegt auf dem komplementären Strang und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Am 5'-Ende des sequenzierten Bereiches wurde ein ORF (*orf1*) identifiziert, dessen abgeleitetes Genprodukt Homologien zu Transposasen zeigt. Das Stopp-Kodon von *orf1* liegt deutlich (mehrere 100 bp) im Sequenzbereich von *SpiA*, welches auf dem komplementären Strang kodiert ist.

Das annotierte Spirangien-Biosynthesegencluster ist unter der Zugriffs-Nummer AM407731 in der EMBL-Datenbank verfügbar.

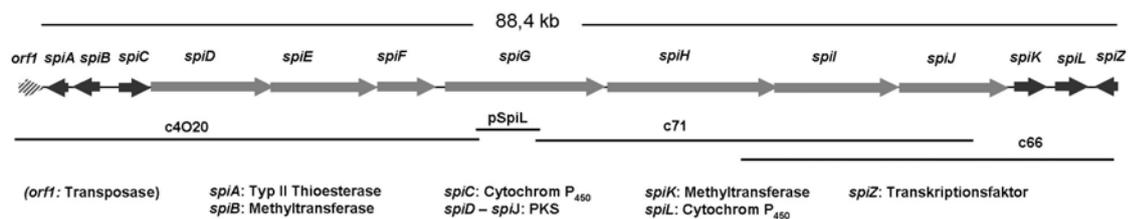


Abbildung 4.3: **Organisation des Spirangien-Biosynthesegenclusters und Lage der Cosmid- bzw. Plasmid-Inserts.** Die Lage der Inserts ist durch Linien markiert. Gene sind durch Pfeile symbolisiert, die abgeleiteten Genprodukte sind darunter aufgeführt.

Tabelle 4.1: Im Spirangien-Biosynthesegencluster kodierte Proteine und deren abgeleitete Funktion

| <b>PKS-Teil des Spirangien Biosynthesegenclusters</b>                                   |                |   |  |   |                                      |
|---|----------------|---|--|---|--------------------------------------|
| Protein (Gen)   | Größe (Da/bp)  | Vermutete Funktionen (Domänen und ihre Position innerhalb der Proteinsequenz)   |  |   |                                      |
| SpiD ( <i>spiD</i> )  | 470.885/13.602 | ACP (214-411), KS (499-1776), AT (2056-2946), AT (3409-4299), DH (4492-4989), KR (5974-6510), ACP (6847-7020), KS (7090-8370), AT (8698-9588), DH (9784-10293), ER (11335-12258), KR (12289-12825), ACP (13138-13338)                       |  |   |                                      |
| SpiE ( <i>spiE</i> )  | 356.285/10.281 | KS (106-1365), AT (1684-2577), KR (3616-4148), ACP (4477-4677), KS (4765-6039), AT (6367-7266), DH (7465-7977), KR (8959-9495), ACP (9808-10008)  |  |   |                                      |
| SpiF ( <i>spiF</i> )  | 172.992/4.953  | KS (97-1371), AT (1699-2604), KR (3613-4149), ACP (4483-4683)   |  |   |                                      |
| SpiG ( <i>spiG</i> )  | 554.784/15.996 | KS (103-1383), AT (1720-2634), KR (3670-4203), ACP (4522-4722), KS (4804-6084), AT (6412-7302), DH (7498-7995), ER (9028-9951), KR (9982-10518), ACP (10858-11031), KS (11113-12387), AT (12718-13611), KR (14644-15180), ACP (15520-15720) |  |   |                                      |
| SpiH ( <i>spiH</i> )  | 524.296/15.018 | KS (73-1353), AT (1672-2562), KR (3598-4131), ACP (4450-4650), KS (4732-6012), AT (6331-7230), KR (8257-8793), ACP (9133-9333), KS (9421-10701), AT (11014-11919), DH (12155-12621), KR (13699-14235), ACP (14554-14754)                    |  |   |                                      |
| SpiI ( <i>spiI</i> )  | 366.953/10.542 | KS (115-1389), AT (1717-2628), KR (3658-4194), ACP (4522-4722), KS (4813-6093), AT (6436-7341), DH (7537-8037), KR (9154-9690), ACP (10009-10209)   |  |   |                                      |
| SpiJ ( <i>spiJ</i> )  | 374.780/10.740 | KS (106-1377), AT (1705-2616), DH (2815-3312), KR (4354-4890), ACP (5209-5406), KS (5482-6755), AT (7072-7980), KR (8839-9375), ACP (9670-9870), TE (10117-10722)   |  |   |                                      |
| <b>Stromaufwärts von <i>spiC</i> und stromabwärts von <i>spiJ</i> kodierte Proteine</b> |                |   |  |   |                                      |
| Protein (Gen)   | Größe (Da/bp)  | Vermutete Funktion des homologen Proteins   | Quelle des homologen Proteins                                | Ähnlichkeit/ Identität (Größe des homologen Bereiches in Aminosäuren) | Zugangsnummer des homologen Proteins |
| (OrfI) ( <i>orfI</i> )*   | (15.558/393)*  | Transposase   | <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622                             | 67%/59% (106)   | YP_630331.1                          |
| SpiA ( <i>spiA</i> )  | 29.789/792     | putative Thioesterase   | <i>Nostoc sp.</i>  | 56%/36% (241)   | NP_486085.1                          |
| SpiB ( <i>spiB</i> )  | 35.748/963     | mögliche Methyltransferase  | <i>Mycobacterium bovis</i>                                   | 51%/39% (220)   | NP_856621.1                          |
| SpiC ( <i>spiC</i> )  | 51.172/1.434   | mögliches C-Typ Cytochrom   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                | 39%/30% (229)   | NP_253309.1                          |
| SpiK ( <i>spiK</i> )  | 28.863/792     | mögliche Methyltransferase  | Vermutetes Symbionten-Bakterium von <i>Paederus fuscipes</i> | 56%/42% (188)   | AA547557.1                           |
| SpiL ( <i>spiL</i> )  | 50.503/1.368   | Cytochrom P <sub>450</sub>  | <i>Trichodesmium erythraeum</i>                              | 61%/40% (447)   | ZP_00675674.1                        |
| SpiZ ( <i>spiZ</i> )  | 27.785/759     | Sigma-24 Faktor   | <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>                         | 55%/40% (158)   | YP_464957.1*                         |

\* Berücksichtigt ist der Bereich bis zum Stopp-Kodon von *spiA* auf dem komplementären Strang

### 4.1.3 *In silico*-Analyse der Polyketidsynthesen

Mit dem im Internet frei zugänglichen Programm „PKS/NRPS-Analysis“ (siehe 2.17) wurden die im Spirangien-Biosynthesegencluster kodierten PKS SpiDEFGHIJ genauer analysiert. Dabei wurden die katalytisch aktiven Domänen in der Proteinsequenz annotiert. In Abbildung 4.4 und Tabelle 4.1 ist die Lage der einzelnen Domänen in den PKS dargestellt. Die sieben PKS enthalten ein kombiniertes Lade- und Elongationsmodul und 14 weitere Module für den Einbau von Extensionseinheiten. Am C-Terminus des letzten Modules von SpiJ ist eine TE-Domäne kodiert.

Die Proteinsequenzen der einzelnen Domänen der Spirangien PKS wurden (getrennt nach katalytischer Aktivität) miteinander verglichen und auf das Vorhandensein der beschriebenen konservierten Motive untersucht.



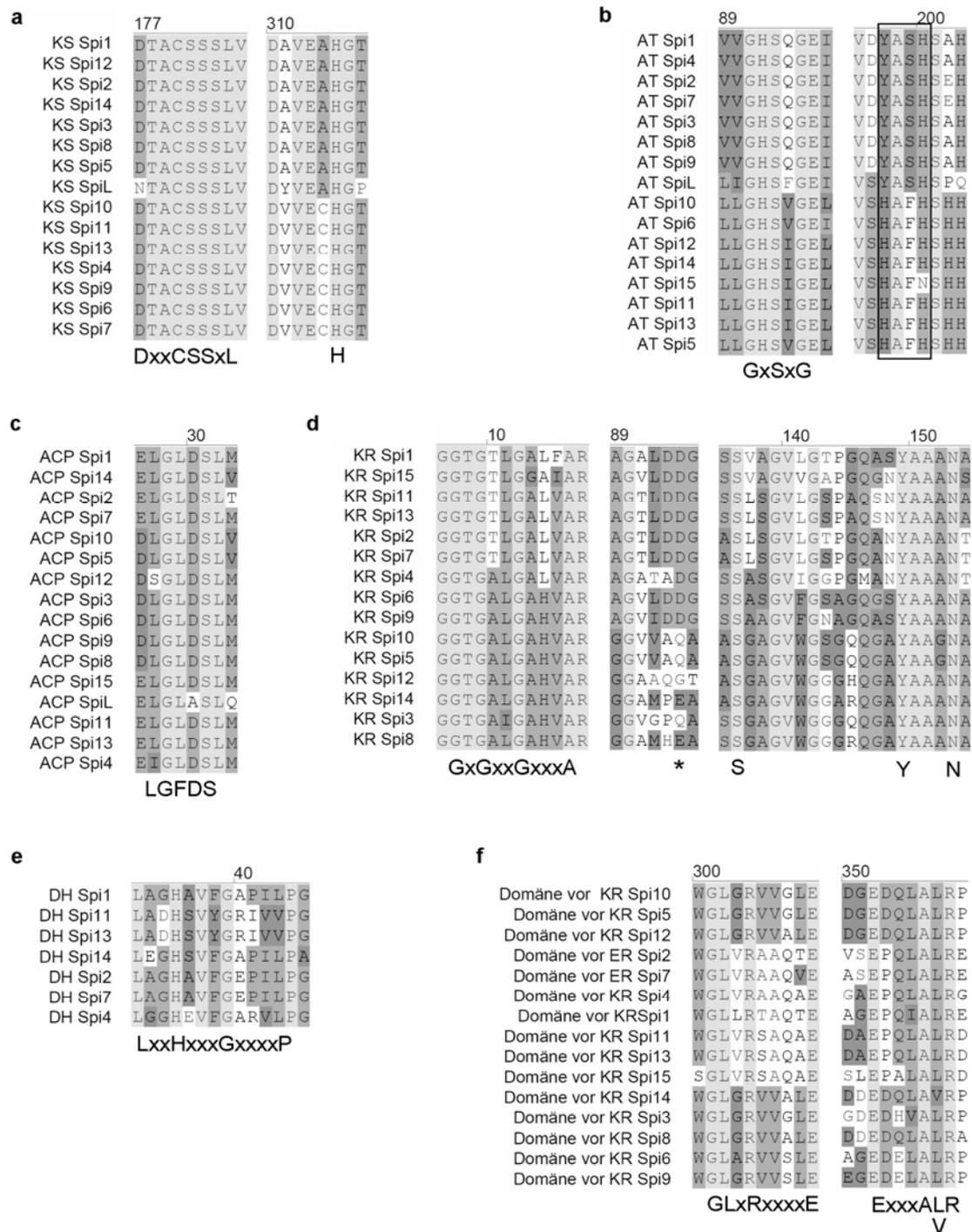


Abbildung 4.5: Sequenzbereiche der konservierten Motive in den Domänen der Spirangien PKS. a: KS-Domänen; b: AT-Domänen; c: ACP-Domänen; d: KR-Domänen; e: DH-Domänen und f: AT-KR/DH-KR/DH-ER-Linkerregionen. Konservierte Motive sind unter den Sequenzvergleichen abgebildet. Der Bereich der AT-Domänen, welcher maßgeblich für die Auswahl des CoA-Esters ist, ist schwarz umrandet.

#### 4.1.4 Inaktivierungsexperimente zur funktionalen Analyse der Post-PKS Enzyme

Um die Funktion der im Gencluster kodierten Post-PKS Enzyme bei der Spirangien-Biosynthese zu untersuchen, wurden alle entsprechenden Gene unabhängig voneinander durch Insertion von pSUPHyg-Derivaten inaktiviert.

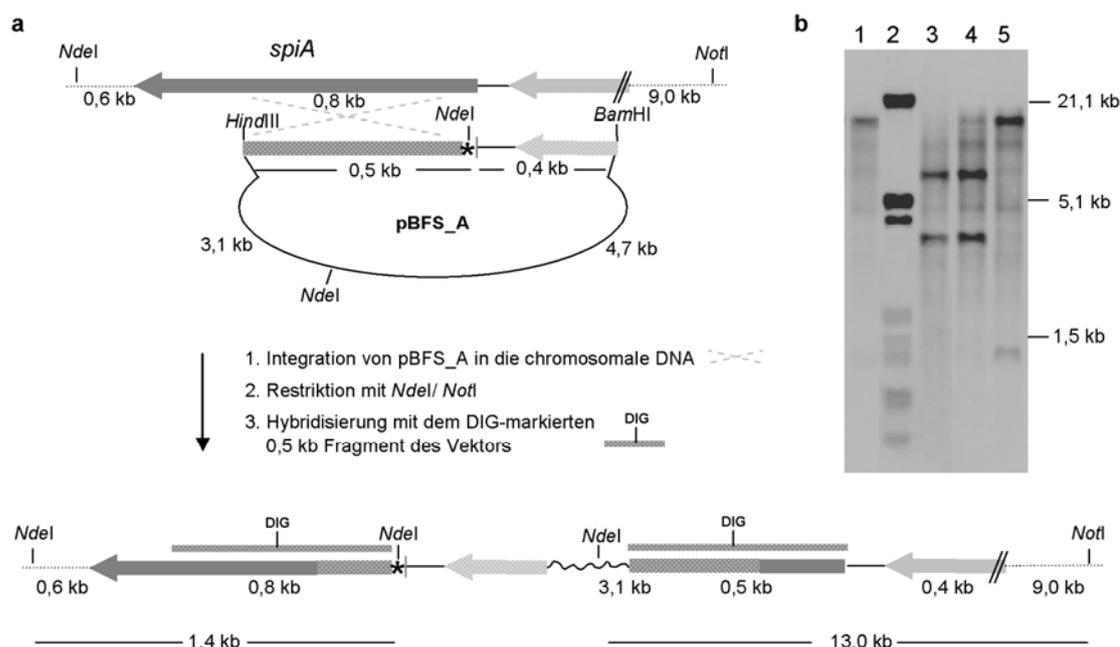
##### 4.1.4.1 Inaktivierung der Typ II Thioesterase *spiA*

Für die Inaktivierung von *spiA* wurde das Plasmid pBFS\_A hergestellt (Abbildung 4.6). pBFS\_A enthält ein 0,9 kb großes Insert, welches homolog zum 5'-Ende von *spiA* ist. Allerdings wurden stromabwärts des *spiA*-Startkodons ein Stopp-Kodon und eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt. Das Vektor-Rückgrat stammt von pSUPHyg (72) und enthält ein Hygromycin-Resistenzgen. Zur genauen Klonierung des Plasmides siehe 2.6.4. Nach DNA-Transfer von pBFS\_A durch biparentale Konjugation (vergleiche 2.12.3) kann die Plasmid-DNA über das zur genomischen DNA homologe Insert in das *S. cellulosum* So ce90A1-Chromosom integrieren. Bei einem gewünschten Integrationsereignis stromabwärts des eingeführten Stopp-Kodons resultieren zwei Kopien von *spiA*, welche beide inaktiv sind. In der ersten Kopie fehlen 0,3 kb am 3'-Ende und in der zweiten Kopie folgt dicht auf das Start-Kodon das eingeführte Stopp-Kodon (vergleiche Abbildung 4.6 a).

Nach Konjugation von pBFS\_A in *S. cellulosum* So ce90A1 wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten, angezogen und sowohl genotypisch als auch phänotypisch charakterisiert.

##### 4.1.4.1.1 Genotypische Analyse der Mutante

Für die genotypische Analyse der Mutanten wurde die genomische DNA isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NotI* hydrolysiert. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde hybridisiert (Southern Blot, vergleiche 2.14). Als Sonde wurde das 0,5 kb große, zum 5'-Ende von *spiA* homologe Fragment eingesetzt, welches in pBFS\_A kloniert vorliegt. In allen analysierten Mutanten konnten die zwei Kopien von *spiA* nachgewiesen werden, die nach Integration des Vektors erwartet wurden: jeweils zwei DNA-Fragmente hybridisierten mit der Sonde (Abbildung 4.6 b). Durch die eingeführte *NdeI*-Schnittstelle konnte auch nachgewiesen werden, ob die Integration stromaufwärts oder, wie für die Inaktivierung gewünscht, stromabwärts der *NdeI*-Schnittstelle und des eingeführten Stopp-Kodons stattgefunden hatte. Bei einer Integration stromabwärts der *NdeI*-Schnittstelle hybridisieren nach Restriktion mit *NdeI* und *NotI* ein 1,4 kb und ein 13,0 kb großes Fragment (vergleiche Abbildung 4.6 a), bei einer unerwünschten Integration stromaufwärts der *NdeI*-Schnittstelle hybridisieren nach Restriktion mit *NdeI* und *NotI* ein 3,6 kb und ein 6,4 kb großes Fragment. Die Mutante BFS\_A-2 zeigte die gewünschten Signale bei 1,4 und 13,0 kb (Spur 5 in Abbildung 4.6 b) und wurde phänotypisch charakterisiert.



**Abbildung 4.6: Das Inaktivierungskonstrukt pBFS\_A (a) und die genotypische Analyse der Insertionsmutanten (a, b)** a: Nach Integration von pBFS\_A in die chromosomale DNA über den eingeführten homologen Bereich (gemustert) resultieren zwei Kopien von *spiA*. Je nachdem, ob die Integration stromaufwärts oder stromabwärts des eingeführten Stopp-Kodons (Stern) stattgefunden hat, wird nach Restriktion mit *NdeI/NotI* und Hybridisierung mit dem DIG markierten homologen 0,5 kb Fragment des Vektors ein unterschiedliches Bandenmuster erhalten. Der Genotyp nach gewünschter Integration und die Größe der erwarteten Banden ist unten abgebildet. b: Southern Blot Analytik von vier Mutanten (Spuren 1, 3, 4 und 5). Spur 2: DIG markierter DNA-Größenstandard. Das Signal der 1,4 kb Bande (siehe laufender Text) in Spur 1 ist schwach vorhanden, die Mutanten-DNA in den Spuren 1 und 5 zeigt das erwartete Restriktionsmuster: eine 1,4 kb und 13,0 kb große Bande hybridisiert. Bei einer unerwünschten Integration hybridisieren eine 3,6 kb und 6,4 kb große Bande (Spuren 3 und 4).

#### 4.1.4.1.2 Phänotypische Analyse der Mutante

Die Mutante BFS\_A-2 wurde parallel zum Wildstamm 14 Tage unter XAD-Zusatz in Produktionsmedium kultiviert, dann wurden Zellen und XAD abgetrennt, die enthaltenen Sekundärstoffe extrahiert und per HPLC-MS analysiert (zur genauen Vorgehensweise vergleiche 2.18, 2.19). Die Mutante und der Wildstamm produzierten vergleichbar viel Epothilon und Spirangien.

#### 4.1.4.2 Inaktivierung der Methyltransferasen *spiB* und *spiK*

Die Methyltransferasen kodierenden Gene *spiB* und *spiK* wurden unabhängig voneinander durch Insertion inaktiviert, um Einblick in die Funktion der Genprodukte bei der Spirangien-Biosynthese zu erhalten. Die entsprechenden Konstrukte pBFS\_B und pBFS\_K basieren auf pSUPHyg, die Lage der homologen Bereiche zur genomischen DNA sind in Abbildung 4.7 a und Abbildung 4.7 c dargestellt.

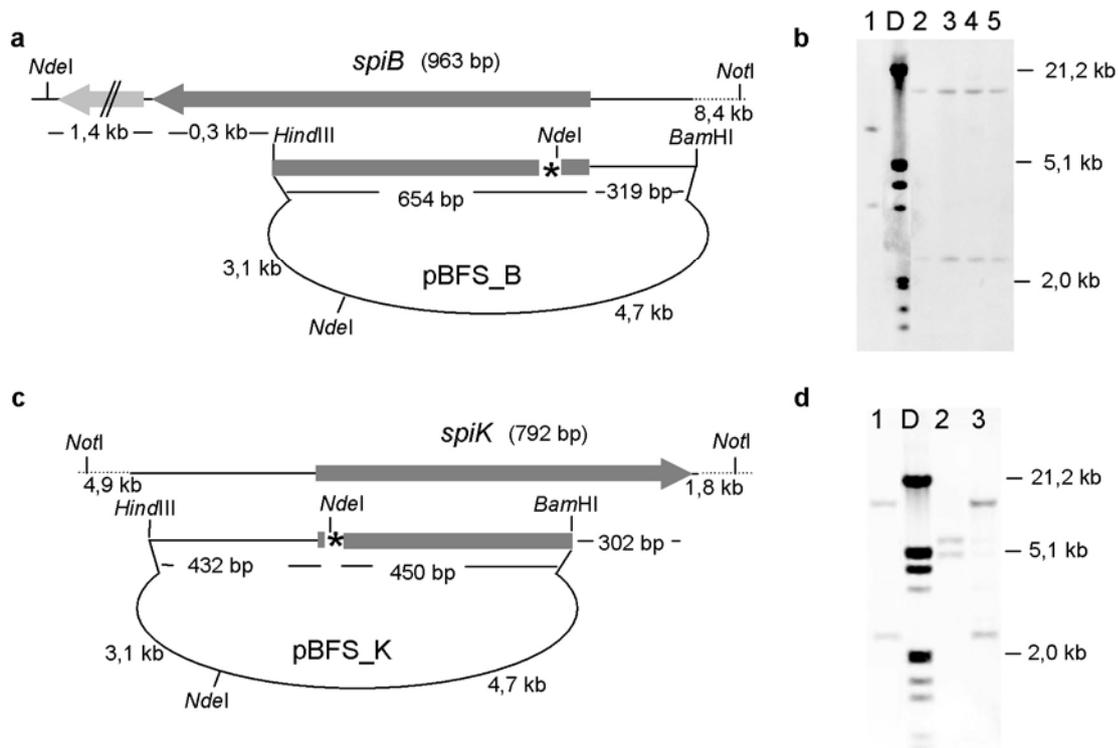


Abbildung 4.7: **Inaktivierungskonstrukte für *spiB* (a) und *spiK* (c) und Southern Blot Analyse der Mutanten (b, d).** a, c: Der Stern symbolisiert das eingeführte Stopp-Kodon. b, d: Spuren 1-5 bzw. 1-3: genomische Mutanten-DNA, hydrolysiert mit *NotI/NdeI*. Hybridisiert wurde mit DIG-markierten Fragmenten der Inaktivierungskonstrukte: 654 bp Fragment von pBFS\_B (b) und 450 bp Fragment von pBFS-K (d). In b) zeigen Mutanten mit gewünschter Integration stromabwärts der eingeführten *NdeI*-Schnittstelle Signale bei 2,4 kb und 12,5 kb (Spuren 2-5), Mutanten mit unerwünschter Integration zeigen Signale bei 3,8 kb und 7,4 kb (Spur 1). In d) zeigen Signale bei 2,6 kb und 10,6 kb eine gewünschte Integration stromabwärts der eingeführten *NdeI*-Schnittstelle an (Spur 1+3), Signale bei 5,1 kb und 6,1 kb eine unerwünschte Integration (Spur 2). D: DIG markierter DNA-Größenstandard.

#### 4.1.4.2.1 Genotypische Analyse der Mutanten

Die Mutanten, welche nach Konjugation von pBFS\_B und pBFS\_K erhaltenen wurden, wurden angezogen und nach Isolation der genomischen DNA genotypisch charakterisiert. Die DNA wurde mit *NotI/NdeI* hydrolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und in zwei Southern Blots analysiert. Für die genotypische Charakterisierung der *spiB*-Mutanten wurde das DIG-markierte 654 bp Fragment von pBFS\_B eingesetzt. Bei einer erwünschten Integration von pBFS\_B stromabwärts des eingeführten Stopp-Kodons und der *NdeI*-Schnittstelle hybridisierten ein 2,4 kb und ein 12,5 kb großes Fragment mit der Sonde. Nach einer unerwünschten Integration des Vektors stromaufwärts der eingeführten *NdeI*-Schnittstelle hybridisierten ein 3,8 kb und ein 7,4 kb großes Fragment mit der Sonde (Abbildung 4.7 b). Für die genotypische Charakterisierung der *spiK*-Mutanten wurde das DIG-markierte 450 bp Fragment von pBFS\_K eingesetzt. Bei einer erwünschten Integration von pBFS\_K stromabwärts des

eingeführten Stopp-Kodons und der *NdeI*-Schnittstelle hybridisierten ein 2,6 kb und ein 10,6 kb großes Fragment mit der Sonde. Nach einer unerwünschten Integration des Vektors stromaufwärts der eingeführten *NdeI*-Schnittstelle hybridisierten ein 5,1 kb und ein 6,1 kb großes Fragment mit der Sonde (Abbildung 4.7 d).

Es konnten neben Mutanten mit unerwünschter Integration jeweils Mutanten mit der gewünschten Integration der Inaktivierungskonstrukte identifiziert werden.

#### 4.1.4.2.2 Phänotypische Analyse der Mutanten

Kulturextrakte der genetisch verifizierten Mutanten BFSB-11 (Inaktivierung von *spiB*) und BFSK-2 (Inaktivierung von *spiK*) wurden per HPLC-MS analysiert. Beide Mutanten produzierten keine Spirangiene A und B mehr, aber je neue Verbindungen. Diese neuen Verbindungen zeigten eine Massendifferenz von -14 Masseneinheiten gegenüber Spirangien A und B und ein UV-Spektrum, welches dem der bekannten Spirangiene sehr ähnlich ist (Abbildung 4.8).

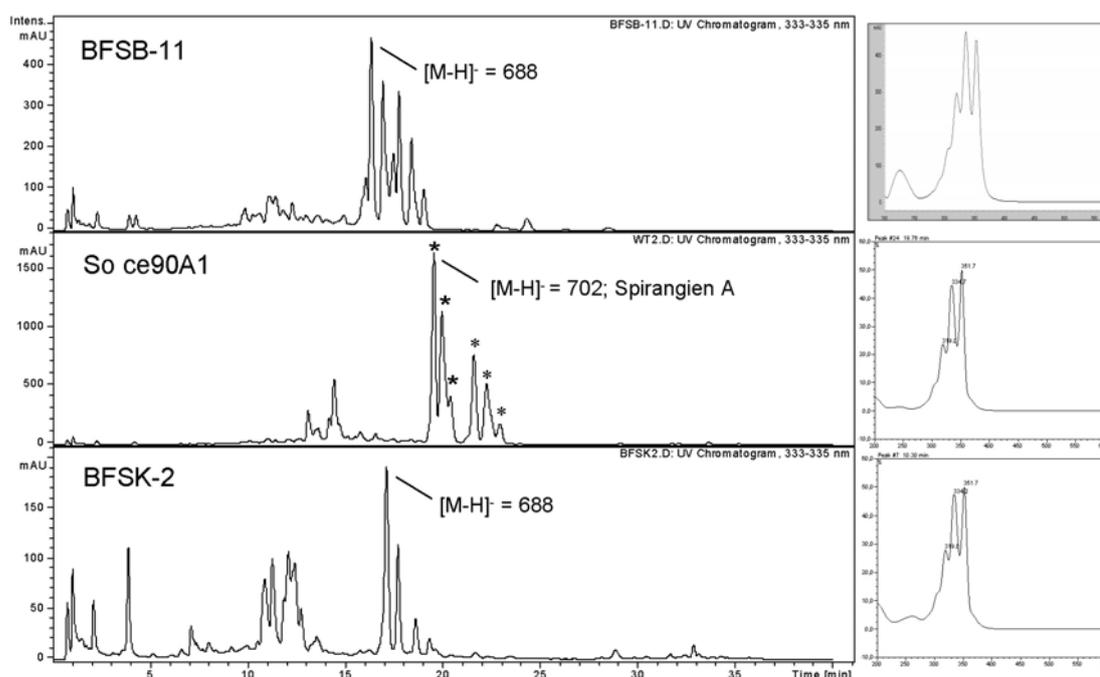


Abbildung 4.8: HPLC-MS-UV/VIS Analyse von Extrakten der Mutante BFSB-11, des Wildstammes und der Mutante BFSK-2. Rechts im Bild sind die UV-Spektren im Bereich 200-600 nm der beschrifteten Peaks angezeigt. Mit Sternen gekennzeichnete Peaks haben gleiche Massen und entsprechen vermutlich verschiedenen *cis/trans* Isomeren von Spirangien A (\*) und Spirangien B (\*).

#### 4.1.4.2.3 Fütterungsversuche zur Strukturaufklärung der Desmethylderivate

Es wurde vermutet, dass es sich bei den von den Methyltransferase-Mutanten BFSB-11 und BFSK-2 produzierten Derivaten um Spirangien-Varianten handelt, die anstelle einer Methoxygruppe eine OH-Gruppe an C3 bzw. C23 tragen (vergleiche Abbildung 1.3). Durch Fütterungsexperimente des Wildstammes und der Mutanten mit L-[Methyl- $^2\text{H}_3$ ]-Methionin sollte diese Hypothese überprüft werden (vergleiche 2.18.2). In dem Kulturextrakt des Wildstammes konnte nach der Fütterung der deuterierten Substanz für Spirangien A und B eine Massenverschiebung von +3 und +6 Masseneinheiten festgestellt werden, entsprechend einer bzw. zwei auf die Hydroxylgruppen an C3/C23 übertragenen  $\text{D}_3$ -markierten Methylgruppen. In den Kulturextrakten der Mutanten konnte nach der Fütterung je nur eine Massenzunahme um +3 Masseneinheiten festgestellt werden, entsprechend dem Einbau von nur einer  $\text{D}_3$ -markierten Methylgruppe.

Um zu untersuchen, welche Hydroxylgruppe in den Mutanten jeweils nicht methyliert wird, wurden der Wildstamm und die Mutanten in 500 ml Kulturmedium kultiviert und mit L-[Methyl- $^{13}\text{C}$ ]-Methionin gefüttert (2.19.2). Spirangien(-Derivate) enthaltende Fraktionen der Kulturextrakte (vergleiche 2.18) wurden per  $^{13}\text{C}$ -NMR vermessen. Die chemischen Verschiebungen der 3-OMe Kohlenstoffe der Spirangiene liegen zwischen 56,7 und 57,0 ppm, die der 23-OMe Kohlenstoffe bei 55,7 ppm (Abbildung 4.9, (27)). Das Signal des 3-OMe Kohlenstoffs fehlt bei den Spirangien-Derivaten der Mutante BFSK-2, demgegenüber fehlt das Signal des 23-OMe Kohlenstoffs bei den Derivaten der Mutante BFSB-11 (Abbildung 4.9).

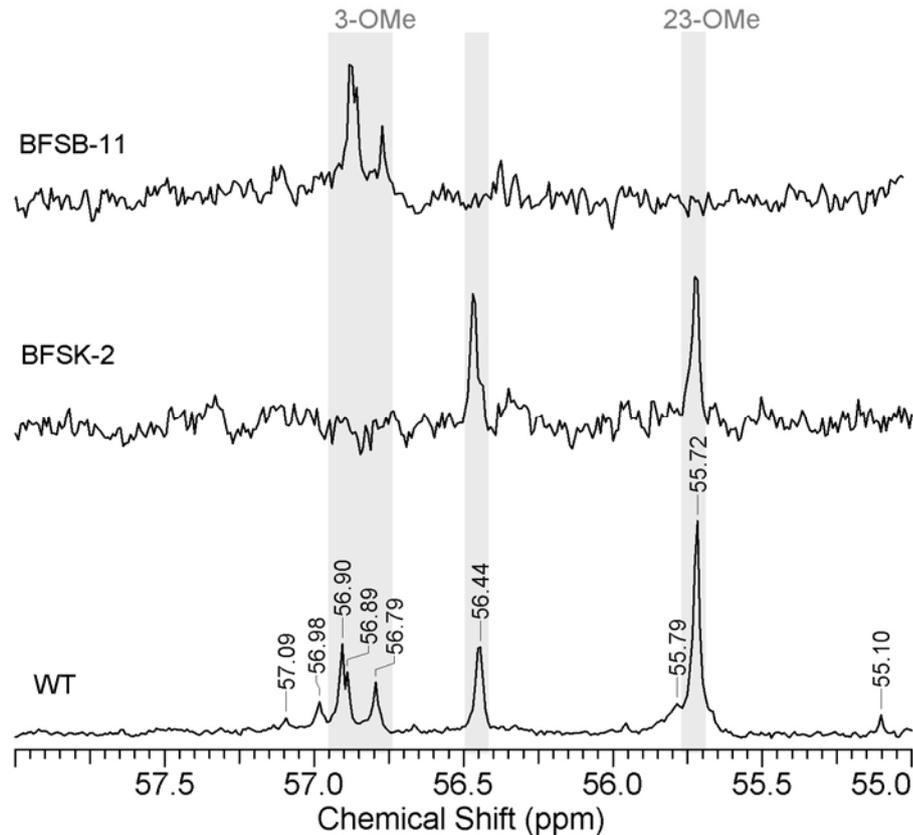


Abbildung 4.9: Ausschnitt der  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren der isolierten Spirangien-Fractionen des Wildtypen (WT) und der Mutanten BFSB-11 und BFSK-2 nach Fütterung von L-[Methyl- $^{13}\text{C}$ ]-Methionin.  
Zur Diskussion des Signales bei 56,44 ppm vergleiche 5.3.3.1.

#### 4.1.4.3 Inaktivierung der Cytochrom-P<sub>450</sub> Monooxygenase *spiC*

*spiC* kodiert eine Cytochrom-P<sub>450</sub> Monooxygenase. Deren Funktion in der Spirangien-Biosynthese wurde untersucht, indem das Gen durch Insertion des pSUPHyg-Derivates pBFS\_C inaktiviert wurde. Direkt stromabwärts von *spiC* folgt mit 13 bp Abstand *spiD*, welches die erste PKS kodiert. Um auch nach der Insertionsinaktivierung von *spiC* die Transkription von *spiD* und der folgenden Gene zu gewährleisten, wurde der *aphII*-Promotor (74) zusammen mit dem homologen Fragment zu *spiC* in das Inaktivierungskonstrukt kloniert (vergleiche Abbildung 4.10 a). Nach Integration von pBFS\_C ist die erste Kopie von *spiC* am 3'-Ende um 308 bp verkürzt, in der zweiten Kopie folgt ein eingeführtes Stopp-Kodon direkt auf das letzte potentielle Start-Kodon GTG. Das tatsächliche Start-Kodon von *spiC* konnte anhand von Leserahmen-Analysen und Vergleichen mit bekannten Sequenzen nicht eindeutig bestimmt werden, das beschriebene GTG ist das letzte Start-Kodon, das als wahrscheinlich angesehen werden kann. Der eingeführte *aphII*-Promotor liegt in den resultierenden Mutanten stromaufwärts der zweiten inaktiven *spiC* Kopie und den folgenden PKS kodierenden Genen.

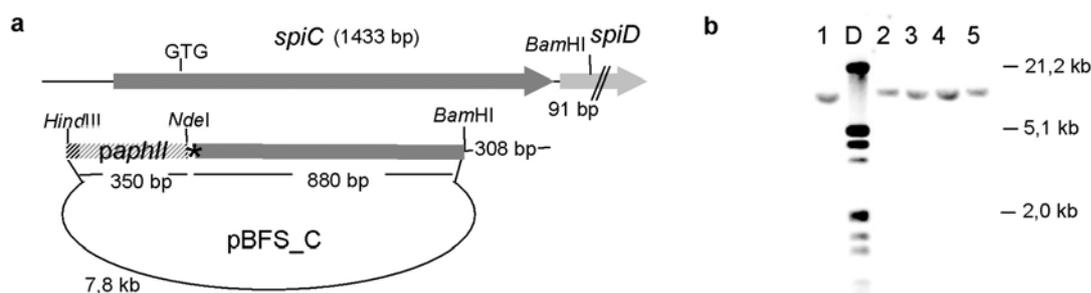


Abbildung 4.10: **Inaktivierungskonstrukt für *spiC* (a) und Southern Blot Analyse der Mutanten (b).**  
 a: Ein Stern symbolisiert das eingeführte Stopp-Kodon. b: Spuren 1–5: genomische Mutanten-DNA, D: DIG markierter DNA-Größenstandard. Nach Restriktion mit *Bam*HI und Hybridisierung mit dem DIG-markierten Hygromycinresistenzgen des Vektor-Rückgrats wurde bei allen Mutanten die erwartete 8,5 kb große Bande detektiert.

#### 4.1.4.3.1 Genotypische Analyse der Mutanten

Nach biparentaler Konjugation von pBFS\_C in *S. cellulosum* So ce90A1 wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten. Die genomische DNA der Klone wurde isoliert, mit *Bam*HI hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In einem Southern Blot wurde mit dem DIG-markierten Hygromycinresistenzgen des Vektor-Rückgrats hybridisiert. Bei mehreren Mutanten konnte die erwartete 8,5 kb-Bande detektiert werden (vergleiche Abbildung 4.10 b).

#### 4.1.4.3.2 Phänotypische Analyse der Mutante

Die vier genetisch verifizierten Mutanten BFSC-2, -3, -5 und -7 wurden parallel zum Wildstamm kultiviert, anschließend wurden die Sekundärstoffe extrahiert und per HPLC-MS analysiert. Im Gegensatz zum Wildstamm-Extrakt konnten in keinem der Mutanten-Extrakte Spirangiene oder Spirangien-Derivate nachgewiesen werden.

#### 4.1.4.3.3 Verifizierung der Kontrolle der Transkription der PKS kodierenden Gene durch den *aphII*-Promotor

Um sicherzustellen, dass die fehlende Spirangien-Produktion der BFSC-Mutanten nicht durch unzureichende Transkription der PKS kodierenden Gene begründet ist, wurde ein zweites Insertionskonstrukt für *spiC* kloniert. Das Konstrukt pBFS\_CP trägt ebenfalls den *aphII*-Promotor stromaufwärts des homologen Fragments zu *spiC*, das homologe Fragment ist jedoch größer als in pBFS\_C und beinhaltet das gesamte 3'-Ende des Gens (siehe Abbildung 4.11 a). Nach Integration von pBFS\_CP resultiert eine erste, vollständige Kopie von *spiC* unter Kontrolle des natürlichen Promotors und eine zweite, inaktive Kopie von *spiC* unter Kontrolle des *aphII*-Promotors. Die Transkription der PKS kodierenden Gene ist abhängig vom eingeführten *aphII*-Promotor. Eine potentielle Ribosomen-Bindestelle ist stromaufwärts von *spiD* vorhanden.

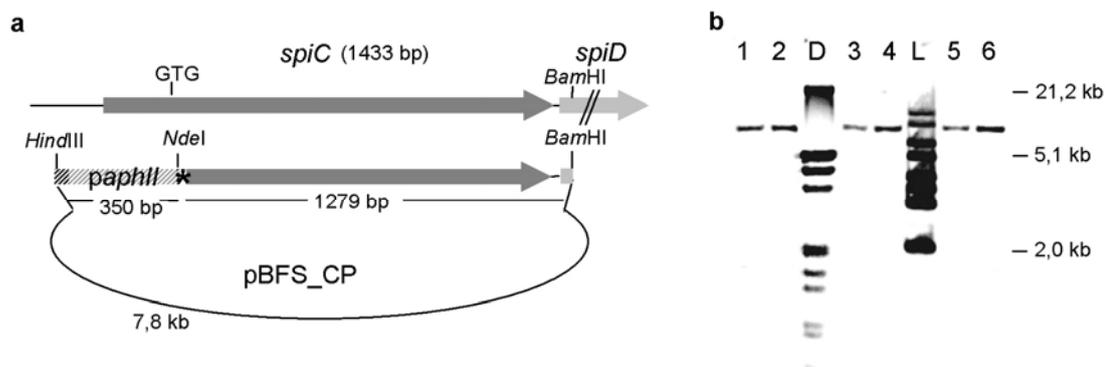


Abbildung 4.11: **Konstrukt zur Kontrolle der Expression der PKS-kodierenden Gene durch den *aphII*-Promotor (a) und Southern Blot Analyse der Mutanten (b).** a: Ein Stern symbolisiert das eingeführte Stopp-Kodon. b: Spuren 1–6: genomische Mutanten-DNA, D: DIG markierter DNA-Größenstandard, L: DNA Größenstandard (unspezifische Hybridisierung). Nach Restriktion mit *BamHI/HindIII* und Hybridisierung mit dem DIG-markierten Hygromycin-Resistenzgen des Vektor-Rückgrats wurde bei allen Mutanten die erwartete 7,8 kb große Bande detektiert.

#### 4.1.4.3.4 Genotypische Analyse der Mutanten

Auch nach Konjugation von pBFS\_CP in *S. cellulosum* So ce90A1 wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten. Die genomische DNA der Klone wurde isoliert, mit *BamHI/HindIII* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In einem Southern Blot wurde mit dem DIG-markierten Hygromycinresistenzgen des Vektor-Rückgrats hybridisiert. Die erwartete 7,8 kb-Bande wurde bei mehreren Mutanten detektiert (vergleiche Abbildung 4.11 b).

#### 4.1.4.3.5 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

Die verifizierte Mutante BFSCP-6 wurde parallel zum Wildstamm kultiviert und anschließend der Sekundärstoffgehalt der Kulturextrakte analysiert. Wie beim Wildstamm konnten bei der Mutante die Produktion von Spirangien nachgewiesen werden, wenn auch mit etwas reduzierter Ausbeute. Die Kontrolle der Transkription der PKS-kodierenden Gene durch den *aphII*-Promotor ist somit in der Mutante gewährleistet.

### 4.1.5 Untersuchung der Sequenzwiederholungen im PKS kodierenden Teil des Spirangien-Biosynthesegenclusters

Bei Vergleichen des PKS-kodierenden Sequenzbereiches des Spirangien-Biosynthesegenclusters mit sich selbst („dot plot“) fielen eine Reihe von Sequenzwiederholungen im Gencluster auf. Sechs Sequenzbereiche mit einer Größe von 1,0 bis 4,6 kb sind mindestens zweimal im Cluster vorhanden, dabei sind jeweils bis zu 99,9 % der Basenpaare identisch (vergleiche Tabelle 4.2, Abbildung 4.12). Die

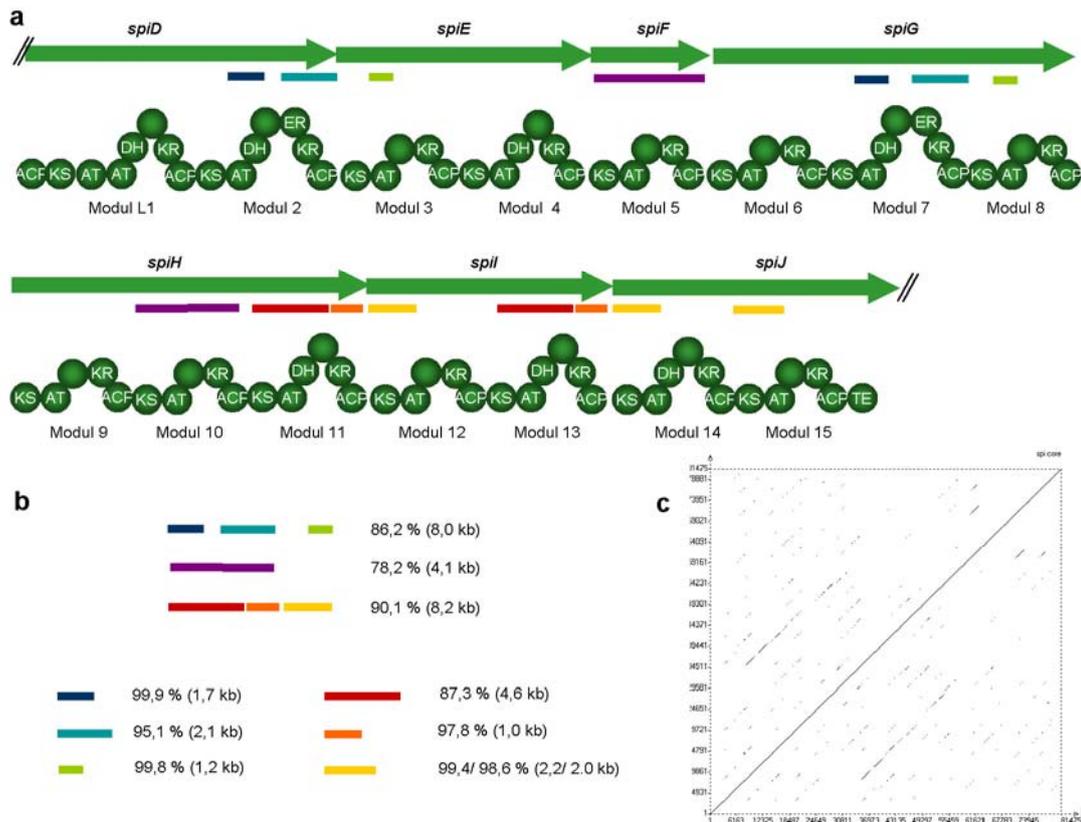
wiederholt vorkommenden Sequenzbereiche lassen sich drei Regionen zuordnen. Die erste Region umfasst drei der hoch homologen Sequenzbereiche und hat eine Gesamtgröße von 8,0 kb. Diese Region kodiert den Bereich von der AT-Domäne von Modul 2 bis einschließlich der AT-Domäne von Modul 3 von SpiD/SpiE und ist ein weiteres Mal in *spiG* vorhanden, wo sie den Bereich von der AT-Domäne von Modul 7 bis einschließlich der AT-Domäne von Modul 8 kodiert. Die beiden Sequenzregionen sind zu 86,2 % identisch. Die 4,1 kb große, das gesamte Modul 5 kodierende Region von *spiF* existiert ein zweites Mal in *spiH*, wo sie für Modul 10 kodiert. Das Ausmaß der Identität der beiden Sequenzbereiche beträgt 78,2 %. Die dritte Region von Sequenzwiederholungen liegt in *spiH* und *spiI* beziehungsweise in *spiI* und *spiJ*. Die 8,2 kb große Region kodiert für das gesamte Modul 11 bzw. Modul 13 und die KS-AT-Domäne der jeweils folgenden Module 12 bzw. 14. Diese beiden Regionen sind zu 90,1 % identisch. Der letzte, die KS-AT-Domäne kodierende Sequenzbereich dieser Region existiert ein drittes Mal, auf *spiJ*. Die beiden Sequenzwiederholungen in *spiI* sind über 2,2 bzw. 2 kb zu 99,4 % bzw. 98,6 % mit dem entsprechenden Bereich in *spiI* identisch. In Tabelle 4.2 ist die genaue Lage der Sequenzwiederholungen im Cluster aufgeführt; in Abbildung 4.12 sind die Dot-Plot Analyse des gesamten PKS-kodierenden Bereichs und die Lage, Größe und Ähnlichkeit der wiederholt vorkommenden Sequenzregionen dargestellt.

Tabelle 4.2: Lage und Länge der Sequenzwiederholungen im Spirangien-Biosynthesegencluster

| Position im Cluster I [bp] | Genbereich I | Position im Cluster II [bp] | Genbereich II | Länge des Bereiches [bp] | Identische Basenpaare [%] | kodierte Domänen*                |
|----------------------------|--------------|-----------------------------|---------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| 14.000 - 15.676            | <i>spiD2</i> | 40.916 - 42.591             | <i>spiG2</i>  | 1.676                    | 99,9                      | AT-DH                            |
| 16.753 - 18.898            | <i>spiD2</i> | 43.647 - 45.784             | <i>spiG2</i>  | 2.140                    | 95,1                      | ER-KR-ACP                        |
| 20.645 - 21.877            | <i>spiE1</i> | 47.283 - 48.514             | <i>spiG3</i>  | 1.232                    | 99,8                      | AT                               |
| 30.001 - 34.099            | <i>spiF</i>  | 55.968 - 60.081             | <i>spiH2</i>  | 4.113                    | 78,2                      | (KS)-AT-L <sup>#</sup> -KR-(ACP) |
| 60.186 - 64.801            | <i>spiH3</i> | 70.592 - 75.207             | <i>spiI2</i>  | 4.615                    | 87,4                      | KS-AT-DH-L-(KR)                  |
| 64.532 - 65.496            | <i>spiH3</i> | 75.000 - 75.965             | <i>spiI2</i>  | 965                      | 97,8                      | (KR)-(ACP)                       |
| 66.369 - 68.615            | <i>spiI1</i> | 76.833 - 79.079             | <i>spiJ1</i>  | 2.246                    | 99,4                      | (KS)-AT                          |
| 66.555 - 68.581            | <i>spiI1</i> | 82.432 - 84.446             | <i>spiJ2</i>  | 2.062                    | 98,6                      | (KS)-AT <sup>2</sup>             |

\* durch den beschriebenen Sequenzbereich unvollständige erfasste Domänen sind in Klammern angegeben, nahezu komplette Domänen sind in grauen Klammern angegeben

# L= Linker



**Abbildung 4.12: Analyse von Sequenzwiederholungen im Spirangien-Biosynthesegencluster.** a: Lage der Sequenzwiederholungen im Cluster und Funktion der kodierten Proteinbereiche; b: Größe und Ausmaß der Identität der Sequenzwiederholungen; c: „Dot Plot“ Analyse des gesamten PKS kodierenden Bereiches des Spirangien-Biosynthesegenclusters. Dabei wird die Sequenz mit sich selbst verglichen, Bereiche mit großer Ähnlichkeit (>85%/ 30 bp) werden durch Punkte angezeigt. Punkte, welche sich zu einer Geraden verbinden lassen, zeigen Regionen mit hohem Identitätsgrad an. Die Diagonale in der Mitte des Diagramms zeigt die Übereinstimmung jeder Base mit sich selbst an.

## 4.2 Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulorum* So ce90

*S. cellulorum* So ce90 produziert nicht nur Spirangiene, sondern auch Epothilone, welche sich als Zytostatika in Phase III der klinischen Prüfung befinden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, regulatorische Proteine der Sekundärstoff-Produktion in *S. cellulorum* So ce90A1 bzw. So ce90D48 zu finden. Der Stamm *S. cellulorum* So ce90D48 ist durch UV-Mutagenese entstanden und produziert bereits Epothilone mit erhöhter Ausbeute (K. Gerth, persönliche Mitteilung). Für die Identifizierung regulatorischer Proteine der Sekundärstoffproduktion wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Beide gehen von der Annahme aus, dass homologe Proteine aus *S. cellulorum* So ce90 und *S. cellulorum* So ce56 wegen der nahen Verwandtschaft der Stämme (K. Gerth, persönliche Mitteilung) eine große Ähnlichkeit aufweisen. Zum einen wurden regulatorische

Proteine isoliert und näher charakterisiert, welche an die Promotor-Region des Epothilon-Biosynthesegenclusters binden. Zum anderen wurden Inaktivierungskonstrukte für Gene bekannter Regulatoren aus *S. cellulorum* So ce56 in *S. cellulorum* So ce90 konjugiert mit dem Ziel, vorhandene homologe Gene zu inaktivieren.

#### 4.2.1 Die UV-Mutante *S. cellulorum* So ce90D48

Untersuchungen zur Regulation wurden sowohl mit dem Wildstamm *S. cellulorum* So ce90 als auch mit der Mutante *S. cellulorum* So ce90D48 durchgeführt. Diese Mutante resultiert aus mehrfacher UV-Mutagenese des Wildstammes und produziert vor allem die pharmakologisch wichtigen Epothilone C und D in erhöhter Ausbeute, wohingegen Spirangiene nicht mehr gebildet werden (K. Gerth, persönliche Mitteilung). Die Epothilone A und B werden nur in Spuren produziert. Die Epothilone A und B entstehen im Wildstamm durch Epoxidierung von Epothilon C und D durch die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase EpoF (auch als EpoK bezeichnet) (vergleiche Abbildung 5.19, (75;76)). Nach Amplifizierung von *epoF* von genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90D48 wurde das Gen in pCR2.1Topo kloniert und von drei unabhängigen Klonen sequenziert (pEpoF1 -3, vergleiche 2.6.4). Das abgeleitete inaktive Genprodukt weist gegenüber dem Wildtyp-EpoF zwei Punktmutationen auf, Leucin in Position 270 ist in der Mutante durch Prolin ersetzt, Arginin an Position 296 durch Cystein.

#### 4.2.2 Untersuchungen von regulatorischen Proteinen, welche durch biomagnetische Separation von Promotorbindeproteinen identifiziert wurden

Die biomagnetische Separation von Promotorbindeproteinen wurde zu Beginn dieser Arbeit von Shwan Rachid durchgeführt: Der biotinylierte Promotor des Epothilon-Biosynthesegenclusters aus *S. cellulorum* So ce90 wurde mit einem Gesamtproteinextrakt einer sechs Tage alten Kultur von *S. cellulorum* So ce90D48 inkubiert. Zugehörige regulatorische Proteine können an die Promotorregion binden und mit Hilfe des eingeführten Biotinrestes vom restlichen Zellprotein abgetrennt werden („Promotor-Fischen“). Dabei bindet der Biotinrest an Streptavidin, welches wiederum an magnetische Partikel gekoppelt ist und über diese abgetrennt werden kann. Die gebundenen Proteine wurden isoliert und mit Trypsin hydrolysiert. Das hydrolysierte Proteingemisch wurde massenspektrometrisch analysiert, die entstandenen Fragmente wurden mit dem in *in silico* hydrolysierten und translatierten *S. cellulorum* So ce56 Genom verglichen. Das ist möglich, weil vorhandene Sequenzen aus *S. cellulorum* So ce90 eine große Übereinstimmung mit der Sequenz von *S. cellulorum* So ce56 zeigen. Auf diese Weise wurden zwei im Genom von *S. cellulorum* So ce56 kodierte Proteine mit potentiell regulatorischer Funktion gefunden, welche Pbp4 und DeoRB genannt wurden (abgeleitet von Promotor-Bindeprotein bzw. dem Namen des ähnlichen Gens in *S. cellulorum* So ce56).

#### 4.2.2.1 PbP4

Das im Genom von *S. cellulosum* So ce56 kodierte PbP4 besitzt ein Molekulargewicht von 186.356 Dalton (*pbP4*: 5082 bp) und zeigt Ähnlichkeiten zu Serin-Threonin-Kinasen (z. B. 41 % identische und 61 % ähnliche Aminosäuren über die gesamte Proteinlänge zu einer Serin-Threoninkinase mit ‚two component‘ Sensordomäne aus *Nostoc* sp. PCC7120; NP\_484398).

##### 4.2.2.1.1 Sequenzierung von *pbp4*

Um die Sequenz von *pbp4* in im *S. cellulosum* So ce90 zu erhalten, wurde zunächst mit dem Oligonukleotidpaar His-regulator-2-up/His-regulator-2-dn ein 2,2 kb großes Fragment von *pbp4* von genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce56 amplifiziert. Mit diesen Oligonukleotiden wurde von genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce90 als Matritze kein Amplifikat erhalten. Das von *S. cellulosum* So ce56 erhaltene Fragment wurde DIG markiert und als Sonde für die Hybridisierung mit einem hochdichten Filter der *S. cellulosum* So ce90 Cosmidbank eingesetzt (vergleiche 4.1.1.2). Drei hybridisierende Cosmide (c41, c42 und c43) wurden isoliert und als Matritze für eine PCR mit His-regulator-2-up/His-regulator-2-dn eingesetzt. Dabei wurde ein 2,2 kb großes Fragment erhalten, welches in pCR®2.1Topo kloniert (pPbP4) und durch ‚primer walking‘ sequenziert wurde. Das erhaltene *pbp4* Fragment aus *S. cellulosum* So ce90 ist mit dem entsprechenden Fragment aus *S. cellulosum* So ce56 zu 91,2 % identisch, auf Protein-Ebene sind die Fragmente zu 90,1% identisch.

##### 4.2.2.1.2 Inaktivierung von *pbp4*

Ausgehend von den 2,2 kb bekannter Sequenz wurde das Inaktivierungskonstrukt für *pbp4* pPbP4KO mit 0,9 kb homologen Bereich entworfen, kloniert (vergleiche 2.6.4) und in *S. cellulosum* So ce90D48 konjugiert. Die erhaltenen Klone wurden nach Restriktion der genomischen DNA mit *Bam*HI in einem Southern Blot verifiziert, dabei hybridisierte das als Sonde eingesetzte DIG-markierte Hygromycin-Resistenzgen mit einem etwa 9 kb großen Fragment. Die Parallel-Mutanten PbP4KO-2, -4 und -5 wurden analog zum Wildstamm in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz angezogen, die Kulturextrakte wurden mit HPLC-MS analysiert. Die Sekundärstoffproduktion der Mutanten war vergleichbar mit der des Wildstammes.

Die Sequenzierung der restlichen *pbp4*-Sequenz wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

#### 4.2.2.2 DeoRB

DeoRB ist ein weiteres *S. cellulosum* So ce56 Protein, das nach (*in silico*) tryptischer Hydrolyse Fragmente aufweist, die mit nach tryptischer Hydrolyse des mit dem Epothilon-Promotor ‚gefischten‘ *S. cellulosum* So ce90 Proteins erhaltenen Fragmenten übereinstimmen. DeoRB hat ein Molekulargewicht von 39.840 Dalton (1104 bp) und zeigt Homologien zu Transkriptionsfaktoren, wie einem Transkriptionsregulator der DeoR-Familie aus *Streptomyces avermitilis* MA4680 (57 % identische und 71 %

ähnliche Aminosäuren von insgesamt 307; NP\_827712.1). Ein für die DNA-Bindung typischerweise benötigtes Helix-turn-Helix-Motiv ist vorhanden. Nach tryptischer Hydrolyse von DeoRB (*S. cellulorum* So ce56) entstehen 42 Fragmente, welche aus mindestens zwei Aminosäuren bestehen, 15 davon entstehen auch nach tryptischer Hydrolyse von DeoRB aus *S. cellulorum* So ce90.

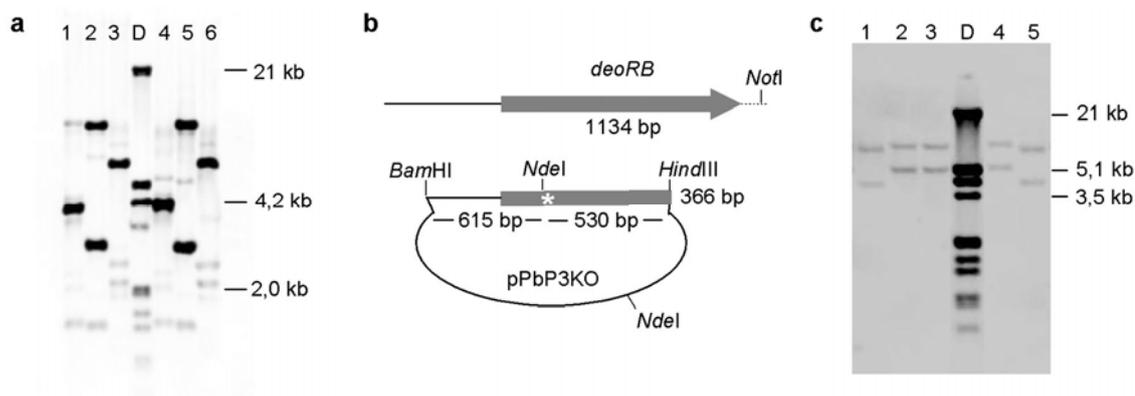
#### 4.2.2.2.1 Sequenzierung von *deoRB*

*deoRB* sollte aus *S. cellulorum* So ce90 sequenziert werden. Ausgehend von der *S. cellulorum* So ce56 Sequenz wurde ein Oligonukleotidpaar DeoR-like-up/DeoR-like-dn entworfen, welches ein 930 bp Fragment von *deoRB* amplifiziert. Mit genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce90 als Matritze wurde kein Amplifikat erhalten. Das von genomischer DNA von *S. cellulorum* So ce56 erhaltene Fragment wurde daraufhin DIG markiert und als Sonde für die Hybridisierung mit der *S. cellulorum* So ce90 Cosmidbank eingesetzt. Drei hybridisierende Cosmide c31, c32 und c33 wurden isoliert und als Matritze für eine PCR mit dem Oligonukleotidpaar DeoR-like-up/DeoR-like-dn eingesetzt. Das erhaltene 0,9 kb Fragment wurde in pCR®2.1Topo kloniert (pPDA3) und sequenziert. Um die vollständige Sequenz von *deoRB* aus *S. cellulorum* So ce90 zu erhalten, wurden die Cosmide mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, und in einem Southern Blot erneut mit dem DIG markierten *deoRB* Fragment hybridisiert. Nach Restriktion von c31 mit *Bam*HI hybridisierte ein 3,9 kb großes Fragment (vergleiche Abbildung 4.13 a). Dieses Fragment wurde über die *Bam*HI-Schnittstelle in pBSII(+) kloniert (pPbPA3) und durch „Primer Walking“ sequenziert. *deoRB* aus *S. cellulorum* So ce90 ist 1134 bp groß (DeoRB: 40.824 Dalton) und ist mit *deoRB* aus *S. cellulorum* So ce56 über 1063 bp zu 87 % identisch (auf Protein-Ebene über 325 Aminosäuren 85 % Identität).

#### 4.2.2.2.2 Inaktivierung von *deoRB*

Die Funktion von DeoRB in *S. cellulorum* So ce90 sollte untersucht werden, deshalb wurde das Inaktivierungskonstrukt pPbP3KO (vergleiche Abbildung 4.13 b) kloniert und in *S. cellulorum* So ce90D48 und *S. cellulorum* So ce90A1 konjugiert. Mit einem Southern Blot nach Restriktion mit *Not*I/*Nde*I und einem homologen Fragment des Inaktivierungskonstruktes als Sonde (Oligonukleotidpaar PbP3KO1/PbP3KO2) wurden Mutanten mit gewünschter Integration des Inaktivierungskonstruktes identifiziert (Hybridisierung eines 5,3 und eines 8 kb-Fragmentes, unerwünschte Integration: Hybridisierung eines 4,1 und eines 7,2 kb-Fragmentes, vergleiche Abbildung 4.13 c). Die *deoRB* Mutanten von *S. cellulorum* So ce90D48 (Parallelmutanten PbP3KO1, PbP3KOA und PbP3KOE) wurden parallel zum Wildstamm unter XAD-Zusatz in Produktionsmedium kultiviert. Der Epothilongehalt der Kulturextrakte der Mutanten unterschied sich nicht signifikant von dem der Wildstamm-Extrakte. Von *S. cellulorum* So ce90A1 wurden die verifizierten *deoRB* Mutanten A3KO-3, -5, -6 und -10 parallel zum Wildstamm kultiviert. Alle Mutanten produzierten wie der Wildstamm Epothilone,

aber keine der Mutanten produzierte Spirangien A oder B. Die Mutante A3KO-3 (später umbenannt in BFA3KO) produziert neue Spirangien-Derivate (vergleiche 4.3).



**Abbildung 4.13:** Southern-Blot Analyse der Cosmide c31 und c33 (a), das Inaktivierungskonstrukt pPbP3KO (b) und Southern-Blot Analyse von mit pPbP3KO erhaltenen Mutanten von *S. celluloseum* So ce90A1 (c). a: Spuren 1 – 3: c31 hydrolysiert mit *Bam*HI, *Pst*I und *Not*I, D: DIG markierter DNA-Größenstandard, Spuren 4 – 6: c33 hydrolysiert mit *Bam*HI, *Pst*I und *Not*I. b: Ein Stern symbolisiert das eingeführte Stopp-Kodon. c) Spuren 1 – 5: genomische DNA von *S. celluloseum* So ce90A1-Mutanten, D: DIG markierter DNA-Größenstandard. Bei Mutanten mit gewünschter Integration hybridisiert eine 5,3 kb und ein 8 kb-Fragment (Spuren 2, 3 und 4), nach unerwünschter Integration hybridisiert eine 4,1 kb und eine 7,2 kb-Fragment (Spuren 1 und 5),

### 4.2.3 Untersuchungen zu Proteinen in *S. celluloseum* So ce90, welche signifikante Homologien zu bekannten regulatorischen Proteinen aus *S. celluloseum* So ce56 aufweisen

Von DeoRA und NtcA aus *S. celluloseum* So ce56 ist bekannt, dass deren Inaktivierung zu einer reduzierten-(DeoRA) bzw. erhöhten (NtcA) Chivosazolproduktion führt ((18) und S. Rachid, persönliche Mitteilung). Bei DeoRA handelt es sich neben DeoRB (siehe oben) um einen zweiten Transkriptionsfaktor, der Ähnlichkeit zu Regulatoren vom DeoR-Typ zeigt. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *S. celluloseum* So ce56 und *S. celluloseum* So ce90 wurde vermutet, dass die entsprechenden Gene auch in *S. celluloseum* So ce90 vorhanden sein könnten. Die Inaktivierungskonstrukte für *deoRA* (später umbenannt in *chiR*) und *ntcA* in *S. celluloseum* So ce56 wurden deshalb auch in *S. celluloseum* So ce90A1 konjugiert.

#### 4.2.3.1 DeoRA

##### 4.2.3.1.1 Inaktivierung von *deoRA*

pSChiR, welches ursprünglich für die Inaktivierung von *deoRA* in *S. celluloseum* So ce56 hergestellt wurde (18), wurde in *S. celluloseum* So ce90A1 und *S. celluloseum* So ce90D48 konjugiert. Es wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten und per Southern Blot analysiert. Dabei diente das DIG markierte Hygromycinresistenzgen als

Sonde, es hybridisierte jeweils ein 9 kb großes Fragment. Die verifizierten Mutanten DA1 (*S. cellulosum* So ce90D48) und BFDA2 (*S. cellulosum* So ce90A1) wurden parallel zu den Wildstämmen unter XAD-Zusatz 16 Tage in Produktionsmedium angezogen und anschließend der Sekundärstoffgehalt der Kulturextrakte untersucht. Die Mutanten DA1 und BFDA2 produzierten deutlich geringere Mengen Epothilon als die jeweiligen Wildstämme, die Mutante BFDA2 produzierte außerdem keine Spirangiene mehr. Das Ausmaß der Produktionsminderung für das von beiden Stämmen produzierte Epothilon C betrug im Mittelwert Faktor 44 in der Mutante BFDA2 (Spannweite von 20 bis 87, Standardabweichung: 22, insgesamt 6 Extrakte) und Faktor 60 in der Mutante DA1 (Spannweite von 18 bis 125, Standardabweichung: 46, insgesamt 4 Extrakte).

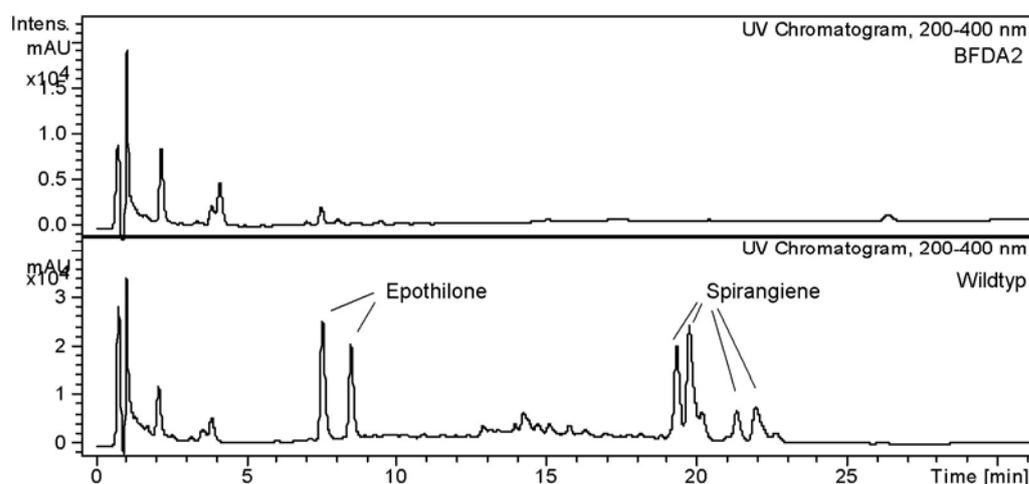


Abbildung 4.14: HPLC-MS-UV/VIS Analyse von Kulturextrakten der Mutante BFDA2 und des Wildtypen

#### 4.2.3.1.2 Sequenzierung von *deoRA*

Um die Sequenz von *deoRA* in *S. cellulosum* So ce90 zu erhalten, wurde aus der Mutante BFDA2 eine Vektor-Rückgewinnung durchgeführt. Dafür wird die genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und die entstandenen Fragmente religiert. Nach Transformation der Ansätze in *E. coli* zeigen nur die Zellen Hygromycinresistenz, die ein religiertes Plasmid mit dem Vektorrückgrat (pSUPHyg) des Inaktivierungskonstruktes enthalten. Ausgehend von der bekannten Sequenz des Inaktivierungskonstruktes kann das Plasmid sequenziert und Information über den Bereich der genomischen DNA erhalten werden, in welchen das Inaktivierungskonstrukt integriert worden ist.

Nach Restriktion von genomischer DNA der Mutante BFDA2 mit *Mlu*I, nachfolgender Religation und Transformation in *E. coli* DH10B konnte ein Plasmid erhalten werden, welches neben dem Vektor-Rückgrat knapp 3 kb angrenzende genomische Sequenz trägt (pDA\_RM). Da mit pDA\_RM keine guten Sequenziererergebnisse erzielt werden konnten, wurde das Plasmid mit *Bam*HI/*Hind*III partiell hydrolysiert und der unbekannte genomische Bereich in pBSII(+) kloniert (pDA\_RMBS-2). Das 5'-Ende

und das 3'-Ende von *deoRA* (So ce90) waren auf dem Plasmid enthalten, davon wurde ein Oligonukleotidpaar DA5'/DA3' abgeleitet, mit dem *deoRA* schließlich von genomischer DNA von *S. cellulosum* So ce90 amplifiziert werden konnte. Nach Klonierung in pCR2.1Topo wurden mehrere Parallelklone sequenziert (pDA90-1 bis-4). *deoRA* aus *S. cellulosum* So ce90 ist 801 bp lang und kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 28.757 Dalton. Das Gen ist zu *deoRA* aus *S. cellulosum* So ce56 zu 89 % identisch. Auf Proteinebene sind 92 % der Aminosäuren identisch und 96 % ähnlich.

#### 4.2.3.1.3 Überexpression von *deoRA*

Da die Inaktivierung von *deoRA* zu einer verringerten Epothilon-Produktion und dem Ausfall der Spirangien-Produktion führt, ist im Rückschluss eine Produktionssteigerung durch verstärkte Expression von *deoRA* denkbar. Diese Hypothese sollte überprüft werden, deshalb wurden Konstrukte mit zwei verschiedenen Promotoren für die Überexpression von *deoRA* entworfen und kloniert.

##### 4.2.3.1.3.1 *deoRA* unter Kontrolle des induzierbaren tet-Promotors

Im *ptet-tetR* System bindet der Tetrazyklin-Repressor in der *ptet*-Region und behindert die Bindung der RNA-Polymerase und damit die Transkription der von *ptet* kontrollierten Gene. In Anwesenheit von Tetrazyklin oder Anhydrotetrazyklin wird konzentrationsabhängig die Bindung des Tetrazyklin-Repressors an *ptet* unterdrückt (77), dieses System wurde in *Myxococcus xanthus* bereits erfolgreich verwendet (H. B. Bode, persönliche Mitteilung). pBF\_PDA2 (vergleiche 2.6.4) enthält das 5'-Ende von *deoRA* und stromaufwärts davon den *tet*-Promotor. Stromaufwärts des *tet*-Promotors ist auf dem komplementären Strang der Tet-Repressor kodiert (vergleiche Abbildung 4.15 a). Nach Integration von pBF\_PDA2 in das *S. cellulosum* So ce90 Genom resultieren zwei Kopien von *deoRA*. Die erste, unter Kontrolle des natürlichen Promotors stehende Kopie ist unvollständig, es fehlen 266 bp am 3'-Ende des Gens. Die zweite Kopie ist vollständig und wird durch *ptet* kontrolliert.

Nach Konjugation von pBF\_PDA2 in *S. cellulosum* So ce90A1 wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten und mit PCR verifiziert. Mit dem Oligonukleotidpaar BF\_PDA5/BF\_PDA6 wurde *tetR-ptet* von genomischer DNA der Mutanten, nicht aber von genomischer DNA des Wildstammes als Negativkontrolle amplifiziert. Die genetisch verifizierten Mutanten BF\_PDA2-1, -3 und -4 wurden parallel zum Wildstamm zweimal über je 7 und 14 Tage kultiviert. Dabei wurde je eine der zwei Kulturen zu Beginn der Kultivierung mit 800 µg/ml Anhydrotetrazyklin versetzt. Die Mutante BF-PDA2-4 hatte nach 7 und 14 Tagen etwa gleich viel Epothilon und Spirangien produziert wie der Wildstamm. Die Mutante BF\_PDA2-3 produzierte jeweils nur Spirangiene, die Mutante BF\_PDA2-1 jeweils nur Epothilone. In allen Fällen war die Produktion bei Kultivierung mit oder ohne Anhydrotetrazyklin-Zusatz vergleichbar.

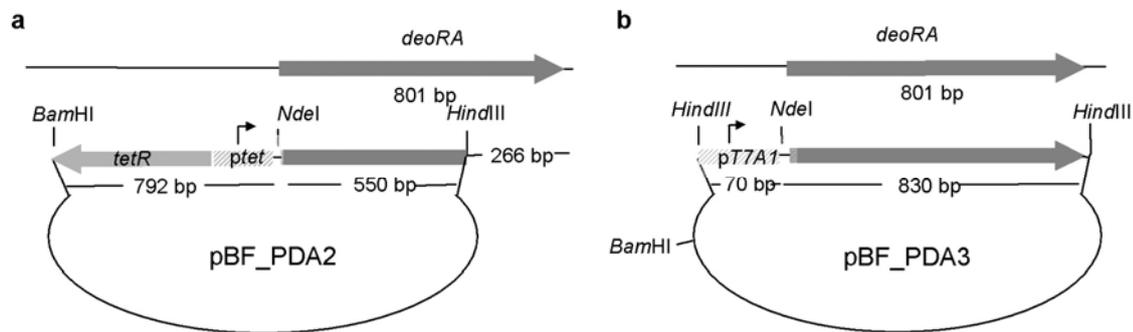


Abbildung 4.15: Konstrukte für die Überexpression von *deoRA* in *S. cellulosum* So ce90A1. a: pBF\_PDA2, b: pBF\_PDA3

#### 4.2.3.1.3.2 *deoRA* unter Kontrolle des konstitutiven T7A1-Promotors

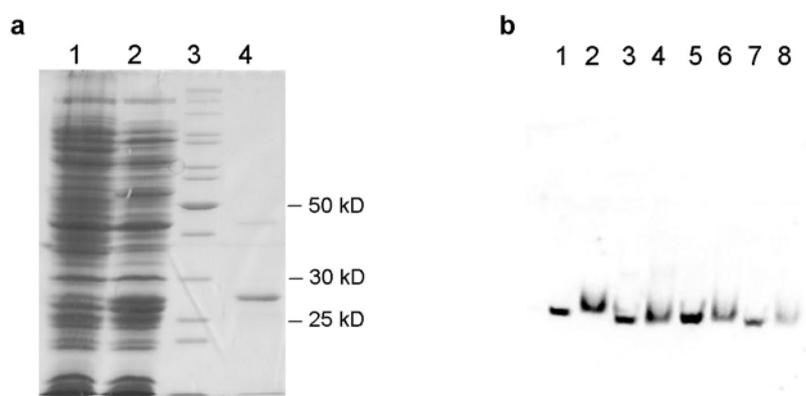
Der T7A1-Promotor führt zu einer konstitutiven Expression in Sorangien (78). *deoRA* sollte unter die Kontrolle des T7A1-Promotors gestellt werden, dafür wurde das Insertionskonstrukt pBF\_PDA3 kloniert (vergleiche Abbildung 4.15 b). pBF\_PDA3 trägt den T7A1-Promotor 15 bp stromaufwärts des vollständigen *deoRA*-Gens. Nach Integration von pBF\_PDA3 in das *S. cellulosum* So ce90 Genom resultieren zwei intakte Kopien von *deoRA*, die erste unter Kontrolle des nativen Promotors, die zweite unter Kontrolle des T7A1-Promotors.

Nach Konjugation von pBF\_PDA3 in *S. cellulosum* So ce90A1 wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten und mit PCR verifiziert. Dabei wurde das Oligonukleotidpaar PSUPHyg rev und BF\_PDA3-2 eingesetzt. PSUPHyg rev bindet 70 bp nahe der *Bam*HI-Schnittstelle in der Vektorsequenz, BF\_PDA3-2 bindet 49 bp stromabwärts des 3'-Endes von *deoRA*, außerhalb des auf pBF\_PDA3 enthaltenen homologen Fragmentes. Bei allen Mutanten wurde mittels PCR das erwartete 1,4 kb Fragment erhalten, nicht aber bei einer parallel angesetzten Kontroll-PCR mit genomischer DNA einer Insertionsmutante eines anderen pSUPHyg-Derivates. Die verifizierten Mutanten BF\_PDA3-1, -4 und -6 wurden angezogen und parallel zum Wildstamm kultiviert. Die Kulturextrakte wurden mit HPLC-MS analysiert, die Epothilon- und Spirangien-Produktion der Mutanten war der des Wildstammes vergleichbar.

#### 4.2.3.1.4 DNA-Bindungsstudien mit DeoRA

Um Bindungsstudien mit der Spirangien- und Epothilon-Promotorregion durchführen zu können, wurde *deoRA* als N-terminales GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 heterolog exprimiert. Dafür wurde *deoRA* in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert (pGEX-DA, 2.6.4). Unter den gewählten Expressionsbedingungen (vergleiche 2.15) wurden 1,5 mg Protein pro Liter Kultur erhalten (Abbildung 4.16 a), die Identität von DeoRA wurde per MALDI-MS Analyse bestätigt. Mit dem gereinigten Protein (vergleiche 2.15) wurden Bindungsversuche durchgeführt. Dafür wurden die

vorhergesagten drei potentiellen Promotor-Regionen des Spirangien-Biosynthesegenclusters (SP12, SP34 und SP56, vergleiche 2.16) und die Epothilon-Promotorregion (BFEPnB) mit PCR amplifiziert und DIG markiert. Die 214 bis 263 bp großen DIG markierten Fragmente wurden mit unterschiedlichen Mengen DeoRA inkubiert, das DNA-Protein Gemisch wurde schließlich mit nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer vom Polyacrylamidgel auf eine Nylonmembran wurde die Lauflänge der DIG markierten DNA Fragmente durch Hybridisierung mit DIG-Antikörpern festgestellt (vergleiche 2.16). DNA-Fragmente mit gebundenem Protein zeigen aufgrund der Größenzunahme ein verändertes Laufverhalten bei der Gelelektrophorese, die Bande wird verschoben („band-shift“). Trotz mehrfacher Veränderung der Versuchsbedingungen wie Inkubationstemperatur, Pufferstärke und eingesetzter Proteinmenge konnte bei keiner der DNA-Banden nach Inkubation mit DeoRA eine Verschiebung festgestellt werden (vergleiche Abbildung 4.16 b).



**Abbildung 4.16: SDS-Gelelektrophorese nach heterologer Expression von *deoRA* (a) und DNA-Bindungsstudie (b).**

a: Spur 1: Proteinrohextrakt von Zellen ohne Expressionsvektor, Spur 2: Proteinrohextrakt von Zellen mit pGEX-DA, Spur 3: Protein-Größenstandard Spur 4: aufgereinigtes Protein (28,8 kD). b: 30 fmol DIG markierte DNA-Fragmente SP12 (Spuren 1 und 2), SP34 (Spuren 3 und 4), SP56 (Spuren 5 und 6) und BFEPnB (Spuren 7 und 8), je ohne Inkubation mit DeoRA (linke Spur) und nach Inkubation mit 90 pmol DeoRA (rechte Spur).

#### 4.2.3.2 NtcA

Das Inaktivierungskonstrukt für *ntcA* in *S. cellulorum* So ce56 pSUPHygGNR (S.Rachid, persönliche Mitteilung) wurde in *S. cellulorum* So ce90A1 konjugiert, dabei wurden Hygromycin-resistente Klone erhalten. Die Klone BFGNR-1, -2 und -3 wurden angezogen und parallel zum Wildstamm unter XAD-Zusatz in Produktionsmedium kultiviert. Der Sekundärstoffgehalt der Kulturextrakte war jeweils vergleichbar. Die genetische Verifizierung und Sequenzierung wurde daraufhin nicht weiter verfolgt.

### 4.3 Untersuchungen zur Produktion von Spiranginderivaten der Mutante BFA3KO

Nach Inaktivierung des Transkriptionsfaktor-kodierenden Gens *deoRB* in *S. cellulorum* So ce90A1 (vergleiche 4.2.2.2) wurde eine genetisch verifizierte Mutante mit gewünschter Integration des Inaktivierungskonstruktes erhalten, die sich in ihrem Phänotyp von den Parallelmutanten unterscheidet. Diese Mutante wurde BFA3KO (Alias: A3KO-3) genannt, sie produziert im Gegensatz zu den Parallelmutanten, welche keine Spirangiene produzieren, veränderte Spirangiene. Vermutlich ist eine spontane Mutation im Biosynthesegencluster die Ursache für den abweichenden Phänotyp (vergleiche 5.5).

#### 4.3.1 Phänotypische Analyse der Mutante BFA3KO

Die Mutante BFA3KO wurde parallel zum Wildstamm 14 Tage in Produktionsmedium unter XAD-Zusatz kultiviert. Die gewonnenen Kulturextrakte wurden mit HPLC-MS und HPLC-UV/VIS analysiert (vergleiche Abbildung 4.17 a). Die Mutante produziert weder Spirangien A noch B, aber eine Reihe neuer Verbindungen. Diese weisen nach negativer Ionisierung die Massen 661,4 und 675,4 (erste Peakgruppe mit 15-18 min Retentionszeit) bzw. 645,4 und 659,4 auf (zweite Peakgruppe mit 25-32 min Retentionszeit), was einer Differenz von -40 Masseneinheiten (erste Peakgruppe) bzw. -56 Masseneinheiten (zweite Peakgruppe) gegenüber Spirangien A und B entspricht (Spirangien A  $[M-H]^- = 701,5$ ; Spirangien B  $[M-H]^- = 715,5$ ). Die neuen Verbindungen wurden nach negativer Ionisierung mit einem hochauflösenden Massenspektrometer vermessen und anhand der ermittelten präzisen Massen die Summenformeln ermittelt:

$$[M-H]^- = 661,43018: C_{38}H_{61}O_9 \quad (\text{berechnet: } 661,43101)$$

$$[M-H]^- = 675,44543: C_{39}H_{63}O_9 \quad (\text{berechnet: } 675,44666)$$

$$[M-H]^- = 645,43518: C_{38}H_{61}O_8 \quad (\text{berechnet: } 645,43610)$$

$$[M-H]^- = 659,45074: C_{39}H_{63}O_8 \quad (\text{berechnet: } 659,45175)$$

Die UV-Spektren der neuen Verbindungen ähneln dem charakteristischen UV-Spektrum der Spirangiene, sind aber 30 nm hypsochrom verschoben (vergleiche Abbildung 4.17 b). Vermutlich handelt es sich bei den Verbindungen um verkürzte Spirangien-Derivate.

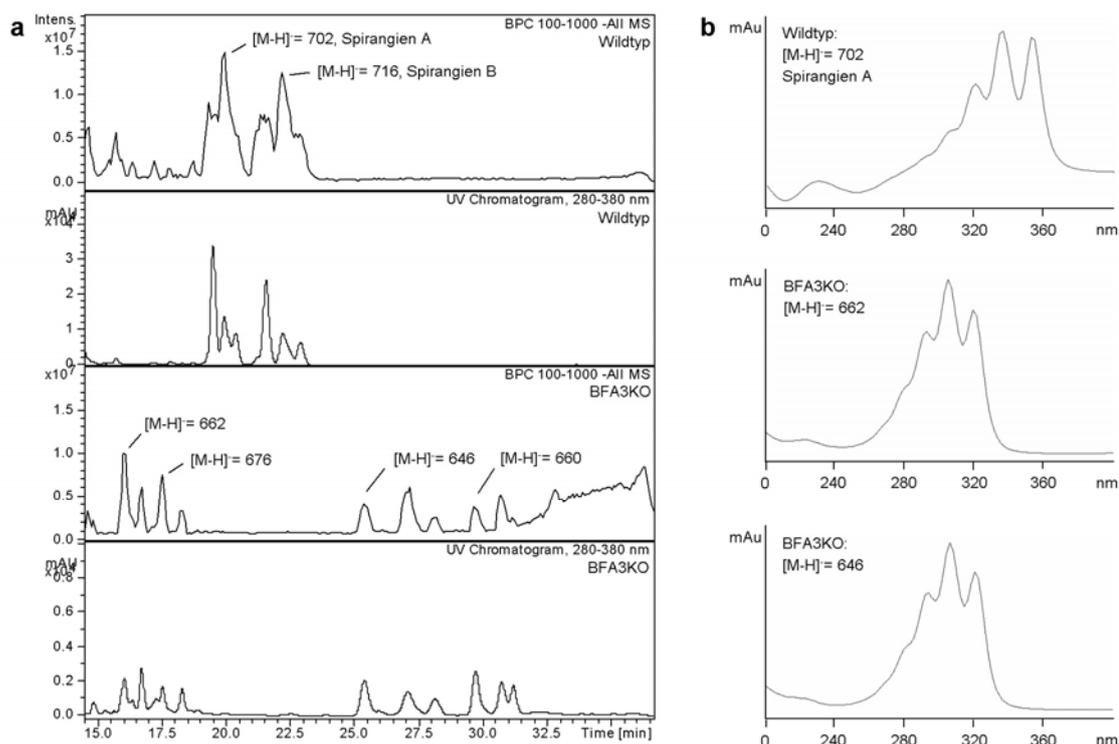


Abbildung 4.17:

**HPLC-MS-UV/VIS-Analyse des Wildtypen und der Mutante BFA3KO (a) und UV-Spektren von Spirangien A und der neuen Verbindungen (b).** BPC steht für „base peak chromatogram“, dargestellt ist die Intensität des stärksten (negativ geladenen) Ions im Spektrum zum jeweiligen Zeitpunkt (b). mAu= Milliabsorptionseinheiten (b).

### 4.3.2 Fütterungsversuch zur Strukturaufklärung der Derivate

Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse der Mutante BFA3KO lassen vermuten, dass es sich bei den neuen Spirangien der Mutante um (verkürzte) Desmethylderivate handeln könnte (5.5.1). Deshalb wurde die Mutante parallel zum Wildstamm unter Zusatz von L-[Methyl-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-methionin kultiviert. Im Extrakt des Wildstammes wurden bei der HPLC-MS-Analyse Massenverschiebungen von +3 und +6 Masseneinheiten von Spirangien A und B detektiert, entsprechend einer bzw. zwei aus L-[Methyl-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-methionin stammenden eingebauten Methylgruppen. Im Extrakt der Mutante konnte jeweils nur eine Massenverschiebung der neuen Derivate um +3 Masseneinheiten detektiert werden.

BFA3KO wurde im 10 l Maßstab unter XAD-Zusatz in Produktionsmedium kultiviert, zur Zeit werden die neuen Derivate aus dieser Kultur aufgereinigt und per NMR strukturell aufgeklärt.

### 4.3.3 Genotypische Charakterisierung der Mutante BFA3KO

Es wurde vermutet, dass eine Rekombination bzw. Mutation im Spirangien-Biosynthesegencluster die Ursache für die Produktion von verkürzten Spirangien-Derivaten der Mutante ist, und nicht die Inaktivierung von *deoRB*. Als Ort einer

möglichen Deletion oder Mutation wurde der Bereich von *spiHIJ* angenommen (siehe 5.5).

#### 4.3.3.1 PCR-Analytik

Der Bereich von *spiH*, in dem eine Deletion oder Mutation vermutet wurde, kodiert Modul 9 (vergleiche 5.5). Dieser Sequenzbereich wurde in mehreren Fragmenten von genomischer DNA der Mutante BFA3KO amplifiziert und nach Klonierung in pCR2.1Topo sequenziert (vergleiche Tabelle 4.3). Allerdings konnte weder eine Deletion noch eine Mutation gegenüber der Wildtyp-Sequenz festgestellt werden.

**Tabelle 4.3: Amplifizierte und sequenzierte Fragmente von *spiH* aus der Mutante BFA3KO**

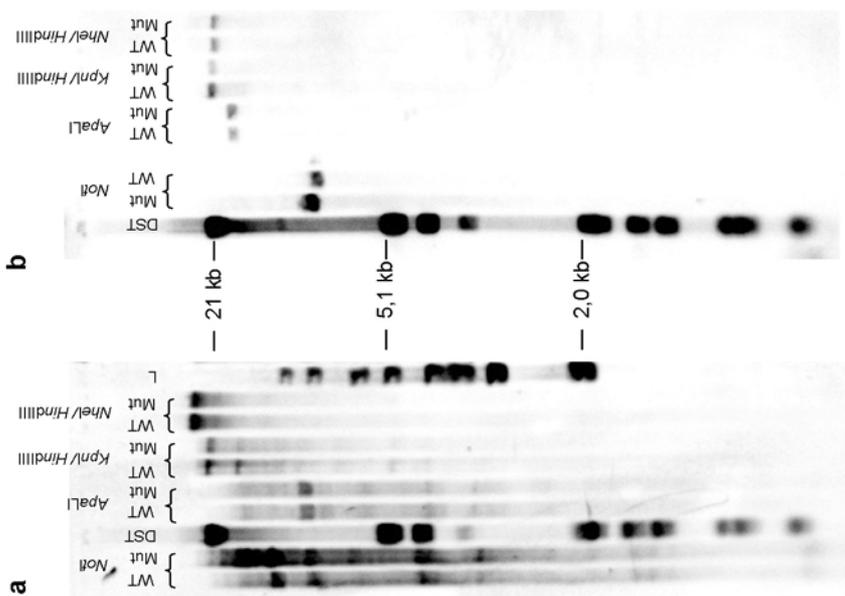
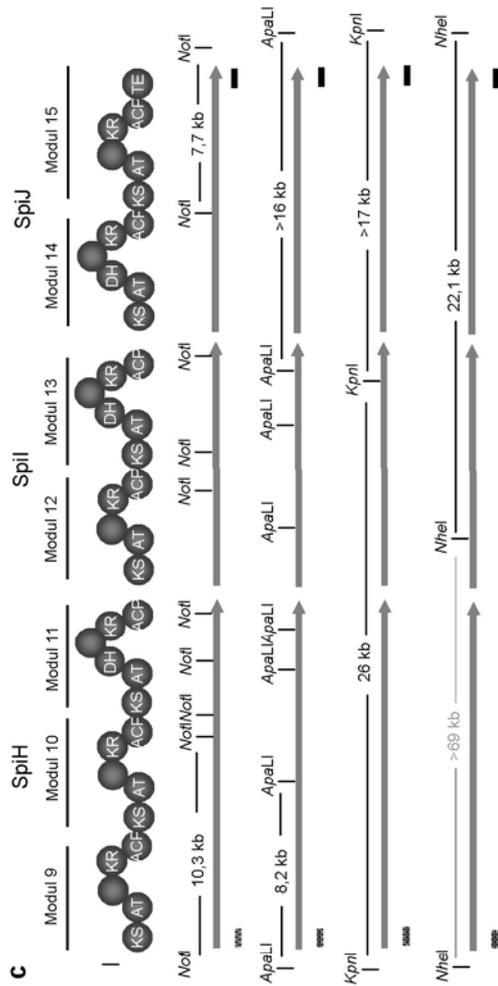
| Oligonukleotide | Amplifikatgröße [bp] | resultierendes Plasmid | kodierter Bereich von Modul 9 |
|-----------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| BF_SH1/BF_SH9   | 952                  | pSH19                  | KS (Teil)                     |
| BF_SH2/BF_SH10  | 820                  | pSH210                 | KS (Teil)                     |
| BF_SH3/BF_SH4   | 951                  | pSH34                  | AT                            |
| BF_SH7/BF_SH8   | 1080                 | pSH78                  | Linker-Region                 |
| BF_SH16/BF_SH11 | 665                  | pTopoSC                | KR                            |
| BF_SH14/BF_SH15 | 519                  | pSH2                   | ACP und Bereich davor         |

#### 4.3.3.2 Southern-Blot Analytik

Auch eine Mutation oder Deletion im 5'-Sequenzbereich des Spirangien-Biosynthesegenclusters kann die Produktion verkürzter Spirangiene verursachen. Genomische DNA der Mutante BFA3KO und des Wildstammes *S. cellulorum* So ce90A1 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NotI*, *ApaLI*, *KpnI/HindIII* und *NheI/HindIII* hydrolysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde mit verschiedenen DIG markierten Fragmenten aus dem Spirangien-Biosynthesegencluster hybridisiert (vergleiche Abbildung 4.18). Als Sonden dienten ein Teil der KS von Modul 9 kodierenden Region von *spiH* und die Region von *spiJ*, welche die terminale TE-Domäne kodiert. Wenn in der Mutante eine größere Deletion (mindestens 1 kb) im Bereich des hybridisierenden Fragmentes stattgefunden hätte, würde sich das hybridisierende Fragment der Mutanten-DNA von dem der Wildstamm-DNA in der Größe unterscheiden. In allen Fällen waren jedoch die hybridisierenden Fragmente von Mutanten- und Wildstamm-DNA gleich groß, so dass eine größere Deletion in dem Bereich von *spiH* bis *spiJ* ausgeschlossen werden kann, der nach den durchgeführten Restriktionen mit den Sonden hybridisiert.

**Abbildung 4.18: Southern Blot Analytik der Mutante BFA3KO im Vergleich zum Wildstamm nach Hydrolyse mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen.**

a) Sonde: KS kodierende Sequenz von *spiH1* (Modul 9) b) Sonde: TE kodierende Sequenz von *spiJ2* (Modul 15). Aufgrund unspezifischer Hybridisierung sind auch die Fragmente des nicht-DIG-markierten DNA-Größenstandards zu sehen. In c) ist die Lage der erwarteten Fragmente nach Restriktion mit *NotI*, *ApaLI*, *KpnI/HindIII* und *NheI/HindIII* dargestellt, zusätzlich sind die erwarteten Fragmentgrößen und die Positionen der entscheidenden Schnittstellen in tabellarischer Form angegeben. Die hydrolysierte DNA der Mutante hybridisiert wie die hydrolysierte Wildstamm-DNA.



DST= DIG markierter DNA-Größenstandard  
 WT= Wildstamm *S. cellulosum* So ce90A1  
 Mut= Mutante BFA3KO

\**HindIII* schneidet nicht in der bekannten Sequenz

| a: Sonde <sup>59857</sup><br>KS Modul 9<br>Restriktion mit  | Erwartetes<br>Fragment bei<br>WT-Sequenz | Signal Mut = WT: Eine mögliche<br>Deletion (im Bereich der Module 9-<br>14) fand hinter dieser Position (bp im<br>Cluster) statt | Entspricht<br>Bereich hinter |
|---|--|--|------------------------------|
| <i>NotI</i>   | 10,3 kb                                  | 59.857   | KR Modul 10                  |
| <i>ApaLI</i>  | 8,2 kb                                   | 57.426   | KS Modul 10                  |
| <i>KpnI/ HindIII*</i>                                       | 26 kb                                    | 74.179   | DH Modul 13                  |
| <i>NheI/ HindIII*</i>                                       | > 69 kb                                  | nicht auswertbar   |                              |
| b: Sonde <sup>81773</sup><br>TE Modul 15<br>Restriktion mit | Erwartetes<br>Fragment bei<br>WT-Sequenz | Signal Mut = WT: Eine mögliche<br>Deletion (im Bereich der Module 9-<br>14) fand vor dieser Position (bp im<br>Cluster) statt    | Entspricht<br>Bereich vor    |
| <i>NotI</i>   | 7,7 kb                                   | 81.773   | KS Modul 15                  |
| <i>ApaLI</i>  | > 16 kb                                  | 75.186   | ACP Modul 13                 |
| <i>KpnI/ HindIII*</i>                                       | > 17 kb                                  | 74.179   | KR Modul 13                  |
| <i>NheI/ HindIII*</i>                                       | 22,1 kb                                  | 68.844   | Linker Modul 12              |



## 5 Diskussion

### 5.1 Aurafuron-Biosynthese in *S. aurantiaca* DW4/3-1

Die Aurafurone A und B (letzteres als (8Z) und (8E)-Diastereoisomer, Abbildung 5.4) wurden aus den Myxobakterien *Archangium gephyra* Ar 10844 und *S. aurantiaca* DW4/3-1 isoliert und strukturell aufgeklärt (26). Das zugehörige Biosynthesegencluster wurde bei dem Screening einer genomischen Cosmidbank von *S. aurantiaca* DW4/3-1 mit KS-kodierenden Sequenzen identifiziert (47) und von zwei Cosmiden und einem ausklonierten Plasmid sequenziert. Das Biosynthesegencluster kodiert sechs PKS und vier Oxidoreduktasen, welche vermutlich Post-PKS-Reaktionen katalysieren. Stromaufwärts des Biosynthesegenclusters liegen vier weitere Gene *orf-1234*, welche vermutlich nicht oder zumindest nicht direkt an der Aurafuron-Biosynthese beteiligt sind (Abbildung 3.1).

#### 5.1.1 PKS-Biosynthese

Die sechs PKS AufCDEFGI beinhalten zusammen sieben Module für die Einführung von Verlängerungseinheiten und ein kombiniertes Lade- und Verlängerungsmodul. Die Domänen-Organisation des kombinierten Lade- und Verlängerungsmoduls AufI ( $ACP_L$ -KS- $AT_L$ -AT-...-ACP) weicht vom üblichen Schema ab ( $ACP_L$ - $AT_L$ -KS-AT-...-ACP, vergleiche Abbildung 1.5), kann aber auch in einigen anderen myxobakteriellen PKS gefunden werden, wie z. B. der Myxalamid-, Myxothiazol-, Stigmatellin- und Soraphen-PKS (48-51). Die Zuordnung der anderen PKS zu den einzelnen Biosyntheseschritten ist weniger eindeutig. Fütterungsversuche mit  $[1-^{13}C]$ ,  $[2-^{13}C]$ - und  $[1,2-^{13}C]$ Acetat, sowie  $[1-^{13}C]$ - und  $[2-^{13}C]$ Propionat und  $[D_{10}]$ -DL-Leucin zeigten, dass das Polyketidgerüst aus drei (aus Acetat stammenden) Malonyl-CoA-Einheiten und vier (aus Propionat stammenden) Methylmalonyl-CoA-Einheiten aufgebaut wird (H. Bode, persönliche Mitteilung). Die Startereinheit ist wie in der Myxothiazol- Biosynthese (49) Isovaleryl-CoA, welches aus Leucin stammt (vergleiche Abbildung 5.1, (79)).

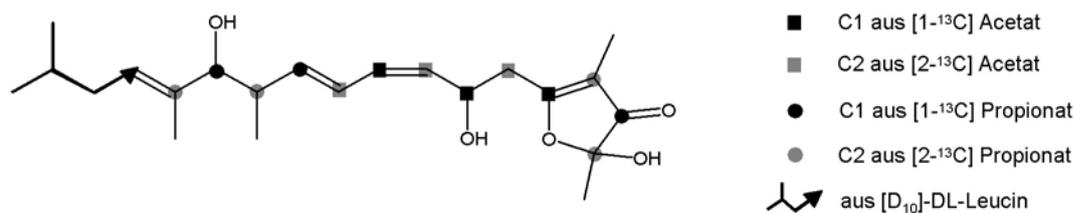


Abbildung 5.1: **Einbau von markierten Biosynthesevorstufen in Aurafuron A**  
(H.B. Bode und R. Müller, unpublizierte Daten)

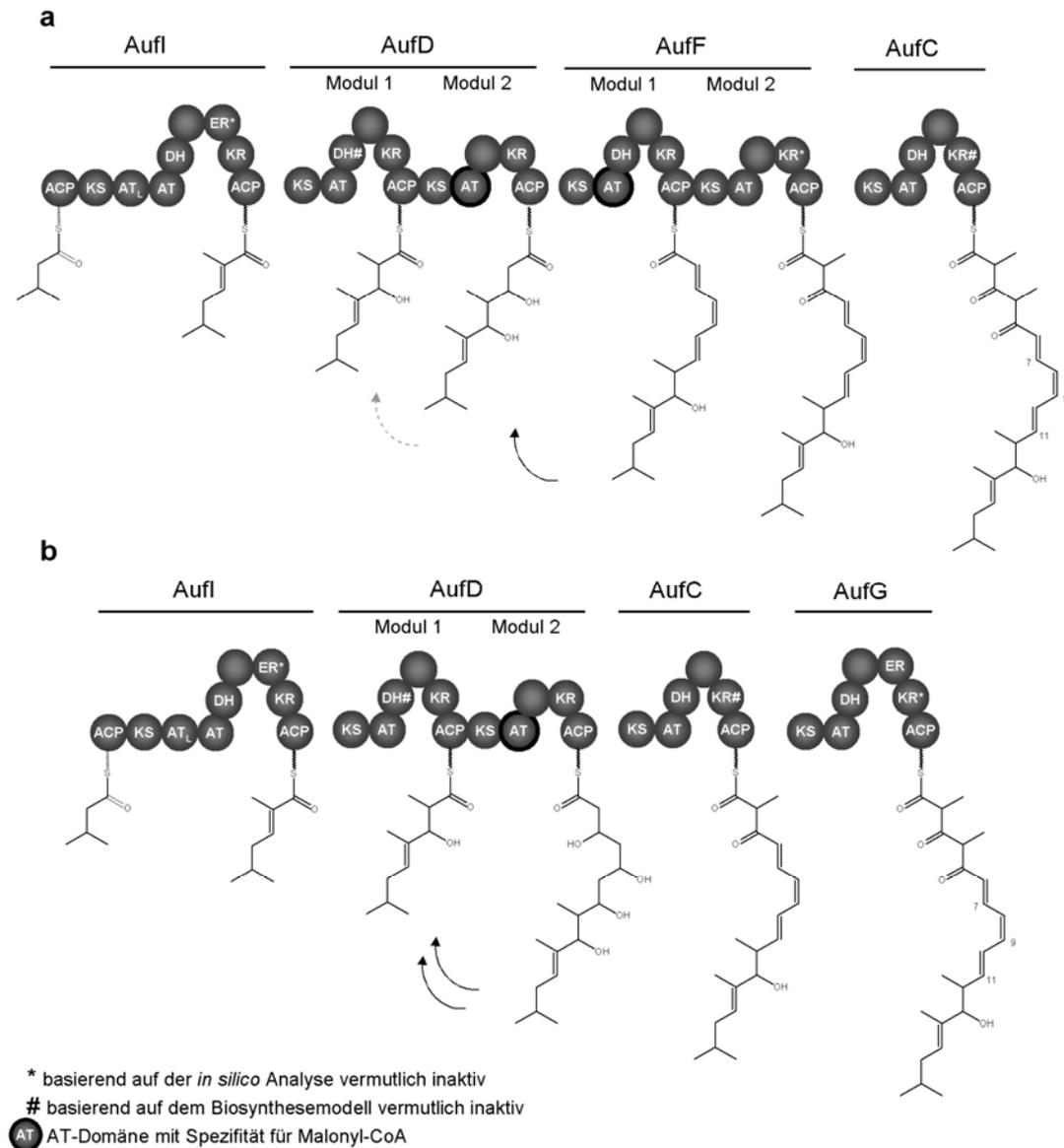
Der Starter Isovaleryl-CoA wird mit insgesamt sieben Acetat- bzw. Propionat-Einheiten verlängert, in der Aurafuron PKS sind aber acht Module für die Einführung von Verlängerungseinheiten vorhanden. Eines dieser acht Module scheint folglich nicht an der Biosynthese beteiligt zu sein. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Modul um AufE, da mehrere Domänen von AufE Mutationen in den konservierten Motiven aufweisen und somit vermutlich inaktiv sind. Die AT-Domäne z. B. scheint verkürzt und enthält keinen der konservierten Reste, die für Methyl- oder Methylmalonyl-CoA transferierende AT-Domänen beschrieben sind (Abbildung 3.3, (55;56)). Ungewöhnlicherweise ist in AufE auch eine ER-, aber keine DH-Domäne vorhanden. Um die Funktionen der anderen Module in der Aurafuron-Biosynthese zuzuordnen, wurde die Substratspezifität der AT-Domänen analysiert. Dazu wurde die Präsenz eines Serin-Restes in einem YASH-Motiv bzw. die Präsenz eines Phenylalanin-Restes in einem HAFH-Motiv untersucht. Der Serin-Rest scheint spezifisch zu sein für Methylmalonyl-CoA transferierende AT-Domänen, der Phenylalanin-Rest für Malonyl-CoA transferierende AT-Domänen (55). Diese Reste können genutzt werden, um die Spezifität neu sequenzierter AT-Domänen vorherzusagen. Von den AT-Domänen der Aurafuron PKS weisen fünf den konservierten Serin-Rest auf (die AT-Domänen von AufC, AufD1, AufF2, AufG und AufI) und zwei den konservierten Phenylalaninrest (AufD2 und AufF1). Die verbleibenden beiden AT-Domänen selektieren die Startereinheit Isovaleryl-CoA (Auf<sub>L</sub>) bzw. sind wahrscheinlich inaktiv (AufE). Da bei der Aurafuron-Biosynthese drei Malonyl-CoA-Einheiten eingebaut werden, aber nur zwei Verlängerungsmodule AT-Domänen mit entsprechender Spezifität aufweisen, wird eines dieser beiden Module AufD2 und AufF1 höchstwahrscheinlich iterativ genutzt.

Die iterative Nutzung einzelner Module in modularer Typ I PKS ist bereits beschrieben worden (37). Das Vorkommen geringer Mengen an Nebenprodukten der 6-DEB und Epothilon-Biosynthese, deren Polyketidkette um eine Propionat- bzw. Acetat-Einheit länger ist als die der Hauptprodukte, wird auf ein „Stottern“ einzelner Module während der Biosynthese zurückgeführt (37;80;81). Demgegenüber steht die programmierte iterative Nutzung eines einzelnen Moduls in der Biosynthese einer Verbindung, welche erstmals für die Stigmatellin-Biosynthese postuliert wurde (50) und nachfolgend auch für weitere modulare PKS beschrieben worden ist (82;83). Experimentelle Daten liegen

für die Borrelidin- und Aureothin-PKS vor. Um auszuschließen, dass nicht-stöchiometrische Mengen der Borrelidin-PKS-Module die Ursache für die Diskrepanz zwischen vorhandenen Modulen in der PKS und genutzten Verlängerungseinheiten sind, wurde das entsprechende Modul BorA5 auf genetischer Ebene mit dem Folgemodul BorA6 fusioniert. Die manipulierte PKS produzierte weiterhin Borrelidin, was auf eine programmierte iterative Nutzung von BorA5 schließen lässt (82). Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Fusion des iterativ genutzten Modules AurA mit AurB in der Aureothin-Biosynthese erhalten (84). Um experimentelle Hinweise für die iterative Nutzung von AufD2 oder AufF1 in der Aurafuron-Biosynthese zu erhalten, sollten die KR-Domänen dieser Module unabhängig voneinander inaktiviert werden. Sollten neue Ketoderivate entstehen, könnten abhängig von Ort und Ausmaß der Ketoreduktion die jeweiligen Biosyntheseschritte den manipulierten Modulen zugeordnet werden. Um die KR-Domänen zu inaktivieren ohne Einfluss auf die Struktur der weiteren Domänen zu nehmen, sollte der Tyrosin-Rest des konservierten S-Y-N Motives gegen einen Phenylalanin-Rest ausgetauscht werden (Abbildung 3.5). Diese Substitution führte zum Verlust der Aktivität von KR-Domänen in der DEBS und der Geldanamycin PKS und zur Produktion der entsprechenden unreduzierten Polyketide (57;85). Nach Inaktivierung der KR-Domäne von AufD2 (Y3189F) produzierte die Mutante BFAKR3-3 kein Aurafuron A und B mehr; neue Derivate konnten jedoch nicht detektiert werden. Möglicherweise wird die veränderte Polyketidkette von den nachfolgenden Modulen nicht weiter prozessiert. Dieses Ergebnis erlaubt keine Zuordnung von AufD2 zu einzelnen Biosyntheseschritten anhand fehlender Ketoreduktion, es zeigt aber, dass AufD2 an der Biosynthese beteiligt sein muß. Eine markerlose Mutante von AufF1 konnte trotz intensiven Bemühens nicht generiert werden. Die entsprechende Erstcrossover-Mutante BFAKR5-2 wurde über Monate ohne Selektionsdruck passagiert und wiederholt auf Toleranz gegenüber dem Gegenselektionsmarker Saccharose getestet (zum Prinzip der markerlosen Mutagenese durch Saccharose-Gegenselektion vergleiche Abbildung 3.3), alle erhaltenen Klone erwiesen sich jedoch als Spontanmutanten.

Da die drei eingebauten Malonyl-CoA-Einheiten in der Biosynthese direkt aufeinander folgen, lassen sich für die Beteiligung von AufD2 an der Aurafuron-Biosynthese drei verschiedene Hypothesen aufstellen: Die Kettenverlängerung durch AufD2 kann einer Kettenverlängerung durch AufF1 folgen (1. Szenario) oder ihr vorausgehen (2. Szenario), dabei würde eines der beiden Module zweimal genutzt werden. Es ist auch möglich, dass AufD2 dreimal genutzt wird und AufF1 gar nicht an der Biosynthese beteiligt ist (3. Szenario) (Abbildung 5.2). In dem ersten Szenario wird die wachsende Polyketidkette nach Einbau von zwei Einheiten Methylmalonyl-CoA erst von AufF1 verlängert, direkt darauf erfolgt die Kettenverlängerung durch AufD2. Das würde bedeuten, dass die jeweils genetisch fusionierten Module AufF2 (welches C-terminal von AufF1 auf dem gleichen Protein AufF liegt) und AufD1 (welches N-terminal von AufD2 auf dem gleichen Protein AufD liegt) beide, und zwar hintereinander, übersprungen werden. Es sind einige wenige Biosynthesen beschrieben, in denen ein

komplettes Modul reproduzierbar übersprungen wird. In der Myxochromid S-Biosynthese wird das (NRPS) Modul 4 übersprungen, was auf das Fehlen des konservierten Serin-Restes im Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) zurückzuführen ist (86). In einer rekombinanten DEBS, in welche das Modul 2 der Rapamycin PKS insertiert wurde, wird dieses zusätzliche Modul übersprungen, so dass aus der Biosynthese vor allem ein Heptaketid hervorgeht anstatt eines (in geringen Mengen ebenfalls gebildeten) Oktaketides (87). In beiden Fällen jedoch ist das übersprungene Modul auf dem gleichen Protein gelegen wie das in der Biosynthese vorhergehende und nachfolgende Modul. Es erscheint unwahrscheinlich, dass zwei PKS über inaktive Module interagieren, die zwar die räumliche Assoziation der biosynthetischen Partnerproteine gewährleisten, aber bei der Biosynthese jeweils übersprungen werden. Im zweiten Szenario verlängert nach AufI und AufD1 erst AufD2 die wachsenden Polyketidkette um eine oder zwei Malonyl-CoA-Einheiten. Im Anschluß daran folgt die Kettenverlängerung durch AufF1 mit den fehlende(n) Malonyl-CoA-Einheit(en) (vergleiche Abbildung 5.2 a). Die AT-Domäne des C-terminal folgenden Moduls AufF2 transferiert nach *in silico* Analyse Methylmalonyl-CoA, die KR-Domäne des Moduls ist inaktiv (es fehlt das komplette S-Y-N Motiv). Aus einer weiteren Kettenverlängerung durch AufF2 würde deshalb eine Ketogruppe an C5 resultieren, was mit dem biosynthetischen Modell der Furanonbildung übereinstimmt (vergleiche 5.1.2). Der nächste Verlängerungsschritt müsste durch AufC erfolgen. Für AufC wurde bereits eine Beteiligung an an der Biosynthese nachgewiesen; die Inaktivierung der KS-kodierenden Sequenz führte zum Ausfall der Aurafuronproduktion und der Zuordnung des Biosynthesegenclusters zum Produkt (47). In diesem (zweiten) Szenario wäre *aufF* im Cluster von zwei Genen *aufE* und *aufG* umgeben, welche für inaktive Proteine kodieren. Im dritten Szenario (vergleiche Abbildung 5.2 b) ist AufF nicht an der Biosynthese beteiligt und AufD2 verlängert die Polyketidkette um alle drei Einheiten Malonyl-CoA, gefolgt von AufC und folgend auf AufD1. Die Tatsache, dass das essentielle *aufC* auf *aufD* in einem Operon folgt, mag als Hinweis auf dieses Biosynthesemodell gesehen werden. Die letzte Verlängerungseinheit würde durch AufG eingeführt, dessen Translation mit der der Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase AufH und der Starter PKS AufI gekoppelt zu sein scheint. Leider konnte keine markerlose KR-Mutante von AufF1 generiert werden, die dieses dritte Biosynthesemodell bestätigen (oder ausschließen) könnte: trifft das dritte Modell zu, wäre keine Effekt dieser Mutagenese auf die Aurafuron-Produktion zu erwarten.



**Abbildung 5.2: Biosynthesehypothesen für das Aurafuron-Polyketidgerüst.** Nur die AT-Domänen von AufD2 und AufF1 transferieren nach *in silico* Analyse Malonyl-CoA, die anderen AT-Domänen transferieren Methylmalonyl-CoA bzw. Isovaleryl-CoA (AufI<sub>L</sub>). In (a) (zweites Szenario, siehe Text) folgt AufF1 auf AufD2 in der Biosynthese und eines der beiden Module wird iterativ genutzt (Pfeil bzw. durchbrochener Pfeil). Im dritten Szenario (b) agiert AufD2 iterativ und führt alle drei Einheiten Malonyl-CoA ein, AufF1 ist in diesem Modell nicht an der Aurafuron-Biosynthese beteiligt. Linker-Regionen sind durch unbeschriftete Kugeln dargestellt.

Üblicherweise sind in einem Typ I PKS Biosynthesegencluster mehrere PKS kodiert. Die Proteine sind in einer definierten Reihenfolge katalytisch aktiv und aus der Polyketidbiosynthese resultiert ein definiertes Produkt. Bei der Erkennung der korrekten Biosynthesepartnerproteine spielen Regionen C-terminal der ACP- und N-terminal der KS-Domänen eine wichtige Rolle, sogenannte „Docking“-Domänen (35). In diesen Regionen wurden neben konservierten Resten, die vermutlich für die Ausbildung der

Sekundärstruktur wichtig sind, auch Positionen beschrieben, welche für die spezifische Interaktion mit den Partnerproteinen wichtig sein könnten (88;89). Es wurde versucht, anhand der Reste in den entsprechenden Positionen der Aurafuron PKS und dem generellen Vergleich der Docking-Domänen Hinweise auf die Interaktionen der PKS untereinander und damit auf die Reihenfolge in der Biosynthese zu erhalten. Die beschriebenen Motive konnten zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt), eine eindeutige Aussage über mögliche biosynthetische Partner konnte aber nicht getroffen werden. An der spezifischen Interaktion von PKS sind vermutlich auch noch andere Regionen beteiligt (35;88), und dieses für die Biokombinatorik wichtige Thema wird sicher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

In den beiden letzten Biosynthesemodellen (Abbildung 5.2 a, b) ist die DH-Domäne von AufD1 scheinbar überflüssig (es findet keine Dehydratation statt), während in Modul AufD2 nach dem Prinzip der Kolinearität eine DH-Domäne fehlt (es findet eine Dehydratation statt). Die DH-Domäne von AufD1 zeigt das konservierte Motiv dieser Domänen (30), ist aber möglicherweise aufgrund von Substitutionen bisher biochemisch nicht charakterisierter Reste inaktiv. Die fehlende Aktivität einer DH-Domäne in AufD2 könnte durch DH-Domänen anderer Module komplementiert werden, z. B. der von AufF1 oder AufC im zweiten Szenario oder der von AufC oder AufG im dritten Szenario. Für die DH-Domäne von Modul 5 in der Epothilon Hybrid-NRPS/PKS konnte experimentell gezeigt werden, dass sie iterativ in der Biosynthese agiert (90). Auch für weitere myxobakterielle DH-Domänen wird eine *in trans* Aktivität außerhalb des entsprechenden Biosynthesemodules postuliert, nämlich in der Stigmatellin-, Chivosazol- und auch der Spirangien-Biosynthese ((50;91), 5.3.1). Möglicherweise wird die Dehydratation auch durch die Monooxygenase AufJ katalysiert. Dieses Enzym zeigt (unter anderem, siehe unten) Ähnlichkeit zu JadH, welches an der Jadomycin-Biosynthese in *Streptomyces venezuelae* beteiligt ist und dabei höchwahrscheinlich bifunktional als Dehydratase und Oxygenase agiert ((92;93), siehe unten).

Aurafuron A und B zeigen eine *Z*-Doppelbindung an C8/9, von Aurafuron B ist in geringen Mengen auch das *8E*-Isomer isoliert worden (26). Häufig korreliert die Präsenz eines Aspartat-Restes an Position 94 von KR-Domänen (58) mit der Bildung einer *D*-konfigurierten Hydroxylgruppe und nach Dehydratation durch nachfolgende DH-Domänen entsteht eine *E*-Doppelbindung (*A/B*-Regel, (57;58;94)). Die intermediär entstehenden Ketogruppen an C11, C9 und C7 werden aller Wahrscheinlichkeit nach von den KR-Domänen von AufD2 und/oder AufF1 reduziert, welche beide den beschriebenen Aspartat-Rest aufweisen. Von den drei abgeleiteten Doppelbindungen liegen die beiden äußeren in *Z*-Konformation und die mittlere in *E*-Konformation vor. Die Aurafuron-Biosynthese ist damit neben der Chivosazol- und anderen Biosynthesen (91) ein weiteres Beispiel, in dem diese Regel nicht anwendbar ist.

Überraschenderweise ist im Aurafuron-Biosynthesegencluster keine terminale TE-Domäne kodiert, welche üblicherweise die Freisetzung der fertig prozessierten

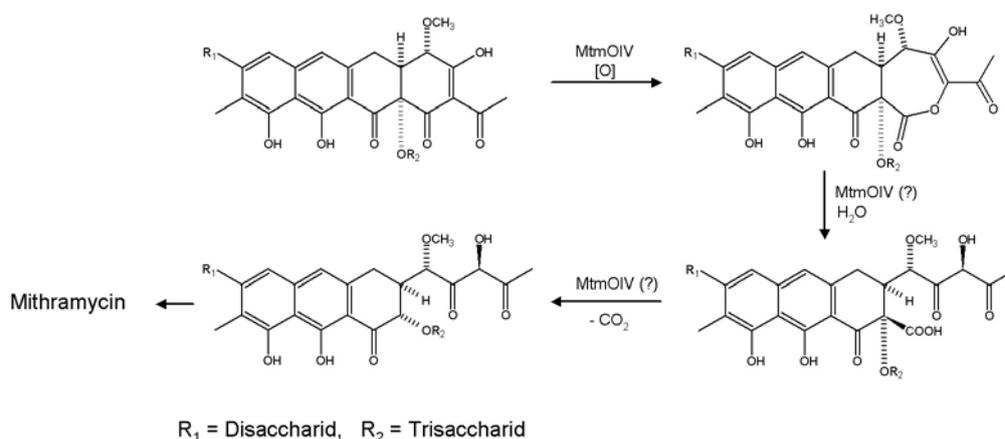
Polyketidkette vom Multienzymkomplex katalysiert (33). Die PKS für den Polyether Nanchangmycin und das nah verwandte Monensin weisen ebenfalls keine TE-Domänen auf. In diesen beiden Fällen wird die Freisetzung der Polyketidkette durch eine diskrete  $\alpha,\beta$ -Hydrolase katalysiert (NanE bzw. MonCII), die ebenfalls in den Biosynthesegenclustern kodiert ist (95;96). Ein solches Enzym ist im Aurafuron-Biosynthesegencluster oder in dessen Nähe nicht kodiert. Möglicherweise ist eine der vier Oxidoreduktasen an der Freisetzung der Polyketidkette beteiligt (siehe unten).

### 5.1.2 Post-PKS Biosynthese

Im Aurafuron-Biosynthesegencluster sind drei Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen AufA, AufB und AufH und eine Monooxygenase AufJ kodiert. Durch Mutagenesen in den kodierenden Bereichen sollte untersucht werden, inwieweit diese Enzyme an Post-PKS Reaktionen wie der Bildung der Furanongruppe beteiligt sind. Alle vier Oxidoreduktasen wurden unabhängig voneinander inaktiviert, AufB durch Insertionsmutagenese, AufAHJ durch markerlose „in frame“-Deletionen eines etwa 300 bp großen Bereiches. Keine der vier Mutanten BFAPA (Inaktivierung von *aufA*), BFABK (Inaktivierung von *aufB*), BFAPC2-3 (Inaktivierung von *aufH*) und BFAMD (Inaktivierung von *aufJ*) produzierte Aurafuron A und B, alle Oxidoreduktasen sind demzufolge an der Aurafuron-Biosynthese beteiligt.

Die Furanongruppe wird vermutlich durch eine komplexe Folge von Biosyntheseschritten gebildet, und es ist schwierig, anhand von Homologievergleichen eine Zuordnung der vier Oxidoreduktasen zu einzelnen Biosyntheseschritten vorzunehmen. Das in dieser Hinsicht am Besten zu charakterisierende Post-PKS-Enzym ist die Monooxygenase AufJ. AufJ zeigt Ähnlichkeit zu MtmOIV aus *Streptomyces argillaceus* (27% identische und 38% ähnliche Aminosäuren über die gesamte Proteinelänge, (66)). Wie experimentell gezeigt werden konnte, agiert dieses Enzym als Baeyer-Villiger-Oxygenase in der Mithramycin-Biosynthese. MtmOIV führt ein Sauerstoffatom in eine C-C Bindung der Biosynthesevorsufe Premithramycin B (ein Cyclohexanonderivat und PKS II Produkt) ein. Auf diese Reaktion folgt eine Ringöffnung und nachfolgend eine Decarboxylierung (Abbildung 5.3, (67)). Orthologe Gene zu *aufJ* sind auch *orf8* und *orf13* aus zwei Biosynthesegenclustern aus *Streptomyces aculeolatus* NRRL 18422 und *Streptomyces* sp. Eco86, welche von Banskota *et al.* beschrieben wurden (68). Die zugeordneten Biosyntheseprodukte E-837 und E-492/E-875 sind Aurafuron A erstaunlich ähnlich und weisen eine gleiche bzw. sehr ähnliche Furanongruppe auf (vergleiche Abbildung 5.4). Basierend auf der Homologie zu MtmOIV stellen die Autoren eine (Post-PKS) Biosynthesehypothese auf, die eine Baeyer-Villiger Oxidation einschließt. In diesem Reaktionsweg wird das sechsgliedrige Laktonderivat, welches vermutlich nach Abspaltung des Polyketidgerüsts von der PKS durch eine TE-Domäne resultiert, am  $\alpha$ -Kohlenstoff hydroxyliert (vergleiche dazu Abbildung 5.5). Danach wird in einer Baeyer-Villiger ähnlichen Reaktion ein Sauerstoffatom in eine C-C Bindung eingeführt, so dass ein Kohlensäurediester-Derivat entsteht. Dieses Kohlensäurediester-Derivat wird oxidativ

gespalten, wobei der Kohlensäure-Kohlenstoff verloren geht. Die entstehende Triketonstruktur reagiert schließlich zum Furanon-Endprodukt, dabei greift die Hydroxylgruppe an C5 des tautomeren Enols am C2 Carbonylkohlenstoff an. Der Reaktionsweg ist in Abbildung 5.5 A adaptiert an Aurafuron abgebildet. Experimentelle Belege für diese Biosynthesehypothese existieren nicht, aber ein Baeyer-Villiger Oxidationsschritt in der Biosynthese der Aurafuron-ähnlichen Strukturen scheint gut vorstellbar. Ein weiteres Enzym, welches Ähnlichkeit zu AufJ zeigt, ist JadH aus der Jadomycin-Biosynthese in *Streptomyces venezuelae* (für einen Sequenzvergleich der diskutierten Enzyme vergleiche Abbildung 5.6). JadH ist wahrscheinlich (zusammen mit zwei weiteren Enzymen, eines davon ist JadH sehr ähnlich) an der oxidativen Öffnung eines der vier Ringe der Angucyclin-Intermediate beteiligt. JadH katalysiert außerdem auch eine Dehydratation der hydroxylierten Ringstrukturen (92;93). Möglicherweise ist auch AufJ bifunktional und sowohl an einer oxidativen Ringkontraktion, als auch an der Einführung des konjugierten Doppelbindungssystems beteiligt. Seit kurzem sind Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen beschrieben, die Baeyer-Villiger Oxidationen durchführen (97;98). An einer entsprechenden Reaktion in der Aurafuron-Biosynthese könnte auch eine der Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen beteiligt sein, möglicherweise zusätzlich zu AufJ. In der Jadomycin-Biosynthese sind drei Oxidoreduktasen an der oxidativen Ringöffnung beteiligt, darunter zwei potentielle Baeyer-Villiger Oxygenasen. Die Funktionen dieser Enzyme scheinen unmittelbar voneinander abzuhängen, die Inaktivierung jedes dieser Enzyme führt dazu, dass die oxidative Ringöffnung nicht mehr stattfindet (92).



**Abbildung 5.3: Durch MtmOIV katalysierte Reaktionen der Mithramycin-Biosynthese.** MtmOIV führt in einer Baeyer-Villiger Oxidation ein Sauerstoffatom in eine C-C Bindung des vierten Ringes der Biosynthesevorstufe Premithramycin B (oben links) ein. Nachfolgende Reaktionen schließen eine Hydrolyse des entstandenen Laktons und eine Decarboxylierung mit ein.

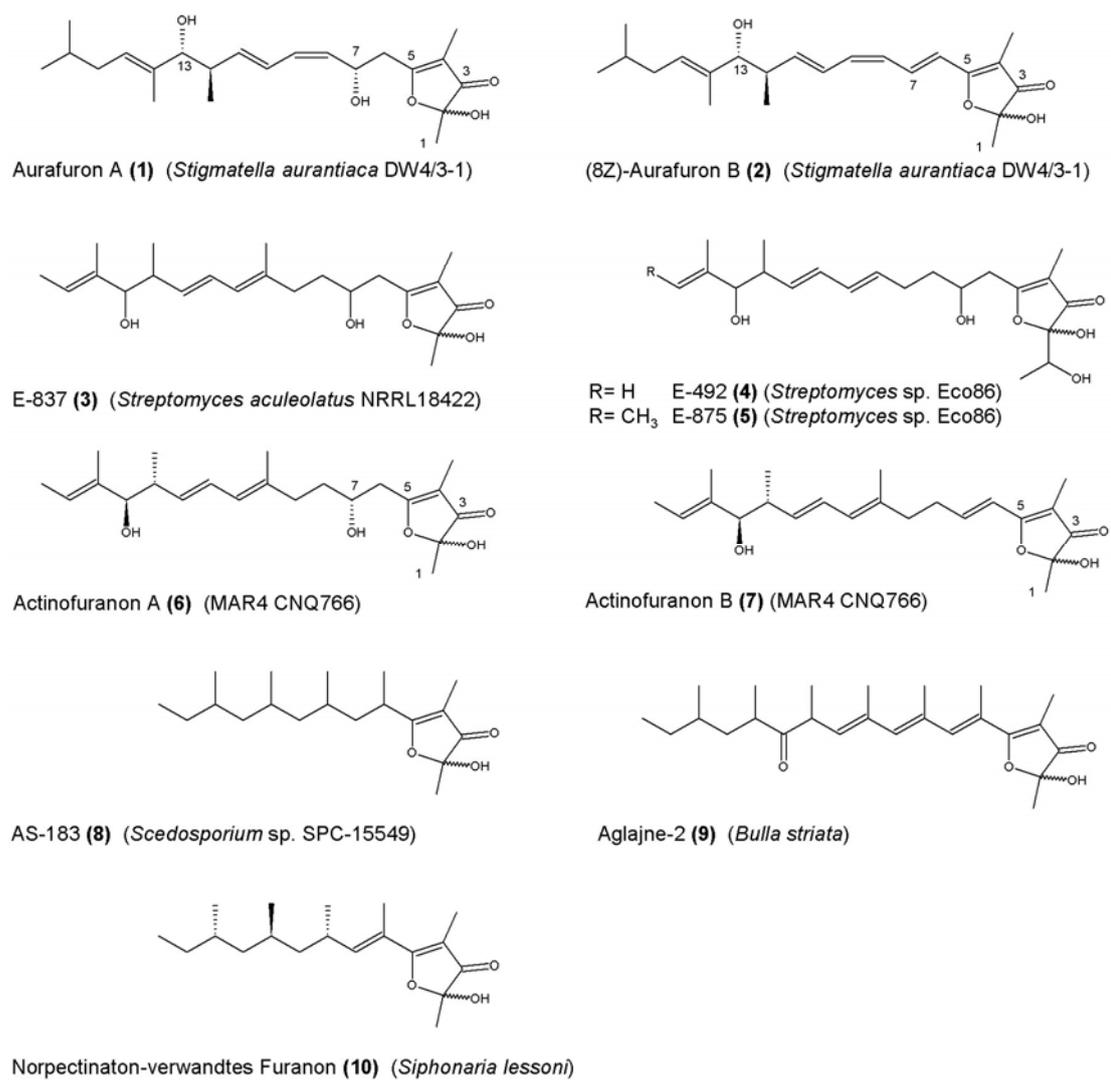


Abbildung 5.4: Aurafuron A, B und verwandte Strukturen.

In Klammern sind die Organismen angegeben, aus denen die Verbindungen isoliert wurden.

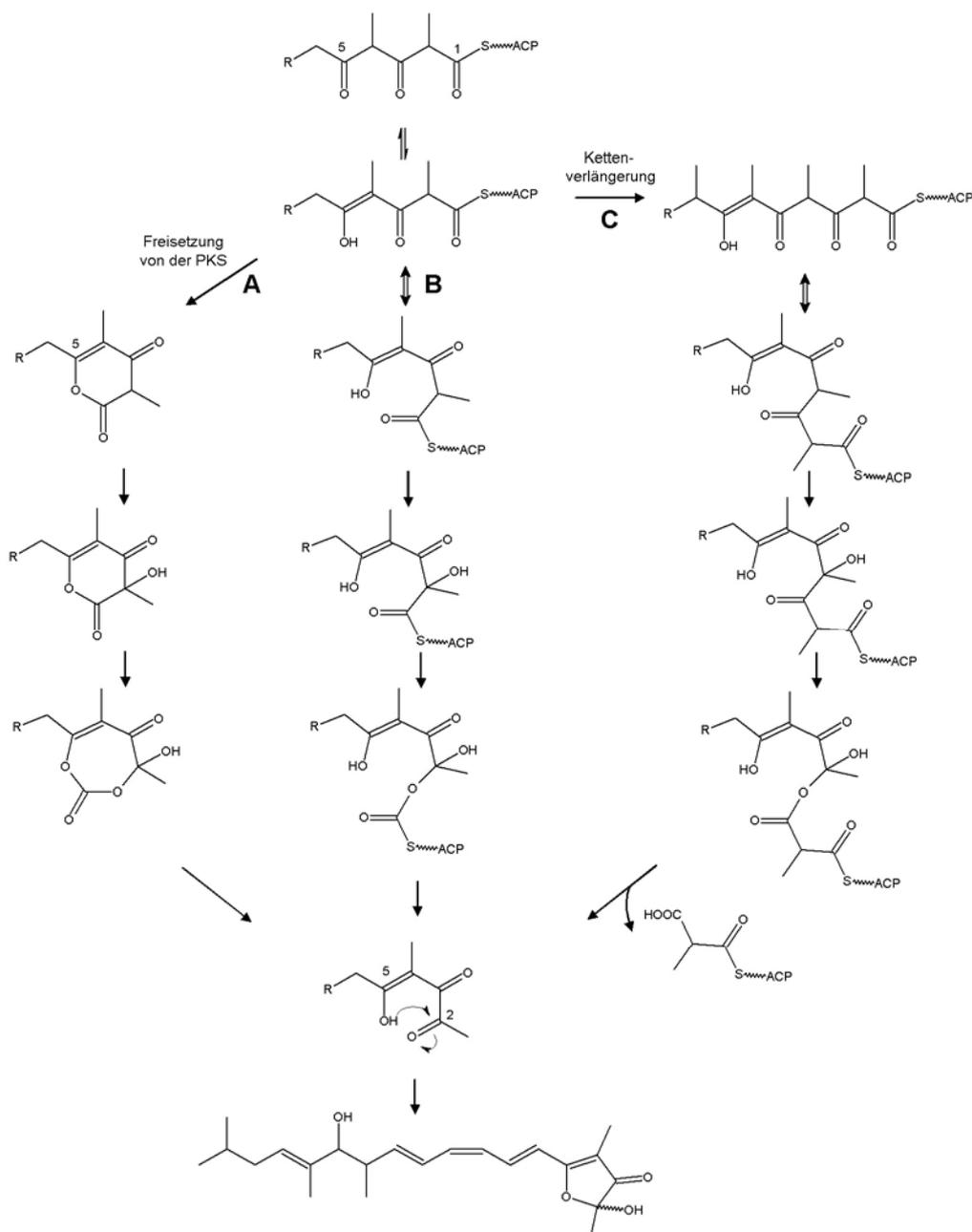


Abbildung 5.5: Mögliche Reaktionsfolgen der Furanon-Bildung.

Reaktionsweg A entspricht dem von Banskota *et al.* postulierten Biosynthesewegen für E-837 und E-492/875. In den Reaktionswegen B und C finden Post-PKS Reaktionen statt, während die Polyketidkette noch am Multienzym gebunden ist. In C wird gegenüber A und B eine zusätzliche Kettenverlängerung durchgeführt. Alle drei vorgestellten Hypothesen beinhalten eine Baeyer-Villiger Oxidation und den Verlust (mindestens) eines Kohlenstoffatoms (C1 der zuletzt [A,B] bzw. zuvorletzt [C] eingeführten Propionat-Einheit).

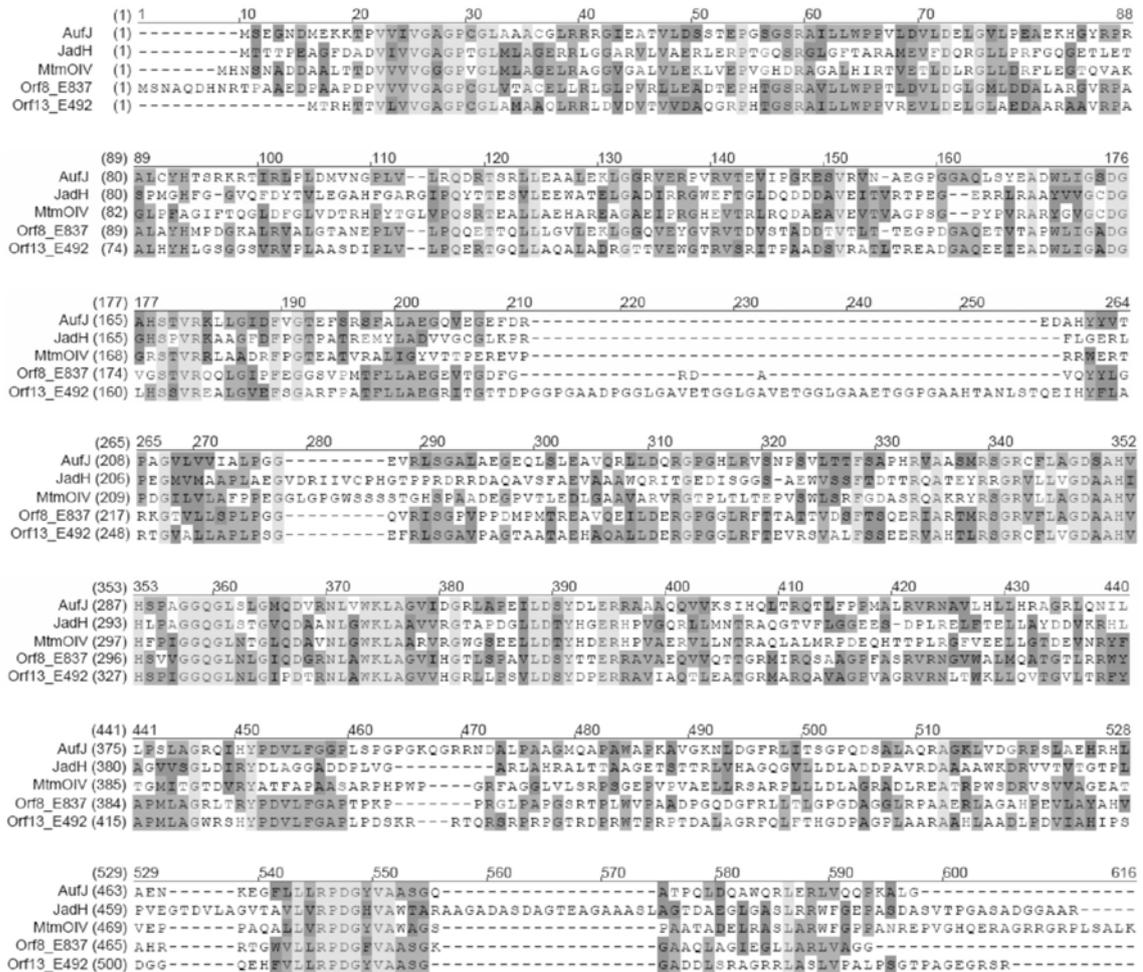


Abbildung 5.6: Sequenzvergleich von AufJ, JadH, MtmOIV, Orf8 (E837) und Orf13 (E492).

Identische Reste sind hellgrau unterlegt, ähnliche Reste sind dunkelgrau unterlegt.

Der in Abbildung 5.5 a dargestellte Reaktionsweg geht von einem Laktonderivat aus. Im Gegensatz zur E-837 und E-492 PKS existiert in der Aurafuron PKS keine TE-Domäne, welche die intramolekulare Zyklisierung zum Laktone katalysieren könnte. Möglicherweise finden modifizierende „Post“-PKS Reaktionen statt, während das Polyketid noch am Multienzymkomplex gebunden ist, und das resultierende Intermediat wird dann oxidativ abgespalten. Solch eine oxidative Abspaltung eines gebundenen Polyketides durch ein einer Baeyer-Villiger Monooxygenase ähnliches Enzym PedG wurde für die Pederin-Biosynthese im bakteriellen Symbionten des Käfers *Paederus fuscipes* postuliert (99). Interessanterweise liegt *pedG* direkt stromabwärts des PKS kodierenden *pedF*. Das letzte Modul von PedF ist unvollständig, und das fehlende ACP ebenso wie weitere Module inklusive einer terminalen TE-Domäne sind auf *pedH* kodiert, welches direkt stromabwärts auf *pedG* folgt. Piel argumentiert, dass *pedG* im Laufe der Evolution in das Biosynthesegencluster integriert worden sein könnte. Das Genprodukt könnte die oxidative Abspaltung des bis zu PedF prozessierten Polyketides katalysieren und damit die originär folgende PKS PedH inklusive der TE-Domäne

überflüssig machen. Auch in diesem Fall ist die Biosynthesehypothese nicht durch experimentelle Daten gestützt, das Modell bringt aber die Strukturen des Produktes und des Biosynthesegenclusters ausgesprochen gut in Einklang. Im Aurafuron-Biosynthesegencluster ist die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase AufH direkt stromabwärts der PKS AufG kodiert. Möglicherweise modifiziert AufH nach Kettenverlängerung durch AufG das Polyketidgerüst in der Art, dass die oxidative Abspaltung durch das Baeyer-Villiger ähnliche AufJ ermöglicht wird. Nach Freisetzung vom Multienzymkomplex könnten weitere Modifikationen stattfinden, die schließlich in der Bildung von Aurafuron resultieren. In Abbildung 5.5 ist ein entsprechender hypothetischer Biosyntheseweg formuliert (B). Unter der Voraussetzung, dass die Aurafuron PKS ein iterativ agierendes Modul enthält, wäre (neben AufE) ein weiteres Modul mehr vorhanden, als Verlängerungseinheiten eingebaut werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Polyketidkette mit einer zusätzlichen Verlängerungseinheit verknüpft wird, die im Zuge der oxidativen Freisetzung des Polyketides wieder abgespalten wird (Abbildung 5.5, C).

Aurafuron A ist das Hauptprodukt der Aurafuron-Biosynthese und an C7 hydroxyliert, Aurafuron B weist eine Doppelbindung an C6/7 auf. Möglicherweise wird die Hydroxylgruppe an C7 nur unvollständig durch eine Dehydratase (sei es eine Domäne oder ein diskretes Protein) abgespalten, so dass das Produkt als A- und B-Typ vorliegt. Alternativ dazu ist es denkbar, dass während der PKS Biosynthese der (an C7, 9, 11) vollständig dehydrierte B-Typ entsteht und die im A-Typ vorhandene Hydroxylgruppe an C7 nachträglich (wieder) eingeführt wird. Aurafuron-ähnliche Verbindungen wurden auch aus dem Actinomyceten MAR4 isoliert (Abbildung 5.4), interessanterweise existieren auch diese Actinofuranone als A- und B-Typ (100). Durch eine Fütterung von Aurafuron B an die PKS-Mutante BFAKR3-3 könnte festgestellt werden, ob Aurafuron B eine Biosynthesevorstufe von Aurafuron A ist. Ist das der Fall, sollte die Mutante Aurafuron B zu Aurafuron A umwandeln können. Für dieses Experiment muß Aurafuron B in ausreichender Menge isoliert werden, dies wird durch geringe Produktmengen erschwert (siehe 5.1.3).

### 5.1.3 Identifizierung möglicher Aurafuron-Derivate

Bei der genauen Analyse von Kulturextrakten von *S. aurantiaca* DW4/3-1 und Mutanten fiel eine bis dahin uncharakterisierte Verbindung auf. Diese Verbindung ist in Extrakten des Wildstammes und aller Post-PKS-Mutanten zu finden, jedoch nicht in Extrakten der PKS-Mutanten. Nach Fütterung der Biosynthesevorstufe L-[5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Leucin wurde eine Massenverschiebung von +3 Masseneinheiten beobachtet, die aus eingebautem Isovalerat stammen kann. Vermutlich handelt es sich um ein Aurafuron-Derivat, die Verbindung wurde vorläufig Aurafuron C genannt. Aurafuron C hat nach negativer Ionisierung die Masse 373,2. Nach Vermessung mit einem hochauflösendem Massenspektrometer wurde C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> als Summenformel der Verbindung berechnet. Ein UV-Spektrum konnte nicht zugeordnet werden. Wegen der geringen produzierten Mengen konnte die Substanz bisher nicht in ausreichender

Menge isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Laktone-Biosyntheseintermediat (vergleiche Abbildung 5.7), durch welche enzymatische Aktivität es auch durch Freisetzung von der PKS entsteht (eine TE-Domäne, welche üblicherweise diese Reaktion katalysiert, ist nicht vorhanden; siehe oben). Sollte sich der Strukturvorschlag bestätigen, wäre dies ein Hinweis auf den Biosyntheseweg A der in Kapitel 5.1.2 diskutierten Biosynthesewege A-C der Furanonringbildung (Abbildung 5.5). Allerdings wäre im Vergleich zu dem in diesem Reaktionsweg postulierten Laktonderivat keine Doppelbindung zwischen C4/5 vorhanden, sondern eine C-C Einfachbindung (Nummerierung nach Abbildung 5.5). Das würde bedeuten, dass in der PKS Biosynthese an C5 anstatt einer Ketogruppe eine Hydroxylgruppe generiert würde. Für die in Abbildung 5.5 gezeigten Biosyntheseoptionen wäre nach der Laktonisierung ein zusätzlicher Oxidationsschritt an diesem Kohlenstoffatom notwendig. Anhand der Modelle der PKS-Biosynthese (Abbildung 5.2) wäre es denkbar, dass an entsprechender Stelle sowohl eine aktive (AufF2), als auch eine inaktive KR-Domäne (AufC) vorhanden ist.

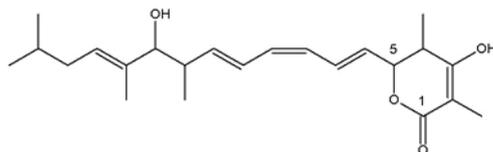


Abbildung 5.7: Strukturvorschlag für Aurafuron C

Die Post-PKS Mutanten BFABK (*aufB*-Mutante), BFAPC2-3 (*aufH*-Mutante) und BFAMD (*aufJ*-Mutante) produzieren alle eine Verbindung, die nach negativer Ionisierung die Masse 359,2 hat, welche von (der präzisen) Masse und dem Laufverhalten in der HPLC her Aurafuron B entspricht, jedoch anders fragmentiert als dieses. Aurafuron B existiert als (8*E*) und (8*Z*)-Isomer, die Fragmentierungsmuster dieser Isomere sind jedoch identisch. Diese Aurafuron B' genannte Verbindung in den Mutantenextrakten ist möglicherweise eine ringoffene Vorstufe von Aurafuron B, vielleicht das isomere Triketonderivat, welches in allen Post-PKS Biosynthesemodellen A-C schließlich zur Furanonstruktur reagiert. In diesem Fall wäre zu schließen, dass sowohl AufB, als auch AufH und AufJ am Ringschluss beteiligt sind. Erstaunlicherweise ist das Fragmentierungsmuster dieser Verbindung dem von Aurafuron C sehr ähnlich (vergleiche Tabelle 3.2, Abbildung 3.10). Leider konnten auch durch Kalkulation der Summenformeln der Fragmente nach präziser Massenbestimmung die Strukturen von Aurafuron C und Aurafuron B' nicht näher charakterisiert werden.

*S. aurantiaca* DW4/3-1, aber keine der in dieser Arbeit generierten Mutanten produziert zwei Verbindungen mit der Masse  $[M-H]^- = 395,2$ , welche nach Fütterung von L-[5,5,5- $^2H_3$ ]Leucin eine Massenverschiebung von +3 Masseneinheiten aufweisen und nahezu identisch fragmentieren wie Aurafuron A. Nach Bestimmung der präzisen Masse wurde die Summenformel  $C_{22}H_{35}O_6$  berechnet. Vermutlich handelt es sich bei diesen

Aurafuron D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> genannten Verbindungen um zwei Isomere, bei denen eine weiteren Doppelbindung der Seitenkette hydroxyliert ist.

Für alle neu identifizierten Intermediate und Verbindungen muß eine genauere Strukturaufklärung erfolgen. Damit ist nicht nur eine Zuordnung zum Aurafuron-Biosynthesegenlocus zu beweisen, sondern wären auch Hinweise über den Ablauf der Biosynthese zu erhalten. Leider können die Aurafurone von *S. aurantiaca* DW4/3-1 nur mit geringer Ausbeute erhalten werden (etwa 0,3 mg/l (8Z)-Aurafuron B und 0,04 mg/l (8E)-Aurafuron B, (26)), was eine Strukturaufklärung sehr erschwert. Die Ausbeute an Aurafuron A ist etwas höher (etwa Faktor 5 bis 8). Es ist geplant, das Aurafuron-Biosynthesegencluster in einem geeigneten heterologen Wirt zu exprimieren. Damit soll die Ausbeute gesteigert und die Strukturaufklärung ermöglicht werden. Durch heterologe Expression des Biosynthesegenclusters für Myxochromid S aus *S. aurantiaca* DW4/3-1 in *Pseudomonas putida* konnte die Ausbeute von 8 mg/l nach 6 Tagen Kultivierung auf 40 mg/l nach 2 Tagen Kultivierung gesteigert werden (19). Auch die genetische Manipulation des Biosynthesegenclusters wie die (markerlose) Inaktivierung einzelner Gene oder der Austausch der Promotorregion wäre erleichtert, da für die Manipulation in *E. coli* unter Verwendung der Red/ET-Technik (101;102) ein größeres Spektrum an Selektionsmarkern und Methoden der DNA-Rekombination zur Verfügung steht. Modifikationen könnten direkt an autonom replizierenden Konstrukten in *E. coli* vorgenommen werden. Idealerweise könnten nach Etablierung und Optimierung eines Systems zur heterologen Expression durch Modifikation des Biosynthesegenclusters weitere Biosyntheseintermediate identifiziert und strukturell aufgeklärt werden, welche wichtige Hinweise auf den Ablauf der Biosynthese geben würden.

## **5.2 Metabolische Einheit trotz genomischer Diversität - Vergleich von Biosynthesewegen Aurafuron-ähnlicher Strukturen**

Aurafuron-ähnliche Strukturen (vergleiche Abbildung 5.4) werden außer von *S. aurantica* DW4/3-1 auch von verschiedenen Aktinomyceten produziert: E-837 wird von *S. aculeolatus* NRLL 18422 produziert (68), E-492 und E-875 von *Streptomyces* sp. Eco86 (68) und die Actinofuranone A und B von einem vorläufig MAR4 CNQ766 genannten Stamm, der vermutlich zum Genus *Streptomyces* gehört (100). AS-183 ist eine Aurafuron-ähnliche Struktur, die aus dem Pilz *Scedosporium* sp. SPC-155549 isoliert wurde (103). Ein weiteres Beispiel ist Aglajne-2, welches aus der Molluske *Bulla striata* isoliert wurde (104). Ein 1:1 Gemisch der (E)- und (Z)-Isomere eines Norpectinaton-verwandten Furanons wurde aus einer weiteren Molluske *Siphonaria lessoni* isoliert (105). Zusätzlich zu den letzten beiden Verbindungen wurden auch die entsprechenden Pyranonderivate Aglajne-3 und Norpectinaton identifiziert (104;105). Zu der Biosynthese dieser Verbindungen ist wenig bekannt. Die erste Veröffentlichung im Jahr 2006 stammt von Banskota *et al.* und beschreibt zwei modulare Typ I PKS Biosynthesegencluster aus *S. aculeolatus* NRLL 18422 und *Streptomyces* sp. Eco86, die

für die Biosynthesemaschinerien der Metabolite E-837 bzw. E-492 und E-875 kodieren. Die PKS sind in einer Transkriptionseinheit kodiert und die Domänenorganisation der einzelnen Module ist weitestgehend kolinear mit den Polyketid-Strukturen ((68), zur Biosynthese des Polyketidgerüsts von E-837 vergleiche Abbildung 5.8). Die Lademodule weisen eine (lediglich decarboxylierende, nicht kondensierende)  $KS_Q$ , eine AT- Domäne und ein ACP auf. Nach *in silico* Analyse der einzelnen Domänen sind lediglich zwei KR-Domänen inaktiv, was mit den Biosynthesemodellen der Verbindungen übereinstimmt. Die einzige Unregelmäßigkeit ist eine scheinbar überflüssige DH-Domäne in den Modulen 7. Obwohl auch die Aurafurone von einer modularen Typ I PKS gebildet werden, weicht die Organisation des Biosynthesegenlocus und der kodierten PKS von den Streptomyeten-Genclustern und PKS signifikant ab. Im Aurafuron-Biosynthesegencluster sind die Gene nicht in einem Operon organisiert wie in den *Streptomyces*-Clustern, sondern in vermutlich drei Transkriptionseinheiten. Es gibt ein kombiniertes Lade- und Verlängerungsmodul, wobei die  $KS$ -Domäne des Verlängerungsmoduls zwischen dem ACP und der AT-Domäne des Lademoduls liegt. Eine  $KS_Q$  ist nicht vorhanden. Die Zuordnung der weiteren Module zu einzelnen Biosyntheseschritten ist schwierig, und die Biosynthese beinhaltet höchstwahrscheinlich ein iterativ agierendes Modul. Weitere Besonderheiten neben einem iterativ agierendem Modul sind zumindest ein überzähliges Modul, eine fehlende DH-Domäne ebenso wie eine fehlende terminale TE-Domäne. Gemeinsamkeiten mit den beschriebenen PKS aus *Streptomyces* sp. scheinen inaktive KR-Domänen in den letzten beiden Modulen der Biosynthese und eine scheinbar überflüssige DH-Domäne in AufC zu sein, welches möglicherweise den Modulen 7 der *Streptomyces* PKS entspricht.

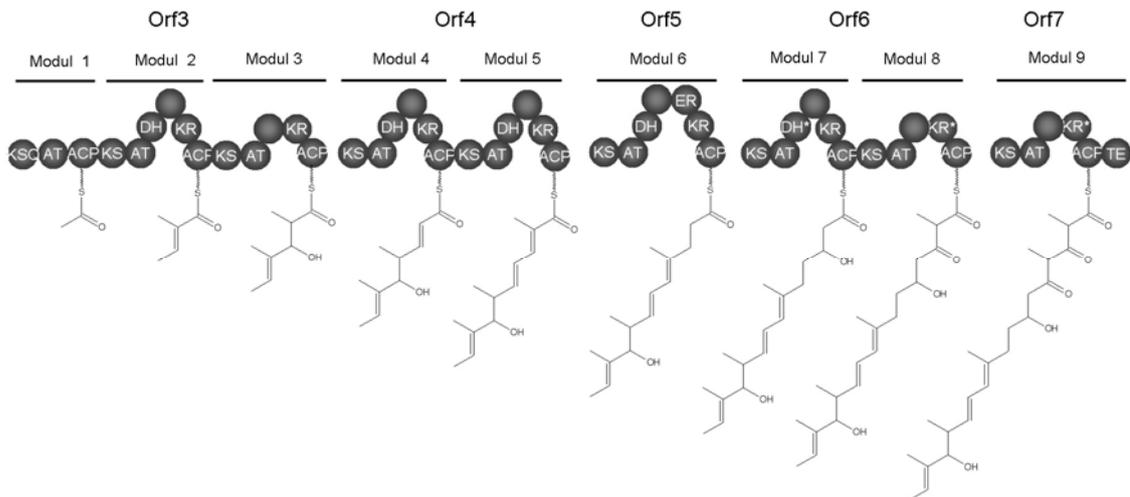


Abbildung 5.8: **Biosynthesemodell des Polyketidgerüsts von E-837 in *Streptomyces aculeolatus* (nach Banskota *et al.*).**

Mit einem Stern markierte Domänen sind vermutlich inaktiv.

Der Vergleich der kodierten Post-PKS-Enzyme der drei Biosynthesegencluster offenbart überzeugende Ähnlichkeiten ebenso wie signifikante Unterschiede. Die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase AufB und die Monooxygenase AufJ haben in den Genclustern aus *Streptomyces* sp. Gegenstücke mit erstaunlicher Homologie. Für die verbleibenden beiden Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen AufA und AufH sind in den E-837 und E-492 Biosynthesegenclustern keine Homologe kodiert, aber unabhängige Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen. Die Bildung der Furanonstrukturen beinhaltet wahrscheinlich ähnliche Reaktionsschritte wie eine Baeyer-Villiger Oxidation, die durch eine sehr ähnliche enzymatische Aktivität katalysiert werden wird. Aufgrund der unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen der Polyketide von der PKS - im Fall der *Streptomyces* PKS durch eine TE-Domäne, ohne Beteiligung einer TE-Domäne im Fall der Aurafuron PKS - führen vermutlich unterschiedliche zusätzliche katalytische Aktivitäten schließlich zur Ausbildung der Endstrukturen. Die Bildung von E-837 und E-492/ E-875 läuft wahrscheinlich über ein sechsgliedriges Laktonderivat, welches bei der Abspaltung des Polyketidgerüsts von der PKS durch die TE-Domäne entsteht. Interessanterweise wurden entsprechende Laktonderivate von Aglajne-2 und dem Norpectinaton-ähnlichen Furanon aus den jeweiligen Organismen isoliert, möglicherweise handelt es sich hier um Biosyntheseintermediate. Es ist nicht gesichert, dass die Aurafuron-Biosynthese ein Laktonintermediat beinhaltet, auch alternative Reaktionsfolgen sind denkbar. Die Post-PKS Biosynthese der Polyketide aus *Streptomyces* sp. wie auch der Aurafurone bedarf weiterer Untersuchungen, um gesicherte Schlußfolgerungen ziehen zu können. Auch ein aus *Saccharopolyspora erythraea* sequenziertes Biosynthesegencluster (69) weist bemerkenswerte Analogien zum Aurafuron-Biosynthesegencluster und noch deutlicher zu den *Streptomyces*-Clustern auf. Ein Produkt konnte dem Biosyntheselocus nicht zugeordnet werden, es ist aber denkbar, dass er für die Bildung einer weiteren Aurafuron-ähnlichen Verbindung verantwortlich ist oder war.

Die phylogenetische Analyse der myxo- und aktinobakteriellen PKS-Sequenzen bestätigt die *in silico* Analyse der PKS-Funktionalitäten (Abbildung 3.13). Die KS-Domänen der Aurafuron PKS sind den KS-Domänen anderer myxobakterieller PKS ähnlicher als den KS-Domänen aus *Streptomyces* sp.. Diese Tatsache spricht eher für eine unabhängige Entwicklung des Aurafuron-Biosynthesegenclusters als für einen Gentransfer von *S. aurantiaca* DW4/3-1 oder den *Streptomyces*-Stämmen durch horizontalen Gentransfer. Das Aurafuron-Biosynthesegencluster hat sich möglicherweise aus einem früheren Biosynthesegenlocus entwickelt, wobei eine Reihe von Punktmutationen zu veränderten Substratspezifitäten und einem Funktionsverlust von Domänen und ganzen Modulen geführt haben könnten. Besonders das höchstwahrscheinlich überflüssige AufE weist einige ungewöhnliche Reste in konservierten Positionen auf. Die entstandene(n) neue(n) Verbindung(en) könnten dem Produzenten einen Selektionsvorteil verschafft und damit die Konservierung des modifizierten Biosyntheseweges begünstigt haben.

Die Ähnlichkeit der gefundenen Aurafuron-verwandten Strukturen ist erstaunlich. Sie wurden nicht nur aus vergleichsweise nah verwandten Organismen wie verschiedenen Aktinobakterien (68;100) oder Myxobakterien isoliert (26), sondern auch aus einem Pilz (103) und sogar aus Mollusken (104;105). Diese Organismen entstammen verschiedenen Lebensräumen wie dem Erdreich (103;106), Gezeitenregionen (105) oder marinen Sedimenten (100). Die weite Verbreitung Aurafuron-ähnlicher Strukturen in verschiedenen Organismen und Lebensräumen läßt eine wichtige biologische Funktion dieser Polyketide vermuten. Für die Aurafurone wurde eine moderate antifungale und zytotoxische Aktivität beschrieben (26), für E-837, E-492 und E-875 eine moderate Hemmung des Elektronen-Transport-Komplexes (68) und für AS-183 eine Hemmung der Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (103). Wie in den meisten Fällen ist die Funktion der Sekundärmetabolite für die Produzenten nicht bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Mutanten von *S. aurantiaca* DW4/3-1 lassen unter Standard-Kultivierungsbedingungen (abgesehen von Effekten auf die Aurafuron-Biosynthese) keinen veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildstamm erkennen. Eine Aussage über die Funktion der Aurafurone für den Produzenten im natürlichen Habitat ist daraus aber nicht abzuleiten.

### 5.3 Spirangien-Biosynthese in *S. cellulorum* So ce90

#### 5.3.1 Identifizierung der unbekanntes Biosynthesegene

Die Spiroketalpolyketide Spirangien A und B wurden aus *S. cellulorum* So ce90 isoliert und strukturell aufgeklärt (Abbildung 1.3, (27)), werden aber auch von weiteren Sorangien-Stämmen produziert (21). Zu Beginn dieser Arbeit waren von zwei Cosmiden 44 kb Sequenzinformation der Biosynthesegene bekannt. Die Cosmide waren durch ein Screening einer genomischen Cosmidbank von *S. cellulorum* So ce90 mit KS-kodierenden Sequenzen als Sonde identifiziert worden (72;107). Nach Erstellung einer neuen Cosmidbank dieses Stammes konnte über die Hybridisierung mit einem KS-kodierenden Fragment des Genclusters ein Cosmid identifiziert werden, welches die fehlende Sequenzinformation des 5'-Endes des Spirangien-Biosynthesegenclusters enthält. Das vollständige Spirangien-Biosynthesegencluster ist 88,4 kb groß. Es sind sieben PKS kodiert, die insgesamt 16 Module enthalten. Am 5'-Ende des Clusters sind auf dem komplementären Strang eine Methyltransferase und eine Typ II-Thioesterase kodiert, direkt stromaufwärts der PKS-Gene ist eine Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase kodiert (vergleiche Abbildung 4.3). Stromabwärts der PKS-Gene sind eine Methyltransferase, eine Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase und (auf dem komplementären Strang) ein Transkriptionsfaktor kodiert, welcher das 3'-Ende des Biosynthesegenclusters bildet (72).

Um Studien zur Biosynthese biologisch aktiver Metabolite durchführen und schließlich die Biosynthese gezielt manipulieren zu können, müssen die Biosynthesegene

identifiziert und sequenziert werden. Durch die rasant fortschreitenden Entwicklungen der Sequenzieretechnologien (108) können heute in wenigen Wochen oder Tagen Sequenzbereiche in der Größe ganzer bakterielle Genome sequenziert werden (109). Noch vor wenigen Jahren wurden für die Durchführung eines solchen Projektes Monate und Jahre veranschlagt. Innerhalb der Genomsequenzen können biosynthetische Gene durch Vergleiche mit bekannten Biosynthesegenen *in silico* identifiziert werden (110). Ein Beispiel ist die Identifizierung der Biosynthesegene des Eisenchelators Myxochelin aus *S. aurantiaca* Sg a15 (111). Diese Methode der Erschließung biosynthetischen Potentials ist allerdings noch sehr kostenaufwändig (108), und auch die Qualität von ausschließlich automatisch generierten Assemblierungen und Annotationen ist noch zu verbessern (112). Eine etablierte Alternative zur Genomsequenzierung und nachfolgender *in silico* Analyse ist die Untersuchung genomischer Bibliotheken auf hochkonservierte Regionen biosynthetischer Gene durch Hybridisierungen oder PCR (15;113). Mit KS-kodierenden Sequenzen als Sonden können zuverlässig Polyketid-Biosynthesegene identifiziert werden, wie viele Beispiele zeigen (47;107;114). Auch im Fall der Spirangien-Biosynthesegene führte diese Methode zur vollständigen Identifizierung des Biosynthesegenlocus.

### 5.3.2 PKS-Biosynthese

Die sieben Spirangien PKS SpiDEFGHIJ sind (mit SpiCKL) in einem Operon kodiert und enthalten ein kombiniertes Lade- und Verlängerungsmodul und 14 weitere Module für den Einbau von Verlängerungseinheiten. Spirangien ist aus 16 Polyketideinheiten aufgebaut. Die Zahl der Module und auch die Domänenorganisation folgt weitestgehend dem Kolinearitätsprinzip (29). Zu den wenigen Abweichungen von diesem Prinzip gehört die Domänenorganisation des kombinierten Lade- und Verlängerungsmodules SpiD, in welchem die KS-Domäne des Verlängerungsmodules zwischen dem ACP und der AT-Domäne des Lademodules liegt (vergleiche Abbildung 5.9). Diese Domänenorganisation ist aber auch in anderen myxobakteriellen PKS zu finden (5.1.1, (48-51)). Die anhand konservierter Motive vorhergesagten Spezifitäten der AT-Domänen (55) stimmen mit dem Einbau von acht Malonat- und sieben Methylmalonat-Einheiten in das Spirangien-Polyketidgerüst überein. Die AT-Domäne des Lademoduls weicht in mehreren Resten von dem konservierten Motiv ab, sie selektiert Acetyl-CoA und Propionyl-CoA als Startereinheiten für die Spirangien A- bzw. Spirangien B-Biosynthese. Die *E*-Doppelbindungen des Moleküls werden von Modulen eingeführt, deren KR-Domänen den beschriebenen konservierten Aspartat-Rest tragen (Module 1, 11 und 13, (57;58)), die *Z*-Doppelbindungen werden von Modulen eingeführt, deren KR-Domänen den beschriebenen konservierten Aspartat-Rest nicht tragen (Module 10 und 12). Dies stimmt mit der A/B-Regel überein, nach der die Aktivität von KR-Domänen des A-Typs ohne den Aspartat-Rest der Bildung von *Z*-Doppelbindungen vorausgeht und die Aktivität von KR-Domänen des B-Typs mit dem Aspartat-Rest der Bildung von *E*-Doppelbindungen (57;58;94).



Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems von C4 bis C13 sind in den Modulen 10 bis 14 DH-Domänen zu erwarten. Diese fehlen jedoch in den Modulen 10 und 12, so dass möglicherweise die Elimination von Wasser durch DH-Domänen der stromabwärts folgenden Module 11 und 13 katalysiert wird. Die letztgenannten DH-Domänen sind einander sehr ähnlich (69 % Identität auf Proteinebene) und gruppieren in einem phylogenetischen Baum abseits der anderen DH-Domänen der Spirangien PKS. Eine solche *in trans*-Aktivität wird auch für DH-Domänen der Stigmatellin, Chivosazol und Aurafuron PKS postuliert ((50;91), 5.1.1). Im Gegensatz zu den anderen PKS weisen allerdings die entsprechenden Module der Chivosazol PKS eine ungewöhnliche Domänenorganisation auf. Für die DH-Domäne von Modul 5 der Epothilon PKS/NRPS konnte eine iterative Aktivität bereits experimentell belegt werden (90). Ein Sequenzvergleich der beschriebenen potentiellen *in trans* agierenden DH-Domänen ließ keine gemeinsamen Reste erkennen, welche von anderen DH-Domänen abweichen und zur Charakterisierung der *in trans* Aktivität dienen könnte. Obwohl die Doppelbindungen an C6/7 und C8/9 bzw. C10/11 und C12/13 wahrscheinlich von einer DH-Domäne eingeführt werden, unterscheiden sie sich in der Stereochemie. Dies bekräftigt die A/B-Regel, nach der die Stereochemie des durch die KR-Domäne eingeführten Alkohols die Stereochemie der entstehenden Doppelbindung bestimmt. Allerdings sind auch weitere *E/Z*-Spirangienisomere in den Kulturextrakten von *S. cellulosum* So ce90 zu finden (Daten nicht gezeigt). Auch wenn nicht ausgeschlossen ist, dass diese während der Aufarbeitung der Extrakte entstehen, zeigt dieser Befund wieder einmal ((91), 5.1.1), dass anhand der A/B-Klassifizierung der KR-Domänen nicht direkt auf die Stereochemie abgeleiteter Doppelbindungen geschlossen werden kann.

Die DH-Domäne von Modul 4 weist das konservierte Motiv dieser Domänen auf, die entsprechende Hydroxylgruppe an C25 scheint aber im Molekül zu verbleiben. Höchstwahrscheinlich ist sie an der Spiroketalbildung beteiligt. Nach Inaktivierung des Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase kodierenden Gens *spiL* produziert die Mutante nur noch azyklische Spirangien-Derivate mit einer Hydroxylgruppe an C25, welche bei einem Teil der Verbindungen glykosyliert ist (Abbildung 5.11, (72)). Möglicherweise führen Punktmutationen in der Nähe der konservierten Reste zum Funktionsverlust der DH-Domäne (vergleiche Abbildung 4.5).

Alle Module der Spirangien PKS enthalten etwa ~380 Aminosäuren große Linker-Regionen N-terminal der KR- bzw. ER-Domänen. Diese Domänen sind in der großen Mehrheit der modularen Typ I PKS Module zu finden, ihre genaue Funktion war aber lange Zeit unklar. Neuere Untersuchungen weisen auf eine strukturelle Rolle bei der Stabilisierung der KR- Domänen hin, die in monomerer Form aus dem PKS-Homodimer herausragen (34). Diese AT-KR/DH-KR/DH-ER Linkerregionen der Spirangien PKS zeigen einige konservierte Reste, die auch in entsprechenden Regionen anderer PKS zu finden sind (vergleiche z.B. 3.2) und können zusätzlich anhand des Sequenzvergleiches in zwei Gruppen eingeteilt werden (Linkerregionen der Module 1, 2, 4, 7, 11, 13, 15 und Linkerregionen der Module 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 14). Diese

Gruppierung zeigt keine offensichtliche biosynthetische Logik, mag aber auf die Entwicklung des Spirangien-Biosynthesegenlocus durch eine Reihe von Duplikationen zurückzuführen sein (vergleiche 5.4).

Das letzte Modul der Spirangien PKS endet mit einer TE-Domäne, welche die Abspaltung der fertig prozessierten Polyketidkette von der PKS als freie Säure katalysiert.

### 5.3.3 Post-PKS Biosynthese

An die Biosynthese des Spirangien-Polyketidgerüsts schließen sich eine Reihe von Post-PKS Reaktionen an. Vier funktionelle Gruppen stammen höchstwahrscheinlich nicht aus der PKS Biosynthese: zwei Methoxygruppen an C3 und C23, die Hydroxylgruppe an C20 und die Spiroketalfunktion im Zentrum des Moleküls. Für die Einführung dieser Funktionalitäten kommen vier im Biosynthesegencluster kodierte Proteine in Frage: die zwei Methyltransferasen SpiB und SpiK und die zwei Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen SpiC und SpiL, die jeweils stromauf- bzw. stromabwärts der PKS Gene im Cluster kodiert sind. Eine Insertionsmutante von *spiL* lag zu Beginn dieser Arbeit vor, Insertionsmutanten von *spiB*, *spiC* und *spiK* wurden im Zuge der Arbeit generiert, um Einblick in die Funktion der kodierten Enzyme in die Biosynthese zu gewinnen.

#### 5.3.3.1 Generierung von Desmethylderivaten

Die Methyltransferase-kodierenden Gene *spiB* und *spiK* wurden unabhängig voneinander durch Insertionsmutagenese inaktiviert. Die Mutanten BFSB-11 und BFSK-2 produzierten beide weder Spirangien A noch B, dafür aber neue Verbindungen mit einer Massendifferenz von -14 Masseneinheiten gegenüber Spirangien A und B. Da das UV-Spektrum dieser Verbindungen weitestgehend dem charakteristischen UV-Spektrum der Spirangiene entspricht, wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um Desmethylderivate handelt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde zu *S. cellulorum* So ce90 und den Mutanten L-[Methyl-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Methionin gefüttert. Nach HPLC-MS-Analyse der Kulturextrakte wurde bei den Wildstamm-Spirangien eine Massenzunahme um 3 und 6 Masseneinheiten festgestellt und bei den Spirangien-Derivaten nur eine Massenzunahme von 3 Masseneinheiten, entsprechend einer und zwei bzw. nur einer aus SAM stammenden D<sub>3</sub>-markierten Methylgruppen. Zusätzlich zur Identifizierung des SAM-Bindemotives zeigt der Einbau der aus Methionin stammenden Methylgruppe, dass es sich um SAM-abhängige Methyltransferasen handelt. Um die beiden Methyltransferasen einer Methylierung der Hydroxylgruppen an C3 und C23 zuordnen zu können, wurden der Wildstamm und die Mutanten unter XAD Zusatz in einem größerem Volumen Produktionsmedium kultiviert und mit L-[Methyl-<sup>13</sup>C]Methionin gefüttert. Die mit den Spirangien-Derivaten angereicherten Fraktionen der Kulturextrakte wurden mit <sup>13</sup>C NMR-Spektroskopie analysiert und mit den entsprechenden Fraktionen des Wildstamm-Extraktes verglichen. Da sowohl Acetyl-CoA als auch Propionyl-CoA als Starter in der Spirangien-Biosynthese dienen und

zusätzlich Doppelbindungsisomere vorhanden sind, treten für das 3-OMe Kohlenstoffatom verschiedene Signale zwischen 56,7 und 57,0 ppm auf (vergleiche Abbildung 4.9). Wie erwartet waren im  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum der Wildstamm-Spirangiene sowohl das 3-OMe, als auch das 23-OMe Signal vorhanden, während den  $^{13}\text{C}$  NMR Spektren der Spirangien-Derivate je eines der Signale fehlte. Im Fall der *spiB*- Mutante fehlte das 23-OMe- Signal, bei den Derivaten der *spiK*- Mutante fehlte das 3-OMe-Signal. Daraus ist zu schließen, dass SpiB die Methylierung der Hydroxylgruppe an C23 katalysiert und SpiK die Methylierung der Hydroxylgruppe an C3. Für das 23-OMe Kohlenstoffatom tritt zusätzlich zu dem beschriebenen Signal bei 55,7 ppm (27) in den Wildstamm Spirangien und den 3O-Desmethylderivaten ein Signal bei 56,4 ppm auf, was möglicherweise auf isomere Formen der benachbarten Spiroketalstruktur zurückzuführen ist.

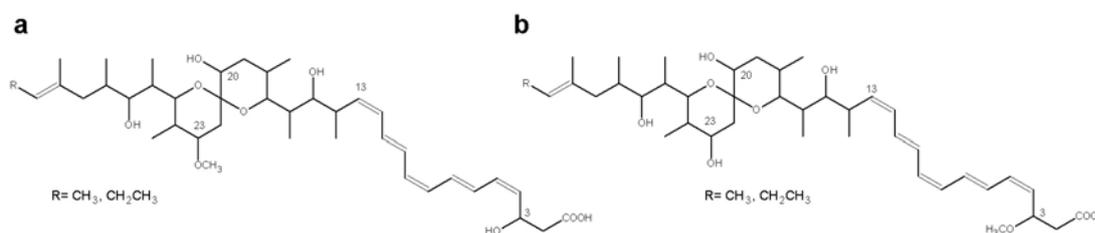


Abbildung 5.10: Desmethyl-Spirangienderivate der *spiK* Mutante BFSK-2 (a) und der *spiB* Mutante BFSB-11 (b)

Durch die Inaktivierung der Methyltransferasegene konnte nicht nur die genaue Funktion der kodierten Enzyme in der Spirangien-Biosynthese geklärt werden, es wurden auch zwei Serien neuer Naturstoff-Derivate generiert. Nach einer Isolierung der verschiedenen Derivate können diese mit verschiedenen biologischen Testsystemen untersucht und die biologische Aktivität mit der der Wildstamm-Spirangiene verglichen werden.

### 5.3.3.2 Untersuchungen zur Bildung der Spiroketalfunktion

Die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen SpiL und SpiC sind vermutlich für die Einführung der Spiroketalfunktion und der Hydroxylgruppe an C20 verantwortlich. Diese Hydroxylgruppe stammt nicht aus der PKS-Biosynthese, da sie an C2 der eingeführten Malonateinheit liegt und die entsprechende AT-Domäne von Modul 6 nach *in silico* Analyse eine Malonyl-CoA-Spezifität zeigt. Nach Inaktivierung von SpiL werden azyklische Spirangien-Derivate produziert, die teilweise an der Hydroxylgruppe an C25 glykosyliert sind (Abbildung 5.11, (72)). Bei dem Zuckerrest handelt es sich wahrscheinlich um ein  $\alpha$ -D-Arabinofuranosid (H. Steinmetz, persönliche Mitteilung). Dieses ist das erste Beispiel einer glykosylierten Verbindung aus *S. cellulosum* So ce90. Der Zuckerrest ist auch in Icumazol B zu finden, welches von anderen *S. cellulosum* Stämmen (*S. cellulosum* So ce701 und So ce1046) produziert wird (115).

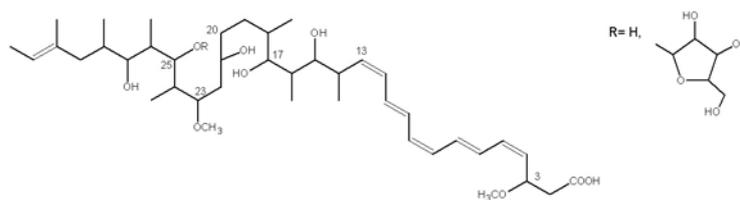


Abbildung 5.11: Azyklische Spirangienderivate der *spiL* Mutante JKB19

Die Insertionsinaktivierung von *spiC* stellte besondere Anforderungen, da das Gen 13 bp stromaufwärts von dem PKS kodierenden Gen *spiD* lokalisiert ist und somit von einer transkriptionellen Kopplung ausgegangen werden muß. Markerlose Mutagenesen sind wegen fehlender Gegenselektionsmarker in *Sorangium* nicht möglich, deshalb wurde hinter das homologe Fragment zur Integration der *aphII*-Promotor kloniert (74). Nach Integration des Inaktivierungskonstruktes resultieren zwei inaktive Kopien von *spiC* unter Kontrolle des natürlichen und des *aphII*-Promotors. Die Transkription der PKS-Gene ist durch den *aphII* Promotor sichergestellt (vergleiche Abbildung 5.12). In den Kulturextrakten der erhaltenen Integrationsmutanten (BFSC) waren jedoch weder Spirangien A und B noch neue Derivate zu detektieren. Um sicherzustellen, dass nicht eine unzureichende Transkription der PKS-Gene die Ursache für das Ausbleiben der Produktion war, wurde ein zweites Mutagenesekonstrukt pBFS\_CP mit einem größeren homologen Bereich entworfen. Nach Integration von pBFS\_CP resultieren eine inaktive Kopie von *spiC* unter Kontrolle des natürlichen Promotors und eine aktive Kopie von *spiC* unter Kontrolle des *aphII*-Promotors. Die PKS-Gene stehen auch hier unter Kontrolle des *aphII*-Promotors (vergleiche Abbildung 5.12). Die entsprechende Mutante BFSCP produziert Spirangiene, die Transkription der Gene unter Kontrolle des *aphII*-Promotors ist also ausreichend. Aus der fehlenden Produktion der Inaktivierungsmutante BFSC kann somit geschlossen werden, dass das Genprodukt SpiC essentiell für die Spirangien-Biosynthese ist.

Die Bildung der Spiroketalfunktion und die Oxidation des Polyketidgerüsts durch die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen findet entweder statt, während das Polyketid noch am Multienzymkomplex prozessiert wird, oder aber nach Freisetzung von der PKS. Nach Inaktivierung von SpiL wird ein Spirangienderivat produziert, das einer fertig prozessierten Polyketidkette (zusätzlich methyliert an den OH-Gruppen an C3 und C23) nach Abspaltung von der PKS durch die terminale TE-Domäne entspricht. Das glykosylierte Derivat resultiert möglicherweise aus einer Glykosyltransferaseaktivität, die originär anderen Biosynthesewegen zuzuordnen ist. Die Produktion dieser azyklischen Derivate stützt die Hypothese, dass die Bildung der Spiroketalfunktion nach Freisetzung von der PKS stattfindet.

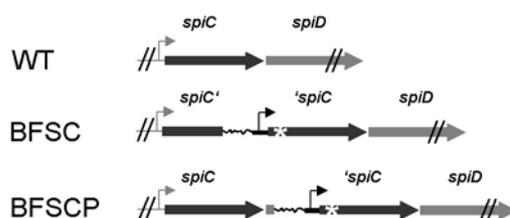


Abbildung 5.12: **Organisation von *spiC* und *spiD* im Wildstamm (WT) und in Mutanten von *S. cellulosum* So ce90 (BFSC und BFSCP).**

Im Wildstamm folgt das erste PKS-kodierende Gen *spiD* (grau) direkt 13 bp stromabwärts auf *spiC* (schwarz) und scheint durch denselben Promotor kontrolliert zu sein (grau). Um in der *spiC*-Inaktivierungsmutante BFSC die Transkription der PKS-kodierenden Gene zu gewährleisten, wurde zusätzlich zu einem homologen Fragment der *aphII*-Promotor (schwarz) kloniert. Der Stern symbolisiert ein eingeführtes Stoppkodon, so dass zwei inaktive Kopien von *spiC* resultieren. Die Vektorsequenz ist durch eine Schlangenlinie gekennzeichnet. In der Mutante BFSCP steht die aktive Kopie von *spiC* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors, und die PKS-kodierenden Gene unter der Kontrolle des eingeführten *aphII*-Promotors.

Spiroketalgruppen sind auch in einer Reihe anderer Naturstoffe zu finden, aber über die Mechanismen der Spiroketalbildung ist häufig nichts oder nur wenig bekannt (z.B. (116)). Ausnahmen sind die Biosynthesewege der Avermectine in *Streptomyces avermitilis* (117) und von Monensin in *Streptomyces cinnamomensis* (118) durch modulare Typ I PKS. Im Fall der Avermectin-Biosynthese entsteht die Spiroketalfunktion vermutlich durch einen nukleophilen Angriff zweier Hydroxylgruppen an einen zentralen Carbonylkohlenstoff, woraus ein Hemiacetal entsteht, das schließlich zur Acetalgruppe weiterreagiert (vergleiche Abbildung 5.13). Für die Bildung der Spiroketalfunktion im Polyether Monensin wird ein anderer Mechanismus diskutiert. Neuere Ergebnisse zeigen, dass nach Epoxidierung der PKS-generierten Doppelbindungen zwei Epoxid-Hydrolase ähnliche Enzyme MonBI und MonBII den nukleophilen Angriff einer Hydroxylgruppe eines Hemiacetals auf einen Epoxid-Kohlenstoff katalysieren. Dieser Angriff führt zur Bildung eines Acetals und nachfolgender Ringöffnung des Epoxids. Die entstehende freie Hydroxylgruppe kann dann ein zweites Epoxid nukleophil angreifen, so dass schließlich die typische Polyetherstruktur entsteht (Abbildung 5.13).

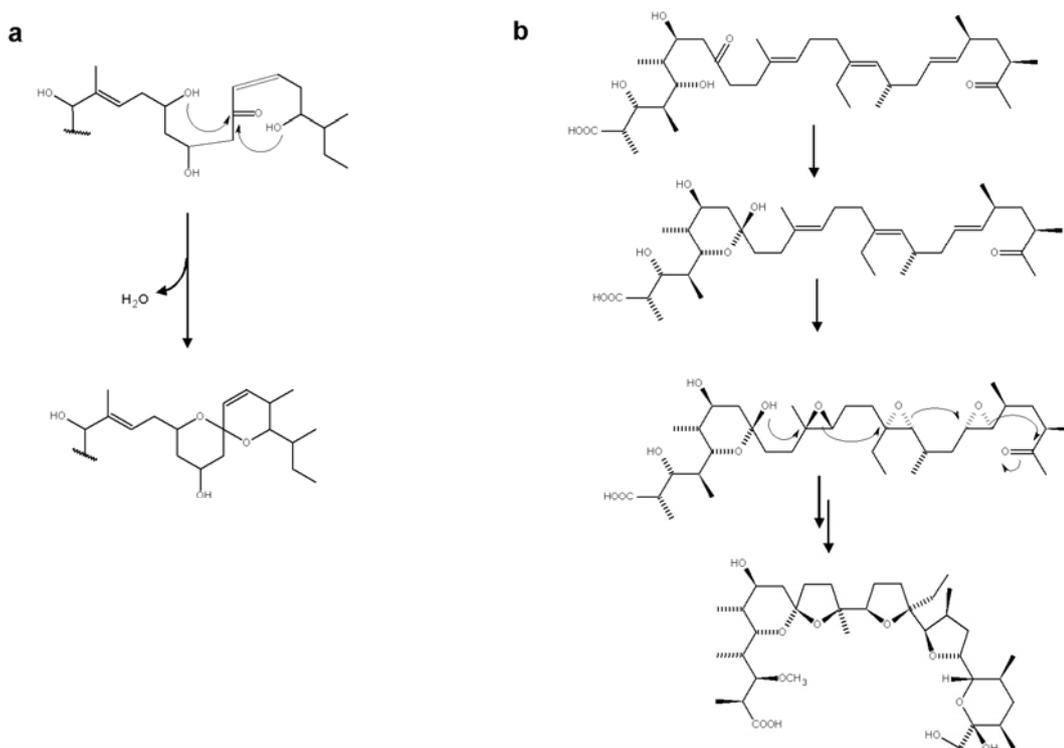
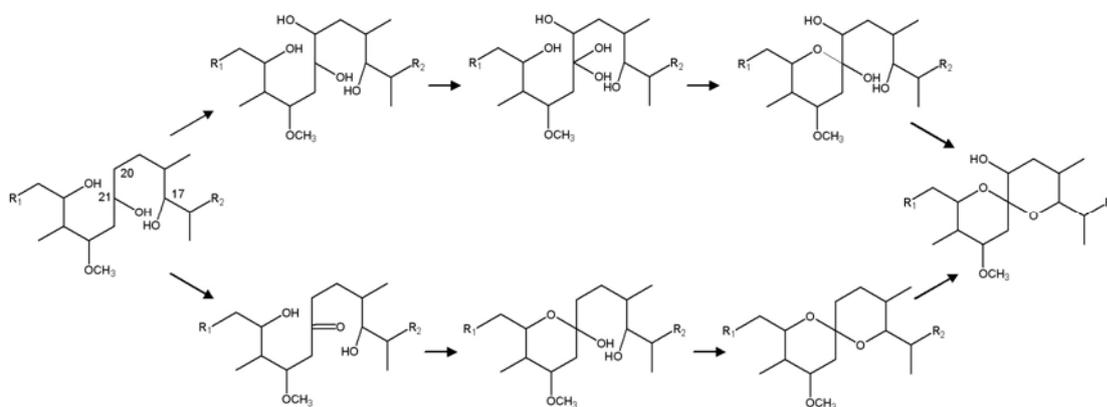


Abbildung 5.13: **Mechanismen der Spiroketalbildung bei der Avermectin- (a) und Monensin-Biosynthese (b).** Beide Post-PKS Biosynthesen gehen von einem Carbonyl-Kohlenstoff aus. In a) erfolgt ein nukleophiler Angriff zweier Hydroxylgruppen an den zentralen Carbonyl-Kohlenstoff. In b) kommt es nach nukleophilem Angriff einer Hydroxylgruppe an einen späteren zentralen Carbonyl-Kohlenstoff zur Epoxidierung der Doppelbindungen und eine Reihe von nachfolgenden nukleophilen Angriffen freier Hydroxylgruppen, die schließlich zur Ausbildung der Polyetherstruktur von Monensin führen.

Sowohl bei der Avermectin- als auch bei der Monensin-Biosynthese ist am späteren zentralen Kohlenstoff der Spiroketalfunktion zu Beginn der Post-PKS Biosynthese eine Ketogruppe vorhanden. Ausgehend von der *in silico* Analyse der PKS Domänen gibt es keine Hinweise, dass die entsprechende KR-Domäne in Modul der Spirangien PKS inaktiv ist und aus der PKS Biosynthese eine Ketogruppe an C21 hervorgeht. Sollte die Spiroketalbildung über ähnliche Reaktionswege verlaufen wie bei der Avermectin- und Monensin-Biosynthese (117;118), müsste diese Ketogruppe durch ein Post-PKS-Enzym (wieder) eingeführt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Spirangien-Biosynthese wie die Monensin-Biosynthese eine Epoxidierung beinhaltet. Die kodierten Post PKS Enzyme SpiL und SpiC zeigen jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Epoxidasen oder Epoxid-Hydrolasen, und auch im Umfeld des Biosynthesegenclusters sind keine solchen Enzyme kodiert. Anhand der bekannten Daten lassen sich zwei hypothetische Reaktionsfolgen der Spiroketalbildung formulieren (Abbildung 5.14). Ausgehend vom azyklischen Derivat der SpiL-Mutante könnte SpiL die Oxidation der Hydroxylgruppe an C21 zum Keton katalysieren, gefolgt von einer katalysierten oder spontanen Zyklisierung die zur Bildung der

Spiroketalfunktion führt. SpiC könnte die nachfolgende Hydroxylierung an C20 katalysieren. In diesem Fall würde nach Inaktivierung von SpiL das azyklische Derivat nicht von SpiC erkannt. Alternativ dazu wäre es möglich, dass SpiL die Hydroxylgruppe an C20 einführt, ehe SpiC entsprechende Oxidations-/Zyklisierungs-Reaktionen katalysiert. Auch hier würde die Inaktivierung von SpiL dazu führen, dass das Substrat nicht mehr von SpiC erkannt wird. Es ist auch vorstellbar, dass SpiC zuerst in einer der beiden Reaktionsfolgen agiert. Leider wird nach Inaktivierung von SpiC kein Derivat erhalten, welches Aufschluß über die von SpiC und SpiL katalysierten Reaktionen geben würde. Möglicherweise ist das Intermediat instabil und zerfällt in schnell abzubauenen Komponenten. Tatsächlich sind auch die Spirangiene wenig stabil.



**Abbildung 5.14: Mögliche Mechanismen der Spiroketalbildung in der Spirangien-Biosynthese, ausgehend vom azyklischen Derivat der SpiL-Mutante (links).** Entweder findet zuerst eine Hydroxylierung von C20 und nachfolgend die Oxidation an C21 und der Ringschluß statt (oben), oder aber erst die Oxidation an C21 mit nachfolgender Spiroketalbildung, und dann erst die Hydroxylierung an C20 (unten). Die einzelnen Reaktionen können dabei durch SpiL oder SpiC katalysiert sein oder spontan ablaufen.

Die Aufklärung der Spiroketalbildung bedarf weiterer Experimente, durch die Inaktivierung von SpiC und SpiL konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass diese Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen an der Spiroketalbildung beteiligt ist. Trotz der enormen Vielzahl der für diese Enzymgruppe beschriebenen Reaktionen (119) ist bisher noch keine nachgewiesene Katalyse einer Spiroketalbildung darunter. Naturstoffe mit Spiroketalgruppen besitzen eine Reihe von interessanten biologischen Aktivitäten. Darunter sind Tubulin-Polymerisationshemmer wie Spongistatin (120), HIV-Protease-Inhibitoren wie Tautomycin (121), Telomerase-Inhibitoren wie Rubromycin (122), antiosteoporotisch wirksame Substanzen wie Reveromycin (123;124) und Proteinphosphatase-Inhibitoren wie Okadansäure (125) (vergleiche Abbildung 5.15). Die chemische Totalsynthese dieser komplexen Verbindungen ist Gegenstand intensiver Bemühungen (z.B. (126)) und Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen wie SpiL und SpiC könnten hier womöglich einen wertvollen Beitrag leisten. Der nächste Schritt zur Untersuchung dieser beiden Enzyme ist die *in vitro* Charakterisierung nach heterologer

Expression, dabei kann das azyklische Derivat der SpiL-Mutante als Substrat eingesetzt werden. Entsprechende Experimente werden zur Zeit in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Bernhardt am Institut für Biochemie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

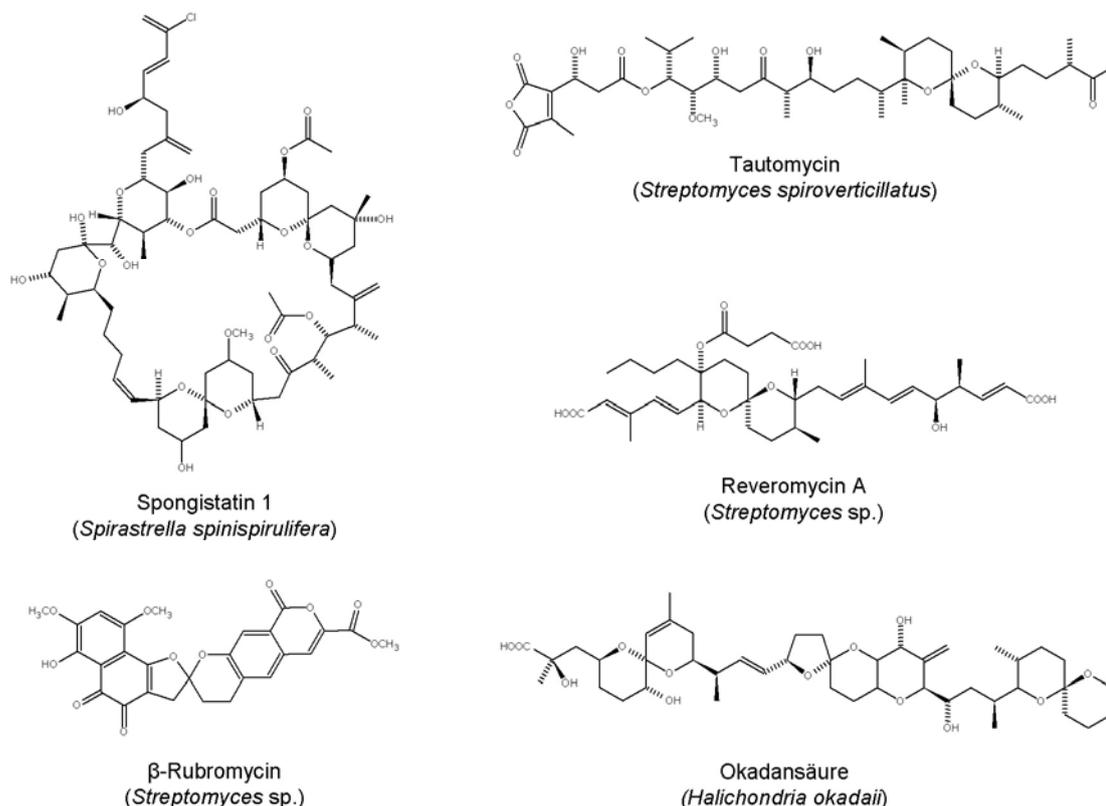


Abbildung 5.15: Biologisch aktive Naturstoffe mit Spiroketalstrukturen

### 5.3.4 Inaktivierung der Typ II Thioesterase

Das Genprodukt von *spiA* am 5'-Ende des Biosyntheseegenlocus zeigt Ähnlichkeit zu Typ II Thioesterasen, welche häufig in PKS (und NRPS) Biosyntheseegenclustern kodiert sind (127). Typ II Thioesterasen sind im Gegensatz zu Typ I Thioesterasen, welche die Freisetzung des Polyketides vom Multienzymkomplex katalysieren, vermutlich nicht direkt an der Biosynthese beteiligt. Häufig führt eine Inaktivierung zu reduzierten Produktausbeuten wie bei der Tylosin-Biosynthese (128). Es sind jedoch auch Beispiele bekannt, in denen kein Effekt auf die Produktbildung beobachtet werden konnte, wie nach der Inaktivierung von *pikAV* bei der Pikromycin-Biosynthese (129). Auch die Inaktivierung von *spiA* führt zu keinem signifikanten Effekt auf die Spirangien-Bildung. Eine editierende Rolle von Typ II Thioesterasen wie die Entfernung von fälschlicherweise decarboxylierten und so die Biosynthese blockierenden Verlängerungseinheiten vom ACP (127) wird ebenso diskutiert wie eine

Funktion bei der Entfernung bestimmter alternativer Startereinheiten vom ACP des Lademodules (130). Eine weitere mögliche Funktion ist die Vermeidung der Akkumulation von intrazellulärem Acyl-CoA (131). Die Rolle von Typ II Thioesterasen in der NRPS Biosynthese ist besser untersucht (132) und es konnte gezeigt werden, dass sie fehlacylierte NRPS regenerieren (133). Die genaue Funktion von SpiA in der Spirangien-Biosynthese und Typ II Thioesterasen im Allgemeinen bleibt unklar.

#### 5.4 Überlegungen zur Entwicklung des Spirangien-Biosynthesegenlocus

Der PKS kodierende Teil des Spirangien-Biosynthesegenlocus weist eine Reihe von Sequenzwiederholungen mit bis zu 99,9 % identischen Basenpaaren auf. Sequenzwiederholungen mit Identitäten in dieser Größenordnung sind auch in anderen Biosynthesegenclustern zu finden, aber meistens auf einzelne Domänen beschränkt (134;135). Myxobakterielle Beispiele hierfür sind das Myxothiazol- und das Epothilon-Biosynthesegencluster (49;75;76). Eine bemerkenswerte und bisher einzigartige Ausnahme ist das Mycolacton-Biosynthesegencluster aus *Mycobacterium ulcerans*. Dieses Cluster kodiert für zwei PKS MLSA1 und MLSB, welche 9 bzw. 8 Module enthalten und enorme 1,8 MDa und 1,2 MDa groß sind. Die insgesamt 17 Module können in sechs Gruppen unterteilt werden, innerhalb der Gruppen sind die Module zu > 98 % identisch (136). Die Anordnung der Module der einzelnen Gruppen in den beiden PKS MLSA1 und MLSB scheint dabei nahezu zufällig zu sein, und es stellt sich die Frage, wie eine gewisse Substratspezifität gewährleistet bleibt (136;137).

Die konservierten Funktionen der PKS spiegeln sich natürlicherweise in einem gewissen Grad an Sequenzhomologie einzelner Domänen und Module wieder. Das Ausmaß der Sequenzähnlichkeit in der Spirangien PKS ist jedoch erstaunlich. Die Lage und Größe dieser Sequenzwiederholungen lässt mindestens drei größere Duplikationsereignisse in der Evolution des Biosynthesegenlocus vermuten (Abbildung 5.16). Ein Vorläufercluster kodierte möglicherweise für 12 statt der heutigen 16 Module. Es ist anzunehmen, dass Sequenzwiederholungen mit geringer Homologie auf frühere Duplikationsereignisse zurückzuführen sind, während Bereiche mit großer Ähnlichkeit jüngere Duplikationsereignisse repräsentieren. Stark konservierte Regionen innerhalb der Sequenzwiederholungen wechseln dabei mit weniger konservierten Regionen ab, in denen vermutlich im Laufe der Generationen mehr Punktmutationen akkumulieren konnten. Das erste große Duplikationsereignis betraf möglicherweise den kompletten Modul 5 kodierenden Bereich auf *spiF*, welcher nach der Verdopplung auch auf *spiH2* für das heutige Modul 10 kodiert (Abbildung 5.16, a und b). Das zweite Duplikationsereignis von dem Modul 2 kodierenden Bereich auf *spiD2* führte eventuell zur Entstehung von *spiG2*, welches das heutige Modul 7 kodiert (Abbildung 5.16, b und c). Die evolutionär jüngste Verdopplung des Modul 11/12 kodierenden Bereiches auf *spiH3/spiI1* schließlich mag zur Entstehung des Module 13 und 14 kodierenden Bereiches auf *spiI2/spiJ1* geführt haben (Abbildung 5.16, c und d).

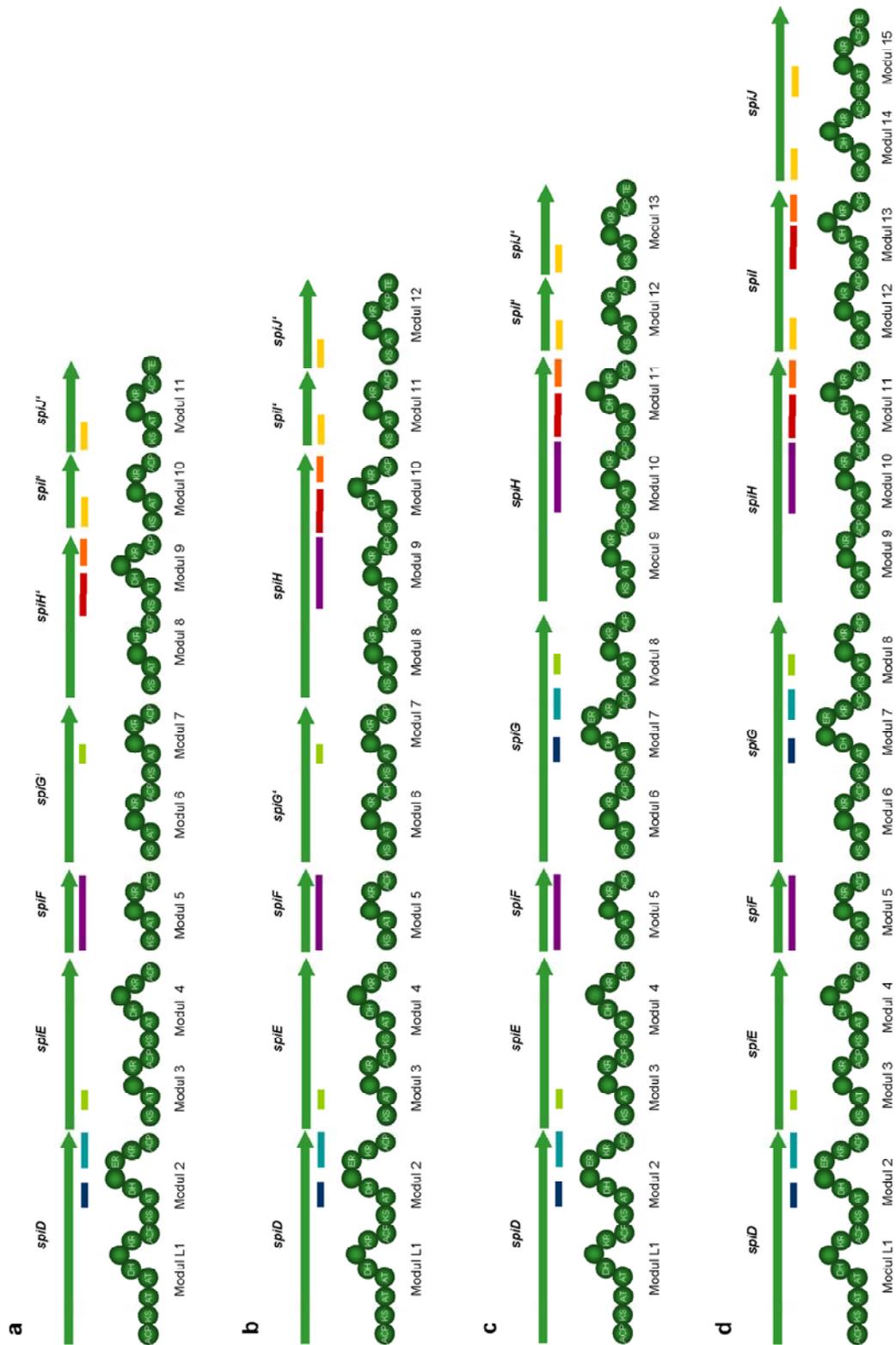


Abbildung 5.16: Der Spirangien-Biosynthesegenlocus (d) und mögliche Vorläufer (a - c). Vorläufergene zu den heutigen Biosynthesegenen sind durch Striche gekennzeichnet. Die Lage der repetitiven Bereiche ist farblich markiert.

Rekombinationsereignisse und Deletionen ganzer Modul-kodierender Bereiche sind für das Biosynthesegencluster des Polyen-Antibiotikums Nystatin in *Streptomyces* sp. beschrieben und für das Gencluster des zyklischen Pentapeptides Nodularin in einem Cyanobakterium postuliert worden. In diesen Fällen konnten die evolutionär verwandten Gencluster identifiziert und ihre Biosyntheseprodukte charakterisiert werden (138;139). Spirangiene werden von einer Reihe von *S. cellulosum*-Stämmen produziert (21), und die Resequenzierung der zugehörigen Biosynthesegencluster sowie die systematische Suche nach verkürzten Spirangienderivaten könnte weitere Erkenntnisse über die Entwicklung des vorhandenen Spirangien-Biosynthesegenclusters bringen.

Die vorgestellten Beispiele zeigen, wie Rekombinationsereignisse in den Biosynthesemaschinerien zur Entwicklung neuer Sekundärmetabolite führen können. Eine alternative Strategie zur Erweiterung des biosynthetischen Potentials einer Art ist der horizontale Gentransfer (HGT) von Biosynthesegenen durch nah oder auch nur entfernt verwandte Organismen (70;140-142). Die Mobilität kompletter Biosynthesewege wird dadurch erleichtert, dass die entsprechenden Gene häufig in einem Operon organisiert sind. Ein Hinweis auf ein HGT-Ereignis ist das Vorkommen Transposase-ähnlicher Sequenzen in der Nähe der Biosynthesegenloci (140). Dieses Phänomen wird in einigen Fällen beobachtet (z. B. (99;139;143)). Überreste eines solchen Transposase-kodierenden Bereiches sind auch stromaufwärts des Spirangien-Biosynthesegenlocus zu finden. Im Fall der Spirangien-PKS scheint das vorhandene Gencluster in *S. cellulosum* So ce90 das Resultat von sowohl HGT- als auch Duplikationsereignissen zu sein.

Der modulare Aufbau der Typ I PKS macht sie zu idealen Kandidaten für biokombinatorische Ansätze. Das gilt nicht nur für Deletionen, Substitutionen oder Mutationen einzelner Module oder Domänen mittels gentechnischer Methoden im Labor (13;16), sondern auch für die Entwicklung neuer Biosynthesemaschinerien in der Natur. Die Rekombination vorhandener enzymatischer Aktivitäten ermöglicht es den Mikroorganismen, mit geringem Aufwand eine chemische Diversität zu gewährleisten. Diese biosynthetische Flexibilität kann für den Produzenten bei der Besetzung von ökologischen Nischen einen wichtigen Wettbewerbsvorteil darstellen (144). Die evolutionäre Entwicklung des Spirangien-Biosynthesegenclusters mag als Optimierung einer Leitstruktur hinsichtlich ihrer biologischer Aktivität betrachtet werden, welcher Art auch der Nutzen für den Produzenten sei. Durch die genaue Analyse solcher Evolutionswege können biokombinatorische Kenntnisse erlangt werden, die bei der Optimierung der Biosynthesemaschinerien potentieller Wirkstoffe im Labor angewendet werden können.

## 5.5 Evolution im Schüttelkolben? Produktion verkürzter Spirangiene durch die Mutante BFA3KO

### 5.5.1 Neue Spirangien-Derivate der Mutante BFA3KO

Die Mutante BFA3KO ist eine Inaktivierungsmutante von *deoRB* in *S. cellulosum* So ce90. *deoRB* kodiert für einen Transkriptionsfaktor (vergleiche 5.6) und liegt nicht im Spirangien-Biosynthesegencluster oder seiner Nähe. BFA3KO produziert keines der bekannten Spirangiene, aber zwei Gruppen neuer Derivate. Durch Bestimmung der präzisen Massen war es möglich, die Summenformeln der Derivate zu ermitteln. Gegenüber Spirangien A ( $C_{41}H_{66}O_9$ ) fehlen  $C_3H_4$  bzw.  $C_3H_4O$ , es sind jeweils auch die entsprechenden Derivate beider Diastereomere (*E* und *Z*) von Spirangien B vorhanden. Die UV-Spektren der Verbindungen entsprechen den charakteristischen UV-Spektren der Spirangiene, sind aber um 30 nm in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben. Diese Verschiebung ist typisch für die Verkürzung eines konjugierten Systems um eine Doppelbindung (145). Für ein Spirangien-Derivat mit einem um eine Doppelbindung verkürzten konjugierten System und der Summenformel  $C_{38}H_{62}O_9$  lassen sich vor dem Hintergrund der bekannten Biosynthesewege zwei Strukturvorschläge ableiten (Abbildung 5.17). Im ersten Strukturvorschlag (2) fehlt gegenüber Spirangien A (1) eine aus Methylmalonat stammende C3-Einheit, die während der Biosynthese von Modul 9 eingeführt wird. Das nachfolgende Modul 10 besitzt keine DH-Domäne, wie das Prinzip der Kolinearität es anhand der Doppelbindung an C12/13 erwarten lassen würde. Diese Doppelbindung wird vermutlich wie auch die Doppelbindung an C10/11 durch die DH-Domäne von Modul 11 eingeführt (vergleiche 5.3.1). Möglicherweise ist diese DH-Domäne bei dem verkürzten Substrat nur einmal katalytisch aktiv. Ein alternativer Strukturvorschlag ist (3) (Abbildung 5.17). In diesem Fall wird eine aus Malonat stammende C2-Einheit weniger eingebaut. Zusätzlich fehlt die Methoxygruppe an C3, wahrscheinlich erkennt die entsprechende Methyltransferase SpiK das veränderte Substrat nicht. Theoretisch ist auch denkbar, dass anstatt der Hydroxylgruppe an C3 die Hydroxylgruppe an C23 nicht methyliert wird. Der zweiten Derivatgruppe fehlt zusätzlich ein Sauerstoffatom. Möglicherweise wird das verkürzte Polyketid an C20 durch SpiC oder SpiL nur unzureichend hydroxyliert.

Um Hinweise zu erlangen, ob den Derivaten von BFA3KO eine Propionat-Einheit oder eine Acetat-Einheit und eine Methoxygruppe fehlt, wurde der Mutante und dem Wildstamm L-[*Methyl*- $^2H_3$ ]-Methionin gefüttert. Die Wildstamm-Spirangiene zeigten eine Massenzunahme um +3 und +6 Masseneinheiten, entsprechend einer bzw. zwei aus dem markiertem Methionin stammenden Methylgruppen. Bei den von BFA3KO produzierten Derivaten konnte nur eine Massenzunahme um +3 Masseneinheiten festgestellt werden. Eine Isolierung und klassische Strukturaufklärung der Derivate mittels NMR wird zur Zeit durchgeführt, das Ergebnis des Fütterungsexperimentes ist aber ein Hinweis, dass es sich um eine C2-Einheit verkürzte Strukturen mit nur einer Methoxygruppe handelt.

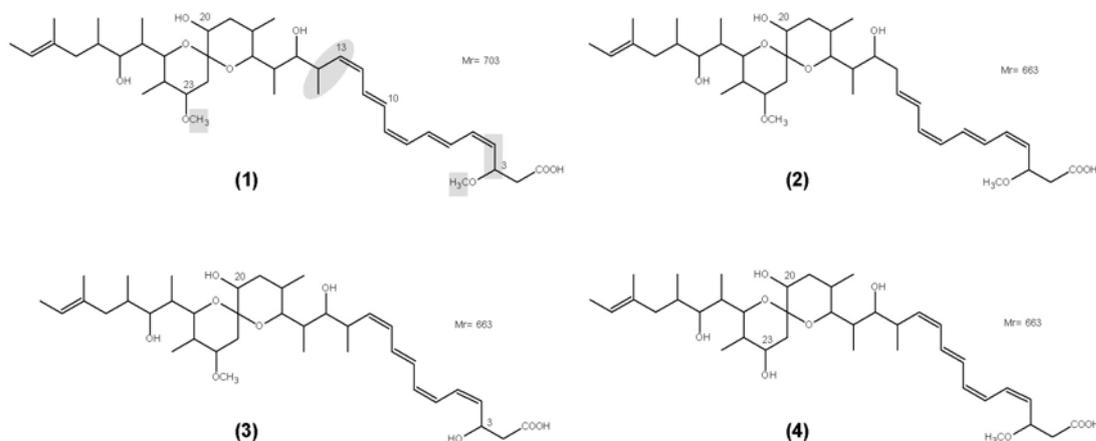


Abbildung 5.17: **Strukturen von Spirangien A (1) und möglicher Derivate der Mutante BFA3KO (2), (3) und (4).**

Die im Derivat (2) fehlende Gruppe ist in (1) durch eine graue Ellipse unterlegt, die in Derivat (3) bzw. (4) fehlenden Einheiten durch graue Kästen. Die Konformation der Doppelbindungen am Carboxylterminus der Derivate mag von den vorgestellten Strukturen abweichen, abhängig davon, welches Modul inaktiv ist. Einer weiteren Reihe von Derivaten fehlt zusätzlich ein Sauerstoffatom, möglicherweise ist C20 in diesen Derivaten nicht hydroxyliert.

### 5.5.2 Genotypische Analyse von BFA3KO

Die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung deuten darauf hin, dass entweder das Methylmalonat-einführende Modul 9 oder ein mit Malonat-verlängerndes Modul der Spirangien PKS in der Mutante BFA3KO nicht aktiv ist. Im letzten Fall kommen die Module 10 bis 14 in Frage, da das konjugierte Doppelbindungssystem betroffen ist. Das um eine Malonat-Einheit verkürzte Produkt wird vermutlich von der Methyltransferase SpiK nicht erkannt, so dass die Methylierung der Hydroxylgruppe an C3 unterbleibt. In der Mutante wurde ein Transkriptionsfaktor inaktiviert (vergleiche 5.6), es erscheint unwahrscheinlich, dass das veränderte Produktspektrum auf diese Inaktivierung zurückzuführen ist. Die PKS kodierenden Gene des Spirangien-Biosynthesegenclusters sind in einem Operon organisiert, abgesehen von *spiG* (356 bp nicht-kodierende Sequenz stromaufwärts) sind maximal 19 bp Abstand vor den einzelnen Genen, und sie sind allem Anschein nach transkriptionell gekoppelt. Die veränderte Transkription von mehreren PKS kodierenden Genen würde nicht die Inaktivität eines einzelnen Moduls dieser PKS erklären. Für die Pikromycin/Methymycin PKS in *Streptomyces venezuelae* konnte gezeigt werden, dass für die Translation von *pikAIV*, welches das sechste und letzte Modul der PKS kodiert, in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen verschiedene Start-Kodons genutzt werden. Je nachdem, welches der beiden Start-Kodons genutzt wird, resultiert eine vollständige oder verkürzte KS-Domäne und 14-gliedriges oder 12-gliedriges Produkt entsteht (146;147). Wu *et al.* konnten allerdings zeigen, dass auch das verkürzte Modul

6 *in vivo* in der Lage ist, das 14-gliedrige Produkt zu bilden (148). Ein Wechsel der Kultivierungsbedingungen kann zu einer Veränderung von komplexen Vorgängen in der Zelle führen und auch die Regulation der Sekundärstoffproduktion betreffen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Inaktivierung eines Transkriptionsfaktors einen Teileffekt dieser komplexen Änderung nachstellt und so indirekt zur Produktion verkürzter Derivate führt. Wahrscheinlicher ist jedoch ein anderes Szenario.

Das Spirangien-Biosynthesegencluster zeigt eine Reihe von Sequenzwiederholungen und ist in der vorhandenen Form vermutlich durch mehrere Duplikationen entstanden (siehe oben). Im Fall der Nystatin PKS aus *Streptomyces* sp. führte die Deletion eines kompletten Modul-kodierenden Bereiches über einen (artifizial eingeführten) homologen Sequenzbereich zur Produktion verkürzter Nystatin-Derivate (Abbildung 5.18, (138)). Ein solches Szenario scheint wegen der Sequenzwiederholungen auch für die Spirangien PKS denkbar, gerade der kodierende Bereich für die KS-AT-Domänen von Modul 14 und 15 ist hochhomolog (Abbildung 5.16, d). Der Modul 9 kodierende Bereich von *spiH* der Mutante wurde nach schrittweiser Amplifizierung sequenziert, es konnte weder eine Deletion noch eine Mutation gegenüber der Wildstammsequenz festgestellt werden. Um herauszufinden, ob eine größere Deletion im Bereich des Modul 10 bis 14 kodierenden Sequenzbereiches Ursache für die Produktion der verkürzten Derivate ist, wurde genomische DNA der Mutante und des Wildstammes parallel mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in zwei Southern Blots analysiert. In allen Fällen hybridisierten sowohl von der Mutanten- als auch der Wildstamm-DNA Fragmente gleicher Größe mit den Sonden. Eine Deletion eines größeren Bereiches wie einer ganzen Modul-kodierenden Region ist damit auszuschließen. Möglicherweise führt die Deletion eines kleineren Sequenzbereiches wie den etwa 200 bp großen ACP-kodierenden Regionen oder auch eine Punktmutation zur Inaktivierung und dem Überspringen eines Modules. Für die Myxochromid S PKS-NRPS konnte gezeigt werden, dass nach Substitution eines konservierten Serin-Restes an einem PCP das entsprechende Modul in der Biosynthese übersprungen wird (86). Um weitere Aussagen über Rekombinationen und Mutationen im Modul 10-14 kodierenden Bereich des Spirangien-Biosynthesegenclusters machen zu können, muss der betreffende Bereich aus der Mutante BFA3KO sequenziert werden.

Sowohl die Ergebnisse der phänotypischen Analyse, als auch die Sequenzierung von *spiH* in der Mutante deuten darauf hin, dass es sich bei dem verkürzten Hauptderivat um die in Abbildung 5.17 abgebildete Struktur (3) oder (4) handelt. Gewissheit wird die Aufreinigung und Strukturklärung der Derivate per NMR bringen, die zur Zeit durchgeführt wird. Möglicherweise lassen sich aus der Stereochemie der Doppelbindungen Hinweise ableiten, welches Modul inaktiv ist. Auch für die genotypische Charakterisierung der Mutante sind weitere Experimente geplant. Nach Integration eines Vektors in den 3`distalen Teil des Spirangien-Biosynthesegenclusters soll der Vektor mit umgebender chromosomaler Sequenz aus der Doppelmutante zurückgewonnen werden.

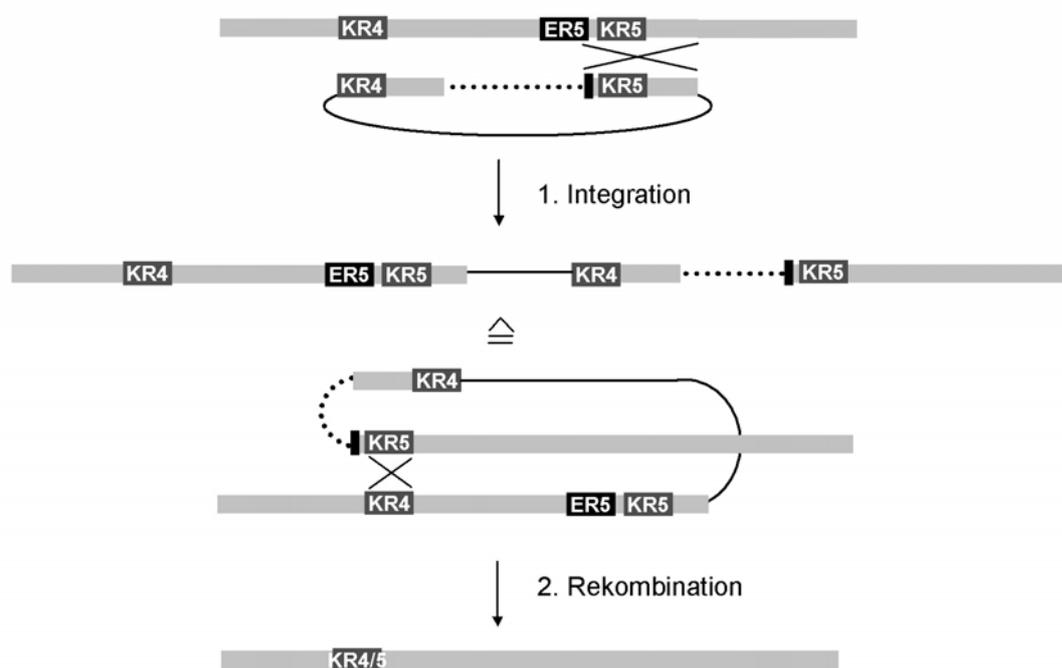


Abbildung 5.18: **Rekombination in dem NsyC kodierenden Bereich der Nystatin PKS.**

Nach Integration eines Konstruktes über einen homologen, die KR von Modul 5 kodierenden Bereich resultiert eine Mutante mit Sequenzwiederholungen im Modul 4/Modul 5 kodierenden Bereich. Entgegen der erwünschten zweiten Rekombination über den KR4 kodierenden Bereich, welche zur Verkürzung des ER-Domänenkodierenden Bereichs (Modul 5) geführt hätte, fand die Rekombination über die KR-kodierenden Sequenzen für Modul 4 und 5 statt. Dadurch kam es zur Deletion eines kompletten Modul-kodierenden Sequenzbereiches.

Das Insert des gewonnenen Plasmides könnte in kleinen Fragmenten in Sequenziervektoren subkloniert, sequenziert und anhand der Wildstammsequenz rekonstruiert werden. Auf diese Weise könnte der entsprechende 26 kb große Bereich des Clusters in BFA3KO mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand sequenziert werden. Da für *S. cellulosum* So ce90 wegen eines breiten Spektrums an Resistenzen nur sehr wenige Selektionsmarker eingesetzt werden können, ist die erstmalige Generierung einer Doppelmutante von *S. cellulosum* So ce90 dabei die nächste Hürde, die es zu nehmen gilt. Eine einfache PCR mit chromosomaler DNA als Matritze und anschließender Sequenzierung des Amplifikates ist wegen der repetitiven Sequenzen in diesem Bereich nicht möglich.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei der Mutante BFA3KO zu Mutationen im Spirangien-Biosynthesegencluster gekommen ist, welches in der Produktion von verkürzten Derivaten resultiert. Es wird angenommen, dass Rekombinationsereignisse und Punktmutationen in der Natur eine wichtige Rolle bei Entwicklung der chemischen Diversität der Produzenten spielen (40;70). Im Fall der Mutante BFA3KO hat eine solche Entwicklung möglicherweise direkt vor unseren Augen im Schüttelkolben stattgefunden.

## 5.6 Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulorum* So ce90

Für die Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in dem Epothilon-Produzenten *S. cellulorum* So ce90 wurden sowohl der Stamm A1 als auch D48 verwendet. Der Stamm *S. cellulorum* So ce90A1 entstammt einer einzelnen Kolonie des Wildisolats, *S. cellulorum* So ce90D48 dagegen ist im Rahmen der Produktionsoptimierung von Epothilonen durch eine Reihe von UV-Mutagenesen entstanden (K. Gerth, persönliche Mitteilung). Diese UV-Mutante produziert mit erhöhter Ausbeute die pharmakologisch interessanteren Epothilone C und D, nur Spuren Epothilon A und B und keine Spirangiene. Epothilon A und B entstehen durch Epoxidierung der Biosynthesevorstufen Epothilon C und D durch die Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenase EpoF (auch als EpoK bezeichnet) (Abbildung 5.19, (149;150)), welche direkt am 3'-Ende des Epothilon-Biosynthesegenclusters kodiert ist (75;76). Zu Beginn dieser Arbeit wurde *epoF* aus *S. cellulorum* So ce90D48 sequenziert. Durch die UV-Mutagenese ist es zu drei Punktmutationen in der DNA-Sequenz gekommen, welche auf Proteinebene zu zwei Substitutionen führen: ein Leucin-Rest in Position 270 ist in der Mutante durch Prolin ersetzt, ein Arginin-Rest an Position 296 durch Cystein. Diese Mutationen liegen im Bereich der I-Helix von EpoF (151), einer der höchstkonservierten Regionen in Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen, welche für die Sauerstoff-Aktivierung entscheidend ist (62). Wahrscheinlich führen diese Punktmutationen dazu, dass EpoF in *S. cellulorum* So ce90D48 inaktiv ist. Die geringen Mengen an produziertem Epothilon A und B sind vermutlich auf andere Stoffwechselaktivitäten zurückzuführen.

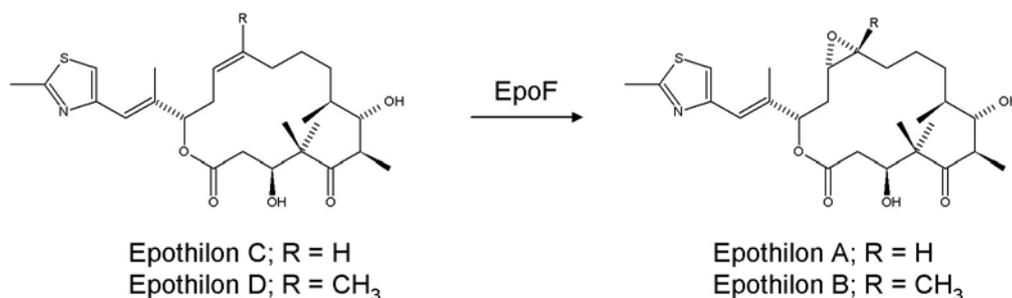


Abbildung 5.19: Biosynthese von Epothilon A und B ausgehend von Epothilon C und D durch EpoF

Zwei verschiedene Strategien wurden angewendet, um regulatorische Proteine der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulorum* So ce90 zu identifizieren. Grundlage beider Ansätze ist die Tatsache, dass *S. cellulorum* So ce90 und der Modellstamm *S. cellulorum* So ce56 nahe verwandt sind (K. Gerth, persönliche Mitteilung) und deshalb ein hoher Anteil hochhomologer Gene zu erwarten ist. Die Genomsequenz von *S. cellulorum* So ce56 wurde parallel zu dieser Arbeit im Rahmen des *S. cellulorum* So ce56 Genomprojektes verfügbar ((152) und *S. cellulorum* Genomprojekt des BMB+F Genomik-Netzwerkes, zur Publikation eingereicht).

In der ersten Strategie wurde versucht, Proteine aus *S. cellulorum* So ce90, welche an die Epthilon-Promotorregion gebunden hatten, mit Hilfe der *S. cellulorum* So ce56-Genomsequenz zu identifizieren und anschließend in *S. cellulorum* So ce90 zu charakterisieren (Ergebnisse 4.3.2). Zwei Proteine mit potentiell regulatorischer Funktion aus *S. cellulorum* So ce56 wurden so identifiziert. Mittels PCR und Hybridisierungsexperimenten mit der Cosmidbank gelang es, die entsprechenden homologen Gene im *S. cellulorum* So ce90-Chromosom aufzuspüren. Nach der Sequenzierung wurde das Gen *pbp4* in *S. cellulorum* So ce90D48 und das zweite Gen *deoRB* in *S. cellulorum* So ce90D48 und *S. cellulorum* So ce90A1 inaktiviert, was jedoch in keinem der Fälle zu einem signifikanten Effekt auf die Sekundärstoffproduktion führte. Pbp4 zeigt Ähnlichkeit zu Serin-Threoninkinasen, welche Phosphatreste auf Serin- und Threonin-Reste übertragen. Durch die Phosphorylierungskaskade können Signale innerhalb der Zelle weitergeleitet werden (153). Serin-Threoninkinasen agieren üblicherweise nicht mit DNA, und bei der *in silico* Analyse von Pbp4 konnte kein charakteristisches DNA-Bindemotiv identifiziert werden. Eventuell ist dieses Protein über eine starke spezifische Interaktion mit einem Protein, welches an die Epthilon-Promotorregion bindet, isoliert worden. Eine unspezifische Bindung ist aber nicht auszuschließen, sie würde auch das Ausbleiben eines Effektes auf die Sekundärstoffproduktion nach Inaktivierung von *pbp4* erklären. DeoRB besitzt nach *in silico* Analyse eine charakteristische DNA-Binderegion und zeigt Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren, welche unter anderem an der Regulation des Zuckerstoffwechsels in *Salmonella* sp. und anderen Organismen beteiligt sind (154). Die Inaktivierung von *deoRB* bleibt ohne Auswirkung auf die Epthilonproduktion, sowohl im Wildstamm, als auch in der bereits produktionsoptimierten UV-Mutante *S. cellulorum* So ce90D48. Es wurden mehrere parallele Mutanten untersucht, eine der vier Mutanten von *S. cellulorum* So ce90A1 produzierte lediglich verkürzte Spirangien-Derivate, die anderen gar keine Spirangiene. Die Produktion der verkürzten Derivate ist wahrscheinlich nicht auf die Inaktivierung von *deoRB* zurückzuführen (5.5). Dass aus einzelnen Kolonien angezogene Kulturen von *S. cellulorum* So ce90 spontan keine Spirangiene produzieren, kommt vereinzelt vor und erschwert die Auswertung der Mutageneseexperimente. Um solche spontanen Effekte auszuschließen, werden generell mehrere Mutanten parallel analysiert. Aus der Produktion von Spirangienderivaten der Parallelmutante ist aller Wahrscheinlichkeit nach zu schließen, dass die Inaktivierung von *deoRB* keinen direkten Effekt auf die Transkription der Spirangien-Biosynthesegene hat. Auch hier hat eventuell eine unspezifische Bindung an den Epthilon-Promotor stattgefunden, möglicherweise wird die Inaktivierung von DeoRB aber auch durch andere Mechanismen der komplexen Zellregulation kompensiert. Es kann auch nicht mit letzter Gewissheit ausgeschlossen werden, dass die inaktivierten Proteine nicht die Proteine sind, die mit der Epthilon-Promotorregion isoliert wurden. Die Strategie des „Promotor-Fischens“ regulatorischer Proteine aus *S. cellulorum* So ce90 und nachfolgender Charakterisierung über den Vergleich mit *S. cellulorum* So ce56-Proteinen führte nicht zur Identifizierung regulatorischer Proteine der Epthilon- und Spirangienproduktion. Dass diese Technik

prinzipiell anwendbar ist, zeigen die Ergebnisse des „Promotor-Fischens“ von regulatorischen Proteinen aus *S. celluloseum* So ce56- und *Myxococcus xanthus* DK1622-Gesamtprotein. In beiden Fällen konnten „gefischte“ Proteine über die verfügbaren Genomdaten identifiziert und experimentell als Regulatoren des Sekundärmetabolismus charakterisiert werden ((18) und C. Kegler, persönliche Mitteilung).

Der zweite Ansatz zur Identifizierung regulatorischer Proteine in *S. celluloseum* So ce90 war die Suche nach homologen Genen zu Genen bereits experimentell charakterisierter Regulatoren in *S. celluloseum* So ce56. Für *deoRA* (später umbenannt in *chiR*) und *ntcA* ist bekannt, dass deren Inaktivierung zu einer reduzierten bzw. verstärkten Produktion des Sekundärmetaboliten Chiovosazol führt. Die Produktion eines zweiten Metaboliten - Etnangien - ist von der Mutagenese nicht betroffen ((18) und S. Rachid, persönliche Mitteilung). Die Inaktivierungskonstrukte für die entsprechenden Gene aus *S. celluloseum* So ce56 *deoRA* und *ntcA* wurden in *S. celluloseum* So ce90A1 und *S. celluloseum* So ce90D48 transformiert (in letzteren nur das *deoRA*-Konstrukt). In allen Fällen wurden die Konstrukte in das *S. celluloseum* So ce90-Chromosom integriert, was darauf hinwies, dass tatsächlich *deoRA*- und *ntcA*-homologe Gene in *S. celluloseum* So ce90 vorhanden sind. Nach Integration des *ntcA*-Inaktivierungskonstruktes konnte kein Effekt auf die Sekundärstoffproduktion nachgewiesen werden und die Charakterisierung des Integrationsortes wurde nicht weiter verfolgt. Anders bei *deoRA*, hier führte die Integration des Konstruktes zu einem deutlichen Effekt auf die Sekundärstoffproduktion: Die entsprechende Mutante von *S. celluloseum* So ce90D48 (DA1) produziert nur Spuren an Epothilonen, die Mutante von *S. celluloseum* So ceA1 (BFDA2) produziert ebenfalls nur Spuren an Epothilonen und keine Spirangiene. Nach einer Vektor-Rückgewinnung mit angrenzender chromosomaler DNA wurde *deoRA* aus *S. celluloseum* So ce90A1 sequenziert. Die beiden Gene in *S. celluloseum* So ce90 und *S. celluloseum* So ce56 sind hochhomolog, die abgeleiteten Proteine haben zu 96 % ähnliche und gleiche Aminosäuren (Abbildung 5.20).

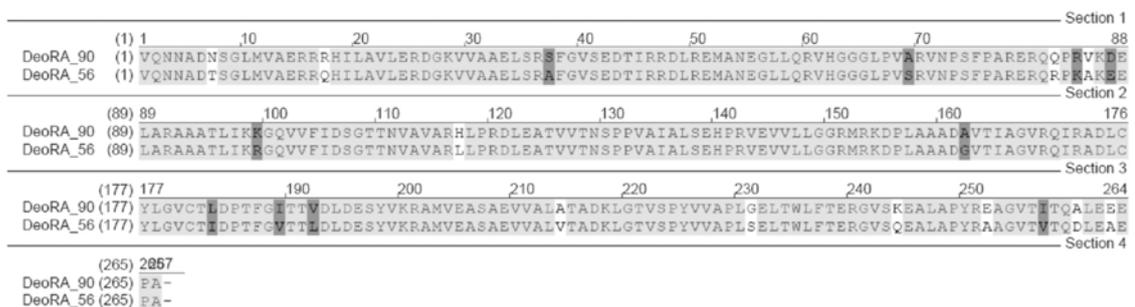


Abbildung 5.20: Sequenzvergleich von *DeoRA* aus *S. celluloseum* So ce90 und *S. celluloseum* So ce56. Identische Reste sind hellgrau unterlegt, ähnliche Reste sind dunkelgrau unterlegt.

Da die Inaktivierung von *deoRA* zu einer reduzierten Epothilonausbeute führt, ist im Rückschluß eine Produktionssteigerung nach verstärkter Expression denkbar. Um diese Hypothese zu testen, wurde *deoRA* in zwei getrennten Mutagenesen unter die Kontrolle

des *tet*-Promotorsystems und unter die Kontrolle des T7A1-Promotors gestellt (im letzten Fall zusätzlich zu einer Kopie unter Kontrolle des natürlichen Promotors). Der *tet*-Promotor ist nachgewiesenerweise in dem Myxobakterium *M. xanthus* aktiv und kann konzentrationsabhängig mit Anhydrotetrazyklin induziert werden, was allerdings durch eine geringe Toleranz des Stammes gegenüber Anhydrotetrazyklin begrenzt wird (H. B. Bode, persönliche Mitteilung). Der T7A1-Promotor wird in einer Reihe von Prokaryoten konstitutiv abgelesen und ist auch in Sorangien aktiv (18;78). In keinem Fall konnte jedoch durch die Einführung der Promotorregionen eine signifikante Produktionssteigerung erreicht werden, die Ausbeuten der Mutanten an Epothilon und Spirangien war denen des Wildstammes vergleichbar. Um festzustellen, ob DeoRA an die Promotorregionen des Epothilon- und Spirangien-Biosynthesegenclusters bindet, wurde DeoRA heterolog in *E. coli* exprimiert und entsprechende Protein-DNA-Bindungsstudien („band-shift assays“) durchgeführt. Auch nach mehrfacher Variation der Versuchsbedingungen konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Für das homologe Protein ChiR/DeoRA in *S. celluloseum* So ce56 konnte durch die Einführung des T7A1-Promotors eine Produktionssteigerung von Chivosazol erreicht werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass DeoRA an die Region stromaufwärts des Chivosazol-Biosynthesegenclusters bindet und somit die Transkription der Biosynthesegene direkt reguliert. Die Promotorregion konnte durch weitere Experimente auf ein 153 bp Fragment eingegrenzt werden (18). Vergleicht man diesen 153 bp großen Bereich mit den Promotorregionen des Epothilon- und Spirangien-Biosynthesegenclusters, so lassen sich keine signifikanten Ähnlichkeiten feststellen (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache deutet wie das Ergebnis der Bindungsstudien mit DeoRA aus *S. celluloseum* So ce90 darauf hin, dass das *S. celluloseum* So ce90 DeoRA die Transkription der Epothilon- und Spirangien-Biosynthesegene nicht direkt beeinflusst. Trotz der direkten Regulation der Chivosazol-Produktion durch DeoRA in *S. celluloseum* So ce56 ist die Produktionssteigerung nach verstärkter Expression des Regulators deutlich geringer als die Produktionsminderung nach Inaktivierung des Regulator-Gens (etwa Faktor 4 gegenüber Faktor 50). Möglicherweise nivellieren andere Komponenten der Zellregulation oder auch die eingeschränkte Verfügbarkeit von Biosynthesevorstufen sowohl in *S. celluloseum* So ce56 als auch in *S. celluloseum* So ce90 den Effekt einer verstärkten DeoRA-Transkription.

Die Inaktivierung von DeoRA in *S. celluloseum* So ce56 führt nicht nur zu einer reduzierten Chivosazol-Produktion, auch die Fruchtkörperbildung ist durch die Mutagenese betroffen (18). Auch die Inaktivierung von DeoRA in *S. celluloseum* So ce90 führt zu mehreren Effekten, da die Produktion beider aus diesem Stamm bisher bekannten Sekundärmetabolite drastisch reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar ist. Ein möglicher Effekt auf die Fruchtkörperbildung kann nicht untersucht werden, da der an homogenes Wachstum adaptierte Stamm die Fähigkeit zur Fruchtkörperbildung verloren hat (K. Gerth, Persönliche Mitteilung). Bei DeoRA aus *S. celluloseum* So ce56 handelt es sich um einen pleiotropen Regulator, möglicherweise trifft dies auch für DeoRA aus *S. celluloseum* So ce90 zu. Ungewöhnlicherweise scheinen beide positive

Regulatoren des Sekundärmetabolismus zu sein, bisher beschriebene DeoR-ähnliche Transkriptionsfaktoren sind als Repressoren charakterisiert worden (z.B. (155)).

Die Produktionsoptimierung von bakteriellen Produzenten durch ungerichtete UV-Mutagenese oder mutagene Chemikalien ist extrem kosten- und zeitaufwändig, nicht selten werden zehntausende von Mutanten generiert und untersucht (149). Die verstärkt verfügbar werdenden Genomsequenzen erlauben eine gerichtete Mutagenese möglicher regulatorischer Genloci. Per *in silico* Analyse identifizierte regulatorische Genloci können systematisch inaktiviert und die Effekte auf die Sekundärstoffproduktion oder andere Zellfunktionen beobachtet werden (L. Kroos, S. Inouye, D. Krug, R. Müller, persönliche Mitteilung). Alternativ dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, durch die Verknüpfung von genomischer Sequenzinformation mit den Ergebnissen protein-biochemischer Experimente gezielt Regulatoren der Sekundärstoffproduktion zu identifizieren. Dies war für Regulatoren aus *S. cellulosum* So ce56 gelungen (18), im Fall von *S. cellulosum* So ce90 konnte auf diese Weise bisher kein direkter Regulator der Sekundärstoffproduktion identifiziert werden. Erschwert wird das Unterfangen dadurch, dass nur die Genomsequenz des nah verwandten Stammes *S. cellulosum* So ce56 genutzt werden kann. Die große Ähnlichkeit von in beiden Stämmen bekannten Genen zeigt aber, dass dieser Ansatz prinzipiell möglich ist. In weiteren Versuchen kann die Methodik des „Promotor-Fischens“ von *S. cellulosum* So ce90-Protein verbessert werden, eine höhere Ausbeute an spezifisch bindenden Protein wird auch die Identifizierung über das translatierte *S. cellulosum* So ce56 Genom erleichtern. Die nahe Verwandtschaft der beiden Stämme konnte im Rahmen dieser Arbeit dazu genutzt werden, das für *S. cellulosum* So ce56 generierte Wissen über regulatorische Proteine auf *S. cellulosum* So ce90 anzuwenden. Auf diese Weise konnte mit DeoRA ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden, dessen Inaktivierung zu einer drastischen Senkung der Produktausbeuten führt. Weitere Experimente werden folgen, um dessen Funktionsweise bei der Regulation der Sekundärstoffproduktion genauer zu untersuchen. Wieder kann hier die nahe Verwandtschaft zu *S. cellulosum* So ce56 genutzt werden, für den seit kurzem ein DNA-Microarray vorhanden ist. Auf diesem Microarray sind auch die aus *S. cellulosum* So ce90 bekannten Biosynthesegencluster für Epothilon und Spirangien repräsentiert, ebenso wie die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten regulatorischen Genloci. Die Ergebnisse bisher durchgeführter Hybridisierungsexperimente (C. Kegler, persönliche Mitteilung) stimmen optimistisch, mit dieser Technik bald weitere Einblicke in die komplexen regulatorischen Netzwerke von *Sorangium cellulosum* gewinnen zu können. Alternativ dazu kann versucht werden, durch eine direkte transkriptionelle Aktivierung des Epothilon-Biosynthesegenclusters eine Produktionssteigerung zu erreichen. Nach Einbringung eines konstitutiven Promotors vor das Myxochromid A-Biosynthesegencluster in *M. xanthus* werden deutlich gesteigerte Produktausbeuten erhalten (S. Wenzel, persönliche Mitteilung).

Die von *S. cellulosum* So ce90 produzierten Epothilone, vor allem Epothilon D, sind auch bei solchen Tumorzelllinien wirksam, die gegen den standardmäßig eingesetzten Polymerisationshemmer Paclitaxel (Taxol®) resistent sind (156). Paclitaxel wird auf

aufwändige Weise semisynthetisch aus einer aus Nadeln von *Taxus baccata* (Europäische Eibe) isolierten Vorstufe gewonnen. Die Produktion von Epothilonen durch *S. cellulosum* So ce90 ist demgegenüber in nahezu unbegrenztem Ausmaß möglich. Allerdings ist auch die Kultivierung des natürlichen Produzenten mit Problemen verbunden. *S. cellulosum* So ce90 hat eine Generationszeit von 16 Stunden und wächst sehr langsam, was Kontaminationen begünstigt und zu langen Produktionszeiten führt. Methoden zur genetischen Manipulation sind wenig entwickelt und autonom replizierende Einheiten sind bisher nicht bekannt (21;28). Eine Alternative ist die heterologe Expression des Epothilon-Biosynthesegenclusters in einem schneller wachsenden und genetisch leichter zugänglichen Wirt. Bisher konnten die Biosynthesegene in *M. xanthus* und *Streptomyces* sp. heterolog exprimiert werden, die Ausbeuten sind jedoch gering (157;158). Nach Resynthese der Biosynthesegene und gleichzeitiger Kodon-Optimierung konnte auch eine heterologe Expression in einem *E. coli*-Stamm erreicht werden, der nach genetischer Manipulation die Voraussetzungen für eine PKS/NRPS-Biosynthese erfüllt. Die Ausbeuten hier bewegen sich allerdings am Detektionslimit (159). Nach wie vor werden deshalb Epothilone für die klinische Anwendung aus *S. cellulosum* So ce90 gewonnen. Im Rahmen dieser Arbeit ist, soweit bekannt, mit DeoRA der erste Regulator der Epothilon-Produktion in *S. cellulosum* So ce90 identifiziert worden. Dies ist ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Regulation der Sekundärstoffproduktion im natürlichen Produzenten. Mit Hilfe dieses Wissens wird es hoffentlich gelingen, in *S. cellulosum* So ce90 weitere regulatorische Mechanismen zu identifizieren, zu charakterisieren und im Sinne einer Produktionssteigerung biotechnologisch nutzbar zu machen.

## 5.7 Myxobakterielle Naturstoffforschung und der Beitrag der vorliegenden Arbeit

Myxobakterien haben sich als eine reiche Quelle an Naturstoffen erwiesen, und nach wie vor werden neue Stämme und Strukturen isoliert (23;160). Eine Methode zur Identifizierung bisher unbekannter Sekundärstoffe ist die systematische Untersuchung des Metabolitenspektrums vieler verschiedener Stämme, auch unter variierten Kultivierungsbedingungen. Auf diese Weise wurden die von *S. cellulosum* So ce90 produzierten Spirangiene identifiziert (27). Alternativ dazu kann das biosynthetische Potential eines Organismus durch Hybridisierungsexperimente und Sequenzierung erschlossen werden. Die Aurafurone wurden nach Inaktivierung des solcherart identifizierten Biosynthesegenlocus in *S. aurantiaca* DW4/3-1 entdeckt (26;47). Aurafuron und Spirangien sind reine Polyketide, und gehören damit zu einer Minderheit der aus Myxobakterien isolierten biologisch aktiven Naturstoffe. Die im Vergleich zu synthetischen Strukturen deutlich häufiger zu findende biologische Aktivität von Naturstoffen wird auf eine Vorselektion im Sinne der Evolution zurückgeführt (9). Diese Ansicht wird dadurch bestätigt, dass sich die Biosynthesemaschinerien für Aurafuron und die strukturell sehr ähnlichen Verbindungen aus Streptomyceten offensichtlich weitestgehend unabhängig voneinander entwickelt haben.

Trotz intensiver Forschung in den letzten zwei Jahrzehnten gewährt die Identifizierung neuer Gencluster und die nachfolgende funktionale Charakterisierung der Biosynthesemaschinerien weiterhin wichtige Einblicke in den Ablauf der Polyketidbiosynthese. Bisher sind beispielsweise nur wenige iterativ agierende modulare PKS bekannt (37;38), und der Mechanismus der Post-PKS Biosynthese in Spirangien, wo Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen an der Spiroketalbildung beteiligt sind, wurde hier zum ersten Mal beschrieben. Das gewonnene biosynthetische Wissen kann genutzt werden, um gezielt Strukturderivate pharmakologisch interessanter Verbindungen zu generieren. Dies kann durch Inaktivierungen von Biosynthesegenen geschehen wie im Fall der Methyltransferasen SpiB und SpiK, aber auch durch Fütterung von alternativen Biosynthesevorstufen, eventuell nach Inaktivierung der biosynthetischen Gene für die natürlichen Biosynthesevorstufen (161). Der modulare Aufbau der PKS macht sie auch zu idealen Kandidaten für biokombinatorische Ansätze, bei denen einzelne Domänen oder ganze Module deletiert, ausgetauscht oder mutiert werden (16). Auch die Natur betreibt Biokombinatorik, viele Biosynthesegencluster sind vermutlich durch Duplikationen und Deletionen von Modulen und Domänen entstanden (40). Im PKS kodierenden Teil des Spirangien-Clusters weisen große Gruppen von Sequenzwiederholungen auf mehrere Duplikationsereignisse in der Entwicklung des Biosynthesegenlocus hin. Im Fall der Mutante BFA3KO hat eine solche Evolution möglicherweise direkt im Schüttelkolben stattgefunden. Die Produktion verkürzter Spirangien-Derivate durch die Mutante zeigt, dass Mikroorganismen durch kontinuierliche Veränderung bestehender Biosynthesemaschinerien chemische Diversität gewährleisten können.

Die biotechnologische Produktion von Naturstoffen, maßgeschneiderten Naturstoffderivaten oder Vorstufen für die Semisynthese wird häufig durch geringe Ausbeuten erschwert. Die Identifizierung von kritischen Schritten in der Biosynthese wie Substratmangel oder negativen Kontrollmechanismen ermöglicht deren gezielte Manipulation mit dem Ziel der Produktionssteigerung. Mit der Identifizierung von DeoRA als Regulator der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulosum* So ce90 ist der erste Schritt zur Charakterisierung der Kontrollmechanismen der Biosynthese des potenten Zytostatikums Epothilon getan.

Die aus Myxobakterien isolierten Verbindungen leisten wie die gewonnenen Erkenntnisse zur Biosynthese und Regulation einen wichtigen Beitrag zur wirkstofforientierten Naturstoffforschung. So dankbar diese Bakterien als Forschungsgegenstand sind, so herausfordernd ist auch das praktische Arbeiten mit ihnen. Die Etablierung geeigneter Mutagenesesysteme und -methoden ist deshalb ebenso wichtig wie die Entwicklung von Methoden zur Kultivierung dieser extrem langsam wachsenden Mikroorganismen (28;162) und die Etablierung von Systemen zur heterologen Expression (163;164).



## 6 Zusammenfassung

Zu den wenigen von Myxobakterien produzierten biologisch aktiven reinen Polyketiden gehören Aurafuron und Spirangien. Beide weisen ungewöhnliche funktionale Gruppen auf: Aurafuron eine Furanon- und Spirangien eine Spiroketalstruktur. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biosynthese dieser Verbindungen durch Typ I Polyketidsynthasen (PKS) in *S. aurantiaca* DW4/3-1 bzw. *S. cellulorum* So ce90 untersucht. Das Spirangien-Biosynthesegencluster war zu Beginn der Arbeit nur zur Hälfte bekannt, die unbekannte Sequenz wurde nach Hybridisierung einer generierten genomischen Bibliothek mit einer spezifischen Sonde identifiziert und sequenziert. Beide Biosynthesegencluster wurden sowohl durch *in silico* Analysen, als auch durch zielgerichtete Mutagenesen einzelner Biosynthesegene funktional charakterisiert.

Die Aurafuron-Biosynthese in *S. aurantiaca* DW4/3-1 folgt nicht dem Kolinearitätsprinzip und schließt höchstwahrscheinlich die bisher selten beschriebene iterative Nutzung eines PKS-Modules ein. An der Post-PKS Biosynthese sind vier Oxidoreduktasen beteiligt, von denen eine möglicherweise eine Baeyer-Villiger Oxygenase darstellt. Mindestens zwei zusätzliche Aurafuron-Derivate wurden identifiziert. Der Vergleich der Biosynthesegene mit denjenigen von Aurafuron-ähnlichen Verbindungen aus *Streptomyces* sp. weist darauf hin, dass sich die Biosynthesewege größtenteils unabhängig voneinander entwickelt haben.

Die Spirangien-Biosynthese in *S. cellulorum* So ce90 folgt weitestgehend dem Kolinearitätsprinzip. Durch die Inaktivierung zweier Methyltransferasen wurde eine Reihe neuer Desmethylderivate generiert und nachfolgend strukturell charakterisiert. Die Ergebnisse der Inaktivierungen der Cytochrom P<sub>450</sub> Monooxygenasen zeigen, dass diese Enzyme an der Bildung der Spiroketalfunktion beteiligt sind. Das Vorhandensein mehrerer größerer Sequenzwiederholungen im Biosynthesegencluster lässt darauf schließen, dass während der evolutionären Entstehung des Genclusters mindestens drei Duplikationsereignisse stattgefunden haben. Im Laufe der Arbeit wurde eine Mutante identifiziert, welche verkürzte Spirangienderivate produziert. Die Ergebnisse der phänotypischen und genotypischen Charakterisierung dieser Mutante deuten darauf hin, dass eine spontane Mutation im Biosynthesegencluster die Produktion der neuen Derivate verursacht hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem mögliche regulatorische Proteine der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulorum* So ce90 identifiziert und charakterisiert. Anhand der Ähnlichkeit zum Regulator der Chivosazolproduktion ChiR im sequenzierten Modellstamm *S. cellulorum* So ce56 konnte ein Gen (*deoRA*) identifiziert und sequenziert werden, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Die Inaktivierung von *deoRA* führte zum Verlust der Spirangienproduktion und zur deutlichen Minderung

der Epothilonproduktion. Die Einbringung zweier alternativer Promotoren vor *deoRA* führte nicht zu einer Produktionssteigerung von Spirangien oder Epothilon. Daraus ist zu schliessen, dass DeoRA für die Produktion nicht limitierend ist. Eine Bindung von DeoRA an die Spirangien- und Epothilon-Promotorregion konnte nach heterologer Expression des Proteins *in vitro* nicht nachgewiesen werden. DeoRA beeinflusst die Transkription der Biosynthesegene mit hoher Wahrscheinlichkeit indirekt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Kenntnisse über den Ablauf und die Evolution der Aurafuron- und Spirangien-Biosynthese gewonnen werden. Zielgerichtete Mutagenesen führten zur Produktion neuer Naturstoffderivate. Die erstmalige Identifizierung eines Regulators der Sekundärstoffproduktion in *S. cellulosum* So ce90 ermöglicht weitere Untersuchungen zur Regulation der Sekundärstoffproduktion in dem Epothilon-Produzenten.

## 7 Abstract

Only few of the biologically active compounds produced by myxobacteria are pure polyketides. Among these, aurafuron and spirangien display interesting functional groups: aurafuron contains a furanone moiety and spirangien exhibits a spiroketal function. In this study, the biosynthesis of these compounds in *S. aurantica* DW4/3-1 and *S. cellulosum* So ce90 by type I polyketide synthases (PKSs) was investigated. The sequence of the spirangien biosynthetic gene locus was identified by screening of a genomic library with a specific probe and sequenced. The biosynthetic gene clusters were characterized by both, *in silico* analyses and the analysis of targeted gene inactivation experiments.

Aurafuron biosynthesis in *S. aurantica* DW4/3-1 does not follow the canonical colinearity rule and most likely includes the iterative usage of a module, a feature that has only been rarely reported for type I PKS. Four oxidoreductases are involved in post-PKS biosynthesis, one of them is presumably acting as a Baeyer-Villiger monooxygenase. At least two so far unknown derivatives were identified. The comparison of the biosynthetic genes with such responsible for the formation of very similar compounds from *Streptomyces* sp. suggests that the biosynthetic pathways developed independently of each other.

The biosynthesis of spirangien in *S. cellulosum* So ce90 is almost following the colinearity paradigm. The targeted inactivation of two methyltransferase encoding genes led to the production of novel desmethyl derivatives that were subsequently structurally characterized. The results of inactivation experiments of cytochrome P<sub>450</sub> monooxygenase encoding genes indicate that these enzymes are involved in the formation of the spiroketal moiety. The presence of large stretches of sequence repeats points to at least three duplication events which took place during the evolution of the biosynthetic gene locus. A mutant was identified that produces truncated spirangien derivatives. The phenotype and the genotype of the mutant were analyzed suggesting that a spontaneous mutation in the biosynthetic gene locus led to the production of the new derivatives.

Within this study proteins with a putative regulatory function in *S. cellulosum* So ce90 secondary metabolism were identified and characterized. Taking advantage of the homology to the ChiR regulator of chivosazol biosynthesis in the sequenced model strain *S. cellulosum* So ce56, a transcription factor encoding gene (*deoRA*) was identified and sequenced. The inactivation of *deoRA* led to the abolishment of spirangien production and to a dramatic decrease in epothilon formation. The introduction of two alternative promoters upstream of *deoRA* did not enhance production levels of spirangien and epothilon. Thus DeoRA does not seem to be limiting for the production of these metabolites. After heterologous expression of

DeoRA, no binding to the spirangien and epothilon promoter regions could be observed *in vitro*, suggesting that DeoRA is not directly regulating transcription of the biosynthetic genes.

During this study insight was gained into the molecular basis and the evolution of aurafuron and spirangien biosynthesis. Targeted gene manipulation led to the production of novel derivatives of these natural products. For the first time a regulatory protein of secondary metabolite production in *S. cellulosum* So ce90 could be identified. This enables further studies on the regulation of secondary metabolite formation in the epothilon producer.

## 8 Literatur

1. Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.
2. Clardy, J., Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006) New antibiotics from bacterial natural products, *Nat. Biotechnol.* 24, 1541-1550.
3. von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., and Habich, D. (2006) Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5072-5129.
4. Rachakonda, S. and Cartee, L. (2004) Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics, *Curr. Med. Chem.* 11, 775-793.
5. Nathan, C. (2004) Antibiotics at the crossroads, *Nature* 431, 899-902.
6. Walsh, C. (2003) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance* ASM Press, Washington, D.C.
7. Sarmah, A. K., Meyer, M. T., and Boxall, A. B. A. (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65, 725-759.
8. Kiyota, H. (2006) Synthesis of naturally derived bioactive compounds of agricultural interest, *Biosci Biotech Bioch* 70, 317-324.
9. Koehn, F. E. and Carter, G. T. (2005) The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discovery* 4, 206-220.
10. Demain, A. L. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 455-463.
11. Baltz, R. H. (1998) Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*, *Trends Microbiol* 6, 76-83.
12. Behal, V. (2003) Alternative sources of biologically active substances, *Folia Microbiol.* 48, 563-571.

13. Clardy, J. and Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules, *Nature* 432, 829-837.
14. Maison, W. (2006) Natural products research: renaissance with strengthened integration of biology and chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 3000-3002.
15. Bode, H. B. and Müller, R. (2005) The impact of bacterial genomics on natural product research, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 6828-6846.
16. Weissman, K. J. and Leadlay, P. F. (2005) Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides, *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 925-936.
17. Khosla, C. and Keasling, J. D. (2003) Metabolic engineering for drug discovery and development, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2, 1019-1025.
18. Rachid, S., Gerth, K., Kochems, I., and Müller, R. (2007) Deciphering regulatory mechanisms for secondary metabolite production in the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56, *Mol. Microbiol.* 63, 1783-1796.
19. Wenzel, S. C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, F. A., and Müller, R. (2005) Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in pseudomonads via red/ET recombineering, *Chem. Biol.* 12, 349-356.
20. Streit, W. R. and Schmitz, R. A. (2004) Metagenomics - the key to the uncultured microbes, *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 492-498.
21. Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., and Müller, R. (2003) Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*, *J. Biotechnol.* 106, 233-253.
22. Reichenbach, H. (2001) Myxobacteria, producers of novel bioactive substances, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 149-156.
23. Meiser, P., Bode, H. B., and Müller, R. (2006) DKxanthenes: Novel secondary metabolites from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* essential for sporulation, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19128-19133.
24. Höfle, G. and Reichenbach, H. (2005) Epothilone, a myxobacterial metabolite with promising antitumor activity, in *Anticancer agents from natural products* (Cragg, G. M., Kingston, D. G., and Newman, D. J., Eds.) pp 413-450, Taylor & Francis, Boca Raton.
25. Cortes, J. and Baselga, J. (2007) Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: The epothilones, *Oncologist* 12, 271-280.

26. Kunze, B., Reichenbach, H., Müller, R., and Höfle, G. (2005) Aurafuron A and B, new bioactive polyketides from *Stigmatella aurantiaca* and *Archangium gephyra* (myxobacteria), *J. Antibiot.* 58, 244-251.
27. Niggemann, J., Bedorf, N., Flörke, U., Steinmetz, H., Gerth, K., Reichenbach, H., and Höfle, G. (2005) Spirangien A and B, highly cytotoxic and antifungal spiroketals from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*: isolation, structure elucidation and chemical modifications, *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 5013-5018.
28. Kopp, M., Irschik, H., Gross, F., Perlova, O., Sandmann, A., Gerth, K., and Müller, R. (2004) Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strains So ce12 and So ce56: development of a mariner-based transposon mutagenesis system, *J. Biotechnol.* 107, 29-40.
29. Staunton, J. and Weissman, K. J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review, *Nat. Prod. Rep.* 18, 380-416.
30. Donadio, S. and Katz, L. (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*, *Gene* 111, 51-60.
31. Kao, C. M., Katz, L., and Khosla, C. (1994) Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host, *Science* 265, 509-512.
32. Sherman, D. H. and Smith, J. L. (2006) Clearing the skies over modular polyketide synthases, *ACS Chemical Biology* 1, 505-509.
33. Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms, *Chem. Rev.* 106, 3468-3496.
34. Keatinge-Clay, A. T. and Stroud, R. M. (2006) The structure of a ketoreductase determines the organization of the beta-carbon processing enzymes of modular polyketide synthases, *Structure* 14, 737-748.
35. Broadhurst, R. W., Nietlispach, D., Wheatcroft, M. P., Leadlay, P. F., and Weissman, K. J. (2003) The Structure of Docking Domains in Modular Polyketide Synthases, *Chem. Biol.* 10, 723-731.
36. Weissman, K. J. (2006) The structural basis for docking in modular polyketide biosynthesis, *ChemBioChem* 7, 485-494.
37. Moss, S. J., Martin, C. J., and Wilkinson, B. (2004) Loss of co-linearity by modular polyketide synthases: a mechanism for the evolution of chemical diversity, *Nat. Prod. Rep.* 21, 575-593.

38. Wenzel, S. C. and Müller, R. (2005) Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from text book biosynthetic logic, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 447-458.
39. Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T., and Omura, S. (1999) Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9509-9514.
40. Jenke-Kodama, H., Borner, T., and Dittmann, E. (2006) Natural biocombinatorics in the polyketide synthase genes of the actinobacterium *Streptomyces avermitilis*, *Plos Computational Biology* **2**, 1210-1218.
41. Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms, *Nature* **400**, 897-899.
42. Moore, B. S. and Hopke, J. N. (2001) Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway, *ChemBioChem* **2**, 35-38.
43. Piel, J., Wen, G. P., Platzer, M., and Hui, D. Q. (2004) Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase, *ChemBioChem* **5**, 93-98.
44. El-Sayed, A. K., Hothersall, J., Cooper, S. M., Stephens, E., Simpson, T. J., and Thomas, C. M. (2003) Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586, *Chem. Biol.* **10**, 419-430.
45. Müller, R. (2004) Don't classify polyketide synthases, *Chem. Biol.* **11**, 4-6.
46. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
47. Silakowski, B., Kunze, B., and Müller, R. (2001) Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*, *Gene* **275**, 233-240.
48. Silakowski, B., Nordsiek, G., Kunze, B., Blöcker, H., and Müller, R. (2001) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15, *Chem. Biol.* **8**, 59-69.
49. Silakowski, B., Schairer, H. U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S., and Müller, R. (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria: the myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, *J. Biol. Chem.* **274**, 37391-37399.

50. Gaitatzis, N., Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G., and Müller, R. (2002) The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase, *J. Biol. Chem.* 277, 13082-13090.
51. Ligon, J., Hill, S., Beck, J., Zirkle, R., Monar, I., Zawodny, J., Money, S., and Schupp, T. (2002) Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26, *Gene* 285, 257-267.
52. Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J., and Katz, L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis, *Science* 252, 675-679.
53. Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1998) Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E.coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes, *EMBO J.* 17, 1183-1191.
54. Haydock, S., Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., König, A., Marsden, A. F. A., Galloway, I. S., Staunton, J., and Leadley, P. F. (1995) Divergent structural motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acylcarrier protein transacylase domains in the modular polyketide synthases, *FEBS Lett.* 374, 246-248.
55. Yadav, G., Gokhale, R. S., and Mohanty, D. (2003) Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases, *J. Mol. Biol.* 328, 335-363.
56. Tang, L., Yoon, Y. J., Choi, C. Y., and Hutchinson, C. R. (1998) Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*, *Gene* 216, 255-265.
57. Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D. V., Hutchinson, C. R., and McDaniel, R. (2003) A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases, *Biochemistry-US* 42, 72-79.
58. Caffrey, P. (2003) Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases, *ChemBioChem* 4, 654-657.
59. Kakavas, S. J., Katz, L., and Stassi, D. (1997) Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*, *J. Bacteriol.* 179, 7515-7522.

60. Weinig, S., Mahmud, T., and Müller, R. (2003) Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: A delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain, *Chem. Biol.* 10, 953-960.
61. Weinig, S. (2003) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Atmungsketteninhibitoren Myxothiazol und Melithiazol, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Naturwissenschaftliche Fakultät, Braunschweig.
62. Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story, *Genome Biol.* 1, REVIEWS3003.
63. Davidson, S. E., Elliott, R. C., Helliwell, C. A., Poole, A. T., and Reid, J. B. (2003) The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase, *Plant Physiology* 131, 335-344.
64. Chen, H., Hubbard, B. K., O'Connor, S. E., and Walsh, C. T. (2002) Formation of beta-hydroxy histidine in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics, *Chem. Biol.* 9, 103-112.
65. Pacholec, M., Hillson, N. J., and Walsh, C. T. (2005) NovJ/NovK catalyze benzylic oxidation of a beta-hydroxyl tyrosyl-S-pantetheinyl enzyme during aminocoumarin ring formation in novobiocin biosynthesis, *Biochemistry-US* 44, 12819-12826.
66. Prado, L., Fernández, E., Weissbach, U., Blanco, G., Quirós, L. M., Braña, A. F., Méndez, C., Rohr, J., and Salas, J. A. (1999) Oxidative cleavage of premithramycin B is one of the last steps in the biosynthesis of the antitumor drug mithramycin, *Chem. Biol.* 6, 19-30.
67. Gibson, M., Nur, E. A., Lipata, F., Oliveira, M. A., and Rohr, J. (2005) Characterization of kinetics and products of the Baeyer-Villiger oxygenase MtmOIV, the key enzyme of the biosynthetic pathway toward the natural product anticancer drug mithramycin from *Streptomyces argillaceus*, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17594-17595.
68. Banskota, A. H., McAlpine, J. B., Sorensen, D., Aouidate, M., Pirae, M., Alarco, A. M., Omura, S., Shiomi, K., Farnet, C. M., and Zazopoulos, E. (2006) Isolation and identification of three new 5-alkenyl-3,3(2H)-furanones from two streptomyces species using a genomic screening approach, *J. Antibiot.* 59, 168-176.
69. Boakes, S., Oliynyk, M., Cortes, J., Bohm, I., Rudd, B. A. M., Revill, W. P., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (2004) A new modular polyketide synthase in the erythromycin producer *Saccharopolyspora erythraea*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 73-80.

70. Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., and Dittmann, E. (2005) Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases, *Mol. Biol. Evol.* 22, 2027-2039.
71. Julien, B., Tian, Z. Q., Reid, R., and Reeves, C. D. (2006) Analysis of the ambruticin and jerangolid gene clusters of *Sorangium cellulosum* reveals unusual mechanisms of polyketide biosynthesis, *Chem Biol* 13, 1277-1286.
72. Knauber, J. (2004) Untersuchungen zum Genetischen Potential der Sekundärstoffbildung von *Sorangium cellulosum* So ce90 und Identifizierung des Spirangienbiosyntheseegenclusters, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Naturwissenschaftliche Fakultät, Braunschweig.
73. Frank, B., Knauber, J., Steinmetz, H., Scharfe, M., Blöcker, H., Beyer, S., and Müller, R. (2007) Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes, *Chem. Biol.* 14, 221-233.
74. Blondelet-Rouault, M. H., Weiser, J., Lebrihi, A., Branny, P., and Pernodet, J. L. (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the omega interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*, *Gene* 190, 315-317.
75. Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D. D., Grolach, J., Mayo, J. M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J., and Ligon, J. M. (2000) The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90, *Chem. Biol.* 7, 97-109.
76. Julien, B., Shah, S., Ziermann, R., Goldman, R., Katz, L., and Khosla, C. (2000) Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*, *Gene* 249, 153-160.
77. Hillen, W. and Berens, C. (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance, *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 345-369.
78. Julien, B. and Fehd, R. (2003) Development of a mariner-Based Transposon for Use in *Sorangium cellulosum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6299-6301.
79. Voet, D. and Voet, J. G. (1995) *Biochemistry* Wiley, New York.
80. Wilkinson, B., Foster, G., Rudd, B. A., Taylor, N. L., Blackaby, A. P., Sidebottom, P. J., Cooper, D. J., Dawson, M. J., Buss, A. D., Gaisser, S., Bohm, I. U., Rowe, C. J., Cortes, J., Leadlay, P. F., and Staunton, J. (2000) Novel octaketide macrolides related to 6-deoxyerythronolide B provide evidence for iterative operation of the erythromycin polyketide synthase, *Chem. Biol.* 7, 111-117.

81. Hardt, I. H., Steinmetz, H., Gerth, K., Sasse, F., Reichenbach, H., and Hofle, G. (2001) New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies, *J. Nat. Prod.* *64*, 847-856.
82. Olano, C., Wilkinson, B., Moss, S. J., Brana, A. F., Mendez, C., Leadlay, P. F., and Salas, J. A. (2003) Evidence from engineered gene fusions for the repeated use of a module in a modular polyketide synthase, *Chem. Commun.* 2780-2782.
83. He, J. and Hertweck, C. (2003) Iteration as programmed event during polyketide assembly; Molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster, *Chem. Biol.* *10*, 1225-1232.
84. He, J. and Hertweck, C. (2005) Functional analysis of the aureothin iterative type I polyketide synthase, *ChemBioChem* *6*, 908-912.
85. Vetcher, L., Tian, Z. Q., McDaniel, R., Rascher, A., Reville, W. P., Hutchinson, C. R., and Hu, Z. (2005) Rapid engineering of the geldanamycin biosynthesis pathway by Red/ET recombination and gene complementation, *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 1829-1835.
86. Wenzel, S. C., Meiser, P., Binz, T., Mahmud, T., and Müller, R. (2006) Nonribosomal peptide biosynthesis: Point mutations and module skipping lead to chemical diversity, *Angew. Chem. Int. Ed.* *45*, 2296-2301.
87. Rowe, C., Bohm, I., Thomas, I., Wilkinson, B., Rudd, B., Foster, G., Blackaby, A., Sidebottom, P., Roddis, Y., Buss, A., Staunton, J., and Leadlay, P. (2001) Engineering a polyketide with a longer chain by insertion of an extra module into the erythromycin-producing polyketide synthase, *Chem. Biol.* *8*, 475-485.
88. Weissman, K. J. (2006) Single amino acid substitutions alter the efficiency of docking in modular polyketide biosynthesis, *ChemBioChem* *7*, 1334-1342.
89. Weissman, K. J., Hong, H., Popovic, B., and Meersman, F. (2006) Evidence for a protein-protein interaction motif on an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase, *Chem. Biol.* *13*, 625-636.
90. Tang, L., Ward, S., Chung, L., Carney, J. R., Li, Y., Reid, R., and Katz, L. (2004) Elucidating the mechanism of cis double bond formation in epothilone biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 46-47.
91. Perlova, O., Gerth, K., Hans, A., Kaiser, O., and Müller, R. (2006) Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56, *J. Biotechnol.* *121*, 174-191.
92. Rix, U., Wang, C., Chen, Y., Lipata, F. M., Remsing Rix, L. L., Greenwell, L. M., Vining, L. C., Yang, K., and Rohr, J. (2005) The oxidative ring cleavage in

- jadomycin biosynthesis: A multistep oxygenation cascade in a biosynthetic black box, *ChemBioChem* 6, 838-845.
93. Chen, Y. H., Wang, C. C., Greenwell, L., Rix, U., Hoffmeister, D., Vining, L. C., Rohr, J. R., and Yang, K. Q. (2005) Functional analyses of oxygenases in jadomycin biosynthesis and identification of JadH as a bifunctional oxygenase/dehydrase, *J. Biol. Chem.* 280, 22508-22514.
  94. Baerga-Ortiz, A., Popovic, B., Siskos, A. P., O'Hare, H. M., Spitteller, D., Williams, M. G., Campillo, N., Spencer, J. B., and Leadlay, P. F. (2006) Directed mutagenesis alters the stereochemistry of catalysis by isolated ketoreductase domains from the erythromycin polyketide synthase, *Chem. Biol.* 13, 277-285.
  95. Liu, T., You, D., Valenzano, C., Sun, Y., Li, J., Yu, Q., Zhou, X., Cane, D. E., and Deng, Z. (2006) Identification of NanE as the thioesterase for polyether chain release in nanchangmycin biosynthesis, *Chem. Biol.* 13, 945-955.
  96. Harvey, B. M., Hong, H., Jones, M. A., Hughes-Thomas, Z. A., Goss, R. M., Heathcote, M. L., Bolanos-Garcia, V. M., Kroutil, W., Staunton, J., Leadlay, P. F., and Spencer, J. B. (2006) Evidence that a novel thioesterase is responsible for polyketide chain release during biosynthesis of the polyether ionophore monensin, *ChemBioChem* 7, 1435-1442.
  97. Kim, T. W., Hwang, J. Y., Kim, Y. S., Joo, S. H., Chang, S. C., Lee, J. S., Takatsuto, S., and Kim, S. K. (2005) Arabidopsis CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis, *Plant Cell* 17, 2397-2412.
  98. Henry, K. M. and Townsend, C. A. (2005) Ordering the reductive and cytochrome P450 oxidative steps in demethylsterigmatocystin formation yields general insights into the biosynthesis of aflatoxin and related fungal metabolites, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3724-3733.
  99. Piel, J. (2002) A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14002-14007.
  100. Cho, J. Y., Kwon, H. C., Williams, P. G., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. (2006) Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *streptomyces* (actinomycetales), *J. Nat. Prod.* 69, 425-428.
  101. Zhang, Y., Muyrers, J. P. P., Testa, G., and Stewart, A. F. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* 18, 1314-1317.

102. Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. P., and Stewart, F. A. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*, *Nat. Genet.* 20, 123-128.
103. Kuroda, K., Yoshida, M., Uosaki, Y., Ando, K., Kawamoto, I., Oishi, E., Onuma, H., Yamada, K., and Matsuda, Y. (1993) AS-183, a novel inhibitor of acyl-CoA - cholesterol acyltransferase produced by *Scedosporium* Sp Spc-15549, *J. Antibiot.* 46, 1196-1202.
104. Cimino, G., Sodano, G., and Spinella, A. (1987) New propionate-derived metabolites from *Aglaja depicta* and from its prey *Bulla striata* (Opisthobranch Mollusks), *J. Org. Chem.* 52, 5326-5331.
105. Capon, R. J. and Faulkner, D. J. (1984) Metabolites of the pulmonate *Siphonaria lessoni*, *J. Org. Chem.* 49, 2506-2508.
106. Reichenbach, H. and Dworkin, M. (1992) The Myxobacteria, in *The Prokaryotes* (Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H., Eds.) 2nd ed. ed., pp 3416-3487, Springer-Verlag, New York.
107. Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B., and Müller, R. (1999) Metabolic diversity in myxobacteria: Identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90, *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 185-195.
108. Service, R. F. (2006) Gene sequencing - The race for the \$1000 Genome, *Science* 311, 1544-1546.
109. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., and Rothberg, J. M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature*.
110. Van Lanen, S. G. and Shen, B. (2006) Microbial genomics for the improvement of natural product discovery, *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 252-260.
111. Silakowski, B., Kunze, B., Nordsiek, G., Blöcker, H., Höfle, G., and Müller, R. (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15, *Eur. J. Biochem.* 267, 6476-6485.

112. Bogyo, M. and Cravatt, B. F. (2007) Genomics and proteomics: From genes to function: advances in applications of chemical and systems biology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 1-3.
113. Piel, J., Hui, D., Fusetani, N., and Matsunaga, S. (2003) Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia, *Environ. Microbiol.*
114. Santi, D. V., Siani, M. A., Julien, B., Kupfer, D., and Roe, B. (2000) An approach for obtaining perfect hybridization probes for unknown polyketide synthase genes: a search for the epothilone gene cluster, *Gene* 247, 97-102.
115. Reichenbach, H., Höfle, G., Böhlendorf, B., and Irschik, H. (1994) Icumazoles and preparation processes, DE19934305486 19930223 ed., Germany.
116. Li, A. and Piel, J. (2002) A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A, *Chem. Biol.* 9, 1017-1026.
117. Ikeda, H. and Omura, S. (1997) Avermectin biosynthesis, *Chem. Rev.* 97, 2591-2609.
118. Gallimore, A. R., Stark, C. B., Bhatt, A., Harvey, B. M., Demydchuk, Y., Bolanos-Garcia, V., Fowler, D. J., Staunton, J., Leadlay, P. F., and Spencer, J. B. (2006) Evidence for the role of the monB genes in polyether ring formation during monensin biosynthesis, *Chem. Biol.* 13, 453-460.
119. Isin, E. M. and Guengerich, F. P. (2007) Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes, *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* 1770, 314-329.
120. Pettit, G. R., Cichacz, Z. A., Herald, C. L., Gao, F., Boyd, M. R., Schmidt, J. M., Hamel, E., and Bai, R. L. (1994) Antineoplastic Agents-300. Isolation and structure of the rare human cancer inhibitory macrocyclic lactones spongistatin-8 and spongistatin-9, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1605-1606.
121. Cheng, X. C., Ubukata, M., and Isono, K. (1990) The structure of tautomycin, a dialkylmaleic anhydride antibiotic, *J. Antibiot.* 43, 809-819.
122. Ueno, T., Takahashi, H., Oda, M., Mizunuma, M., Yokoyama, A., Goto, Y., Mizushima, Y., Sakaguchi, K., and Hayashi, H. (2000) Inhibition of human telomerase by rubromycins: Implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety, *Biochemistry-US* 39, 5995-6002.
123. Koshino, H., Takahashi, H., Osada, H., and Isono, K. (1992) Reveromycins, new inhibitors of eukaryotic cell-growth .3. Structures of reveromycin-A, reveromycin-B, reveromycin-C and reveromycin-D, *J. Antibiot.* 45, 1420-1427.

124. Woo, J. T., Kawatani, M., Kato, M., Shinki, T., Yonezawa, T., Kanoh, N., Nakagawa, H., Takamia, M., Lee, K. H., Stern, P. H., Nagai, K., and Osada, H. (2006) Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4729-4734.
125. Cohen, P., Holmes, C. F. B., and Tsukitani, Y. (1990) Okadaic Acid - A New Probe for the Study of Cellular-Regulation, *Trends Biochem. Sci.* 15, 98-102.
126. Zinzalla, G., Milroy, L. G., and Ley, S. V. (2006) Chemical variation of natural product-like scaffolds: design and synthesis of spiroketal derivatives, *Org. Biomol. Chem.* 4, 1977-2002.
127. Heathcote, M. L., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (2001) Role of type II thioesterases: evidence for removal of short acyl chains produced by aberrant decarboxylation of chain extender units, *Chem. Biol.* 8, 207-220.
128. Butler, A. R., Bate, N., and Cundliffe, E. (1999) Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*, *Chem. Biol.* 6, 287-292.
129. Chen, S., Roberts, J. B., Xue, Y., Sherman, D. H., and Reynolds, K. A. (2001) The *Streptomyces venezuelae* pikAV gene contains a transcription unit essential for expression of enzymes involved in glycosylation of narbonolide and 10-deoxymethynolide, *Gene* 263, 255-264.
130. Hu, Z., Pfeifer, B. A., Chao, E., Murli, S., Kealey, J., Carney, J. R., Ashley, G., Khosla, C., and Hutchinson, C. R. (2003) A specific role of the *Saccharopolyspora erythraea* thioesterase II gene in the function of modular polyketide synthases, *Microbiology* 149, 2213-2225.
131. Zheng, Z., Gong, Q., Liu, T., Deng, Y., Chen, J. C., and Chen, G. Q. (2004) Thioesterase II of *Escherichia coli* plays an important role in 3-hydroxydecanoic acid production, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3807-3813.
132. Linne, U., Schwarzer, D., Schroeder, G. N., and Marahiel, M. A. (2004) Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis, *Eur. J. Biochem.* 271, 1536-1545.
133. Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U., and Marahiel, M. A. (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14083-14088.
134. Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Konig, A., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase, *Gene* 169, 9-16.

135. Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strm, A. R., Valla, S., and Zotchev, S. B. (2000) Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway, *Chem. Biol.* 7, 395-403.
136. Stinear, T. P., Mve-Obiang, A., Small, P. L. C., Frigui, W., Pryor, M. J., Brosch, R., Jenkin, G. A., Johnson, P. D. R., Davies, J. K., Lee, R. E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S. F., Leadlay, P. F., and Cole, S. T. (2004) Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 1345-1349.
137. Bali, S., O'Hare, H., and Weissman, K. J. (2006) Broad substrate specificity of ketoreductases derived from modular polyketide synthases, *ChemBioChem* 7, 478-484.
138. Brautaset, T., Bruheim, P., Sletta, H., Hagen, L., Ellingsen, T. E., Strom, A. R., Valla, S., and Zotchev, S. B. (2002) Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the nysC polyketide synthase gene in *S. noursei* ATCC 11455, *Chem. Biol.* 9, 367-373.
139. Moffitt, M. C. and Neilan, B. A. (2004) Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6353-6362.
140. Lopez, J. V. (2003) Naturally mosaic operons for secondary metabolite biosynthesis: variability and putative horizontal transfer of discrete catalytic domains of the epothilone polyketide synthase locus, *Mol Gen Genomics* 270, 420-431.
141. Ginolhac, A., Jarrin, C., Robe, P., Perriere, G., Vogel, T. M., Simonet, P., and Nalin, R. (2005) Type I polyketide synthases may have evolved through horizontal gene transfer, *J. Mol. Evol.* 60, 716-725.
142. Lia, Z.-F., Zhaoa, J.-Y., Xiaa, Z.-J., Shia, J., Liua, H., Wua, Z.-H., Hua, W., Liua, W.-F., and Li, Y.-Z. (2007) Evolutionary diversity of ketoacyl synthases in cellulolytic myxobacterium *Sorangium*, *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 189-196.
143. Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., and Hattori, M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12215-12220.
144. Firn, R. D. and Jones, C. G. (2000) The evolution of secondary metabolism - a unifying model, *Mol. Microbiol.* 37, 989-994.

145. Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. (1995) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
146. Xue, Y. and Sherman, D. H. (2000) Alternative modular polyketide synthase expression controls macrolactone structure, *Nature* **403**, 571-575.
147. Beck, B. J., Yoon, Y. J., Reynolds, K. A., and Sherman, D. H. (2002) The hidden steps of domain skipping: Macrolactone ring size determination in the pikromycin modular polyketide synthase, *Chem. Biol.* **9**, 575-583.
148. Wu, J., He, W., Khosla, C., and Cane, D. E. (2005) Chain elongation, macrolactonization, and hydrolysis of natural and reduced hexaketide substrates by the pikromycin/methymycin polyketide synthase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 7557-7560.
149. Gerth, K., Steinmetz, H., Höfle, G., and Reichenbach, H. (2001) Studies on the biosynthesis of epothilones: the PKS and epothilone C/D monooxygenase, *J. Antibiot.* **54**, 144-148.
150. Ogura, H., Nishida, C., Hoch, U., Perera, R., Dawson, J. H., and Ortiz de Montellano, P. R. (2004) EpoK, a cytochrome P450 involved in biosynthesis of the anticancer agents epothilones A and B. Substrate-mediated rescue of a P450 enzyme, *Biochemistry-US* **43**, 14712-14721.
151. Nagano, S., Li, H. Y., Shimizu, H., Nishida, C., Ogura, H., de Montellano, P. R. O., and Poulos, T. L. (2003) Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK, *J. Biol. Chem.* **278**, 44886-44893.
152. Pradella, S., Hans, A., Sproer, C., Reichenbach, H., Gerth, K., and Beyer, S. (2002) Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56, *Arch. Microbiol.* **178**, 484-492.
153. Kennelly, P. J. (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective, *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 1-8.
154. Christensen, M., Borza, T., Dandanell, G., Gilles, A. M., Barzu, O., Kelln, R. A., and Neuhard, J. (2003) Regulation of expression of the 2-deoxy-D-ribose utilization regulon, deoQKPX, from *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *J. Bacteriol.* **185**, 6042-6050.
155. Zeng, X., Saxild, H. H., and Switzer, R. L. (2000) Purification and Characterization of the DeoR Repressor of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* **182**, 1916-1922.
156. Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, M. (1995) Epothilones, a new class of

- microtubule-stabilizing agents with Taxol-like mechanism of action, *Cancer Res.* 55, 2325-2333.
157. Julien, B. and Shah, S. (2002) Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2772-2778.
  158. Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., and Julien, B. (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster, *Science* 287, 640-642.
  159. Mutka, S. C., Carney, J. R., Liu, Y., and Kennedy, J. (2006) Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*, *Biochemistry-US* 45, 1321-1330.
  160. Gerth, K. and Müller, R. (2005) Moderately thermophilic myxobacteria: Novel potential for production of natural products, *Environ. Microbiol.* 7, 874-880.
  161. Weissman, K. J. (2007) Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery, *Trends Biotechnol.* 25, 139-142.
  162. Müller, R. and Gerth, K. (2006) Development of simple media which allow investigations into the global regulation of chivosazol biosynthesis with *Sorangium cellulosum* So ce56, *J. Biotechnol.* 121, 192-200.
  163. Wenzel, S. C. and Müller, R. (2005) Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 594-606.
  164. Perlova, O., Fu, J., Kuhlmann, S., Krug, D., Stewart, F., Zhang, Y., and Müller, R. (2006) Reconstitution of myxothiazol biosynthetic gene cluster by Red/ET recombination and heterologous expression in *Myxococcus xanthus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7485-7494.

## **Danke!**

Mein Dank gilt Prof. Rolf Müller, für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Themas, fürs Fordern und Fördern, fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit, eine stets offen stehende Tür und dafür, dass er mir wissenschaftliches Vorbild ist.

Prof. Giffhorn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ein prima Betriebsklima und ihre Hilfsbereitschaft in allen Labor- und sonstigen Angelegenheiten.

Dr. Klaus Gerth danke ich für die initiale Hilfe bei der Kultivierung von *Sorangium cellulosum* So ce90 und einige Fermentationen.

Dr. Silke Wenzel, Dr. Olena Perlova und Dr. Jeroen Dickschat danke ich für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktive Kritik.

Silke Wenzel und Daniel Krug möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labores danken, und für unzählige Abende im Canossa und anderswo.

Mein letzter Dank geht an meine Familie, besonders an meine Eltern, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen konnte und kann. Danke!