

Studien zur Biosynthese des Hormaomycins

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Max Crüsemann

aus Bielefeld

Universität Bonn

2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörn Piel
2. Prof. Dr. Gabriele König
3. Prof. Dr. Hans-Georg Sahl
4. Prof. Dr. Gabriele Bierbaum

Tag der Promotion: 20.07.2012

Erscheinungsjahr: 2012

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Jörn Piel sehr herzlich danken, dass er mich mit diesem sehr interessanten und abwechslungsreichen Projekt betraut und in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Besonders gefallen hat mir die vertrauensvolle, konstruktive Atmosphäre, und dass er immer ein offenes Ohr und Zeit für Fragen und Diskussionen hatte.

Prof. Gabriele König, Prof. Hans-Georg Sahl und Prof. Gabriele Bierbaum danke ich für die Übernahme der weiteren Gutachten dieser Arbeit. Ihnen möchte ich stellvertretend für die gute Atmosphäre in der Forschergruppe FOR 854 und für wertvolle Anregungen und Diskussionen in den Seminaren danken.

Ich danke Dr. Michael Freeman, Christoph Kohlhaas, Max Helf und Katja Jensen für Korrekturen von Teilen dieser Arbeit und wichtige Tipps.

Besonders möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Piel und genauso der von Dr. Tobias Gulder für die großartige Zeit im und vor allem außerhalb des Labors bedanken, ihr seid einfach die besten Kollegen, die man sich vorstellen kann!!!

Extra erwähnen möchte ich Christoph Kohlhaas, Frank Eggert, Sarah Frank, Petra Pöplau, Annette Kampa, Ursula Steffens, Katja Jensen, Fritzi Schaefer und René Richarz, die nicht nur Arbeitskollegen, sondern richtig gute Freunde geworden sind, und die ich hoffentlich alle immer mal wieder treffen und ein Bier (oder zwei?) mit ihnen trinken werde.

Ich möchte Xiaofeng Cai für die großartige Zusammenarbeit am Hormaomycinprojekt danken, wir sind ein super Team! Dr. Michael Freeman danke ich für die sehr vielen guten praktischen Tipps zur Proteinexpression.

Ein riesiger Dank geht an die gesamte Massenspektrometrieabteilung des chemischen Instituts unter Dr. Marianne Engeser. Frau Sondag, Frau Schocher und Frau Peters-Pflaumbaum haben unzählige Proben für mich gemessen, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich möchte Christoph Kohlhaas und Nik Schwarz herzlich für die Synthesen von Propenylprolin und Ethinylprolin und die Bereitstellung für meine Assays danken.

Vielen Dank auch an meine Praktikanten während der letzten Jahre: Shane Heim, Desirée Schubert, Elias Shaaya und Zijian Wu für die große Hilfe bei den Experimenten und viel Spaß bei der Arbeit.

Weiterhin danke ich Dr. Harald Groß und Dr. Till Schaeberle für die guten Kooperationen, für die Hilfe beim Fermentieren und für viele Diskussionen und Anregungen.

Prof. Alfonso Mangoni und Dr. Roberta Teta danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, nach Neapel zu gehen, für das Beibringen von vielen NMR-Kenntnissen, für die sehr gute Zusammenarbeit und für die tolle Zeit am Institut in Neapel. Mille Grazie!

Vielen Dank an Roberto Langella, Concetta Ambrosino und Maria Marrazzo für die große Hilfe bei den HPLC-Isolierungen in Neapel und die nette Atmosphäre im Labor. Ciao a tutti!

Ich danke meiner Katrin für die Unterstützung während der Arbeit, die schönste Zeit meines Lebens (bis jetzt) und dafür, dass wir weiter alles zusammen machen!

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und alles andere danken. Diese Arbeit ist für euch.

Inhalt

1 Zusammenfassung.....	1
2 Abstract	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Biologie und Signalstoffe der Streptomyceten.....	5
3.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS).....	10
3.2.1 Adenylierungsdomänen (A-Domänen).....	12
3.2.2 Andere Domänen der NRPS.....	15
3.2.3 Strukturelle Einsichten in NRPS.....	18
3.2.4 MbtH-artige Proteine.....	20
3.3 Prinzipien zur Erzeugung neuer Naturstoffe	23
3.3.1 Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Mutasynthese an NRPS.....	23
3.3.2 Kombinatorische Biosynthese an NRPS	25
3.4 Cyclopropyl- und Nitrogruppen in der Natur.....	28
3.5 Hormaomycin und der <i>hrm</i> -Gencluster.....	29
4 Zielsetzung der Arbeit.....	36
5 Ergebnisse und Diskussion.....	39
5.1 Studien zur Biosynthese von Nitrocyclopropylalanin[(3-Ncp)Ala].....	39
5.1.1 Fütterung von (3-Ncp)Ala zu einer knock-out Mutante von <i>hrmI</i>	40
5.1.2 Bioinformatische Einordnung von HrmI und HrmJ.....	41
5.1.3 <i>In vivo</i> -Experimente zur (3-Ncp)Ala-Biosynthese.....	43
5.1.4 Heterologe Expression und Charakterisierung von HrmJ.....	43
5.2 Studien zur Biosynthese von Propenylprolin[(4-Pe)Pro].....	47
5.2.1 Heterologe Expression und kinetische Charakterisierung von HrmF.....	49
5.2.2 <i>In vivo</i> Experimente zur Untersuchung der Funktion von HrmC.....	52
5.2.3 Suche nach einem <i>lmbX</i> -Homolog in <i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384	53
5.3 Studien zur Biosynthese von Chlorhydroxypyrrrolcarbonsäure (Chpca).....	56
5.3.1 Heterologe Expression und Charakterisierung von HrmK.....	57
5.3.2 Heterologe Expression und Charakterisierung von HrmL.....	60
5.3.3 Beladung von HrmL mit Prolin.....	63
5.3.4 <i>In vivo</i> -Experimente zur Untersuchung der Funktion von HrmN.....	64
5.4 <i>In vitro</i> -Studien an der Hormaomycin-NRPS.....	68
5.4.1 Heterologe Expression der Hormaomycin A-Domänen und Coexpression mit HrmR.....	69
5.4.2 Konstruktion und heterologe Expression fusionierter A-Domänen.....	73
5.4.3 Modellierung der fusionierten A-Domänen nach PheA.....	78
5.4.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der nativen und fusionierten A-Domänen..	80

5.5 Biologische Studien an Hormaomycin.....	100
5.5.1 Fermentation von Hormaomycin.....	100
5.5.2 Isolierung und Strukturaufklärung natürlicher Hormaomycinanaloga.....	101
5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick.....	119
6 Material und Methoden.....	124
6.1 Vektoren und Organismen.....	124
6.1.1. Vektoren und Plasmide.....	124
6.1.2 Organismen.....	125
6.2 Medien und Puffer.....	125
6.2.1 Medien.....	125
6.2.2 Puffer.....	127
6.3 Mikrobiologische Techniken.....	128
6.3.1 Stammhaltung in Kryokulturen.....	128
6.3.2 Kultivierung von Bakterien.....	128
6.3.3 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen.....	129
6.3.4 Transformation.....	129
6.3.4.1 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen.....	129
6.3.4.2 Elektroporation.....	129
6.3.4.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	130
6.3.4.4 Chemische Transformation.....	130
6.3.5 Blau/Weiß-Selektion auf transformierte positive Klone.....	130
6.4 Molekularbiologische Techniken.....	131
6.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	131
6.4.1.1 Kolonie-PCR.....	132
6.4.1.2 Fusions-PCR.....	132
6.4.1.3 Verwendete Oligonucleotide (Primer).....	133
6.4.1.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	135
6.4.2 DNA-Isolierung.....	135
6.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	135
6.4.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	136
6.4.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Streptomyces</i>	136
6.4.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	136
6.4.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	137
6.4.5 Sequenzierung.....	137
6.4.6 Restriktionspaltung von DNA.....	138
6.4.7 Dephosphorylierung von Vektoren.....	138
6.4.8 Ligation.....	138

6.4.9 Klonierung von Plasmiden.....	138
6.4.9.1 T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten ²⁷⁸	138
6.4.9.1.1 Konstruktion eines T/A-Klonierungsvektors.....	139
6.4.9.1.2 T/A-Klonierung.....	139
6.4.9.2 Klonierung von <i>in vitro</i> -Expressionskonstrukten in <i>E. coli</i>	140
6.4.9.3 Konstruktion von Coexpressionsstämmen in <i>E. coli</i>	141
6.4.9.4 Klonierung von <i>in vivo</i> -Expressionskonstrukten in <i>Pseudomonas fluorescens</i>	142
6.5 Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinanalytik.....	142
6.5.1 Alignments zur Festlegung des Leserahmens.....	142
6.5.2 Proteinexpression.....	143
6.5.3 Zellaufschluss.....	143
6.5.4 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.....	143
6.5.5 Entsalzung und Aufkonzentrierung.....	144
6.5.6 TCA-Präzipitation.....	144
6.5.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	144
6.5.8 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	145
6.5.8.1 Bradford-Assay.....	145
6.5.8.2 SDS-PAGE-Absorptionsmessungen.....	146
6.5.9 Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen.....	147
6.5.9.1 Probenvorbereitung.....	147
6.5.9.2 MALDI-TOF-TOF-MS.....	147
6.5.10 Proteinaufreinigung mit FPLC.....	147
6.5.11 Lagerung von Proteinen.....	147
6.6 <i>In vitro</i> -Enzymassays.....	148
6.6.1 [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.....	148
6.6.1.1 Durchführung des Assays.....	148
6.6.1.2 Massenspektrometrische Analytik des Assays.....	148
6.6.2 Assays zur Bildung von (3-Ncp)Ala aus Lysin.....	149
6.6.2.1 Assay von HrmJ.....	149
6.6.2.2 Derivatisierung der Aminosäuren.....	149
6.6.2.3 HPLC-Analytik der Assays.....	149
6.6.3 Kinetische Charakterisierung von HrmF.....	150
6.6.4 PCP-Beladungsassay von HrmK/HrmL.....	150
6.7 <i>In vivo</i> -Proteinexpression und Analytik.....	150
6.7.1 <i>In vivo</i> -Proteinexpression von Biosynthesegenen.....	150
6.7.2 Aufarbeitung der Zellen und Extraktion.....	150
6.7.3 HPLC-Analytik von Enzymexpressionen.....	151

6.7.4 HPLC-HRMS von Enzymexpressionen.....	151
6.8 Fermentation von <i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384.....	151
6.9 Analytik des HrmB-Überexpressionsextraktes.....	152
6.9.1 Analytische und präparative Auftrennung des Extraktes.....	152
6.9.2 Massenspektrometrie von Hormaomycin und Analoga.....	153
6.9.3 NMR-Spektroskopie von Hormaomycin und Analoga.....	153
6.10 Verwendete Chemikalien.....	153
6.11 Verwendete Geräte und Materialien.....	156
7 Abkürzungsverzeichnis.....	159
8 Literatur.....	162
9 Anhang.....	181
9.1 Plasmidkarten.....	181
9.2 Alignments und Proteinmodelle.....	184
9.3 Massenspektren und zusammenfassende Tabellen.....	189
9.4 HPLC- und FPLC-Chromatogramme.....	196
9.5 NMR-Spektren.....	199
10 Publikationen.....	215
11 Lebenslauf.....	216
12 Selbstständigkeitserklärung.....	217

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1:	Einige medizinisch verwendete Stoffwechselprodukte von Streptomyceten	5
Abb. 3-2:	Der Lebenszyklus von Streptomyceten	6
Abb. 3-3:	Die Regulation der Streptomycinbiosynthese und der morphologischen Differenzierung durch den A-Faktor	7
Abb. 3-4:	Niedermolekulare Signalstoffe in Streptomyceten	9
Abb. 3-5:	Einige medizinisch eingesetzte nichtribosomale Peptide	10
Abb. 3-6:	Die Biosynthese des Tyrocidins (18) an der Tyrocidinsynthetase	11
Abb. 3-7:	Aktivierung (a) und Übertragung (b) der einzubauenden Aminosäure durch die A-Domäne.	13
Abb. 3-8:	Posttranslationale Modifizierung eines PCP durch die PPTase	15
Abb. 3-9:	Peptidbildung durch die Kondensationsdomäne (C)	16
Abb. 3-10:	(a) Epimerisierung durch die Epimerasedomäne (E), (b) Zyklisierung zweier Aminosäuren durch die Zyklisierungsdomäne (Cy) am Beispiel der Thiazolinbildung	17
Abb. 3-11:	Die Übertragung des Peptids auf die Thioesterasedomäne und Ablösung durch a) Hydrolyse oder b) intramolekularen Angriff	17
Abb. 3-12:	Reaktionszyklus der PCP- und A-Domänen	19
Abb. 3-13:	Das Terminationsmodul der Surfactin-NRPS	19
Abb. 3-14:	Tertiärstruktur des MbtH-artigen Proteins aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Abb. 3-15:	Schematische Darstellung der Mutasyntese	24
Abb. 3-16:	Die Familie der calcium-dependent antibiotics (CDAs) (20)	25
Abb. 3-17:	Daptomycin (14)	27
Abb. 3-18:	Ausgewählte Naturstoffe mit Cyclopropylgruppen: 2-(1-Methylcyclopropyl)-glycin (21), Ptaquilosid (22), U-106305 (23)	29
Abb. 3-19:	Ausgewählte Naturstoffe mit Nitrogruppen: Chloramphenicol (24), Pyrrolnitrin (25), Aureothin (26)	29
Abb. 3-20:	Hormaomycin (13) und seine Bausteine	30
Abb. 3-21:	Durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese inkorporierte Analoga der Vorstufen von Hormaomycin (13)	31
Abb. 3-22:	Der <i>hrm</i> -Gencluster	32
Abb. 3-23:	Die Assemblierung von Hormaomycin an der Hormaomycin-NRPS	33
Abb. 5-1:	2 <i>S</i> -(49); 2 <i>R</i> -(50) 3-(<i>trans</i> -2'-Nitrocyclopropyl)alanin, Belactosin A (51)	39
Abb. 5-2:	Postulierte (3-Ncp)Ala-Biosynthese	39
Abb. 5-3:	Agarplatte von <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> mit Extrakten von Δ <i>hrmI</i> , Δ <i>hrmI</i> +(3-Ncp)Ala (27), Wildtyp (Hrm) und (3-Ncp)Ala (27)	40
Abb. 5-4:	Katalysierte Reaktion der Isoleucin-4-Hydroxylase	41
Abb. 5-5:	Katalysierte Reaktionen (a) und aktives Zentrum (b) von Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen	42

Abb. 5-6:	Katalysierte Reaktion von PqqC	42
Abb. 5-7:	SDS-PAGE-Gel (15%) von HrmJ	44
Abb. 5-8:	Die Derivatisierung von Lysin (58) mit Dansylchlorid (67)	44
Abb. 5-9:	Vergleich der HPLC-Chromatogramme des HrmJ-Assays nach Derivatisierung, Methode 1	45
Abb. 5-10:	Vergleich der HPLC-Chromatogramme des HrmJ-Assays nach Derivatisierung, Methode 2	45
Abb. 5-11:	Oben: Ausschnitt aus dem HR-ESI Massenspektrum (Positiv-Modus) des aufgefangenen neu entstandenen Peaks aus Abb. 5-11. Unten: theoretisches Massenspektrum des postulierten Oxim-Intermediates 40 aus der (3-Ncp)Ala-Biosynthese.	46
Abb. 5-12:	Übersicht über die postulierte Biosynthese von (4-Pe)Pro (69) und dessen Homologe aus den Biosynthesen von Anthramycin, Sibiromycin, Tomaymycin und Lincomycin.	48
Abb. 5-13:	Reaktionsmechanismus von HrmF	48
Abb. 5-14:	Coenzym F ₄₂₀ (76)	49
Abb. 5-15:	SDS-PAGE-Gel (12%) von HrmF	50
Abb. 5-16:	Michaelis-Menten-Kurve von HrmF mit L-DOPA (71)	51
Abb. 5-17:	Hanes-Woolf-Kurve der Reaktionskinetik von HrmF	51
Abb. 5-18:	Akzeptierte alternative Substrate von HrmF	52
Abb. 5-19:	Methylübertragung durch S-Adenosylmethionin (87) auf a) Hydroxygruppe b) Aminogruppe c) nukleophilen Kohlenstoff	53
Abb. 5-20:	Ausschnitt aus dem HPLC-HRMS-Chromatogramm der Umsetzungen von HrmF und der Coexpression von HrmC und HrmF mit L-DOPA (71).	54
Abb. 5-21:	Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Peaks bei a): 11,8 min (HrmF) bzw. b): 11,3 min (HrmC+HrmF) aus Abb. 5-20.	55
Abb. 5-22:	Die putative Chpca-Biosynthese	57
Abb. 5-23:	Generierung eines neuen Clorobiocinanalogs durch HrmQ	57
Abb. 5-24:	SDS-PAGE-Gel (15%) von der Coexpression von HrmK/HrmR	58
Abb. 5-25:	MALDI-TOF-Messung von isoliertem His ₈ -HrmK	58
Abb. 5-26:	Getestete Substrate von HrmK: Prolin und Analoga	59
Abb. 5-27:	Vergleich der Massenspuren der Umsetzung von HrmK mit verschiedenen Substraten im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-1)	60
Abb. 5-28:	Aktivierung verschiedener Substrate durch HrmK im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	60
Abb. 5-29:	Phosphopanthetheinylierung durch PPTasen	61
Abb. 5-30:	Heterologe Expression und Aufreinigung von HrmL aus pHIS8 (a) und pHIS8 _{svp} (b)	61
Abb. 5-31:	MALDI-TOF-Messung von ₈ His-HrmL aus pHIS8 _{svp}	62
Abb. 5-32:	MALDI-TOF-Ergebnisse des Beladungsassays von HrmL mit Prolin	63
Abb. 5-33:	Naturstoffe mit N-Hydroxypyrrroleinheiten	64
Abb. 5-34:	Pyoluteorin (115)	65
Abb. 5-35:	Analogien in der Hormaomycin- und Pyoluteorinbiosynthese	65

Abb. 5-36:	Kombinatorische Biosynthese in <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	65
Abb. 5-37:	Klonierungsschema für pMC15.	67
Abb. 5-38:	Vergleich der HPLC-Spuren (308 nm) der Extrakte von pMC15 nach 43 h (1), 51 h (2), 66 h (3), 76 h (4).	67
Abb. 5-39:	a): Vergleich der UV-Spuren eines HPLC-MS-Experiments einer Expression von pMC15 in <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 nach 76 h mit pME6041 in <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 b): Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Peaks bei 33,3 min.	68
Abb. 5-40:	SDS-PAGE-Gel (12%) einer Expression von HrmP1 _A in 1 L LB	70
Abb. 5-41:	MALDI-TOF-Analyse von His ₈ -HrmO3 _A	70
Abb. 5-42:	SDS-PAGE-Gel (12%) einer Expression von HrmO3 _A in 1 L LB, Elutionsfraktion in 6 verschiedenen Puffern nach dem Stabilitätstest	71
Abb. 5-43:	SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin) einer heterologen Coexpression und Aufreinigung von HrmO2 _A /HrmR (a) HrmP3 _A /HrmR (b)	73
Abb. 5-44:	Ähnlichkeitsplot von Hrm O1 _A , O3 _A , O4 _A und P1 _A erstellt mit dem Programm Vector NTI.	74
Abb. 5-45:	Aminosäurenalignment von HrmO3 _A (obere Reihe) und HrmO4 _A (untere Reihe) erstellt mit dem Programm Bioedit.	74
Abb. 5-46:	Schema der Konstruktion der fusionierten A-Domänen	75
Abb. 5-47:	Agarosegel (1%) der mit Fusion-PCR erzeugten, künstlichen A-Domänen O2f _A , O4f _A , P2f _A , A5f _A , H6f _A .	75
Abb. 5-48:	Übersicht über die exprimierten nativen und fusionierten A-Domänen HrmK, HrmO1 _A , HrmO3 _A , HrmO4 _A , HrmP1 _A , HrmP2 _A , O2f _A , O4f _A , P2f _A , A5f _A , H6f _A , jeweils coeluiert mit HrmR. A5f _x zeigt eine Coelution von A5f _A mit CdaX.	77
Abb. 5-49:	SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin) einer Expression von His ₆ HrmR (a) und His ₆ CdaX (b)	78
Abb. 5-50:	Ausschnitt aus der von I-TASSER ²⁶² vorhergesagten Sekundärstruktur von O2f _A .	79
Abb. 5-51:	Mit I-TASSER ²⁶² durch Homologiemodellierung nach PheA erzeugte 3-D Struktur von O2f _A .	79
Abb. 5-52:	Der Austausch von γ - ¹⁸ O ₄ -ATP (120) in ATP (123) in Gegenwart eines Überschusses von Pyrophosphat (121) durch die A-Domäne. ¹⁰⁹	81
Abb. 5-53:	MALDI-TOF-Ergebnisse der Umsatz von HrmP1 _A mit verschiedenen Aminosäuren im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-55, Tab. 9-2)	81
Abb. 5-54:	Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren durch HrmP1 _A im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	82
Abb. 5-55:	(β -Me)Phe (31), (4-Cl)Phe (124) und (α -Me)Phe (125)	82
Abb. 5-56:	MALDI-TOF-Ergebnisse der Umsatz von HrmP1 _A /HrmR mit verschiedenen Aminosäuren im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-59, Tab. 9-3)	83
Abb. 5-57:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP1 _A (schwarz) und HrmP1 _A (rot) mit HrmR nach FPLC mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	84
Abb. 5-58:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO3 _A mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	85
Abb. 5-59:	(3-Ncp)Ala (27), 5-Nitro-2-aminobenzoessäure (126) und Cyclopropylglycin (127)	85

Abb. 5-60:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO4 _A (schwarz) und O4f _A (rot) mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	86
Abb. 5-61:	Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung der Elution von HrmO1 _A /HrmR.	87
Abb. 5-62:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO1 _A (schwarz) und HrmO1 _A nach FPLC (rot) mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	88
Abb. 5-63:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO2 _A (schwarz) und O2f _A (rot) mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	89
Abb. 5-64:	Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung der Elution von HrmO2 _A /HrmR	90
Abb. 5-65:	Dokumentation der FPLC Aufreinigung von a) HrmO2 _A (siehe Abb. 5-66) und b) O2f _A (siehe Abb. 9-19) jeweils mit HrmR.	90
Abb. 5-66:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO2 _A (schwarz) und O2f _A (rot) mit HrmR nach FPLC im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	91
Abb. 5-67:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP2 _A (schwarz) und P2f _A (rot) mit HrmR im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	92
Abb. 5-68	4-Z-Propenylprolin (69) und 4-Z-Ethynylprolin (128)	93
Abb. 5-69:	hypothetische Reaktion eines Azidobiotins (129) mit Ethynylhormaomycin (130) über „Klick-Chemie“	94
Abb. 5-70:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP3 _A mit HrmR vor (schwarz) und nach (rot) FPLC-Aufreinigung im [γ - ¹⁸ O ₄]-ATP-Assay.	94
Abb. 5-71:	a): Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von HrmP3 _A . b): Dokumentation von 5-71- a): SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin).	95
Abb. 5-72:	HPLC-Chromatogramm (230 nm) des Ethylacetat-Rohextraktes einer Fermentation von <i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384	101
Abb. 5-73:	HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes der <i>hrmB</i> -Überexpression (273 nm)	102
Abb. 5-74:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin (13)	104
Abb. 5-75:	Strukturen der in Abbildung 5-76 erhaltenen MS/MS-Fragmente von Hormaomycin (13)	104
Abb. 5-76:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A1 (136)	105
Abb. 5-77:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A1 (136)	106
Abb. 5-78:	Hormaomycin A1 (136).	106
Abb. 5-79:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A2 (137)	107
Abb. 5-80:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A2 (137).	108
Abb. 5-81:	Hormaomycin A2 (137).	108
Abb. 5-82:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A3 (138)	109
Abb. 5-83:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A3 (138)	109
Abb. 5-84:	Hormaomycin A3 (138)	110
Abb. 5-85:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A4 (139)	110
Abb. 5-86:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A4 (139)	111

Abb. 5-87:	Hormaomycin A4 (139).	111
Abb. 5-88:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A5 (140)	112
Abb. 5-89:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A5 (140)	113
Abb. 5-90:	Hormaomycin A5 (140).	113
Abb. 5-91:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Spektrum von Hormaomycin A6 (141)	114
Abb. 5-92:	Ausschnitt aus dem ¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (141)	115
Abb. 5-93:	Ausschnitt aus dem ¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (141)	115
Abb. 5-94:	Hormaomycin A6 (141).	116
Abb. 5-95:	Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum für Hormaomycin E1/E2 (40/41)	117
Abb. 5-96:	Im Massenspektrum von Fraktion 3 detektiertes Fragment 142 , mögliche Vorstufen 30 , 143 und 144 .	117
Abb. 5-97:	hypothetische Strukturen des isolierten Substanzgemisches Hormaomycin E1 (40) und E2 (41).	118
Abb. 5-98:	Übersicht über die isolierten Hormaomycinderivate A1-A5	122
Abb. 6-1:	BSA-Kalibriergerade für den Bradford-Test	146
Abb. 6-2:	Kalibriergerade zur Messung der Konzentration unbekannter Proteinproben am Geldokumentationssystem Genius	146
Abb. 9-1:	Plasmidkarte und MCS von pBluescript SK(+)	181
Abb. 9-2:	Plasmidkarte mit MCS von pGEM-T Easy	181
Abb. 9-3:	Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pHIS8-svp bzw. pHIS8	182
Abb. 9-4:	Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pCDFDuet-1	183
Abb. 9-5:	Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pET28a.	183
Abb. 9-6:	MCS für den Proteinexpressionsvektor pME6041	184
Abb. 9-7:	Alignment von HrmJ (obere Sequenz) und der Isoleucin-4-Oxygenase (IDO) aus <i>Bacillus thuringiensis</i> (untere Sequenz), erstellt mit dem Programm Bioedit.	184
Abb. 9-8:	Alignment der putativen C-C-Hydrolasen SibS, LmbX, TomK und ORF15.	184
Abb. 9-9:	Sequenzalignment für vier A-Domänen aus der NRPS des Antibiotikums CDA mit allen Hormaomycin A-Domänen HrmO1 _A -HrmP3 _A , erstellt mit dem Programm Bioedit	186
Abb. 9-10:	Ausschnitt aus der von I-TASSER ²⁶² vorhergesagten Sekundärstruktur von O4f _A .	187
Abb. 9-11:	Mit I-TASSER ²⁶² durch Homologiemodellierung nach PheA erzeugte 3-D Struktur von O4f _A .	187
Abb. 9-12:	Ausschnitt aus der von I-TASSER ²⁶² vorhergesagten Sekundärstruktur von His ₈ P2f.	187
Abb. 9-13:	Mit I-TASSER ²⁶² durch Homologiemodellierung nach PheA erzeugte 3-D Struktur von P2f _A .	187

Abb. 9-14:	Ausschnitt aus der von I-TASSER ²⁶² vorhergesagten Sekundärstruktur von A5f _A .	188
Abb. 9-15:	Mit I-TASSER ²⁶² durch Homologiemodellierung nach PheA erzeugte 3-D Struktur von A5f _A .	188
Abb. 9-16:	Ausschnitt aus der von I-TASSER ²⁶² vorhergesagten Sekundärstruktur von H6f _A .	188
Abb. 9-17:	Mit I-TASSER ²⁶² durch Homologiemodellierung nach PheA erzeugte 3-D Struktur von H6f _A .	188
Abb. 9-18:	Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von HrmP1 _A .	196
Abb. 9-19:	Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von O2f _A .	196
Abb. 9-20:	HPLC-Chromatogramm der Fraktion 15 aus Tabelle 5-16; Methanol/H ₂ O 85:15, 273 nm	197
Abb. 9-21:	HPLC-Chromatogramm der Fraktionen 16 und 17 aus Tabelle 5-16; Methanol/H ₂ O 85:15, 273 nm	197
Abb. 9-22:	HPLC-Chromatogramm der Fraktion 23 aus Tabelle 5-16; Methanol/H ₂ O 8:2, 273 nm	198
Abb. 9-23:	HPLC-Chromatogramm der Fraktion 30 aus Tabelle 5-16; Methanol/H ₂ O 8:2, 273 nm	198
Abb. 9-24:	Nummerierung der C-Atome der Bausteine des Hormaomycins (13).	199
Abb. 9-25:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin (13) in CDCl ₃	199
Abb. 9-26:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin (13) in CD ₃ OD	200
Abb. 9-27:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A1(136) in CD ₃ OD	200
Abb. 9-28:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A2 (137) in CD ₃ OD	202
Abb. 9-29:	¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A2 (137) in CD ₃ OD	203
Abb. 9-30:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A3 (138) in CD ₃ OD	204
Abb. 9-31:	¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A3 (138) in CD ₃ OD	205
Abb. 9-32:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A4 (139) in CD ₃ OD	207
Abb. 9-33:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A5 (140) in CD ₃ OD	209
Abb. 9-34:	¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A5 (140) in CD ₃ OD	209
Abb. 9-35:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (141) in CD ₃ OD	211
Abb. 9-36:	¹ H- ¹ H-COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (141) in CD ₃ OD	212
Abb. 9-37:	¹ H-NMR-Spektrum von Hormaomycin E1/E2 (40/41) in CD ₃ OD	214

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Durch Fütterung von Substanzen aus Abb. 3-19 erzeugte Hormaomycinanaloga	31
Tab. 3-2:	Kodierte Proteine in der <i>hrm</i> -Region, ihre putativen Funktionen und nächsten Verwandten (Stand 2/2012)	33
Tab. 3-3:	Nichtribosomale Codes der Hormaomycin A-Domänen und vorausgesagte Spezifitäten	34
Tab. 5-1:	Vergleich der Darstellung der aus dem Alignment (Anhang, Abb. 9-7) extrahierten hypothetischen Metall-Liganden und α -Ketoglutarat (63) stabilisierende Aminosäuren für IDO und HrmJ	42
Tab. 5-2:	Vergleich der kinetischen Daten von HrmF und LmbB1	51
Tab. 5-3:	Konservierte Aminosäuremotive der degenerierten Primer für das LmbX-Homolog	53
Tab. 5-4:	Detektierte Massen in den HPLC-MS-Chromatogrammen von HrmF und HrmC/HrmF (siehe Abb. 5-22) und deren mögliche Strukturformeln	55
Tab. 5-5:	Vergleich der gemessenen Massen für His ₈ -HrmL und His ₈ -HrmL+Svp mit der berechneten Masse für das 4'-phosphopanthetheinylierte Protein.	62
Tab. 5-6:	Übersicht über die in pHIS ₈ exprimierte Hormaomycin-A-Domänen	71
Tab. 5-7:	Proteinkonzentrationen von HrmO3 _A (1 L) in 6 verschiedenen Puffern nach dem Stabilitätstest	72
Tab. 5-8:	Übersicht über die mit PCR erzeugten Fragmente für die fusionierten A-Domänen	75
Tab. 5-9:	Übersicht über die konstruierten fusionierten A-Domänen	76
Tab. 5-10:	Übersicht über die in Abbildung 5-50 durch SDS-PAGE-Absorptionsmessung ermittelten Proteinkonzentrationen und –verhältnisse.	77
Tab. 5-11:	Mit I-TASSER ²⁶² erstellte C-Scores und TM-Scores für HrmO3 _A und die fusionierten A-Domänen.	80
Tab. 5-12:	Vergleich der Aktivitäten von HrmO3 _A und HrmP1 _A mit HrmR	84
Tab. 5-13:	Vergleich der Aktivitäten von HrmO4 _A und O4f _A mit HrmR	86
Tab. 5-14:	Vergleich der Aktivitäten der aufgereinigten A-Domänen HrmO2 _A und O2f _A mit HrmR	91
Tab. 5-15:	Aminosäuren 330 und 331 (relativ zu PheA) in den miteinander kombinierten A-Domänen.	96
Tab. 5-16:	Übersicht über die isolierten Fraktionen aus dem Rohextrakt des <i>hrmB</i> -Überexpressionsstammes	103
Tab. 5-17:	Übersicht über die in der analytischen HPLC der Fraktionen aus Abb. 5-75 erhaltenen Reinsubstanzen	103
Tab. 6-1:	Vektoren zur Lagerung, Subklonierung und Sequenzierung	124
Tab. 6-2:	Vektoren zur Proteinexpression	124
Tab. 6-3:	Verwendete Ausgangsvektoren zur Expression von <i>hrmC</i> , <i>hrmF</i> und <i>hrmJ</i>	124
Tab. 6-4:	Übersicht über die eingesetzten Organismen	125
Tab. 6-5:	Kultivierungsbedingungen der verwendeten Bakterien	129
Tab. 6-6:	Lösungen zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen	130

Tab. 6-7:	Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion	131
Tab. 6-8:	Temperaturprogramm für die PCR	132
Tab. 6-9:	Temperaturprogramm für die Fusions-PCR	133
Tab. 6-10:	Primer zur heterologen Expression von Hormaomycin-Biosynthesegenen in <i>E. coli</i>	133
Tab. 6-11:	Primer zur heterologen Expression der Hormaomycin A-Domänen in <i>E. coli</i>	134
Tab. 6.12:	Primer zur Konstruktion der fusionierten A-Domänen	134
Tab. 6-13:	Primer zur heterologen Expression in <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	135
Tab. 6-14:	Primer zur Sequenzierung im Expressionsvektor	135
Tab. 6-15:	Primer zur Suche nach einem <i>ImbX</i> -Homolog in <i>S. griseoflavus</i> W-384	135
Tab. 6-16:	Verwendete Puffer zur Plasmidisolierung	136
Tab. 6-17:	Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer	137
Tab. 6-18:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten T/A-Konstrukte	140
Tab. 6-19:	Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten Expressionskonstrukte	141
Tab. 6-20:	Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Coexpressionsstämme	142
Tab. 9-1:	Aktivierung verschiedener Substrate durch HrmK im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay	189
Tab. 9-2:	Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren durch HrmP1 _A im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	189
Tab. 9-3:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP1 _A mit HrmR vor und nach FPLC im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	190
Tab. 9-4:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO3 _A mit HrmR im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	191
Tab. 9-5:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO4 _A und O4f _A mit HrmR im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	191
Tab. 9-6:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO1 _A mit HrmR vor und nach FPLC-Aufreinigung im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	192
Tab. 9-7:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO2 _A und O2f _A mit HrmR im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	193
Tab. 9-8:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO2 _A und O2f _A mit HrmR nach FPLC im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	193
Tab. 9-9:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP2 _A und P2f _A mit HrmR im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	194
Tab. 9-10:	Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP3 _A mit HrmR vor und nach FPLC-Aufreinigung im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay.	195
Tab. 9-11:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A1 (136)	201
Tab. 9-12:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A2 (137)	202
Tab. 9-13:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A3 (138)	205
Tab. 9-14:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A4 (139)	207
Tab. 9-15:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A5 (140)	210
Tab. 9-16:	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A6 (141)	212

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden Experimente zur Aufklärung der Biosynthese, Untersuchungen zum evolutionären Ursprung der Adenylierungsdomänen und Studien zur Flexibilität der Biosyntheseenzyme des bakteriellen Peptids Hormaomycin präsentiert. Hormaomycin wird von *Streptomyces griseoflavus* W-384 synthetisiert und besitzt mehrere interessante biologische Aktivitäten. Einzigartig ist die Struktur des Hormaomycins; es ist ein zyklisches Peptidlacton mit acht Bausteinen, von denen sieben nicht-proteinogenen Ursprungs sind. Einige dieser Bausteine, wie (3-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala], 4-(Z-Propenyl)prolin [(4-Pe)Pro] und 5-Chlor-N-hydroxypyrrol-2-carbonsäure [Chpca] sind in der Natur bisher einzigartig. Vorläufer-dirigierte Biosyntheseexperimente haben gezeigt, dass die Biosynthesemaschinerie von Hormaomycin ungewöhnlich flexibel ist. In der Arbeitsgruppe Piel konnte in Vorarbeiten der Biosynthesegencluster des Hormaomycins isoliert und sequenziert werden. Die Analyse der Sequenz zeigte, dass Hormaomycin von einer nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) synthetisiert wird.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Biosynthesen der Vorstufen durch heterologe Expressionen von Biosynthesegenen teilweise aufgeklärt. Durch bioinformatische Analysen wurden zwei Gene mit unbekannter Funktion, *hrmI* und *hrmJ*, dem postulierten Biosyntheseweg von (3-Ncp)Ala zugeordnet. Beide Enzyme haben keine eng verwandten Homologe. Eine Fütterung von (3-Ncp)Ala zu einer Knock-Out-Mutante von *hrmI* führte zu einer Komplementierung der Hormaomycinproduktion, was die Zugehörigkeit des Enzyms zu diesem Biosyntheseweg beweist. HrmJ, eine α -Ketoglutarat-abhängige Oxygenase, katalysiert vermutlich den ersten Schritt des Biosyntheseweges. Das Enzym konnte in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert und isoliert werden und bildete in Enzymassays aus Lysin ein neues Produkt. Massenspektrometrische Messungen geben erste Hinweise darauf, dass es sich hierbei um ein hydroxyliertes Lysin mit terminaler Oximfunktion handelt. HrmI ist putativ eine Oxidase und könnte zu einer neuen Enzymfamilie gehören. (4-Pe)Pro wird, analog zur Biosynthese des Lincomycins, über Tyrosin und L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) synthetisiert. HrmF, eine L-DOPA-Dioxygenase, katalysiert die Öffnung des Catecholrings zu einem instabilen, gelb gefärbten Pyrrolinintermediat. HrmF wurde in dieser Arbeit kinetisch charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Enzym eine fast 160-fach höhere katalytische Aktivität als sein Homolog aus der Lincomycinbiosynthese, LmbB1, besitzt. Das Enzym ist aufgrund seiner hohen Aktivität, der sehr losen Substratspezifität und hohen Expressionsausbeuten ein guter Kandidat für chemoenzymatische Syntheseverfahren. Die Startereinheit der Hormaomycinbiosynthese, Chpca, wird aufgrund von bioinformatischen Voraussagen aus Prolin, kovalent gebunden an HrmL, ein freistehendes Peptidylcarrierprotein (PCP), synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Acyl-CoA-Synthetase HrmK und HrmL heterolog exprimiert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Prolin vom Enzym sehr selektiv adenyliert wird. Für HrmL wurde massenspektrometrisch die 4'-Phosphopanthetheinylierung nachgewiesen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Adenylierungsdomänen (A-Domänen) der Hormaomycin-NRPS. Alle sieben A-Domänen wurden mit dem MbtH-artigen Protein HrmR coexprimiert und isoliert. Für den Komplex wurde ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 bestimmt. Die Proteine wurden in einem massenspektrometrisch basierten Assay umfassend charakterisiert und zur Eliminierung von falsch positiven Resultaten mit FPLC weiter aufgereinigt. Für HrmO3_A und HrmP1_A wurde eine selektive Aktivierung von (β -Me)Phe nachgewiesen. HrmO1_A und HrmO4_A aktivieren (3-Ncp)Ala fast quantitativ und Leucin am zweithäufigsten [jeweils etwa 10% im Vergleich zu (3-Ncp)Ala]. HrmO2_A adenyliert L-Threonin sehr selektiv, und HrmP3_A zeigt eine fast quantitative Umsetzung für (4-Pe)Pro. HrmP3_A kann zusätzlich ein Prolinderivat mit einer Ethynylkette aktivieren. Dieses Ergebnis ist sehr vielversprechend im Hinblick auf die Mutasynthese eines Hormaomycinderivates mit Alkynylseitenkette. Dieses Derivat könnte in Pull-down-Experimenten zur Auffindung des molekularen Targets für Hormaomycin eingesetzt werden. HrmP2_A aktiviert *in vitro* bevorzugt Valin, was der bioinformatischen Voraussage entspricht. Allerdings wird *in vivo* Isoleucin von der NRPS inkorporiert. Die Gründe für diese Diskrepanz sind nicht bekannt. Die Sequenzen der Hormaomycin A-Domänen zeigen in einigen Fällen eine weitgehende Übereinstimmung am N- und C-Terminus (jeweils etwa 200 Aminosäuren). Das legt einen möglichen Austausch der zentralen DNA-Abschnitte, und damit der Substratspezifität, durch Rekombination während der Evolution nahe. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurden fünf rekombinante A-Domänen konstruiert, die alle die N- und C-terminale Sequenz von HrmO3_A trugen. Die zentralen Abschnitte wurden einerseits drei A-Domänen aus der Hormaomycin-NRPS andererseits zwei A-Domänen der NRPS des calcium dependent antibiotic (CDA) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), entnommen. Alle rekombinanten Enzyme wurden stabil in *E. coli* mit HrmR coexprimiert. Die Hormaomycinfusionen waren aktiv und zeigten in etwa die gleiche Substratspezifität und Aktivität wie die nativen, die zentralen Abschnitte enthaltenden, A-Domänen. Die Ergebnisse dieser Experimente geben Einblicke in die Evolution der Hormaomycin-A-Domänen und zeigen neue Strategien für die kombinatorische Biosynthese von nichtribosomalen Peptiden auf.

Im dritten Teil wurden die ersten bekannten, natürlich gebildeten Analoga des Hormaomycins aus einem Extrakt eines Hormaomycin-Überproduktionsstammes isoliert und deren Strukturen anschließend aufgeklärt. Hormaomycin A1 ist ein Deschlorohormaomycin, wogegen in Hormaomycin A2 Valin statt Isoleucin in das Peptid eingebaut wurde. Hormaomycin A3 und A4 tragen jeweils ein Leucin, Hormaomycin A5 zwei Leucine statt (3-Ncp)Ala im Molekül. Der Einbau der proteinogenen Aminosäuren in Hormaomycin A2-5 korrespondiert sehr gut mit den Ergebnissen der A-Domänentests und demonstriert die Anwendbarkeit dieser Tests für zukünftige Mutasyntheseexperimente. Die Aktivitäten der isolierten Analoga werden weitere Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Hormaomycin geben.

2 Abstract

Presented here are the results carried out on the elucidation of the biosynthesis, evolutionary investigations on the adenylation domains and studies on the flexibility of the biosynthetic machinery of the bacterial peptide hormaomycin. Hormaomycin, produced by *Streptomyces griseoflavus* W-384, bears several interesting biological activities. In addition, hormaomycin has a unique and interesting structure; it is a cyclic peptide lactone with eight building blocks, seven of which are non-proteinogenic. Some of these building blocks are unprecedented, such as (3-nitrocyclopropyl)alanine [(3-Ncp)Ala], 4-(Z-propenyl)proline [(4-Pe)Pro] and 5-chloro-N-hydroxypyrrole-2-carboxylic acid [Chpca]. Previous precursor-directed biosynthetic experiments showed an unusually flexible biosynthetic machinery. In the Piel group, the putative biosynthetic gene cluster of hormaomycin was isolated and sequenced. Analysis of the sequence revealed that hormaomycin is assembled by a nonribosomal peptide synthetase (NRPS).

In the first part of this work, the biosyntheses of the unique building blocks were partially elucidated with heterologous expressions of various biosynthetic genes in *E. coli*. Bioinformatic analyses could assign two gene candidates with unknown function, *hrmI* and *hrmJ*, to the (3-Ncp)Ala biosynthetic pathway. For both enzymes no close homologs are known. Feeding of (3-Ncp)Ala to a knock-out mutant of *hrmI* could complement hormaomycin production, proving that HrmI belongs to this precursor pathway. HrmJ, a α -ketoglutarate-dependent oxygenase, is hypothesized to catalyze the first step of the (3-Ncp)Ala pathway. The enzyme was heterologously expressed in *E. coli* and purified in high yields. Enzymatic assays with HrmJ and lysine produced a new product that was detected by mass spectrometry. The results provide evidence for a hydroxylated lysine with a terminal oxime moiety. HrmI is a putative oxidase that could belong to a new enzyme family. (4-Pe)Pro was shown to be synthesized from tyrosine and dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), analogous to the lincomycin pathway. HrmF, a L-DOPA dioxygenase, catalyzes ring opening of the catechol leading to formation of a unstable, yellow pyrroline intermediate. In this work, HrmF was kinetically characterized and shown that the enzyme has catalytic efficiency of around 160 times higher than its homolog from the lincomycin pathway, LmbB1. The high activity, very relaxed substrate specificity and high protein yields make HrmF a good candidate for chemoenzymatic synthetic utility. The starter unit of hormaomycin biosynthesis, Chpca, was proposed to be synthesized from proline covalently bound to HrmL, a peptidyl carrier protein (PCP) through bioinformatic analyses. In this work, HrmK and HrmL were heterologously expressed and purified. The Acyl-CoA synthetase HrmK was characterized in a mass spectrometry based assay. Proline was shown to be activated very selectively and quantitatively in the assay. Analogs of proline could be activated only in trace amounts. For HrmL, 4'-phosphopanthetheinylation was observed by mass spectrometry.

The second part of this work deals with the characterization of the adenylation domains (A domains) of the hormaomycin NRPS. All seven A domains could be heterologously expressed and isolated. It was shown that all A domains need HrmR, a MbtH-like protein, for their catalytic activities. Hence, HrmR was coexpressed with the adenylation domains. For the protein complex, a stoichiometric ratio of 1:1 was determined. The proteins were comprehensively characterized in a mass spectrometry-based assay and further purified by FPLC to remove false positive activities. For HrmO3_A and HrmP1_A, (β -Me)Phe was shown to be the native substrates. HrmO1_A and HrmO4_A activate (3-Ncp)Ala to a great extent; the second preferred substrate was shown to be leucine [around 10% compared to (3-Ncp)Ala]. HrmO2_A adenylates threonine very selectively and HrmP3_A shows a high turnover for (4-Pe)Pro. HrmP3_A can additionally activate a proline derivative with an ethynyl side chain. This result is very promising in terms of mutasynthetic experiments, to yield a hormaomycin derivative with an alkynyl side chain. This hormaomycin could then be used in pull-down experiments for the identification of the molecular target of hormaomycin. HrmP2_A was shown to activate valine *in vitro*, which fits to the bioinformatic prediction. However, *in vivo*, isoleucine is incorporated into hormaomycin. This discrepancy has yet to be elucidated. Multiple hormaomycin A domains exhibit high sequence identity at their N- and C-termini (around 200 amino acids in each case). This suggested an exchange of the central DNA stretches of the domains might have occurred during evolution, and thus an exchange of substrate specificity via recombinatoric events. To test this hypothesis experimentally, five recombinant A domains were constructed, all of them having the same sequence of HrmO3_A at their N- and C-termini. Three central DNA stretches originated from hormaomycin A domains on the one hand while the other two were taken from adenylation domains of the NRPS of the “calcium-dependent antibiotic” (CDA) from *Streptomyces coelicolor* A3(2). All five recombinant enzymes were coexpressed with HrmR in *E. coli*. The hormaomycin fusions were active and showed virtually the same substrate specificity and enzymatic turnover as the native central-domain containing enzymes. The results of this study give new insights into the evolution of the hormaomycin adenylation domains and point to a combinatorial exchange of substrate specificities. This study could lead to new, evolution-based strategies for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis.

In the third part, the first known natural hormaomycin analogs were isolated from an extract of a hormaomycin overproducing strain and their structures were subsequently elucidated. Hormaomycin A1 is a dechlorohormaomycin, while in hormaomycin A2, valine was shown to be incorporated instead of isoleucine. Hormaomycin A3 and A4 have one leucine each and Hormaomycin A5 harbors two leucines instead of (3-Ncp)Ala. The incorporation of the proteinogenic amino acids into hormaomycin A2-5 corresponded well with the the results of the A domain assays and demonstrates the applicability of these tests for mutasynthetic experiments in the future. Furthermore, the bioactivities of the isolated analogs will give further insights into the structure-activity relationships of hormaomycin.

3 Einleitung

3.1 Biologie und Signalstoffe der Streptomyceten

Bakterien bilden die größte Gruppe von Organismen und haben für den Menschen in vielerlei Hinsicht wichtige Bedeutungen: Unter anderem haben sie großen Einfluss als Krankheitserreger, als symbiotische Organismen sowie in der Lebensmittel- und Biotechnologie. Bedeutend ist auch der ausgeprägte sekundäre Metabolismus der Bakterien. Die Menschheit hat sich die vielfältigen biologischen Aktivitäten bakterieller Stoffwechselprodukte zunutze gemacht. Eine besonders wichtige Bakteriengruppe für den Menschen ist die Ordnung der Actinomycetales, da deren Vertreter extrem viele biologisch aktive Substanzen produzieren, von denen viele als Therapeutika aus der heutigen Medizin nicht mehr wegzudenken sind.^{1,2} Von den mehr als 5000 bekannten Antibiotika werden mehr als zwei Drittel von Actinomyceten synthetisiert.³ Naturstoffe aus Actinomyceten machen heute ein Milliardenvolumen auf dem Arzneimittelmarkt aus.⁴

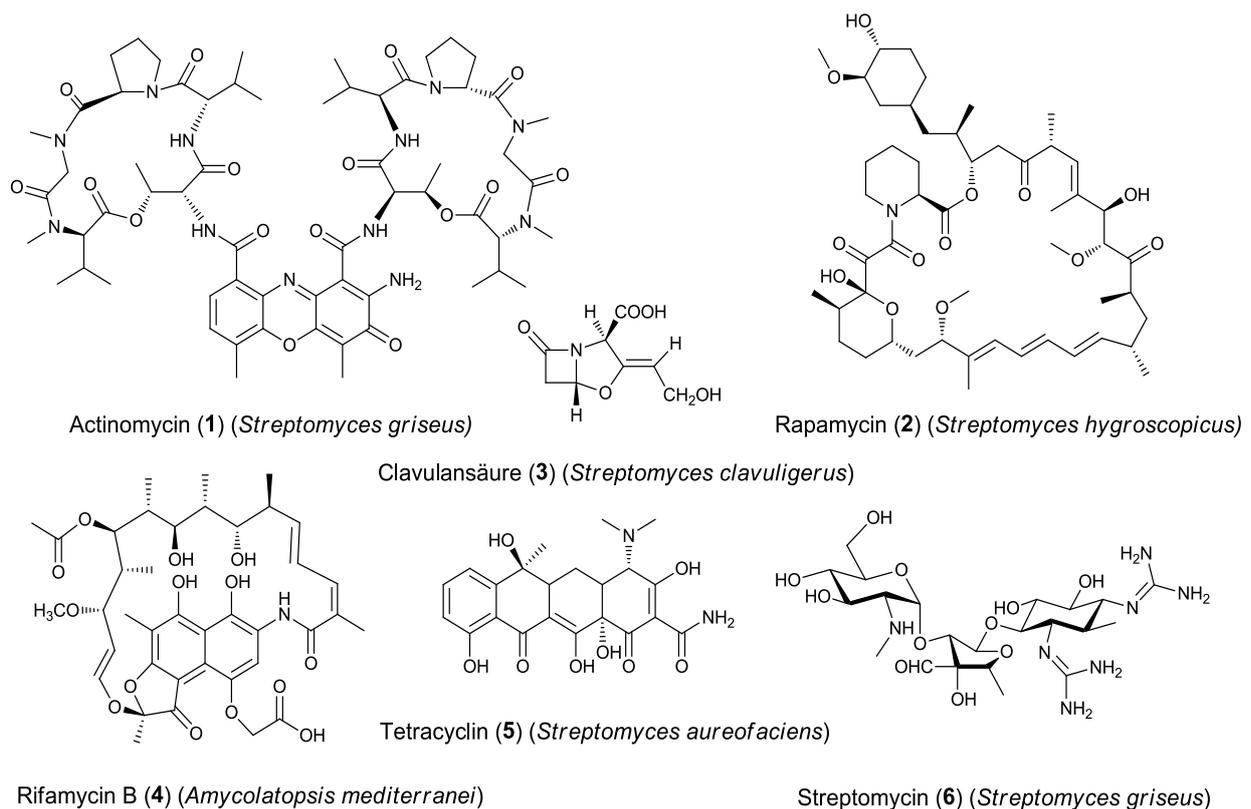


Abb. 3-1: Einige medizinisch verwendete Stoffwechselprodukte von Streptomyceten

Als herausragende Beispiele sind Zytostatika wie Actinomycin (1)⁵ und Immunsuppressiva wie Rapamycin (2)⁶ zu nennen. Besonders zahlreich sind die Antibiotika aus den verschiedensten Stoffklassen, wie die β -Lactame [Beispiel Clavulansäure (3)],⁷ Makrolide [Beispiel Rifamycin B (4)],⁸ Tetracycline (5),⁹ oder Aminoglykoside [Beispiel Streptomycin (6)].¹⁰ Abbildung 3-1 zeigt die Strukturen dieser Substanzen. Actinomycin (1) und Streptomycin (6) waren die ersten Antibiotika, die

Selman A. Waksman, einer der Pioniere der Antibiotikaforschung, in den 1940er Jahren aus der Fermentationsbrühe von *Streptomyces griseus* isolieren und charakterisieren konnte.^{11,12}

Die Gattung *Streptomyces* ist die artenreichste der Actinomyceten. Streptomyceten sind an extreme Lebensbedingungen angepaßt, sie sind vor allem im Erdboden und in marinen Habitaten zu finden. Die Streptomyceten sind Einzeller, haben aber als eine der wenigen Prokaryoten die Fähigkeit zu Mycelienbildung entwickelt. Außerdem können sie, ähnlich wie *Bacillus*-Arten, Sporen bilden, die lange Perioden auch bei Trockenheit überdauern können. Der Lebenszyklus von Streptomyceten ist komplex¹³⁻¹⁶ und ähnelt dem von Pilzen. Sie formen bei ausreichendem Nahrungsangebot aus einer Spore ein vegetatives Mycelium, das aus sich verzweigenden Hyphen besteht (vergleiche Abb. 3-2). Wenn das Nahrungsangebot wieder knapper wird, werden weitere morphologische Veränderungen eingeleitet. Es bildet sich ein sogenanntes Luftmycel aus langen, gestreckten Hyphen aus, das aus der wässrigen Umgebung in die Luft wachsen kann. Dort bildet es durch eine kontrollierte Form der Zellteilung wieder Kompartimente aus, die sich durch Verdickung der Zellwände und Bildung eines grauen Pigmentes wieder in Ketten von Sporen differenzieren. Diesen Vorgang nennt man Sporulation.

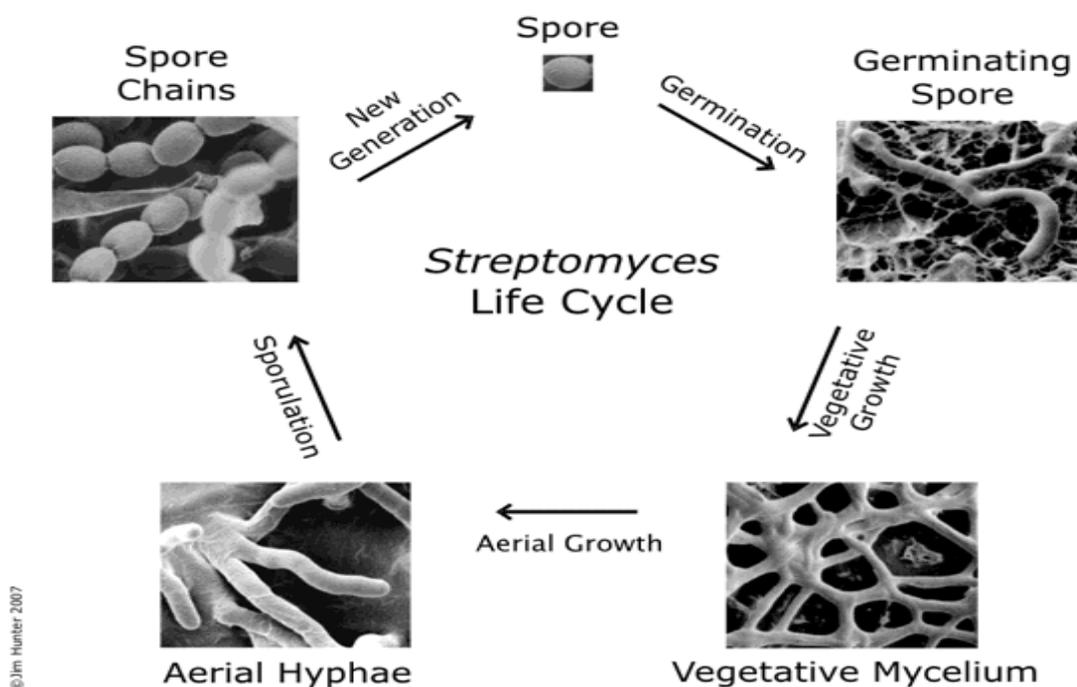


Abb. 3-2: Der Lebenszyklus von Streptomyceten (aus http://openwetware.org/wiki/ Streptomyces:Other_Bits/ An_Introduction_to_Streptomyces, © Jim Hunter, Goss Laboratory).

Der sekundäre Metabolismus von Streptomyceten ist, wie oben erwähnt, äußerst vielfältig. Durch die Sequenzierung des Genoms von *Streptomyces coelicolor* A3(2)¹⁷ und weiterer Streptomycetengenome zeigte sich, dass *Streptomyces*-Arten eine Vielzahl von Biosynthesegenclustern für bioaktive Metaboliten besitzen.¹⁸ Viele Produkte dieser Gencluster sind bis heute nicht bekannt. Die Vielfalt an Genclustern zeigt, dass diese Bakterien für den Kampf gegen diverse Umwelteinflüsse und Feinde mit

einem Arsenal aus Substanzen mit verschiedenen Wirkungen ausgestattet sind. Im Laufe der Evolution haben zum Beispiel horizontaler Gentransfer, Mutationen und Rekombination von DNA-Abschnitten zu dieser außergewöhnlichen Vielfalt an sekundären Metaboliten geführt.¹⁹⁻²² Gerade die sehr komplexe Umgebung des Erdbodens, die Tatsache, dass Streptomyceten unbeweglich sind und der hohe Stress (chemischer, biologischer, physikalischer), haben laut Bentley et al. die Evolution der Metabolitenproduktion beschleunigt.¹⁷ Challis und Hopwood heben außerdem Synergieeffekte, wie sie zum Beispiel bei Clavulansäure und anderen β -Lactamen²³ oder bei dem Zweikomponenten-antibiotikum Streptogramin²⁴ auftreten, als Antrieb für die Evolution von Genclustern hervor.³

Es gibt starke Evidenz dafür, dass die Produktion von sekundären Metaboliten mit der Bildung von Luftmycel assoziiert ist.^{14,25} Das wird auch aus der Beobachtung deutlich, dass Streptomyceten in ihrer natürlichen Lebenswelt dann Antibiotika produzieren, wenn die unmittelbare Umgebung nährstoffarm ist, und die Phase der Luftmycelbildung beginnt.²⁶ Wie wird nun die Produktion von Sekundärmetaboliten und Luftmycelbildung koordiniert? Zum Beispiel ist in den Genclustern von Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* und Streptomycin (6) in *Streptomyces griseus* nur ein einziges Regulatorgen kodiert.²⁵ Dieser Wachstumsfaktor, im Falle von 6 *strR*, ist von einem direkten Signalaktivator, AdpA, kontrolliert.²⁷ Die Transkription dieses Aktivators wird von einem γ -Butyrolacton, genannt A-Faktor (7) (vgl. Abb. 3-3), aktiviert.

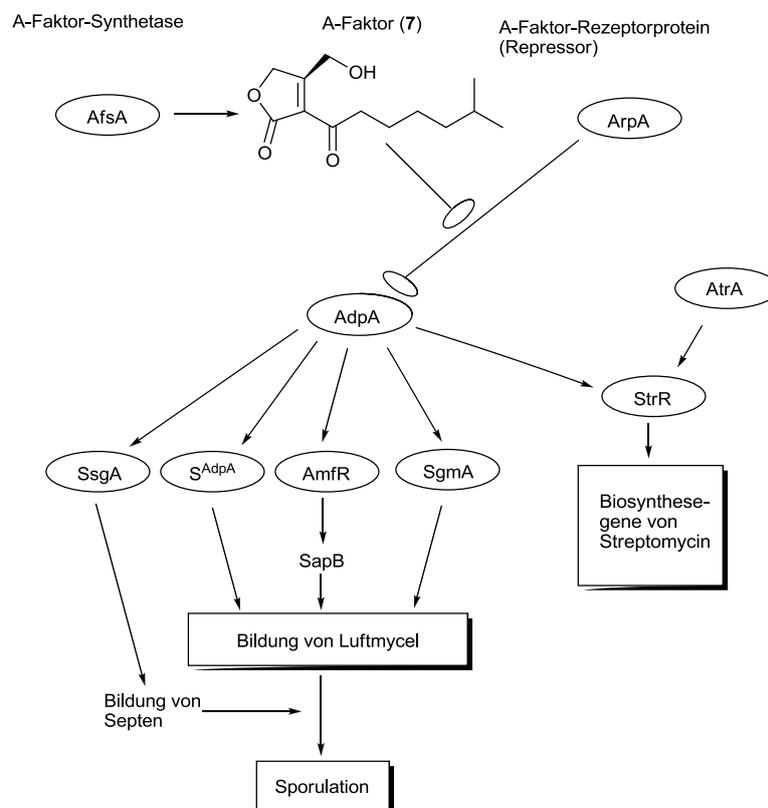


Abb. 3-3: Die Regulation der Streptomycinbiosynthese und der morphologischen Differenzierung durch den A-Faktor (nach²⁵). Pfeilspitzen indizieren Aktivierung, wohingegen Ovale am Ende des Pfeils eine Repression indizieren.

Dieser A-Faktor (7) bindet an ArpA, einen Repressor der Transkription von *adpA*. Die Biosynthese von Streptomycin ist aber außerdem noch durch andere Faktoren, wie z.B. den Transkriptionsfaktor AtrA²⁸ über StrR reguliert. AdpA bindet nicht nur an das Aktivatorgen der Streptomycinbiosynthese, sondern kann auch das Wachstum von Luftmycel und Sporen induzieren. Es sind bis heute mehrere Targets von AdpA identifiziert worden: *ssgA*, das für die Ausformung von Septen bei der Sporenbildung notwendig ist,²⁹ und einige Gene die für essentielle Proteine in der Luftmycelbildung kodieren. Dazu gehören unter anderem ein extracytoplasmatischer σ -Faktor,³⁰ die Metalloendopeptidase SgmA,³¹ und AmfR, ein Regulator des *amf*-Operons. Dieses ist für die Expression eines lanthioninartigen Peptides, SapB, verantwortlich.³² SapB besitzt aber keine antibiotischen Eigenschaften, sondern kann als hydrophobes Peptid tensidartig die Oberflächenspannung senken, und erleichtert so die Aufrichtung der Zelloberfläche aus wässriger Umgebung in die Luft, die Initiation der Luftmycelbildung.^{33,34} SapB wurde erstmals im anderen Modellorganismus der Streptomyces, *Streptomyces coelicolor*, entdeckt. In diesem Organismus scheint die Regulation der Luftmycelbildung komplexer zu sein als in *S. griseus*, einige Elemente sind aber konserviert. Es gibt Orthologe zu den dargestellten Aktivatoren. Das *amf*-Operon für die Produktion von SapB heißt hier *ram*-Operon,³⁵ *bldH* ähnelt *adpA*³⁶ und der σ -Faktor BldN ist das Ortholog des AdpA- σ -Faktors.³⁷ Die essentiellen Gene für die Luftmycelbildung in *S. coelicolor* wurden *bld* genannt, nach dem englischen Wort bald (kahl), da die Mutanten dieser Gene kein Mycel bilden können. *bldH* enthält ein in Streptomyces äußerst seltenes TTA-Codon, dessen Translation durch die Expression der Leucyl-tRNA BldA reguliert wird.³⁸ Außerdem existiert in *S. coelicolor* noch ein weiterer, zum gerade beschriebenen Mechanismus komplementärer Weg zur Luftmycelbildung. Er wird auf nährstoffarmem Medium induziert und führt zur Bildung von sogenannten Chaplins.^{39,40} Diese kleinen Proteine formen fibrillenartige Strukturen aus, die ihrerseits wie SapB hydrophobe Oberflächen haben, und ebenso zur Ausbildung von Luftmycelium führen.⁴¹⁻⁴³ Die Regulation der Luftmycelbildung ist in diesem Organismus sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es scheint in *S. coelicolor* mehrere aktivierende, hemmende und verstärkende Querverbindungen zwischen diesen beiden Aktivierungskaskaden zu geben. Für tiefere Informationen sei auf die Literatur verwiesen.^{14,44,45}

Der sekundäre Metabolismus in Streptomyces ist außerdem durch andere Faktoren, wie zum Beispiel das Kohlenstoff-, Phosphat- und Stickstoffangebot und die Produktion von N-Acetylglucosamin reguliert.^{25,46} Es gibt aber auch immer mehr Evidenz für weitere, artspezifische Effektoren von Wachstum und Sekundärmetabolismus.⁴⁷ Neben dem oben erwähnten A-Faktor (7) sind bis zum heutigen Tage 13 weitere γ -Butyrolactone aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten isoliert worden.^{47,48} Den γ -Butyrolactonen chemisch und von der Wirkweise recht ähnlich sind die Methylenomycinfurane (8),⁴⁹ Furancarbonsäuren, die zuerst aus *Streptomyces violaceoruber* isoliert wurden.⁵⁰ Sie erhöhen die Produktion des Antibiotikums Methylenomycin. Autoinduzierend wirken auch das AMP-Analogon B-Faktor (9)⁵¹ oder das Diaminotetrol PI-Faktor (10) aus *Streptomyces natalensis*.⁵² Für die Pamamycine (11), Polyketide aus *Streptomyces alboniger*,⁵³ wurde dagegen

zeigt, dass sie in geringen Konzentrationen Wachstum und Antibiotikaproduktion auch in verschiedenen anderen *Streptomyces*-Arten induzieren können.^{54,55}

Neben Proteinen wie dem C-Faktor⁵⁶ gibt es außerdem niedermolekulare Peptide wie das Goadsporin (**12**) oder das Hormaomycin (**13**) (siehe Abb. 3-4), die ebenso in nanomolaren Konzentrationen die Antibiotikaproduktion und das Wachstum von vielen verschiedenen Streptomyceten fördern.^{56,57} Da sie ein sehr breites Wirkspektrum besitzen, wird angenommen, dass sie in die oben beschriebenen Signalketten, die zur Mycelbildung und Antibiotikaproduktion führen, eingreifen. Goadsporin (**12**), ein lineares Peptid aus *Streptomyces* sp. TP-A0584,⁵⁸ konnte ebenfalls ein breites Spektrum von Streptomyceten anregen. Es besitzt eine Reihe von Oxazolen und Thiazolen, die aus Serin- Threonin- und Cysteinresten posttranslational gebildet werden.^{59,60} Hormaomycin (**13**), der Gegenstand dieser Arbeit,^{57,61} ist das strukturell außergewöhnlichste der genannten bakteriellen Hormone und zeigt eine ganz ähnliche Wirkung wie Goadsporin. Im Gegensatz zu Goadsporin (**12**) wird Hormaomycin (**13**) aber nichtribosomal synthetisiert (siehe Abschnitt 3.2).⁶² Weitere Informationen über **13** befinden sich im Abschnitt 3.4. Vergleichende Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Hormaomycin und Goadsporin sind derzeit Forschungsgegenstand in den Arbeitsgruppen Piel (Universität Bonn) und Onaka (Toyama University).

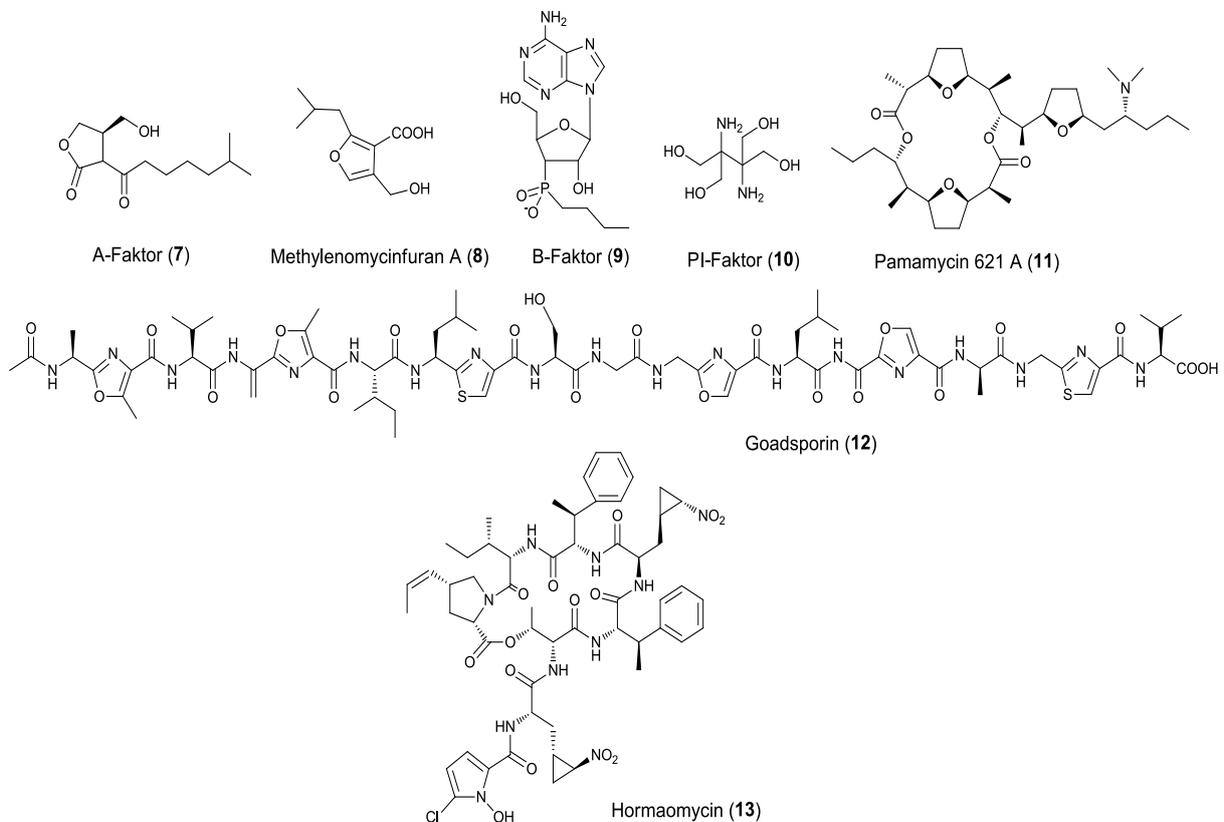


Abb. 3-4: Niedermolekulare Signalstoffe in Streptomyceten

3.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)

Wie seit den 1950er Jahren bekannt ist, werden Peptide und Proteine in Organismen grundsätzlich am Ribosom synthetisiert.⁶³ Es existieren aber auch vom Ribosom unabhängige Mechanismen, Peptide als Produkte des Sekundärstoffwechsels zu synthetisieren. Einige dieser nichtribosomalen Peptide (NRP) haben auch für den Menschen als Arzneistoffe eine wichtige Bedeutung.⁶⁴ Nichtribosomale Peptide, die in der heutigen Medizin eine wichtige Rolle spielen, sind unter anderem das Lipopeptid Daptomycin (**14**)⁶⁵ und das Glycopeptid Vancomycin (**15**),⁶⁶ die als Antibiotika eingesetzt werden. Außerdem sind das immunsuppressiv wirkende Ciclosporin (**16**)⁶⁷ und das antitumoral wirkende Bleomycin A₂ (**17**) als Hauptkomponente des Zytostatikums Bleomycin⁶⁸ (siehe Abb. 3-5) zu nennen. Ein wichtiges Merkmal nichtribosomal synthetisierter Peptide ist, dass sie oft eine beträchtliche Anzahl an nicht-proteinogenen Aminosäuren enthalten. Mehr als 300 verschiedene Bausteine wurden in nichtribosomalen Peptiden identifiziert.⁶⁴

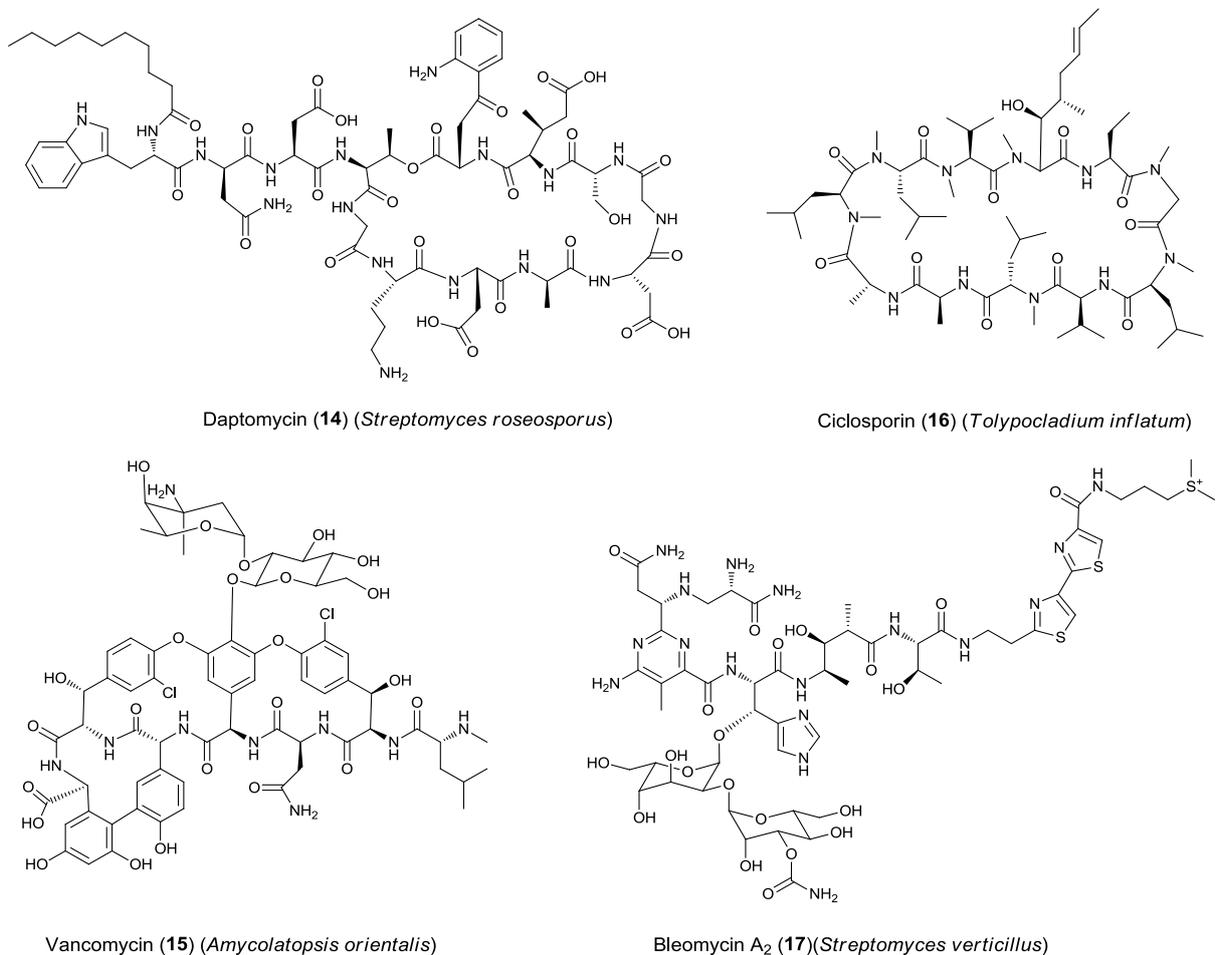


Abb. 3-5: Einige medizinisch eingesetzte nichtribosomale Peptide

Die Geschichte der Erforschung der NRP beginnt im Jahr 1963, als Tatum und Mitarbeiter bewiesen, dass die Biosynthese des Antibiotikums Tyrocidin (**18**), produziert von *Bacillus brevis*, durch einen vom Ribosom unabhängigen Mechanismus stattfindet.⁶⁹ Dies wurde dadurch belegt, dass die

Die meisten bakteriellen NRPS folgen der sogenannten Kolinearitätsregel, das heißt, jedes Modul ist für die Aktivierung und den Einbau von genau einer Aminosäure verantwortlich. Da die wachsende Peptidkette von Modul zu Modul weitergereicht wird, kann man aus der Abfolge der Module auf das Produkt und umgekehrt vom NRP auf die Struktur der NRPS schließen. Dazu sind bioinformatische Methoden zur Entschlüsselung der Substratspezifität der Module notwendig. Diese Substratspezifität wird hauptsächlich durch das aktive Zentrum der Adenylierungsdomänen (A-Domänen) (siehe 3.2.1) determiniert. Die Entschlüsselung des „nichtribosomalen Codes“ durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen⁷⁹⁻⁸¹ hat es ermöglicht, einerseits Gencluster für viele bekannte nichtribosomale Peptide zu finden, aber auch durch „genomic mining“ aufgrund vorhandener Gensequenzen neue Naturstoffe vorherzusagen und zu isolieren.^{82,83} Darüber hinaus sind in Bakterien Hybride aus NRPS und Polyketidsynthasen (PKS) weit verbreitet: Die Polyketidbiosynthese funktioniert nach einem ähnlichen Thiotemplatmechanismus, in der Natur was die Kombination von Modulen aus beiden Biosynthesewegen erlaubt.⁸⁴ Prominente Beispiele für natürlich vorkommende NRPS/PKS-Hybride sind z.B. das Immunsuppressivum Rapamycin (**2**) (Abb. 3-1) und das antiproliferativ wirkende Bleomycin (**17**) (Abb. 3-5).

Es gibt aber auch Ausnahmen von der Kolinearitätsregel. Bei Dimeren, wie dem marinen Chinoxalin Echinomycin, werden alle Module zweimal durchlaufen, bevor an der Thioesterase über zwei Esterifizierungen die Monomere zum Dimer verknüpft werden.⁸⁵ Auch die Thioesterasen von Gramacidin S⁸⁶ und Enterobactin⁸⁷ arbeiten iterativ und katalysieren die Di- bzw. Trimerisierung der assemblierten Peptidketten. In der Nocardicin-NRPS befinden sich fünf Module statt aufgrund des Moleküls zu erwartenden drei Modulen.⁸⁸ Eine kürzlich erschienene Studie zeigt aber, dass alle fünf Module in der Biosynthese des Tripeptids involviert sind.⁸⁹ Die Inaktivierung jeder einzelnen PCP-Domäne führte zu einer nichtproduzierenden Mutante. Ein Vergleich der Biosynthesegencluster der drei antitumoralen Substanzen Bleomycin (**17**), Tallysomycin und Zorbamycin zeigte, dass alle drei NRPS eine unterschiedliche Anzahl von Modulen besitzen, obwohl die Produkte von der Aminosäureanzahl identisch sind.⁹⁰

Neben den oben dargestellten NRPS gibt aber auch iterative NRPS. Hier werden einzelne Module für die Synthese eines Moleküls mehrfach benutzt. Diese NRPS kommen hauptsächlich in Eukaryoten vor,^{91,92} aber es gibt auch bakterielle Beispiele. Das Oligopyrrolantibiotikum Congocidin aus *Streptomyces ambofaciens* wird an einer NRPS mit einer einzigen A-Domäne assembliert.⁹³

3.2.1 A-Domänen

Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) katalysiert die sogenannte Adenylierung der einzubauenden Aminosäure, d.h. die Aktivierung durch Bildung eines Aminoacyl-intermediates aus Aminosäure und Adenosintriphosphat (ATP) (siehe Abb. 3-7 a). Anschließend wird diese aktivierte Aminosäure unter

Abspaltung von Adenosinmonophosphat (AMP) auf eine terminale Sulfhydrylgruppe im aktiven Zentrum der PCP-Domäne übertragen (Abb. 3-7 b).

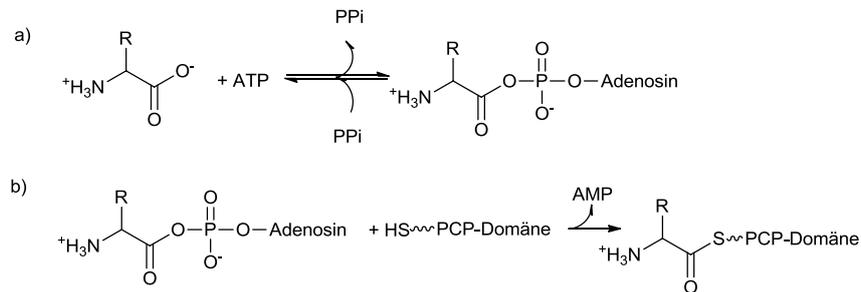


Abb. 3-7: Aktivierung (a) und Übertragung auf das Peptidylcarrierprotein (PCP) (b) von Aminosäuren durch die A-Domäne.

Durch die 1997 publizierte Aufklärung der Kristallstruktur von PheA, dem Phenylalanin aktivierenden ersten Modul der Gramicidinsynthetase,⁹⁴ konnten wichtige Einsichten in die Struktur und den Aktivierungsmechanismus einer A-Domäne gewonnen werden. Demnach ist die A-Domäne aus einer kleineren, etwa 100 Aminosäuren (AS) umfassenden C-terminalen Subdomäne und einer größeren, ungefähr 400 Aminosäuren langen, N-terminalen Subdomäne aufgebaut.⁹⁵ Das aktive Zentrum ist an der Verbindungsfläche zwischen diesen Subdomänen lokalisiert, wobei fast alle für die Substraterkennung wichtigen Aminosäure-Positionen Teil der C-terminalen Domäne sind. Weitere gewonnene Kristallstrukturen zeigen, dass die Struktur von vielen Acyl-Adenylat generierenden Enzymen sehr ähnlich ist, wie z.B. bei der freistehenden, 2,3-Dihydroxybenzoat-aktivierenden Domäne EntB aus der Bacillibactin-Biosynthese,⁹⁶ aber auch bei der Acetyl-CoA-Synthase⁹⁷ oder der Luciferase der Leuchtkäfer.⁹⁸ Deshalb wurde für diese Superfamilie der Name „ANL“ (Acyl-CoA-Synthetasen, NRPS-Adenylierungsdomänen, Luciferasen) vorgeschlagen.⁹⁵

In der Bindetasche von PheA wurden zehn Aminosäurereste ausgemacht, die mit der aktivierten Aminosäure interagieren. Eine bioinformatische Analyse aller bis dahin publizierten Sequenzen von A-Domänen ergab, dass sich diese Aminosäurereste je nach Substrat unterscheiden, und dass man in den meisten Fällen aus der Sequenz dieser zehn Aminosäuren auf das aktivierte Substrat schließen kann. Diese Aminosäuresequenz wird als nichtribosomaler Code („nonribosomal code“) bezeichnet und erlaubt in vielen Fällen eine funktionelle Vorhersage der A-Domänen.^{79,80} Der nichtribosomale Code wurde später noch auf acht Aminosäuren reduziert (Position 236, 239, 278, 299, 301, 322, 330, 331 von PheA) da die Positionen 235 (Asp) bzw. 517 (Leu) bei allen sequenzierten A-Domänen nahezu invariant sind. Erstere ist in die Bindung der α -Aminogruppe der gebundenen Aminosäure involviert, letztere in die Bindung der α -Carboxygruppe.

Die Bestimmung des nichtribosomalen Codes hat viele Forscher herausgefordert, durch Mutationen der involvierten Aminosäuren die Substratspezifität der A-Domäne zu verändern. In der Studie von Stachelhaus et al. änderte sich die Spezifität der A-Domäne AspA aus der Surfactinsynthetase durch

Austausch einer einzigen Aminosäure (His322Glu) von Asparaginsäure zu Asparagin.⁷⁹ Anschließend konnten Eppelmann et al. durch Austausch einer einzigen Aminosäure (Lys239Gln) der A-Domäne GluA aus der Surfactinsynthetase die Substratspezifität des Enzyms von Glutaminsäure zu Glutamin verändern.⁹⁹ In einem strukturbasierten, bioinformatischen Ansatz gelang es Chen et al. die Substratspezifität der kristallisierten A-Domäne PheA⁹⁴ durch einen eigens entwickelten Algorithmus und dann nachfolgenden einzelnen Mutationen im aktiven Zentrum die Substratspezifität von Phenylalanin zu ändern. So ließ sich das bevorzugte Substrat von Phenylalanin zur ungeladenen Aminosäure Leucin, aber auch zu den geladenen Aminosäuren Arg, Glu, Lys, und Asp ändern. Die mutierten Enzyme hatten aber durchweg eine geringere katalytische Aktivität als der Wildtyp (maximal 16%).¹⁰⁰

In vielen Fällen besitzen die A-Domänen eine gewisse Flexibilität hinsichtlich der Substraterkennung. Das ist besonders bei hydrophoben Aminosäureresten der Fall.⁸⁰ Somit kommt es oft zu natürlichen Strukturvarianten von nichtribosomalen Peptiden. Das cyclische Dekapeptid Tyrocidin (**18**) besteht beispielsweise aus vier verschiedenen Verbindungen, die sich untereinander in zwei Aminosäure-Positionen (Phe und Tyr) unterscheiden.¹⁰¹ Von den „calcium-dependent antibiotics“ (CDA) (**20**) sind insgesamt sechs verschiedene natürliche Varianten isoliert worden, die sich an drei Aminosäureresten unterscheiden (vgl. Abb. 3-16).¹⁰² Vom Immunsuppressivum Ciclosporin (**16**) (Abb. 3-5) sind sogar ca. 30 Strukturvarianten bekannt.¹⁰³

Die Evolution von A-Domänen und damit von NRPS-Genclustern ist in den Microcystinen, die von verschiedenen Cyanobakterienarten synthetisiert werden, untersucht worden. Christiansen et al. konnten interessante Erkenntnisse über die Evolution von A-Domänen der Anabaenopeptide aus *Planktothrix*-Arten gewinnen. Durch phylogenetische Analysen konnten Einsichten in die Evolution dieser A-Domänen und ihrer Spezifitäten aus gemeinsamen Vorläufern gewonnen werden.¹⁰⁴ Die Spezifitäten homologer A-Domänen haben sich durch Punktmutationen in Aminosäureresten in der Bindetasche verändert. Bei den Microcystinen und den Aeruginosinen haben rekombinatorischer Austausch von A-Domänen zur Bildung von neuen NRPS, und damit neuen Peptiden geführt.^{105,106} Das konnte durch Sequenzanalysen gezeigt werden. Tooming-Klunderud et al. konnten nicht nur Austausch von ganzen A-Domänen, aber auch Rekombinationspunkte in A-Domänen im Microcystin-Operon ausmachen, die zu einer zusätzlichen Varietät der Microcystine geführt haben.¹⁰⁷

Klassischerweise wird die Substratspezifität der A-Domänen *in vitro*, das heißt isoliert im Reaktionsgefäß, mit dem ATP/Pyrophosphat-Austauschassay ermittelt.¹⁰⁸ In diesem Assay wird der Austausch von natürlichem Pyrophosphat und markiertem, im Überschuss zugesetzten ³²P-Pyrophosphat gemessen. Aus der Rate des Austauschs lassen sich Rückschlüsse auf das Ausmaß der Aminosäurenaktivierung schließen. Einen modifizierten, massenspektrometrisch basierten Assay mit einem stabilen Sauerstoffisotop (¹⁸O), das nicht radioaktiv ist, haben Phelan et al. entwickelt.¹⁰⁹ Dieser Assay wird auch in dieser Arbeit verwendet (siehe Abschnitt 5.4.4, Abb. 5-54). Dorrestein et al. haben

einen ebenfalls massenspektrometrisch basierten Assay publiziert, in dem der AT-Domäne ein Pool von Aminosäuren angeboten wird, und nur das präferierte, gebundene Substrat detektiert wird.¹¹⁰

3.2.2 Andere Domänen der NRPS

Peptidylcarrierproteine (PCP) sind kleine, 80-100 Aminosäuren lange Proteine, die entweder freistehend, aber auch als Teil von NRPS vorkommen können.¹¹¹ Um Aminosäuren von der A-Domäne aufnehmen zu können, müssen die PCP phosphopanthetheinyliert werden. Bei dieser Reaktion wird ein Phosphopanthetheinylrest (4'-Ppant) aus Coenzym A (**19**) an ein Serin, das in einem konservierten GGXS-Motiv liegt, im aktiven Zentrum des Proteins angehängt. Dies geschieht durch die Aktivität einer Phosphopanthetheinyltransferase (PPTase).¹¹² 3',5'-ADP wird freigesetzt und das Serin besitzt nun einen etwa 20 Å langen, beweglichen Rest mit einer terminalen Sulfhydrylgruppe (-SH) (vgl. Abb. 3-8). Dieser ist gut zugänglich für nucleophile Substitutionsreaktionen. Die unmodifizierte Form der PCPs wird als *apo*-Form, der phosphopanthetheinylierte Zustand als *holo*-Form bezeichnet. Das PCP selber scheint kaum Substratspezifität zu besitzen.¹¹³

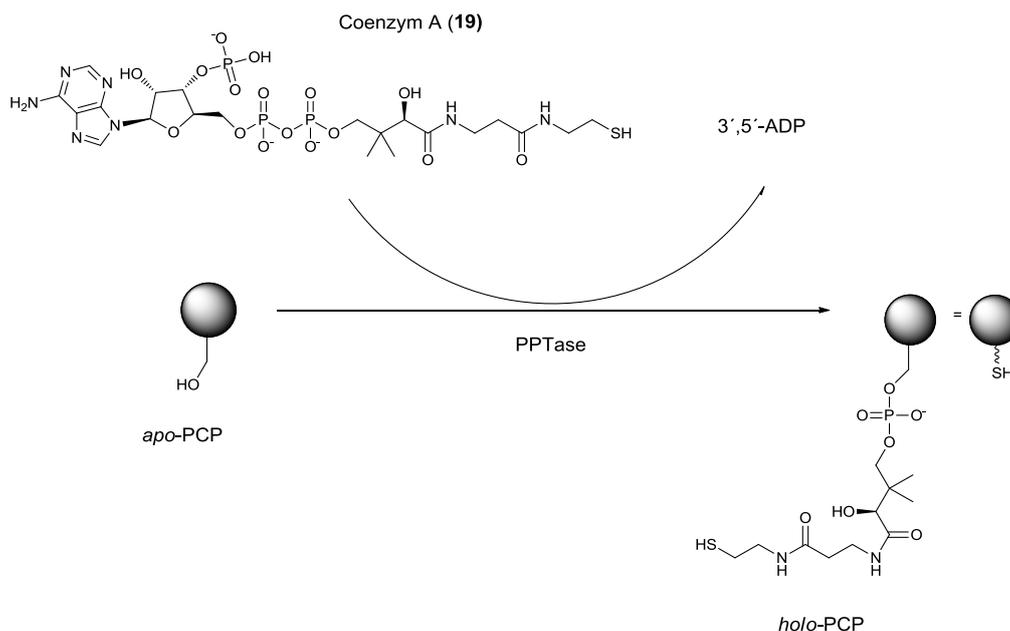


Abb. 3-8: Phosphopanthetheinylierung durch Phosphopanthetheinyltransferasen (PPTasen). Die PPTase überträgt eine 4'-Phosphopanthetheinylgruppe aus Coenzym A (**19**) auf ein Serin eines *apo*-Peptidylcarrierproteins (PCP). Es entsteht ein *holo*-PCP mit einer terminalen -SH-Gruppe.

Die Kondensationsdomänen (C-Domänen) sind für die Verlängerung der Peptidkette verantwortlich. Sie katalysieren die Kondensationsreaktion zwischen der Peptidylkette, die an das 4'-Ppant des in der Enzymkette stromaufwärts gelegenen PCP gebunden ist, und der Aminosäure, die an das stromabwärts gelegene PCP gebunden ist (vgl. Abb. 3-9). Kristallisationsstudien der freistehenden C-Domäne VibH aus der Vibriobactinbiosynthese zeigen die Existenz eines Lösungsmittelkanals, der von beiden Seiten der C-Domäne zugänglich ist.¹¹⁴ Es wird postuliert, dass sowohl der 4'-Ppant-Arm der stromaufwärts

(Donor), als auch der stromabwärts (Akzeptor) liegenden PCP-Domäne durch diesen Tunnel das aktive Zentrum, in dem die Kondensation stattfindet, erreichen können.

Das aktive Zentrum enthält ein charakteristisches Motiv mit konservierten Histidinen (HHxxxxDG),¹¹⁵ das sich als essentiell für die katalytische Aktivität herausstellte.¹¹⁶ Die Substratspezifität der C-Domäne wird als eher breit angesehen,¹¹⁷ wobei durch Fütterungsexperimente mit Aminoacyl- oder Peptidyl-N-acetylcysteaminthioestern (SNACs) gezeigt wurde, dass es Unterschiede zwischen Donor- und Akzeptorseite gibt.⁷⁷ So gibt es an der Donorseite eine breite Erkennung unbekannter Substrate, wie z.B. Aminoacyl- statt Peptidresten oder Peptidketten mit unterschiedlicher Aminosäureanzahl und –zusammensetzung.^{113,118-120} Die Tatsache, dass gegenüber den Domänen im selben Modul eine größere Selektivität vorherrscht als gegenüber den im vorherigen, zeigt, dass bei kombinatorischen Experimenten die Rekombination von ganzen Modulen erfolgsversprechender als die Rekombination einzelner Domänen ist.

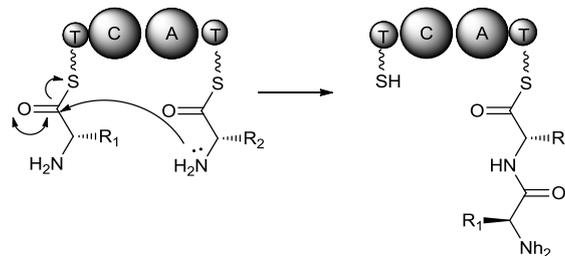


Abb. 3-9: Peptidknüpfung durch die Kondensationsdomäne (C). T=Thiolierungsdomäne (PCP); A=Adenylierungsdomäne

Zusätzliche katalytische Domänen, die in NRPS-Module inkorporiert sein können, sind Epimerase- (E), Zyklisierungs- (Cy)- und Methyltransferase (MT)-Domänen. Epimerase- und Zyklisierungsdomänen sind phylogenetisch¹²¹ und strukturell¹¹⁴ mit den Kondensationsdomänen verwandt. Epimerasedomänen katalysieren die Epimerisierung von Aminosäureresten von der L- zur D-Konfiguration, wahrscheinlich über eine Keto-Enol-Tautomerie (vgl. Abb. 3-10 a).¹²² Marahiel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Epimerasen eine breite Substratspezifität besitzen, und für biokombinatorische Experimente eingesetzt werden können.¹²³ Allerdings sind Epimerasedomänen aus Initiationsmodulen, also den ersten Modulen der NRPS, weit schlechter für die kombinatorische Biosynthese geeignet.¹²⁴ Zyklisierungsdomänen kondensieren den intramolekularen nukleophilen Angriff eines Heteroatoms (O oder N) aus Cystein, Serin oder Threonin auf den benachbarten Ketokohlenstoff. Durch Dehydratisierung bildet sich ein Thiazolin- oder Oxazolin-Heterozyklus. Abbildung 3-10 b) zeigt diesen Mechanismus am Beispiel der Thiazolinbildung. Dieser kann durch eine Oxidationsdomäne (Ox) noch weiter zum Oxazol oder Thiazol oxidiert werden, wie z.B. im Bleomycin (Abb. 3-5).¹²⁵ Durch Mutationen von konservierten Aminosäuren in der Bacitracin-Zyklisierungsdomäne und dem anschließenden Verlust der Zyklisierung konnten essentielle Aminosäurereste im aktiven Zentrum dieses Enzyms bestimmt werden. Außerdem konnten mit

kombinatorischer Biosynthese durch Austausch von NRPS-Modulen neue Heterozyklen erzeugt werden.¹²⁶

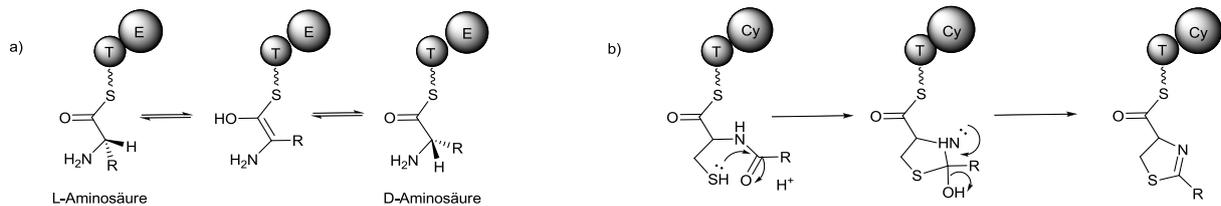


Abb. 3-10: a): Epimerisierung durch die Epimerasedomäne (E), b): Zyklisierung zweier Aminosäuren durch die Zyklisierungsdomäne (Cy) am Beispiel der Thiazolinbildung aus Cystein. T=Thiolierungsdomänen (PCP).

Methyltransferasedomänen (MT) katalysieren die Übertragung eines Methylrestes aus S-Adenosylmethionin (SAM) (**87**), (siehe Abb. 5-21) meist auf den Peptidstickstoff. Die Thioesterasedomäne (TE) ist normalerweise die letzte Domäne in der NRPS. Sie katalysiert die Ablösung des assemblierten Peptides von der letzten PCP-Domäne. Dabei kann das Produkt durch Hydrolyse in linearer Form einfach abgelöst werden oder intramolekular cyclisiert werden (vgl. Abb. 3-11).¹²⁷ So können neben linearen Peptiden auch zyklische Peptide, Makrolactone, Makrolactame oder Makrothiolactone mit oder ohne Seitenkette entstehen.¹²⁸ 2002 wurde die erste Kristallstruktur einer NRPS-Thioesterasedomäne, SrfTE aus der Surfactinsynthetase, aufgeklärt.¹²⁹ Sie zeigte, dass Thioesterasen zu Familie der α/β -Hydrolasen gehören. Sie besitzen eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat, die die Spaltung der Thioesterbindung zwischen dem 4'-Ppant des letzten PCP und dem Peptid und die darauf folgende Bildung eines Peptidyl-TE-Intermediates katalysieren. Dieses Intermediat kann entweder durch den Angriff von H₂O hydrolytisch als lineares Peptid freigesetzt werden, oder durch den Angriff eines intramolekularen Nucleophils cyclisieren und als zyklisches Peptid freigesetzt werden.

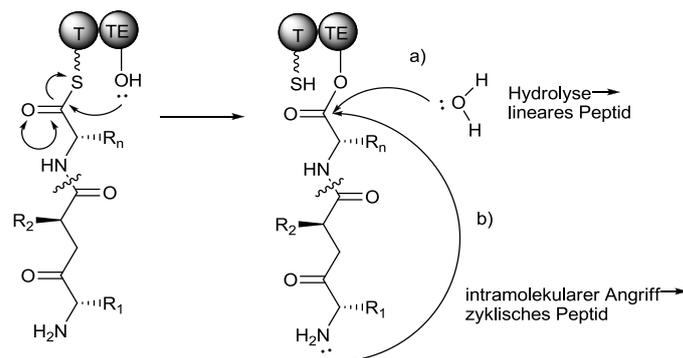


Abb. 3-11: Die Übertragung des Peptids auf die Thioesterasedomäne (TE) und Ablösung durch a) Hydrolyse oder b) intramolekularen Angriff. T=Thiolierungsdomäne (PCP).

Experimente zur Substratspezifität der TE-Domänen haben gezeigt, dass das Enzym besonders selektiv ist für die Seitenketten der Aminosäuren, die das Peptidyl-O-TE-Intermediat formen.¹³⁰ Auch benötigt das Substrat eine bestimmte strukturelle Organisation, um erkannt zu werden.¹³¹

Thioesterasen scheinen eine unterschiedlich breite Substratspezifität zu besitzen. Während die Surfactin-TE relativ spezifisch für ihr natürliches Substrat ist,¹³¹ hat die Tyrocidin-TE eine sehr breite Substratspezifität, die es in Kombination mit Festphasenpeptidsynthese erlaubte, chemoenzymatisch eine ganze Bibliothek von zyklischen Peptiden zu erstellen.¹³²

3.2.3 Strukturelle Einsichten in NRPS

In den letzten Jahren wurden zunehmend Erkenntnisse über die Struktur und den Mechanismus der NRPS-Enzyme gewonnen.¹³³⁻¹³⁵ Lange standen nur die einzelnen Domänen der NRPS im Fokus, doch durch Kristallisation von Didomänen^{136,137} oder ganzen Modulen¹³⁸ konnten weitreichende neue Einsichten sowohl in strukturelle Modi von NRPS-Domänen als auch in Lokalisationen und Interaktionen von Domänen gewonnen werden. NMR-Strukturanalysen der TyrocidinC3-PCP-Domäne haben gezeigt, dass PCPs in drei verschiedenen Konformationen vorliegen können, in der A-, H- und der A/H-Konformation.¹³⁹ *Apo*-PCPs können in der A oder A/H-Konformation, *holo*-PCPs dagegen in der A/H oder H-Konformation vorliegen. Die Phosphopanthetheinyltransferase Sfp interagiert während der Phosphopanthetheinylierung nur mit der A-Konformation des PCP. Da Coenzym A (**19**) zu einem großen Teil innerhalb der Zelle acetyliert als Acetyl-CoA vorliegt, kommt es oft zu Fehlbeladungen (mispriming) des PCP, und somit zum Abbruch der Kettenverlängerung des Peptids. Diese Fehlbeladungen können durch ein Reparatorenzym, die sogenannte Thioesterase Typ II (TEII) korrigiert werden, indem die TEII mit dem fehlbeladenen PCP in der H-Konformation interagiert und kleine Moleküle, wie z.B. die Acetylgruppe wieder abspaltet.¹⁴⁰ In der H-Konformation kann das *holo*-PCP dann mit der A-Domäne interagieren.

Auch für die A-Domänen wurden durch die Kristallstruktur und ausführliche Modellierungsstudien von DltA, einem D-Alanin aktivierenden Enzym, verschiedene Konformationen nachgewiesen.¹⁴¹ Diese Konformationen können ebenfalls in einem Zyklus dargestellt werden. In der offenen Konformation weist die C-terminale Subdomäne von der A-Domäne weg. In dieser Konformation können die Aminosäure und ATP gebunden werden. Das Aminoacyl-AMP-Intermediat wird gebildet, und die Abspaltung von Pyrophosphat führt zu einer geschlossenen Konformation, in der das Aminoacyl-AMP vor der Umgebung geschützt ist. Der anschließende Schritt ist die Übertragung der Aminosäure und Generierung einer Thioesterbindung am *holo*-PCP. Die A-Domäne kehrt wieder in die offene Konformation zurück. Die beschriebenen Zyklen für PCP- und A-Domäne sind in Abb.3-12 bildlich dargestellt. Die Röntgenkristallstruktur einer PCP-C-Didomäne aus der Tyrocidin-Synthetase hat weitere Einblicke in die Umgebung der PCP gegeben.¹³⁷

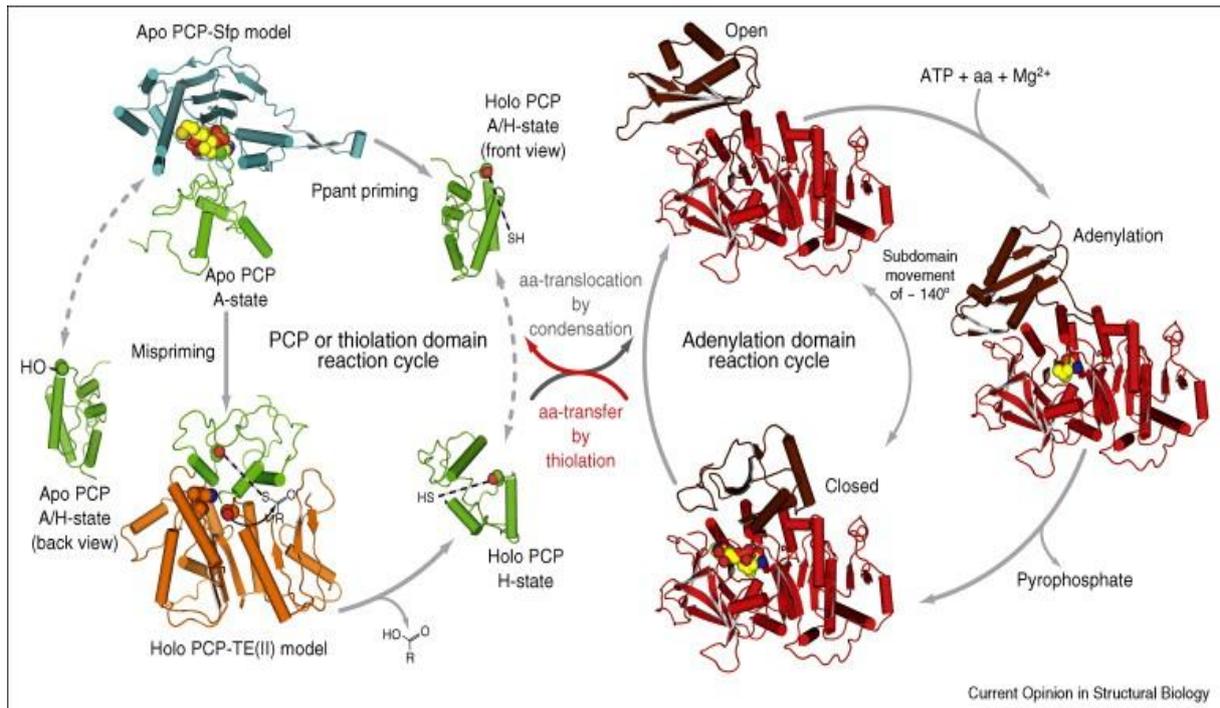


Abb. 3-12: Reaktionszyklus der PCP- und A-Domänen (aus ¹³⁵). Die *apo*-PCP-Domäne (links, grün) wird in die *holo*-Form von einer PPTase (blau) konvertiert. Falsche Beladungen werden von einer TE, Typ II repariert (orange). Die korrekt beladene *holo*-PCP-Domäne interagiert mit dem A-Domänen-Zyklus, und wird mit einer Aminosäure (AS) beladen. Nach Translokation der AS durch Kondensation kann die *holo*-PCP-Domäne neu beladen werden. Im A-Domänenzyklus (rechts) durchläuft die kleine C-terminale Subdomäne (braun) der A-Domäne (rot) mehrere Konformationen. In der offenen Konformation kann die A-Domäne die Aminosäure und ATP binden. Während der Adenylierung wird Aminoacyl-AMP generiert und Pyrophosphat abgespalten. Das Aminoacyl-AMP ist von der Umgebung durch eine geschlossene Konformation geschützt, was den Transfer auf die PCP-Domäne (Thiolierung) erleichtert.

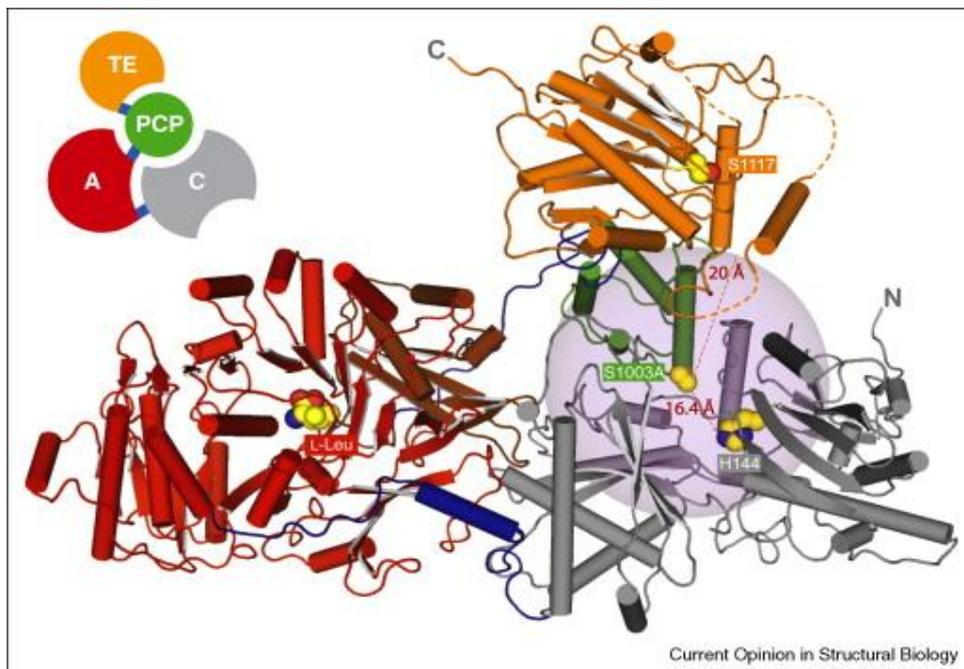


Abb. 3-13: Das Terminationsmodul der Surfactin-NRPS (aus ¹³⁵). Der 20 Å -Radius, der vom 4'-Ppant-Arm des PCP erreichbar ist (S1003A), ist grau markiert. Linkerregionen sind blau markiert; die Domänen sind korrespondierend zu der schematischen Übersicht in der oberen linken Ecke angeordnet und gefärbt.

Es ist für die korrekte Assemblierung notwendig, dass die PCP-Domäne mit ihrem 4'-Ppant-Arm alle umliegenden Domänen, wie die stromaufwärts liegende A-Domäne, aber auch die aufwärts und die abwärts liegende C-Domäne erreichen kann. Die C-Domänen besitzen eine V-artige Struktur aus 2 gleich großen Subdomänen, die durch eine kurze Verbindungs-(hinge)-Region und durch eine Schlaufe in der Mitte des Proteins verbunden sind. Die Form des Enzyms erlaubt den PCP-Domänen stromaufwärts und -abwärts, von beiden Seiten des Enzyms die Substrate für die Kondensation zu positionieren. Die Länge des 4'-Ppant-Arms beträgt in etwa 20 Å. Eine NMR-Struktur einer apo-PCP-TE-Didomäne aus der Enterobactin-Synthetase zeigt, dass das aktive Zentrum der TE 18 Å, also in Reichweite des 4'-Ppant-Arms, vom aktiven Zentrum der PCP entfernt ist.¹³⁶ Beide Domänen haben eine recht große hydrophobe Kontaktfläche (etwa 1300 Å²). Das könnte die Notwendigkeit erklären, in kombinatorischen Biosyntheseansätzen PCP und TE zusammen zu rekombinieren.¹⁴² Im Jahr 2008 wurde die Kristallstruktur eines vollständigen NRPS-Terminationsmoduls aus der Surfactinsynthetase erhalten und analysiert (siehe Abb. 3-13).¹³⁸ Es wurde ersichtlich, dass A- und C-Domäne sehr stark miteinander interagieren und eine gemeinsame Oberfläche von mehr als 1600 Å² bilden. Diese starke Interaktion scheint auch hier der Grund zu sein, warum in kombinatorischen Biosynthesen von NRPS-Enzymen C- und A-Domäne miteinander kombiniert werden mussten, um eine funktionierende neue NRPS zu erhalten.¹⁴² Interessanterweise ist zwar das aktive Zentrum der Thioesterase in Reichweite des aktiven Zentrums des PCP (16 Å), aber das aktive Zentrum der A-Domäne ist ungefähr 60 Å entfernt. Es scheinen also größere strukturelle Änderungen im Bereich der NRPS-Enzyme während der Peptidsynthese stattzufinden.

3.2.4 MbtH-artige Proteine

Im Gencluster für die Biosynthese des Siderophors Mycobactin in *Mycobacterium tuberculosis* befindet sich ein Gen, *mbtH*, das für ein kleines, etwa 80 Aminosäuren großes Protein kodiert.¹⁴³ Nach diesem Protein wurde eine neue Superfamilie, die MbtH-artigen Proteine (MbtH-like Proteins) benannt. Es stellte sich heraus, dass *mbtH*-Homologe in vielen NRPS-Genclustern auftreten. Richard Baltz stellte eine systematische Analyse der bisher sequenzierten *mbtH*-Homologe auf, und notierte, dass diese Proteine am häufigsten in Actinobakterien auftreten (1,1 Homologe/Genom).¹⁴⁴ Besonders hoch ist die Prävalenz in Streptomyceten und Mycobakterien (2,6 bzw. 2,1 Homologe/Genom). Aber auch in den Bacillales und in den Proteobakterien (0,4 bzw. 0,3 Homologe/Genom) sind diese Proteine durchaus anzutreffen. In Eukaryoten gibt es bisher keine Evidenz von *mbtH*-ähnlichen Genen. Die MbtH-artigen Proteine in Actinomyceten sind 62 bis 80 Aminosäuren groß und normalerweise einzeln in NRPS-Genclustern kodiert. Eine Ausnahme bildet das Gencluster des Antibiotikums Teicoplanin, in dem zwei *mbtH*-artige Gene lokalisiert sind.¹⁴⁵ In Streptomyceten zeigen MbtH-artige Proteine eine hohe Sequenzidentität (durchschnittlich 64,3% zu DptG).¹⁴⁴ MbtH-artige Proteine sind also mit NRPS assoziiert, in *Streptomyces roseosporus* ist am N-Terminus einer NRPS sogar eine MbtH-artige Domäne mit der NRPS fusioniert.¹⁴⁴ Eine interessante Ausnahme befindet sich im

Lyngbyatoxingencluster, wo ein MbtH-Protein mit einer P450-Monooxygenase fusioniert ist.¹⁴⁶ Transkriptionsanalysen an NRPS zeigten, dass in Überproduktionsstämmen nicht nur die NRPS-Transkription, sondern auch die Transkription der *mbtH*-Homologe hochreguliert ist.¹⁴⁷ Die Inaktivierung von *cchK*, dem *mbtH*-Homolog aus dem Coelichelin-Gencluster verringerte die Coelichelin-Produktion, die Inaktivierung von *cdaX*, dem *mbtH*-Homolog aus dem CDA-Gencluster stoppte die Produktion von CDA (**20**) sogar vollständig.¹⁴⁸ Auch die Deletion von *cloY* aus dem Clorobiocingencluster verminderte die Clorobiocinproduktion dramatisch.¹⁴⁹ In beiden Studien konnte aber die Metabolitenproduktion durch Kreuzkomplementierung mit nicht-nativen MbtH-Proteinen *in vivo* wieder hergestellt werden. Eine Expression von *cdaX* unter einem konstitutiven statt dem nativen Promotor führte sogar zu einer erhöhten Coelichelinproduktion. Die Ergebnisse dieser *in vivo*-Studien zeigen, dass MbtH-artige Proteine in vielen Biosynthesewegen wichtig, in einigen Fällen essentiell für die NRP-Produktion sind. Das Expressionslevel der MbtH-artigen Proteine korreliert mit der Metabolitenproduktion. MbtH-artige Proteine scheinen aber oft recht unspezifisch zu wirken, auch heterologe MbtH-Proteine können die NRPS aktivieren.

Die MbtH-artigen Proteine haben, wie schon erwähnt, eine hohe Konservierung ihrer Sequenzen, ein Sequenzvergleich zeigt zum Beispiel drei über alle Proteine konservierte Tryptophane (W 25, 35 und 55 in DptG). Die Kristallstruktur eines MbtH-Proteins aus dem Pyoverdincluster aus *Pseudomonas aeruginosa* zeigt, dass diese Tryptophane auf der hydrophoben Außenfläche des Proteins, das eine Pfeilspitzenstruktur besitzt (Abb. 3-14), lokalisiert sind.¹⁵⁰ Auch andere invariante Aminosäuren, wie Asparagin (N) 17, Serin (S) 23 und die Proline (P) 26 und 32 sind zur Außenseite exponiert.

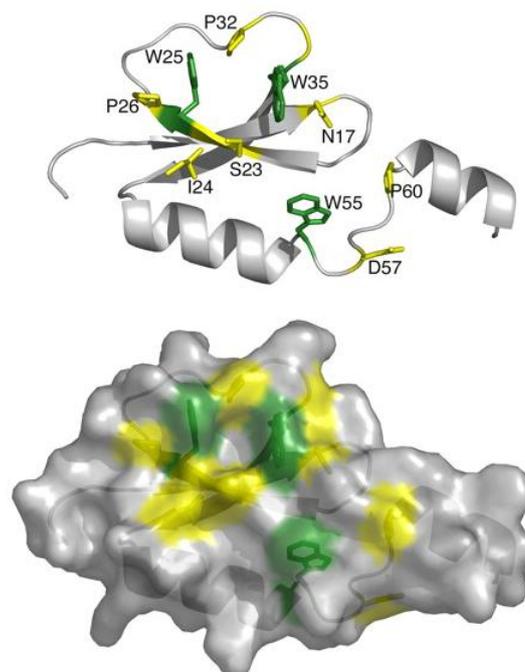


Abb. 3-14.: Tertiärstruktur des MbtH-artigen Proteins aus *Pseudomonas aeruginosa* (oben) (aus ¹⁴⁴). Die invarianten Tryptophane (grün) und andere Aminosäuren (gelb) sind zu einer hydrophoben Außenfläche (unten) exponiert.

Mit NMR-Spektroskopie und Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie wurde 2010 die Struktur eines MbtH-artigen Proteins in Lösung aufgeklärt.¹⁵¹ Die β -Faltblattstrukturen im Zentrum des Proteins zeigen dynamische Bewegungen, die mit Interaktionen mit anderen Proteinen in Verbindung gebracht werden können. Die Aminosäurereste dieser Strukturen sind unter anderem die oben erwähnten W25 und 35 und P26 und 32. Der C-Terminus, der auch hoch konserviert ist (W55, P60) zeigt dagegen ungeordnete Bewegungen. Die Autoren vermuten, dass dieser Teil mit verschiedenen Bindungspartnern interagieren kann. Die andere Außenseite der „Pfeilspitze“ ist sequenziell variabel. Auch diese könnte mit verschiedenen Bindungspartnern interagieren.

Wichtige neue Einblicke in die Funktion von MbtH-Proteinen lieferten Felnagle et al. 2010.¹⁵² Sie zeigten, dass die heterolog exprimierte AT-Didomäne CmnO und VioO aus der Capreomycin- bzw. Viomycinbiosynthese *in vitro* nur aktiv waren, wenn das zugehörige MbtH-Protein CmnN bzw. VioN coexprimiert wurde. MbtH-Protein und AT-Didomäne koelutierten während der Nickel-NTA-Aufreinigung und Konzentrationsmessungen in einem 1:1-Verhältnis aus AT-Didomäne und MbtH-Protein. Auch separat exprimiertes und für den Assay hinzugegebenes MbtH-Protein aktivierte die A-Domäne, allerdings nicht so stark wie das coexprimierte. Ein Austausch von W55 gegen Alanin verhinderte die Coelution von CmnO und CmnN. Dieser ausgetauschte Aminosäurerest scheint also essentiell für die Interaktion zu sein. Felnagle et al. zeigten auch, dass nicht alle AT-Didomänen MbtH-Proteine benötigen: CmnF und CmnG waren auch ohne CmnN aktiv.

Eine ähnliche Studie von Zhang et al zeigte analoge Ergebnisse.¹⁵³ Drei heterolog exprimierte CAT-Tridomänen aus der Pacidamycinbiosynthese waren ohne MbtH-Protein PacJ aktiv, während das Protein PacL nur mit gereinigtem PacJ Aktivität zeigte. Auch hier wurden Mutagenesestudien durchgeführt. Eine W25A-Mutante zeigte etwa nur 50% *in vitro*-Aktivität, während eine W25A/W35A-Mutante die Aktivität komplett verloren hatte. Die drei konservierten Tryptophane in den MbtH-Proteinen scheinen also Schlüsselrollen in der Interaktion mit anderen NRPS-Domänen zu spielen. Auch in dieser Studie konnten heterologe MbtH-Proteine die NRPS-Proteine aktivieren. KtzJ und GlbE aus der Kutznerid- bzw. Glidobactinbiosynthese konnten PacJ gleichwertig ersetzen. Imker et al. beobachteten, dass eine monomodulare (C-A-T) NRPS, GlbF aus der Glidobactinbiosynthese, sich erst durch die Coexpression mit GlbE, dem im Gencluster angrenzenden MbtH-Protein, exprimieren ließ.¹⁵⁴ Hier wurde also eine stabilisierende oder Chaperon-artige Funktion des MbtH-artigen Proteins deutlich.

Boll et al. konnten in ihrer kürzlich erschienenen Studie weitere Erkenntnisse über die Interaktionen von MbtH-artigem Protein und NRPS gewinnen.¹⁵⁵ Erstmals wurde eine freistehende A-Domäne (CloH) mit MbtH-Protein (CloY) inkubiert, und aktivierte diese. Es konnte gezeigt werden, dass auch das MbtH-Protein aus *E. coli*, YbdZ, mit heterolog exprimierten A-Domänen interagiert. Ein *ybdZ*-defizienter Stamm verringerte die Rate an löslicher A-Domäne signifikant. Auch hier lagen A-Domäne und MbtH in einem molaren 1:1-Verhältnis vor. Interessanterweise wurde nach

Größenausschlußchromatographie ein 2:2-Komplex aus der Didomäne SimH und dem MbtH-artigen Protein SimY isoliert. Ein Sequenzvergleich der adenylierenden Enzyme CloH und NovH zeigt eine Übereinstimmung von 83%. Im Gegensatz zu CloH ist NovH aber auch ohne MbtH-Protein aktiv.¹⁵⁶ Modellierungsstudien nach der Kristallstruktur von PheA⁹⁴ zeigten im Vergleich von CloH und NovH bei nur einer Aminosäure nahe des aktiven Zentrums einen Austausch: Leu396Met (Position relativ zu PheA). Dieses Leucin wurde in CloH nun durch Mutagenese gegen Methionin ausgetauscht. Diese Mutante benötigte *in vitro* kein MbtH-Protein mehr für Aktivität, hatte aber nur noch etwa 1/3 der Aktivität der nativen A-Domäne. A-Domänen sind also ein wichtiger Bindungspartner von MbtH-Proteinen, obwohl es noch andere Interaktionspartner zu geben scheint. Es ist immer noch nicht vollständig geklärt, warum manche A-Domänen MbtH-Proteine benötigen, und andere nicht, aber die Natur des Aminosäurerestes 396 (in PheA Lysin) scheint einen Einfluß auf die Interaktion zu haben.¹⁵⁵ Es wird postuliert, dass die Interaktion zwischen einer A-Domäne und einem MbtH-artigen Protein Konformationsänderungen hervorruft, die zu einer Erhöhung der Aktivität führen. Eine dreidimensionale Struktur eines Komplexes aus A-Domäne und MbtH-artigem Protein würde entscheidende neue Einsichten in die Interaktions- und Aktivierungsmechanismen durch MbtH-artige Proteine geben.

3.3 Prinzipien zur Erzeugung neuer Naturstoffe

Die Suche nach neuen Arzneistoffen ist für den Menschen aufgrund von ständig neu auftretenden Resistenzen, neuen Krankheiten oder wegen unzureichender Therapie fortwährend nötig. Klassische Methoden sind Synthese neuer Kandidaten, oder semisynthetische Veränderungen zur Optimierung bereits bekannter Therapeutika. Im Bereich der Naturstoffe, die oft synthetisch schwer zugänglich sind, wurde Methoden entwickelt, in die Biosynthese einzugreifen, und die Produzenten sogenannte „unnatürliche Naturstoffe“ synthetisieren zu lassen.¹⁵⁷ Einige klassische und aktuelle Beispiele im Bereich der NRPS sollen hier kurz vorgestellt werden.

3.3.1 Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Mutasyntese an NRPS

Eine Methode, um Analoga von Naturstoffen zu erhalten, ist die Vorläufer-dirigierte Biosynthese.¹⁵⁸ Durch Zufütterung von Analoga der Vorstufen werden diese statt der „Originale“ in das Produkt eingebaut, und neue Stoffe mit den gewünschten Modifikationen entstehen. Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese beruht auf der losen Substratspezifität einiger biosynthetischer Enzyme, die zu einem nicht unerheblichen Teil chemisch unterschiedliche Substrate erkennen und prozessieren können. Die Ausbeute des neuen Naturstoffs kann gesteigert werden, wenn der Stoffwechselweg, der zum zu ersetzenden Baustein führt, durch gezielte Mutation blockiert wird. Dieses Verfahren wird als Mutasyntese bezeichnet.¹⁵⁹ Schematisch ist die Mutasyntese am Beispiel eines nichtribosomalen Peptides (NRP) in Abbildung 3-15 dargestellt.

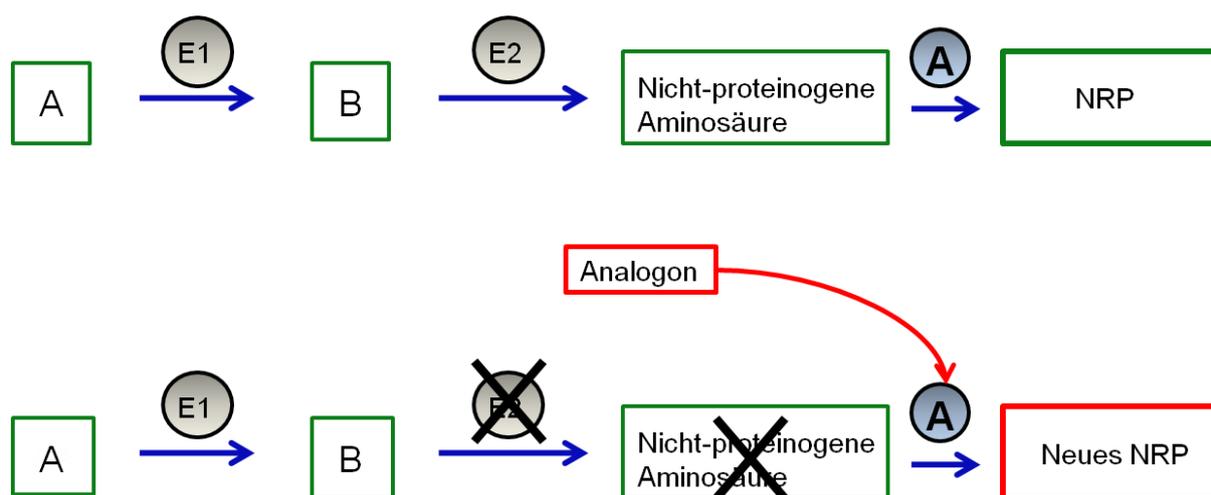


Abb. 3-15: Schematische Darstellung der Mutasythese. Die Enzyme E1 und E2 katalysieren die Synthese einer nicht-proteinogenen Aminosäure, die dann von der A-Domäne (A) erkannt und in das nichtribosomale Peptid (NRP) eingebaut wird.

Allerdings führt die Mutasythese nicht in allen Fällen zum Erfolg. Die gesamte Biosynthesemaschinerie muss, wie oben erwähnt, ab dem zugeführten Produkt eine relaxierte Substratspezifität besitzen, um das neue Stoffwechselprodukt weiter zu prozessieren und freizulassen. Außerdem sollte das natürliche Produkt in hohen Ausbeuten isoliert werden können, da die mutasythetischen Analoga oft in weit geringerem Maße als das Original produziert werden.

Ein sehr erfolgreiches Beispiel ist die Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Mutasythese der „Calcium-dependent antibiotics“ (20) (CDAs), Lipopeptide aus *Streptomyces coelicolor*, in der Gruppe von Jason Micklefield. Hier wurde in mehreren Studien die Fähigkeit, Analoga der Vorstufen einzubauen, ausgenutzt und verschiedenste Varianten generiert. Die Fütterung von Phenylglycinen (Phenylglycin, 4-F-Phenylglycin) zu einem Stamm, in dem die Hydroxyphenylglycin-(Hpg)-Biosynthese [Aminosäure(AS) 6, vergleiche Abb. 3-16] unterbrochen ist, resultierte in der Biosynthese von neuen CDAs.¹⁰² Zu einem Stamm, der durch gerichtete Mutation die Fähigkeit zur Biosynthese von 3-Methylglutaminsäure (AS 10) verloren hatte, wurden 3-Fluoromethyl- und 3-Ethylglutaminsäure gefüttert. Auch hier wurden diese Analoga eingebaut und resultierten in der Produktion neuer CDAs.¹⁶⁰ Eine Mutation des aktiven Zentrums des ersten PCP in der CDA-Synthase verhinderte die 4'-Phosphopanthetheinylierung dieser Domäne und somit die Aufnahme der Epoxyhexanoyleitenkette. Fütterung mit N-Acetylcysteaminthioestern (SNAC) mit verschiedenen Fettsäureresten führte zu CDAs mit Pentanoyl- und Hexanoylseitenketten.¹⁶¹ Zu einem Tryptophan-auxotrophen Stamm von *Streptomyces coelicolor* wurden 5-Hydroxy- und 5-Fluorotryptophan gefüttert. In diesem Fall konnten mehrere neue CDAs mit unterschiedlichen Tryptophanresten (AS 3,11) isoliert werden.¹⁶²

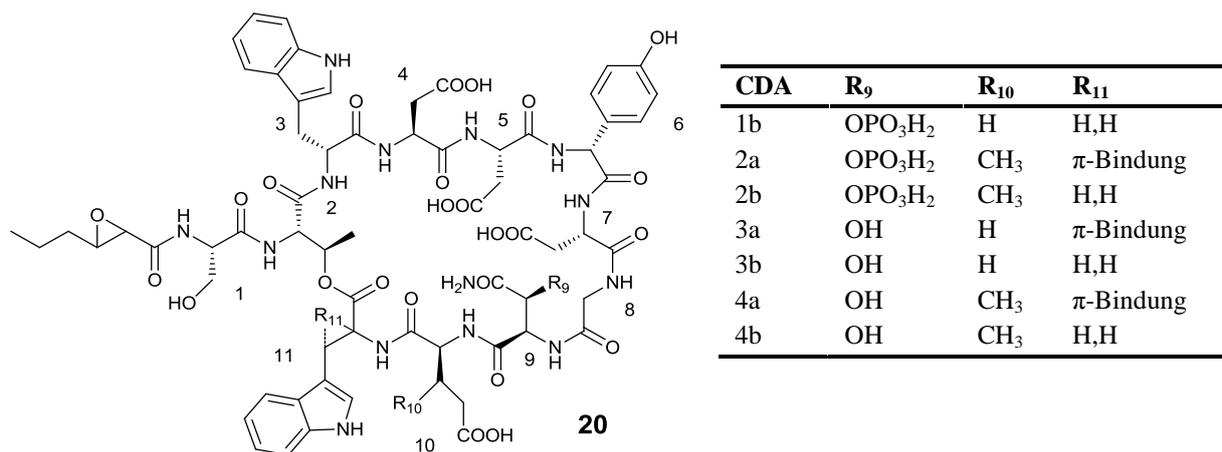


Abb. 3-16: Die Familie der „Calcium-dependent antibiotics“ (CDAs) (**20**). Die Zahlen neben den Aminosäureresten geben die Abfolge der NRPS-Module wieder. Die nebenstehende Tabelle zeigt die Unterschiede der einzelnen CDAs in den entsprechenden Aminosäureresten.

3.3.2 Kombinatorische Biosynthese

Die kombinatorische Biosynthese zielt darauf, durch Austausch von ORFs, Modulen, Domänen oder Aminosäuren die Substratspezifität der biosynthetischen Enzyme zu verändern und neue Produkte produzieren zu lassen.^{142,163} Prinzipiell sind der kombinatorischen Biosynthese kaum Grenzen gesetzt, allerdings haben die meisten Studien gezeigt, dass mit einer Rekombination der Biosynthesemaschinerie sehr oft ein dramatischer Verlust der Produktausbeute einhergeht. Gründe dafür sind, wie in der Mutasynthese, in der Substratspezifität der stromabwärts liegenden Enzyme, aber auch in der veränderten Enzymarchitektur und möglichen Problemen in der Protein-Protein-Interaktion zu suchen. In diesem Abschnitt sollen einige Beispiele aus dem Bereich der NRPS vorgestellt werden.

Eppelmann et al. konnten in Erweiterung der Studie von Stachelhaus⁷⁹ nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* die Substratspezifität der A-Domäne AspA aus der Surfactinsynthetase ändern.⁹⁹ Durch Austausch einer einzigen Aminosäure (His322Glu) änderte sich die Spezifität von Asparaginsäure zu Asparagin, und der resultierende Stamm produzierte ein bis dahin nicht isoliertes Asparaginsulfactin. Mootz et al. konnten durch Deletion eines Leucin integrierenden Moduls in der Surfactinsynthetase ein Surfactin mit verminderter Ringgröße isolieren.¹⁶⁴ Butz et al. konnten dagegen durch Erweiterung der Balhimycin-NRPS durch ein künstlich erzeugtes Modul eine verlängertes Peptid mit einem zusätzlichen Hydroxyphenylglycin isolieren.¹⁶⁵ Allerdings wurde das neue Produkt nicht von den hochspezifischen Oxygenasen, die die Quervernetzungen in der Seitenkette herstellen (vgl. Vancomycin (**15**); Abb. 3-5), erkannt. Auch fanden keine Glycosylierungen statt. In einer mutagenetischen Studie wurde versucht, durch zwei Punktmutationen (Ala322Glu, Asn331Gly) in der A-Domäne des Moduls 7 der CDA-NRPS (vgl. Abb. 3-16) die Spezifität von Asparaginsäure zu Asparagin zu ändern.¹⁶⁶ Das entsprechende Produkt konnte auch isoliert werden, allerdings in weitaus

geringeren Mengen als das natürliche Produkt. Stattdessen wurde in großen Mengen ein Hexapeptidintermediat detektiert, das offensichtlich während der Biosynthese von der NRPS freigesetzt wurde. Das Asparagin-Thioesterintermediat scheint also von der stromaufwärts liegenden C-Domäne nur in geringen Maße erkannt und prozessiert worden zu sein. Für höhere Effizienz in der kombinatorischen Biosynthese ist also auch das aktive Zentrum der zugehörigen C-Domänen von großer Bedeutung. Hahn und Stachelhaus konnten die Existenz von sogenannten Kommunikationsdomänen (COM-Domains), kurzen Strukturmotiven am Ende und Anfang von einigen NRPS, nachweisen.¹⁶⁷ Diese Domänen sind notwendig für die Interaktion und Organisation von mehreren NRPS und die korrekte Abfolge der Biosynthese eines NRP, wenn es von mehreren NRPS-Enzymen synthetisiert wird. Die meisten NRPS-Systeme sind, wie oben erwähnt, auf mehreren ORFs codiert. Es konnte anschließend durch Manipulation der aktiven Zentren dieser COM-Domains *in vitro* ein Tripeptid von drei verschiedenen NRPS-Modulen aus der Tyrocidin- Surfactin- und Bacitracin-synthetase, die nun miteinander interagierten, synthetisiert werden.¹⁶⁸ Dieser vielversprechende Ansatz konnte dann in einer *in vivo*-Studie erfolgreich angewendet werden. In heterologen Expressionen konnten neue Produkte aus unterschiedlich neu programmierten Teilen der Surfactin- und Tyrocidinsynthetase isoliert werden.¹⁶⁹

Am medizinisch relevanten Lipopeptid Daptomycin (**14**) aus *Streptomyces roseosporus* (Abb.3-17) wurden bisher die meisten erfolgreichen kombinatorischen Experimente durchgeführt.¹⁷⁰ Eine Studie von 2006 zeigt das enorme Potential, das die kombinatorische Biosynthese beinhaltet: Es wurden Module innerhalb der Daptomycin-NRPS ausgetauscht (11Ser gegen 8Ala, vergleiche Abb. 3-17), ausserdem wurden Module aus der NRPS der verwandten Lipopeptide A54145 [11Ser und 8Ala gegen 11Asn, 8Ala gegen 8Lys, 13Kynurenin (Kyn) gegen 13Ile] und CDA (13Kyn gegen 13Trp, vgl. Abb. 3-16) in der Daptomycin-NRPS ausgetauscht. Zusammen mit der Deletion einer Methyltransferase (12Glu statt 12MeGlu) konnten so insgesamt 60 neue Peptide massenspektrometrisch detektiert werden, von denen allein in dieser Studie zwölf isoliert und getestet wurden. Einige waren **14** in der Aktivität gegen grampositive Bakterien zumindest gleichwertig, in manchen Tests sogar verbessert.¹⁷¹ Die Produktionsrate der neuen Peptide war allerdings signifikant erniedrigt. Die Bibliothek der kombinatorisch erzeugten Daptomycine konnte 2010 noch erweitert werden. Durch zusätzlichen Austausch des Moduls 2 (2Asn gegen 2Glu) und Variationen in der Lipidseitenkette standen nun insgesamt 25 Daptomycine dem antibakteriellen Testsystem zur Verfügung.^{172,173}

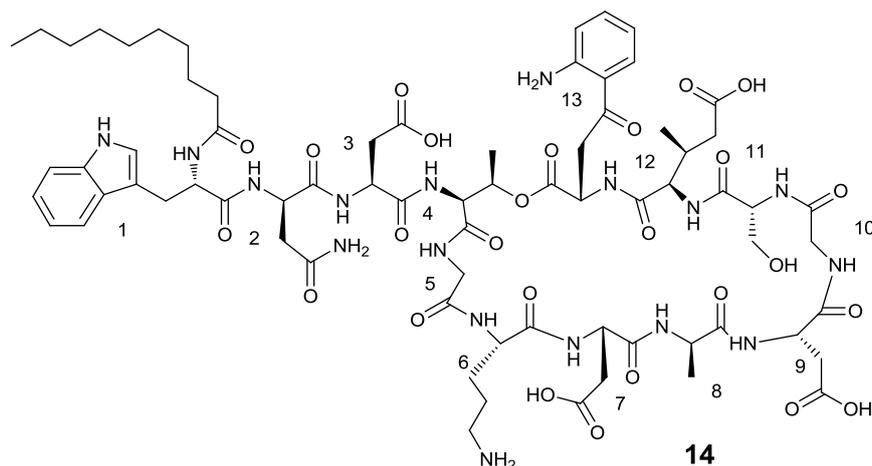


Abb. 3-17: Daptomycin (**14**). Die Zahlen neben den Aminosäureresten geben die Abfolge der NRPS-Module wieder.

In der Evolution ist es wiederholt zu Rekombination von DNA-Abschnitten gekommen. Viele neue Gencluster sind durch den Austausch von Aminosäuren, Domänen Modulen und ganzen Genen entstanden.²¹ Ein Beispiel sind die drei Lipopeptide Bacillomycin D, Iturin A und Mycosubtilin, die alle eine identische „nördliche“ Molekülhälfte besitzen. Ein Vergleich der Gencluster der drei Metaboliten zeigt, dass es in der zweiten Hälfte der NRPS durch Rekombination zu einer Umordnung der Module und damit zu drei verschiedenen Naturstoffclustern gekommen sein muss. Ausserdem sind die A-Domänen-Paare Glu/Gln und Ser/Thr strukturell sehr eng miteinander verwandt und könnten aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Mutationen entstanden sein.¹⁷⁴ Ein ähnliches Phänomen wurde in der Gruppe von Müller bei den Myxochromiden ebenso erkannt: Punktmutationen und der Austausch bzw. das Überspringen von Modulen sind bei zwei Genclustern direkt für strukturelle Unterschiede in den resultierenden Verbindungen verantwortlich. Diese Hypothese wurde durch kombinatorische Experimente bewiesen.¹⁷⁵ Gerichtete Evolution im Labor wurde in einer anderen Studie von Fischbach et al. dafür ausgenutzt, die Aktivität einer kombinatorisch erzeugten, chimären NPRS zu steigern.¹⁷⁶ Der Austausch der EntF-A-Domäne (spezifisch für Serin) gegen SyrE-A1, die die gleiche Spezifität besitzt, resultierte in einer 30-fach verschlechterten Aktivität der Enterobactinsynthetase. Es wurden durch mutagene PCR zufällige Mutationen eingebracht. Durch Selektion der am schnellsten wachsenden Klone, neue Mutationen dieser Klone und erneute Selektion wurde evolutiv auf die Wiederherstellung der Aktivität selektioniert. Nach zwei Selektionsrunden war ein Viertel der ursprünglichen Aktivität wieder hergestellt. Dieses Konzept wurde durch den Austausch einer Valin-aktivierenden Domäne aus der Andrimid-Biosynthese gegen eine 2-Aminobutyrat-aktivierende Domäne aus der Cytotrienin-PKS/NRPS angewendet. Hier konnte nach drei Selektionsrunden immerhin ein Drittel der Aktivität, die nach dem Austausch der Domänen auf 3% gesunken war, wiederhergestellt werden. Villiers und Hollfelder wendeten ebenfalls das Prinzip der gerichteten Evolution an: Sie führten zufallsgerichtete Mutationen in die erste A-Domäne der Tyrocidinsynthetase (Spezifität: Phe) ein und testeten zunächst alle Klone in einem A-Domänen-Hochdurchsatzscreening¹⁰⁸ auf Aktivität für kleinere Aminosäuren. Erfolgversprechende Mutationen

wurden kombiniert und neuen Mutationen ausgesetzt. Durch insgesamt vier Mutationen konnte die Substratspezifität hin zu kleineren Aminosäuren wie Alanin geändert werden. Interessanterweise betraf nur eine dieser vier Mutationen eine Aminosäure des nichtribosomalen Codes.¹⁷⁷ Für die A-Domäne AdmK in der Andrimidbiosynthese wurden von Evans et al. ebenfalls gerichtete Evolution angewendet: Hier wurden allerdings drei kritische Aminosäurereste im nichtribosomalen Code der Domäne ausgemacht, durch deren Mutationen sich die Substratspezifität der Domäne von Valin zu Alanin, Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin ändern könnte. In einer *in vivo*-Studie wurde eine Bibliothek an mutierten Klonen erstellt und in einem Screeningansatz wurden 14000 Klone mit LC/MS/MS auf neue Andrimide analysiert und im Erfolgsfall anschließend getestet. So konnten vier neue Andrimide isoliert werden.¹⁷⁸

Insgesamt wurden in den letzten 15 Jahren viele Ansätze ausprobiert, durch kombinatorische Biosynthese neue nichtribosomale Peptide zu erzeugen. Dabei wurden Austausche auf Aminosäuren-, Domänen-, Modul- oder NRPS-Ebene vorgenommen. Mit Mutationen in aktiven Zentren von A-Domänen lassen sich zumeist nur konservative Änderungen der Struktur erreichen. Computerbasierte Ansätze können für dramatischere Änderungen der Spezifität eine Lösung sein. Austausch von Domänen oder ganzen Modulen gibt größere Freiheiten in der Kombination, allerdings sind diesem Verfahren durch zumeist deutlich geringere Produktausbeuten Grenzen gesetzt. Rekombination von ganzen NRPS durch Austausch der Kommunikationsdomänen oder Deletion von einzelnen Modulen hat in einigen ersten Ansätzen vielversprechend funktioniert, allerdings wurden diese Ansätze bisher nicht weiter verfolgt. Kritisch bleibt die geringe Ausbeute der kombinatorischen Produkte, da die Substratspezifität vieler NRPS-Enzyme zwar relaxiert ist, aber die nachfolgenden Enzyme nicht alle Substratänderungen tolerieren. Evolutionär basierte Ansätze der Rekombination können diese Probleme wie dargestellt signifikant verringern. Die Substratspezifität hat sich evolutionär entwickelt und die Verständnis und Ausnutzen dieser Entwicklungen kann in zukünftigen rekombinatorischen Experimenten zu neuen Strategien und besseren Ergebnissen bei der kombinatorischen Biosynthese führen.

3.4 Cyclopropyl- und Nitrogruppen in der Natur

Cyclopropane kommen in der Natur selten vor,^{122,179} sie sind aber in verschiedensten Stoffklassen wie z.B. Fettsäuren, Terpenen und Aminosäuren zu finden (siehe Abb. 3-18).^{180,181} Die Aminosäure 2-(1-Methylcyclopropyl)glycin (**21**) zum Beispiel ist Bestandteil der Kutzneride, zyklischer Peptide aus einem Actinomyceten, die ebenso wie Hormaomycin (**13**) nichtribosomal synthetisiert werden.^{182,183} Ptaquilosid (**22**) ist ein Sesquiterpenglykosid aus dem Adlerfarn *Pteridium aquilinum* mit karzinogenen Eigenschaften.¹⁸⁴ Meist ist nur ein Cyclopropanring in ein Molekül integriert, Fettsäuren können aber durchaus mehrere Cyclopropane beinhalten. Den Rekord an Cyclopropanringen hält die Fettsäure U-106305 (**23**) aus *Streptomyces*-Arten.¹⁸⁵ Die Biosynthese von Cyclopropanen geschieht

zumeist SAM-vermittelt über ein kationisches Intermediat oder durch eine interne nucleophile Substitution.^{179,186}

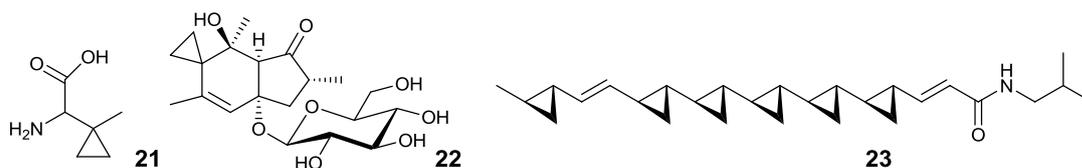


Abb. 3-18: Ausgewählte Naturstoffe mit Cyclopropylgruppen: 2-(1-Methylcyclopropyl)glycine (**21**), Ptaquilosid (**22**), U-106305 (**23**)

Auch Nitrogruppen sind in Naturstoffen selten anzutreffen. Prominente Beispiele sind das bekannte Antibiotikum Chloramphenicol (**24**),¹⁸⁷ das fungizid wirkende Pyrrolnitrin (**25**)¹⁸⁸ und das antiproliferativ wirkende Polyketid Aureothin (**26**) (siehe Abb. 3-19).^{189,190} Die Nitrofunktion ist zumeist an einen Aromaten gebunden.¹⁹¹ In der Biosynthese von Nitrogruppen kann ein Aromat direkt mit einer Nitrosylspezies nitriert werden,¹⁹² meistens aber wird eine Nitrogruppe durch Oxidation einer Aminofunktion gebildet. Im Jahr 2008 konnte die Kristallstruktur von AurF, einer *p*-Aminobenzoat-N-Oxygenase aufgeklärt werden.¹⁹³ Es ist eine Monooxygenase, die kein Häm benötigt, und die Aminofunktion in Schritten über Hydroxylamin- und Nitrosfunktion zur Nitrogruppe oxidiert. Im Hormaomycin (**13**) sind beide genannten Strukturmerkmale in einer einzigen Aminosäure, 3-Nitrocyclopropylalanin (**27**) zweimal enthalten (siehe Abschnitt 3.5).

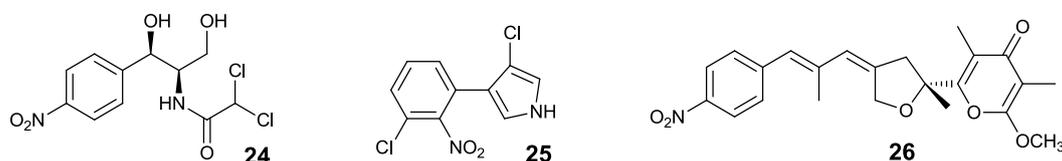


Abb. 3-19: Ausgewählte Naturstoffe mit Nitrogruppen: Chloramphenicol (**24**), Pyrrolnitrin (**25**), Aureothin (**26**)

3.5 Hormaomycin und der *hrm*-Gencluster

Im Jahr 1984 wurde aus einer bei Toyama (Japan) genommenen Bodenprobe ein *Streptomyces* sp. AC-1978 isoliert und kultiviert. Die Fermentation ergab ein neuartiges, antibakteriell aktives Peptid, das Threonin, Isoleucin und drei unbekannte Aminosäuren enthielt und Takaokamycin genannt wurde.¹⁹⁴ Die Strukturaufklärung gelang allerdings nicht vollständig. Fünf Jahre später wurde in der Gruppe von Hans Zähler ein morphogenes Peptid namens Hormaomycin (**13**) aus einer bei Anuradhapura (Sri Lanka) genommenen Bodenprobe isoliert. Dabei handelte es sich um die gleiche Substanz wie Takaokamycin.⁵⁷ Im Jahr 1990 konnte die Struktur von **13** vollständig aufgeklärt werden,⁶¹ wobei die absolute Konfiguration erst im Jahre 2004 bestätigt wurde: Es liegt ein zyklisches Lacton über sechs Aminosäuren vor, wobei die 3-Hydroxyfunktion eines (*R*)-*allo*-Threonins [*α*-Thr] mit der Carboxyfunktion eines (*2S,4R*)-4-(*Z*-Propenyl)prolins verknüpft ist.¹⁹⁵ Weitere Bestandteile

des Ringes sind L-Isoleucin [Ile], zwei Einheiten (2*S*,3*R*)-3-Methylphenylalanin [(β -Me)Phe] und ein (2*S*)-Diastereomer von 3-(trans-2-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala]. Die Seitenkette besteht aus dem (2*R*)-Diastereomer von (3-Ncp)Ala und 5-Chloro-N-hydroxypyrrol-2-carbonsäure [Chpca] (siehe Abb. 3-20). In NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Konformationen des Moleküls in verschiedenen Lösungsmitteln signifikant voneinander unterscheiden, was sich in unterschiedlichen NMR-Spektren widerspiegelt.¹⁹⁶ Im Jahre 2004 wurde die erste Totalsynthese von **13** beschrieben.¹⁹⁷

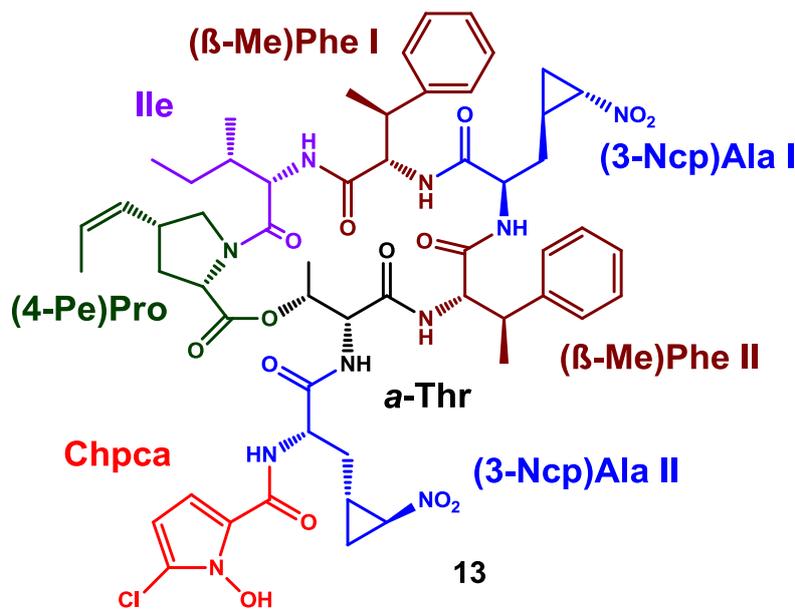


Abb. 3-20: Hormaomycin (**13**) und seine Bausteine

Hormaomycin (**13**) besitzt neben seiner einzigartigen Struktur interessante biologische Eigenschaften: Es regt in nanomolaren Konzentration die Bildung von Luftmycel und die Produktion von sekundären Metaboliten in vielen anderen Streptomyceten an (siehe auch Abschnitt 3.1).⁵⁷ Dieser Eigenschaft verdankt das Hormaomycin (**13**) seinen Namen (Griechisch: hormao = ich rege an). Außerdem besitzt Hormaomycin (**13**) eine starke antibiotische Aktivität gegen einige coryneforme Actinomyceten (MIC *Arthrobacter pascens*: 88 μ M)⁵⁷ und gegen den Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ für den K1-Stamm: 587 nM, für den FCR3-Stamm: 1,207 nM).¹⁹⁸

Die molekularen Wirkmechanismen von **13** sind bisher nicht bekannt. Der Einfluß auf das Mycelienwachstum und die Produktion von Sekundärmetaboliten legt eine Interaktion in der *bld*-Signalkette bei *Streptomyces coelicolor*, bzw. der Butyrolactonkaskade bei *Streptomyces griseus* (siehe Abb. 3-3) nahe. Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Hormaomycin (**13**) ist derzeit Forschungsgegenstand in der Arbeitsgruppe Piel.

Die Hormaomycin-NRPS besitzt eine relativ breite Substratspezifität; in Vorläufer-dirigierten Biosynthesestudien konnte eine ganze Reihe von Analoga der Aminosäurebausteine eingebaut werden, was zu einer Vielfalt von neuen Hormaomycinderivaten **36-54** führte.^{62,199,200} Anstelle von (3-Ncp)Ala (**27**) konnten die zugefütterten Nitronorvalin (NO₂Nva) (**29**) und Nitronorleucin (NO₂Nle)

(30) offenkettige Analoga, in Hormaomycin (13) inkorporiert werden. Es war ebenso möglich, Methoxycyclopropylalanin [(3-Mcp)Ala] (28) zuzufüttern (siehe Abb. 3-21).

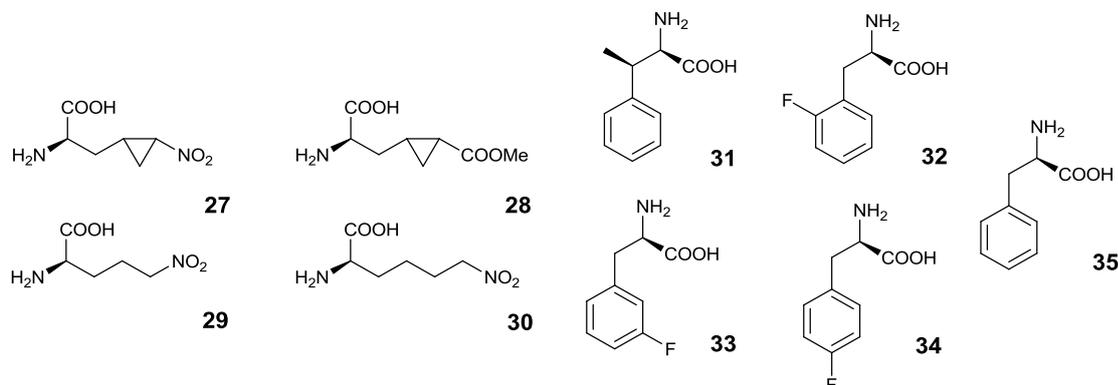


Abb. 3-21: Durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese inkorporierte Analoga der Vorstufen (3-Ncp)Ala (27), (β -Me)Phe (31) von Hormaomycin: (3-Mcp)Ala] (27), (NO_2)Nva (29), (NO_2)Nle (30), (*o*-F)Phe (32), (*m*-F)Phe (33), (*p*-F)Phe (34), Phe (35), vergleiche Tab. 3-1. ^{62,199,200}

Tab. 3-1: Durch Fütterung von Substanzen aus Abb. 3-19 erzeugte Hormaomycinanaloga (vergleiche Abb. 3-20 und 3-21). ^{62,199,200}

Hormaomycin	Eingebaute Aminosäure	Ersetzte Aminosäure
C (36)	(3-Mcp)Ala (28)	(3-Ncp)Ala (27) I+II
D1 (37)	(NO_2)Nva (29)	(3-Ncp)Ala (27) I
D2 (38)	(NO_2)Nva (29)	(3-Ncp)Ala (27) II
D3 (39)	(NO_2)Nva (29)	(3-Ncp)Ala (27) I+II
E1 (40)	(NO_2)Nle (30)	(3-Ncp)Ala (27) I
E2 (41)	(NO_2)Nle (30)	(3-Ncp)Ala (27) II
E3 (42)	(NO_2)Nle (30)	(3-Ncp)Ala (27) I+II
F1 (43)	<i>o</i> -F-Phe (32)	(β -Me)Phe (31) I
F2 (44)	<i>o</i> -F-Phe (32)	(β -Me)Phe (31) II
F3 (45)	<i>o</i> -F-Phe (32)	(β -Me)Phe (31) I+II
G1 (46)	<i>m</i> -F-Phe (33)	(β -Me)Phe (31) I
G2 (47)	<i>m</i> -F-Phe (33)	(β -Me)Phe (31) II
G3 (48)	<i>m</i> -F-Phe (33)	(β -Me)Phe (31) I+II
H1 (49)	<i>p</i> -F-Phe (34)	(β -Me)Phe (31) I
H2 (50)	<i>p</i> -F-Phe (34)	(β -Me)Phe (31) II
H3 (51)	<i>p</i> -F-Phe (34)	(β -Me)Phe (31) I+II
J1 (52)	Phe (35)	(β -Me)Phe (31) I
J2 (53)	Phe (35)	(β -Me)Phe (31) II
J3 (54)	Phe (35)	(β -Me)Phe (31) I+II

Auch an den Positionen des β -Methylphenylalanins (31) ist eine strukturelle Vielfalt möglich: Phenylalanin (35) und jeweils in *ortho*- *meta*- und *para*-Position mit Fluor substituierte Phenylalanine [(*o*-F)Phe (32) (*m*-F)Phe (33) (*p*-F)Phe (34)] konnten eingebaut werden. Eine Substitution konnte sowohl an Position I oder II (vergleiche Abb. 3-20) einzeln, als auch an beiden Positionen gleichzeitig nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die durch Fütterungen erzeugten Hormaomycinanaloga gibt Tabelle 3-1. Hormaomycin D2 (38) zeigt eine völlig neue antibiotische

Aktivität gegen den Pilz *Candida albicans* in der gleichen Größenordnung wie das etablierte Nystatin, was äußerst ungewöhnlich ist, da **13** nicht gegen Pilze aktiv ist.²⁰⁰ Synthetisch konnte durch die Verwendung von Diaminopropionsäure statt D-Thr ein Hormaomycinlactam dargestellt werden.²⁰¹ Die Bioaktivitäten der isolierten Analoga und weiterer synthetischer Hormaomycinderivate geben Einblick in Struktur-Wirkungsbeziehungen. Das erfolgreich angewendete Prinzip der Vorläufer-dirigierten Biosynthese gibt Anlaß zur Hoffnung, dass weitere Hormaomycinanaloga durch Zufütterung von Vorstufen erzeugt werden können.

In der Arbeitsgruppe Piel wurde aus einer Cosmidbibliothek der Biosynthesegencluster des Hormaomycins (**13**) isoliert.⁶² Es besteht aus 23 open reading frames (ORF) *hrmA-W* und hat eine Größe von 48,409 Basenpaaren (bp) (siehe Abb. 3-22). Eine Übersicht über die ORFs, ihre putativen Funktionen und die nächsten Verwandten befindet sich in Tabelle 3-3. Der zentrale Bestandteil des Cluster kodiert für die Hormaomycin-NRPS, die aus 2 ORFs (*hrmO*, *hrmP*) besteht und insgesamt sieben Module umfaßt. Sie katalysiert die Synthese des Peptids aus seinen biosynthetischen Vorstufen (siehe Abschnitt 3.2). Mit Hilfe des nichtribosomalen Codes^{79,80} kann bioinformatisch mit der Software NRPSpredictor 2²⁰² zumindest für einige A-Domänen das Substrat vorausgesagt werden. Die Reihenfolge der Module passt genau zur Architektur des Peptids. So zeigt HrmO2_A eine Präferenz für die Aufnahme und den Einbau von Threonin, während für die vorletzte A-Domäne, HrmP2_A, eine Spezifität für Isoleucin oder Valin vorausgesagt wird, wobei interessanterweise laut Datenbank ein Einbau von Valin präferiert wird (90%).²⁰² Für die anderen A-Domänen, die den Einbau der ungewöhnlichen Einheiten (3-Ncp)Ala (**27**), (β-Me)Phe (**31**) und (4-Pe)Pro (**69**) katalysieren, ist kein Homolog in den Datenbanken bekannt (siehe Tabelle 3-2).

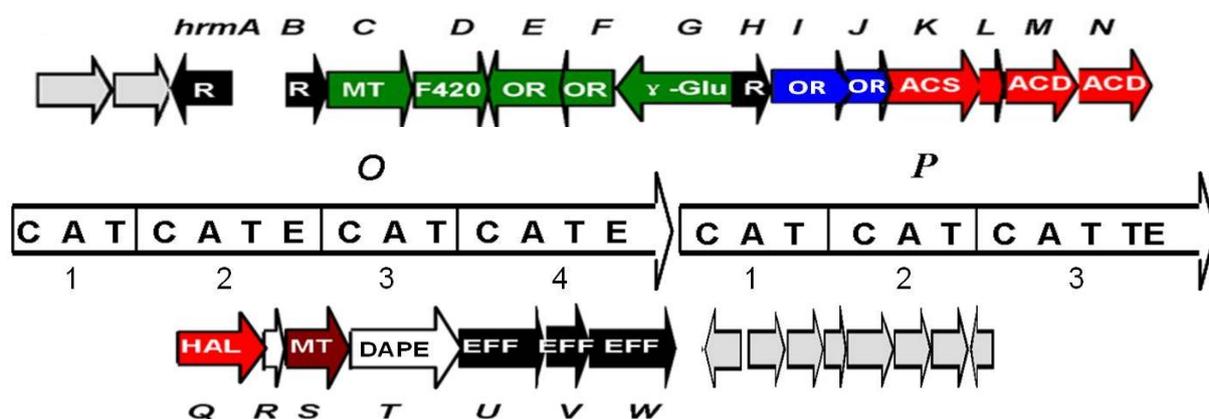


Abb. 3-22: Der *hrm*-Gencluster (*hrmA-W*). Die Farben der ORFs weisen auf die putative Beteiligung in der Biosynthese der einzelnen Hormaomycinvorstufen (vergleiche Abb. 3-20) hin. Putative Regulator- und Transportgene sind schwarz markiert. Graue Pfeile symbolisieren die flankierenden Gene des *hrm*-genclusters. R=Regulatorgen; MT=Methyltransferase; OR=Oxidoreduktase; γ -Glu= γ -Glutamyltranspeptidase; ACS=Acyl-CoA-Synthetase; ACD=Acyl-CoA-Dehydrogenase; C=Kondensationsdomäne, A=Adenylierungsdomäne, T=Thiolierungsdomäne; E=Epimerasedomäne; TE=Thioesterasedomäne; Hal=Halogenase; DAPE=Diaminopimelatepimerase; EFF=Effluxprotein.

Auch die Existenz von Epimerasedomänen in HrmO4 und HrmP2 passt zu den stereochemisch veränderten (3-Ncp)Ala I und α -Thr. Abbildung 3-23 zeigt schematisch die hypothetische Assemblierung von Hormaomycin an der Hormaomycin-NRPS. Die Biosynthese der Chlorhydroxypyrrolcarbonsäure (**93**), des äußeren Gliedes der Seitenkette, wird nach bioinformatischen Voraussagen an den freistehenden HrmK (Acyl-CoA-Synthetase) und HrmL (Peptidylcarrierprotein Typ II) katalysiert. Analog zu der Biosynthese von Pyoluteorin (**115**) und Clorobiocin (**99**)^{203,204} wird putativ zunächst Prolin (**69**) durch HrmK an HrmL gebunden, und dann zum Pyrrol dehydriert. Weitere Details zur Biosynthese der Vorstufen sind in den Kapiteln 5.1-5.3 nachzulesen.

Tab. 3-2: Nichtribosomale Codes der Hormaomycin A-Domänen und vorausgesagte Spezifitäten.⁶²

A-Domäne	Nicht-ribosomaler Code	Nächstverwandter Code (A-Domäne)	Spezifität der verwandten Domäne
HrmK	DLFYAAKVCK	DLLYAALVCK (PltF)	Pro
Hrm O1/O4	DPIVVGGVAK		
Hrm O2	DFWNIGMVHK	DFWNIGMVHK (SypC5)	Thr
Hrm O3/P1	DAWTTAVAAK		
Hrm P2	DGYFWGVTFK	DAYFWGVTFK (AcmB2) DGFFFGVVFK (BacC1)	Val Ile
Hrm P3	DVQFSAHGAK		

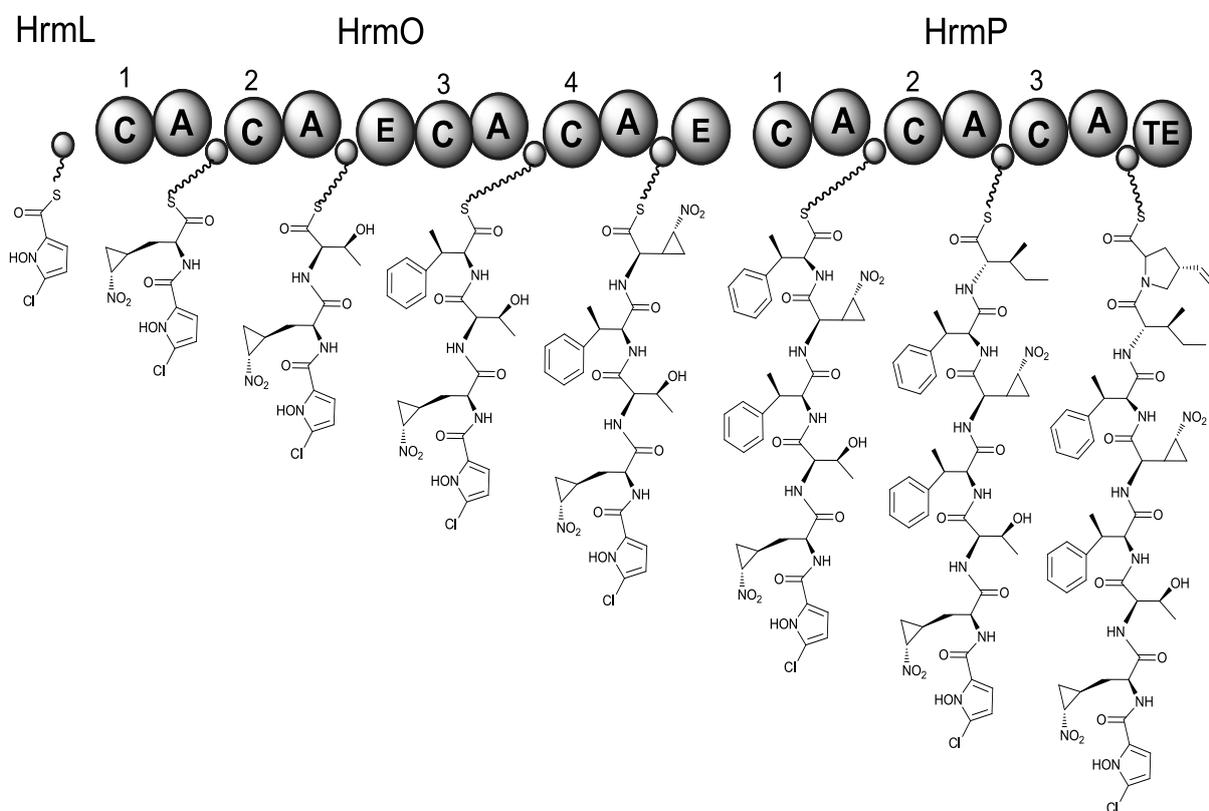


Abb. 3-23: Die hypothetische Assemblierung von Hormaomycin an der Hormaomycin-NRPS.⁶² C=Kondensationsdomäne; A=Adenylierungsdomäne; TE=Thioesterasedomäne. Die Zahlen geben die Bezeichnung für die NRPS-Module wieder.

Tab. 3-3: Kodierte Proteine in der *hrm*-Region, ihre putativen Funktionen und nächsten Verwandten (Stand 2/2012)

Protein	AS	vorhergesagte Funktion	Sequenzähnlichkeit (Protein, Herkunft)	Ähnlichkeit/ Identität	Zugangsnummer
HrmA	321	AraC-artiger transkriptioneller Regulator	SCO0287, <i>Streptomyces coelicolor</i>	84/75	CAB54172
HrmB	197	Putativer Regulator	NovE, <i>Streptomyces caeruleus</i>	73/60	AAF67498
HrmC	358	Methyltransferase	LmbW, <i>Streptomyces lincolnensis</i>	72/57	CAA55769
HrmD	298	F420-abhängige Oxidoreductase	SCO3591, <i>S.coelicolor</i>	63/52	CAA22223
HrmE	326	Tyrosinhydroxylase	LmbB2, <i>S. lincolnensis</i>	55/47	CAA55748
HrmF	185	DOPA-spaltende Oxidoreductase	TomH, <i>Streptomyces achromogenes</i>	69/61	ACN39014
HrmG	599	γ -Glutamyl-Transpeptidase	LmbA, <i>S. lincolnensis</i>	73/64	CAA55746
HrmH	132	Endoribonuclease	YjgH, <i>Kinetococcus radiotolerans</i>	80/60	YP_001362405
HrmI	350	Unbekannt	PSPTOT1_5436, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	72/57	ZP_03398361
HrmJ	227	Unbekannt	PSPTOT1_5541, <i>P. syringae</i> pv. tomato	70/51	ZP_03398362
HrmK	527	Acyl-CoA-Synthetase	CaiC, <i>Oscillatoria sp.</i> PCC 6506	50/34	ZP_07113995
HrmL	91	Typ II Peptidyl-Carrier - Protein	VinL, <i>Streptomyces halstedtii</i>	59/40	BAD08369
HrmM	388	Acyl-CoA-Dehydrogenase	MoeH5, <i>Streptomyces clavuligerus</i>	51/33	YP_002190358
HrmN	389	Acyl-CoA-Dehydrogenase	Strop_4265, <i>Salinispora tropica</i>	49/36	YP_001161071
HrmO	5252	NRPS (C A PCP C A PCP E C A PCP C A PCP E)	RHA1_ro00141, <i>Rhodococcus sp.</i> RHA	40-60% Domänen-identität	YP_700135
HrmP	3471	NRPS (C A PCP C A PCP C A PCP TE)	PstC, <i>Streptomyces ghanaensis</i>	40-60% Domänen-identität	ZP_06575792
HrmQ	448	Halogenase	ChIB4 <i>Streptomyces antibioticus</i>	79/64	AAZ77674
HrmR	72	MbtH-Homolog	Tcur1889, <i>Thermomonospora curvata</i>	82/66	YP_003299497
HrmS	329	Methyltransferase	MppJ, <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	67/52	AAU34201
HrmT	301	Diaminopimelat-Epimerase	DAPF2 (SAV3161), <i>S. avermitilis</i>	63/47	BAB69347
HrmU	427	membranintegrierter Antitransporter	CZA382.28, <i>Amycolatopsis orientalis</i>	68/56	CAB45049
HrmV	156	ABC-Transporter, ATP bindendes Protein	ABC-transporter, <i>Streptomyces cattleya</i> DSM 46488	78/66	AEW99195

HrmW	563	ABC transporter, ATP bindendes protein	KM-6054 <i>Kitasatospora</i> <i>setae</i>	52/41	YP_004902137
------	-----	---	--	-------	--------------

4 Zielsetzung der Arbeit

Aus den vielen ungewöhnlichen und teilweise einzigartigen Eigenschaften des Hormaomycins (**13**) und seines Biosyntheseengclusters ergeben sich folgende wissenschaftliche Fragestellungen, die in dieser Arbeit bearbeitet werden sollten. Erste Einblicke in die Biosynthese des Hormaomycins (**13**) wurden durch Fütterungsexperimente und durch die Isolierung des Hormaomycinbiosyntheseengclusters erhalten.⁶² So konnten durch Sequenzvergleiche viele putative Kandidaten für einzelne Biosyntheseschritte ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun weitere Einblicke in die komplexe Biosynthese der einzigartigen Hormaomycinvorstufen 3-Nitrocyclopropylalanin [(3-Ncp)Ala] (**27**), 4-Propenylprolin [(4-Pe)Pro] (**69**) und Chlorhydroxypyrrolcarbonsäure (Chpca) (**93**) gewonnen werden. Heterologe Expressionen und *in vitro* und *in vivo*-Charakterisierungen diverser Enzyme des Hormaomycingenclusters in *E. coli* sollten neue Einsichten in die Funktionsweise dieser Enzyme liefern.

Die Biosynthese von 3-Nitrocyclopropylalanin (**27**) verläuft ausgehend von Lysin (**58**) über einen in der Natur neuartigen Mechanismus, der nach Fütterungsstudien postuliert wurde.²⁰⁶ Demzufolge wird **58** zunächst an einer nicht aktivierten Position hydroxyliert, es kommt dann über Lactonisierung und N-Oxidation zur Cyclopropanbildung. Die bioinformatische Analyse des Hormaomycingenclusters deutet durch Ausschlussverfahren auf zwei Enzymkandidaten (HrmI und HrmJ) hin, die für die oxidativen Modifizierungen von Lysin (**58**) zu (3-Ncp)Ala (**27**) verantwortlich sein könnten. Diese Enzyme haben keine bisher bekannten charakterisierten näheren Verwandten, gehören also zu neuartigen Enzymfamilien. In dieser Arbeit sollten diese Enzyme durch Fütterungsstudien der (3-Ncp)Ala-Biosynthese zugeordnet werden, die Enzyme dann heterolog exprimiert und ihre Funktionen charakterisiert werden.

Für 4-Propenylprolin (**69**) wurde als biogenetische Vorstufe das Tyrosin (**70**) identifiziert. Über L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (**71**) erfolgt dann durch HrmF, eine L-DOPA-2,3-Dioxygenase, die Öffnung des Catecholringes und eine Neuordnung des Kohlenstoffskeletts zu einem gelb gefärbten Pyrrolinylintermediat **72**.⁶² Diese Reaktion sollte im Rahmen dieser Arbeit kinetisch charakterisiert werden. Die weiteren Schritte zum Propenylprolin (**69**) sind unklar. Im Hormaomycingencluster befindet sich, im Gegensatz zu ähnlichen Biosynthesewegen,²²²⁻²²⁵ kein Enzym mit Homologien zu einer C-C-Hydrolase. Mit Hilfe von degenerierten Primern sollte im Genom von *Streptomyces griseoflavus* W-384 nach einem Homolog gesucht werden. HrmC, eine putative SAM-abhängige Methyltransferase sollte zusammen mit HrmF heterolog exprimiert werden, um eine eventuelle Methylierung des L-DOPA-Spaltproduktes **72** zu detektieren.

Die Biosynthese von Chlorhydroxypyrrolcarbonsäure (Chpca) (**93**) findet nach bioinformatischen Voraussagen wahrscheinlich ähnlich wie bei anderen Pyrrolen^{203,204} ausgehend von Prolin an einem

freistehenden Peptidylcarrierprotein (PCP) statt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Acyl-CoA-Synthetase HrmK und das PCP HrmL heterolog exprimiert werden. HrmK sollte auf seine Substratspezifität hin untersucht werden. Für HrmL sollte zunächst eine posttranslationale Modifizierung (Phosphopantetheinylierung) nachgewiesen werden, da diese für weitere Reaktionen unerlässlich ist. Im Anschluß sollte dann die Beladung von HrmL mit Prolin durch HrmK nachgewiesen werden.

N-Hydroxypyrrrole wie Chpca (**93**) sind äußerst selten in der Natur anzufinden. Aus dem Hormaomycingencluster kommt am ehesten HrmN, eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, für die N-Hydroxylierung des Pyrrols in Frage. Dieses Enzym sollte nun in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, dem Produzenten des Antibiotikums Pyoluteorin (**115**), exprimiert werden. Die Biosynthese des Pyrrolteils von Pyoluteorin verläuft ähnlich zur putativen Biosynthese von Chpca. Wenn HrmN während der Pyoluteorinproduktion exprimiert wird, könnte es das Pyoluteorin (**115**) hydroxylieren. Damit wäre die Funktion von HrmN bewiesen und ein neuer Naturstoff durch kombinatorische Biosynthese generiert. Diese Strategie hat bereits im Fall von HrmQ, einer Halogenase, funktioniert und zur Isolierung von chlorierten Clorobiocinderivaten geführt.²³⁹

Der Zusammenbau der Vorstufen zum Hormaomycin erfolgt an einem Megaenzymkomplex, einer nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS). Der Einbau von verfütterten Analoga der Vorläufer (Mutasyntese) in Hormaomycin impliziert eine lose Substratspezifität der Hormaomycin-NRPS. Die Adenylierungsdomänen (A-Domänen) der NRPS spielen durch Auswahl des Substrates eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von nicht-ribosomalen Peptiden. Die Interaktion und Aktivierung von verschiedenen A-Domänen mit sogenannten MbtH-artigen Proteinen (MbtH-like proteins) wurde 2010 nachgewiesen. Da im Hormaomycin-Gencluster ein solches Protein (HrmR) kodiert ist, ist eine solche Interaktion für eine oder mehrere Hormaomycin-A-Domänen wahrscheinlich. Die Hormaomycin A-Domänen sollten im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* exprimiert und rekonstituiert werden. Über Coexpression mit HrmR sollte ihre Interaktion mit diesem Protein untersucht werden. Anschließend sollten die A-Domänen massenspektrometrisch charakterisiert werden. Informationen über die Substratspezifitäten der A-Domänen geben wichtige Hinweise über die Möglichkeit, Hormaomycinanaloga durch Mutasyntese zu erzeugen.

Eine Sequenzanalyse der Hormaomycin-A-Domänen lässt Hypothesen zum evolutiven Ursprung dieser Domänen zu. So zeigen große Abschnitte am 5'- und 3'-Terminus der A-Domänen, die für den Einbau von chemisch stark unterschiedlichen Aminosäuren verantwortlich sind, eine äußerst hohe Übereinstimmung. Dieses Phänomen legt eine Rekombination der zentralen DNA-Abschnitte der Domänen, die in ihrer Sequenz stark divergieren, und damit folgend den Austausch der Substratspezifität dieser A-Domänen während der Evolution nahe. Um diese Hypothese zu unterstützen, sollten im Rahmen dieser Arbeit kombinatorisch erzeugte A-Domänen mit ausgetauschten zentralen DNA-Abschnitten aus dem Hormaomycin-NRPS und dem CDA-NRPS aus

Streptomyces coelicolor A3(2) konstruiert und in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Diese Proteine sollten anschließend massenspektrometrisch auf ihre Substratspezifität untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studien können neue Einblicke in die Evolution von A-Domänen geben und Strategien zur kombinatorischen Biosynthese von nichtribosomalen Peptiden aufzeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten außerdem natürliche Hormaomycinanaloga, die von einem Hormaomycin-Überexpressionsstamm gebildet wurden, isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Bisher wurden noch keine natürlichen Hormaomycinanaloga beschrieben. Die Strukturen können einen Einblick in die Biosynthese der Hormaomycinvorstufen, aber auch in die Substratspezifität der Hormaomycin-NRPS geben. Die anschließende biologische Testung der neuen Substanzen kann dann weitere Einsichten in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Hormaomycin liefern.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Studien zur Biosynthese von (3-Ncp)Ala

3-(*trans*-2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala] (**27**) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure mit mehreren außergewöhnlichen Strukturmerkmalen (siehe Abschnitt 3.4), die in Hormaomycin (**13**) in zwei verschiedenen diastereomeren Formen [*2S* (**55**) und *2R* (**56**)] eingebaut ist (Abb. 5-1). Die Änderung der Stereoinformation wird vermutlich durch die Epimerasedomäne in HrmO4 eingeführt (vergleiche Abb. 3-23). Die ähnlichste in der Natur vorkommende Aminosäure ist das Aminocyclopropylalanin, der zentrale Bestandteil des Proteasominhibitors Belactosin A (**57**) (Abb. 5-1), das ebenfalls aus einem Bakterium der Gattung *Streptomyces* isoliert wurde.²⁰⁵ Über die Biosynthese von **57** ist bisher nichts bekannt.

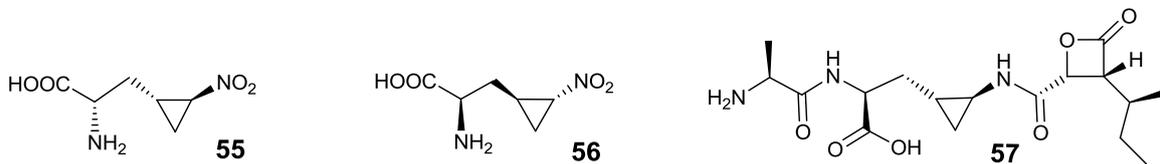


Abb. 5-1: *2S*-(**55**); *2R*-(**56**) 3-(*trans*-2'-Nitrocyclopropyl)alanin, Belactosin A (**57**)

Aufgrund von Fütterungsexperimenten mit markierten Aminosäuren konnte für (3-Ncp)Ala (**27**) ein biosynthetischer Ursprung aus Lysin (**58**) nachgewiesen werden.²⁰⁶ Anschließend wurden mit Deuterium an verschiedenen Positionen isotope-markierte Lysine verfüttert, um den Ort der initialen Modifikation von Lysin (**58**) zu bestimmen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wurde ein Modell der (3-Ncp)Ala-Biosynthese postuliert. Hiernach wird Lysin (**58**) an C4 hydroxyliert, es kommt zu einer spontanen Lactonisierung zu **59**. Dann wird die Aminfunktion oxidiert und es bildet sich ein Oxim **60** durch Tautomerisierung.

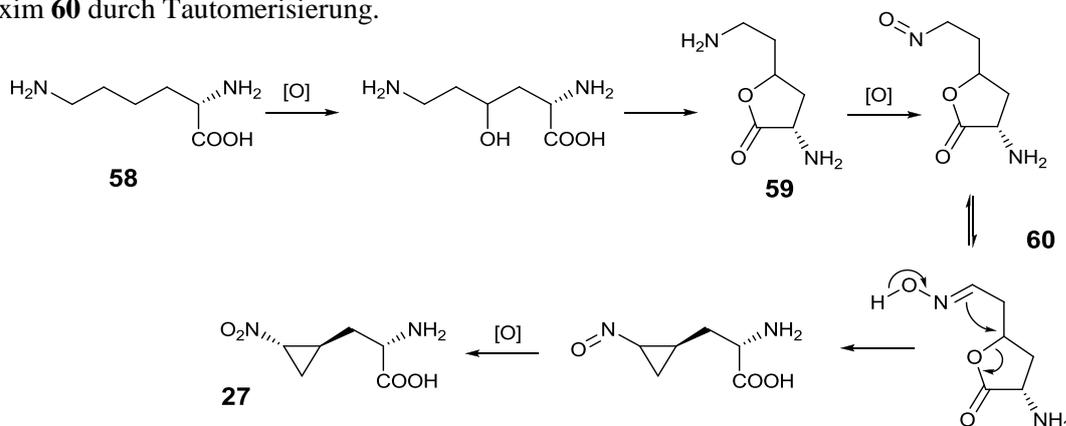


Abb. 5-2: Postulierte (3-Ncp)Ala-Biosynthese.²⁰⁶ Lysin (**58**) wird an C4 oxidiert, es kommt zu einer spontanen Lactonisierung zu **59**. Es folgen N-Oxidation zum Oxim (**60**), Cyclopropanbildung und Oxidation der Nitrogruppe zum (3-Ncp)Ala (**27**).

Der letzte Schritt ist die Cyclopropanbildung durch intramolekularen nucleophilen Angriff und die Oxidation zur Nitrofunktion. Es entsteht (3-Ncp)Ala (**27**). Abbildung 5-2 zeigt den erläuterten

Mechanismus. Dieser Mechanismus der Cyclopropanbiosynthese ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Durch einfache bioinformatische Analysen konnte den meisten Genen des Hormaomycingenclusters eine mögliche Rolle in der Hormaomycinbiosynthese zugewiesen werden. Für die Biosynthese von (3-Ncp)Ala (**27**) gab es keine offensichtlichen Kandidaten. Die einzigen Gene, denen sonst keine Funktion zugewiesen konnte, sind *hrmI* und *hrmJ*. Durch Ausschlussverfahren wurde diesen Genen daher eine mögliche Rolle in der (3-Ncp)Ala-Biosynthese zugewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen von HrmI und HrmJ ebenso wie die Biosynthese dieser ungewöhnlichen Aminosäure so weit wie möglich aufgeklärt werden.

5.1.1 Fütterung von (3-Ncp)Ala zu einer Deletionsmutante von *hrmI*

Um die Funktion von HrmI zu untersuchen, wurde von Xiaofeng Cai durch homologe Rekombination eine Δ *hrmI*-Mutante von *Streptomyces griseoflavus* W-384 konstruiert (Daten hier nicht aufgeführt). Dieser Stamm verlor dadurch die Fähigkeit, Hormaomycin zu produzieren. Durch Zufüttern des Biosynthesebausteins, dessen Produktion unterbrochen ist, kann die Produktion des Metaboliten wiederhergestellt werden. Um die Hypothese, dass HrmI an der (3-Ncp)Ala-Biosynthese beteiligt ist, zu bestätigen, wurde diese Aminosäure daher dem Stamm Δ *hrmI* während der Fermentation zugefüttert. Die starke antibiotische Wirkung von Hormaomycin (**13**) gegen *Arthrobacter crystallopoietes* wurde für die Analytik der Komplementierung ausgenutzt. Abbildung 5-3 zeigt den Vergleich einer Kultivierung von *Streptomyces griseoflavus* W-384, des Stammes Δ *hrmI* und des mit (3-Ncp)Ala (**27**) gefütterten Δ *hrmI*. Als zusätzliche Negativkontrollen wurden Lösungen von (3-Ncp)Ala (**27**) in verschiedenen Konzentrationen aufgebracht.

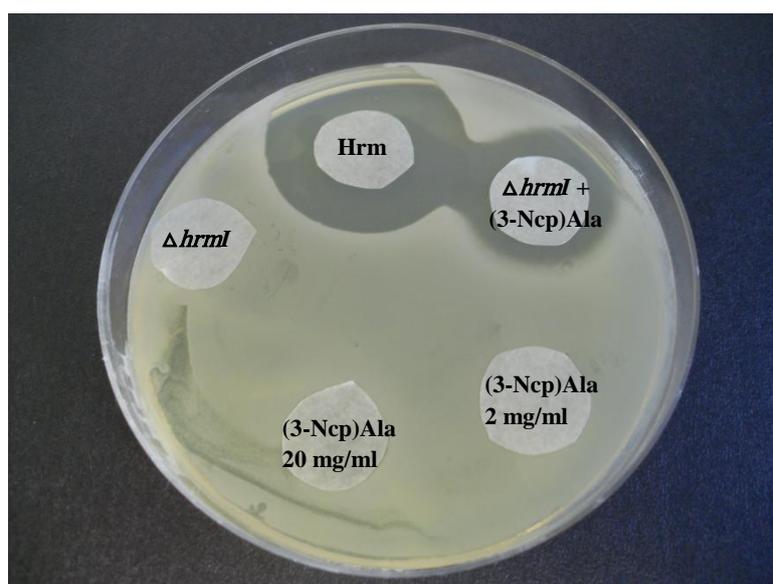


Abb. 5-3: Agarplatte von *Arthrobacter crystallopoietes* mit Hormaomycin (**13**) (Hrm) und (3-Ncp)Ala (**27**), Extrakten von Δ *hrmI*, und Δ *hrmI*, gefüttert mit (3-Ncp)Ala (**27**).

Es ist zu erkennen, dass durch die Zufütterung von (3-Ncp)Ala (**27**) die Hormaomycinbiosynthese wiederhergestellt worden ist, was durch den antibiotischen Effekt des Hormaomycins (**13**) gezeigt wird. Die Negativkontrollen zeigen, dass der antibiotische Effekt nicht von **27** herrührt. Ein analoges Experiment wurde von Xiaofeng Cai mit einer Deletionsmutante von *hrmJ* durchgeführt, auch hier konnte das zugefügte (3-Ncp)Ala (**27**) die Hormaomycinbiosynthese komplementieren (Daten hier nicht aufgeführt). HrmI und HrmJ sind also tatsächlich an der Biosynthese von **27** beteiligt. Um Informationen über die möglichen Reaktionen von HrmI und HrmJ zu gewinnen, wurde in Abschnitt 5.1.2 eine intensiviertere bioinformatische Analyse durchgeführt.

5.1.2 Bioinformatische Einordnung von HrmI und HrmJ

Eine BLAST-(Basic Local Alignment Search Tool)-Suche ergab kein charakterisiertes homologes biosynthetisches Protein für HrmI. Für HrmJ gab es ein ähnliches Ergebnis, allerdings scheinen mehrere Homologe von HrmJ zu einer bisher uncharakterisierten Proteinsuperfamilie DUF 2257 zu gehören. Um entferntere Verwandte für HrmI und HrmJ zu finden, wurde eine „position specific iterative BLAST“ (PSI-BLAST)-Analyse für beide Proteine durchgeführt. Bei dieser Analyse wird zunächst eine Liste aller sehr ähnlichen Proteine erstellt. Aus dieser Liste wird eine sogenannte Profilsequenz erstellt, die konservierte Regionen der Proteine zusammenfaßt. Mit dieser Profilsequenz wird wieder eine BLAST-Suche durchgeführt. Dieser Prozess läßt sich beliebig oft wiederholen. Dadurch, dass verwandte Proteine in die Suche miteinbezogen werden, ist PSI-BLAST viel empfindlicher bei der Ermittlung weit entfernter Verwandtschaften als das gewöhnliche BLAST.²⁰⁷ Eine iterative PSI-Blast-Suche für HrmJ ergab eine entfernte Verwandtschaft (Sequenzähnlichkeit 37%) zu einer L-Isoleucin-4-Hydroxylase aus *Bacillus thuringiensis*.²⁰⁸ Dieses Enzym hydroxyliert die Aminosäure Isoleucin (**61**) in der unaktivierten 4-Position zu Hydroxyisoleucin (**62**) (siehe Abb. 5-4). Analog könnte HrmJ den ersten Schritt der (3-Ncp)Ala-Biosynthese, die oxidative Modifizierung von Lysin (**58**) an der 4-Position katalysieren (vergleiche Abb. 5-2).

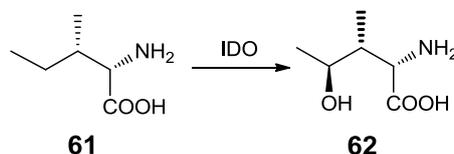


Abb. 5-4: Katalysierte Reaktion der Isoleucin-4-hydroxylase aus *Bacillus thuringiensis*. Isoleucin (**61**) wird an C4 zu **62** hydroxyliert.

In biochemischen Studien gab es Hinweise, dass die Isoleucin-4-Hydroxylase (IDO) eine Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängige Oxygenase ist.^{208,209} Diese Enzyme katalysieren den Einbau eines Atoms molekularen Sauerstoffs in ein Zielmolekül mit Hilfe der Cofaktoren Fe(II) und α -Ketoglutarat (**63**) (siehe Abb. 5-5 a). Dabei wird der Cofaktor Fe(II) chelatisiert und es kommt zur oxidativen Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinat (**64**) und Bildung einer reaktiven Sauerstoffspezies, die das Substrat hydroxyliert.²¹⁰

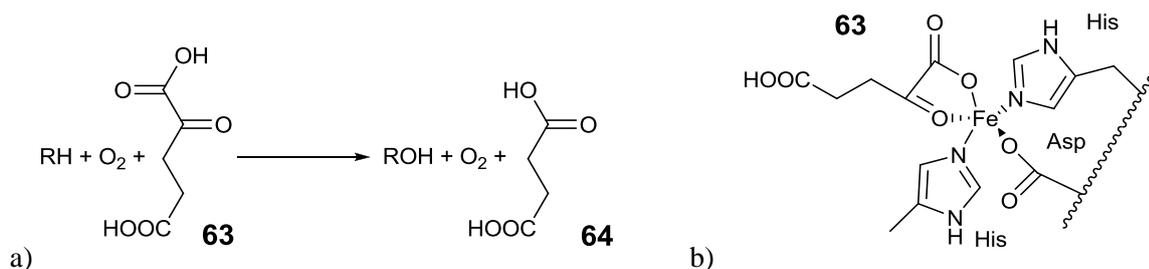


Abb. 5-5: a): Katalysierte Reaktionen von Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen. Das Substrat wird hydroxyliert und α -Ketoglutarat (**63**) zu Succinat (**64**) decarboxyliert. b): Aktives Zentrum von Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen: Fe(II) wird von α -Ketoglutarat (**63**) und einer katalytischen Triade aus Aspartat und zwei Histidinen chelatisiert.

Strukturelle Einsichten in den Wirkmechanismus Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängiger Oxygenasen haben gezeigt, dass als katalytische Triade im Enzym ein His¹-X-Asp/Glu-X_n-His²-Motiv vorliegt. Diese drei Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle bei der Chelatisierung des Eisens und der Koordination des Substrates (siehe Abb. 5-5 b). Eine weitere charakteristische Aminosäure (Arg/Lys) ist elf bis zwölf Aminosäuren C-terminal von His² lokalisiert. Diese übernimmt eine Stabilisierung des α -Ketoglutarat (**63**) an C-5.²¹⁰ Ein Sequenzvergleich von HrmJ und IDO zeigt, dass beide Enzyme das beschriebene Motiv besitzen (siehe Tab. 5-1). HrmJ ist also sehr wahrscheinlich eine α -Ketoglutaratabhängige Oxygenase aus einer neuen Enzymfamilie.

Tab. 5-1: Vergleich der Darstellung der aus dem Alignment (Anhang, Abb. 9-7) extrahierten hypothetischen Metall-Liganden und α -Ketoglutarat (**63**) stabilisierende Aminosäuren für IDO und HrmJ

Enzym	Ligand 1	Ligand 2	Spacing	Ligand 3	Spacing	α -KG C-5 Stabilisierung
IDO	His 159	Asp 161	51	His 212	15	Arg 227
HrmJ	His 132	Asp 134	52	His 186	14	Arg 200

Eine iterative PSI-Blast-Suche für HrmI ergab eine entfernte Verwandtschaft zu PqqC und Homologen aus der Biosynthese des Pyrrolochinolinchinons (**66**), eines Cofaktors von vielen bakteriellen Dehydrogenasen.²¹¹ PqqC ist eine kofaktorlose Oxidase, die den letzten Schritt in diesem Biosyntheseweg katalysiert.²¹² Die 2-Amino-2-Carboxyethylseitenkette von **65** wird zu einem Carboxypyrrol zyklisiert. Gleichzeitig wird das komplette Hexahydrochinolinsystem oxidiert. Die Gesamtreaktion benötigt drei Moleküle Sauerstoff, es wird H₂O₂ freigesetzt (siehe Abb. 5-6).

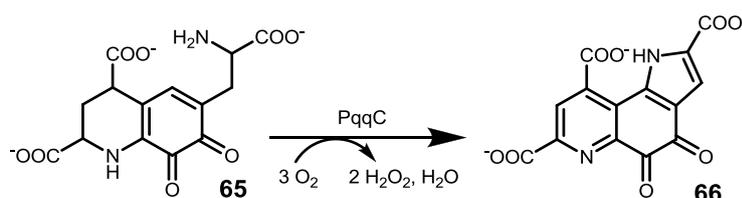


Abb. 5-6: Katalysierte Reaktion von PqqC. Die Seitenkette von **65** wird zu einem Carboxypyrrol zyklisiert. Oxidation des Hexahydrochinolinsystems führt zu Pyrrolochinolinchinon (**66**).

Biochemische Studien haben allerdings gezeigt, dass das Enzym für volle *in vitro*-Aktivität Nikotinamiddinukleotidphosphat (NADPH) und eine nicht näher definierte cytosolische Fraktion („activating factor“) benötigt.^{213,214}

Die bioinformatisch gesammelten Informationen über HrmI und HrmJ unterstützen die Hypothese von Brandl,²⁰⁶ dass (3-Ncp)Ala (**27**) aus über eine mehrfache Oxidation aus Lysin (**58**) gebildet wird. Demnach würde HrmJ Lysin (**58**) an Position 4 hydroxylieren und es zur Bildung eines Lactons **59** kommen, das an der ϵ -Aminoposition weiter zu **60** oxidiert wird. HrmJ könnte dann den zweiten Teil der Biosynthese, den Ringschluss zum Cyclopropan und die Oxidation zur Nitrogruppe katalysieren (vergleiche Abb. 5-2). Die Oxidationsstufe am ϵ -N für das Substrat von HrmI ist unbekannt.

5.1.3 *in vivo*-Experimente zur (3-Ncp)Ala-Biosynthese

Die Reaktion von HrmJ mit Lysin (**58**) sollte zunächst mit einem *in vivo*-Experiment untersucht werden. Das HrmJ enthaltende Expressionsplasmid pDF011 (siehe Tab. 6-3) wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und in 500 mL 2xYT-Medium (siehe 6.2.1) kultiviert. Während der Kultivierung wurden 2 mmol Lysin (**58**) gefüttert. Als Negativkontrolle wurde eine Kultur des Stammes MC7, der HrmL überexprimierte, verwendet. Die Kultur wurde wie in 6.7.2 beschrieben aufgearbeitet, mit Dansylchlorid derivatisiert (6.6.2.3) und mit HPLC analysiert (siehe 6.6.2.4). Es konnte in mehreren Expressionsversuchen kein neues Produkt detektiert werden (Daten nicht aufgeführt). Daher wurde die Strategie geändert und HrmJ als Protein mit N-terminalem Histidinyltag exprimiert. Dies erlaubt die selektive Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 6.5.4). Die postulierte Reaktion sollte dann in Abschnitt 5.1.4 mit dem isolierten Protein *in vitro* untersucht werden.

5.1.4 heterologe Expression und Charakterisierung von HrmJ

HrmJ wurde mit spezifischen Primern (siehe Tab. 6-10) mittels PCR aus genomischer DNA von *Streptomyces griseoflavus* W-384 amplifiziert und über die Schnittstellen *SacI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pET28b kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde pMC44 genannt. Anschließend wurde das Protein in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert (siehe 6.2.1) und über Ni-NTA-Chromatographie (siehe 6.5.4) aufgereinigt. Ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-(SDS-PAGE)-Gel einer Expression in 200 mL 2xYT-Medium zeigt Abbildung 5-7. Das Protein (berechnete Größe: 27,1 kDa) konnte in hohen Konzentrationen (13 μ M) in der Elutionsfraktion erhalten und isoliert werden. Anschließend sollte das Protein in einem Assay charakterisiert werden. Dafür wurde die Elutionsfraktion einer Überexpression (500 mL 2xYT) mit PD10-Säulen in Assaypuffer (siehe 6.2.2) überführt und über Vivaspinn-Zentrifugatoren [molecular weight cut-off (MWCO): 10 kDa] aufkonzentriert (siehe 6.5.5).

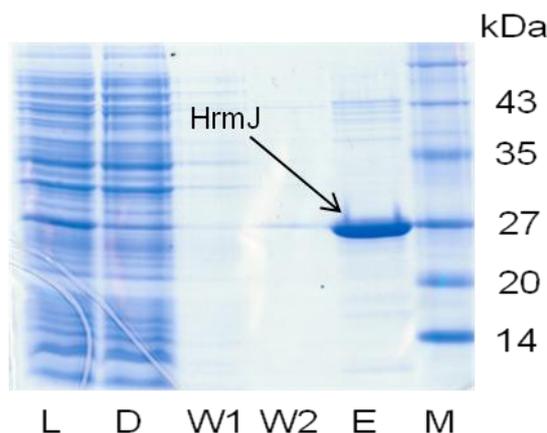


Abb. 5-7: SDS-PAGE-Gel (15%) von HrmJ (200 mL 2xYT, 1 mM IPTG, 16 °C): L=Lysat; D=Durchfluß; W1,W2=Waschfraktionen mit Lysispuffer,Waschpuffer; E=Elution; M=Proteinmarker.

Mit dem konzentrierten und entsalzten HrmJ wurden Enzymassays mit verschiedenen Temperaturen und pH-Werten durchgeführt. Essentielle Bestandteile für die Charakterisierung von Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenasen sind die Cofaktoren Fe(II) und α -Ketoglutar Säure (**63**) sowie Ascorbinsäure.^{215,216} Der Assay wurde wie in 6.6.2.1 beschrieben durchgeführt und dann mit HPLC analysiert (siehe Abschnitt 6.6.2.3). Die HPLC-Analytik von Aminosäuren ist nicht trivial; aufgrund der meist nicht vorhandenen Chromophore können die meisten Aminosäuren nicht durch UV-Absorption detektiert werden. Für die Detektion werden Aminosäuren mit UV-aktiven oder fluoreszierenden Reagenzien wie Dansylchlorid (**67**), 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (Fmoc), oder *o*-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert.²¹⁷ Bei der Analytik des HrmJ-Assays erwiesen sich nach Vorversuchen die Derivatisierung mit Dansylchlorid (**67**) als geeignet. Zunächst wurden 50 μ L des Assays mit **67** in einer einstündigen Reaktion unter Lichtausschluß²¹⁵ derivatisiert (siehe Abschnitt 6.6.2.2). Abbildung 5-8 zeigt diese Reaktion am Beispiel des Substrates für HrmJ, Lysin (**58**). Es entsteht α -Aminodansyllysin (**68**). Im Falle von Lysin kann die Derivatisierung auch an der ϵ -Aminogruppe erfolgen; es sind also zusammen mit dem doppelt dansylierten Lysin insgesamt drei derivatisierte Lysine vorstellbar.

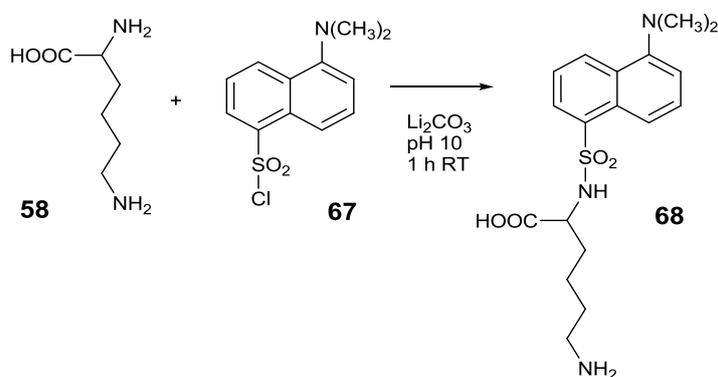


Abb. 5-8: Die Derivatisierung von Lysin (**58**) mit Dansylchlorid (**67**)

Wegen des zwitterionischen Verhaltens müssen oft Puffer in der HPLC-Analytik von Aminosäuren eingesetzt werden. Es wurden nach diversen Vorversuchen zwei isokratische HPLC-Methoden mit verschiedenen Puffersystemen ausgewählt, die eine stabile Analytik des Assays erlaubten. HPLC-Methode 1²¹⁸ benutzt ein Puffersystem mit Ammoniumformiat (9,0 mM) und Ameisensäure (pH 3,40) gemischt mit Acetonitril (59:41). Methode 2²¹⁵ basiert auf einem Phosphatpuffersystem (pH 7,5, 0,1 mM) und Acetonitril (80:20). In den Abbildungen 5-9 und 5-10 sind erfolgreiche HrmJ-Assays mit Methode 1 (Abb. 5-9) und Methode 2 (Abb. 5-10) gezeigt. Für das dansylierte Lysin sind die erwarteten drei Peaks detektiert worden (Methode 1: 9 min, 10 min und 15 min; Methode 2: 10, 11 und 16 min; jeweils Spur a). Beide Chromatogramme zeigen, daß die Lysinkonzentration im Assay [Peak bei 9 min (1) bzw. 11 min (2)] im Vergleich zur Negativkontrolle ohne HrmJ (Spur c) abgenommen hat, und dafür ein neuer Peak mit kürzerer Retentionszeit entstanden ist (jeweils etwa 8 min, Spur b).

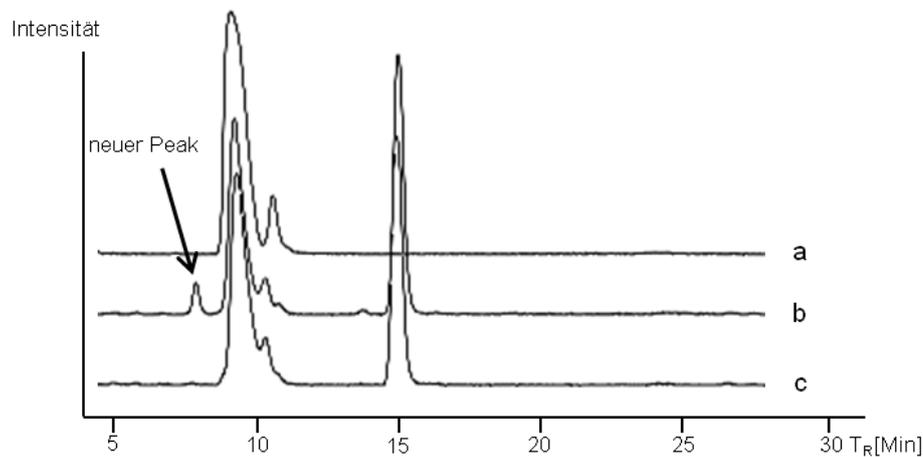


Abb. 5-9: Vergleich der HPLC-Chromatogramme des HrmJ-Assays nach Derivatisierung, Methode 1, 254 nm: a = Lysin (**58**) (0,1 mM), b = HrmJ-Assay, pH 7,5, RT, 3h; c = Negativkontrolle ohne HrmJ

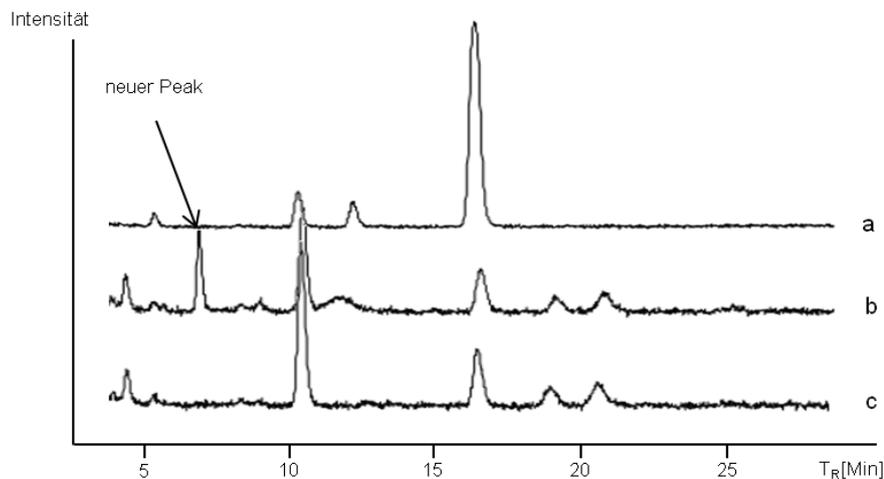


Abb. 5-10: Vergleich der HPLC-Chromatogramme des HrmJ-Assays nach Derivatisierung, Methode 2, 218 nm: a = Lysin (**58**) (0,1 mM); b = HrmJ-Assay, pH 7,5, 30 °C, 3h; c = Negativkontrolle ohne HrmJ

Eine massenspektrometrische Charakterisierung des Assays mit HPLC-MS war an diesem Institut mit den angewendeten Methoden nicht möglich. Es wurde deswegen in mehreren Experimenten der neu entstandene Peak in der HPLC isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Die Analyse eines Peaks aus Methode 1 lieferte ein Ion, das zu einem hypothetischen Intermediat der (3-Ncp)Ala-Biosynthese paßt (siehe Abb. 5-11).

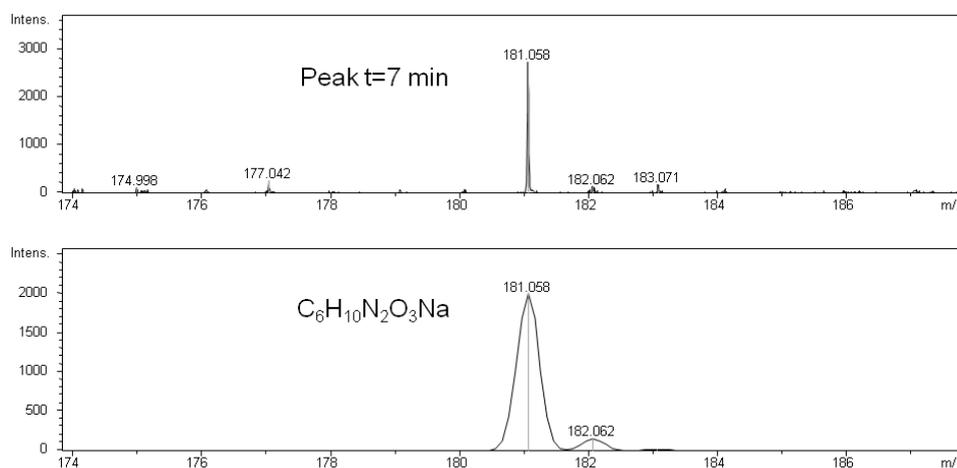


Abb. 5-11: oben: Ausschnitt aus dem HR-ESI Massenspektrum (Positiv-Modus) des aufgefangenen neu entstandenen Peaks aus Abbildung 5-9. Unten: theoretisches Massenspektrum des postulierten Oxim-Intermediates **60** aus der (3-Ncp)Ala-Biosynthese.

Das Massenspektrum der aufgefangenen Fraktion zeigt ein Ion bei m/z : 181,058. Diese Masse korreliert mit dem theoretischen Massenspektrum für das Oxim-Intermediat aus der postulierten Biosynthese **60** [(M+Na)⁺_{calc.}: 181,058]. Somit konnte erste Evidenz für ein Intermediat in der (3-Ncp)Ala-Biosynthese gefunden werden. Die Masse des dansylierten Oxims konnte nicht detektiert werden. Möglicherweise war das instabile Dansylderivat von **60** wieder zerfallen.

Aufgrund der Signalunterdrückung in der Massenspektrometrie hängt der Messerfolg der Probe stark von der Matrix des Analyten ab.²¹⁹ Daher ist es möglich, dass erst nach Entsalzung der Probe oder Elution in Methanol das gewünschte Molekül im Massenspektrometer detektiert werden kann. Es wurde in mehreren Experimenten versucht, die isolierte Fraktion zu entsalzen, oder sie zu trocknen und in Methanol zu überführen, um ein aussagekräftiges MS/MS-Spektrum für die detektierte Masse aufzunehmen. Weitere Versuche zur Charakterisierung dieser Substanz schlugen aber fehl.

Auch die Charakterisierung dieses Intermediates mit NMR-Spektroskopie würde sich unter den dargestellten Bedingungen als schwierig gestalten. Die Mengen der produzierten Substanz sind in diesem Maßstab zu gering, um ein aussagekräftiges Spektrum aufzunehmen. Eine Möglichkeit, die Hydroxylierung der ϵ -Aminogruppe nachzuweisen, wäre, ein ¹⁵N-NMR-Spektrum der Substanz aufzunehmen. Ein hydroxyliertes Amin würde eine signifikante Differenz in der chemischen Verschiebung im Gegensatz zur Aminogruppe ergeben. Hierzu werden aber große Produktmengen benötigt, die mit dem dargestellten Assay bisher nicht erreicht werden konnten.

Trotz vielfachen Wiederholungen ist es nur in einem Assay gelungen, ein neues Produkt zu detektieren und teilweise zu charakterisieren. Alle anderen Versuche HrmJ mit Lysin (**58**) umzusetzen, blieben bisher erfolglos. Die Inaktivität des Enzyms könnte an der bekannten Instabilität und Oxidationsempfindlichkeit α -Ketoglutarat-abhängiger Oxygenasen liegen.^{220,221} Eine Möglichkeit wäre, das Enzym unter Sauerstoffausschluss aufzuarbeiten, was sehr aufwendig ist. Auch das wurde mit einer Expression analog zu Abbildung 5-7 versucht; es konnte aber unter Laborbedingungen kein vollständiger Sauerstoffausschluss gewährleistet werden. Auch in diesem Experiment wurde Lysin nicht von HrmJ umgesetzt.

Dieser Teil der Arbeit wurde erst gegen Ende der Dissertation begonnen, daher waren aus Zeitgründen weitere Experimente für diese Arbeit nicht mehr durchführbar. Zurzeit wird in der Arbeitsgruppe Piel das putative Oxim-Intermediat **60** auf chemischem Wege synthetisiert. Nach erfolgter Fertigstellung kann das Molekül als Standard für den Assay von HrmJ in HPLC-Experimenten eingesetzt werden und wird durch den Vergleich von Retentionszeit und UV-Spektrum weitere Klarheit über die Identität des detektierten Intermediates bringen. HrmI konnte von Xiaofeng Cai ebenso wie HrmJ in großen Mengen exprimiert und isoliert werden (unveröffentlichte Ergebnisse). In ersten Versuchen zur direkten Bildung von (3-Ncp)Ala (**27**) aus Lysin (**58**) wurde das aufgereinigte HrmI dem HrmJ-Assay zugegeben. Zusätzlich wurde 0,5 mM NADPH dem Assay zugefügt (siehe 5.1.2). Es konnte kein neues Produkt in der HPLC detektiert werden (Daten hier nicht aufgeführt). Wahrscheinlich liegt das negative Ergebnis auch hier an der Instabilität von HrmJ. Mit dem synthetisierten postulierten Intermediat können in Zukunft ausführliche Studien zur Funktion von HrmI durchgeführt werden und die Biosynthese von (3-Ncp)Ala (**27**) weiter aufgeklärt werden.

5.2 Studien zur Biosynthese von 4-Propenylprolin

4-Z-Propenylprolin (4-Pe)Pro (**69**) ist ein weiterer einzigartiger Baustein des Hormaomycins. Sein biosynthetischer Ursprung liegt nicht, wie man zunächst vermuten könnte, im Prolin (**94**), sondern in der aromatischen Aminosäure Tyrosin (**70**). Dies belegen Fütterungsexperimente von Markus Radzom.⁶² Die bioinformatische Analyse des Hormaomycingenclusters erlaubt aufgrund von Sequenzvergleichen mit den Genclustern von Lincomycin²²² und den den Pyrrolo[1,4]benzodiazepinen Anthramycin,²²³ Sibiromycin²²⁴ und Tomaymycin,²²⁵ die ähnliche Bausteine besitzen, eine Hypothese für den Biosyntheseweg des 4-Propenylprolins (**69**) (siehe Abb. 5-12). Hiernach sollte die Genkassette *hrmCDEFG* für die (4-Pe)Pro-Biosynthese verantwortlich sein.

Die einzigen charakterisierten enzymatischen Homologe aus diesem Biosyntheseweg sind LmbB2 und LmbB1 aus dem Lincomycingencluster.^{226,227} Während LmbB1 die Bildung eines Pyrrolinderivates **72** aus L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (**71**) katalysiert, konnte die Bildung desselben Produktes aus **70** durch das Zusammenwirken von LmbB2 und LmbB1 gezeigt werden.²²⁶

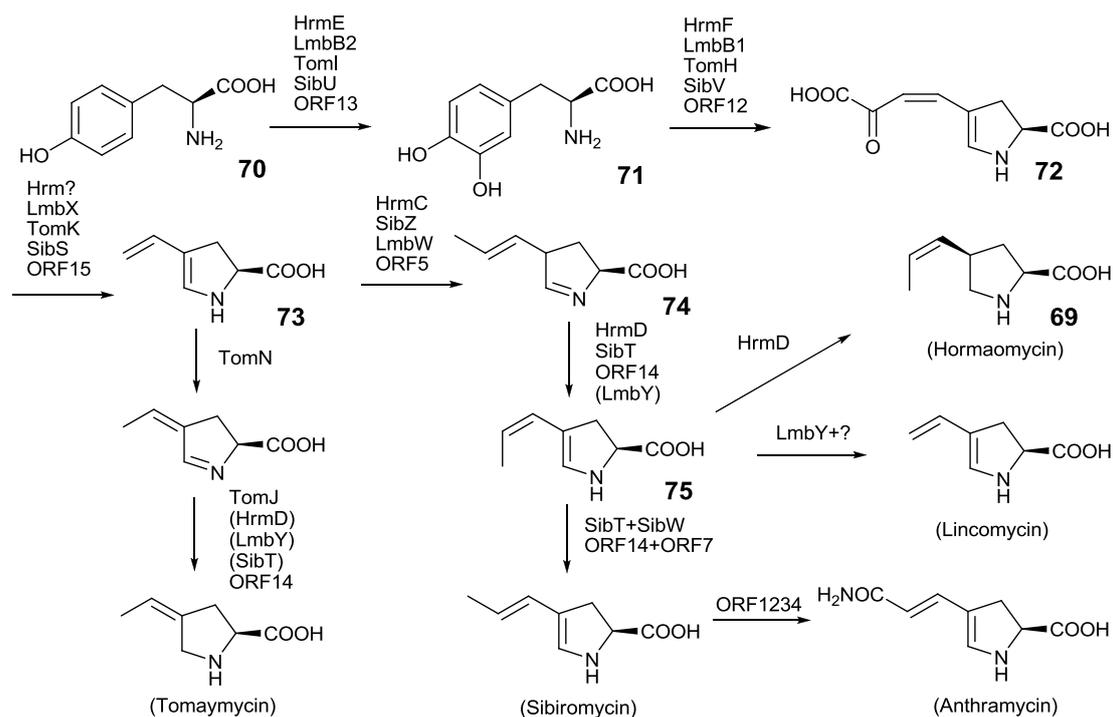


Abb. 5-12: Übersicht über die postulierte Biosynthese von (4-Pe)Pro (**69**) und dessen Homologe aus den Biosynthesen von Anthramycin (ORFxy), Sibiromycin (Sib), Tomaymycin (Tom) und Lincomycin (Lmb).⁶²

Das LmbB2-Homolog Hrme ist also sehr wahrscheinlich eine Tyrosin-Hydroxylase. Die 2,3 L-DOPA-Dioxygenase Hrme katalysiert analog zu LmbB1 die Addition von molekularem Sauerstoff an eine Hydroxygruppe des Catecholringes und führt so zu dessen Öffnung (Abb. 5-13). Das Enzym benötigt Fe(III) als Koordinator für die benachbarten Hydroxylgruppen.²²⁸ Die anschließende spontane Kondensation des entstandenen Aldehyds mit der Aminfunktion führt zur Bildung eines Pyrrolins und somit zur kompletten Reorganisation des Kohlenstoffgerüsts. Das instabile Reaktionsprodukt **72** ist leuchtend gelb gefärbt ($\lambda_{\max} = 414 \text{ nm}$). Die Bildung von **72** konnte bereits massenspektrometrisch in einer *in vivo*-Studie von Daniel Flachshaar nachgewiesen werden.⁶²

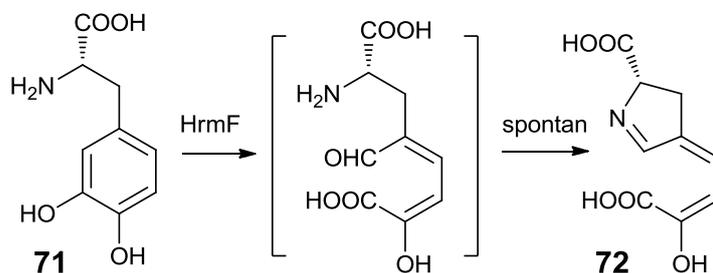


Abb. 5-13: Reaktionsmechanismus von Hrme. Der Catecholring von L-DOPA (**71**) wird oxidativ geöffnet; es kommt zur spontanen Rezyklisierung zum Pyrrrolinderivat **72**.

Die weiteren Schritte bis zum Propenylprolin sind weniger eindeutig: In den homologen Genclustern ist jeweils ein Gen für eine Hydrolase kodiert, die hypothetisch die Spaltung einer C-C Bindung katalysiert und die Seitenkette bis zum Vinyl **73** abbaut (vergleiche Abb. 5-12).²²⁹ Für *lmbX* aus dem

Lincomycingencluster wurde gezeigt, dass dieses Gen essentiell für die Lincomycinproduktion ist.²³⁰ Im Hormaomycin-Gencluster ist solch ein Homologes nicht vorhanden. HrmC hat Homologien zu SAM-abhängigen Methyltransferasen, es könnte die Vinylkette von **73** um ein C-Atom zu **74** verlängern. HrmD ähnelt LmbY, einer putativen Coenzym F_{420} -abhängigen Oxidoreduktase, die unter anderem die Reduktion des Pyrrolinringes von **75** zum (4-Pe)Pro (**69**) katalysieren könnte. Ein Lincomycinproduzent, dem die Oxidoreduktase LmbY durch Mutation fehlte, akkumulierte das Dien **75**,²³¹ was diese Funktion nahelegt. HrmG, eine putative γ -Glutamyltranspeptidase, ist wahrscheinlich an der Biosynthese des F_{420} -Chromophors beteiligt. Das Coenzym F_{420} (**76**) ist hauptsächlich in Archaeen verbreitet. Es ähnelt strukturell dem Flavinmononukleotid (FMN), besitzt aber ein höheres Reduktionspotential und eine Seitenkette aus einem bis sieben Glutamatresten (siehe Abb. 5-14).²³²

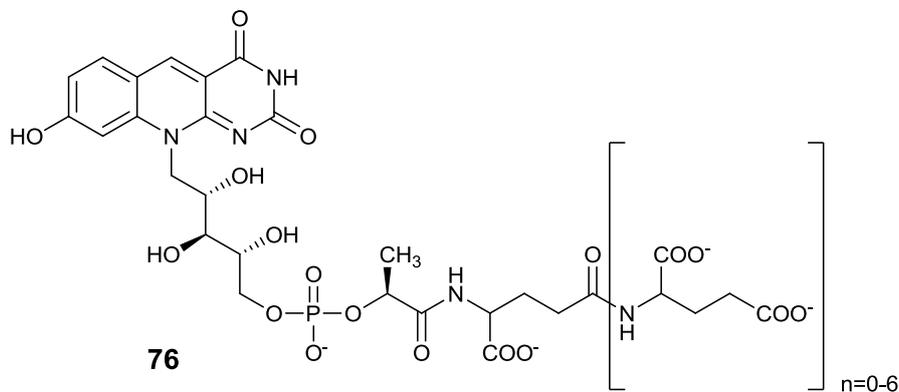


Abb. 5-14: Coenzym F_{420} (**76**)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die L-DOPA-Dioxygenase HrmF kinetisch charakterisiert werden. Mit Hilfe von degenerierten Primern sollte im Genom von *S. griseoflavus* W-384 nach Homologen von *lmbX* gesucht werden. Außerdem sollte ein Stamm konstruiert werden, der HrmF und die putative Methyltransferase HrmC exprimiert, um den Zeitpunkt der Methylierung in der (4-Pe)Pro-Biosynthese zu untersuchen.

5.2.1 Heterologe Expression und kinetische Charakterisierung von HrmF

HrmF konnte in vorherigen Arbeiten von Daniel Flachshaar bereits heterolog exprimiert und das Spaltungsprodukt von L-DOPA (**71**) massenspektrometrisch charakterisiert werden.⁶² Das Enzym, eine L-DOPA-2,3-Dioxygenase, spaltet den Catecholring oxidativ zwischen den beiden Hydroxygruppen. Es kommt zu Bildung eines instabilen, gelb gefärbten Intermediates (vergleiche Abb. 5-13). Um diese Reaktion kinetisch zu charakterisieren, wurde HrmF aus dem Konstrukt pDF010 (siehe Tab. 6-3) mit *AseI* und *NdeI* ausgeschnitten und in pHIS8 kloniert. Das Konstrukt wurde pMC6

genannt. Die Expression und Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Chromatographie ist in Abbildung 5-15 dargestellt.

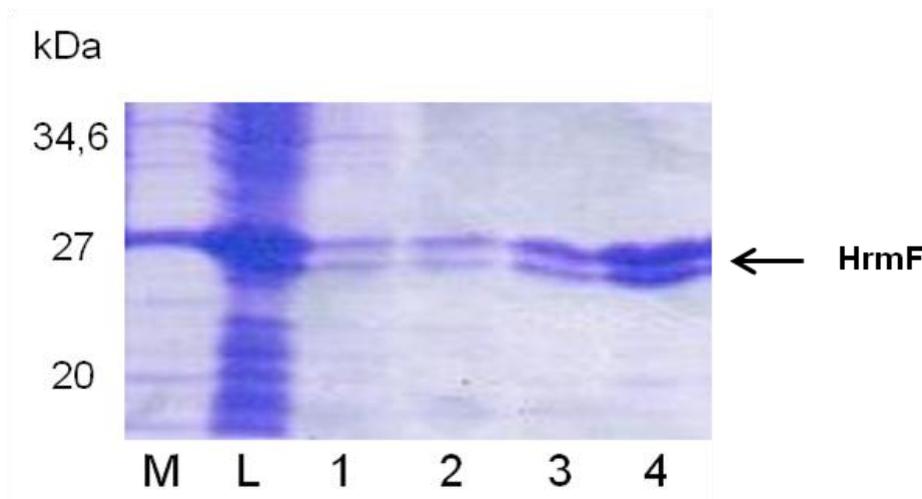


Abb. 5-15: SDS-PAGE-Gel (12%) von HrmF: M=Proteinmarker; L=Lysat; 1-4=Elutionsfraktionen mit 50,100,150 und 200 mM Imidazol

Die Reaktion von HrmF mit L-DOPA (**51**) wurde kinetisch untersucht. Analoge kinetische Untersuchungen wurden bereits an LmbB1, der L-DOPA-Dioxygenase aus der Lincomycinbiosynthese durchgeführt.²²⁷ Zur Analyse von His₈-HrmF wurden die Elutionsfraktionen einer Überexpression von pMC6 gesammelt, mit PD-10-Säulen in 100 mM Phosphatpuffer pH 8 überführt und mit Vivaspin (MWCO 10 kDa) (siehe 6.5.5) aufkonzentriert. Dem Enzym wurden nun verschiedene Mengen an **51** zugefüttert und die Reaktionen über 30 Minuten photometrisch bei 413 nm vermessen. Es wurden sieben verschiedene Substratmengen zugegeben (0,918 μmol , 2,753 μmol , 4,59 μmol , 6,426 μmol , 9,18 μmol , 11,934 μmol , 18,36 μmol). Die linearen Anfangsraten der Reaktionen wurden bestimmt und gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen. Alle Umsetzungen wurden dreifach durchgeführt. In Abbildung 5-16 ist die Michaelis-Menten-Kurve der Reaktion dargestellt. Hieraus lassen sich die kinetischen Parameter für das Enzym bestimmen. Die Kurve wurde linearisiert, indem die Quotienten aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen wurden (Hanes/Woolf-Plot, Abb. 5-17). Aus dem Schnittpunkt der Hanes/Woolf-Gerade mit der x-Achse läßt sich der K_M -Wert (Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit) ablesen. Weiterhin läßt sich aus der Steigung der Geraden die katalytische Konstante, k_{cat} , bestimmen. Die erhobenen kinetischen Parameter sind in Tabelle 5-2 aufgeführt und werden dort mit denen des charakterisierten Homologs, LmbB1, verglichen.

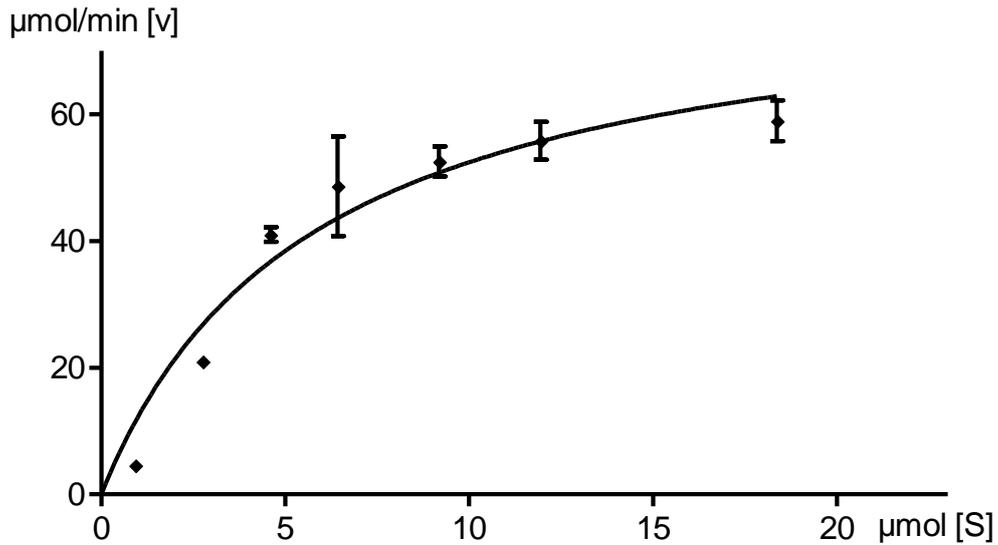


Abb. 5-16: Michaelis-Menten-Kurve von HrmF mit L-DOPA (71). Aufgetragen sind die linearen Steigungsraten der Absorption ($\lambda=413$ nm) nach Zugabe von 0,918 μmol , 2,753 μmol , 4,59 μmol , 6,426 μmol , 9,18 μmol , 11,934 μmol , 18,36 μmol L-DOPA (71). Die Kurve wurde mit dem Programm GraphPad Prism durch den Nullpunkt normiert. Die Balken geben das 95%-Konfidenzintervall für die Mittelwerte der Meßwerte wieder.

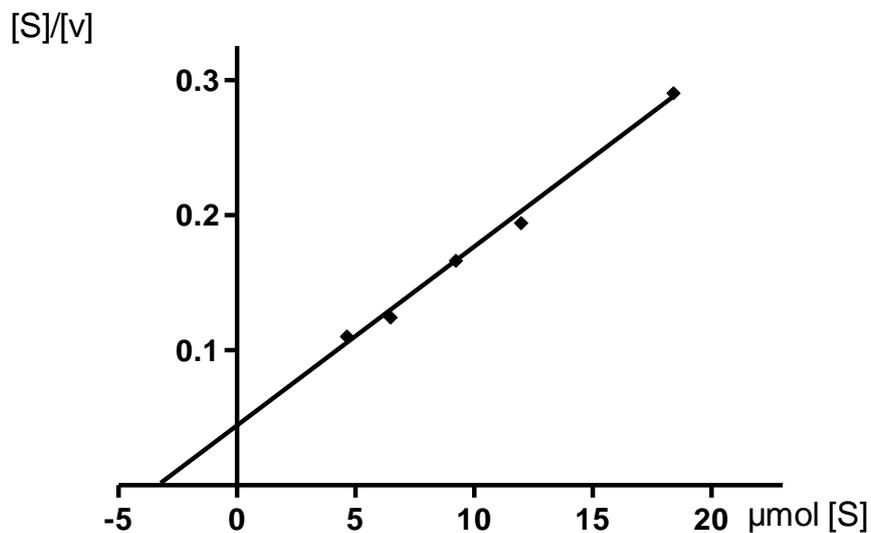


Abb. 5-17: Hanes/Woolf-Gerade der Reaktionskinetik von HrmF (siehe Abb. 5-16). Der Quotient aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen.

Tab. 5-2: Vergleich der erhobenen kinetischen Parameter für HrmF und LmbB1²²⁷

Protein	K_M [μM]	K_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{mM} \times \text{min}^{-1}$]
HrmF	3,348	57,8	17264
LmbB1	38	4.2	108

Der Vergleich von HrmF und LmbB1 zeigt, dass HrmF eine durchweg höhere katalytische Effizienz als sein Homologes besitzt. Der etwa 10-fach kleinere K_M -Wert und die etwa 15-fach höhere katalytische Konstante (K_{cat}) ergeben zusammen eine fast 160-fach höhere Effektivität für HrmF gegenüber LmbB1. HrmF zeigt darüber hinaus eine sehr relaxierte Substratspezifität. In einer anschließenden Studie von Elisabeth Rüthlein²³³ konnten zehn verschiedene Analoga von L-DOPA (**71**), **77-86**, umgesetzt werden, wobei starke Variationen in der Seitenkette möglich sind und sie sogar schrittweise bis zum Catechol (**77**) abgebaut werden kann (siehe Abb. 5-20). Die 3,4-Hydroxysubstitution des Phenylrestes hat sich in dieser Studie aber als essentiell für die Substraterkennung erwiesen.²³³

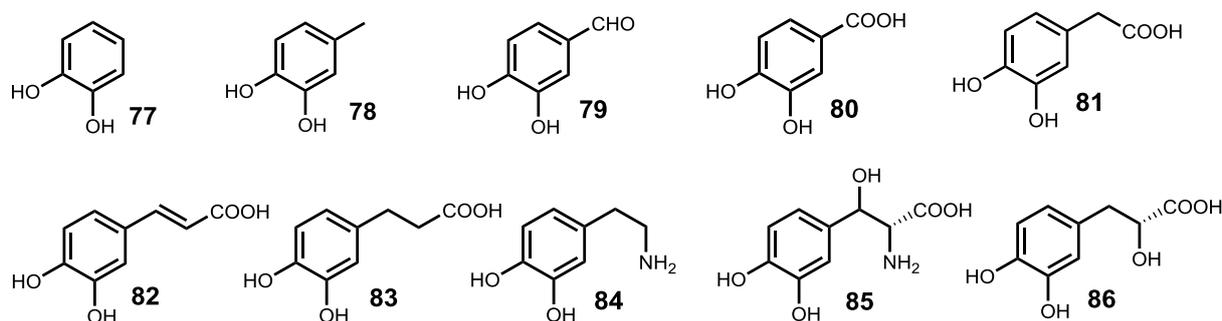


Abb. 5-18: Akzeptierte alternative Substrate von HrmF:²³³ Catechol (**77**), 4-Methylcatechol (**78**), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**79**), 3,4-Dihydroxybenzoesäure (**80**), 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (**81**), Kaffeesäure (**82**), 3,4-Dihydroxyphenylpropanoic acid (**83**), Dopamin (**84**), L-Dihydroxyphenylserin (**85**), 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid (**86**).

Die kinetischen Daten, zusammengenommen mit der relaxierten Substratspezifität und der Möglichkeit, das Enzym einfach und in großen Mengen zu exprimieren, machen HrmF somit zu einem aussichtsreichen Kandidaten für biotechnologische Produktionen oder chemoenzymatische Synthesen.

5.2.2 Suche nach einem *lmbX*-Homolog in *Streptomyces griseoflavus* W-384

Wie oben erwähnt, fehlt im Biosynthesegencluster des Hormaomycins ein Kandidat für die C-C-Hydrolyse des Spaltungsproduktes von L-DOPA, **72** (siehe Abb. 5-12). Um im Genom des Hormaomycinproduzenten ein Homologes des für eine C-C-Hydrolase kodierenden *lmbX* zu finden, wurden in einem Aminosäurealignment von LmbX, TomK, SibS und dem Produkt von ORF15 konservierte Regionen ausgemacht. Auf Basis dieser konservierten Regionen wurden degenerierte Primer entworfen, mit denen im Genom von *Streptomyces griseoflavus* W-384 mittels PCR versucht wurde, ein Homologes dieser Gene zu detektieren. Bei der Analyse des Alignments (siehe Abb. 9-8) fiel auf, dass ORF15 aus der Anthramycinbiosynthese eine geringere Verwandtschaft mit den anderen drei Enzymen zeigt; dieses Enzym wurde bei der Erstellung der degenerierten Primer daher nicht berücksichtigt. Tabelle 5-3 zeigt die für die Erstellung der Primer verwendeten Aminosäuremotive.

Tab. 5-3: Konservierte Aminosäuremotive der degenerierten Primer für das LmbX-Homolog

Primername	Aminosäuremotiv	Position (LmbX)
Unknown1f	QEGC G/S R	99-104
Unknown1r	PACAS	213-218
Unknown2f	ET A/V FV	45-49
Unknown2r	PEDPAC	210-215

Die erwartete Größe für ein Amplikon der Primer Unknown1f mit 1r oder 2r betrug ca. 300 bp, die erwartete Größe eines Amplikons der Primer Unknown2f mit 1r oder 2r war etwa 500 bp. Für alle Primerkombinationen wurden mehrere PCRs mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen der Primer durchgeführt, aber es wurde kein korrespondierendes Produkt amplifiziert. In anschließenden Studien wurde von Xiaofeng Cai versucht, über Hybridisierung mit *lmbX* ein Homolog im Genom zu detektieren.⁶² Auch dieser spezifischere Ansatz führte zu keinem Ergebnis. Die anschließende Veröffentlichung des Genoms von *Streptomyces griseoflavus* W-384 (in der Studie als *S. griseoflavus* Tu-4000 bezeichnet)²³⁴ bestätigte die durchgeführten Experimente: Es ist kein Homologes von *lmbX* im Genom von *Streptomyces griseoflavus* W-384 enthalten. Wie die C-C-Bindung im Falle des 4-Propenylprolins (**69**) gespalten wird, bleibt also weiter unklar. Entweder übernimmt ein anderes, bisher unbekanntes Enzym aus einer anderen Enzymfamilie diese ungewöhnliche Reaktion, oder ein Enzym aus dem Hormaomycingencluster katalysiert unerwarteterweise diesen Umwandlungsschritt.

5.2.3 *In vivo*-Experimente zur Untersuchung der Funktion von HrmC

Eine bioinformatische Analyse von *hrmC* ergab, dass es für eine SAM (**87**)-abhängige Methyltransferase kodiert. Nächster Verwandter ist LmbW aus der Lincomycinbiosynthese (57% Identität). SAM-abhängige Methyltransferasen katalysieren die Übertragung einer CH₃-Gruppe durch eine nukleophile Substitution an Hydroxy-, Amino-, Thiol-, und nucleophilen Kohlenstoffatomen (siehe Abb. 5-19).²³⁵ Nach der Übertragung des Methylrestes und Abspaltung eines Protons entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH) (**88**), aus dem Methionin wieder regeneriert werden kann

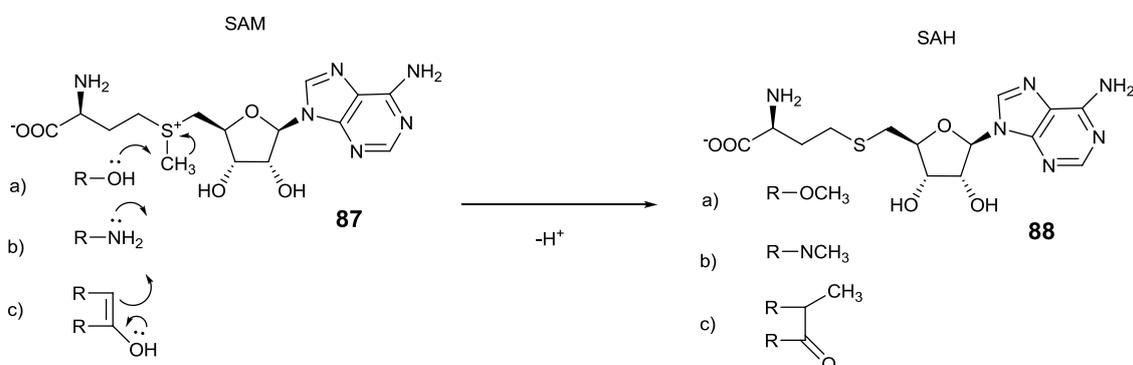


Abb. 5-19: Methylübertragung durch S-Adosylmethionin (**87**) auf a) Hydroxygruppe b) Aminogruppe c) nukleophilen Kohlenstoff (nach ¹²²)

Die Biosynthesewege von Propenylprolin und analogen Aminosäuren aus Tyrosin sind ab der L-DOPA-Spaltung bisher wenig untersucht, an einem Punkt der Biosynthese wird aber eine Methylgruppe an die Seitenkette angehängt (vergleiche Abb. 5-12). Homologe zu HrmC sind in allen anderen Biosynthesewegen, deren Seitenkette aus 3 C-Atomen besteht, enthalten (LmbW, SibZ, ORF5). Um nun zu untersuchen, ob HrmC die Übertragung einer Methylgruppe auf das Produkt der Reaktion von HrmF (**72**) katalysiert, sollten HrmF und HrmC in *E. coli* coexprimiert werden. Da das Redaktionsprodukt von HrmF instabil ist, ist dies der einfachste Weg, die putative Methylierung nachzuweisen. HrmC wurde aus pDF008 (siehe Tab. 6-3) per Restriktionsverdau mit *AseI* und *NdeI* ausgeschnitten, und in den Coexpressionsvektor pCDF-Duet, der mit *NdeI* geschnitten und dephosphoryliert war, kloniert. pMC2 wurde erhalten. pMC2 wurde dann mit pMC6 (*hrmF* in pHIS8) in *E. coli* BL21(DE3) cotransformiert. Der resultierende Stamm wurde MC3 genannt. MC6 und MC3 wurden parallel in 300 ml 2xYT-Medium bei 37 °C und 250 rpm kultiviert, und die Proteine nach der Induktion mit 1 mM IPTG bei 16 °C über Nacht überexprimiert. Die Umsetzung mit L-DOPA (**71**) und Aufarbeitung der Kultur erfolgte nach Rüthlein²³³ (siehe Abschnitt 6.7.2). Der erhaltene Extrakt wurde dann mit HPLC-MS analysiert (Methode CF; siehe 6.7.3). Das Ergebnis zeigt Abbildung 5-20. Im Maximum des Peaks bei 11,8 min (HrmF) bzw. 11,2 min (HrmC+HrmF) erscheint die Masse $[M+H]^+$ des Reaktionsprodukts **72** (siehe Abb. 5-21).

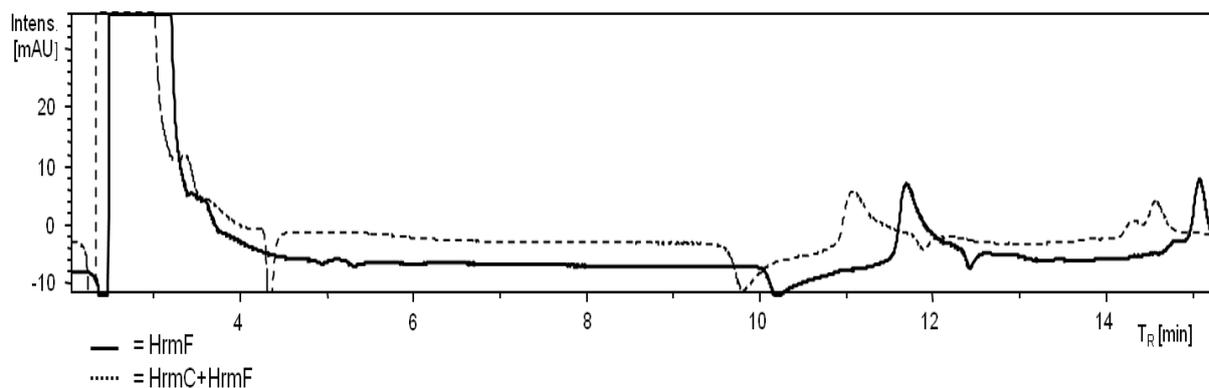
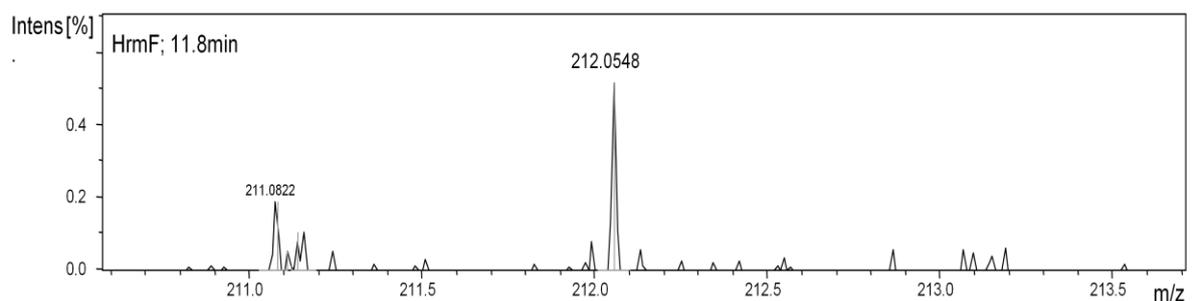
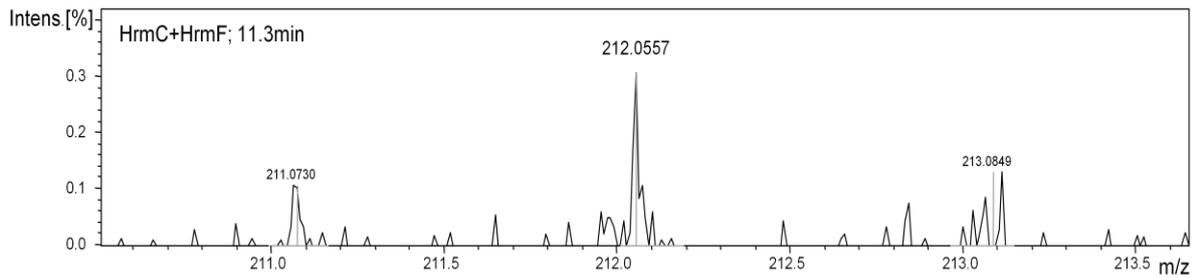


Abb. 5-20: Ausschnitt aus dem HPLC-HRMS-Chromatogramm der Umsetzungen von HrmF (schwarze Linie) und der Coexpression von HrmC und HrmF (gestrichelte Linie) mit L-DOPA (**71**)

a)



b)



c)

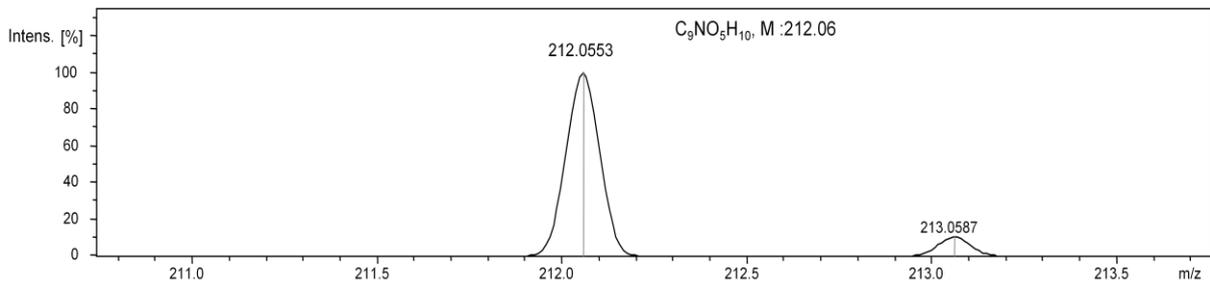


Abb. 5-21: Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Peaks bei a): 11,8 min (HrmF) bzw. b): 11,3 min (HrmC+HrmF) aus Abb. 5-20. Spektrum c) zeigt das theoretische Massenspektrum des Spaltproduktes von L-DOPA, **72** $[M+H]^+$.

In beiden HPLC-MS-Läufen konnten außerdem weitere Massen, die putativ zu Intermediaten der (4-Pe)Pro-Biosynthese, oder zu Zerfallsprodukten von **72** gehören, detektiert werden. Eine Masse mit $m/z=198,08$ und eine Masse $m/z=152,08$ besitzen die gleiche Retentionszeit. Der Unterschied von 46,0 Da beträgt eine HCOOH-Gruppe.

Tab. 5-4: Detektierte Massen in den HPLC-MS-Chromatogrammen von HrmF und HrmC/HrmF (siehe Abb. 5-20) und deren mögliche Strukturformeln

Detektierte Masse $[m/z]$	Retentionszeit [min]	Mögliche Summenformel $[M+H]^+$	Mögliche Strukturformel
212,05	11,8 (F) 11,2 (C+F)	$C_9H_9NO_2$	 72
198,07	15,2 (F) 14,8 (C+F)	$C_9H_{11}NO_4$	 89
152,08	15,2 (F) 14,8 (C+F)	$C_8H_7NO_2$	 90
226,07	12,7 (F) 12,2 (C+F)	$C_{10}H_{11}NO_5$	 91
166,05	12,7 (F) 12,2 (C+F)	$C_8H_9NO_3$	 92

Diese könnte aus einem instabilen Intermediat eliminiert worden sein. Es konnte zwar die Masse des putativen methylierten Intermediates ($m/z=226,08$) in beiden Extrakten detektiert werden, ebenso wie eine Masse von $m/z=166,05$, ebenfalls mit gleicher Retentionszeit (Massendifferenz einer Acetyleinheit). Unterschiede in den Massenspuren der beiden Extrakte konnten aber nicht festgestellt werden. Die Moleküle **89-92** sind mögliche Strukturen dieser Intermediate. Die Ergebnisse zeigen, dass die Intermediate tatsächlich eine große Instabilität besitzen. Die detektierten Massen könnten aber auch zu ganz anderen Substanzen gehören. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass HrmC nicht den direkt an HrmF anschließenden Schritt in der Biosynthese des 4-Propenylprolin (**69**) katalysiert. Möglicherweise können Deletionsmutanten einzelner Gene (*hrmC*, *hrmD*, *hrmG*) im Hormaomycinproduzenten die (4-Pe)Pro-Biosynthese weiter aufklären. Wenn Zwischenprodukte oder neue Hormaomycine mit veränderter Struktur entstehen, würde das Einsichten in die Funktion dieser Proteine geben. In *S. griseoflavus* W-384 steht bereits ein solches Mutationssystem zur Verfügung; erste Deletionsmutanten von Biosynthesegenen des Hormaomycins (**13**) sind von Xiaofeng Cai beim Stand dieser Arbeit bereits konstruiert worden (Ergebnisse unveröffentlicht).

5.3 Studien zur Biosynthese von Chpca

Die 5-Chlor-N-hydroxypyrrol-2-carbonsäure (Chpca) (**93**) (Abb. 5-24 a) ist die Startereinheit für die Biosynthese des Hormaomycins. Auch sie ist bisher einzigartig in der Natur. Für die biologische Aktivität des Hormaomycins ist die N-Hydroxylgruppe essentiell, das haben Struktur-Wirkungs-Experimente gezeigt.¹⁹⁵ Durch Fütterungen von markierten Vorstufen konnte ein biogenetischer Ursprung aus L-Prolin (**94**) bewiesen werden.⁶² Die Biosynthese von Pyrrolen aus Prolin (**94**) ist in einigen Systemen, wie Clorobiocin (**99**) oder Pyoluteorin (**115**) gut untersucht; nach der kovalenten Bindung von Prolin (**94**) über eine Thioesterbindung an ein PCP, katalysiert durch eine freistehende A-Domäne, wird der Pyrrolidinring durch eine oder mehrere Acyl-CoA-Dehydrogenasen zum Pyrrol-PCP oxidiert.²³⁶ Diese Reaktionsschritte konnten für mehrere Biosynthesysteme *in vitro* rekonstruiert werden.^{203,204,237} Das Pyrrolyl-PCP kann nun durch andere Enzyme noch weiter modifiziert werden, im Falle des Pyoluteorins konnte nach Konstitution des Pyrrolyl-PCP *in vitro* eine Dichlorierung des Pyrrols durch ein einziges Enzym nachgewiesen werden.²³⁸ Aus dem Gencluster des Hormaomycins sind *hrmKLMN* und *hrmQ* Kandidaten für die Biosynthese von Chpca (**93**). Abbildung 5-22 b) zeigt die putative Biosynthese: *hrmK* kodiert für eine Acyl-CoA-Synthetase, die, nach Analyse des nonribosomalen Codes (siehe Tab. 3-3), Prolin (**94**) auf das Typ-II-Peptidylcarrierprotein HrmL überträgt. HrmM hat hohe Homologien zu einer Acyl-CoA-Dehydrogenase, die Prolyl-PCP (**95**) zu Pyrrolyl-PCP (**96**) oxidieren könnte.

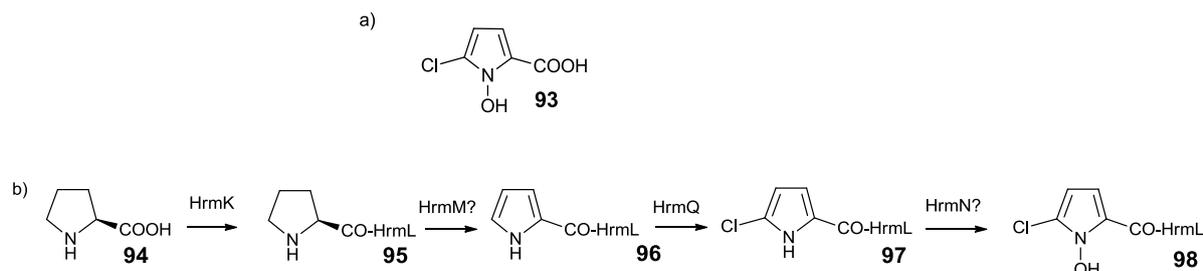


Abb. 5-22: a): 5-Chlor-N-hydroxypyrrol-2-carbonsäure (Chpca) (**93**). b): Die putative Chpca-Biosynthese. Prolin (**94**) wird von HrmK aktiviert und kovalent an HrmL kovalent gebunden. Es entsteht Prolyl-HrmL (**95**). Nach Oxidation zum Pyrrolyl-HrmL (**96**) durch HrmM wird durch HrmQ ein Chloratom an das Pyrrolyl-HrmL (**96**) addiert. Es entsteht **97**. HrmN katalysiert dann putativ die N-Hydroxylierung von **97** zu **98**.

HrmQ konnte bereits charakterisiert werden; in einem kombinatorischen Experiment chlorierte das Enzym das Antibiotikum Clorobiocin (**99**), das auch über eine Pyrrolcarbonsäureeinheit verfügt (siehe Abb. 5.23).²³⁹ Das Experiment fand in einem Stamm statt, in dem die Methyltransferase CloN6 nicht mehr funktionsfähig war, somit konnte HrmQ die nun freie 2-Position chlorieren. Als Hauptprodukt entstand Novclobiocin 124 (**100**). Das Enzym besitzt hohe Sequenzähnlichkeit (60%) zu den FADH₂-abhängigen Halogenasen PltA und Pyr29 aus der Pyoluteorin- und Pyrrolomycinbiosynthese.^{238,240} Für die N-Hydroxylierung zum Chpca-HrmL (**98**) konnte kein eindeutiger Kandidat identifiziert werden. Auch die Reihenfolge der Modifikationsschritte Chlorierung und Hydroxylierung ist unbekannt.

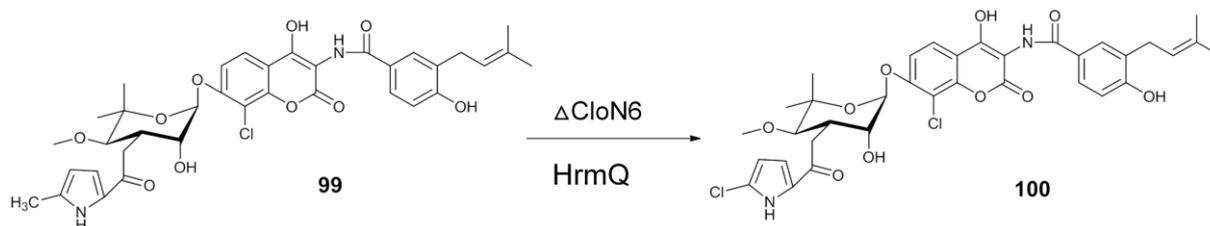


Abb. 5-23: Generierung eines neuen Clorobiocinanalogs **100** durch HrmQ aus einem Clorobiocin-(**99**)-Produzenten, dem die Methyltransferase CloN6 fehlt.²³⁹

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die ersten Enzyme der Chpca-Biosynthese, HrmK und HrmL rekonstituiert werden, die Substratspezifität der Adenylierungsenzyms HrmK getestet werden, und versucht werden, verschiedene Substrate auf HrmL zu übertragen. Außerdem sollte die N-Hydroxylierung untersucht werden: Der mögliche Kandidat HrmN sollte zusammen mit einer Promotorsequenz der Pyoluteorinbiosynthese heterolog in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 exprimiert werden. Die Pyrroleinheit im Pyoluteorin und dessen Biosynthese ähneln der von Chpca (**94**) im Hormaomycin (**13**). Daher ist eine Hydroxylierung des Pyoluteorins (**115**) durch eine Pyrrol-N-Hydroxylase des Hormaomycinclusters möglich.

5.3.1 heterologe Expression und Charakterisierung von HrmK

Das Gen für die Acyl-CoA-Synthetase *hrmK* wurde über spezifische Primer (siehe Tab. 6-10) mittels PCR amplifiziert und mit TA-Klonierung (siehe 6.4.9.1) in pBluescript SK+ eingefügt. Es entstand pMC3.

Nach erfolgter Sequenzierung wurde pMC3 mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und *hrmK* in den Expressionsvektor pHis8 kloniert (6.4.9.2). Das Konstrukt wurde pMC4 genannt. Um zu testen, ob HrmK für seine Aktivität ein MbtH-ähnliches Protein benötigt, wurde pMC4 zusammen mit pMC10, das *hrmR* im Coexpressionsvektor pCDF-DUET enthielt (siehe Kapitel 5.4.1), in *E. coli* BL21(DE3) cotransformiert und coexprimiert. Der Stamm wurde MC11 genannt. Die Aufreinigung des His₈-Fusionsproteins erfolgte mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 6.5.4). Abbildung 5-24 zeigt, dass HrmK in hoher Reinheit isoliert wurde. Aus dem Vergleich des Zelllysates und der Elutionsfraktion ist zu erkennen, dass HrmR (unterste Bande) exprimiert wurde, jedoch nicht coeluiert wurde. HrmK scheint also eine geringe Affinität zum MbtH-Homologen HrmR zu besitzen.

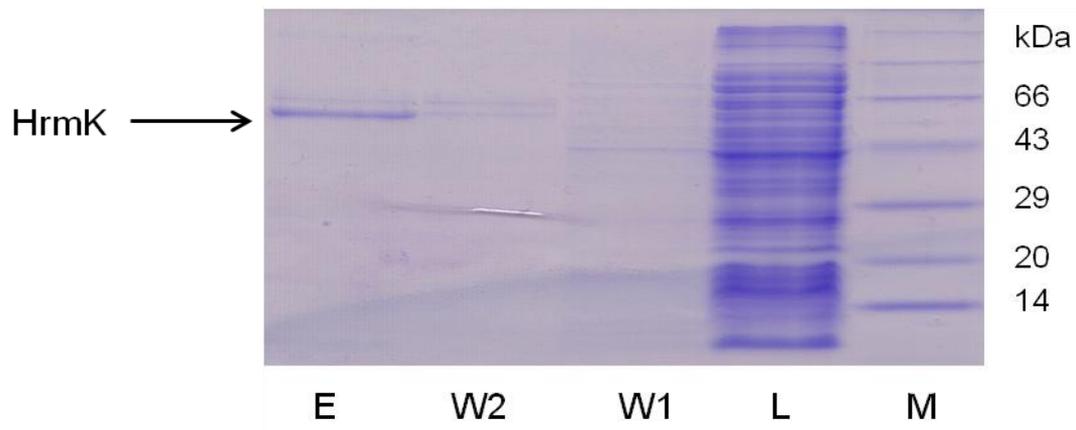


Abb. 5-24: SDS-PAGE-Gel (Tricin, 15%) von der Coexpression von HrmK/HrmR (500 mL TB; 16 °C; 1 mM IPTG; M=Proteinmarker; L=Lysat; W1/W2=Waschfraktionen mit Lysispuffer/Waschpuffer; E=Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol).

Um die erfolgreiche Expression von HrmK zu überprüfen, wurde das Enzym mit MALDI-TOF-MS (siehe Abschnitt 6.5.9) analysiert. Das Ergebnis der Messung zeigt Abbildung 5-25.

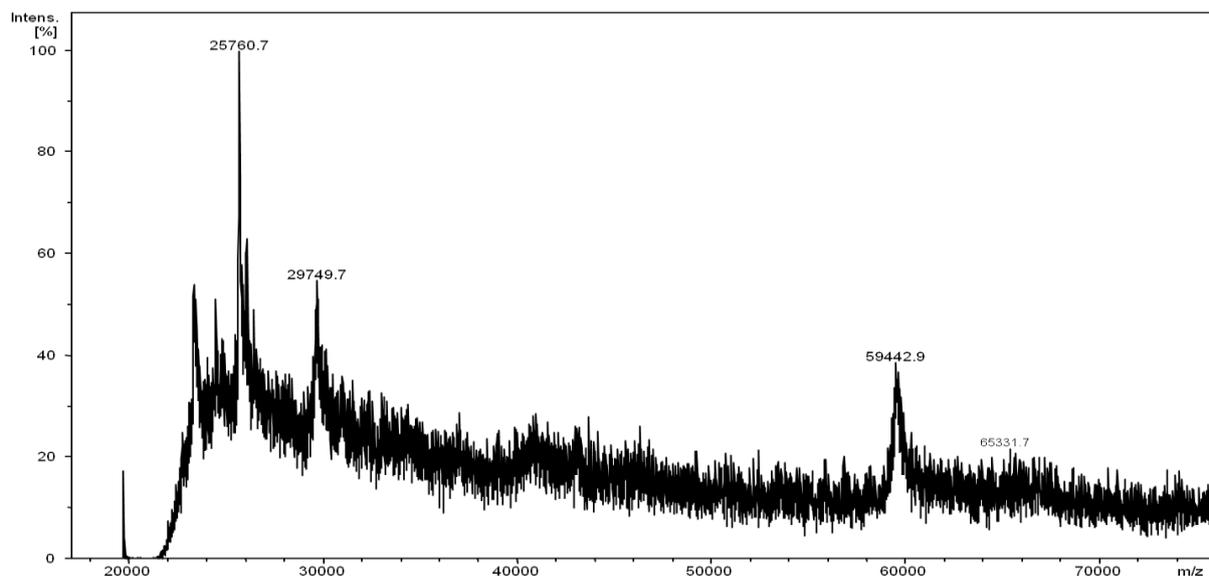


Abb. 5-25: MALDI-TOF-Messung von isoliertem His₈-HrmK.

Es wurde ein Ion bei 59443 Da gemessen, dessen Masse der berechneten von His₈-HrmK entspricht. Um nun die Substratspezifität von HrmK zu bestimmen, wurde eine 500 mL-Überexpressionskultur von MC11 in TB-Medium (siehe 6.2.1) kultiviert, mit 0,5 mM IPTG induziert, bei 16 °C überexprimiert (siehe 6.5.2) und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abschnitt 6.5.4). Die Proteinelutionsfraktion wurde über eine PD10-Säule entsalzt und mit Vivaspin 500 30K wieder aufkonzentriert (siehe 6.5.5). Das frische Protein wurde dann im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (siehe 6.6.1, vergleiche Abb. 5-52, Kapitel 5.4.3) mit verschiedenen Aminosäuren und Carbonsäuren getestet. Ein Großteil der Substrate bestand aus strukturellen Analoga des Prolins **101-110** (siehe Abb. 5-26).

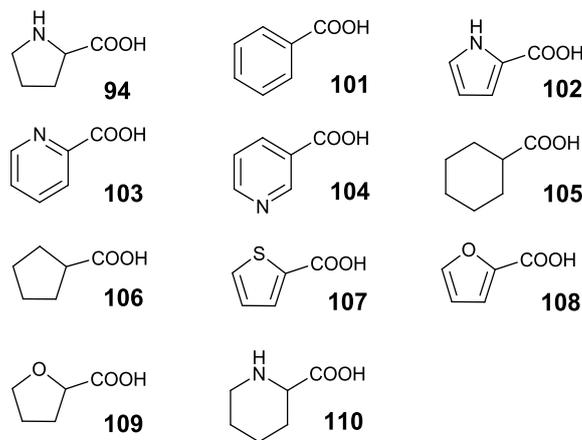


Abb. 5-26: getestete Substrate von HrmK: Prolin (**94**) und Analoga: Benzoesäure (**101**), Pyrrol-2-carbonsäure (**102**), Picolinsäure (**103**), Nikotinsäure (**104**), Cyclohexancarbonsäure (**105**), Cyclopentancarbonsäure (**106**), Thiophen-2-carbonsäure (**107**), Furan-2-carbonsäure (**108**), Tetrahydrofuran-2-carbonsäure (**109**), Pipecolinsäure (**110**).

Das Ergebnis der Messung (Abb. 5-27, 5-28) zeigt, dass Prolin (**94**) sehr selektiv vom Enzym präferiert wird. Die Umsetzung von **94** im Assay verlief nahezu quantitativ. Das ist an der Generierung eines neuen Ions bei $m/z=506$ aus dem Ion bei $m/z=514$ zu erkennen (vgl. Abb. 5-52, Abschnitte 5.4.4 und 6.6.1) Dieses Resultat konnte in einem wiederholten Experiment bestätigt werden. Die anderen getesteten Substrate wurden nur in Spuren aktiviert (<3%). HrmK scheint also, wie auch schon in Arbeiten von Radzom postuliert,²⁰⁰ eine sehr enge Substratspezifität zu besitzen. Diese Ergebnisse erschweren die Möglichkeit, durch Fütterungen von Prolinanaloga zum Produzenten Variationen der Startereinheit zu erzeugen. Außerdem kann in folgenden *in vitro*-Assays zur Chpca-Biosynthese mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht das Oxidationsprodukt von Prolin, die Pyrrol-2-carbonsäure (**102**), als Substrat von HrmK und HrmL eingesetzt werden. Für weitergehende *in vitro*-Untersuchungen, wie z.B. die *N*-Hydroxylierung (siehe Kapitel 5.3.4), müßte also HrmM ebenfalls heterolog exprimiert und isoliert werden und das Prolyl-PCP (**95**) anschließend oxidieren, bevor weitere Enzymreaktionen untersucht werden könnten (vgl. Abb. 5-22).

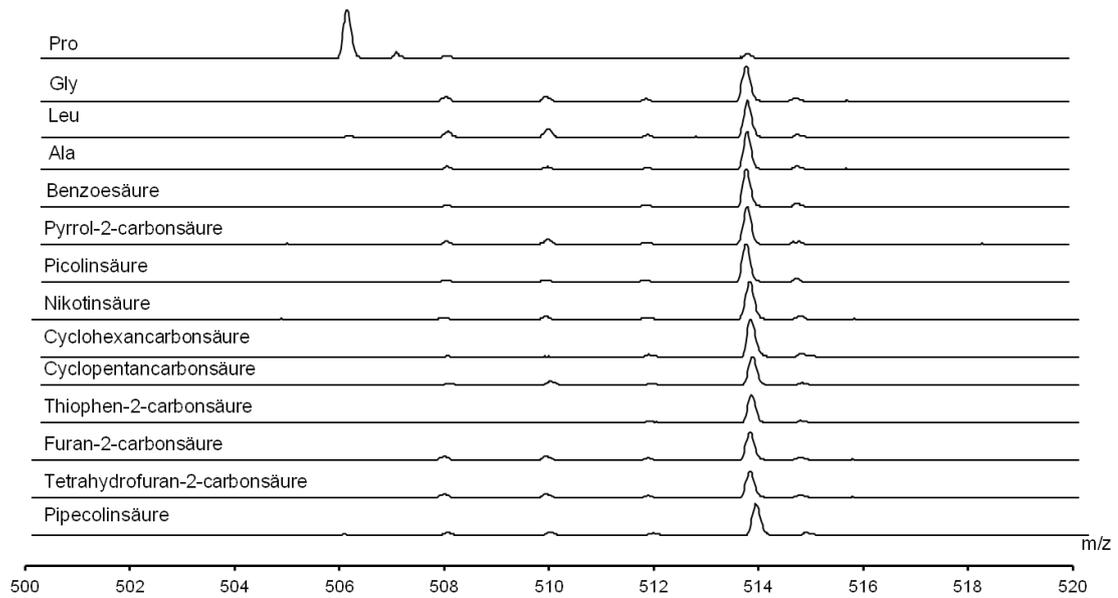


Abb. 5-27: Vergleich der Massenspuren der Umsetzung von HrmK mit verschiedenen Substraten im im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay (vgl. Tab. 9-1)

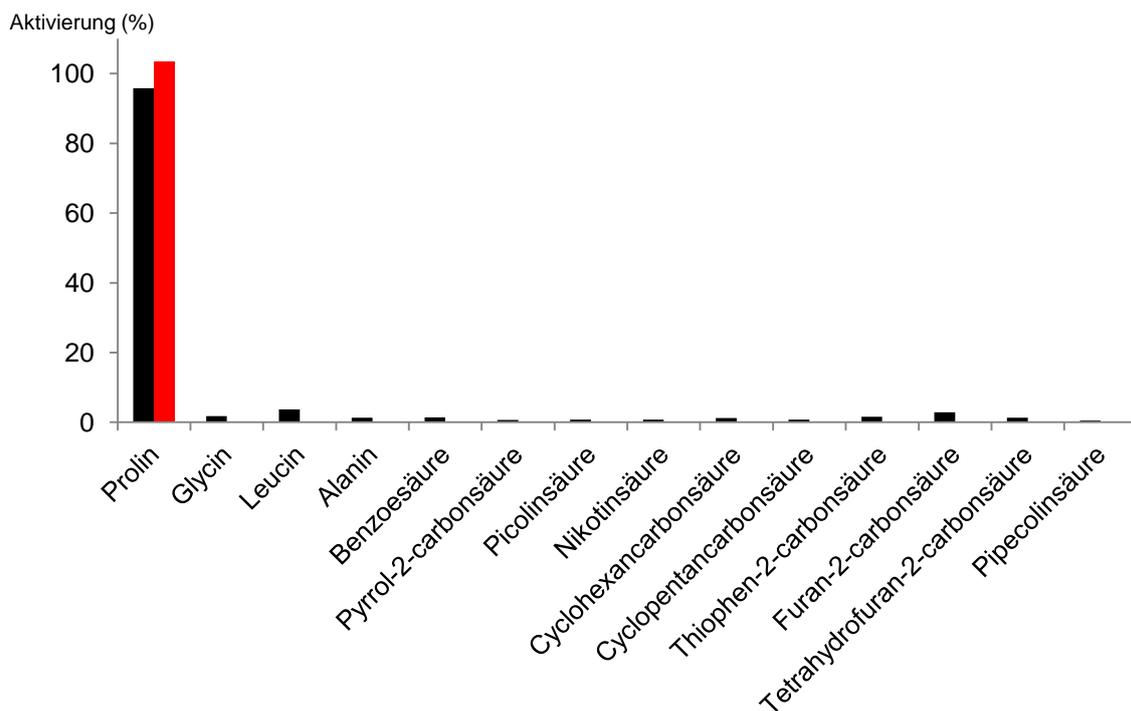


Abb. 5-28: Aktivierung verschiedener Substrate durch HrmK im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay (schwarz) und Wiederholung der Reaktion mit Prolin (rot). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert (vgl. Abb. 5-27, Tab. 9-1).

5.3.2 Heterologe Expression und Charakterisierung von HrmL

Nach bioinformatischen Voraussagen ist HrmL ein freistehendes PCP Typ II. PCPs akzeptieren aktivierte Aminosäuren von Acyl-CoA-Transferasen und A-Domänen über eine Thioesterbindung. Um eine aktivierte Aminosäure von einer A-Domäne aufnehmen zu können, muss ein Serinrest in Peptidyl-Carrierproteinen durch eine PPTase posttranslational mit einem 4'-Ppant aus Coenzym A

(19) modifiziert werden (siehe Abb. 5-29).¹¹² Somit wird eine terminale Sulfhydrylgruppe gebildet, die als Akzeptor für die übertragene Aminosäure dient (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.2).

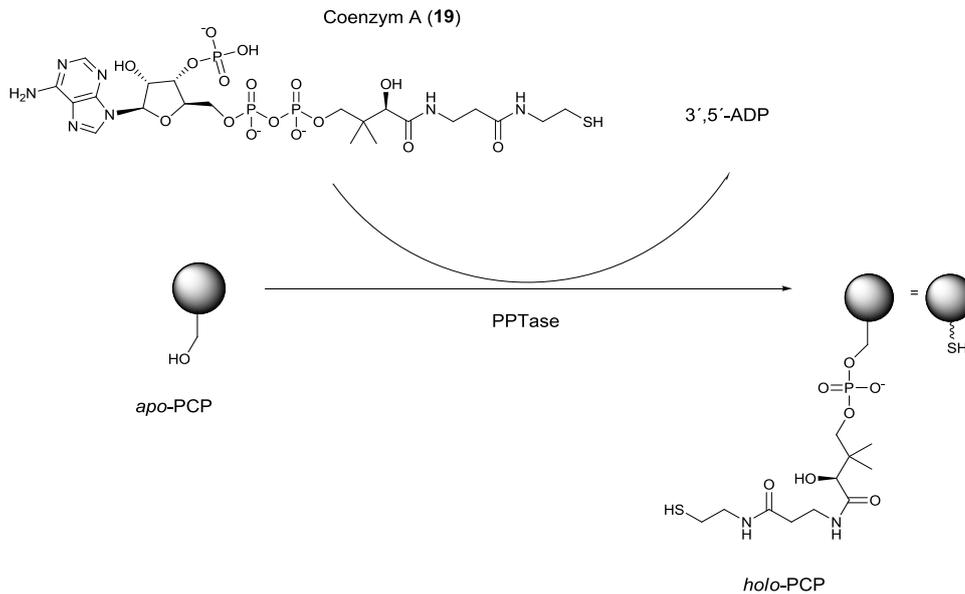


Abb. 5-29: Phosphopanthetheinylierung durch Phosphopanthetheinyltransferasen (PPTasen). Die PPTase überträgt eine 4'-Phosphopanthetheinylgruppe aus Coenzym A (19) auf ein Serin eines *apo*-Peptidylcarrierproteins (PCP). Es entsteht ein *holo*-PCP mit einer terminalen -SH-Gruppe.

hrmL wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III sowohl in den Expressionsvektor pHIS8 (pMC7) als auch in pHIS8-*svp* (pMC5) kloniert (siehe Kapitel 6.4.9.2). und in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert (siehe 6.5.2). In pHIS8-*svp* ist zusätzlich das Gen für die Phosphopanthetheinyltransferase Svp aus *Streptomyces verticillus*²⁴¹ durch die Schnittstelle *Not*I inseriert.²⁴² Zwar besitzt *E. coli* auch PPTasen, jedoch erhöht eine Phosphopanthetheinyltransferase aus einem verwandten Organismus die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Modifikation. Die Ergebnisse der Expressionen und Aufreinigungen sind in Abbildung 5-30 a) und b) zu sehen.

a)

b)

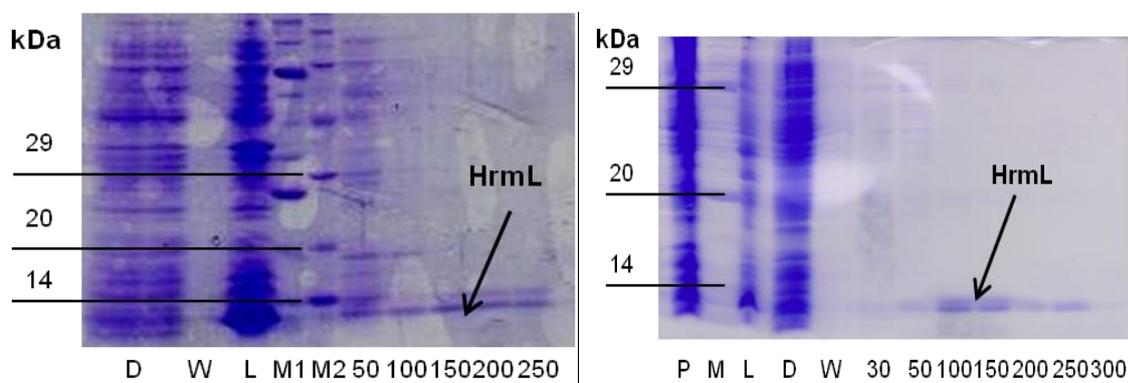


Abb. 5-30: Heterologe Expression und Aufreinigung von HrmL aus a) pHIS8 und b) pHIS8-*svp* (500 mL LB; 1 mM IPTG). P=Pellet; D=Durchfluß; L=Lysat; M=Marker; W=Washfraktion; 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300=Elutionsfraktionen mit x mM Imidazol.

Wenn eine posttranslationale Phosphopantetheinylierung stattfindet, erhöht sich die Masse des PCP um 339 Da. Dieser Betrag muß also zur Masse des Octahistidinyl-PCP addiert werden. Für das phosphopantetheinylierte His₈-HrmL ergibt sich somit insgesamt eine Proteinmasse von 12685 Da. Zur Massenbestimmung von Proteinen eignen sich mehrere massenspektrometrische Methoden. Die bevorzugte Methode ist ESI-FT-MS aufgrund der hohen Auflösung und Genauigkeit der Massen. Eine Alternative zur Detektion von Proteinen bietet die Ionisation per MALDI, die gewöhnlicherweise mit der „time of flight“-Detektion kombiniert wird. Für kleine Proteine war die Detektion von Phosphopantetheinylierungen bereits möglich.^{243,244} Auch wurde dieses Messprinzip in der Arbeitsgruppe Piel durch Holger Niederkrüger bei der Detektion der Phosphopantetheinylierung von Acylcarrierproteinen (ACPs) angewendet.²⁴⁵

Aus einer 500 mL-Kultur wurden die aufgereinigten Proteine aus pHIS8 und pHIS8_{svp} für eine MALDI-TOF-Messung (siehe 6.5.9) vorbereitet. Hierbei wurde vom Protokoll abgewichen und jeweils 20-30 min bei 6000 rpm zentrifugiert, da eine höhere Geschwindigkeit in diesem Schritt zu gemessenen Proteinmassen um 10 kDa führte (Daten nicht aufgeführt). Um eine Proteinfragmentierung zu vermeiden, wurde daher die Zentrifugationsgeschwindigkeit erniedrigt. Die MALDI-TOF-Ergebnisse in den Abbildungen 5-31 und 5-32 zeigen, dass sowohl HrmL aus pHIS8 als auch HrmL aus pHIS8_{svp} phosphopantetheinyliert vorliegen.

Tab. 5-5: Vergleich der gemessenen Massen für His₈-HrmL und His₈-HrmL+Svp mit der berechneten Masse für das 4'-phosphopantetheinylierte Protein.

Protein (+4'-Ppant)	Berechnete Masse	Gemessene Masse [<i>m/z</i>]	Abweichung
His ₈ -HrmL	12685 Da	12681	-4 Da
His ₈ -HrmL+Svp	12685 Da	12677	-8 Da

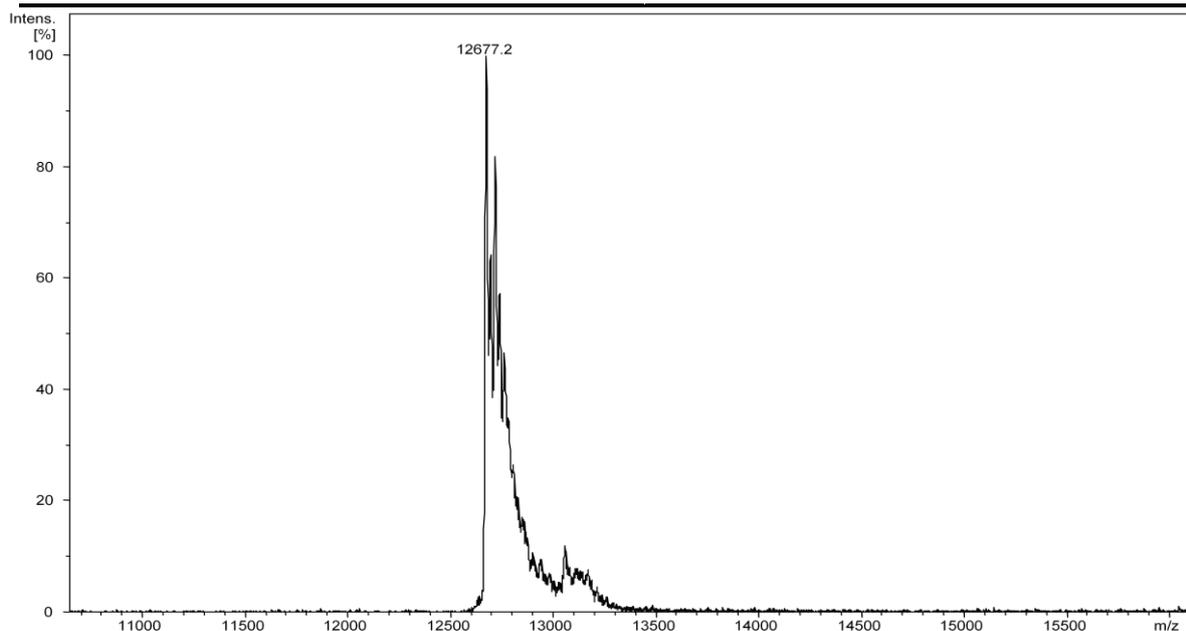


Abb. 5-31: MALDI-TOF-Messung von His₈-HrmL aus pHIS8_{svp}

Die geringen Abweichungen von 4 bzw. 8 Da (siehe Tab. 5-5) sind bei dieser Messmethode und der Größe des Moleküls zu vernachlässigen. HrmL wird also offenbar von 4'-Phosphopanthetheinyltransferasen aus *E. coli* BL21(DE3) modifiziert. Die Coexpression von Svp ist für ein aktives HrmL in diesem Stamm nicht notwendig. Insgesamt konnte HrmL stabil heterolog exprimiert und isoliert werden. Die Beladung mit einem Phosphopanthetheinylrest, und damit die Aktivierung für Beladungsreaktionen (siehe Kapitel 5.3.3) konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

5.3.3 Beladung von HrmL mit Prolin

Mit den exprimierten Enzymen HrmK (5.3.1) und dem 4'-phosphopanthetheinylierten HrmL (5.3.2) wurde nun versucht, die Generierung von Prolyl-HrmL (**95**) nachzuweisen. Solche Beladungsassays sind für mehrere Systeme, unter anderem Pyoluteorin (**115**) und Clorobiocin (**99**) erfolgreich durchgeführt worden.^{203,204}

Aus 500 mL-Expressionen von HrmK und HrmL wurden die Elutionsfraktionen mit PD10-Säulen in 50 mM Phosphatpuffer umgepuffert und aufkonzentriert (siehe 6.5.5). Der Beladungsassay wurde, wie in Abschnitt 6.6.4 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine entsalzt und mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe 6.5.9) analysiert (Abb. 5-32). Es ist zu erkennen, dass sowohl der Assay (obere Spur) als auch die Negativkontrolle ohne HrmK (untere Spur) ein Maximum bei $m/z=12681,0$ bzw. $12681,5$ besitzen, Diese Masse entspricht dem 4'-phosphopanthetheinylierten His₈-HrmL (12685 Da, vergleiche Tab. 5-5). Eine Masse von $m/z=12781$, die dem Prolyl-HrmL (**95**) entspricht, konnte nicht detektiert werden.

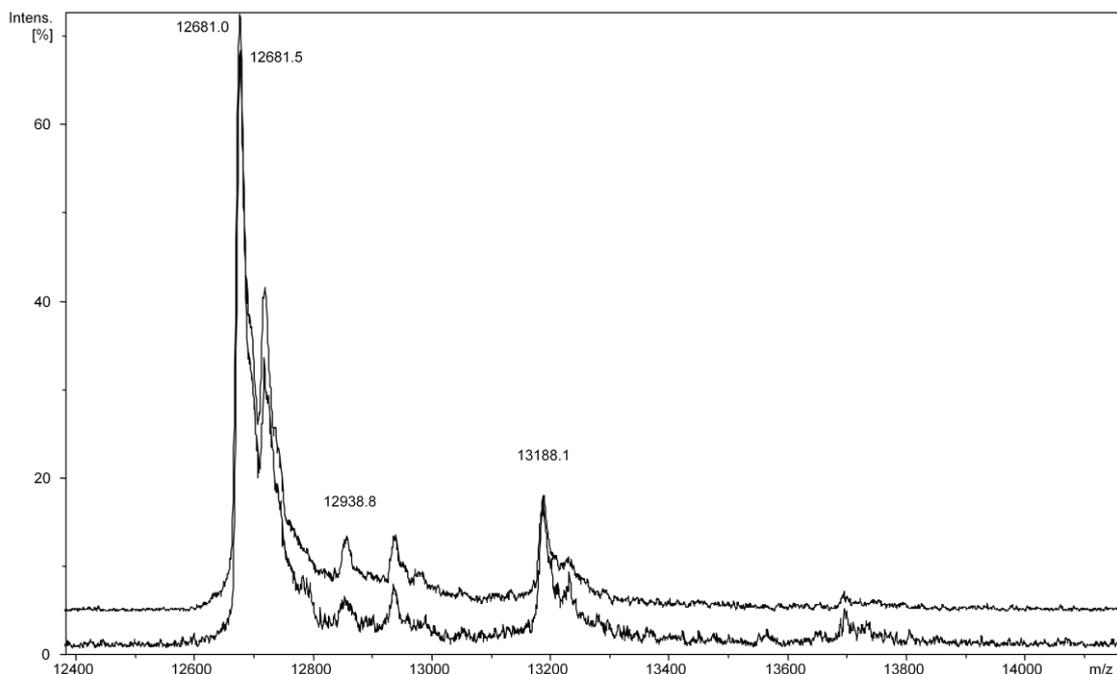


Abb. 5-32: MALDI-TOF-Ergebnisse des Beladungsassays von HrmL mit Prolin (**94**) (obere Spur). Untere Spur: Negativkontrolle ohne HrmK

Die Beladung von HrmL mit Prolin hat also in diesem Assay nicht funktioniert. Mögliche Gründe hierfür sind in nicht optimalem pH-Wert, Temperatur oder Reaktionszeit oder in einer zu geringen Konzentration von HrmK zu suchen. Auch ist es möglich, dass HrmK während der Aufarbeitung seine Aktivität verloren hatte. Frühere *in-vitro*-Studien an Enzymen der Anatoxinbiosynthese haben gezeigt, dass das dort erzeugte Prolyl-PCP recht instabil ist, und eine Halbwertszeit von etwa 2 h bei 28 °C hat.²³⁷ Die massenspektrometrischen Messungen sollten also direkt im Anschluß an den Assay erfolgen. Außerdem kann bei der Aufkonzentrierung und Entsalzung in den Vivaspin-Zentrifugatoren der instabile Komplex möglicherweise zerfallen.

5.3.4 *In vivo*-Experimente zur Untersuchung der Funktion von HrmN

N-hydroxylierte Pyrrole sind äußerst selten in der Natur anzufinden. Einige rare Beispiele sind das aus *Streptomyces libani* No. 6362 isolierte Anthrachinonpyronantibiotikum Chromoxymycin (**111**),²⁴⁶⁻²⁴⁸ die Sugapyrrole A (**112**) und B (**113**), aus *Streptomyces sp.* USF-6280²⁴⁹ und das Glycerinopyrin (**114**) aus *Streptomyces violaceus* (siehe Abb. 5-33).²⁵⁰ Über die Biosynthese der *N*-Hydroxygruppen ist nichts bekannt. Interessanterweise wird die Carboxypyrroleinheit nicht, wie zu erwarten wäre, aus Prolin (**94**) gebildet, sondern, wie Fütterungsstudien zeigten, aus Leucin.²⁵¹

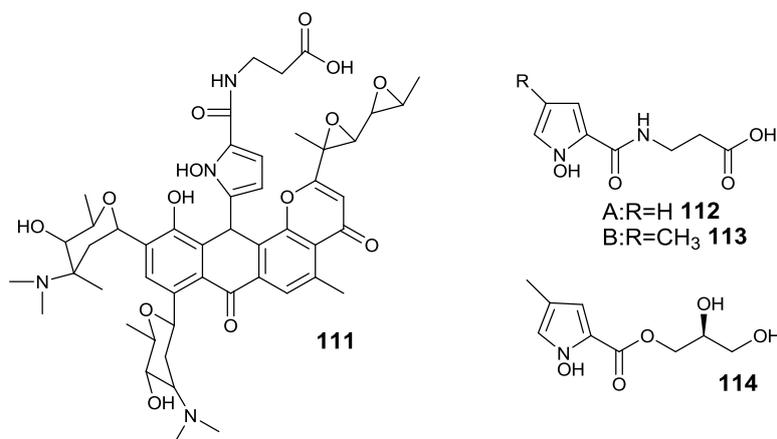


Abb. 5-33: Naturstoffe mit *N*-Hydroxypyrroleinheiten: Chromoxymycin (**111**), Sugapyrrol A (**112**) und B (**113**), Glycerinopyrin (**114**)

Für das Thiopeptid Nocathiacin I, das eine *N*-Hydroxyindolyleinheit besitzt, wurde 2010 der Biosynthesegencluster isoliert.²⁵² Es wurde postuliert, dass die *N*-Hydroxylierung hier durch ein P-450-abhängiges Enzym katalysiert wird. Da im Hormaomycingencluster ein solches Enzym nicht kodiert ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die *N*-Hydroxylierung auf anderem Wege stattfindet. Ein möglicher Kandidat hierfür ist HrmN. Bioinformatische Analysen für HrmN sagen eine Acyl-CoA-Dehydrogenase Typ 2 voraus, die allerdings eine geringe Verwandtschaft zu den meisten charakterisierten Acyl-CoA-Dehydrogenasen Typ 2 besitzt. Ein etwas entfernterer Verwandter (50% Sequenzähnlichkeit) ist eine Alkylresorcinolhydroxylase aus *Actinoplanes missouriensis*. Es scheint also möglich, dass HrmN diese *N*-Hydroxylierung, eine für diese Enzymfamilie bisher nicht

charakterisierte Reaktion, katalysiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde *hrmN* zusammen mit einer Promotorsequenz der Pyoluteorinbiosynthese exprimiert. Pyoluteorin (**115**) (Abb. 5-34) ist eine antifungal wirkende Substanz, die von einigen *Pseudomonas*-Arten produziert wird. Es besitzt unter anderem eine Dichlorpyrroleinheit, die der Chpca (**93**) im Hormaomycin (**13**) ähnelt.

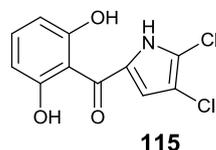


Abb. 5-34: Pyoluteorin (**115**)

Die Biosynthese von **115** ist gut untersucht; 1999 wurde sein Biosynthesegencluster aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 isoliert.²⁵³ Eine Vorstufe ist Prolin (**94**), das von der Acyl-CoA-Synthetase PltF aktiviert und an PltL, ein PCP gebunden wird.²⁰³ Am Prolyl-PltL (**116**) wird nun die weitere Biosynthese katalysiert. PltE, eine Acyl-CoA-Dehydrogenase dehydriert **116** zu Pyrrolyl-PltL (**117**)²⁰³ und die FADH₂-abhängige Halogenase PltA führt beide Chlorierungen durch.²³⁸ Die Biosynthese von **117** im Hormaomycin ist aufgrund der bioinformatischen Zuordnung analog zur Pyoluteorin-Biosynthese, nur katalysiert HrmQ im Gegensatz zu PltA nur eine Chlorierung.²³⁹ Abbildung 5-35 verdeutlicht diese Analogien.

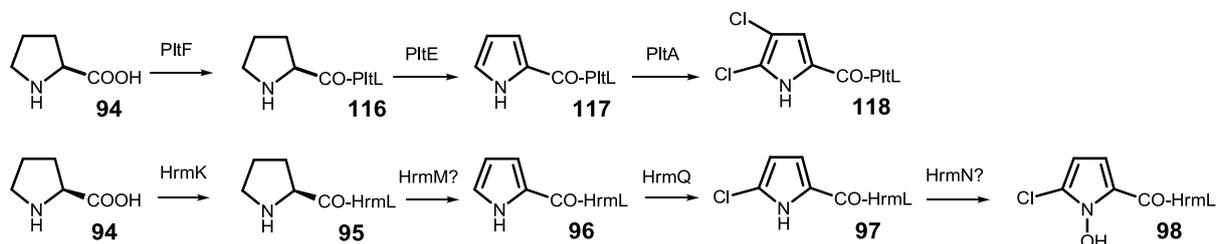


Abb. 5-35: Analogien in der Hormaomycin- und Pyoluteorinbiosynthese. Prolin (**94**) wird von PltF bzw. HrmK aktiviert und an PltL bzw. HrmL kovalent gebunden (**116** bzw. **95**). Nach Oxidation zum Pyrrolyl-PltE (**117**) bzw. Pyrrolyl-HrmL (**96**) durch PltE bzw. HrmM (putativ) werden durch PltA zwei bzw. durch HrmQ ein Chlor an das Pyrrol addiert (**118** bzw. **97**). HrmN katalysiert dann putativ die N-Hydroxylierung von **97** zu **98**.

hrmN sollte nun heterolog im Pyoluteorinproduzenten *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 exprimiert werden. Besitzt HrmN eine Hydroxylasefunktion, so könnte ein hydroxyliertes N-Hydroxydichloropyrrolyl-PltL (**119**), und damit ein hydroxyliertes Pyoluteorin generiert werden, wie in Abbildung 5-36 dargestellt.

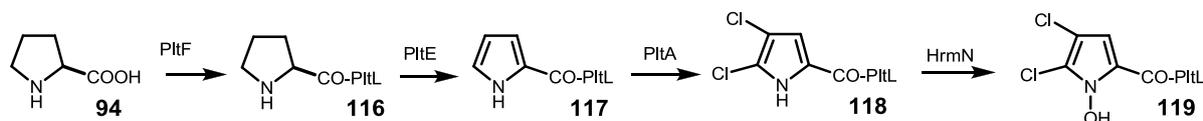


Abb. 5-36: Kombinatorische Biosynthese in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Nach der Biosynthese von Dichloropyrrolyl-PltA (**118**) (siehe Abb. 5-35) kommt es hypothetisch durch N-Hydroxylierung durch HrmN und zur Bildung von **119**.

Um eine zeitgleiche Transkription von *hrmN* mit den Biosynthesegenen des Pyoluteorins (**115**) zu gewährleisten, sollte eine Promotorsequenz aus dem Biosynthesegencluster des Pyoluteorins (**115**) vor *hrmN* kloniert werden. Es handelt sich hierbei um eine inverse Wiederholungssequenz TGTAAN₇-TTACA, die eine Variante eines sogenannten Ebright-Box-Motiv darstellt (TNTNA-N₇-TNANA).²⁵³ Diese Promotersequenz ist 45 Basenpaare stromaufwärts vom positiven Regulatorgen *pltR*²⁵⁴ entfernt, das für einen transkriptionellen Aktivator der Familie der LysR-artigen Proteine kodiert.²⁵⁵

Aus der genomischen DNA von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (siehe 6.4.2.2) wurde mittels spezifischer Primer (Promotor F/R) (Tab. 6-13) eine 462 bp große Region amplifiziert, die die Promotorsequenz in 3'-5'-Richtung enthielt. Dieses Fragment wurde mittels TA-Klonierung (siehe Abschnitt 6.4.9.1) in pBluescript SK(+) eingefügt und ergab pMC12. *hrmN* wurde ebenso mit PCR amplifiziert und mittels TA-Klonierung in pGEM-Teasy eingefügt und ergab pMC9. Beide Fragmente sollten nun in den Expressionsvektor pME6041,²⁵⁶ der eine Kanamycinresistenzkassette besitzt, eingefügt werden. Wichtig für die Wahl des Expressionsplasmids war, dass es keinen konstitutiven Promotor enthält und für die heterologe Expression in Pseudomonaden geeignet ist. Das Expressionskonstrukt sollte den Promotor und *hrmN* in einer bestimmten Anordnung enthalten, da die Pyoluteorinpromotorsequenz im Gencluster in 3'-5'-Richtung kodiert ist, *hrmN* aber in 5'-3'-Richtung. Die Plasmide pMC9 und pMC12 wurden sequenziert, um zu detektieren, in welcher Richtung das Insert eingebaut wurde, da sich dies beim T/A-Klonieren nicht voraussagen lässt. Die Promotersequenz wurde aus pMC12 mit *EcoRI* und *SalI* ausgeschnitten, *hrmN* aus pMC9 mit *SalI* und *SphI*. Beide Fragmente wurden gleichzeitig mit dem Expressionsplasmid pME6041 ligiert, das mit *EcoRI* und *SphI* linearisiert und dephosphoryliert war. Die Klonierung ergab pMC15 (siehe Abb. 5-37). pMC15 wurde mittels Elektroporation in elektrokompente *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 transformiert (siehe 6.3.4). Bei der Analyse der Transformation stellte sich heraus, dass *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 eine natürliche Resistenz gegen Kanamycin besitzt. Vertreter der Art *Pseudomonas fluorescens* können einen Biofilm bilden können, der eine natürliche Antibiotikaresistenz hervorruft.²⁵⁷ Trotz Selektion auf Kanamycin mußte daher die erfolgreiche Transformation des Plasmids mit Kolonie-PCR (siehe 6.4.1.1) überprüft werden. Anschließend wurde *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 mit pMC15 (genannt MC15) bei 30 °C in KB-Medium (siehe 6.2.1) kultiviert. Als Negativkontrolle wurde *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 mit dem leeren pME6041 verwendet. Das Kulturvolumen betrug 50 mL. Nach vier verschiedenen Zeitpunkten (43 h, 51 h, 66 h und 76 h) wurden die Kulturen nach Sarniguet et al.²⁵⁸ (siehe 6.7.2) aufgearbeitet. Die erhaltenen Extrakte wurden mit HPLC (siehe 6.7.3) und HPLC-MS (siehe 6.7.4) analysiert.

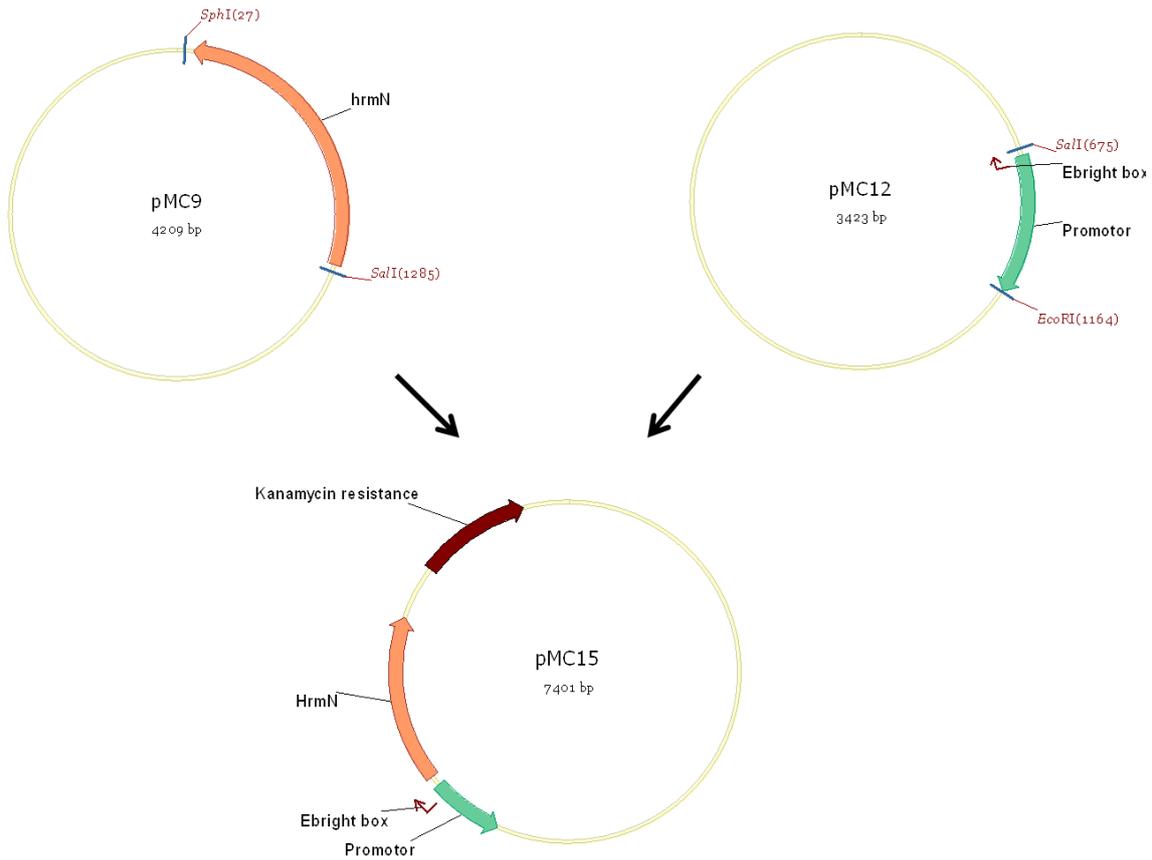


Abb. 5-37: Klonierungsschema für pMC15. Aus pMC9 wurde *hrmN* mit *SalI* und *SphI* ausgeschnitten, so wie der Pyoluteorinpromotor aus pMC12 mit *EcoRI* und *SalI*. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden dann in pME6041, der mit *EcoRI* und *SphI* geschnitten war, ligiert und ergaben pMC15.

Die Ergebnisse zeigen, dass nach 66 Stunden die Produktion von Pyoluteorin begonnen hat (siehe Abb. 5-48). In der HPLC-MS ist im Hauptpeak das charakteristische Massenspektrum von Pyoluteorin $[M+H]^+$ zu sehen (Abb. 5-39 a, b). Ein hydroxyliertes Pyoluteorin (m/z : Pyoluteorin+16) konnte in diesen Experimenten nicht detektiert werden.

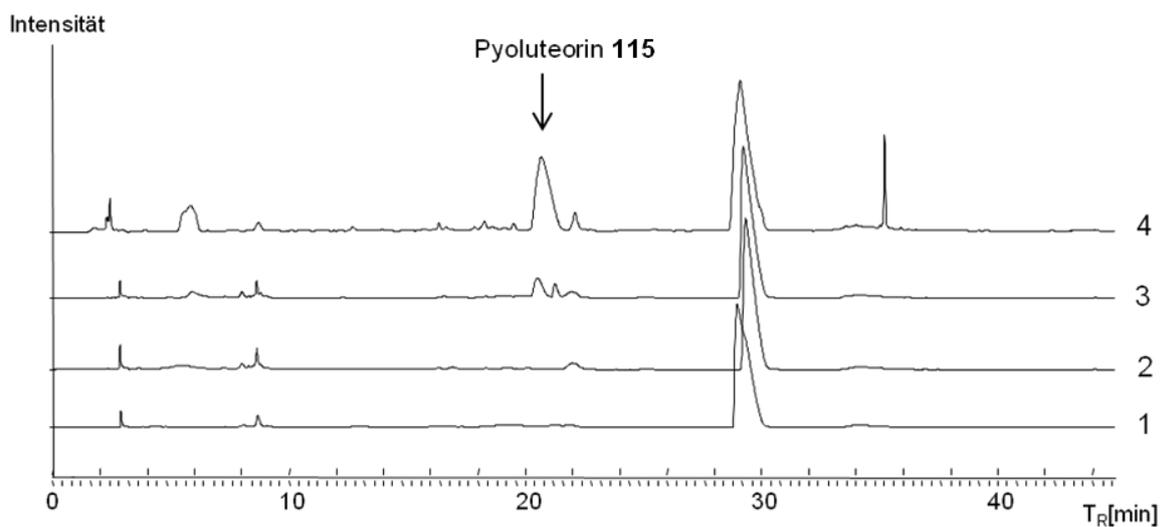
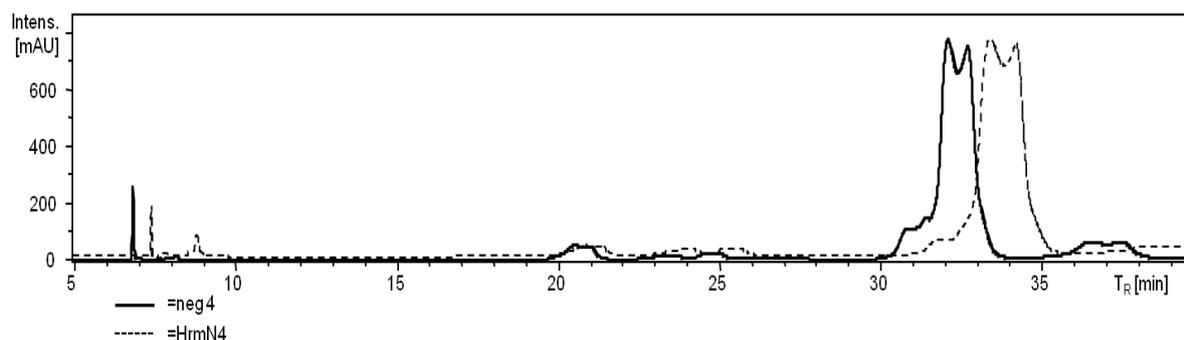


Abb. 5-38: Vergleich der HPLC-Spuren (308 nm) der Extrakte von pMC15 nach 43 h (1), 51 h (2), 66 h (3), 76 h (4). Die Produktion von Pyoluteorin (115) ($T_R = 21$ min) beginnt nach 66 h.

a)



b)

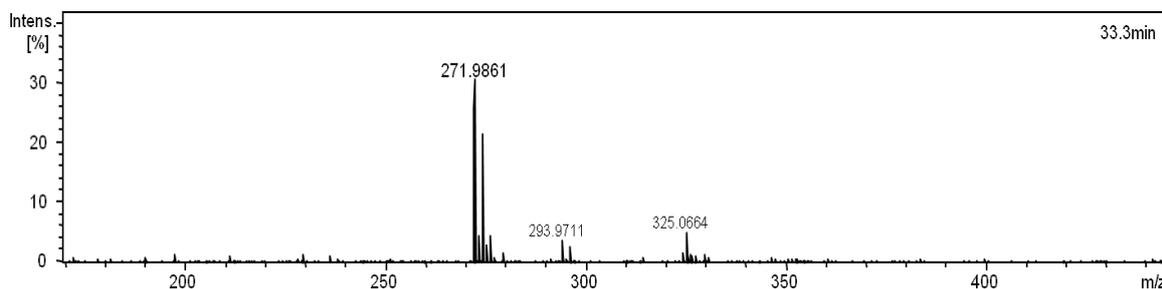


Abb. 5-39: a): Vergleich der UV-Spuren eines HPLC-MS-Experiments einer Expression von pMC15 in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 nach 76 h (gestrichelte Linie) mit pME6041 in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (durchgezogene Linie). b): Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Peaks bei 33,3 min [Pyoluteorin (**115**)].

Eine mögliche Erklärung für das Scheitern der Experimente könnte in der fehlenden Expression von HrmN in pMC15 liegen. Die korrekte Transkription von *hrmN* könnte mit reverser Transkriptions-PCR (RT-PCR) nachgewiesen werden, ebenso wie die notwendige Synchronisation der Transkription von *hrmN* und Pyoluteorinbiosynthesegenen. Außerdem kann das exprimierte HrmN eventuell das Dichloropyrrolyl-PCP (**118**) nicht hydroxylieren, da das zusätzliche Chloratom am Substrat das aktive Zentrum behindert. Es ist auch denkbar, dass ein ganz anderes Enzym aus dem Hormaomycin-Gencluster oder aus dem Genom von *Streptomyces griseoflavus* W-384 die *N*-Hydroxylierung katalysiert. Eine andere Möglichkeit, die Funktion von HrmN nachzuweisen, wäre die Erzeugung einer *hrmN*-Deletionsmutante in *Streptomyces griseoflavus* W-384. Wenn HrmN eine *N*-Hydroxylase ist, würde möglicherweise nicht mehr Hormaomycin (**13**), sondern nur ein Dehydroxyhormaomycin gebildet werden.

5.4 *in vitro*-Studien an der Hormaomycin-NRPS

Die nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) katalysiert die Kondensation von Aminosäuren zu Peptiden. Wie oben erwähnt, sind die Adenylierungsdomänen (A-Domänen) hauptsächlich verantwortlich für die Erkennung und den Einbau des richtigen Substrats (siehe Abschnitt 3.2.1). Im Rahmen dieser Studie sollten nun alle A-Domänen des Hormaomycins heterolog exprimiert und auf

ihre Substratspezifität getestet werden. Die Messung dieser Spezifitäten sollte in dieser Studie mit einem nicht-radioaktiven Assay¹⁰⁹ (siehe Abb. 5-52 und Abschnitt 6.6.1) mit Hilfe von $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{-ATP}$ (**120**) untersucht werden. Mit diesen Messungen kann die Genauigkeit bioinformatischer Voraussagen über die Substratpromiskuität überprüft werden. Darüber hinaus können die Ergebnisse Aufschluss über weitere mögliche Substrate geben, die von der NRPS akzeptiert und anstelle der nativen Substrate in Hormaomycin eingebaut werden können. Es ist auch möglich, dass die A-Domänen nicht die fertigen Peptidbausteine einbauen, sondern deren biogenetische Vorstufen. In diesem Fall würden diese dann an das PCP gebunden und dort durch weitere Biosynthesenzyme zu den finalen Peptidbausteinen prozessiert. Das ist zum Beispiel bei der β -Hydroxylierung von Tyrosyl-NovH der Fall.²⁵⁹

Die heterologe Expression der A-Domänen und Versuche zur Stabilität der Proteine sind in Abschnitt 5.4.1 gezeigt. Außerdem wird die Coexpression der A-Domänen mit dem MbtH-artigen Protein HrmR beschrieben. Weiterhin sollten auf Basis von Sequenzvergleichen der A-Domänen rekombinante A-Domänen konstruiert, exprimiert und charakterisiert werden. Dies ist in den Kapiteln 5.4.2 und 5.4.3 dargestellt. Die finale Aufreinigung mit FPLC und die massenspektrometrische Charakterisierung aller exprimierten A-Domänen ist in Abschnitt 5.4.4 dargestellt.

5.4.1 Heterologe Expression der Hormaomycin-A-Domänen und Coexpression mit HrmR

Die Hormaomycin-NRPS besteht aus 2 open reading frames (ORFs) *hrmO* und *hrmP*, die sich aus sieben Modulen zusammensetzen (*hrmO1-hrmO4*, *hrmP1-hrmP3*) (vgl. Abb. 3-22). Zunächst wurde ein Sequenzvergleich (Alignment) mit anderen funktionellen Adenylierungsdomänen durchgeführt, um Anfang und Ende der Domäne bestimmen zu können (siehe Abb. 9-9). Die codierenden Sequenzen aller sieben A-Domänen der einzelnen Module wurden in Vorarbeiten von Denise Hissa und Katrin Zimmermann mit PCR (siehe 6.4.1) amplifiziert und über TA-Klonierung (6.4.9.1) in pBluescript SK(+) (*hrmO1_A-O4_A*) bzw. pGEM-T easy (*hrmP1_A-P3_A*) eingefügt. Die Konstrukte wurden als pDC1-pDC7 bezeichnet (siehe Tab. 6-18).

Die A-Domänen wurden über die Restriktionsschnittstellen *EcoR1* und *HindIII* in den Expressionsvektor pHIS8 kloniert. Bei der A-Domäne von *hrmP2* befand sich eine Schnittstelle für *EcoR1* im Genabschnitt. Deswegen wurde für das Insert stattdessen *MfeI* als Restriktionsenzym ausgewählt. Es entstanden pMC17-pMC23 (siehe Tab. 6-19). Die Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert (siehe 6.5.2) und über den N-terminalen Octahistidinytag mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe Abschnitt 6.5.4). Alle A-Domänen konnten in Testexpressionen als lösliche Proteine isoliert werden. Beispielhaft ist in Abb. 5-40 ein SDS-PAGE-Gelbild der heterologen Expression und Aufreinigung von HrmP1_A gezeigt.

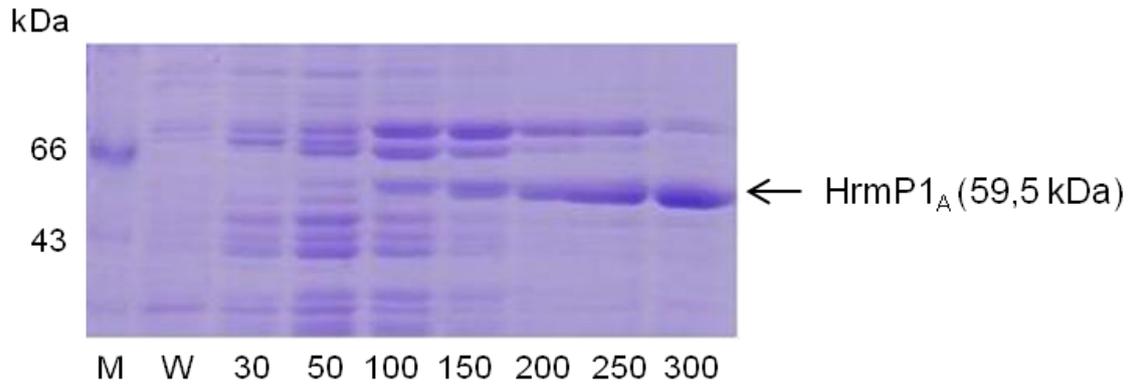


Abb. 5-40: SDS-PAGE-Gel (12%) einer Expression von HrmP1_A in 1 L LB (16 °C, 1 mM IPTG). M=Marker; W=Waschfraktion in Lysispuffer; 30-300: Elutionfraktionen in x mM Imidazol

Um sicherzustellen, dass die isolierten Proteine auch tatsächlich die His₈-A-Domänen sind, wurde die HrmO3_A massenspektrometrisch mit MALDI-TOF-MS untersucht (siehe 6.5.9). Abbildung 5-41 zeigt das Ergebnis (59190 Da). Die theoretische Masse von His₈-O3_A beträgt 59323 Da. Eine Abweichung von 162 Da (0,3%) ist bei diesem Messverfahren und bei dieser Molekülgröße als vernachlässigbar anzusehen. Es ist also davon auszugehen, dass das richtige Protein exprimiert und isoliert wurde. Eine Übersicht über die exprimierten His₈-Adenylierungsdomänen gibt Tabelle 5-6.

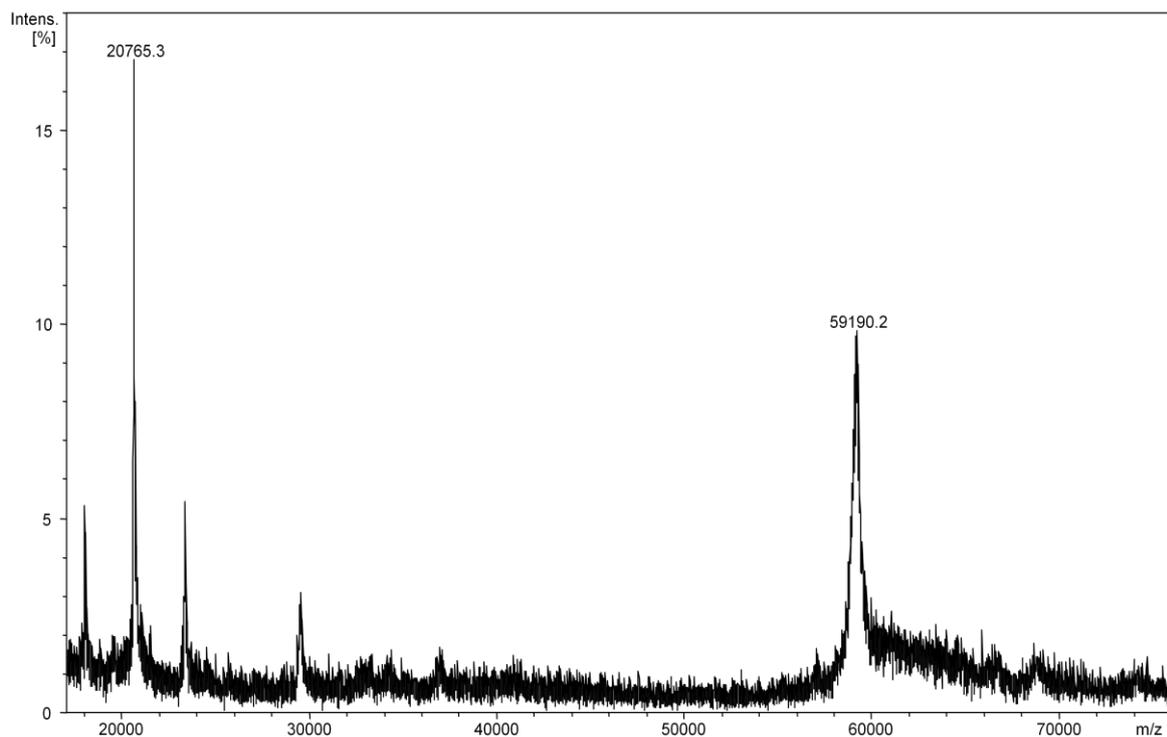


Abb. 5-41: MALDI-TOF-Analyse von His₈-HrmO3_A

Tab. 5-6: Übersicht über die in pHIS₈ exprimierten Hormaomycin-A-Domänen

A-Domäne	Länge der Aminosäuresequenz [AS]	Größe des His ₈ -Proteins
HrmO1 _A	540	59231 Da
HrmO2 _A	559	62401 Da
HrmO3 _A	542	59323 Da
HrmO4 _A	540	59700 Da
HrmP1 _A	542	59445 Da
HrmP2 _A	546	61264 Da
HrmP3 _A	565	62813 Da

Um einen geeigneten Puffer für die Lagerung und den Aktivitätsassay zu finden, wurde ein Puffer-Stabilitätstest durchgeführt. Dazu wurde die Elutionsfraktion einer 1 L-Expression von HrmO3_A in sechs gleiche Volumenanteile geteilt und über PD-10-Säulen (siehe 6.5.5) in unterschiedliche Puffer überführt. Die Proteine wurden über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und am nächsten Tag wurde 10 min bei 15000 g zentrifugiert, um das präzipitierte Protein abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und TCA-präzipitiert (siehe 6.5.6). Das Präzipitat wurde mit SDS-PAGE (siehe 6.5.7) analysiert. In Abbildung 5-42 ist zu erkennen, dass die Bande des Zielproteins (ca. 60 kDa) in 100 mM Phosphat-Puffer pH 8 (Puffer 6) am stärksten ist. Die Ergebnisse des Bradfordtests (6.5.8.1) stimmen damit überein (vgl. Tabelle 5-7). Auch hier ist die Proteinkonzentration in Puffer 6 am höchsten. Das Protein zeigte also in Puffer 6 die größte Stabilität. Die A-Domänen wurden für alle folgenden Assays und Lagerungen in diesen Puffer überführt. Zusätzlich wurden dem Puffer noch 100 mM NaCl hinzugefügt. Dies steigert die Stabilität des Proteins in Lösung.²⁶⁰

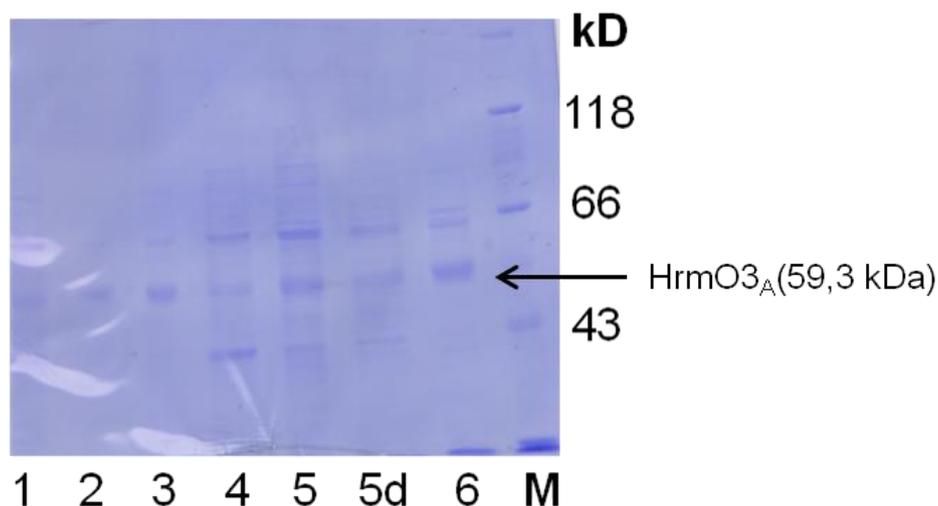


Abb. 5-42: SDS-PAGE-Gel (12%) einer Expression von HrmO3_A in 1 L LB, (16 °C, 1 mM IPTG) Elutionsfraktion in 6 verschiedenen Puffern nach dem Stabilitätstest (1: 100 mM Tris pH 7; 2: 100 mM Tris pH 7,5; 3: 100 mM Tris pH 8; 4: 100 mM Phosphat pH 7; 5, 5d: 100 mM Phosphat pH 7,5; 6: 100 mM Phosphat pH 8; M:Marker).

Tab. 5-7: Proteinkonzentrationen von HrmO_{3A} (1 L) in 6 verschiedenen Puffern nach dem Stabilitätstest

Puffer	Proteinkonzentration
1: 100 mM Tris pH 7	282 µg/mL
2: 100 mM Tris pH 7,5	91 µg/mL
3: 100 mM Tris pH 8	243 µg/mL
4: 100 mM Phosphat pH 7	215 µg/mL
5: 100 mM Phosphat pH 7,5	446 µg/mL
6: 100 mM Phosphat pH 8	353 µg/mL

Für die präparative Expression der A-Domänen wurden standardmäßig Kulturen in 500 mL TB-Medium (6.2.1) angesetzt und die Proteinexpression mit 0.5 mM IPTG induziert. Dieses Medium lieferte eine höhere Ausbeute an löslichem Zielprotein (Daten nicht aufgeführt). Das geringere Kulturvolumen reduzierte die Anzahl der coeluierten Hintergrundproteine aus *E. coli*. Die Proteinexpression fand dann bei 16 °C über Nacht statt. Nach Aufreinigung der Expression über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 6.5.4) wurde die Elutionsfraktion mit dem höchsten Proteingehalt über PD10-Säulen in den Assaypuffer eluiert und mit Vivaspin-Zentrifugatoren (30K MWCO) (siehe 6.5.5) konzentriert. Das Volumen der Waschschrte mit Lysepuffer und Waschpuffer (siehe 6.2.2) wurde auf 20 mL erhöht. Dies reduzierte die Konzentration an unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Kontaminationsproteinen (vergleiche die Abbildungen 5-43 a und b). Das konzentrierte, entsalzte Protein wurde mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt, um die Ausbildung unerwünschter Disulfidbrücken und Dimerisierung zu verhindern.

Seit kurzem ist bekannt, dass Coexpressionen von MbtH-artigen Proteinen mit Teilen von NRPS (A-T, C-A-T) letztere Enzyme *in vitro* aktivieren können.^{152,153} Diese kleinen Proteine befinden sich in vielen Genclustern von nichtribosomalen Peptiden. Eine ausführliche Darstellung hierzu befindet sich in Kapitel 3.2.4. Auch im Hormaomycingencluster ist ein solches MbtH-artiges Protein, HrmR, kodiert. Es umfasst 72 Aminosäuren und ist nur durch einen ORF, HrmQ, von der NRPS getrennt. Das Gen *hrmR* wurde mit spezifischen Primern (siehe Tab. 6-10) mit PCR amplifiziert. Über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* wurde das gereinigte PCR-Produkt dann in den Coexpressionvektor pCDF-DUET kloniert und ergab pMC10. pMC10 wurde dann mit allen Hormaomycin-A-Domänen (und HrmK; siehe Kapitel 5.3.1) in *E. coli* BL21(DE3) cotransformiert. Über die doppelte Selektion mit Kanamycin (pMC17-pMC23) und Streptomycin (pMC10) wurden Stämme erhalten (MC26-MC32, siehe Tab. 6-20), die A-Domäne und HrmR enthielten. Diese Coexpression fand auch hier bei 16 °C und mit einer Induktion durch 0,5 mM IPTG statt. Anschließend wurden die Proteine ebenso über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 6.5.4) aufgereinigt. In publizierten Coexpressionsstudien von A-Domänen und anderen MbtH-artigen Proteinen^{152,153} wurde das MbtH-artige Protein mit der A-Domäne coeluiert, was auf eine Interaktion mit der A-Domäne hindeutet. Für die A-Domänen dieser Komplexe konnte *in vitro* Aktivität nachgewiesen werden. In Abbildung 5-43 a) und b) sind zwei Beispiele einer heterologen Coexpression dargestellt. 5-43 a) zeigt die Coexpression von

MC30 (HrmO2_A und HrmR). Es sind in der Elutionsfraktion Hintergrundbanden zu erkennen, die Fraktion ist nicht rein. 5-43 b) zeigt die Coexpression von MC28 (HrmP3_A und HrmR). Auch hier ist HrmR in der Elutionsfraktion zu sehen. Hier wurden die Zielproteine in größerer Reinheit erhalten.

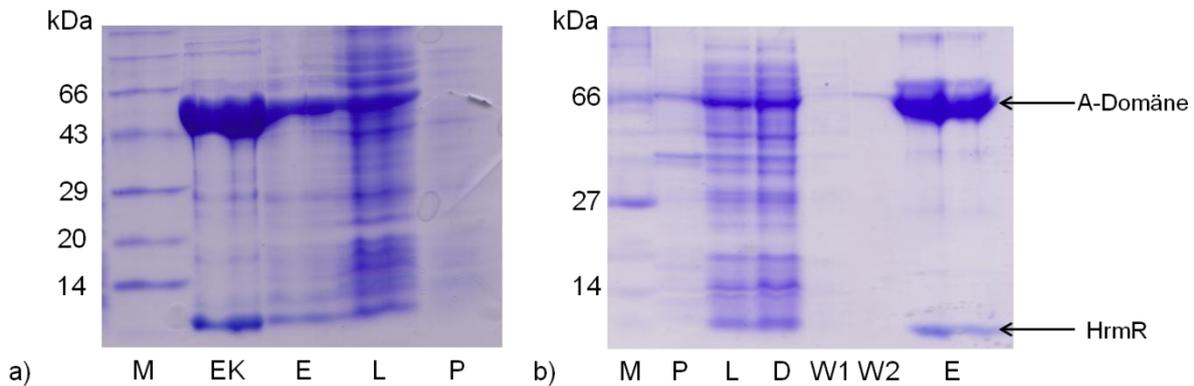


Abb. 5-43: SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin) einer Coexpression und Aufreinigung von a) HrmO2_A/HrmR b) HrmP3_A/HrmR in *E. coli* BL21(DE3) (jeweils 500 mL TB, 0,5 mM IPTG, 16 °C). M=Marker; P=Pellet; L=Lysat; D=Durchfluß; W1/W2=Waschfraktionen mit 10 mM bzw. 40 mM Imidazol; E=Elution mit 250 mM Imidazol; EK=Konzentration der Elution mit Vivaspin 30K MWCO.

Die massenspektrometrische Charakterisierung und weitere Aufreinigung der exprimierten A-Domänen mit HrmR wird in Abschnitt 5.4.4 beschrieben.

5.4.2 Konstruktion, Expression und Charakterisierung fusionierter A-Domänen

Während der Evolution ist es in vielen Fällen zur horizontalem Transfer und Rekombination von DNA-Abschnitten gekommen. Diese Ereignisse haben im Bereich der Biosynthese von Sekundärmetaboliten zu neuen Genclustern geführt. Einige Austausche lassen sich beim direkten Vergleich von Genclustern für Metaboliten mit ähnlichen Strukturen beobachten.^{105,107,174,175} Einige Beispiele sind in den Abschnitten 3.2.1 und 3.3.2 bereits erläutert worden. Ein ähnliches Phänomen konnte auch in der Hormaomycin-NRPS beobachtet werden.

Ein Sequenzvergleich (Alignment) der A-Domänen der Hormaomycin-NRPS zeigt, dass viele A-Domänen, obwohl sie sehr unterschiedliche Aminosäuren aktivieren, eine erstaunliche Sequenzähnlichkeit besitzen. Die A-Domänen der Module HrmO1, HrmO4 [Spezifität jeweils (3-Ncp)Ala (**27**)] und der Module HrmO3, HrmP1 [Spezifität jeweils (β -Me)Phe (**31**)] besitzen am N-Terminus und am C-Terminus große Abschnitte mit Sequenzübereinstimmung (Aminosäuren 1-200 und 320-550). In der Mitte der Proteinsequenz unterscheiden sich die A-Domänen dagegen signifikant. Abbildung 5-44 visualisiert diese Beobachtung durch einen Ähnlichkeitsplot der A-Domänen von HrmO1, O3, O4 und P1. Die A-Domänen HrmO3_A und HrmO4_A haben eine Sequenzübereinstimmung von 77% (Abb. 5-45). Während der N-terminale Teil (Aminosäuren 1-200) zu 96% übereinstimmt, hat der C-terminale Teil (Aminosäuren 320-542 in O3_A) eine Sequenzübereinstimmung von immerhin 80%. Im zentralen Teil stimmen die Aminosäuren dagegen nur zu 36% überein. Diese Beobachtung legt die Hypothese nahe, dass dieser zentrale Abschnitt des

Proteins allein für die Substratauswahl verantwortlich ist und es im Laufe der Evolution zu einem rekombinatorischen Austausch der zentralen, kodierenden DNA-Abschnitte gekommen ist.

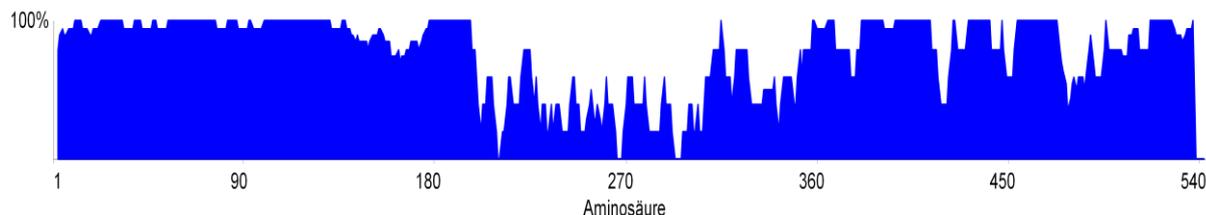


Abb. 5-44: Ähnlichkeitsplot von Hrm O1_A, O3_A, O4_A und P1_A erstellt mit dem Programm Vector NTI. Die Höhe der blauen Fläche gibt den Grad der Sequenzähnlichkeit an.

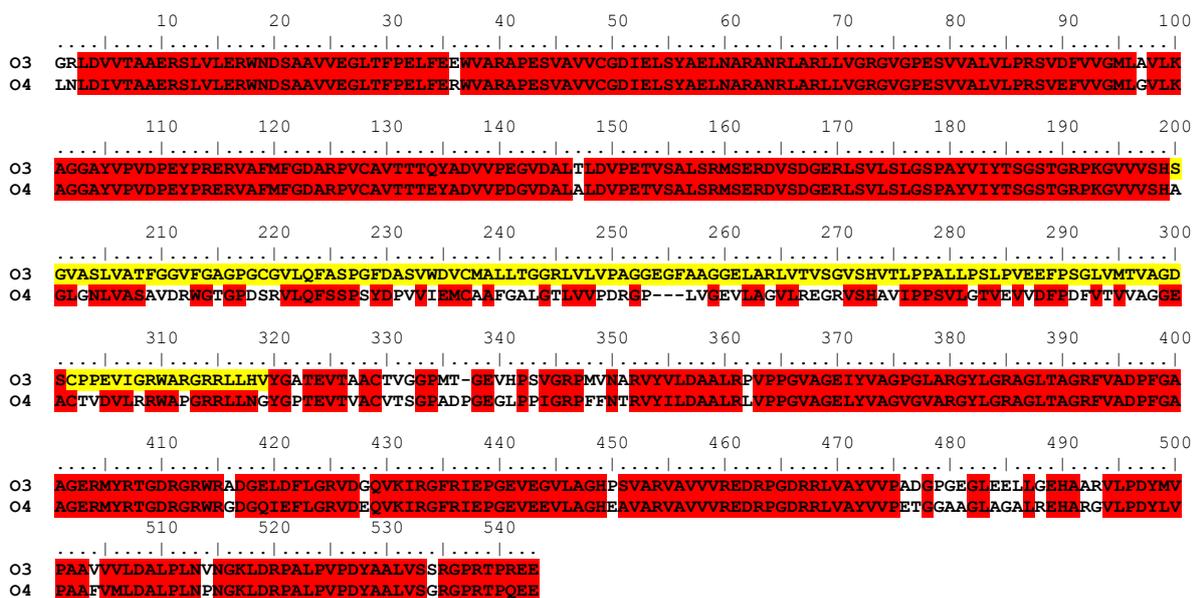


Abb. 5-45: Aminosäurealignment von HrmO3_A (obere Reihe) und HrmO4_A (untere Reihe) erstellt mit dem Programm Bioedit. Übereinstimmende Aminosäuren sind rot markiert. Der gelb markierte Bereich markiert den in dieser Studie ausgetauschten Sequenzbereich.

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurden rekombinante A-Domänen erzeugt. Alle sollten die gleichen Randabschnitte (Aminosäuren 1-199 und 320-542) von HrmO3_A besitzen. Die Fusion sollte nach dem Motiv VVVSH (AS 195-199) und vor dem Motiv YGATE (AS 320-324) in HrmO3_A stattfinden (vergleiche Abb. 5-45). Aus fünf verschiedenen A-Domänen wurden auf Basis eines Sequenzalignments (Abb. 9-9) die zentralen Abschnitte eingebaut. Aus der Hormaomycin-NRPS wurde HrmO4_A als am nächsten verwandte Domäne [Spezifität (3-Ncp)Ala (27)], und zwei etwas weiter entfernt verwandte A-Domänen, HrmO2_A (Spezifität Threonin) und HrmP2_A (Spezifität Isoleucin/Valin) ausgewählt. Außerdem wurden A-Domänen aus der NRPS des Antibiotikums CDA (20), CdaPSIA5_A (Spezifität Asparaginsäure) und CdaPSIH6_A (Spezifität Hydroxyphenylglycin) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) ausgewählt (vgl. Abb. 3-16). Mit spezifischen Primern (siehe Tab. 6-12) wurden zunächst die DNA-Abschnitte der A-Domänen, die fusioniert werden sollten, amplifiziert (Tab. 5-8).

Tab. 5-8: Übersicht über die mit PCR erzeugten Fragmente für die fusionierten A-Domänen

Mit PCR erzeugte DNA-Fragmente	Lage in der jeweiligen A-Domäne [AS]	Größe des DNA-Fragments
O3L	HrmO3 _A 1-199	597 bp
O3R	HrmO3 _A 320-542	666 bp
O2 Insert	HrmO2 _A 199-329	430 bp
O4 Insert	HrmO4 _A 200-316	388 bp
P2 Insert	HrmP2 _A 198-319	409 bp
A5 Insert	CdaO5 _A 182-291	367 bp
H6 Insert	CdaO6 _A 214-334	400 bp

Die Fragmente wurden mit einem PCR-Kit aufgereinigt (siehe 6.4.1.4). Anschließend wurden immer drei DNA-Fragmente mit einer nach Szewczyk et al.²⁶¹ abgewandelten Methode der Fusions-PCR (siehe 6.4.1.2) zu einem neuen A-Domänen-Fragment fusioniert und amplifiziert (vgl. Abb. 5-46).

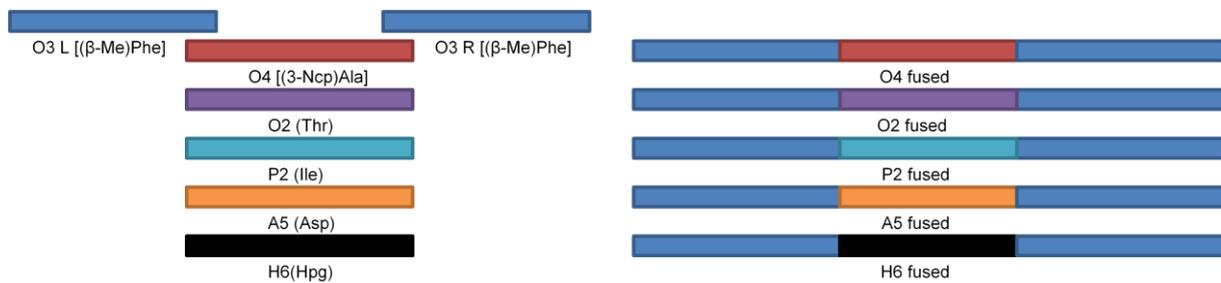


Abb. 5-46: Schema der Konstruktion der fusionierten A-Domänen. Zentrale Teile aus verschiedenen A-Domänen (O4, O2, P2, A5, H6) wurden mit einem N-terminalen (O3L) und einem C-terminalen Teil (O3R) aus HrmO3_A über Fusions-PCR (Abschnitt 6.4.1.2) zu rekombinanten A-Domänen fusioniert.

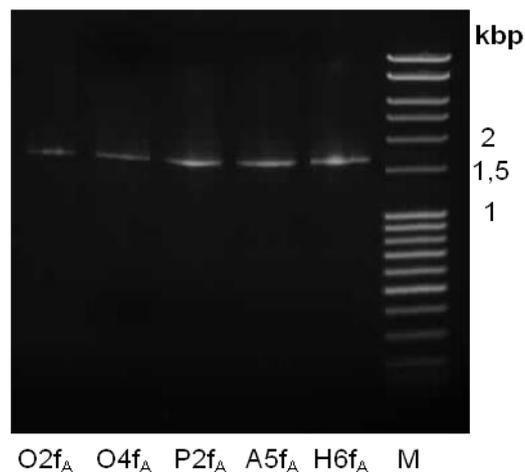


Abb. 5-47: Agarosegel (1%) der mit Fusions-PCR erzeugten, künstlichen A-Domänen-DNA-Abschnitte O2f_A, O4f_A, P2f_A, A5f_A, H6f_A. M=Marker

Dabei wurde für jede neue Domäne immer der 5'-und der 3'-Abschnitt von HrmO3_A (O3L/O3R) mit einem Insert, dem zentralen DNA-Abschnitt einer anderen A-Domäne, kombiniert. Wichtig für die

spezifische Amplifikation waren sogenannte „nested primer“, die identisch mit einem DNA-Abschnitt am 5'-Ende (O3L) und am 3'-Ende (O3R) des zu fusionierenden DNA-Abschnitts sind. Diese wurden dem PCR-Ansatz hinzugefügt. Die fusionierten Fragmente konnten ohne nennenswerte PCR-Nebenprodukte erzeugt werden (siehe Abb. 5-47).

Die fusionierten PCR-Produkte wurden wieder und über TA-Klonierung in pGEM-Teasy subkloniert. Nach Sequenzierung und positivem Sequenzabgleich wurden die fusionierten A-Domänen über *EcoRI* und *HindIII* in den Expressionsvektor pHIS₈ kloniert und ergaben die Plasmide pMC 34-37 und pMC41 (siehe Tab. 6-19). Diese Plasmide wurden wiederum zusammen mit pMC10, das das MbtH-artige Protein HrmR beinhaltet (siehe Abschnitt 5.4.1), in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und doppelt selektioniert. Es entstanden die Stämme MC38-40 und 42-43 (siehe Tab. 6-20). In diesen Stämmen fand die Coexpression von fusionierter A-Domäne und HrmR analog zu den nativen Domänen statt (siehe Abschnitt 5.4.1). Eine Übersicht über die exprimierten Fusionsproteine zeigt Tabelle 5-9.

Tab. 5-9: Übersicht über die konstruierten fusionierten A-Domänen

Neu erzeugte Proteine	Abkürzung	Vorausgesagte Spezifität ²⁰²	Größe des His ₈ -Proteins
O2fused	O2f _A	Thr	61661 Da
O4 fused	O4f _A	(3-Ncp)Ala	59169 Da
P2 fused	P2f _A	Ile/Val	60539 Da
A5 fused	A5f _A	Asp	58918 Da
H6 fused	H6f _A	Hpg	60102 Da

Abbildung 5-48 gibt eine Übersicht über alle exprimierten A-Domänen mit HrmR. Bis auf die freistehende A-Domäne HrmK (siehe Abschnitt 5.3.1) wurde überall HrmR coeluiert. Um das Verhältnis der Komponenten des eluierten Komplexes zu bestimmen, wurden im Geldokumentationssystem die Flächen der Proteinbanden bestimmt. Mit Hilfe der auf dem gleichen Gel erstellten Eichgerade (siehe Abb. 6-2) konnten die Konzentrationen der eluierten und aufkonzentrierten A-Domänen bestimmt werden (Tab. 5-10). Die A-Domänen liegen in einem Bereich von ca. 8-17 μ M. Das ist ausreichend, um den [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay durchzuführen. Die fusionierten A-Domänen ließen sich stabil exprimieren und in ähnlichen Ausbeuten erhalten wie die nativen. Eine direkte Konzentrationsbestimmung für HrmR war mit der gewählten Methode nicht möglich. Über das Verhältnis der Peakflächen von A-Domäne und HrmR ließ sich im Zusammenhang mit dem Massenverhältnis der Proteine ein stöchiometrisches Verhältnis der eluierten Proteine bestimmen. Das Verhältnis liegt in allen Fällen ungefähr bei 1:1. Dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen bei Coelutionen von A-Domänen und MbtH-artigen Proteinen überein.^{152,155} Es ist außerdem zu erkennen, dass in den Elutionsfraktionen neben den eluierten A-Domänen und HrmR weitere Proteine aus *E. coli* durch unspezifische Bindungen coeluiert wurden.

Diese können das Messergebnis beeinflussen (siehe 5.4.3). Die A-Domänen mit den zentralen Teilen aus *S. coelicolor*, A5f_A und H6f_A, wurden zusätzlich mit dem MbtH-artigen Protein aus dem CDA-Gencluster, CdaX coexprimiert. Dieses wurde, analog zu HrmR (siehe oben) amplifiziert und in pCDF-DUET kloniert (pMC66). Dieses Konstrukt wurde dann mit pMC37 und pMC41 cotransformiert, um die Coexpressionsstämme MC68 und MC69 (siehe Tab. 6-20) zu erhalten. Mit diesen Stämmen wurden ebenso Coexpressionen durchgeführt. Bei der Coelution mit A5f_A und CdaX kommt es ebenfalls zu einer Coelution im Verhältnis von ungefähr 1:1 (Bande A5_x in Abb. 5-48).

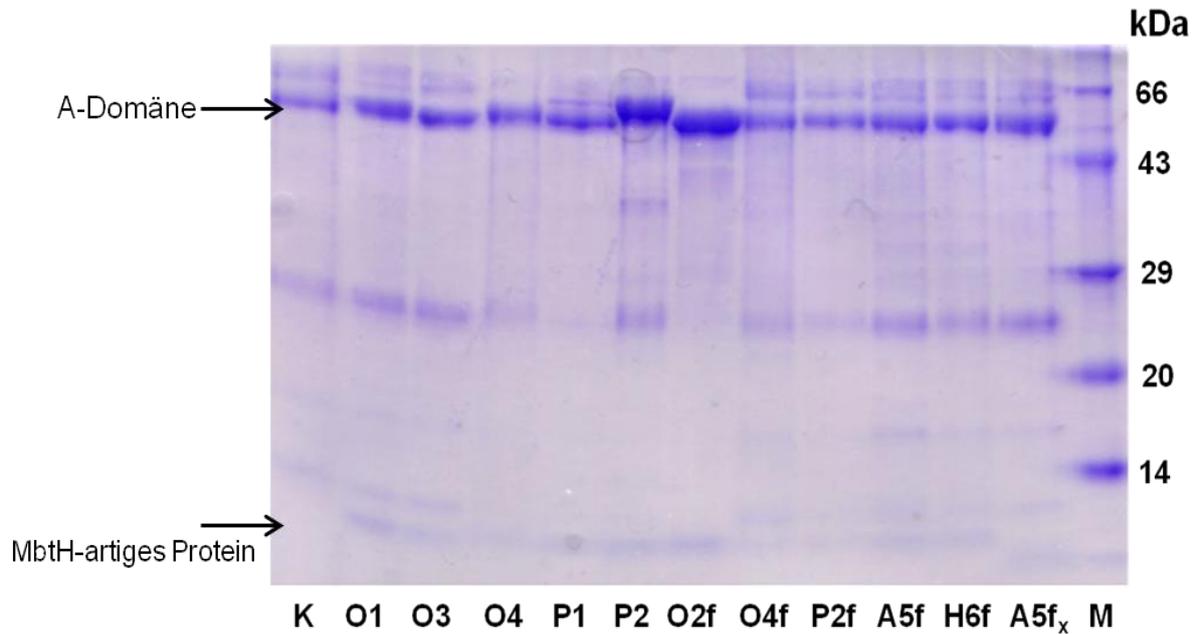


Abb. 5-48: Übersicht über die isolierten nativen und fusionierten A-Domänen HrmK, HrmO1_A, HrmO3_A, HrmO4_A, HrmP1_A, HrmP2_A, O2f_A, O4f_A, P2f_A, A5f_A, H6f_A, jeweils coeluiert mit HrmR. A5f_x zeigt eine Coelution von A5f_A mit CdaX. M=Marker

Tab. 5-10: Übersicht über die in Abbildung 5-50 durch SDS-PAGE-Absorptionsmessung ermittelten Proteinkonzentrationen und –verhältnisse. Diese wurden über die Eichgerade in Tabelle 6-2 ermittelt.

Proteine	Fläche A-Domäne	Fläche MbtH	Konzentration A-Domäne	Verhältnis A-Domäne/ MbtH Peakfläche	Verhältnis A-Domäne/ MbtH Masse	Verhältnis A-Domäne / MbtH Molarität
K/R	14069	-	8,5 µM	-	-	-
O1/R	16641	3180	10,3 µM	5,23:1	6,23:1	0,83:1
O3/R	14574	2232	8,8 µM	6,53:1	6,35:1	1,03:1
O4/R	15923	1614	9,7 µM	9,86:1	6,39:1	1,54:1
P1/R	14155	2148	8,5 µM	6,59:1	6,36:1	1,04:1
P2/R	27367	3107	17,3 µM	8,81:1	6,55:1	1,35:1
O2f/R	27318	4215	17,1 µM	6,48:1	6,60:1	0,98:1
O4f/R	18885	2016	11,8 µM	9,37:1	6,32:1	1,48:1
P2f/R	13403	1700	7,7 µM	7,88:1	6,47:1	1,22:1
A5f/R	15650	2597	9,6 µM	6,02:1	6,30:1	0,96:1
H6f/R	15825	2277	9,5 µM	6,95:1	6,43:1	1,08:1
A5f/X	14596	2752	8,8 µM	5,30:1	7,20:1	0,73:1

In-vitro-Studien von MbtH-artigen Proteinen haben gezeigt, dass auch separat exprimiertes MbtH-Protein in der Lage ist, *in vitro* A-Domänen zu aktivieren, wenn auch in schwächerem Maße, als wenn es coexprimiert wird (siehe auch 3.2.4).^{152,155} Um die Wahrscheinlichkeit der Aktivität der fusionierten A-Domänen zu erhöhen, wurden *hrmR* und *cdaX* zur separaten heterologen Expression über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET28b kloniert und ergaben pMC46 und pMC65. Die Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und über einen N-terminalen Hexahistidinyltag aufgereinigt (siehe Abb. 5-49). Die Proteine wurden entsalzt (siehe 6.5.5) und in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. (siehe 6.5.11). Bei Bedarf konnten die Proteine dem A-Domänen-Assay zugegeben werden.

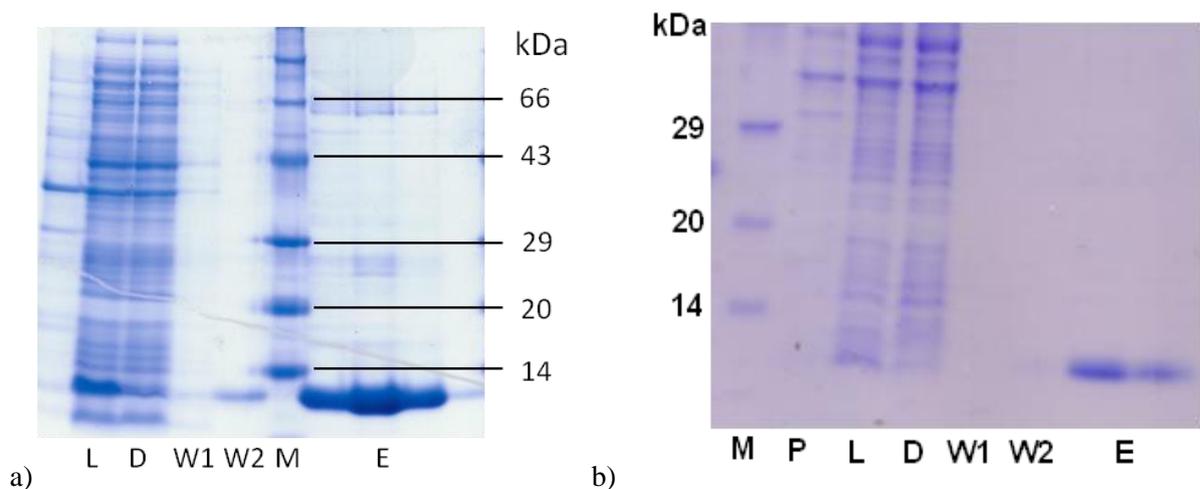


Abb. 5-49: SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin) einer Expression von a) His₆HrmR und b) His₆CdaX (jeweils 500 mL 2xYT, 16 °C, 1 mM IPTG). Fraktionen: P=Pellet, L=Lysat; D=Durchlauf; W1/W2= Waschfraktionen mit 10 mM/40 mM Imidazol; M=Marker; E=Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol.

5.4.3 Modellierung der fusionierten A-Domänen nach PheA

Um die neu erzeugten Enzyme weiter zu charakterisieren, wurden Modellierungsstudien mit dem Programm I-TASSER^{262,263} durchgeführt. Dieser Algorithmus modelliert Proteinsequenzen mit unbekannter Struktur nach ihren nächsten Homologen, deren Struktur aufgeklärt ist. Für A-Domänen ist diese Berechnung recht zuverlässig, da gezeigt wurde, dass alle bisher kristallisierten A-Domänen eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen.⁹⁵ Die erzeugten A-Domänen wurden nach der Kristallstruktur von PheA⁹⁴ (siehe Abschnitt 3.2.1) modelliert. Ein Ausschnitt aus der modellierten Sekundärstruktur von O2f_A ist in Abbildung 5-50 aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass an den Fusionsstellen (200, 330) keine organisierte Sekundärstruktur (β -Faltblatt=S; α -Helix=H) vorliegt. Das unterstützt die Möglichkeit eines funktionsfähigen, aktiven Fusionsproteins.

Qualität des Modells und liegt bei guten Korrelationen mit dem Homolog über 0,5. In Tabelle 5-11 sind die von I-TASSER errechneten Scores aufgeführt. Alle Werte für die fusionierten Domänen liegen in einem ähnlichen Bereich, der von I-TASSER als sehr gute Qualität des Modells eingeschätzt wird.²⁶² Der Vergleich der Modelle mit dem der nativen A-Domäne HrmO3_A zeigt, dass C-Score und TM-Score fast die gleichen Werte besitzen. C-Score und TM-Score für His₈P2f_A liegen signifikant höher als die der anderen Domänen, das ist aus der Tatsache zu begründen, dass hier als einziges die Proteinsequenz mit Histidinytag modelliert wurde. Diese ist naturgemäß ähnlicher als die nativen Proteine zu PheA, das auch mit Histidinytag kristallisiert wurde.⁹⁴

Tab. 5-11: Mit I-TASSER^{262,263} erstellte C-Scores und TM-Scores für HrmO3_A und die fusionierten A-Domänen.

Protein	C-score	TM-Score
HrmO3 _A	0,96	0,84
O2f _A	0,81	0,82
O4f _A	0,54	0,79
His ₈ P2f _A	1,62	0,94
A5f _A	0,77	0,82
H6f _A	0,81	0,82

Die Ergebnisse der Modellierungen liefern somit weitere Anhaltspunkte, dass durch den Austausch des zentralen Teils von HrmO3_A die Ausbildung der Tertiärstruktur der A-Domänen nicht beeinträchtigt wird.

5.4.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der nativen und fusionierten A-Domänen

Alle isolierten A-Domänen aus den Abschnitten 5.4.1 und 5.4.2 sollten nun in einem massenspektrometrisch basierten Aktivitätsassay¹⁰⁹ (siehe 6.6.1) auf ihre Aktivität und Selektivität getestet werden. Dieser Assay basiert auf dem Austausch von ATP, das am terminalen Phosphat mit schwerem Sauerstoff (¹⁸O) markiert ist ([γ -¹⁸O₄]-ATP (**120**)) und ¹⁶O₄-Pyrophosphat (**121**), das im Überschuss hinzugegeben wird. Wenn nun ein Austausch durch die A-Domäne stattfindet, entsteht ein Gleichgewicht zwischen dem [γ -¹⁸O₄]-ATP (**120**) ($m/z=514$), des Aminoacyl-AMP (**122**) und ATP (**123**) ($m/z=506$) durch einen Austausch des ¹⁶O₄-Pyrophosphat (**121**) (vgl. Abb. 5-52). Je mehr von der zugegebenen Aminosäure aktiviert wurde, desto stärker liegt das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des ATP, d.h. umso größer ist der Peak bei $m/z=506$ relativ zum Peak bei $m/z=514$ im Massenspektrum. Der Grad des Austauschs, und damit die Präferenz für verschiedene Substrate, lässt sich so massenspektrometrisch für die A-Domänen bestimmen.

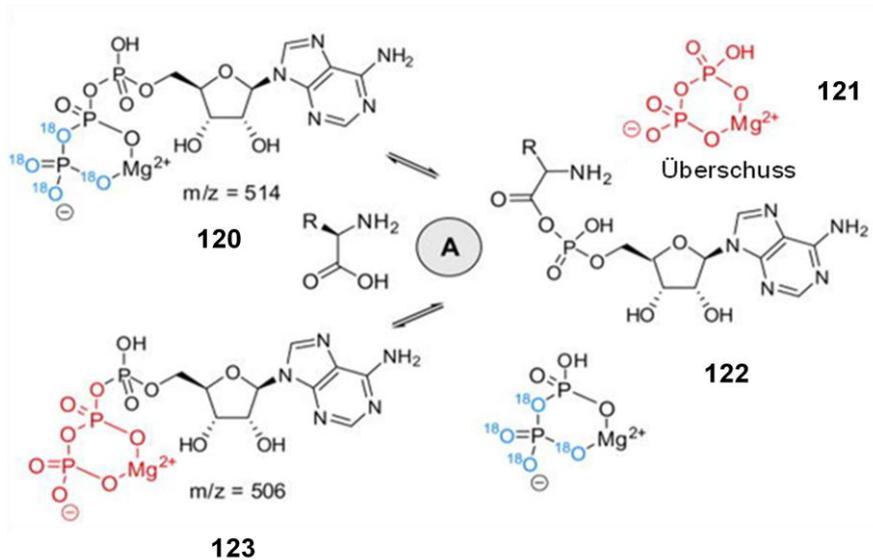


Abb. 5-52: Der Austausch von γ - $^{18}\text{O}_4$ -ATP (**120**) in ATP (**123**) in Gegenwart eines Überschusses von Pyrophosphat (**121**) durch die A-Domäne.¹⁰⁹ Dieses Reaktionsgleichgewicht wird in dieser Arbeit verwendeten $[\gamma$ - $^{18}\text{O}_4$]-ATP-Assay ausgenutzt.

Das Ergebnis eines erfolgreichen $[\gamma$ - $^{18}\text{O}_4$]-ATP-Assays zeigen die Abbildungen 5-53 und 5-54. HrmP1_A wurde mit verschiedenen Aminosäuren inkubiert. β -Methylphenylalanin (**31**) wird von der A-Domäne am stärksten adenyliert, allerdings ist der Umsatz in diesem Falle eher als moderat einzuschätzen (12,4% Aktivierung). Auch scheinen die anderen Aktivitäten keinem bestimmten Muster zu folgen. Alle weiteren Versuche, die Aktivität der NRPS-A-Domänen zu bestimmen, schlugen fehl. Es wurde keine Aminosäure in signifikanten Maße (>4%) umgesetzt (Daten hier nicht aufgeführt).

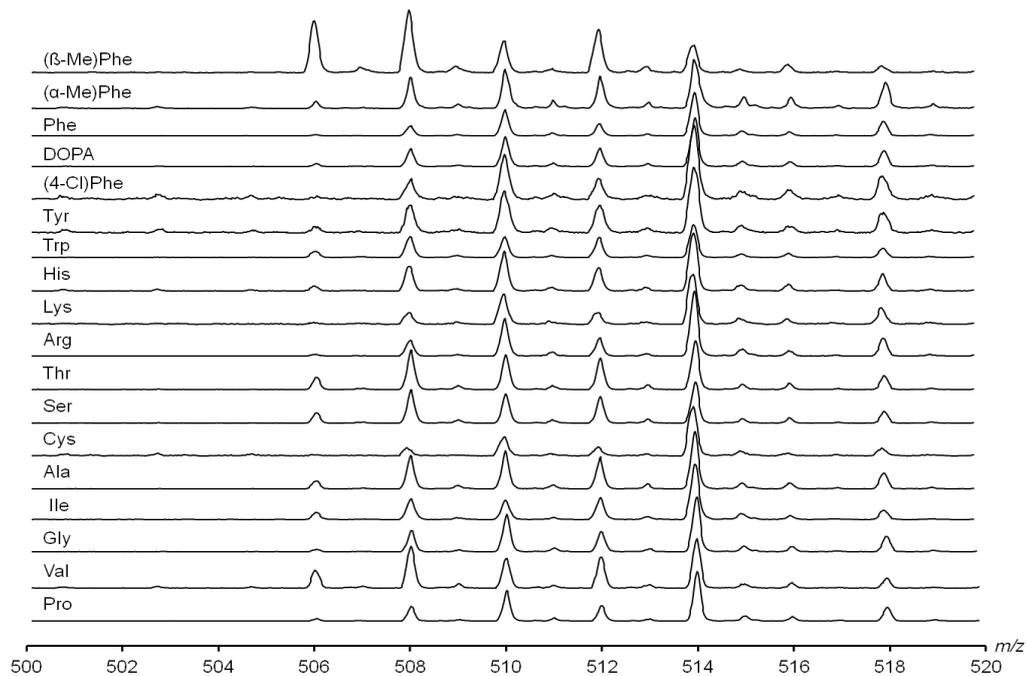


Abb. 5-53: MALDI-TOF-Ergebnisse der Umsetzung von HrmP1_A mit verschiedenen Aminosäuren im $[\gamma$ - $^{18}\text{O}_4$]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-54, Tab. 9-2)

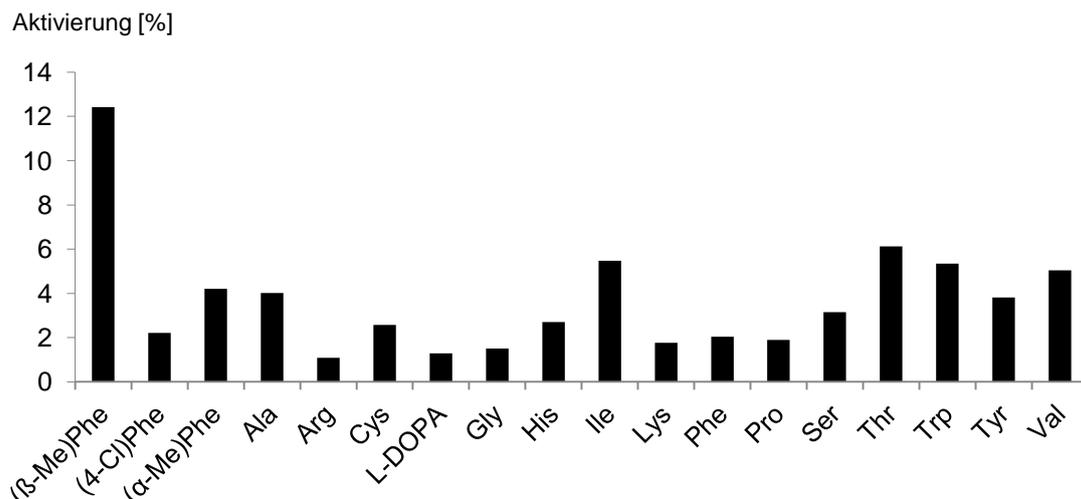


Abb. 5-54: Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren durch HrmP1_A im [γ-¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-53, Tab. 9-2)

Die Coexpression mit HrmR führte dagegen *in vitro* zu aktiven A-Domänen. Hier konnte für alle Hormaomycin-A-Domänen eine Aminosäurenaktivierung für das präferierte Substrat von mehr als 20% detektiert werden. Als essentiell für die Aktivität der Enzyme erwies sich die Zugabe von 1 mM Dithiothreitol (DTT) zum Assay. Die Messergebnisse der Hormaomycin-A-Domänen mit HrmR und der fusionierten A-Domänen mit HrmR werden in den folgenden Abschnitten dargestellt und diskutiert.

(β-Me)Phe-aktivierende A-Domänen

Die A-Domänen HrmO3_A und HrmP1_A ähneln sich auf sequenzieller Ebene sehr stark (95% Identität der Aminosäuren). Der nichtribosomale Code für beide Domänen ist der gleiche (siehe Tab. 3-3). HrmP1_A ist die einzige A-Domäne der Hormaomycin-NRPS, die *in vitro* auch ohne coexprimiertes HrmR, wenn auch verringert, eine Aktivität besitzt (siehe Abb. 5-54). Mit HrmR wurden für HrmP1 dagegen fast quantitative Umsetzungen (bis zu 96%) des erwarteten Substrats (β-Me)Phe (**31**) detektiert (siehe Tab. 9-3, vergleiche Abb. 5-53 und 5-56). Es wurden außerdem strukturelle Analoga des Substrates getestet: 4-Chlorphenylalanin [(4-Cl)Phe] (**124**), dessen Fluoranalogue **34** bereits in Fütterungsexperimenten in Hormaomycin (**13**) eingebaut worden war (vergleiche Abb. 3-19)²⁰⁰ und α-Methylphenylalanin [(α-Me)Phe] (**125**), bei dem die Methylgruppe am Aminokohlenstoff liegt (Abb. 5-55).

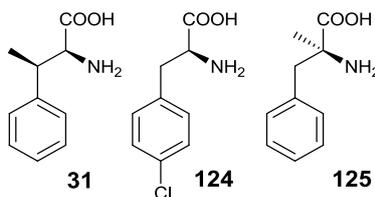


Abb. 5-55: (β-Me)Phe (**31**), (4-Cl)Phe (**124**) und (α-Me)Phe (**125**)

Diese beiden Substrate wurden *in vitro* allerdings nur in sehr geringem Maße von den beiden A-Domänen akzeptiert. Die Bindetasche scheint für den raumgreifenden Substituent Chlor nicht ausreichend groß genug zu sein. Auch am α -C ist den Ergebnissen nach sehr wenig Platz für strukturelle Variationen. Das nach (β -Me)Phe (**31**) präferierte Substrat war Phenylalanin (**35**), mit Aktivierungswerten um die 10% von **31**. Auch diese Aminosäure war bereits durch Fütterungen von Radzom in Hormaomycin inkorporiert worden.²⁰⁰ Für HrmP1_A wurden FPLC-Aufreinigungsexperimente (siehe Abschnitt 6.5.10) durchgeführt. Es konnte eine Trennung der Fraktion erreicht werden (siehe Abb. 9-18, Anhang). Die Fraktionen B11-B9 wurden vereinigt, konzentriert und in Assaypuffer überführt. Allerdings zeigt die geringe Peakgröße des Chromatogramms, dass nur noch eine geringe Menge Enzym für den Assay vorlag. (β -Me)Phe (**31**) wurde zwar selektiv aktiviert, allerdings wurden hier nur insgesamt 6,7% umgesetzt (siehe Tab. 9-2). Das Aktivierungsmuster blieb allerdings weitgehend erhalten, da alle anderen getesteten Aminosäuren unter 0,7% umgesetzt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Assay auch bei geringen Umsätzen valide Ergebnisse liefern kann, wenn das Protein in großer Reinheit vorliegt. Die Abbildungen 5-56 und 5-57 fassen die dargestellten Ergebnisse grafisch zusammen. Zur einheitlichen Darstellung wurde das am stärksten aktivierte Substrat als 100% gesetzt. Aus Platzgründen werden die Ergebnisse für die folgenden A-Domänen nur graphisch zusammengefaßt, die einzelnen Ergebnisse der Messungen befinden sich im Anhang.

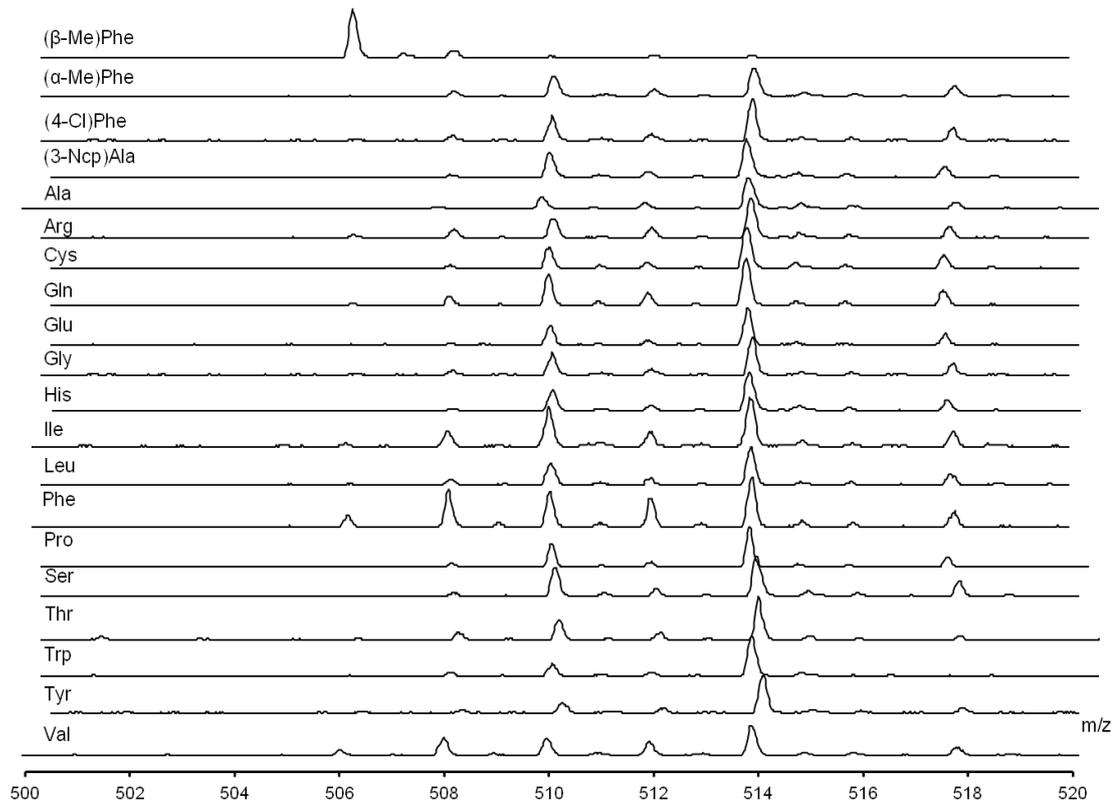


Abb. 5-56: MALDI-TOF-Ergebnisse der Umsatz von HrmP1_A/HrmR mit verschiedenen Aminosäuren im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-57, Tab. 9-3)

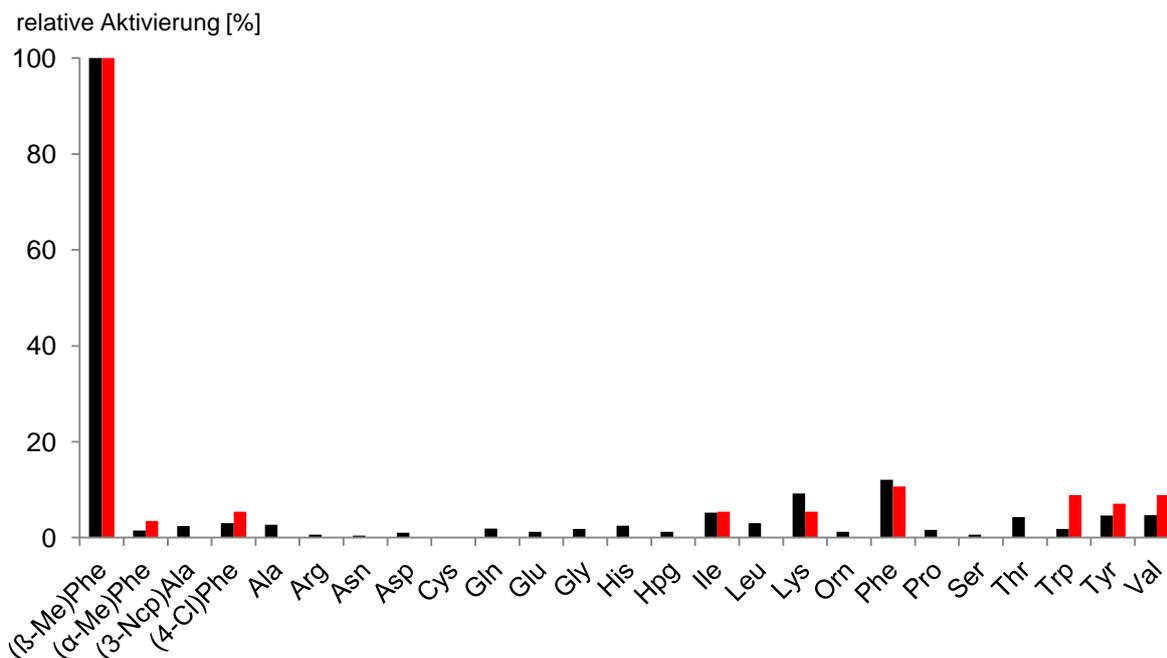


Abb. 5-57: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP1_A (schwarz) und HrmP1_A nach FPLC (rot) mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Abb. 5-56, Tab. 9-3). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Tab. 5-12: Vergleich der Aktivitäten von HrmO3_A und HrmP1_A mit HrmR

Enzym	Umsatz (β-Me)Phe[%] (Tab. 9-2, 9-4)	Konzentration [mM] (Tab. 5-10)	Relativer Umsatz [% Umsatz/mM]
HrmO3 _A	42,3	8,8	4,81
HrmP1 _A	96,1	8,5	11,31

Für HrmO3_A wurden die gleichen Substrate getestet wie für HrmP1_A. (β-Me)Phe (**31**) ist hier ebenso das bevorzugt umgesetzte Substrat. Allerdings ist die Umsetzung von **31** *in vitro* bei etwa gleicher Konzentration (8,8 μM vs. 8,5 μM, siehe Tab. 5-10) weniger als halb so hoch, durchschnittlich 42,3%. Da beide Assays jeweils die gleiche Zeit (2 h) inkubiert wurden, lässt sich der Umsatz des Substrates über Gleichsetzung der Enzymmenge miteinander vergleichen.

In dieser Elutionsfraktion wurden ungewöhnlich hohe Aktivitäten für Leucin und Threonin (Aktivierung über 20%) observiert, die in HrmP1_A nicht gemessen wurden (vergleiche Abb. 5-57 und Abb. 5-58). Allerdings waren diese Aktivitäten nicht reproduzierbar. In einer zweiten Messung lagen die Aktivierungsraten für Leucin und Threonin viel niedriger (siehe Tab. 9-4). Auch Erol et al. konnten in einer Messung der A-Domäne des Corallopyronins unerwartet hohe Aktivitäten für Threonin beobachten.²⁶⁴ Das deutet darauf hin, dass diese Aktivitäten falsch positiv sind, und aus *E. coli* stammen könnten. Für HrmO3_A würde eine Aufreinigung über FPLC genauere Einsichten in die wahre Aktivität der Domäne geben; dieses Experiment konnte allerdings aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden.

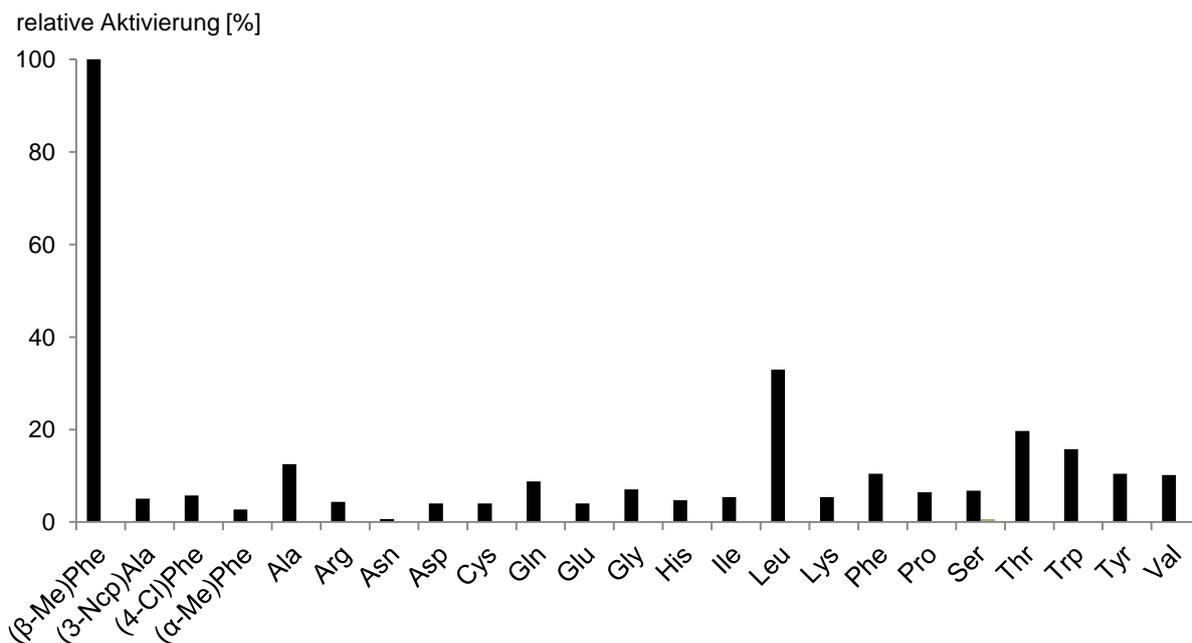


Abb. 5-58: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO3_A mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-4). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

(3-Ncp)Ala-aktivierende A-Domänen

Aufgrund der relativen Lage in der NRPS sollten die Module HrmO1 und HrmO4 die ungewöhnliche Aminosäure (3-Ncp)Ala (**27**) einbauen. Der nichtribosomale Code für deren A-Domänen ist neuartig und für beide A-Domänen exakt gleich, in den Datenbanken läßt sich kein Homologes finden (siehe Tab. 3-3). Die A-Domänen HrmO1_A, HrmO4_A und die konstruierte A-Domäne O4f_A, die den zentralen Teil der HrmO4 A-Domäne besitzt und die äußeren Teile von HrmO3_A (siehe 5.4.2), wurden mit verschiedenen proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren getestet. Als entfernte Analoga des (3-Ncp)Ala (**27**) wurden 5-Nitro-2-aminobenzoesäure (**126**) und Cyclopropylglycin (**127**) (siehe Abb. 5-59) getestet. Die Ergebnisse der Messungen der Enzyme HrmO4_A und O4f_A sind in Abbildung 5-60 aufgeführt.

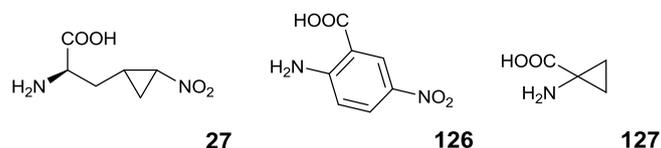


Abb. 5-59: (3-Ncp)Ala (**27**), 5-Nitro-2-aminobenzoesäure (**126**) und Cyclopropylglycin (**127**)

Natives und fusioniertes HrmO4_A besitzen in etwa die gleiche Aktivität und Substratspezifität. Das Substrat (3-Ncp)Ala (**27**) wurde im Assay von beiden Enzymen fast quantitativ umgesetzt (84,1% bzw. 96,1%). Von den anderen getesteten Aminosäuren werden Leucin und Valin, hydrophobe

Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette noch am ehesten toleriert [um 10% der Aktivität von **27**, siehe Tab. 9-5].

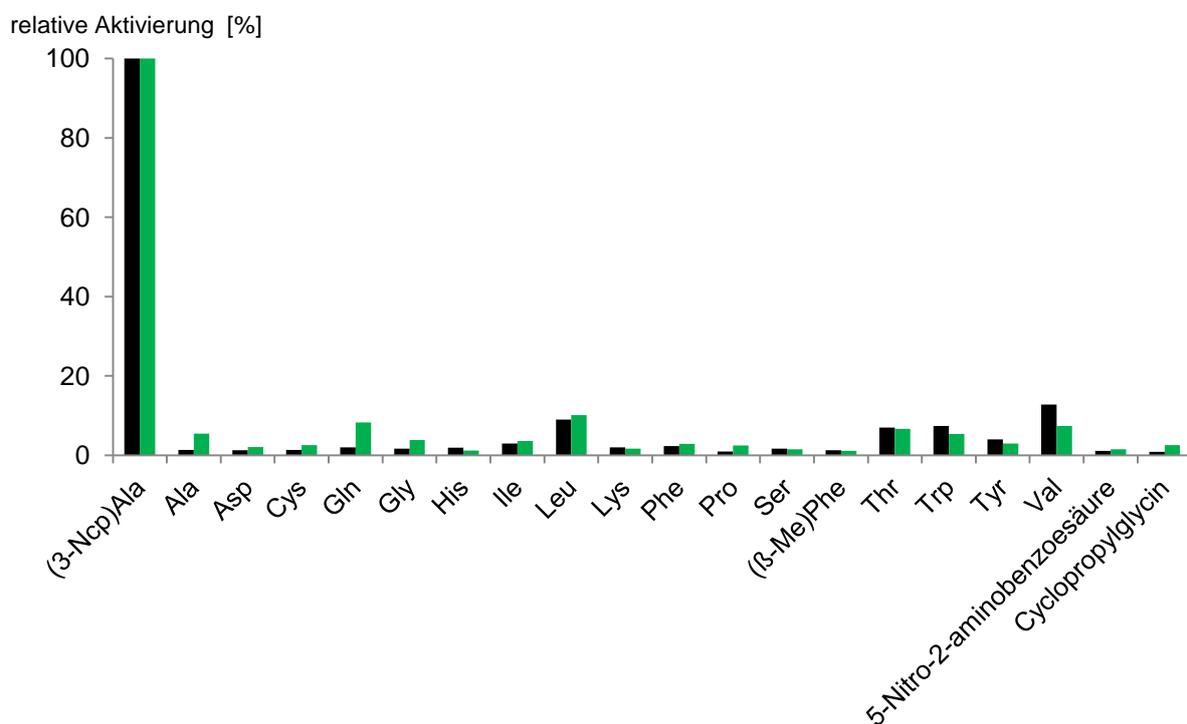


Abb. 5-60: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO4_A (schwarz) und O4f_A (grün) mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-5). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Die gestesteten Nitro- bzw. Cyclopropylaminosäuren **126** und **127** wurden sehr schlecht aktiviert. Wahrscheinlich sind die Abweichungen in der Seitenkette zu groß, um vom aktiven Zentrum erkannt zu werden. Bemerkenswerterweise ist das künstlich erzeugte Enzym O4f_A fast genauso aktiv wie das native (siehe Tab. 5-13). Auch zeigt das fusionierte Enzym keinerlei Präferenz für (β-Me)Phe (**31**), das bevorzugte Substrat von HrmO3_A. Die Sequenzänderungen am N- und C-Terminus (insgesamt 10% der Aminosäuren des Proteins) haben also nur minimalen Einfluß auf das aktive Zentrum und die Konformation der A-Domäne.. Durch den Austausch des zentralen Teils der A-Domäne konnte somit die Substratspezifität von HrmO3_A von (β-Me)Phe (**31**) zu (3-Ncp)Ala (**27**) verändert werden. In Tabelle 5-13 wird der Umsatz beider Enzyme miteinander verglichen. HrmO4_A zeigt nur geringfügig mehr Umsatz als das rekombinante Enzym O4f_A, die Aktivität beider Enzyme ist also fast gleichzusetzen.

Tab. 5-13: Vergleich der Aktivitäten für (3-Ncp)Ala (**27**) von HrmO4_A/HrmR und O4f_A/HrmR

Enzym	Umsatz (3-Ncp)Ala [%] (Tab. 9-5)	Konzentration [mM] (Tab. 5-10)	Relativer Umsatz [% Umsatz/mM]
HrmO4 _A	84,1	9,7	8,67
O4f _A	96,1	11,8	8,14

Die A-Domäne HrmO1_A wurde ebenfalls mit einer Reihe von Substraten getestet. Die Ergebnisse ähneln sehr den der Domäne HrmO4_A. Auch hier wird (3-Ncp)Ala (**27**) fast quantitativ umgesetzt (97% bzw. 78,5%); Leucin, Valin und Alanin liegen bei etwa 5-10% der Aktivierung von (3-Ncp)Ala (**27**) (siehe Tab. 9-6). Diese Analogie war zu erwarten, da beide A-Domänen eine Sequenzidentität von 95% besitzen. Ungewöhnlich ist auch hier der hohe Umsatz von Threonin. In der ersten Messung lag die Aktivierung bei fast einem Viertel von **27**. Diese Promiskuität war auch hier unerwartet, da sich die Strukturen der beiden Aminosäure nicht sehr ähneln. In einer zweiten Messung war die Aktivität aus der selben, gefrorenen Charge sogar noch viel höher, der absolute Umsatz lag bei 61,4% [fast 80% von (3-Ncp)Ala (**27**)]. Um HrmO1_A von eventuellen Hintergrundproteinen, die diese nicht reproduzierbare Aktivität verursachen können, zu befreien, wurde 1 mL des gefrorenen Enzyms weiter über ein FPLC-System mit einer Ionenaustauschsäule aufgereinigt (siehe Abschnitt 6.5.10). Es wurde ein stufenweiser Gradient zu einer höheren Salzkonzentration (NaCl) angelegt und die Enzyme so schrittweise von der Säule eluiert (siehe Abb. 5-61). Die Fraktionen, in denen sich Peaks befanden, wurden TCA-präzipitiert (siehe 6.5.6) und mit SDS-PAGE analysiert.

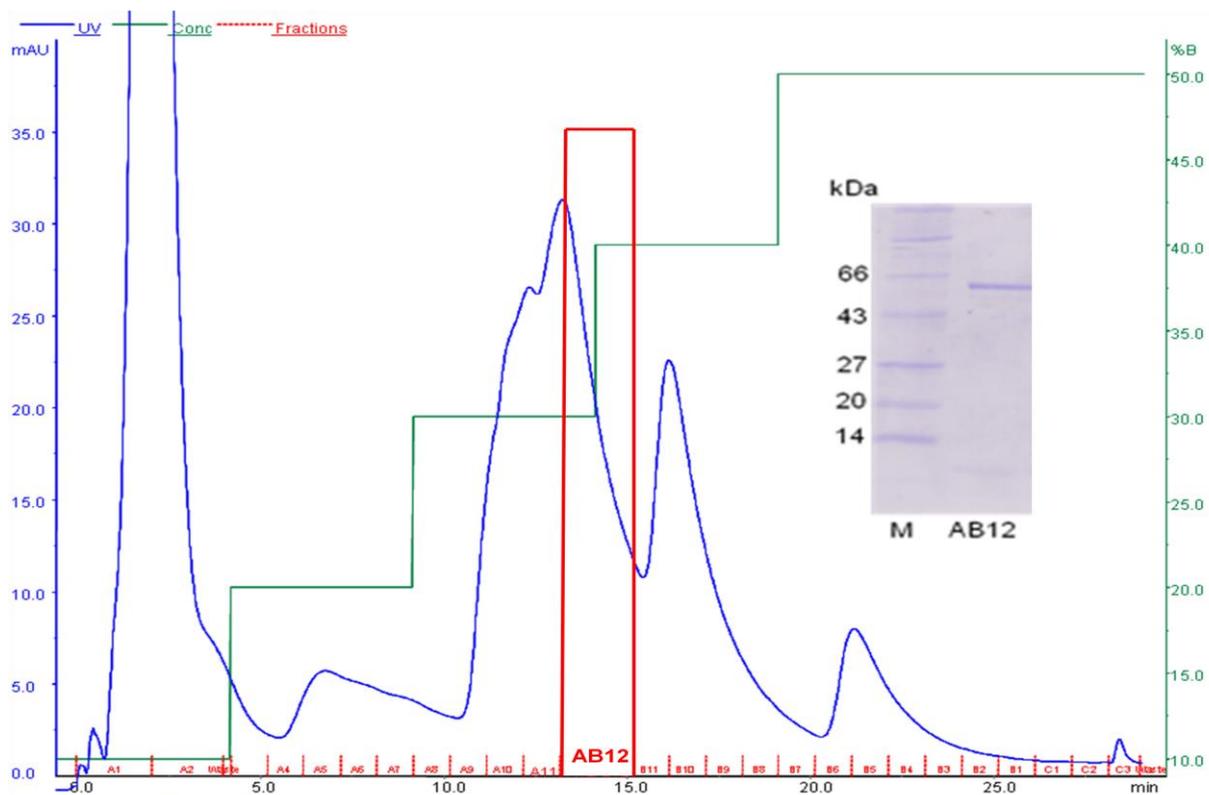


Abb. 5-61: Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung der Elution von HrmO1_A. Blaue Spur: UV-Absorption; grüne Spur: NaCl-Konzentration, Rote Zahlen: für den Assay gesammelte Fraktionen. Ein SDS-PAGE-Gel der für die Wiederholung des Assays gepoolten Fraktionen AB12 ist eingefügt.

Auf dem FPLC-Chromatogramm ist zu erkennen, daß eine starke Verunreinigung der A-Domäne vorlag. Eine vollständige Trennung der Peaks wurde nicht erreicht. Die Fraktionen A12 und B12 die den größten Peak in möglichst hoher Reinheit besaßen, wurden vereinigt. Die erneute Testung dieser Fraktionen im A-Domänenassay ergab, dass die relative Aktivierung für Threonin zu (3-Ncp)Ala (**27**)

um mehr als 50% reduziert werden konnte (von durchschnittlich 50,8% auf 19,7%), und außerdem andere Aktivitäten wie z.B. für Tryptophan, Glycin und Alanin gegen 0 reduziert werden konnten. Einzig der relative Umsatz für Leucin blieb nahezu konstant. Abbildung 5-62 und Tabelle 9-6 fassen die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Die Aktivität für Threonin konnte durch die FPLC-Trennung reduziert werden. Im Falle von HrmO1_A müsste die FPLC-Trennung weiter optimiert werden, um eine vollständige Isolierung des Proteins zu gewährleisten. Das würde mit hoher Wahrscheinlichkeit alle falsch positiven Aktivitäten beseitigen.

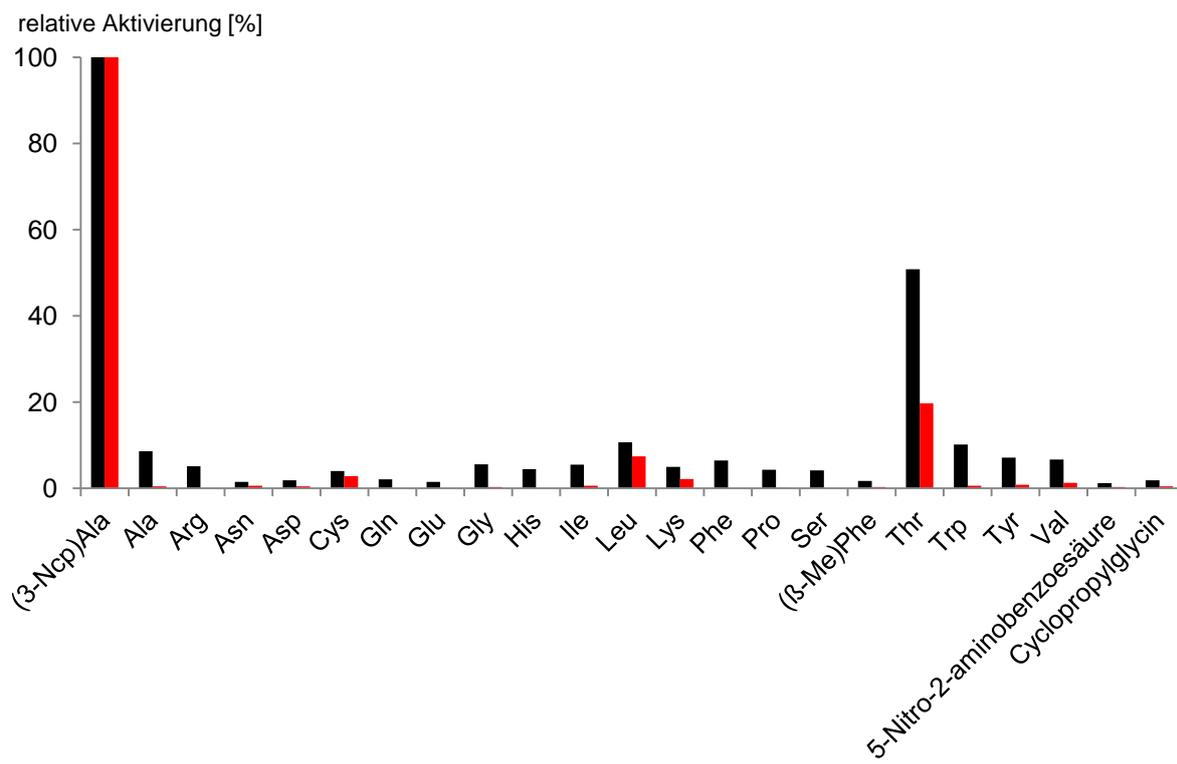


Abb. 5-62: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO1_A (schwarz) und HrmO1_A nach FPLC (rot) mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-6). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Wenn man alle erhaltenen Ergebnisse für HrmO1_A, HrmO4_A und O4f_A vergleicht, so läßt sich zusammenfassen, dass alle drei Enzyme (3-Ncp)Ala (**27**) von den angebotenen Substraten bevorzugt auswählen und im Assay fast quantitativ umsetzen. (3-Ncp)Ala (**27**) ist somit das natürliche Substrat der NRPS, und wird vor der Assemblierung des Hormaomycins synthetisiert (siehe Abschnitt 5.1). Von den getesteten proteinogenen Aminosäuren besitzen die Domänen am ehesten eine gewisse Präferenz für Leucin [jeweils um 10% Umsatz von (3-Ncp)Ala (**27**)] Diese Aminosäure könnte also durchaus von der NRPS anstelle von **27** in Hormaomycin eingebaut werden (siehe hierzu auch Abschnitt 5.5). Da Threonin nur von HrmO1_A auffallend stark umgesetzt wird, jedoch nicht von HrmO4_A und außerdem der Threonin-Umsatz durch FPLC stark reduziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass diese Aktivität nicht von der A-Domäne herrührt. Eine Optimierung der FPLC-Methode und damit endgültige Isolierung von HrmO1_A wird diesen Punkt weiter klären können.

L-Threonin aktivierende A-Domänen

Die Coexpression mit HrmR aktiviert auch die A-Domäne des Moduls HrmO2. Wie vorausgesagt, ist L-Threonin das bevorzugte Substrat (bis zu 75% Umsatz). D-Threonin wird von der A-Domäne nur in Spuren aktiviert. L-Threonin wird also während der Biosynthese des Hormaomycins von der A-Domäne adenyliert, auf das PCP übertragen und dann von der Epimerasedomäne in D-*allo*-Threonin umgewandelt (vergleiche Abb. 3-23).

Auch die konstruierte A-Domäne O2f_A, die zu einem Großteil der Sequenz aus HrmO3_A besteht (siehe Abschnitt 5.4.2) coeluiert mit HrmR und aktiviert L-Threonin, wie bioinformatisch vorausgesagt (bis zu 63% Umsatz). Das ist bemerkenswert, da O2f_A große Teile der (β -Me)Phe (**31**)-aktivierenden Domäne HrmO3_A trägt. Abzüglich des zentralen Teils stimmen die Teile AS 1-199 und 320-542 von O2f_A nur zu 52% bzw. 63% mit der korrespondierenden Sequenz von HrmO2_A überein. (β -Me)Phe (**31**) wird von der kombinatorisch erzeugten A-Domäne auch hier nicht aktiviert. Das Enzym ist also, wie auch O4f_A, offensichtlich korrekt gefaltet. Auffallend an den Messungen mit der Elution aus der Ni-NTA-Aufreinigung war, dass das Enzym offenbar eine geringe Substratspezifität besitzt; Valin wurde zu fast 80% von L-Threonin umgesetzt. Dagegen scheint O2f_A im Allgemeinen selektiver zu sein. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-63 und Tabelle 9-7 zusammengefasst.

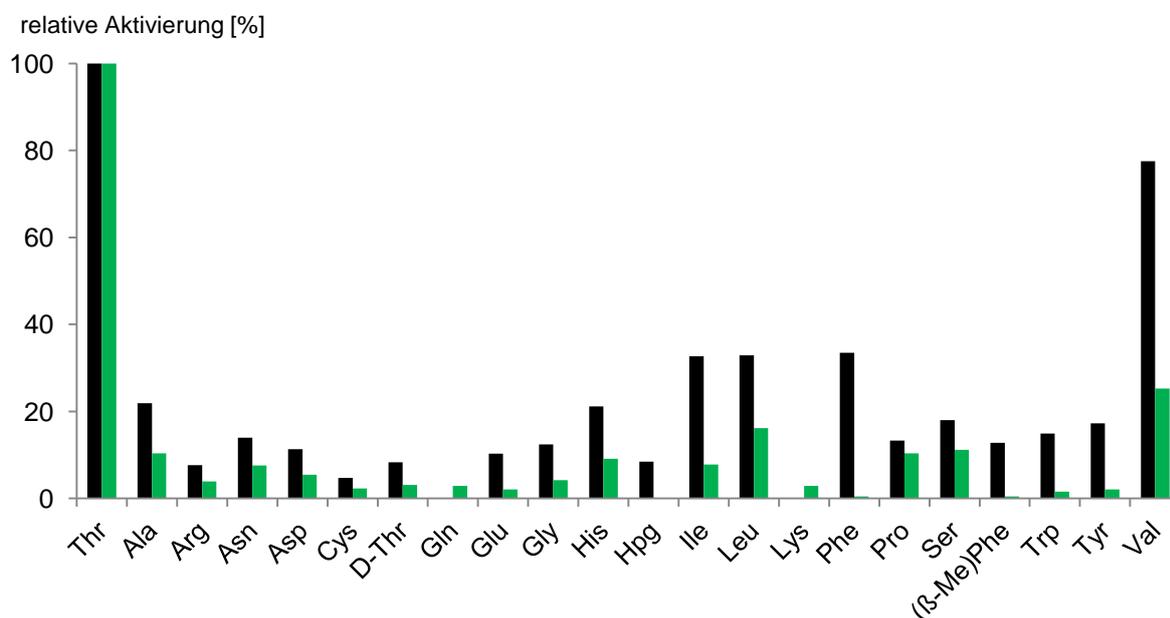


Abb. 5-63: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO2_A (schwarz) und O2f_A (grün) mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-7). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Um auch hier eine eventuelle falsch positive Aktivität zu entfernen, wurde eine FPLC-Aufreinigung der Fraktionen von HrmO2_A und O2f_A, analog zu HrmO1_A, durchgeführt (siehe 6.5.10). Die sehr ähnlichen Chromatogramme (Abb. 5-64, Abb. 9-19) zeigen, dass in beiden Fällen eine Isolierung eines Peaks (jeweils Fraktionen B11-B8) möglich war. Diese Fraktionen wurden wieder vereinigt, aufkonzentriert und in den Assaypuffer überführt. Abbildung 5-65 zeigt SDS-PAGE-Gele der

aufgereinigten Fraktionen. Es war eine erneute Messung der gereinigten A-Domänen im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]$ -ATP-Assay möglich.

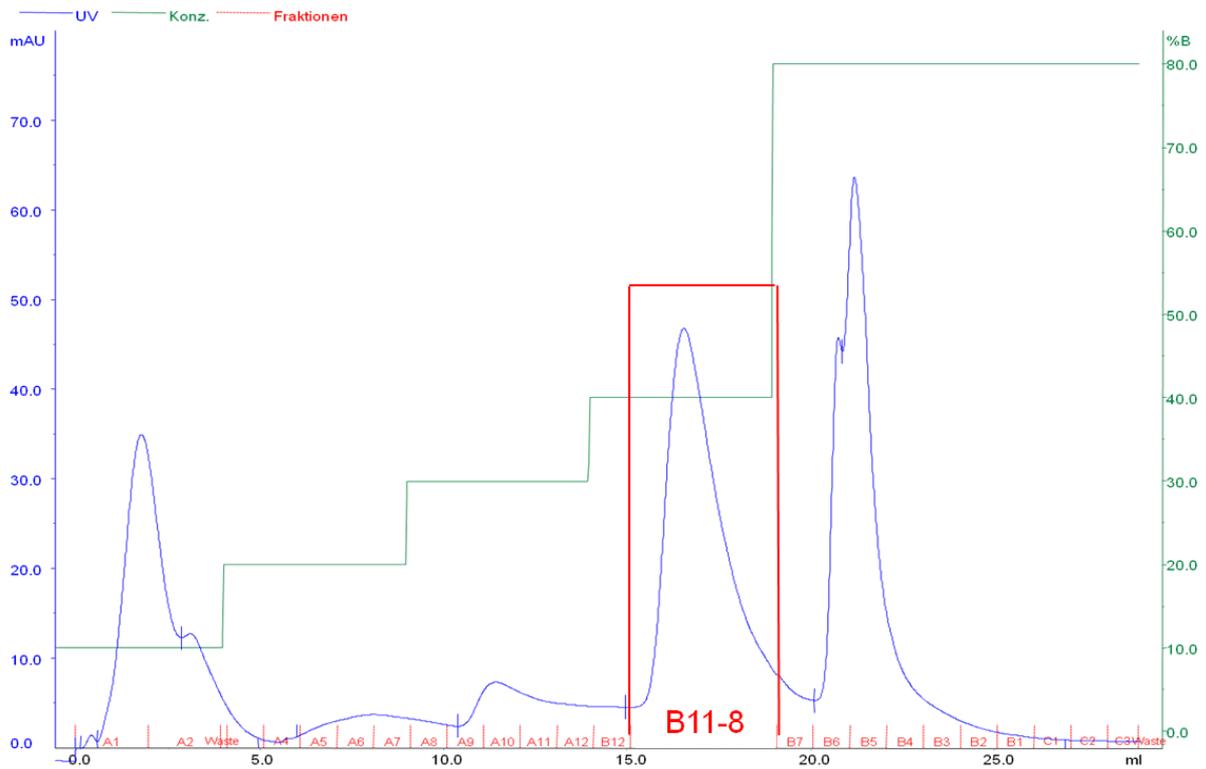


Abb. 5-64: Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung der Elution von $\text{HrmO}_2\text{A}/\text{HrmR}$. Blaue Spur: UV-Absorption; grüne Spur: Konzentration Puffer B (50 mM Tris, pH 8; 1M NaCl); Rote Zahlen: gesammelte Fraktionen

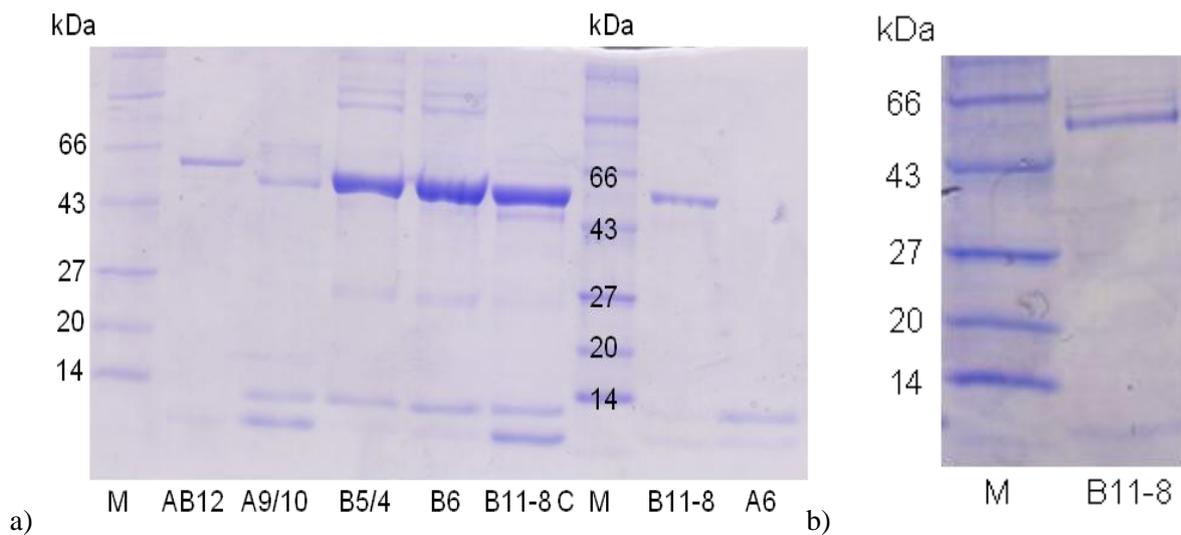


Abb. 5-65: Dokumentation der FPLC Aufreinigung von a) HrmO_2A (siehe Abb. 5-64) und b) $\text{O}_2\text{f}_\text{A}$ (siehe Abb. 9-19) jeweils mit HrmR . M= Marker; B9/10, B5/4; B6; A6=TCA-Präzipitate von nicht verwendeten Fraktionen; B 11-8=Assayfraktion von $\text{HrmO}_2\text{A}/\text{O}_2\text{f}_\text{A}$; C=konzentriert

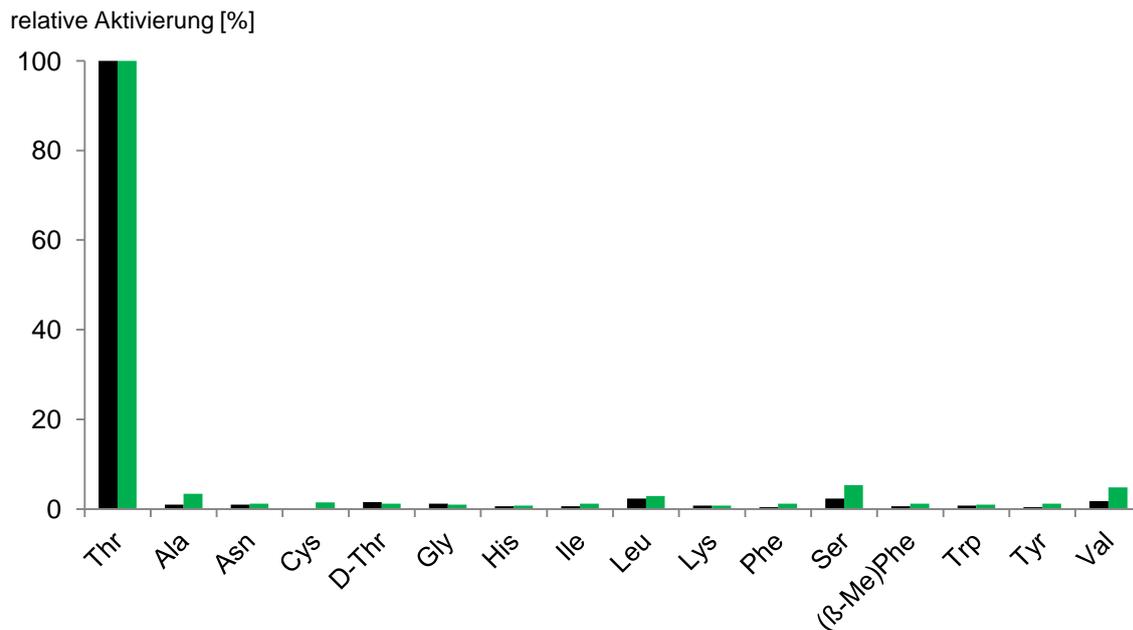


Abb. 5-66: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO_{2A} (schwarz) und O_{2fA} (grün) mit HrmR nach FPLC im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-8). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Die Selektivitäten beider Domänen nach der FPLC zeigen eine dramatische Veränderung zu vorher (vergleiche Abb. 5-63 und 5-66): Die Enzyme sind nun äußerst selektiv für L-Threonin als Substrat. Die Aktivität für Valin (vorher 77,5% von L-Thr für HrmO_{2A}) ist fast komplett verschwunden, auch die anderen Aktivitäten (z. B. Ile, Leu, Phe) scheinen nicht von der A-Domäne selbst, sondern von falsch positiven Aktivitäten durch andere, aktivierende Proteine aus *E. coli* verursacht worden zu sein. Durch die endgültige Isolierung der A-Domäne konnten diese Aktivitäten beseitigt werden. Ein direkter Vergleich der Umsätze beider Domänen läßt sich über die Peakflächen in den FPLC-Chromatogrammen ziehen. Tabelle 5-14 zeigt das Ergebnis: Die kombinatorisch erzeugte Domäne, die in großen Teilen nur noch 52% (O3L) bzw. 63% (O3R) Sequenzidentität mit der nativen Domäne HrmO_{2A} besitzt, hat immerhin noch über die Hälfte ihrer Aktivität (57,6%). Das ist, verglichen mit anderen kombinatorischen Ansätzen (vgl. Abschnitte 3.2.1 und 3.2.3), ein sehr guter Wert. Die starken Änderungen in den äußeren Sequenzabschnitten haben also neben der Tatsache, daß sie keinerlei Einfluß auf die Substratspezifität besitzen, auch geringen Einfluß auf die Konformation des Enzyms.

Tab. 5-14: Vergleich der Umsätze der aufgereinigten A-Domänen HrmO_{2A} und O_{2fA} mit HrmR

Protein	Peakfläche (Abb. 5-66, 9-19)	Umsetzung von L-Thr (Tab. 9-8)	Relative Aktivität
HrmO _{2A}	87,6774	52,0%	100%
O _{2fA}	120,7705	41,3%	57,6%

Valin/Isoleucin aktivierende Domänen

Die bioinformatische Voraussage für die A-Domäne HrmP2_A ist nicht eindeutig: Das Programm NRPSPredictor2²⁰² sagt sowohl Valin als auch Isoleucin als mögliches Substrat des Enzyms voraus. Bemerkenswert ist, dass sich der nächste Verwandte, eine Valin-aktivierende Domäne, im nichtribosomalen Code durch nur eine Aminosäure von HrmP2_A unterscheidet, wohingegen die nächste Isoleucin-aktivierende Domäne dort in drei Aminosäuren abweicht (vgl. Tab. 3-3). Indes wird *in vivo* Isoleucin in die Peptidkette eingebaut, was aus der Struktur des Hormaomycins (**13**) offensichtlich ist.

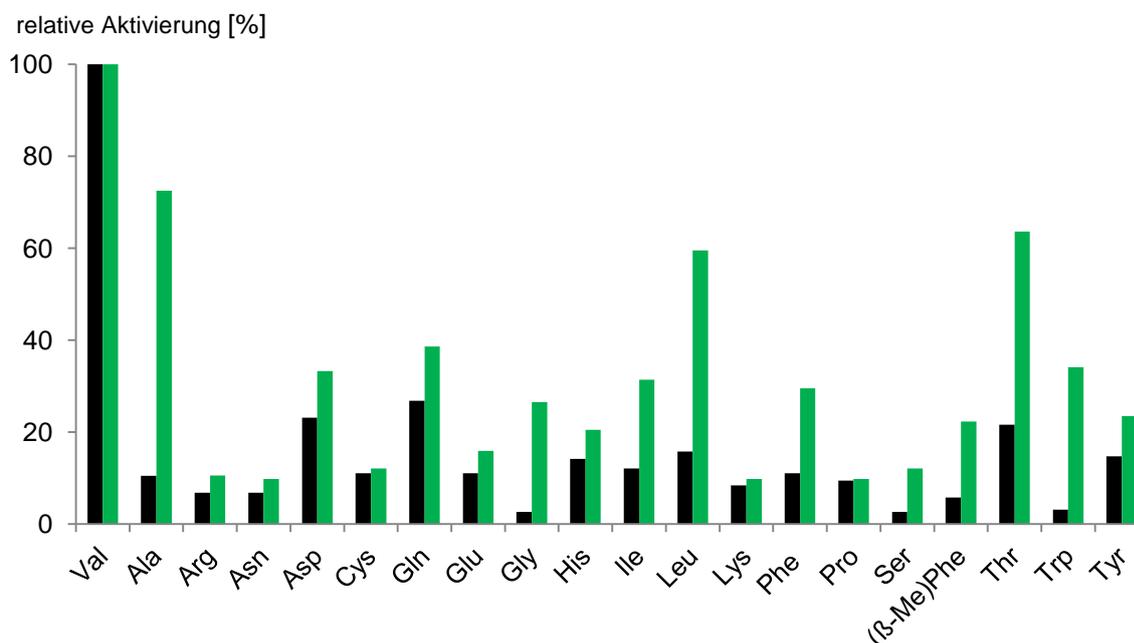


Abb. 5-67: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP2_A (schwarz) und P2f_A (grün) mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (vgl. Tab. 9-9). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

HrmP2_A zeigt coeluiert mit HrmR tatsächlich eine Präferenz für das Substrat Valin (siehe Abb. 5-67). Auch die konstruierte A-Domäne P2f_A, bei der ein Großteil der Sequenz aus HrmO3_A stammt (siehe 5.4.2), aktiviert Valin bevorzugt, allerdings ist hier die Streuung bei anderen Aminosäuren auch größer. Das mag an der geringen Gesamtaktivität [maximal 19% bzw. 13% Aktivierung für Valin (Tab. 9-9)] trotz einer ausreichenden Proteinkonzentration im Assay (17,3 μ M bzw. 7,7 mM siehe Tab. 5-11) liegen. Weitere Aufreinigungsversuche mit FPLC wurden analog zu den vorherigen Enzymen durchgeführt, aber die konzentrierten Proteine konnten im anschließenden [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay keine Aminosäure selektiv (>4%) aktivieren (Daten hier nicht aufgeführt). HrmP2_A besitzt *in vitro* die geringste Aktivität der Hormaomycin A-Domänen. Das ist dadurch zu erklären, daß das Enzym *in vivo* ein anderes Substrat aktiviert und möglicherweise nicht in seiner optimalen Konformation vorliegt. Dieses Phänomen ist bereits durch Mootz und Marahiel an A-Domänen des Tyrocidins (**18**) beobachtet und interpretiert worden.²⁶⁵ Möglicherweise zwingt die natürliche Umgebung des Enzyms in der NRPS das Enzym in eine andere Konformation. Eine Möglichkeit,

diese Hypothese zu untersuchen, wäre die heterologe Expression des ganzen Moduls HrmP2 (C-A-T) und dann die Untersuchung der Substratspezifität *in vitro*. Es besteht die Möglichkeit, dass diese A-Domäne in der Evolution aus einem Vorläufer entstanden ist, der bevorzugt Valin oder beide Aminosäuren aktivierte. Durch Selektionsdruck könnte es dann durch Mutationen eine Änderung der Substratspezifität zu Isoleucin gekommen sein. Eine andere Möglichkeit für diese Diskrepanz ist, dass die C-Domäne des nächsten Moduls eine stärkere Korrekturfunktion besitzt, indem sie das Isoleucyl-Peptidintermediat bevorzugt prozessiert. Solch eine Funktion ist für C-Domänen beobachtet worden (siehe Kapitel 3.2.2).¹¹⁷ Diese Funktion könnte in einer Expression der Hrm P3 C-Domäne und der Synthese des Heptapeptidintermediates der Biosynthese von Hormaomycin (**13**) (vergleiche Abb. 3-21), das an das HrmP2-PCP gebunden wird, nachgewiesen werden.

(4-Pe)Pro aktivierende Domäne

Die A-Domäne des Moduls HrmP3 sollte laut bioinformatischer Voraussage spezifisch für 4-Z-Propenylprolin [(4-Pe)Pro] (**69**) sein. Dieses Substrat lag zu Beginn der Studien nicht für *in vitro*-Assays vor; es wurde in der Arbeitsgruppe Piel von Christoph Kohlhaas nach Zlatopolskiy¹⁹⁷ synthetisiert (Daten hier nicht aufgeführt). Besonders interessant ist es, ob die A-Domäne flexibel hinsichtlich Änderungen in der Alkylseitenkette des 4-Z-Propenylprolins (**69**) reagiert. Hierzu wurde von Nik Schwarz in der Arbeitsgruppe Piel 4-Z-Ethynylprolin (**128**) (siehe Abb. 5-68) synthetisiert (Daten nicht aufgeführt), das ein mögliches Reagenz für „Klick-Chemie“ ist.

Eine mögliche Strategie zur Aufklärung des Wirkmechanismus von bioaktiven Stoffen ist es, Pull-down-Experimente zur Auffindung des molekularen Targets im Zielorganismus durchzuführen.^{266,267} Über „Klick-Chemie“^{268,269} kann dann das bioaktive Molekül über eine Alkynylgruppe zum Beispiel an ein Biotin, das eine Azidogruppe trägt, gebunden werden. Durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition entsteht *in situ* ein Triazol, eine kovalente Verbindung. Das Biotin kann dann wiederum über Avidinbeads immobilisiert werden. Anschließend kann das Proteintarget des bioaktiven Moleküls dann über massenspektrometrische Experimente identifiziert werden. Im Hormaomycin (**13**) eignet sich besagte Propenylseitenkette des (4-Pe)Pro (**69**) gut für die Derivatisierung in ein terminales Alkin. Das kann durch Totalsynthese oder aber durch Mutasyntese (siehe Abschnitt 3.3.1) über Fütterung von Ethynylprolin (**128**) geschehen. Abbildung 5-69 zeigt die kovalente Bindung eines hypothetischen Alkynylhormaomycins (**130**) an ein Biotinazid (**129**). Um zu evaluieren, ob HrmP3_A ein solches Ethynylprolin (**128**) akzeptiert, wurde das synthetisierte Molekül im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay eingesetzt.

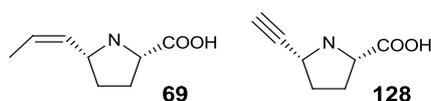


Abb. 5-68: 4-Z-Propenylprolin (**69**) und 4-Z-Ethynylprolin (**128**)

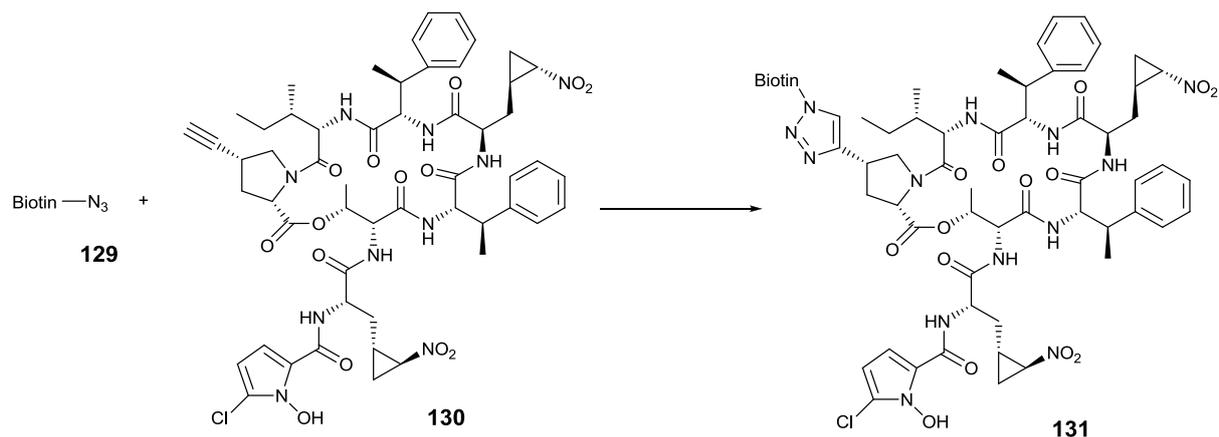


Abb. 5-69: hypothetische Reaktion eines Azidobiotins (**129**) mit Ethynylhormamycin (**130**) über „Klick-Chemie“

Abbildung 5-70 zeigt, dass HrmP3_A das natürliche Substrat (4-Pe)Pro (**69**) fast quantitativ (89,6%) umsetzen konnte. Das Analogon 4-Z-Ethynylprolin (**128**) wird zu 26% von **69** aktiviert. Dieser hohe Wert ist sehr vielversprechend für mutasynthetische Experimente.

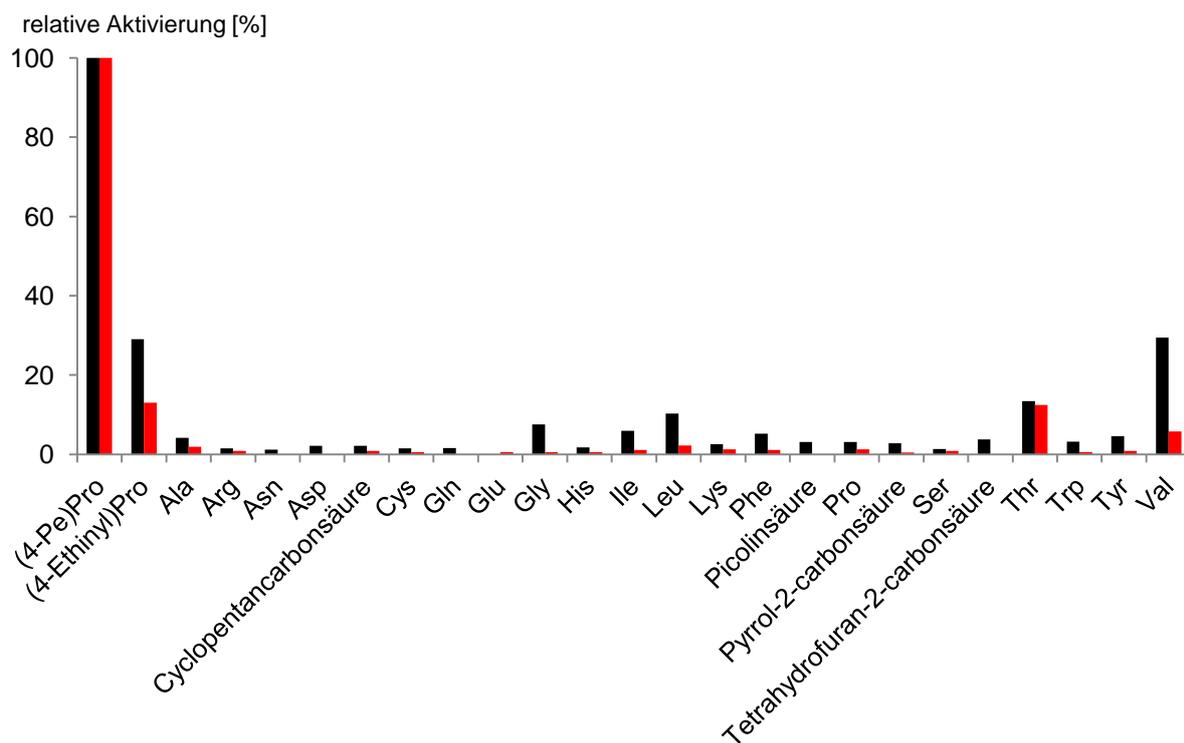
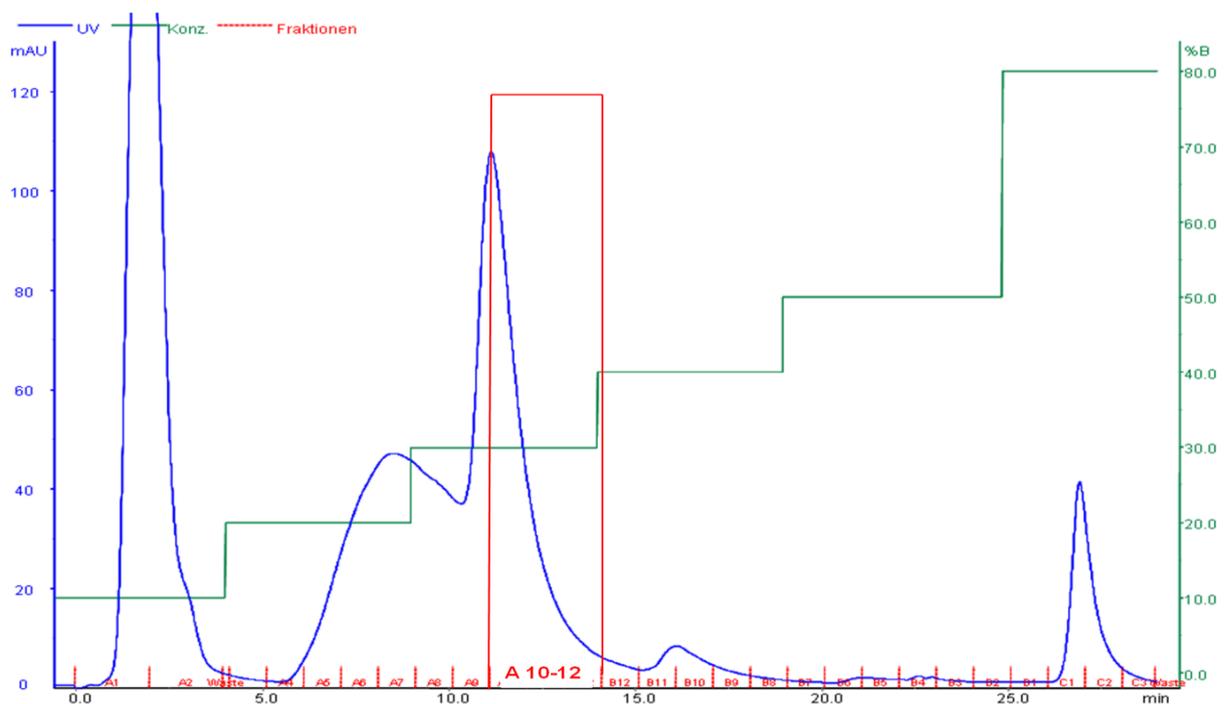


Abb. 5-70: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP3_A mit HrmR vor (schwarz) und nach (rot) FPLC-Aufreinigung im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay (siehe Tab. 9-10). Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Ein ungewöhnliches Ergebnis ist in dieser Messung die äußerst hohe Aktivität für Valin [26,4% von (4-Pe)Pro (**69**); gleichwertig mit Ethynylprolin (**128**)]. Möglicherweise lag auch hier eine Aktivität einer coeluierten Kontamination vor, wie in einigen obigen Ergebnissen (vgl. HrmO1_A). Um die falsch positive Aktivität zu reduzieren, wurde auch diese Fraktion mit FPLC weiter aufgereinigt. Mit der

entwickelten FPLC-Methode konnte ein Großteil der Hintergrundproteine aus der Elutionsfraktion entfernt werden. Allerdings ist auch diese Fraktion durch eine Kontamination verunreinigt (siehe Abb. 5-71). Die gesammelten und konzentrierten Fraktionen A 10-12 zeigen die höchste Reinheit. Mit diesen Fraktionen wurde der A-Domain-Assay wiederholt. In der Wiederholung des Assays konnte die (4-Pe)Pro-Aktivierung bestätigt werden (87,8% Umsatz). Die Aktivierungsrate vom Analogon, 4-Ethynylprolin (**128**), wurde zwar von 29% auf 13% des 4-Propenylprolins (**69**) verringert, jedoch war die Aktivität weiterhin die zweithöchste der getesteten Substrate. Die außerordentlich hohe Aktivierung von Valin wurde von fast 30% auf nur noch 5% reduziert. Auch diese Aktivität war also zumindest zu einem gewissen Maße als falsch positiv anzusehen.

a)



b)

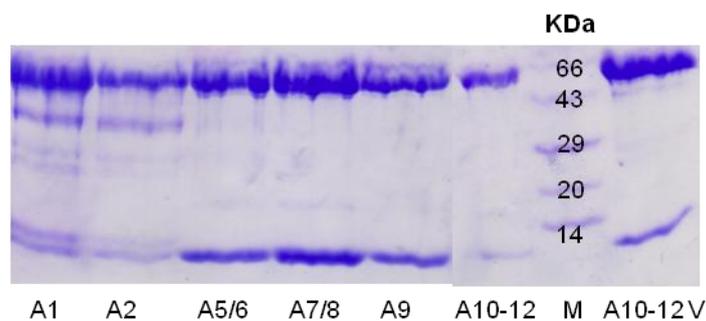


Abb. 5-71: a): Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von HrmP_{3A}. Blaue Spur: UV-Absorption grüne Spur: Konzentration NaCl; Rote Zahlen: gesammelte Fraktionen. A10-12 wurden für die Wiederholung des Assays eingesetzt. b): Dokumentation von 5-71 a): SDS-PAGE-Gel (15%, Tricin). A1-A9 = TCA-Präzipitate der Fraktionen; A10-12 = Konzentrat (500 μ L) der gesammelten Fraktionen A10-12; M = Marker (Roth); A10-12V = Konzentrat (50 μ L) der gesammelten Fraktionen A10-12.

Fusionsdomänen mit Teilen aus *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Nach erfolgreicher Expression der A-Domänen A5f_A und H6f_A mit Inserts aus *S. coelicolor* A3(2) und anschließender Coelution mit HrmR wurden auch diese Enzymkomplexe im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay getestet. Allerdings konnte in mehreren Experimenten keine signifikante Umsetzung (>4% Austausch) der vorhergesagten Substrate Asparaginsäure und Hydroxyphenylglycin detektiert werden. (β -Me)Phe (**31**) wurde ebenfalls nicht aktiviert (Daten nicht aufgeführt). Auch die Zugabe von heterolog exprimiertem HrmR oder CdaX (siehe Abb. 5-48 a,b) führte nicht zur Verbesserung der Aktivität. Bei einer eingehenderen Analyse der ausgetauschten Fragmente wurde ersichtlich, dass in dem in dieser Arbeit vorgestellten Rekombinationsansatz nicht alle Aminosäurereste des aktiven Zentrums von HrmO3_A auf Basis des nichtribosomalen Codes^{79,80} ausgetauscht worden waren. Position 330 und 331 (relativ zu PheA) blieben in allen rekombinanten A-Domänen gleich. An beiden Positionen ist hier ein Alanin mit einer kleinen Aminosäureseitenkette (siehe Tab. 5-15). Der nicht erfolgte Austausch dieser Aminosäuren in den Kombinationen mit den Hormaomycin-A-Domänen (O2f_A, O4f_A, P2f_A) scheint keinen oder nur geringen Einfluß auf die korrekte Bindung des Substrates zu haben. Position 330 hat in PheA direkten Kontakt mit dem Substrat⁹⁴ und wird von hydrophoben Aminosäuren dominiert.⁷⁹ CdaPSI-A5_A trägt an dieser Position einen relativ großen Leucylrest. Die Mutation dieses Restes zu einem Alanylrest wie in HrmO3_A könnte Einfluß auf die Substratbindung haben. Position 331 wird von Challis et al.⁸⁰ zwar aus dem nichtribosomalen Code ausgeklammert, da die Seitenkette der Aminosäure in PheA von der Bindetasche wegweist, aber diese Position ist hochvariant unter A-Domänen mit verschiedenen Substraten und hat möglicherweise ebenfalls Einfluß auf die Substratbindung.⁷⁹ In CdaPSI-A5_A/H6_A ist an dieser Position ein Cystein bzw. Asparagin; Aminosäuren, die sich insbesondere durch ihre Polarität deutlich von Alanin unterscheiden.

Tab. 5-15: Aminosäuren 330 und 331 (relativ zu PheA) in den miteinander kombinierten A-Domänen. Alle in dieser Arbeit fusionierten Domänen besitzen hier die Aminosäuren von HrmO3_A, Alanin und Alanin (fett markiert).

Peptid	A-Domäne	Position	Position
		330 (PheA)	331 (PheA)
Hormaomycin	HrmO3	Ala	Ala
	HrmO2	Val	Ala
	HrmO4	Val	His
	HrmP2	Thr	Phe
CDA	CdaPSI-A5	Leu	Cys
	CdaPSI-H6	Val	Asn

Mutationen der fusionierten A-Domänen A5_A und H6_A an diesen Positionen zu den nativen Aminosäuren (Leu/Cys bzw. Val/Asn) könnten die bisher nicht aktiven Fusionsproteine möglicherweise aktivieren. Eine andere Strategie wäre die Konstruktion von neuen, fusionierten A-Domänen, wo ein etwas größerer Teil der zentralen Sequenz, und damit diese beiden Aminosäuren mit ausgetauscht werden.

Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit wurden umfassende Studien an den Adenylierungsdomänen der Hormaomycin-NRPS durchgeführt. Es konnten alle sieben A-Domänen in *E. coli* mit einem N-terminalen Octahistidinyltag exprimiert und isoliert werden. Die Enzyme wurden mit einem massenpektrometrisch basierten ATP-Austausch-Assay¹⁰⁹ charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass alle NRPS-A-Domänen für ihre volle *in vitro*-Aktivität das MbtH-artige Protein HrmR benötigen. HrmR konnte mit allen A-Domänen coexprimiert und coeluiert werden. Die Proteine interagieren miteinander und wurden in einem Komplex im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 eluiert. Die bioinformatisch vorhergesagten Substrate wurden selektiv aktiviert. Eine Ausnahme bildet HrmP2_A, das statt der nativ inkorporierten Aminosäure Isoleucin Valin bevorzugt aktivierte. Gründe dafür könnten eine Korrekturfunktion der folgenden C-Domäne oder eine andere Proteinkonformation in der NRPS-Umgebung *in vivo* sein. Die (3-Ncp)Ala-aktivierenden Domänen HrmO1_A und HrmO4_A haben eine gewisse Präferenz für die proteinogene Aminosäure Leucin (etwa 10% von (3-Ncp)Ala) (**27**). HrmO3_A und HrmP1_A können Phenylalanin zu etwa 10% von (β -Me)Phe (**31**), dem bevorzugten Substrat, aktivieren. Ein Chloratom in *para*-Position des Phenylrings wurde nicht toleriert, ebensowenig wie eine Methylgruppe in der α -Position. Für die (4-Pe)Pro-aktivierende Domäne HrmP3_A wurde ein Ethinylprolin (**128**) getestet, das zu etwa 20% von (4-Pe)Pro (**69**) umgesetzt werden konnte. Diese Aminosäure soll in mutasynthetischen Experimenten einer Deletionsmutante des Hormaomycinproduzenten, in dem die (4-Pe)Pro-Biosynthese unterbrochen ist, zugefüttert werden. Ein entstehendes Ethinylhormaomycin (**130**) könnte, falls es aktiv ist, in Pull-down-Experimenten über „Klick-Chemie“ kovalent an einen fluoreszierenden Marker gebunden werden, um Informationen über das molekulare Target von Hormaomycin zu erhalten.

Einige der über Ni-NTA-Affinitätschromatographie isolierten Proteinfractionen wurden über FPLC weiter aufgereinigt und erneut getestet. In diesem Reinigungsschritt konnten unspezifische, falsch positive Aktivitäten von coeluierten Proteinen aus *E. coli* BL21(DE3), die hauptsächlich Threonin und Valin aktivierten, reduziert und teilweise ganz entfernt werden. An HrmO2_A und O2f_A konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass bei vollständiger Isolierung des Proteins durch FPLC alle falsch positiven Aktivitäten eliminiert werden konnten (vgl. Abb. 5-63 und 5-66). Das Phänomen einer unerwarteten Aktivierung von Threonin aus einer A-Domänen-Aufreinigung aus *E. coli* BL21(DE3) wurde auch von Erol et al. an den Corallopyonin-A-Domänen beobachtet.²⁶⁴ Phelan et al., die den [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay entwickelten, beobachteten in ihrem Labor falsch positive Umsetzungen von Tryptophan für einige A-Domänen (Brian Bachmann, persönliche Mitteilung). Diese falsch positiven Aktivitäten scheinen also öfter in A-Domänen-Assays aufzutreten, werden aber selten publiziert. Interessanterweise waren die Aktivitäten durch diese Kontaminationen für Threonin und Valin in den Assays nicht immer reproduzierbar, wohingegen „wahre“ Substrate vom Enzym immer wieder, auch aus gefrorenen Enzymchargen, umgesetzt wurden. Auch wurde immer das gleiche Protokoll für

die Ni-NTA-Aufreinigung benutzt; daher ist es erstaunlich, dass einerseits manche Aufreinigungen keine falsch positiven Aktivitäten zeigen, und andererseits die Aktivität zwischen Valin, Threonin und Leucin schwankt. Für einen Ausschluß von solchen falsch positiven Aktivitäten sollten A-Domänen in diesem Assay daher grundsätzlich in einem weiteren Reinigungsschritt anschließend an die Ni-NTA-Chromatographie isoliert werden.

Weiterhin wurden fünf A-Domänen mit Fusions-PCR erzeugt, in denen ein zentraler Part der Sequenz von HrmO3_A (etwa 120 Aminosäuren) gegen Teile aus anderen A-Domänen ausgetauscht wurde. Es wurden drei A-Domänen der Hormaomycin für diese Fusionen ausgesucht, HrmO2_A, HrmO4_A und HrmP2_A. Außerdem wurden zwei Teile von A-Domänen der NRPS des Antibiotikums CDA aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), die Aspartat und Hydroxyphenylglycin aktivieren, mit HrmO3_A fusioniert. Homologiemodelle der fünf rekombinanten Proteine sagen eine große Wahrscheinlichkeit für eine Funktionalität der neuen Proteine voraus. Alle fünf Fusionsproteine konnten in *E. coli* in gleichen Ausbeuten wie die nativen A-Domänen mit HrmR coexprimiert und coeluiert werden (siehe Abb. 5-48, Tab. 5-10). Die drei Fusionsdomänen aus der Hormaomycin-NRPS zeigen im Assay die gleiche Substratspezifität und die gleiche, oder nur eine leicht verringerte Aktivität wie die nativen A-Domänen der kleinen, zentralen Teile der Domäne. Das zeigt, dass hier die Substratspezifität der Enzyme nur durch diesen Teil determiniert wird. Die Substratspezifität von HrmO3_A konnte also durch den Austausch dieses Teiles von (β -Me)Phe (**31**) mit geringen Aktivitätseinbußen dramatisch zu (3-Ncp)Ala (**27**), Threonin und Valin geändert werden. Außerdem scheint ein Austausch einer so großen Aminosäuresequenz die intakte Tertiärstruktur des Enzym nur gering zu beeinflussen. Dies unterstützt die Hypothese, dass diese Sequenzen während der Evolution rekombiniert worden sind. Interessant wäre es, Reaktionskinetiken der A-Domänen aufzunehmen, um die Umsetzungen der Substrate noch besser miteinander vergleichen zu können.

Die Fusionen mit den zentralen Teilen der CDA-A-Domänen zeigten keine Aktivität. Um zu testen, ob das MbtH-artige Protein einen Einfluß auf die Aktivität besitzt, wurde das MbtH-artige Protein aus dem CDA-Gencluster, CdaX mit den beiden Enzymen coexprimiert. Aber auch diese coexprimierten Proteinkomplexe waren nicht aktiv, auch nicht, wenn separat exprimiertes MbtH-artiges Protein (HrmR oder CdaX) dem Assay hinzugegeben wurde. Der Grund für die fehlende Aktivität könnte in zwei Aminosäuren im aktiven Zentrum liegen, die in den Fusionen nicht mit ausgetauscht wurden. In CdaPSIA5_A und H6_A liegen hier Leucyl- und Valylreste, die mit dem gebundenen Substrat interagieren. Der in HrmO3_A an dieser Position liegende Alanylrest ist hier möglicherweise sterisch nicht groß genug für die Interaktion. Die Aminosäurereste an Position 331 sind variabel und werden möglicherweise auch für die Substratbindung benötigt. Um diese Hypothese zu untersuchen, müssten die genannten Aminosäuren zu den in der nativen A-Domäne vorliegenden mutiert werden, oder ein etwas größerer Teil der Sequenz von CdaPSIA5_A und H6_A mit HrmO3_A fusioniert werden. Diese beiden Aminosäuren sind auch in den Hormaomycin-A-Domänen variabel, haben aber offensichtlich

keinen oder nur geringen Einfluss auf die Substratbindung. Möglicherweise sind die fusionierten Proteine aber auch nicht korrekt gefaltet, um eine Substrat korrekt binden und umsetzen zu können. Das könnte durch Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie untersucht werden.

Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass ein Austausch dieser zentralen Teile der A-Domäne durch Rekombination während der Evolution vorgefallen sein könnte. Rekombination von DNA-Fragmenten ist eine treibende Kraft in der Evolution der Gencluster von Sekundärmetaboliten, wie in Abschnitt 3.3.2 dargelegt. Rekombinationen von NRPS-Clustern sind bisher hauptsächlich in strukturell sehr ähnlichen NRPS in Cyanobakterien observiert worden. Hier wurden *in silico* Rekombinationen von ganzen A-Domänen,^{105,106} multiplen Regionen¹⁰⁷ oder Modulen¹⁷⁴ postuliert und mit der beobachteten Produktvielfalt korreliert. In der Hormaomycin-NRPS scheint es dagegen innerhalb des Genclusters zu Rekombinationen von zentralen Teilen der A-Domänen gekommen zu sein. In dieser Arbeit wurden Beobachtungen, die *in silico* gemacht wurden, experimentell durch *in vitro* erzeugte, rekombinante A-Domänen verifiziert. Die Ergebnisse der Experimente zeigen, dass es zumindest im Hormaomycinsystem möglich ist, durch einfachen Austausch von Regionen, die die Substratspezifität beinhalten, diese im Labor nach Wunsch zu ändern. Die Substrate der rekombinierten A-Domänen sind teilweise chemisch sehr verschieden [vergleiche (β -Me)Phe (**31**) und (3-Ncp)Ala (**27**)]. Mit der vorgestellten Methode sind in dieser Studie an der A-Domäne dramatischere Änderungen der Substratspezifität möglich, als mit bisher publizierten.^{79,99} Außerdem haben die *in vitro* erzeugten Enzyme in dieser evolutionsbasierten Studie eine weitaus höhere Aktivität als in einer computerbasierten, wo es ähnlich dramatische Spezifitätsänderungen gab.¹⁵⁶ Auf die resultierende Aktivität der mutierten A-Domäne ist dieser evolutionäre Ansatz also dem informatischen überlegen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen neue, auf der Evolution basierende Strategien für die kombinatorische Biosynthese von nichtribosomalen Peptiden auf. Eine rationale Rekombination von diesen zentralen Teilen der Enzyme könnte zumeist auftretende dramatische Verluste in der Produktion dieser kombinatorisch erzeugten Peptide durch Austausch von ganzen Domänen signifikant verringern und gleichzeitig größere strukturelle Veränderungen in den kombinatorisch erzeugten Peptiden ermöglichen. Allerdings bleibt abzuwarten, ob sich die *in vitro*-Ergebnisse auch auf andere Spezifitäten aus fremden Systemen ausweiten lassen, wie anhand der Rekombination mit den *S. coelicolor*-A-Domänen diskutiert wurde. Außerdem ist diese Besonderheit der Hormaomycin-A-Domänen nicht einfach auf andere Systeme übertragbar. Auch ist nicht klar, ob sich die *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Experimente übertragen lassen können. Hier sind außerdem die anderen Biosynthesenzyme, wie die C-Domänen der NRPS zu berücksichtigen. In der Hormaomycin-NRPS wäre außerdem eine selektive Rekombination von A-Domänenabschnitten *in vivo* aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit über weite Teile der A-Domänen schwer durchzuführen.

5.5 Biologische Studien an Hormaomycin

5.5.1 Fermentation von Hormaomycin

Um eine möglichst hohe Menge Hormaomycin (**13**) für biologische Studien zu isolieren, wurde *Streptomyces griseoflavus* W-384 analog zu vorangehenden Arbeiten fermentiert.²⁰⁰ Es wurde eine Vorkultur in 50 ml NM6 (siehe 6.2.1) angesetzt und bei 180 rpm und 27 °C für 48 h inkubiert. Die Vorkultur wurde dann in einem sterilen Labfors 10 l Fermenter mit 1,5 l NM10 (siehe 6.2.1) versetzt und für 72 h bei 27 °C, einem pH von 6,5 und einer Luftzufuhr von 1,6 vvm fermentiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden nach 24 h über 10 Stunden eine Lösung von 3 mmol Pyrrol-2-carbonsäure (**102**) in 75 ml sterilem Wasser zur Kulturbrühe gepumpt. Diese Zugabe hat in früheren Studien zu einer Erhöhung der Hormaomycinausbeuten geführt.²⁰⁰ Durch Zentrifugation wurde das Mycel vom Medium getrennt, letzteres wurde, da es kein Hormaomycin (**13**) enthielt, verworfen. Das Mycel wurde nach Lyophilisation und Mörsern mit 3x 450 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde mit kaltem Pentan gewaschen. Der trockene Rohextrakt wurde in Methanol/Acetonitril gelöst und an einem präparativen HPLC-System (siehe Abschnitt 6.8) aufgetrennt. Ein Bild der Trennung des Rohextraktes ist in Abbildung 5-72 zu sehen. Der Peak bei $t_R=26,2$ min ist Hormaomycin (**13**). Die Identität wurde durch ein hochauflösendes Massenspektrum der Fraktion und durch ¹H-NMR bestätigt (Abb. 9-25, Anhang). Es wurden 2 mg Hormaomycin isoliert. Die Substanz wurde für Aktivitätsassays und Studien zum Wirkmechanismus in den Arbeitsgruppen Sahl und Hörauf (Universität Bonn) eingesetzt. In weiteren Fermentationsansätzen, die alle mit den gleichen Parametern durchgeführt wurden, konnte Hormaomycin nur in Spuren detektiert werden (Daten hier nicht aufgeführt). Insgesamt hat sich trotz exakter Befolgung des Protokolls von Radzom²⁰⁰ die Hormaomycinproduktion des Stammes von 40 mg/L auf 1,3 mg/L reduziert. Das gleiche Phänomen wurde parallel in der Arbeitsgruppe Zeeck in Göttingen (persönliche Mitteilung von Axel Zeeck) beobachtet. *S. griseoflavus* W-384 scheint also mit der Zeit unter Laborbedingungen die Fähigkeit zur Biosynthese von Hormaomycin (**13**) zu verlieren. Die Gründe hierfür sind unbekannt.

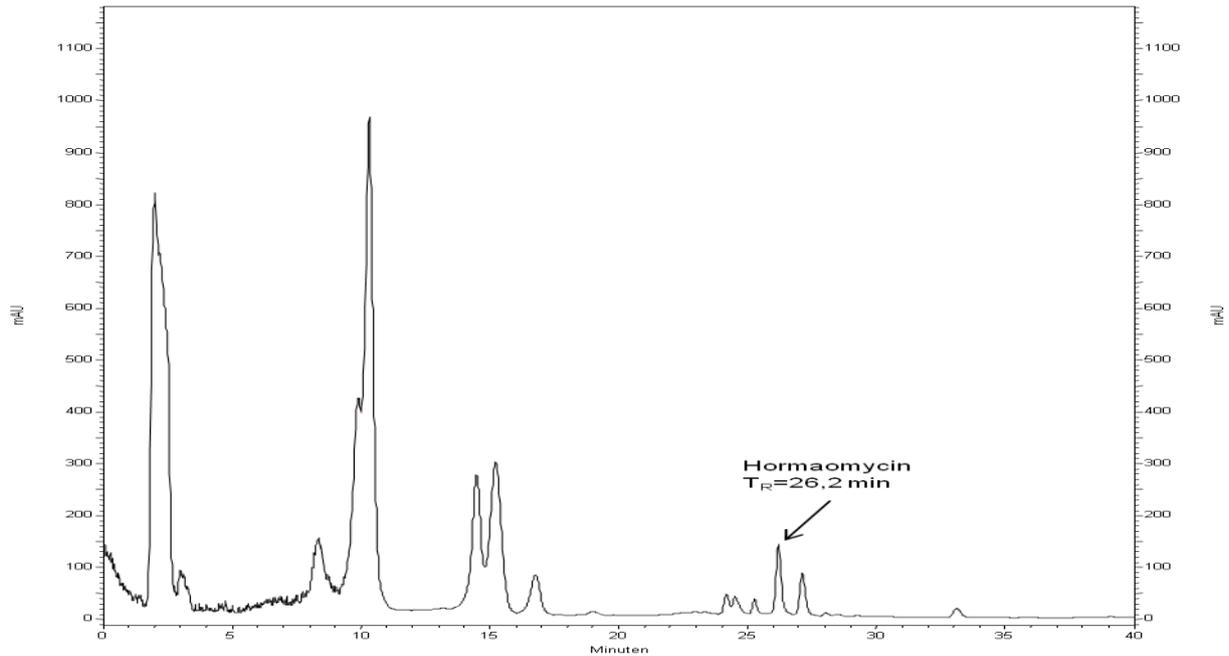


Abb. 5-72: HPLC-Chromatogramm (230 nm) des Ethylacetat-Rohextraktes einer Fermentation von *S. griseoflavus* W-384.

5.5.2 Isolierung und Strukturaufklärung natürlicher Hormaomycinanaloge

Da der Hormaomycinproduzent im Laufe der Zeit Hormaomycin (**13**) nur noch in eingeschränkten Mengen produzierte (siehe 5.5.1), wurde nach einem Weg gesucht, die Hormaomycintiter in der Fermentation zu erhöhen. Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten ist in Streptomyeten komplex reguliert.²⁵ Einige Aspekte sind in Kapitel 3.1 diskutiert worden. Eine Möglichkeit, die Produktion von Sekundärmetaboliten zu erhöhen, ist die Überexpression von positiven Regulatorgenen im Gencluster des Metaboliten.²⁷⁰ Im Hormaomycingencluster ließen sich durch Sequenzvergleiche gleich drei putative Regulatorgene, *hrmA*, *hrmB* und *hrmH* detektieren. *hrmA* und *hrmB* wurden aufgrund von Sequenzvergleichen (siehe Tab. 3-2) als putative positive Regulatoren der SARP-Familie (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins) identifiziert. Nach der Konstruktion eines Überexpressionsstammes des Regulatorgens *hrmB* durch Xiaofeng Cai zeigte sich in der HPLC-Analyse einer Fermentation, dass nicht nur die Produktion von Hormaomycin dramatisch gesteigert wurde (135-fach), sondern auch neue Peaks in der Analyse erschienen. Diese Peaks stimmten mit dem UV-Spektrum des Hormaomycins (**13**) weitgehend überein. Zusätzlich wurden in der HPLC-ESI-MS für diese Peaks ähnliche Massen zu **13** detektiert. Diese Substanzen wurden also als natürliche Analoga des Hormaomycins vermutet, die während der Biosynthese durch eine relaxierte Substratspezifität der biosynthetischen Enzyme entstehen. Eine Isolierung und Strukturaufklärung dieser Analoga gibt einerseits Einblicke in die Biosynthese des Hormaomycins (**13**). Außerdem können durch Testung der Analoga und Vergleich der Aktivitäten zu **13** neue Struktur-Wirkungsbeziehungen erhalten werden.

Die Isolierung und Strukturaufklärung der Analoga wurde in der Universität Neapel im Labor von Prof. Alfonso Mangoni durchgeführt. Eine Fermentation eines Überexpressionsstammes von *hrmB*, XC13, in 900 mL Production medium (siehe 6.2.1) in Kulturgrößen von jeweils 50 mL ergab nach zweimaliger Extraktion mit Ethylacetat 624 mg Trockenextrakt. Dieser wurde mittels HPLC unter isokratischen Bedingungen auf einer semipräparativen C18-Säule aufgetrennt (siehe Kapitel 6.11.1). Es wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die für eine Auftrennung von Hormaomycin (**13**) und Derivaten optimiert wurde. Das Laufmittel war ein Gemisch aus 75% Acetonitril und 25% Wasser, mit 0,1% TFA versetzt. Der Extrakt wurde im Laufmittel mit einer Konzentration von 18,75 mg/mL gelöst. Pro Injektion konnten für eine gute Trennung nur etwa 16 mg Extrakt (800 µl) injiziert werden, daher wurde diese Injektion zehn Mal wiederholt. Es wurden 30 Fraktionen gesammelt. Abbildung 5-73 zeigt ein Chromatogramm des Rohextraktes.

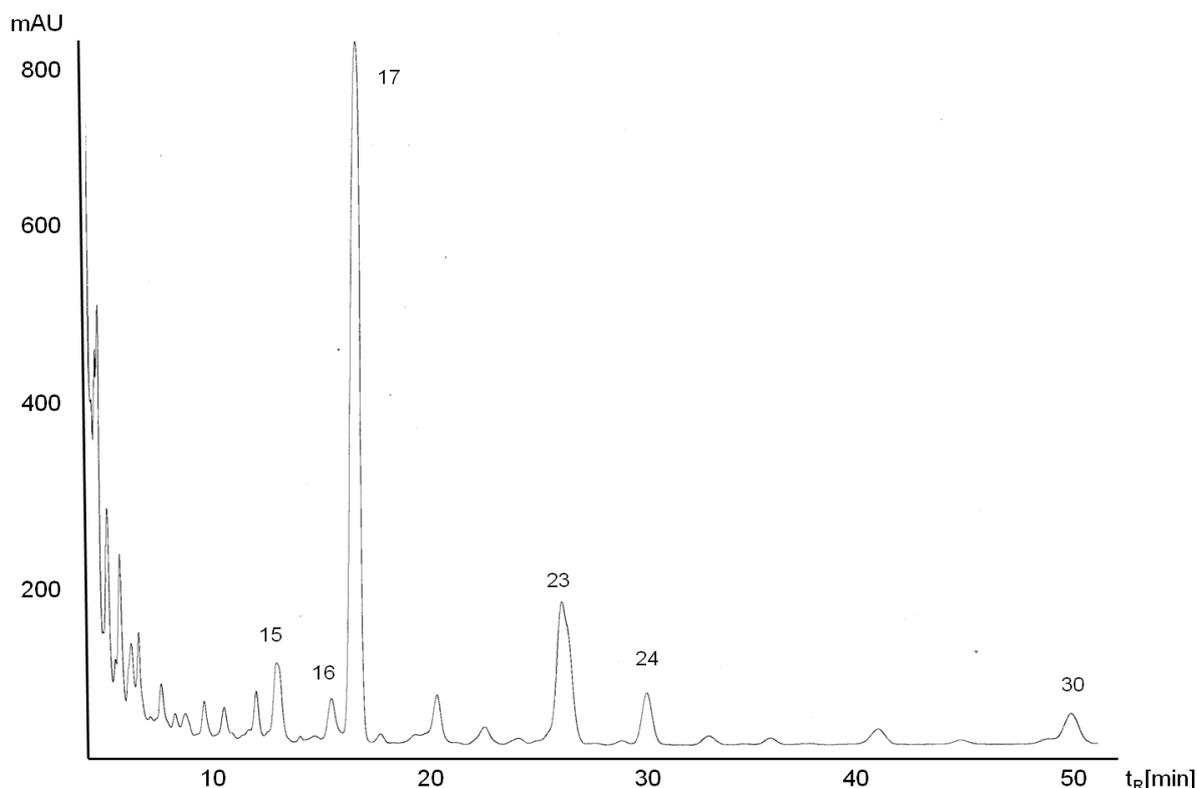


Abb. 5-73: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes der *hrmB*-Überexpressionsmutanten XC13 (273 nm). Isolierte Fraktionen sind numeriert

Hormaomycin (HRM) (**13**) wurde mittels HR-ESI-MS in Fraktion 17, der größten im Chromatogramm, nachgewiesen. Die Ausbeuten der Fraktionen 15, 16, 23, 24 und 30 (siehe Tab. 5-16) erlaubten im Folgenden eine NMR-spektroskopische Untersuchung. Eine ¹H-NMR-Analyse der Fraktionen gab erste Hinweise auf die neuen Strukturen, allerdings war für eine vollständige Strukturaufklärung die Reinheit der Fraktionen unzureichend.

Tab. 5-16: Übersicht über die isolierten Fraktionen aus dem Rohextrakt des *hrmB*-Überexpressionsstammes

Fraktion	Retentionszeit [min]	Ausbeute [mg]
15	12,5	2,8
16	15,3	1,1
17	16,2	11,8
23	26,0	4,8
24	30,0	1,5
30	50,0	3,4

Daher wurden im Folgenden die Fraktionen auf einer analytischen HPLC-Säule weiter gereinigt und die größten Peaks gesammelt. Da pro Injektion nur 1 mg (100 µl) aufgetragen werden konnte, wurden auch diese Injektionen wiederholt und die zusammengehörenden Fraktionen vereinigt. Die analytische HPLC wurde mit einem Methanol-Wasser-Gemisch durchgeführt, die Polarität des Gemisches wurde, um die HPLC-Läufe nicht unnötig zu verlängern, bei den höheren Fraktionen erniedrigt (siehe Tab. 5-17). Die Chromatogramme zeigten, dass die Fraktionen 15, 16 und 23 aus mehreren Komponenten bestanden, die Fraktionen 17, 24 und 30 aus nur einer (siehe Abb. 9-20 - 9-23, Anhang). Auf der analytischen Säule und in dem veränderten Fließmittel (Methanol/Wasser statt Acetonitril/Wasser) konnte eine höhere Trennschärfe erreicht werden, was zur vollständigen Auftrennung der Peaks führte. Die sieben so erhaltenen Reinsubstanzen wurden nun massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch analysiert.

Tab. 5-17: Übersicht über die in der analytischen HPLC der Fraktionen aus Abb. 5-75 erhaltenen Reinsubstanzen

Substanz	Fraktion	Fließmittel [MeOH:H ₂ O]	Retentions- zeit [min]	Exakte Masse [M+Na] ⁺	Ausbeute [mg]
1	15	85:15	7,8	1117,4930	0,9
2	15	85:15	8,5	1137,4392	1,0
3	16	85:15	9,5	1153,4699	1,1
Hormaomycin (13)	17	85:15	10	1151,4575	6,5
4	23	9:1	7,8	1237,4900	1,5
5	23	9:1	9,0	1108,4833	1,5
6	24	9:1	10,5	1108,4833	0,6
7	30	9:1	16,0	1065,5163	1,2

Von den Verbindungen wurden hochaufgelöste Massenspektren und Fragmentierungsspektren des Molekülpeaks (MS/MS) aufgenommen. Außerdem wurden ¹H-NMR-Experimente und, wenn nötig, zweidimensionale ¹H-¹H-COSY- und zTOCSY-NMR-Experimente durchgeführt. Die Messungen wurden, anders als zu vorhergehenden Studien^{61,200} in deuteriertem Methanol (CD₃OD) vorgenommen. Hier addierte sich nämlich das sonst verwendete CDCl₃ vermutlich radikalisch an die Substanzen und führte zu nicht analysierbaren Spektren (Daten nicht aufgeführt). In den folgenden Abschnitten wird die Strukturaufklärung der Hormaomycinanaloge beschrieben. Dabei wurde sich an den ebenso aufgenommenen Spektren für Hormaomycin (**13**) orientiert. Anhand der Unterschiede der Massen-

und NMR-Spektren ließen sich die Differenzen in den Strukturen aufklären. Abbildung 5-74 zeigt das aufgenommene MS/MS-Fragmentierungsspektrum von **13**. Den erhaltenen Massen ließen sich Molekülfragmente zuordnen. Die Seitenkette wurde über das Isocyanat **132** und **133** zuerst fragmentiert; über den Sechsring **134** kam es dann zur Abspaltung des α -Threonins und zum linearen Fragment **135** (vergleiche Abb. 5-74). Über Vergleiche der MS/MS-Fragmentierungsspektren der Analoga ließen sich die Positionen der Veränderungen gegenüber **13** bestimmen.

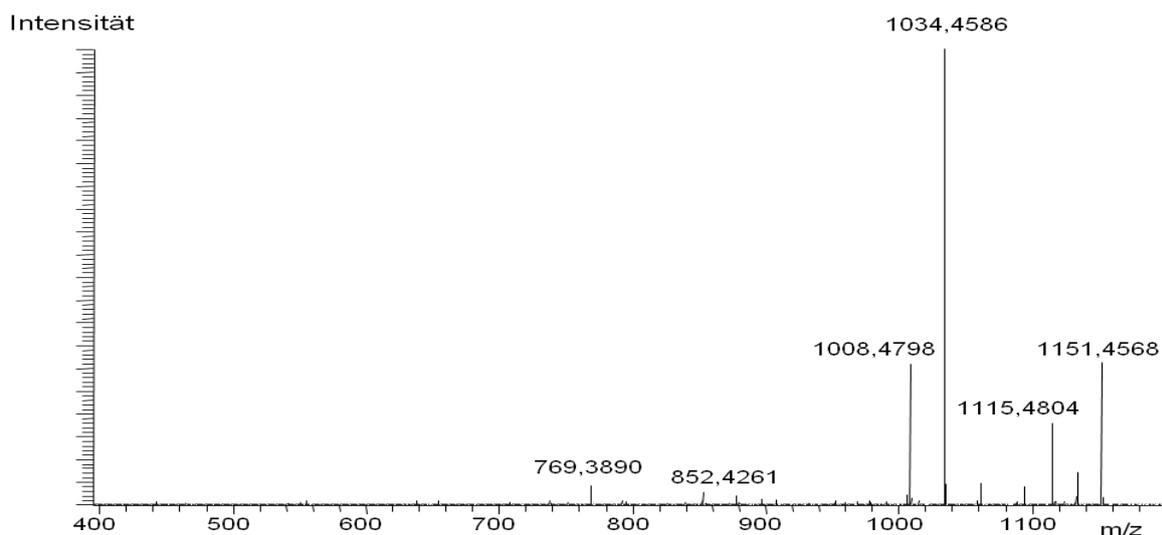


Abb. 5-74: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin (**13**)

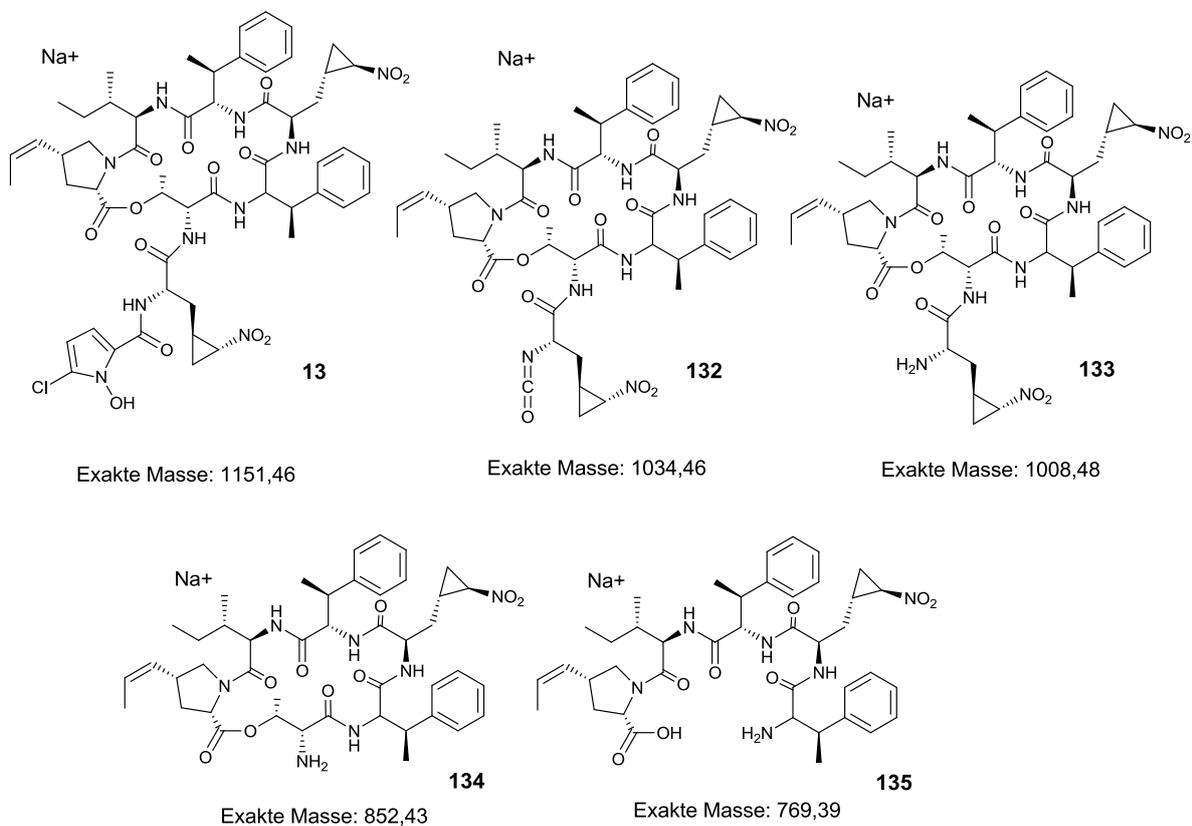


Abb. 5-75: Strukturen der in Abbildung 5-74 erhaltenen MS/MS-Fragmente von Hormaomycin (**13**)

Strukturaufklärung der Hormaomycinanaloga

Hormaomycin A1 (136)

Das Massenspektrum von Substanz 1 aus Tabelle 5-17 weist einen Molekülpeak von $m/z=1117,4930$ auf, was auf ein Hormaomycin-Na-Addukt ohne Chlor, dafür mit einem zusätzlichen Wasserstoff hindeutet ($C_{55}H_{70}N_{10}O_{14}Na_{calc}=1117,4971$). Die Analyse der MS/MS-Fragmentierung in Abbildung 5-76 zeigt, dass die Veränderung zum Hormaomycin (**13**) am terminalen Baustein der Seitenkette (Chcpa) erfolgt ist, da das Fragment mit der Masse $m/z=1034$ (**132**) wie im Hormaomycin (**13**) vorhanden ist (vgl. Abb. 5-75).

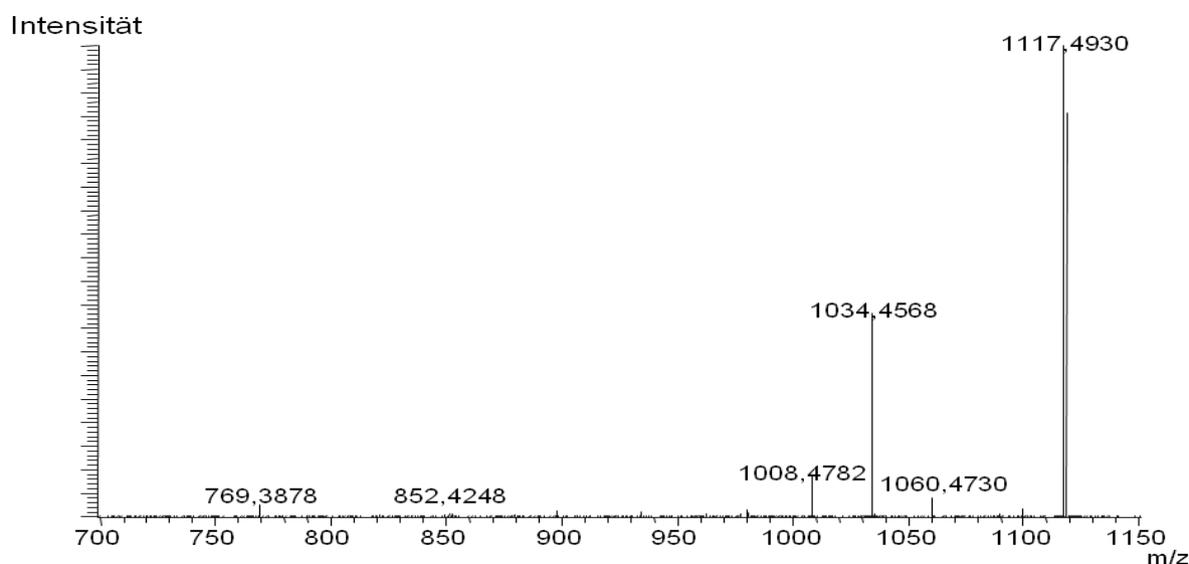


Abb. 5-76: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A1 (**136**).

Das vermutete Fehlen eines Chloratoms im Molekül lässt sich auch durch das veränderte Isotopenmuster zeigen, da das für Chlor charakteristische stark vertretene M+2-Isotop hier nicht detektiert wurde. Die Analyse des 1H -NMR-Spektrums (siehe Tab. 9-11) zeigt ein weitgehend identisches Signalmuster zu Hormaomycin, allerdings zeigen die Signale bei $\delta=6,79$ ppm (Chcpa 3) und $\delta=6,04$ ppm (Chcpa 4) eine Dublett-Dublett-Aufspaltung, statt eines Dubletts beim Hormaomycin (**13**), was auf ein zusätzliches Wasserstoffatom in der nächsten Umgebung (Chcpa 5) hindeutet. Außerdem ist bei einer Verschiebung von etwa 6,85 ppm schwach ein zusätzliches Signal zu erkennen (siehe Abb. 5-77). Dieses ist dem neuen Wasserstoff an Chcpa 5 zuzuordnen. Hormaomycin A1 (**136**) (Abb. 5-78) ist also ein Hormaomycinderivat ohne das im Verlauf der Biosynthese durch HrmQ angefügte Chlor. Die Tatsache, dass nur das Chlor fehlt, unterstützt die Hypothese, dass HrmQ eine singuläre Funktion in der Biosynthese der Chlorhydroxypyrrrolcarbonsäure (**93**) besitzt, und nicht für weitere Biosyntheseschritte, wie etwa die *N*-Hydroxylierung verantwortlich ist.

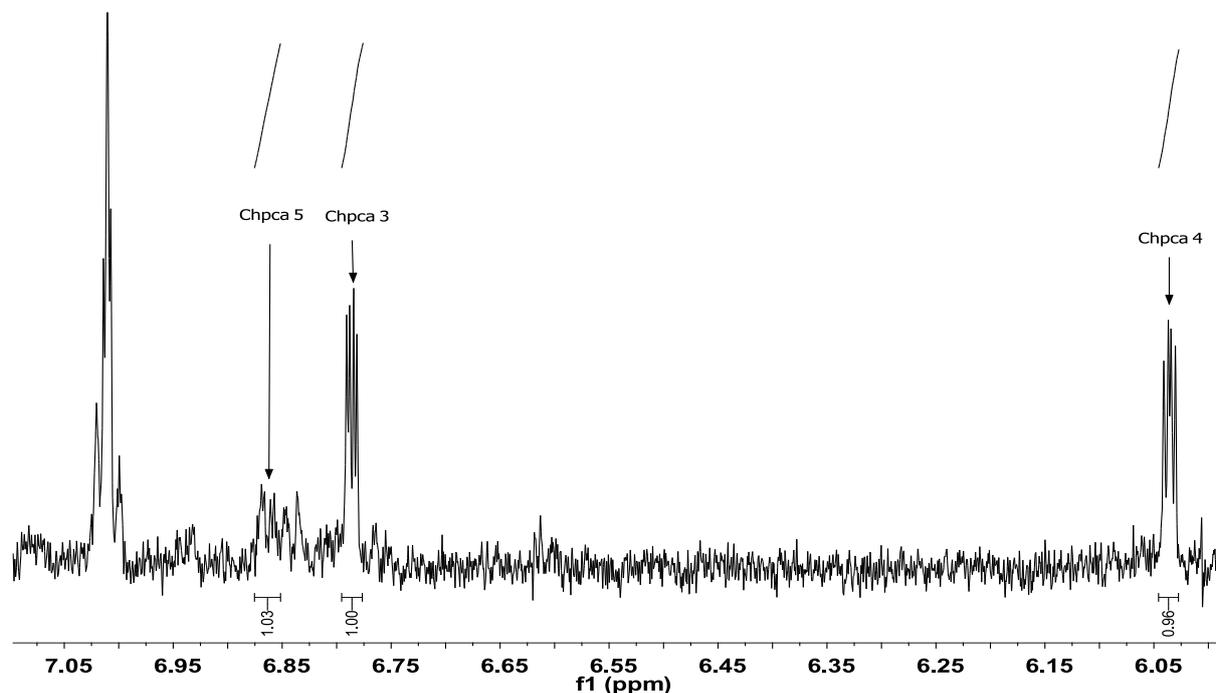


Abb. 5-77: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hormaomycin A1 (**136**) in CD_3OD , 700 MHz.

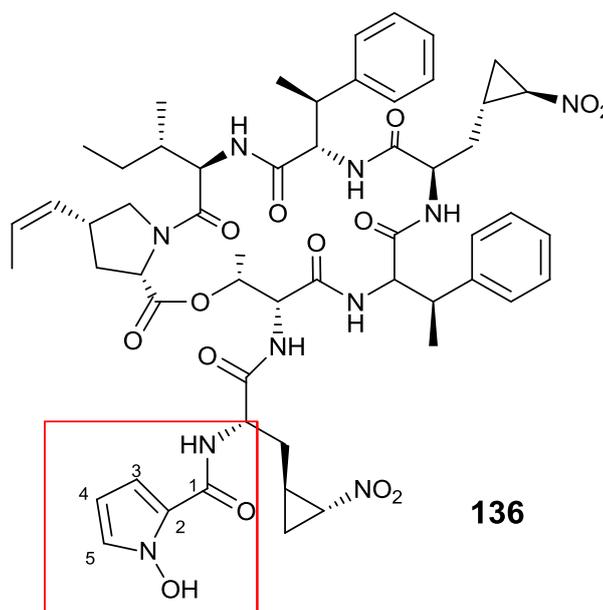


Abb. 5-78: Hormaomycin A1 (**136**). Die Kohlenstoffatome der Startereinheit sind nummeriert.

Hormaomycin A2 (**137**)

Das Massenspektrum von Substanz 2 aus Tabelle 5-17 zeigt einen Molekülpeak von $m/z=1137,4392$. Dies impliziert das Fehlen einer Methylgruppe im Vergleich zu Hormaomycin (**13**) ($\text{C}_{54}\text{H}_{67}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{ClNa}_{\text{calc}}=1137,4424$). Die MS/MS-Fragmentierung der Substanz (siehe Abb. 5-79) zeigt, dass diese Methylgruppe in einer der Aminosäure im Ringsystem fehlen muss, da die Massendifferenz

von 14 zu Hormaomycin (**13**) auch nach Abspaltung der ersten drei Aminosäuren erhalten bleibt [($m/z=755$ vs. $m/z=769$ (**135**)] (vergleiche Abb. 5-75).

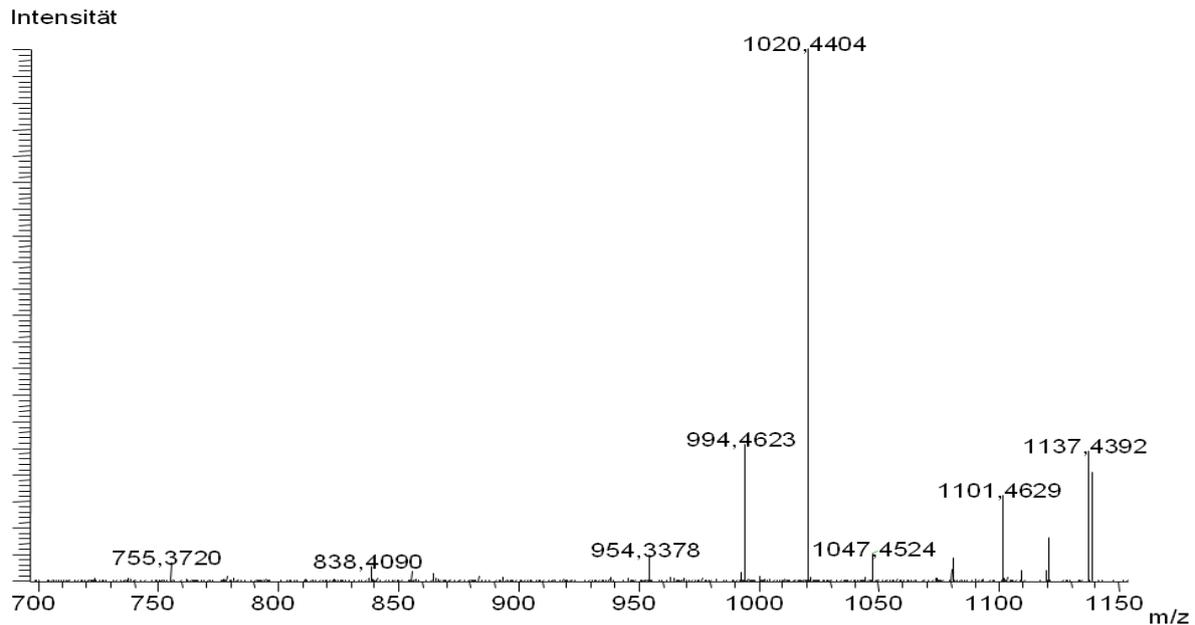


Abb. 5-79: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A2 (**137**).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung (siehe Abb. 9-28, Tab. 9-12) lässt durch Zuordnung der Signale einen Austausch einer der beiden β -Methylphenylalanine (**31**) gegen Phenylalanin (**35**) ausschließen, da die charakteristischen Dubletts bei $\delta=1,36$ ppm [(β -Me)Phe II] bzw. $\delta=1,20$ ppm [(β -Me)Phe II] im Spektrum weiterhin vorhanden sind. Bei genauerer Betrachtung des $^1\text{H-}^1\text{H-COSY-NMR}$ -Spektrums (Abb. 9-29) lassen sich im Spinsystem des Isoleucins Verschiebungen bzw. Fehlen von Signalen ausmachen. Während die Signale der Wasserstoffe an C2 eine weitgehend ähnliche Verschiebung zum Hormaomycin aufweist, zeigt H3 eine Kopplung zu zwei Dubletts bei $\delta=1,01$ ppm bzw. $\delta=0,99$ ppm (siehe Abb. 5-80). Das bedeutet, dass C3 mit zwei terminalen Methylgruppen verknüpft ist, anstatt mit einer Methylengruppe und einer Methylgruppe wie beim Hormaomycin (**13**). Statt Isoleucin wurde in der Biosynthese die um 1 Methylgruppe kleinere Aminosäure Valin in die wachsende Peptidkette eingebaut. Abbildung 5-81 zeigt die Struktur der aufgeklärten Substanz **137**.

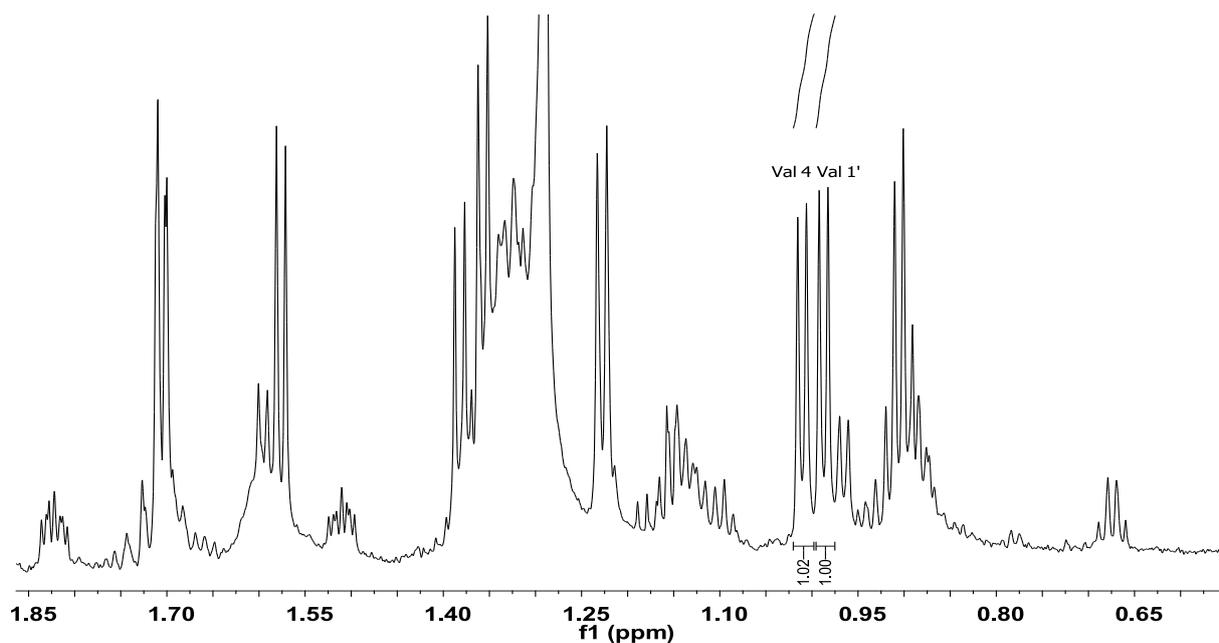


Abb. 5-80: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hormaomycin A2 (**137**) in CD_3OD , 700 MHz.

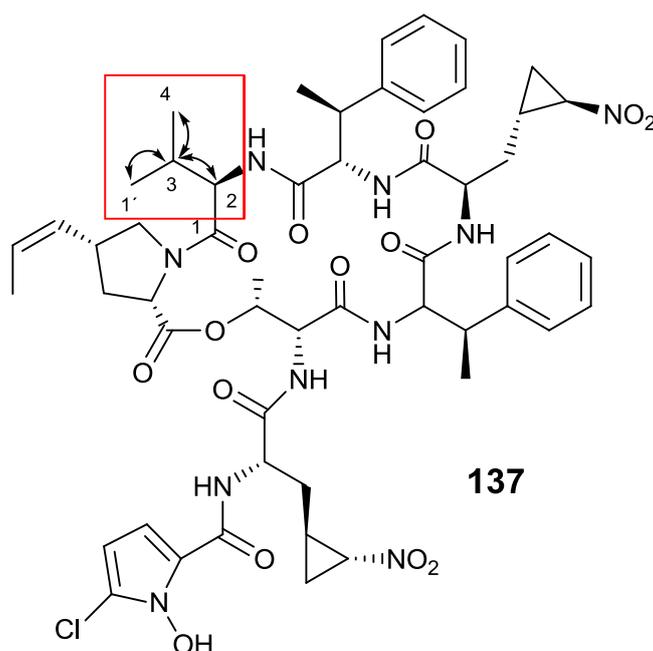


Abb. 5-81: Hormaomycin A2 (**137**). Die Kohlenstoffatome des eingebauten Valins sind nummeriert.

Hormaomycin A3 (**138**)

Für Substanz 5 aus Tabelle 5-17 wurde eine Molekülmasse von $m/z=1108,4833$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ detektiert, das entspricht einer berechneten Masse eines um 43 Da kleineren Hormaomycins ($\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{ClNa}_{\text{calc}}=1108,4887$). Eine MS/MS-Fragment von $m/z=726,417$ bestätigt, dass die Veränderung am Ringsystem des Hormaomycins (**13**) vonstatten gegangen sein muß (siehe Abb. 5-82, vergleiche Abb. 5-75).

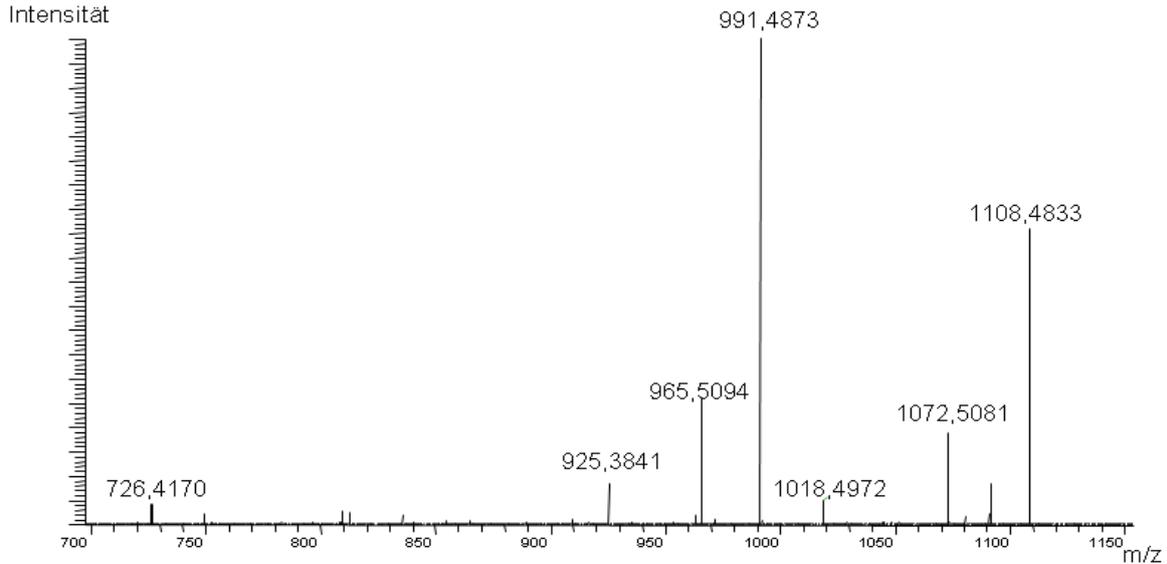


Abb. 5-82: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A3 (**138**)

Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (Abb. 5-83 und 9-30, Tab. 9-13) zeigt, dass charakteristische Signale im Hochfeldbereich, wie H3'b des (3-Ncp)Ala (**27**) I fehlen, und stattdessen Dubletts bei $\delta=0,53$ ppm und $\delta=0,62$ ppm im Spektrum erschienen sind. Die beiden Dubletts koppeln mit einem Multiplett bei $\delta=0,48$ ppm, dieses Spinsystem stellt also ein Propylensystem mit zwei terminalen Methylgruppen dar. Im $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ koppelt das Multiplett mit 2 Signalen bei $\delta=0,72$ ppm und $\delta=0,90$ ppm, von denen das erstere eine ddd-Aufspaltung hat, also mit 3 chemisch ungleichen H-Atomen koppelt (siehe Abb. 9-30). Ein Signal bei $\delta=3,66$ ppm und $\delta=7,80$ ppm komplettieren das Spinsystem, das zusammengefasst die Seitenkette der Aminosäure Leucin darstellt. Diese hat in diesem Analogon also das (3-Ncp)Ala (**27**) I ersetzt. Abbildung 5-84 zeigt die aufgeklärte Struktur.

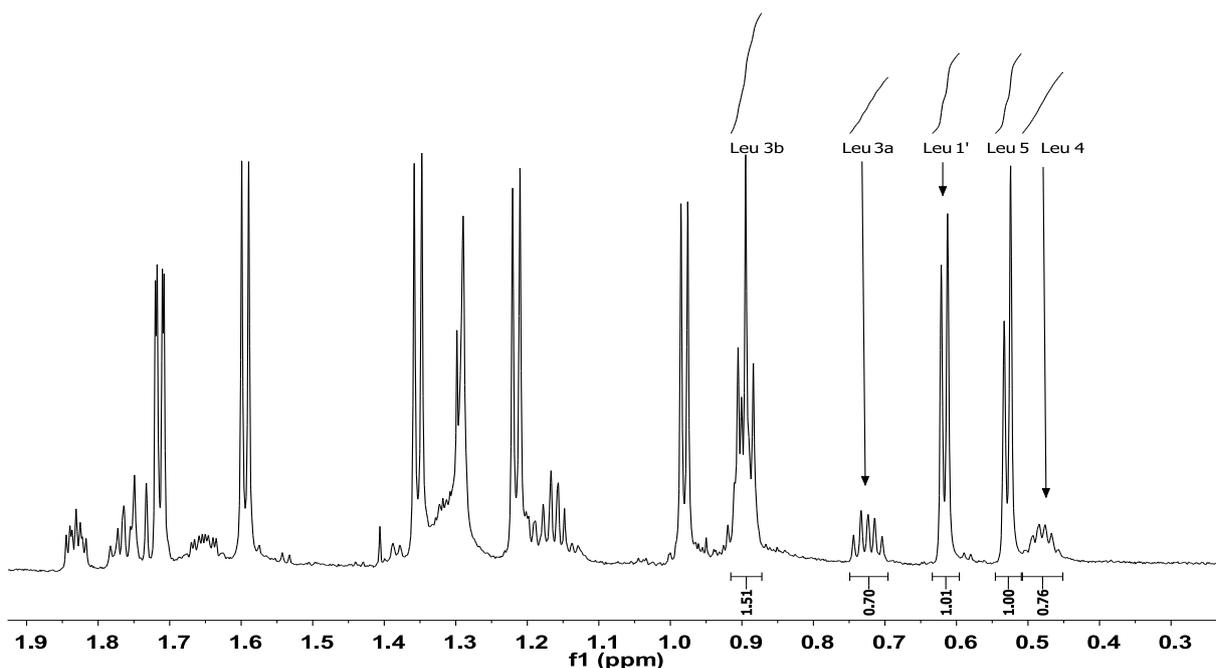


Abb. 5-83: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hormaomycin A3 (**138**) in CD_3OD , 700 MHz.

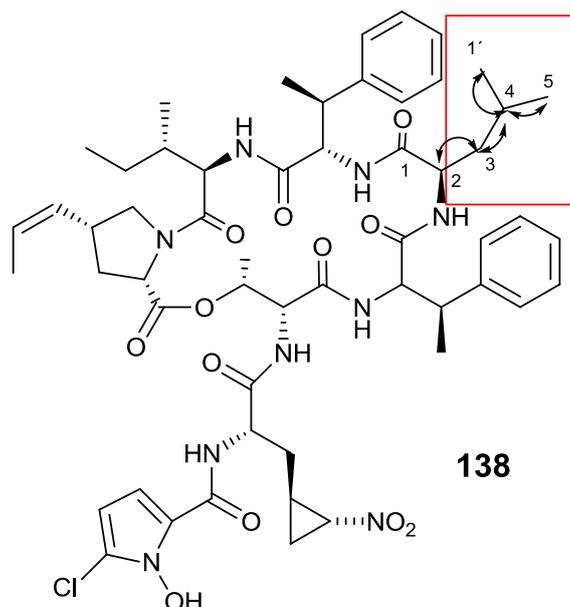


Abb. 5-84: Hormaomycin A3 (**138**). Die Kohlenstoffatome des eingebauten Leucins sind nummeriert.

Hormaomycin A4 (**139**)

Diese Verbindung zeigt einen Molekülpeak von $m/z=1108,4833$ $[M+Na]^+$, was der gemessenen Masse von Hormaomycin A3 (**138**) (vgl. Abb. 5-82, Tab. 5-17) entspricht. Im Gegensatz zu Hormaomycin A3 (**138**) zeigt die MS/MS-Fragmentierung aber eine gleiche Fragmentgröße des Ringsystems wie Hormaomycin (**13**) [$m/z=769,387$ (**135**)] wie ein Vergleich von Abbildung 5-85 mit Abbildung 5-75 zeigt. Das legt die Vermutung nahe, dass hier (3-Ncp)Ala (**27**) II gegen Leucin ausgetauscht sein könnte.

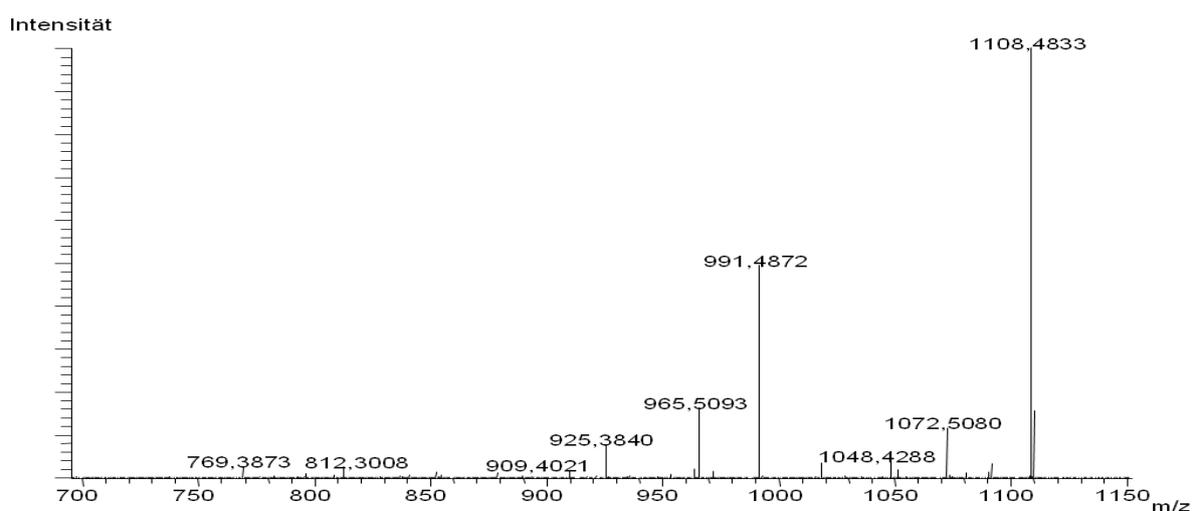


Abb. 5-85: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A4 (**139**) in CD_3OD , 700 MHz.

Eine Analyse des 1H -NMR-Spektrums bestätigt dies (vgl. Abb. 9-32, Tab. 9-14). Die Signale von (3-Ncp)Ala (**27**) I sind im Spektrum erhalten geblieben, während charakteristische Dupletts bei $\delta=0,97$

ppm und $\delta=1,01$ ppm, ein Multipllett bei $\delta=1,71$ ppm (siehe Abb. 5-86) und drei weitere Signale analog zu Hormaomycin A3 (**138**) auf einen Leucylrest hindeuten. In dieser Verbindung ist also das (3-Ncp)Ala (**27**) in der Seitenkette durch Leucin ersetzt worden. Abbildung 5-87 zeigt die aufgeklärte Struktur.

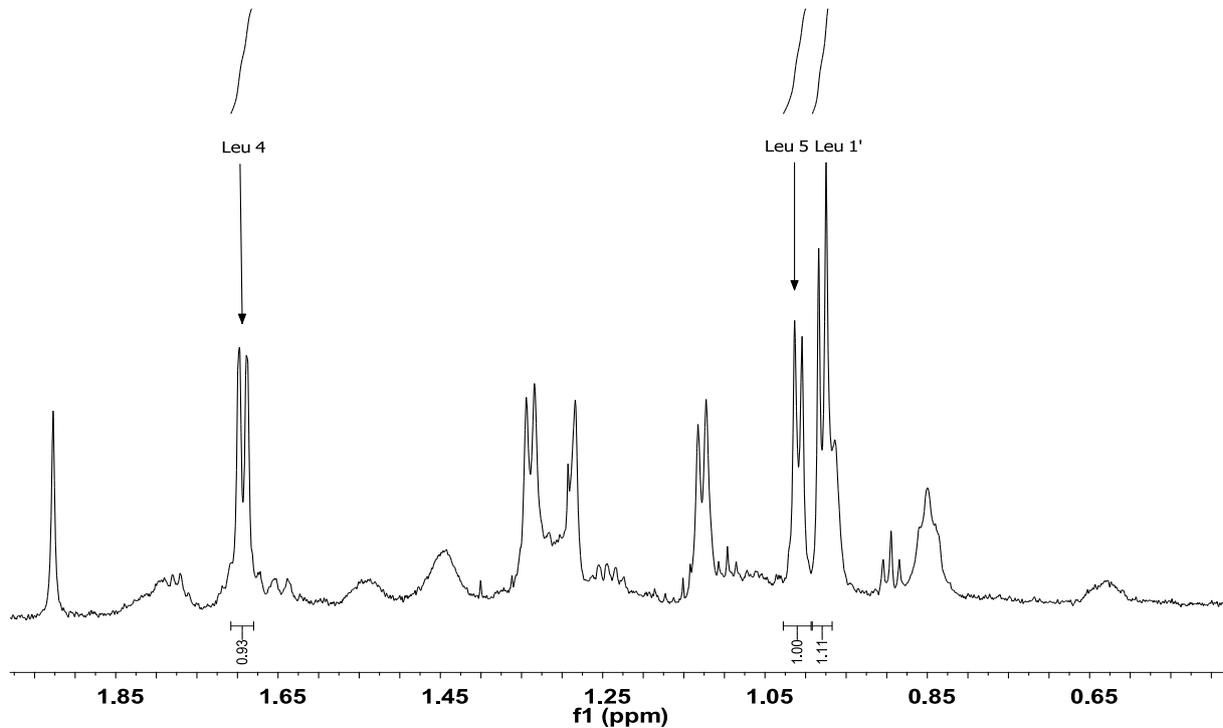


Abb. 5-86: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A4 (**139**) in CD_3OD , 700 MHz.

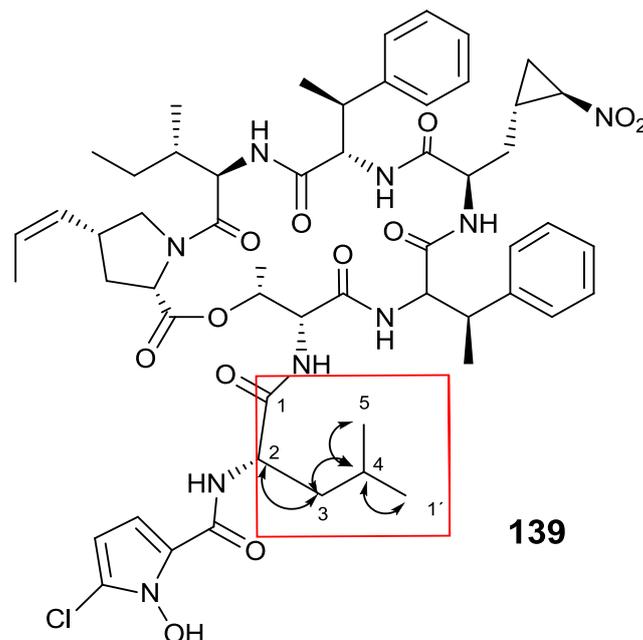


Abb. 5-87: Hormaomycin A4 (**139**). Die Kohlenstoffatome des eingebauten Leucins sind nummeriert.

Hormaomycin A5 (140)

Diese Verbindung hat mit Abstand die größte Retentionszeit des Extraktes (siehe Tab. 5-16), und besitzt eine Masse von $m/z=1065,5163$ $[M+Na]^+$. Das bedeutet eine berechnete Massendifferenz von 43 im Vergleich zu Hormaomycin A3 (**138**) und A4 (**139**) und 86 im Vergleich zu Hormaomycin (**13**) (vgl. Tab. 5-17). Die naheliegende Hypothese, dass hier beide Nitrocyclopropylalanine (**27**) gegen Leucin ausgetauscht sind, lässt sich aus einer Analyse der MS/MS- und NMR-Spektren bestätigen ($[C_{55}H_{75}N_8O_{10}ClNa]^+_{calc}=1065,5192$). Das Fragment mit der Masse von $m/z=726,4175$ (Abb. 5-88) zeigt, daß das Ringsystem die gleiche Masse wie Hormaomycin A3 (**138**) besitzt (vgl. Abb. 5-82).

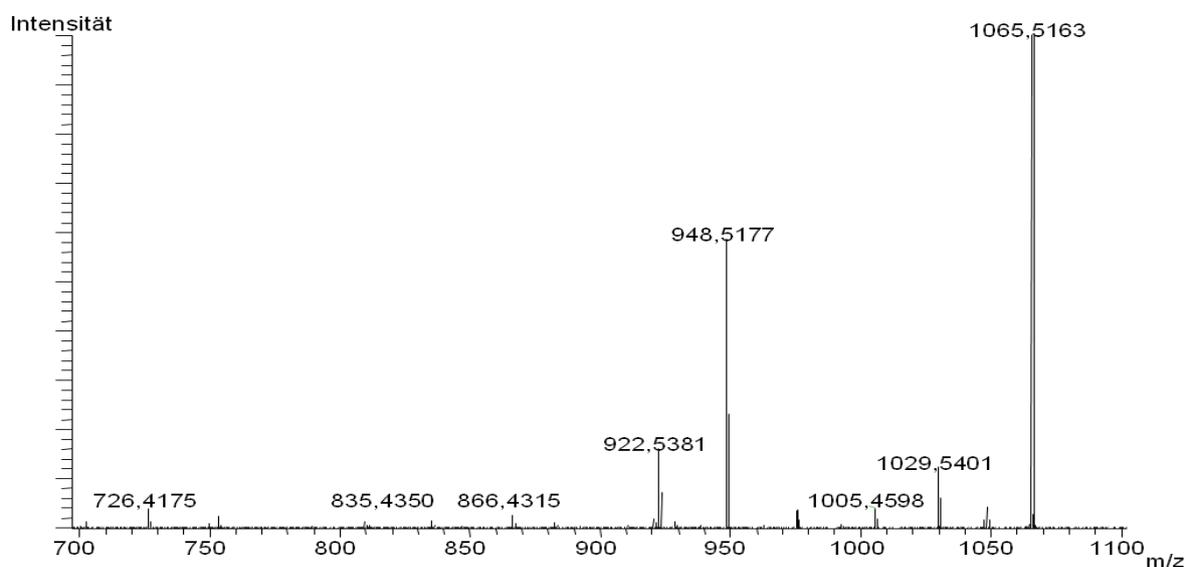


Abb. 5-88: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum von Hormaomycin A5 (**140**) in CD_3OD , 700 MHz.

Außerdem sind beide Spinsysteme des Leu I aus Hormaomycin A3 (**138**) und Leu II aus Hormaomycin A4 (**139**) vorhanden (siehe die Abbildungen 5-89 und 9-33, Tabelle 9-15). Hormaomycin A5 (**140**) ist also ein Hormaomycinderivat mit zwei Leucinen anstelle von (3-Ncp)Ala (**27**). Die Struktur der neu aufgeklärten Substanz zeigt Abbildung 5-90.

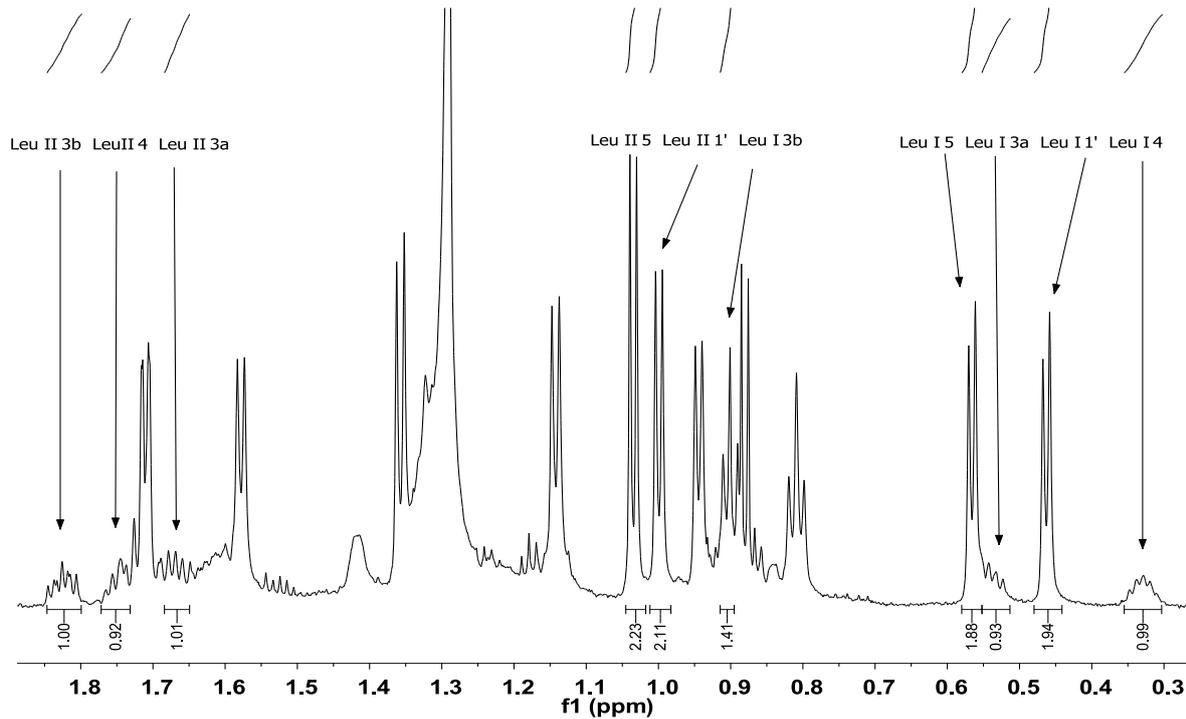


Abb. 5-89: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hormaomycin A5 (**140**) in CD_3OD , 700 MHz.

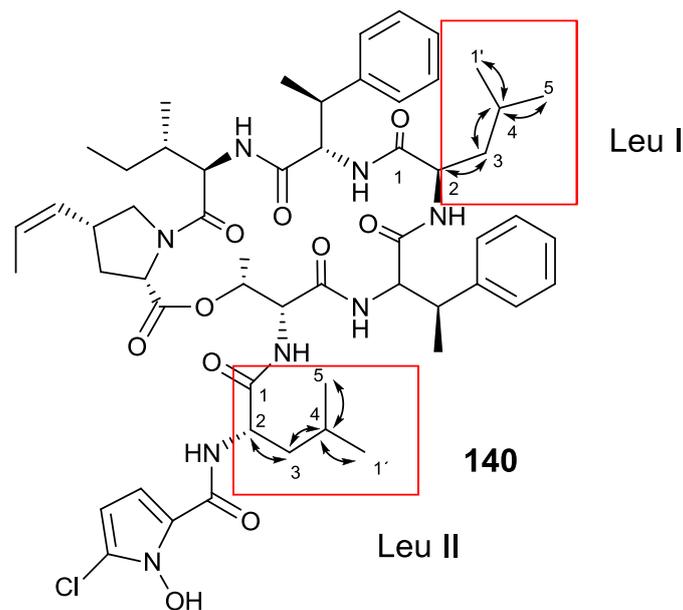


Abb. 5-90: Hormaomycin A5 (**140**). Die Kohlenstoffatome der eingebauten Leucine sind nummeriert.

Hormaomycin A6 (**141**)

Substanz 4 aus Tabelle 5-17 besitzt eine Masse von $m/z=1237,4894$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Das ist eine berechnete positive Massendifferenz von 76 im Vergleich zu Hormaomycin (**13**). Eine Analyse des Massenspektrums ergibt eine mögliche Summenformel von $\text{C}_{59}\text{H}_{75}\text{ClN}_{10}\text{NaO}_{16}$ ($\text{C}_{59}\text{H}_{75}\text{ClN}_{10}\text{O}_{16}$ $\text{Na}_{\text{calc}}=1237,4949$). Es könnte also eine $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ -Einheit an Hormaomycin (**13**) addiert worden sein.

Eine MS/MS-Analyse (Abb. 5-91) zeigt Fragmente von $m/z=1008$ (**133**), und 1034 (**132**), wie bei Hormaomycin (**13**) (vgl. Abb. 5-75). Der Lactonring hat also eine unveränderte Größe. Daher sollte die Veränderung an der Seitenkette vorliegen. Ein Fragment hat die Masse $1150,4454$. [Das Addukt ist also unter Mitnahme eines Wasserstoffes aus **13** abgespalten worden ($[M_{\text{HRM}}+\text{Na}-1]^+_{\text{calc}}=1150,4503$).

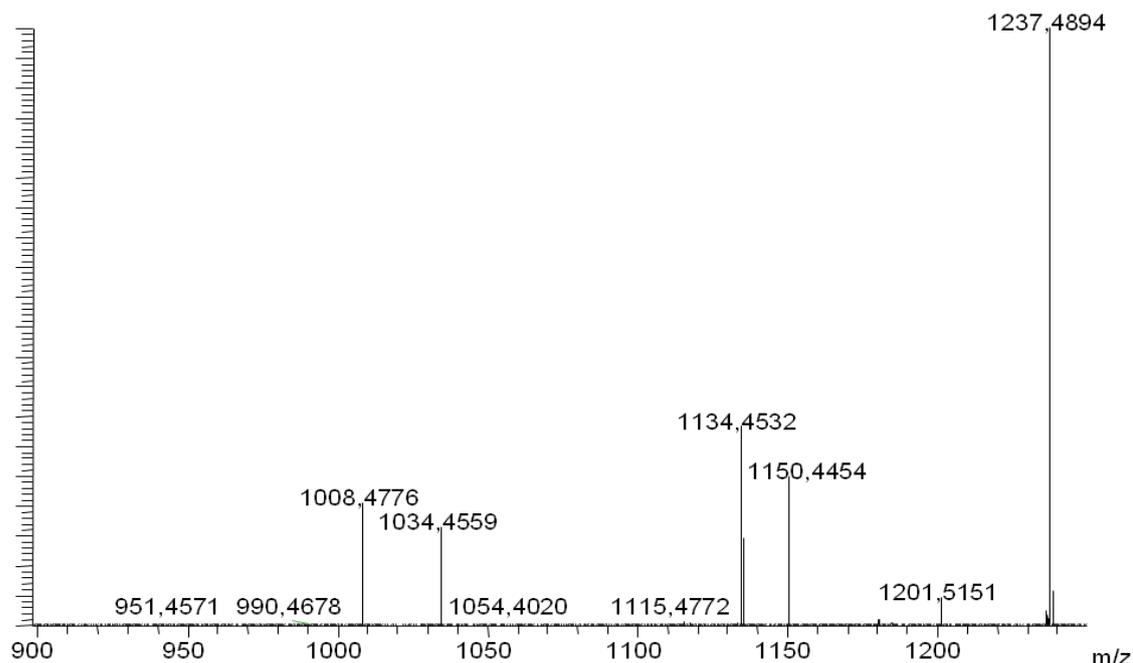


Abb. 5-91: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentationsspektrum von Hormaomycin A6 (**141**).

Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung zeigt weitgehend eine ähnliche Signalaufspaltung zum Hormaomycin (**13**). Zusätzlich sind einige neue Signale zu erkennen: zwei Dubletts bei $\delta=5,03$ ppm und $\delta=5,13$ ppm, die im ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum eine Kopplung miteinander zeigen (Abb. 5-92). Zudem weist die große Kopplungskonstante ($^2J = 15$ Hz) der Signale auf eine geminale Kopplung der beiden Wasserstoffe hin. Zusammen mit der hohen Tieffeldverschiebung lässt sich auf eine isolierte Methylengruppe in elektronenziehender Umgebung schließen. Zwei weitere neue Signale im ^1H -Spektrum weisen auf eine endständige Ethoxygruppe hin: Das Quartett bei $\delta=4,29$ ppm und das charakteristische Triplet bei $\delta=1,32$ ppm koppeln nur miteinander (siehe Abb. 5-92 und Abb. 5-93). All diese Informationen zusammengenommen lassen nur eine einzig mögliche Struktur für Hormaomycin A6 zu: eine Ethylacetylgruppe ist an das *N*-Hydroxyl addiert worden. Abbildung 5-94 zeigt die aufgeklärte Struktur.

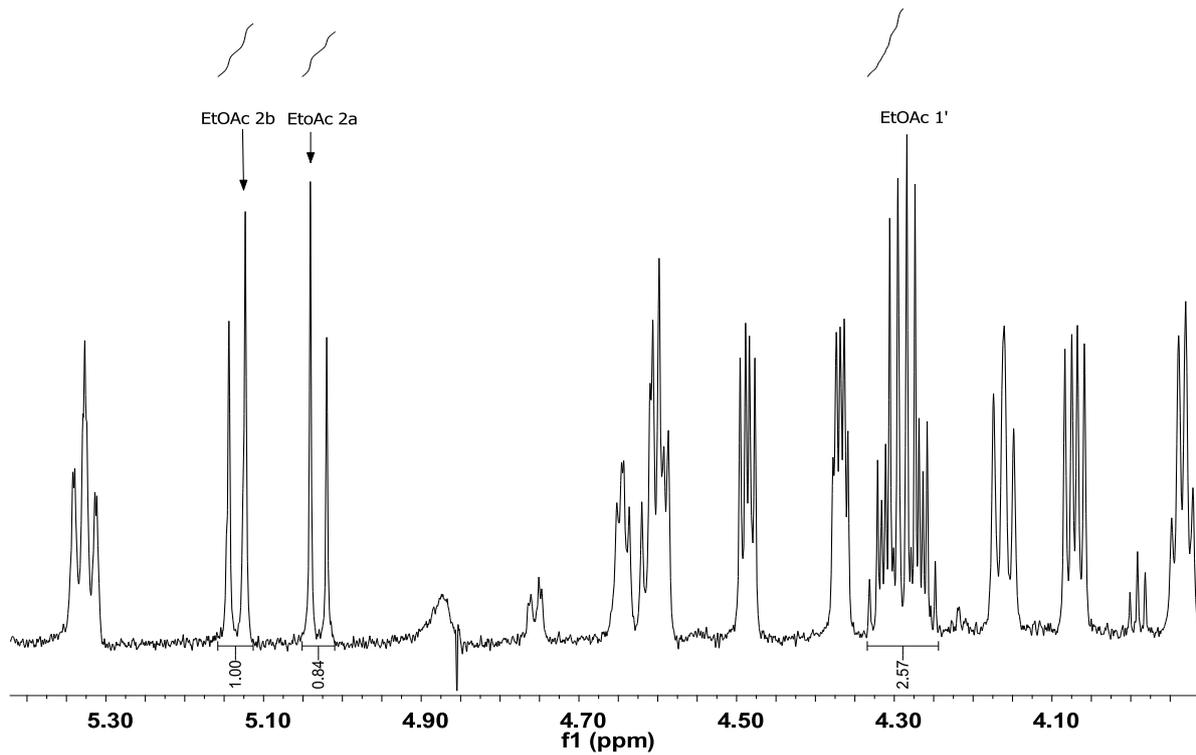


Abb. 5-92: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (**141**) in CD_3OD , 700 MHz.

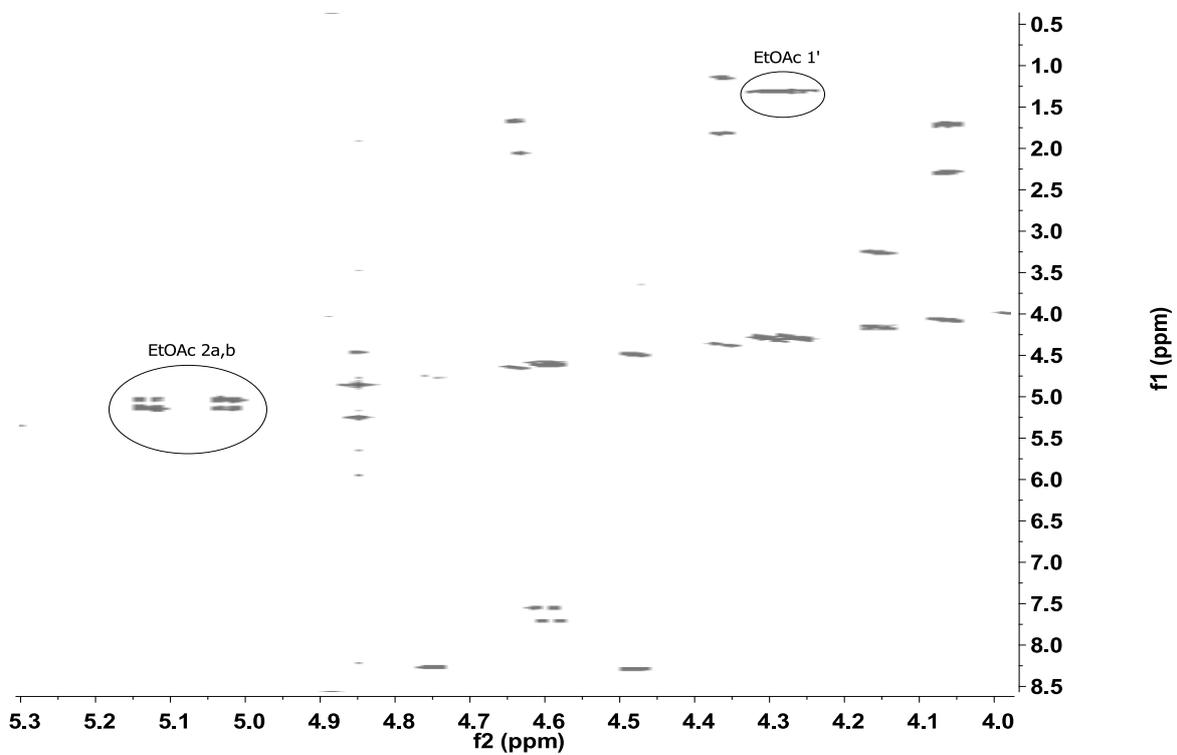


Abb. 5-93: Ausschnitt aus dem ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (**141**) in CD_3OD , 700 MHz.

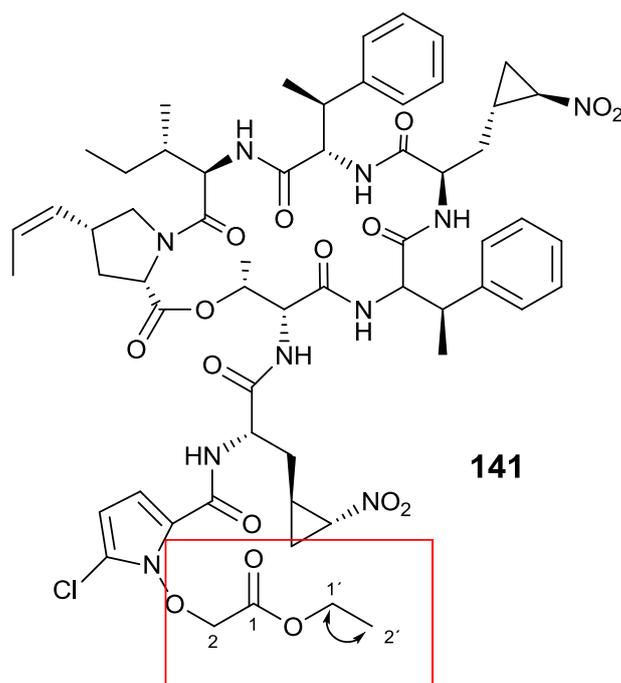


Abb. 5-94: Hormaomycin A6 (**141**). Die Kohlenstoffe des neuen Ethylacetylrestes sind nummeriert.

Die Frage ist hier, ob dieses Derivat ein natürlich produziertes Molekül ist, oder ein Aufarbeitungsartefakt. Die Natur des Restes am *N*-OH lässt auf eine Addition des Extraktionsmittels Ethylacetat schließen. Allerdings ist diese äußerst ungewöhnlich, da hier das weniger elektrophile α -C des Ethylacetat angegriffen wurde. Ein möglicher Mechanismus wäre eine Reaktion mit einem entstandenen N-O-Radikal, das über den Pyrrolring stabilisiert werden könnte. Eine Detektion dieses Moleküls *in vivo*, z.B. durch MALDI-Imaging Massenspektrometrie einer Bakterienkolonie,²⁷¹ würde die Identität als Naturstoff bestätigen.

Hormaomycin E1/E2 (40/41)

Als Molekülmasse der isolierten Substanz 3 aus dem Extrakt wurde $m/z=1153,4699$ bestimmt (siehe Tab. 5-28). Das deutet auf ein hydriertes Hormaomycin (**13**) hin ($C_{55}H_{71}ClN_{10}O_{14}Na_{\text{calc}}=1153,4737$). Das MS/MS-Fragmentierungsspektrum (Abb. 5-95) zeigt, dass sowohl die Fragmente bei $m/z=852$ (**134**) und $m/z=769$ (**135**) aus **13** (siehe Abb. 5-72) als auch Fragmente bei $m/z=771$ (Abb. 5-96) und $m/z=854$ vorliegen. Das bedeutet, dass hier ein Gemisch aus zwei Substanzen vorliegt, bei denen einerseits in der Seitenkette, andererseits im Ring eine Hydrierung erfolgt ist. Dass hier ein durch die angewendeten Methoden nicht trennbares Gemisch vorliegt, bestätigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Es sind viele Signalüberlagerungen zu sehen (siehe Abb. 9-36, Anhang). Am wahrscheinlichsten ist also, dass in dieser Fraktion jeweils eines der Nitrocyclopropylalanine hydriert vorliegt.

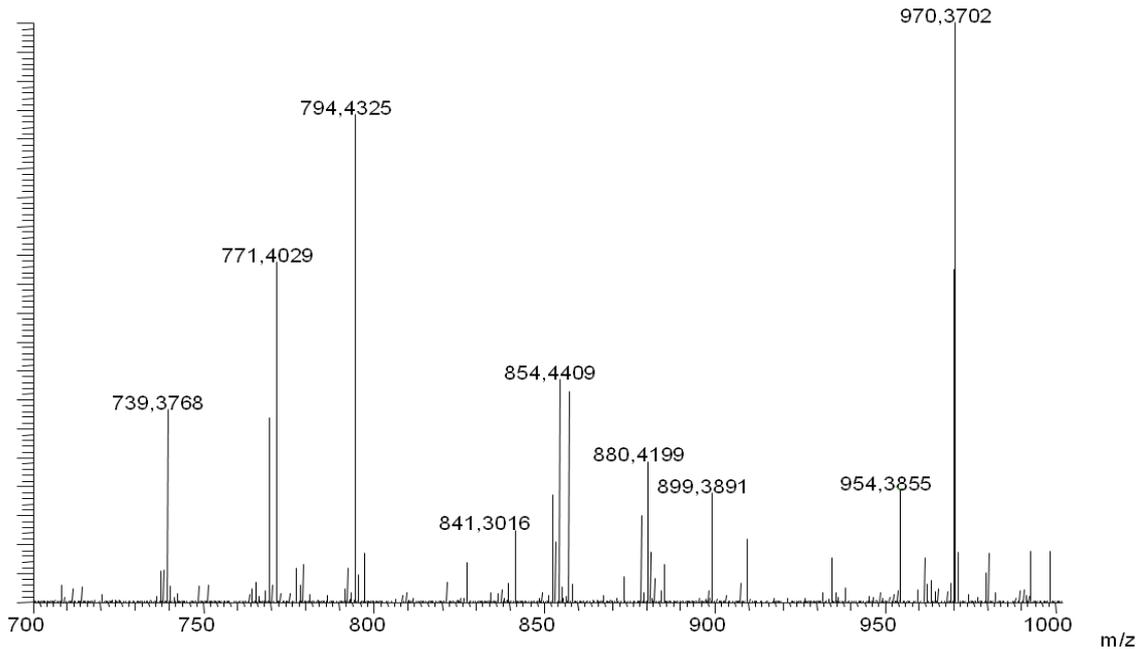


Abb. 5-95: Ausschnitt aus dem MS/MS-Fragmentierungsspektrum für Hormaomycin E1/E2 (**40,41**)

Die Natur des Restes ist nicht eindeutig zu belegen. Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (Abb. 9-37) schließt allerdings einen Einbau von **143** aus, einem postulierten Intermediat der (3-Ncp)Ala-Biosynthese²⁰⁶ (vergleiche Abschnitt 5.1, Abb. 5-2), da im Spektrum kein Signal für das Methin des Oxims (um $\delta=2-3$ ppm) zu detektieren ist. Auch kommt eine eingebaute Vorstufe wie **144** nicht in Frage, da ebensowenig ein Signal für den tertiären Wasserstoff (um $\delta=2$ ppm) zu detektieren ist. Die wahrscheinlichste Struktur wäre der geöffnete Cyclopropanring, wie er im Nitronorleucin (**30**) vorliegt, das in Fütterungen bereits in **13** eingebaut wurde (vgl. Abb. 3-21, Tab. 3-1).²⁰⁰ Daher ist das vorliegende Gemisch am ehesten eines aus Hormaomycin E1/E2 (**40/41**) (Abb. 5-97). Auch diese Moleküle könnten Aufarbeitungsartefakte sein.

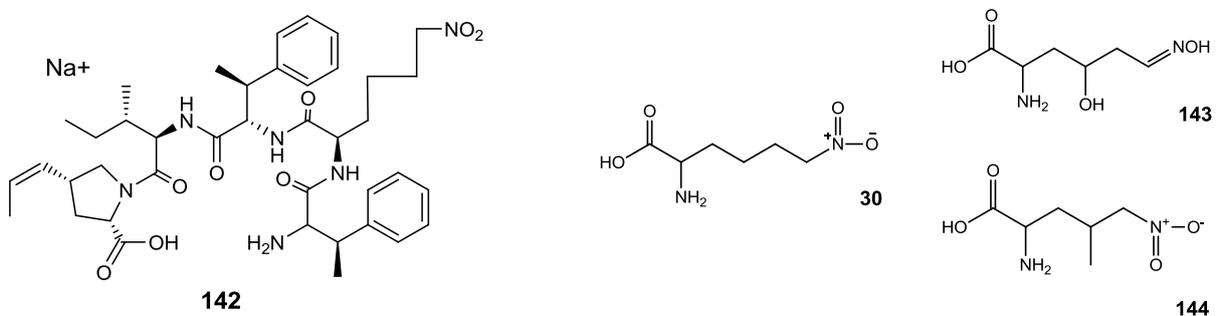


Abb. 5-96: Im Massenspektrum von Fraktion 3 detektiertes Fragment **142** ($m/z=771,403$) (hypothetisch), mögliche Vorstufen **30**, **143** und **144**.

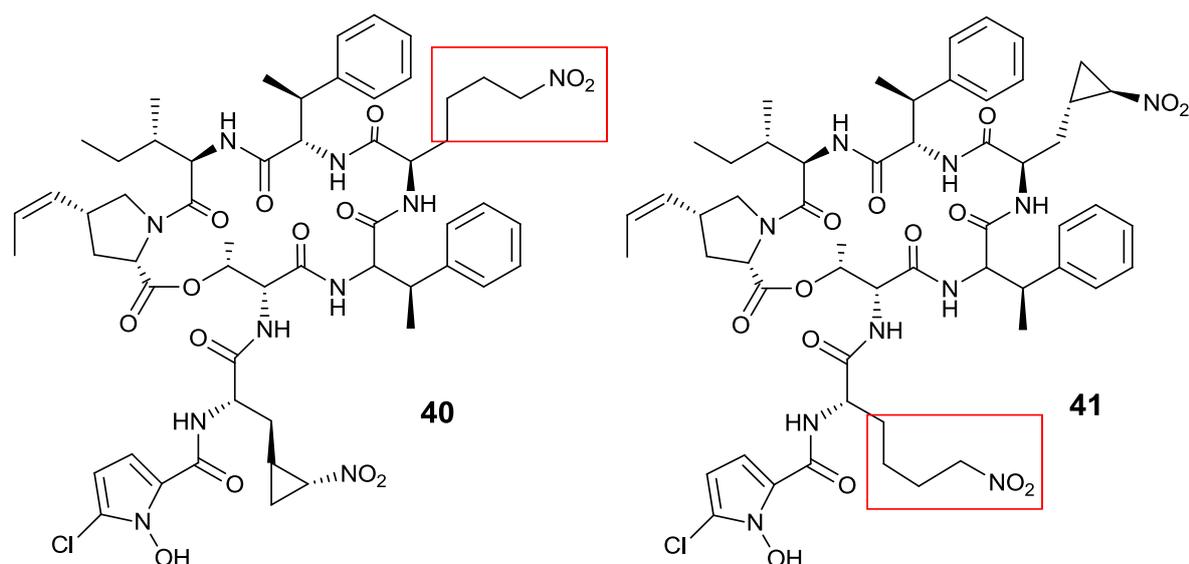


Abb. 5-97: hypothetische Strukturen des isolierten Substanzgemisches Hormaomycin E1 (**40**) und E2 (**41**).

Insgesamt wurden also sechs neue Hormaomycinanaloga isoliert und deren Struktur aufgeklärt. Außerdem wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit die bereits durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese erzeugten Hormaomycinderivate E1 und E2 (**40,41**)²⁰⁰ isoliert (siehe Tab. 3-1). Bei letzteren, sowie Hormaomycin A6 (**141**) ist es nicht klar, ob es sich hierbei um natürlich produzierte Substanzen oder Artefakte bei der Aufarbeitung handelt. Die biologische Aktivität der isolierten Substanzen sollte anschließend von Xiaofeng Cai gegen *Arthrobacter crystallopoietes* und *Streptomyces coelicolor* A3(2) getestet werden. Die Anzahl und strukturelle Varietät der isolierten Analoga zeigt, dass die Hormaomycin-NRPS flexibel auf verschiedene Substrate reagiert. Nicht nur die A-Domänen, aber auch die Kondensations- und Thioesterasedomänen des Megaenzym schein eine geringe Substratspezifität zu besitzen. Anstelle von (3-Ncp)Ala (**27**) wird Leucin zu einem gewissen Maß in Hormaomycin eingebaut. Genau diese Erkenntnis kann auch aus den Ergebnissen der A-Domänenassays (siehe Kapitel 5.4.4) abgeleitet werden. Valin, das in Hormaomycin A2 (**137**) eingebaut wird, wird von HrmP2_A *in vitro* sogar bevorzugt aktiviert. Die A-Domänenassays sind somit sehr gut als Voraussage für zukünftige Mutasynthesestudien geeignet. Fütterungsexperimente von Xiaofeng Cai zeigen, dass sich die Ausbeute von Hormaomycin A3-5 (**138-140**) durch Fütterung des Überexpressionsstammes mit Leucin weiter steigern läßt (Ergebnisse unveröffentlicht). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die NRPS flexibel auf unterschiedliche Substratangebote reagiert.

Somit sind zur Bibliothek der Hormaomycine den bereits durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese gebildeten Hormaomycinderivaten **36-54** (Tab. 3-1)^{62,199,200} die ersten natürlichen Derivate hinzugefügt worden. Die Detektion weiterer putativer Hormaomycine im Überexpressionsextrakt durch HPLC und HPLC-MS zeigt, dass es mit einer etwas größeren Fermentationsmenge und sensitiven Instrumenten leicht möglich sein wird, weitere neue natürliche Hormaomycine zu isolieren und zu testen.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit (Abschnitte 5.1-5.3) konnten durch heterologe Expressionen von Biosynthesegenen des Hormaomycins (**13**) neue Einsichten in die Biosynthese der Vorstufen gewonnen werden. Die Biosynthese der einzigartigen Aminosäure 3-Nitrocyclopropylalanin [(3-Ncp)Ala] (**27**) wird hypothetisch aus Lysin (**58**) durch 4-Hydroxylierung, N-Oxidation und Cyclopropylbildung synthetisiert (siehe Abschnitt 5.1).²⁰⁶ Im Rahmen dieser Arbeit wurde *hrmI* durch Komplementierung einer knock-out-Mutante der (3-Ncp)Ala-Biosynthese zugewiesen. Mit HrmJ wurde durch Xiaofeng Cai ein analoges Ergebnis erzielt. HrmI und HrmJ sind neuartige Enzyme, die keine charakterisierten Homologe besitzen. Durch intensive bioinformatische Analysen (PSI-BLAST) konnten für HrmI und HrmJ mögliche Funktionen und eine Reaktion in der (3-Ncp)Ala-Biosynthese postuliert werden. HrmJ, das putativ den ersten Schritt in der Biosynthese katalysiert, zeigt entfernte Homologie zu einer Isoleucinhydroxylase, einer Fe(II)/ α -Ketoglutaratabhängigen Oxygenase. Das Enzym wurde in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert und isoliert und wurde *in vitro* in einem Hydroxylierungsassay mit Fe(II), α -Ketoglutarat und Ascorbat eingesetzt. In der HPLC-Analyse des Assays konnte ein neuer Peak detektiert werden, der massenspektrometrisch charakterisiert wurde. Die gemessene exakte Masse weist auf ein putatives Intermediat in der (3-Ncp)Ala-Biosynthese, ein hydroxyliertes Lysin mit terminaler Oximfunktion **60** hin. Weitere Einsichten in die Biosynthese konnten bisher nicht erzielt werden. Das Ergebnis des Assays ließ sich, vermutlich aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit des Enzyms, nicht reproduzieren. Ein nächster Schritt könnte die Wiederholung des Assays unter strikt anaeroben Bedingungen sein. Zur Zeit wird das postulierte detektierte Produkt in der Arbeitsgruppe Piel chemisch synthetisiert. Nach erfolgter Fertigstellung kann diese Substanz als Standard und Vergleichssubstanz dienen und weitere Aufschlüsse über die Identität des detektierten Intermediates liefern. Außerdem kann diese Substanz als Substrat für die putative Oxidase HrmI eingesetzt werden, die, laut Hypothese, den anschließenden Schritt zur Bildung von (3-Ncp)Ala (**27**) katalysiert.

Die Biosynthese des 4-Propenylprolins [(4-Pe)Pro] (**69**) (Abschnitt 5.2) verläuft über die proteinogene Aminosäure Tyrosin (**70**) und L-DOPA (**71**).^{62,226} Die L-DOPA-Dioxygenase HrmF, die den Schlüsselschritt, die Ringöffnung von **71**, katalysiert, wurde in dieser Arbeit kinetisch charakterisiert. Das Enzym besitzt einen etwa 10-fach kleineren K_M -Wert und eine etwa 15-fach höhere katalytische Konstante (K_{cat}) gegenüber dem einzigen charakterisierten Homolog LmbB1 aus der Biosynthese des Lincomycins. Hieraus ergibt sich eine fast 160-fach höhere Effektivität für HrmF. Das Enzym ist, zusammen mit seiner robusten Expression und der bemerkenswert relaxierten Substratspezifität ein guter Kandidat für chemoenzymatische Syntheseansätze.⁶² Mit degenerierten Primern wurde im Genom von *Streptomyces griseoflavus* W-384 nach Homologen zu LmbX, einer putativen C-C-Hydrolase gesucht, die essentiell für die Biosynthese des (4-Pe)Pro-Analogs im Lincomycin ist. Solch ein Enzym ist im *hrm*-Gencluster nicht kodiert. Allerdings konnte kein korrespondierendes PCR-

Produkt amplifiziert werden.⁶² Außerdem wurde die putative SAM-abhängige Methyltransferase HrmC mit HrmF coexprimiert. Es konnte aber kein neues Produkt im Extrakt detektiert werden. Das Ergebnis zeigt, dass HrmC während der Biosynthese von (4-Pe)Pro (**69**) wahrscheinlich nicht den Reaktionsschritt nach HrmF katalysiert. Die weitere Biosynthese des Propenylprolins (**69**) bleibt also weiterhin ungeklärt. Im zukünftigen Experimenten sollten auch die weiteren putativen Biosynthesegene für **69** in verschiedenen Kombinationen mit HrmF coexprimiert werden, um den an HrmF anschließenden Schritt in der (4-Pe)Pro-Biosynthese zu bestimmen. Ein weiterer Ansatz ist die Deletion von putativen Biosynthesegenen des Hormaomycins *in vivo*. Erste Deletionsmutanten wurden bereits von Xiaofeng Cai konstruiert, mögliche akkumulierte Zwischenprodukte können Aufschluß über die Funktion dieser Gene geben.

Die biosynthetische Startereinheit des Hormaomycins, Chlorhydroxypyrrrolcarbonsäure (Chpca) (**93**), wird am freistehenden Peptidylcarrierprotein HrmL ausgehend von Prolin (**94**) synthetisiert (siehe Abschnitt 5.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Acyl-CoA-Synthetase HrmK und HrmL in *E. coli* exprimiert und isoliert. Für HrmL wurde eine für die Aktivität notwendige posttranslationale Modifizierung, die 4'-Phosphopanthetheinylierung, massenpektrometrisch nachgewiesen. Die Substratspezifität von HrmK wurde *in vitro* in einem massenspektrometrisch basierten Adenylierungsassay charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das Enzym sehr selektiv Prolin (**94**) adenyliert und strukturelle Analoga von **94** nicht aktiviert werden. Eine Beladung von HrmL mit Prolin durch HrmK *in vitro* konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Für die N-Hydroxylierung des Pyrrols ist HrmN ein guter Kandidat. Das Enzym wurde in einem kombinatorischen Biosyntheseexperiment in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, dem Produzenten der Substanz Pyoluteorin (**115**), exprimiert. Eine N-Hydroxylierung der Pyrroleinheit des Pyoluteorins (**115**) konnte massenspektrometrisch aber nicht detektiert werden. Somit bleibt die N-Hydroxylierung, eine in der Natur äußerst seltene Modifikation, weiter unaufgeklärt. Um die Biosynthese von Chpca (**93**) *in vitro* weiter zu untersuchen, müssten, nach erfolgreicher Generierung von Prolyl-HrmL (**95**), die Acyl-CoA-Dehydrogenase HrmM, die Halogenase HrmQ und HrmN exprimiert, isoliert, und **95** zugesetzt werden. Eine *hrmN*-Deletionsmutante im Hormaomycinproduzenten wird momentan in der Arbeitsgruppe Piel durch Xiaofeng Cai konstruiert, nach erfolgreicher Generierung können eventuell akkumulierende Intermediate Aufschluss über die Funktion von HrmN geben.

Im zweiten Teil der Arbeit (Abschnitt 5.4) wurden die Adenylierungsdomänen (A-Domänen) der Hormaomycin-NRPS untersucht, um Einsichten in Substratspezifität der Hormaomycin-NRPS im Hinblick auf mutasynthetische Experimente zu gewinnen. Alle A-Domänen wurden heterolog stabil exprimiert und isoliert. Nachdem nur eine A-Domäne, HrmP1_A, im massenpektrometrisch basierten Adenylierungsassay¹⁰⁹ moderate Aktivität zeigte,⁶² wurden alle A-Domänen mit dem MbtH-artigen Protein HrmR coexprimiert. Alle A-Domänen wurden mit HrmR in einem molekularen 1:1-Verhältnis eluiert und zeigten *in vitro* hohe adenylierende Aktivität. Die A-Domänen HrmO1_A und HrmO4_A

aktivieren (3-Ncp)Ala (**27**) fast quantitativ. Leucin wurde von den getesteten Aminosäuren am zweitstärksten aktiviert [etwa 10% von (3-Ncp)Ala (**27**)]. Die Domänen HrmO3_A und HrmP1_A aktivieren bevorzugt (β -Methyl)phenylalanin [$(\beta$ -Me)Phe] (**31**), gefolgt von Phenylalanin (**35**) [etwa 10% von **31**]. Die Analoga α -Methylphenylalanin (**125**) und 4-Chlorophenylalanin (**124**) konnten nicht umgesetzt werden. HrmP3_A aktiviert bevorzugt das natürliche Substrat (4-Pe)Pro (**69**), der relativ hohe Umsatz von 4-Z-Ethynylprolin (**128**) (etwa 20% von **69**) ist sehr vielversprechend im Hinblick auf die erfolgreiche Mutasythese eines Hormaomycinderivates, das über „Klick-Chemie“ das molekulare Target von Hormaomycin (**13**) binden und aufklären könnte. HrmP2_A adenyliert *in vitro* hauptsächlich das bioinformatisch vorausgesagte Substrat Valin, obwohl an dieser Stelle Isoleucin in Hormaomycin eingebaut wird. Diese Diskrepanz könnte durch andere Proteinkonformationen *in vivo* oder durch Korrekturfunktionen anderer Enzyme der Hormaomycin-NRPS entstehen. Die Enzymfraktionen wurden nach der Isolierung über Ni-NTA-Chromatographie teilweise mit FPLC weiter aufgereinigt und erneut getestet. Ungewöhnlich hohe Aktivitäten für einzelne Aminosäuren und breitere Hintergrundaktivitäten, mutmaßlich durch Verunreinigungen aus *E. coli* verursacht, konnten durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt reduziert und falsch positive Ergebnisse somit eliminiert werden. Die Ergebnisse der A-Domänentests können somit wertvolle Informationen für zukünftige Mutasytheseexperimente am Hormaomycin liefern. In der Arbeitsgruppe Piel ist bereits ein Knock-Out-System für einzelne Biosynthesegene durch Xiaofeng Cai etabliert. Zukünftig können weitere Analoga der Hormaomycinvorstufen synthetisiert und nach erfolgreicher Testung im A-Domänenassay den jeweiligen Stämmen zugefüttert werden, um neue Hormaomycinanaloga zu generieren.

Die Sequenzen der Hormaomycin A-Domänen zeigen in einigen Fällen eine weitgehende Übereinstimmung am N- und C-Terminus (jeweils etwa 200 Aminosäuren). Das legt einen möglichen Austausch der zentralen DNA-Abschnitte, und damit der Substratspezifität, durch Rekombination während der Evolution nahe. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurden mit Fusions-PCR fünf rekombinante A-Domänen konstruiert, die alle die N- und C-terminale Sequenz von HrmO3_A trugen (siehe Abschnitt 5.4.2). Die zentralen Abschnitte wurden einerseits HrmO2_A, HrmO4_A und HrmP2_A, (O2f_A, O4f_A und P2f_A), andererseits zwei A-Domänen der NRPS des „calcium-dependent antibiotic“ (CDA) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), entnommen. Alle rekombinanten Enzyme ließen sich stabil in *E. coli* mit HrmR coexprimieren. O2f_A, O4f_A und P2f_A waren aktiv und zeigten die gleiche Substratspezifität wie die nativen, die zentralen Abschnitte enthaltenden, A-Domänen. Die enzymatische Aktivität war gleich (O4f_A) oder nur leicht verringert (O2f_A, P2f_A). Die Fusionen mit den A-Domänenabschnitten von *S. coelicolor* waren nicht aktiv. Allerdings wurden während der Fusion zwei essentielle Aminosäurereste für die Substratbindung nicht ausgetauscht. Eine Mutation dieser Aminosäuren oder ein Austausch eines etwas größeren DNA-Abschnitts könnte auch hier zu aktiven Enzymen führen. Die erfolgreiche Konstruktion, Expression und Testung von neuen A-Domänen, die aus verschiedenen Abschnitten von Hormaomycin-A-Domänen zusammengesetzt wurden, unterstützt

die Hypothese, dass die Substratspezifität der NRPS in der Evolution durch Rekombination von DNA-Abschnitten, die die Information für Substratspezifität beinhalten, generiert wurde. Solch ein Phänomen ist für Streptomyceten bisher nicht beschrieben worden. Allerdings dürfte die Generierung einer rekombinierten Hormaomycin-NRPS mit neuen A-Domänenspezifitäten nicht einfach sein, da viele Abschnitte der Module sehr hohe Homologien zeigen, was die gezielte homologe Rekombination von Genabschnitten erschwert. Die erfolgreiche Übertragung dieses Konzeptes auf andere NRPS-Systeme bleibt abzuwarten, da ähnliche Rekombinationen von Spezifitäten bisher fast nur in NRPS von Cyanobakterien beobachtet wurden.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel 5.5) wurden die ersten bekannten, natürlich gebildeten Analoga des Hormaomycins aus einem Extrakt eines Hormaomycin-Überproduktionsstammes isoliert und deren Strukturen mit massenspektrometrischen Methoden und NMR-Experimenten anschließend aufgeklärt. Hormaomycin A1 (**136**) ist ein Deschlorohormaomycin, wogegen in Hormaomycin A2 (**137**) Valin statt Isoleucin in das Peptid eingebaut wurde. Hormaomycin A3 (**138**) und A4 (**139**) tragen jeweils ein Leucin, Hormaomycin A5 (**140**) zwei Leucine statt (3-Ncp)Ala (**27**) im Molekül. Abbildung 5-98 fasst die Strukturen der Analoga zusammen. Der Einbau der proteinogenen Aminosäuren in Hormaomycin A2-5 korrespondierte sehr gut mit den Ergebnissen der A-Domänentests (vgl. Abschnitt 5.4.4) und demonstriert eindrucksvoll die Anwendbarkeit dieser Tests für zukünftige Mutasynttheseexperimente.

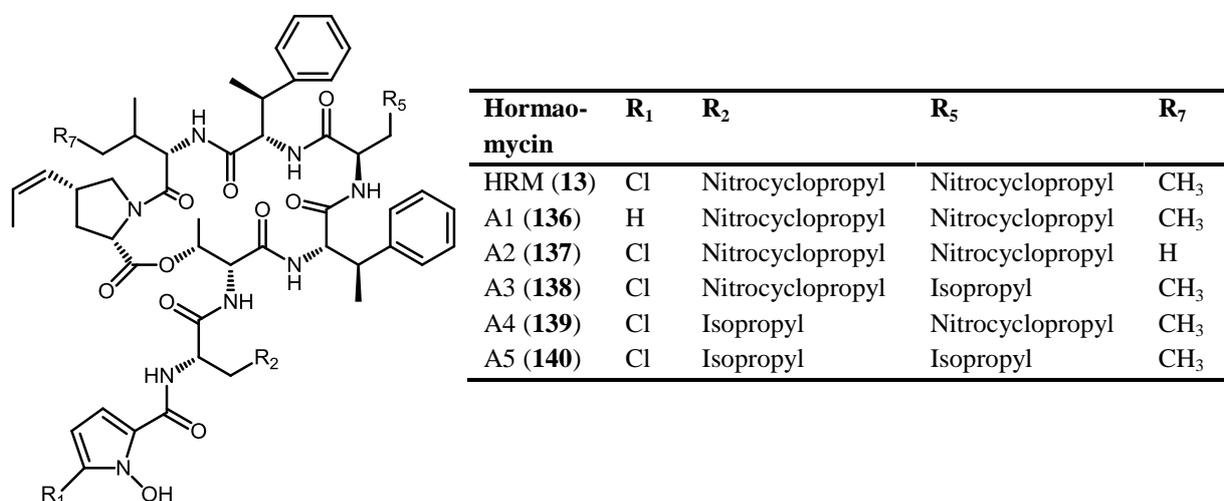


Abb. 5-98: Übersicht über die isolierten Hormaomycinderivate A1-A5

Außerdem wurde ein Gemisch aus zwei Hormaomycinen mit vermutlich offenem Cyclopropanring **40/41** und ein zusätzliches Addukt mit einer Ethylacetylseinheit am N-Hydroxyl **141** isoliert. Hierbei ist nicht geklärt, ob es sich um Naturstoffe oder Artefakte bei der Aufarbeitung handelt. Die biologischen Aktivitäten der isolierten Analoga werden weitere Einblicke in die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Hormaomycin (**13**) geben. Die Detektion weiterer putativer

Hormaomycine im Überexpressionsextrakt durch HPLC-MS zeigt, dass es mit geeigneten Methoden und einer großen Fermentationsmenge möglich sein wird, mehr neue natürliche Hormaomycinanaloga zu isolieren und die Substanzbibliothek der Hormaomycine zu erweitern.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit neue Einsichten in die Biosynthese und die Substratspezifitäten der NRPS des strukturell komplexen bakteriellen Hormons Hormaomycin (**13**) gewonnen werden. Die bioinformatische Analyse des Genclusters und die teilweise Aufklärung der Biosynthese der Vorstufen zeigt interessante und neuartige Biosynthesewege der einzigartigen Vorstufen des Hormaomycins. Die weitere biochemische Charakterisierung der Enzyme wird tiefere Einblicke in die katalysierten Reaktionen und ihre Mechanismen bringen. Durch die Charakterisierung der A-Domänen wurden umfassende Einblicke in die Spezifitäten der Hormaomycin-NRPS gewonnen. Mit dem vorhandenen Testsystem können zukünftig zielgerichtete Mutasyntheseexperimente durchgeführt werden, um neuartige Hormaomycinderivate zu generieren. Diese könnten verbesserte oder breitere antibiotische Eigenschaften oder bessere hormonale Wirkungen besitzen. Unter anderem kann in Zukunft Mutasynthese mit einem Alkinylderivat von **69** dazu beitragen, über ein Pull-down-Experiment das zelluläre Target und damit den hormonellen Wirkmechanismus von Hormaomycin (**13**) aufzuklären, der an einer Schnittstelle von morphologischer Differenzierung und Produktion von Sekundärmetaboliten in Streptomyceten liegt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen außerdem, dass das MbtH-artige Protein HrmR mit allen A-Domänen der NRPS interagiert und für die Aktivität benötigt wird. Weitere Studien zu den Interaktionsstellen von A-Domänen und weiteren NRPS-Domänen mit MbtH-artigen Proteinen wären wünschenswert und würden die Kenntnisse über NRPS und kombinatorische Biosynthese weiter vergrößern. Die Hormaomycin-NRPS kann aufgrund der flexiblen Austauschbarkeit von Substratpromiskuitäten und der generell relaxierten Substratspezifität ein gutes System für zukünftige kombinatorische Biosyntheseexperimente sein. HrmF, aber auch HrmI und HrmJ, die Enzyme der (3-Ncp)Ala-Biosynthese, könnten in Zukunft für chemoenzymatische Synthesen eingesetzt werden. HrmI und HrmJ sind hier besonders interessant, da sie einen neuen enzymatischen Zugang zu chiralen Cyclopropylderivaten liefern könnten.

6 Material und Methoden

6.1 Vektoren und Organismen

6.1 Vektoren

Zur Lagerung, Subklonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte (Tab. 6-1) und zur heterologen Expression in *E. coli* und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Tab. 6-2) wurden verschiedene Vektoren eingesetzt.

Tab. 6-1 Vektoren zur Lagerung, Subklonierung und Sequenzierung (Plasmidkarten unter Abschnitt 9.1)

Vektor	Resistenz (verwendete Konzentrationen)	Herkunft
pBluescript II SK(+)	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Fa. Stratagene
pGEM-T easy	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Fa. Promega

Tab. 6-2 Vektoren zur Proteinexpression (Plasmidkarten unter 9.1)

Vektor	Expressionsspezifikationen	Resistenz (verwendete Konzentrationen)	Herkunft
pHIS8 ²⁷²	Tag: N-terminaler His-Tag Promoter:T7 Induktion: IPTG 0,1-1 mM	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Prof. Bradley Moore
pHIS8- <i>svp</i> ²⁴²	Tag: N-terminaler His-Tag Promoter:T7 Induktion: IPTG 0,1-1 mM	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Prof. Bradley Moore
pET 28b	Tag: N-terminaler His-Tag Promoter:T7 Induktion: IPTG 0,1-1 mM	Kanamycin (50 µg x mL ⁻¹)	Fa. Novagen
pCDF-DUET	Promoter:T7 Induktion: IPTG 0,1-1 mM	Streptomycin (50 µg x mL ⁻¹)	Prof. Craig Townsend
pME 6041 ²⁵⁶		Kanamycin (200 µg x mL ⁻¹)	

Tab. 6-3: Verwendete Ausgangsvektoren zur Expression von *hrmC*, *F*, *J*

Vektor	Bestandteile	Resistenz(verwendete Konzentrationen)	Herkunft
pDF008	pBluescript II SK(+), <i>hrmC</i>	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Daniel Flachshaar
pDF010	pBluescript II SK(+), <i>hrmF</i>	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Daniel Flachshaar
pDF012	pBluescript II SK(+), <i>hrmJ</i>	Ampicillin (100 µg x mL ⁻¹)	Daniel Flachshaar

6.1.2 Organismen

Zur Lagerung von Ligationen, Plasmiden und Konstrukten wurde *E. coli* XL-1 blue, zur heterologen Proteinexpression *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Zur heterologen Expression von *hrmN* diente *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Streptomyces griseoflavus* W-384 wurde für die Isolierung von Hormaomycin fermentiert, als Testorganismus für die Komplementierung von Hormaomycin diente *Arthrobacter crystallopoietes*. Für die Amplifizierung von Teilen der CDA-A-Domänen wurde *Streptomyces coelicolor* A3(2) kultiviert. Eine Übersicht ist in Tabelle 6-3 aufgeführt.

Tab. 6-4: Übersicht über die eingesetzten Organismen

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F',proAB lacIq ZAM15 Tn10</i>	Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(Tet ^R)]F', <i>ompT, hsdSB(r_B⁻m_B⁻), gal, dcm, DE3</i>	Fa. Invitrogen
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	Wildtyp	Harald Gross
<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384	Wildtyp	Axel Zeeck
<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384 Δ <i>hrmI</i>	Δ <i>hrmI</i>	Xiaofeng Cai
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	Wildtyp	DSMZ 20117
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Wildtyp	DSMZ 40782

6.2 Medien und Puffer

6.2.1 Nährmedien

Die folgenden Medien wurden für die feste und flüssige Kultivierung von Bakterien eingesetzt. Für alle Nährmedien außer dem Production Medium wurde demineralisiertes Wasser (dH₂O) verwendet. Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Trugen die zu kultivierenden Bakterien ein Plasmid, so wurde das entsprechende Antibiotikum für die Selektion hinzugegeben (Tab. 6-1, 6-2).

LB-Medium (Luria Bertani):²⁷³

10 g x L ⁻¹	NaCl
5 g x L ⁻¹	Hefeextrakt
10 g x L ⁻¹	Trypton
15 g x L ⁻¹	Agar

pH = 7,4 (NaOH)

Das Flüssigmedium wurde ohne Agar angesetzt.

2xYT-Medium (Kieser):¹⁵

5 g x L ⁻¹	NaCl
10 g x L ⁻¹	Hefeextrakt
16 g x L ⁻¹	Trypton

TB-Medium (Terrific broth):²⁷⁴

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
4 mL Glycerin

ad 900 mL dH₂O

Nach dem Autoklavieren wurden 100 mL einer sterilen Lösung mit 0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄ (pH=7,2) zugegeben.

KB-Medium (King`s broth B):²⁷⁵

20 g x L⁻¹ Pepton
1,5 g x L⁻¹ K₂SO₄
1,5 g x L⁻¹ MgCl₂
10 mL x L⁻¹ Glycerin

NM6:²⁰⁰

20 g x L⁻¹ D-(-)-Mannitol
20 g x L⁻¹ Sojamehl
20 g x L⁻¹ Fleischextrakt
2 g x L⁻¹ NaCl
0.3 g x L⁻¹ L-Valin
0.5 g x L⁻¹ ZnSO₄ x 6 H₂O

pH = 7,3

NM10:²⁰⁰

50 g x L⁻¹ D-(-)-Mannitol
3 g x L⁻¹ L-Asparagin
1 g x L⁻¹ K₂HPO₄
25 g x L⁻¹ NaCl
50 mg x L⁻¹ MgSO₄ x 7 H₂O
50 mg x L⁻¹ CaCl₂ x 2 H₂O
420 mg x L⁻¹ CH₃COONa
100 mg x L⁻¹ *meso*-Inosit
10 mL x L⁻¹ Spurenelementelösung (siehe unten)
1 mL x L⁻¹ Vitaminlösung (siehe unten)

Spurenelementelösung:²⁰⁰

8 g x L⁻¹ CaCl₂ x 2 H₂O
5 g x L⁻¹ MnCl₂ x 2 H₂O
50 mg x L⁻¹ ZnCl₂
50 mg x L⁻¹ CuCl₂ x 2 H₂O
50 mg x L⁻¹ FeCl₃ x 6 H₂O

Vitaminlösung:²⁰⁰

1 g x L⁻¹ Thiamin-HCl
1,2 g x L⁻¹ Calcium-D-(+)-Panthotenat
1 g x L⁻¹ Flavin-Mononucleotid
2,3 g x L⁻¹ Nicotinsäure
12 g x L⁻¹ Pyridoxin-HCl

200 mg x L ⁻¹	<i>p</i> -Aminobenzoat
100 mg x L ⁻¹	Vitamin B ₁₂
10 mg x L ⁻¹	Folsäure
6 mg x L ⁻¹	Biotin

GYM medium:²⁷⁶

4 g x L ⁻¹	Glucose
4 g x L ⁻¹	Hefeextrakt
10 g x L ⁻¹	Malzextrakt
2 g x L ⁻¹	CaCO ₃
12 g x L ⁻¹	Agar

pH = 7,4

Production medium:⁵⁷

10 g x L ⁻¹	D-Mannitol
20 g x L ⁻¹	Fleischextrakt
20 g x L ⁻¹	Sojamehl
0.5 g x L ⁻¹	ZnSO ₄ x 6 H ₂ O

1 L Leitungswasser, pH = 7,2

TSB medium:¹⁵

30 g x L ⁻¹	Tryptic Soy Broth
------------------------	-------------------

6.2.2 Puffer

In den Experimenten fanden folgende Puffer Verwendung. Lösungsmittel war in allen Fällen demineralisiertes Wasser. Weitere verwendete Puffer sind bei den jeweiligen Methoden verzeichnet.

TE-Puffer:²⁷⁷

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

pH = 8,0 (HCl)

STE-Puffer:²⁷⁷

1 mM	EDTA
10 mM	Tris
100 mM	NaCl

pH = 8,0 (HCl)

TAE-Puffer (50x):²⁷⁷

0,12 % (v/v)	Eisessig
0,48 % (w/v)	Tris
1 mM	EDTA

pH = 8,0 (HCl)

Der Puffer wurde vor Gebrauch mit demineralisiertem Wasser zum 1 x TAE Puffer verdünnt.

Lysepuffer:²⁶⁰

25 mM	NaHPO ₄
500 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
10% (v/v)	Glycerin

pH = 8,0 (HCl)

Waschpuffer:²⁶⁰

25 mM	NaHPO ₄
500 mM	NaCl
40 mM	Imidazol
10% (v/v)	Glycerin

pH = 8,0 (HCl)

Elutionspuffer:²⁶⁰

25 mM	NaHPO ₄
500 mM	NaCl
50 mM - 250 mM	Imidazol
10% (v/v)	Glycerin

pH = 8,0 (HCl)

Assaypuffer:

25 mM	NaHPO ₄
100 mM	NaCl
10% (v/v)	Glycerin

pH = 8,0 (HCl)

6.3 Mikrobiologische Techniken

6.3.1 Stammhaltung in Kryokulturen

Zur Lagerung von Bakterienstämmen bei -80 °C wurden Gefrierkulturen angelegt. Hierfür wurde die unter geeigneten Bedingungen (siehe 6.3.2) aufgezogene Bakterienkultur unter sterilen Bedingungen mit dem gleichen Volumenanteil einer sterilen 30% (v/v) Glycerinlösung versetzt. Die entstandene Glycerinkultur wurde in ein Kryoröhrchen gefüllt und bei -80 °C gelagert.

6.3.2 Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden unter folgenden Bedingungen (in Flüssigkultur oder auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium) kultiviert. Zusätzliche Parameter sind direkt zu den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

Tab. 6-5: Kultivierungsbedingungen der verwendeten Bakterien

Stamm	Medium (siehe Kapitel 6.2.1)	Temperatur [°C]	Schüttler- geschwindigkeit [min ⁻¹]
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	LB	37	200-250
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	LB, 2xYT, TB	37	200-250
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf 5	KB	30	200
<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384	NM6 (Vorkultur), NM10 (Fermentation)	27	200 (Vorkultur)
<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384 <i>ΔhrmI</i>	Production medium	27	200
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	TSB	30	200

6.3.3 Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Das Wachstum einer Bakterienkultur lässt sich durch die Erhöhung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgen. Kulturen wurden photometrisch gegen das jeweilige sterile Medium als Referenz vermessen.

6.3.4 Transformation

Transformation ist das Einbringen von DNA in einen Organismus. In dieser Arbeit wurden chemische (Hitzeschocktransformation) und elektrische Transformation (Elektroporation) angewendet. Vor der Transformation mussten elektrisch bzw. chemisch kompetente Zellen hergestellt werden (siehe Kap. 6.3.4.1 und 6.3.4.3), um DNA aufnehmen zu können.

6.3.4.1 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen

Es wurde eine Übernachtskultur (5 mL) hergestellt und mit einem Zahnstocher, der in die Bakterienkultur gehalten wurde, beimpft. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur in 200 mL LB-Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Wenn die OD_{600} von 0,4 erreicht war, wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Von nun an wurde auf Eis weitergearbeitet. Die Zellen wurden nun aufeinanderfolgend in steriler Umgebung mit 200 mL, 100 mL und 50 mL kaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde bei 4 °C, 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im letzten Schritt in 1 mL 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße zu 70 µl ausaliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.3.4.2 Elektroporation

Zu 70 µl auf Eis aufgetauten, elektrokompenten Zellen (siehe 6.3.4.1) wurden 1-3 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0.1-1 µl eines oder mehrerer Plasmide hinzugegeben und in eine eisgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Schichtdicke 2 mm) überführt. Das Gemisch wurde in einem

Elektroporator (Programm Ec 2) einer kurzzeitigen Spannung von 2,5 kV ausgesetzt. Danach wurde 1 mL LB-Medium zugegeben, das Gemisch wieder in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

6.3.4.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurde eine Übernachtskultur (5 mL) (siehe 6.3.4.1) hergestellt und am nächsten Morgen in 200 mL LB-Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 200 min⁻¹ kultiviert. Wenn die OD₆₀₀ von 0,4 erreicht war, wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Von nun an wurde auf Eis weitergearbeitet. Das Pellet wurde in 25 mL eiskaltem TFB I (Tab. 6-6) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 5 min) und in 4 mL TFB II (Tab. 6-6) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 100 µL aliquotiert und nach dem Schockfrieren in flüssigem N₂ bei -80 °C gelagert.

Tab. 6-6: Lösungen zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Lösung	Zusammensetzung
TFBI	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerin
TFBII	10 mM MOPS (steril filtriert) 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15% (v/v) Glycerin

6.3.4.4 Chemische Transformation

Zu einem Aliquot auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten Zellen wurden bis zu 10 µl der Ligation oder der Plasmide gegeben und 20 min inkubiert. Die Zellen wurden für 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium hinzugefügt und das Gemisch wurde erneute 2 min auf Eis gelagert. Nach einer Schüttelinkubation für 1 h bei 37 °C und 250 rpm wurde die Zellsuspension auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.3.5 Blau/Weiß-Selektion auf transformierte positive Klone

Die Plasmide zur Lagerung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten (Tab. 6-1) geben die Möglichkeit, nach der Transformation nicht nur transformierte von nicht transformierten Klonen zu unterscheiden, sondern auch die Klone zu erkennen, die im transformierten Plasmid DNA aufgenommen haben. Dies geschieht über die Lokalisation der MCS im Reporter gen lacZ

(IPTG-induzierbar). Eine Ligation von DNA in dieses Gen bedeutet eine Destruktion des Gens, welches die β -Galactosidase kodiert. β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und einem blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff. Eine positive Insertion in die MCS kann daher durch die Färbung der Zellen sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden die Transformanten aus Kapitel 6.3.3 wie beschrieben auf Selektivagar ausplattiert. Die Agarplatten wurden zuvor mit 40 μ L einer 20 mg/mL X-Gal-Lösung in Dimethylformamid sowie mit 40 μ L einer 20 mg/mL Isopropyl- β -D-1-thiogalacto-pyranosid-(IPTG)-Lösung imprägniert. Nach der Inkubation färbten sich transformierte Zellen, deren Plasmide Fremd-DNA aufgenommen haben, weiß und transformierte Zellen, deren Plasmid kein Insert tragen, blau.

6.4 Molekularbiologische Techniken

6.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur selektiven Amplifikation von DNA. Als Template wurden die genomische DNA von *Streptomyces griseoflavus* W-384, *Streptomyces coelicolor* A3(2) und *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, zur Kontrolle der Klonierung aber auch Expressionsplasmide wie pCDF DUET, pHIS-8 oder pME6041 verwendet. In Tabelle 6-7 ist ein üblicher Reaktionsansatz dargestellt. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 6-10 - 6-15 aufgelistet.

Tab. 6-7: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion

Volumen	Substanz
1 μ l	dNTP (10 mM)
0,5 μ l	Templat-DNA
0,25 bzw. 0,5 μ l	DNA-Polymerase (5 U/ μ L)
0,75 μ l	Vorwärtsprimer (50 μ M)
0,75 μ l	Rückwärtsprimer (50 μ M)
2,5 μ l	DMSO
5 bzw. 10 μ l	Puffer (10x bzw. 5x)
ad 50 μ l	ddH ₂ O

Für unterschiedliche Amplifizierungsexperimente wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Zur Überprüfung von Plasmiden und zur Kolonie-PCR diente die *Taq*-DNA-Polymerase (0,25 μ l), als Puffer wurde der mitgelieferte 10x-Reaktionspuffer verwendet. Für die Amplifikation von DNA für Klonierungen wurde die Expand High Fidelity PLUS DNA-Polymerase (0,5 μ l, 5 U/ μ L) eingesetzt. Diese besitzt eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität, wodurch die Fehlerrate minimiert wird. Als Puffer wurde der mitgelieferte 5x-Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsansätze wurden zur Amplifikation in einem Thermocycler (Biometra) plaziert und einem Temperaturprogramm ausgesetzt (Tab. 6-8).

Tab. 6-8: Temperaturprogramm für die PCR

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholung
Heizdeckel			
Initiation Denaturierung	96	120	} 30-35 x
Denaturierung	96	30	
Annealing	Primerabhängig	30	
Elongation	72	60 x (1000 bp) ⁻¹	
Abschließende Elongation	72	300	
Abkühlung	4		

6.4.1.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zur Überprüfung von Bakterienkolonien auf Agarplatten auf enthaltenes Insert. Hier dienten ganze Zellen als Templat enthaltende Matrix. Diese Prozedur war mit einer erheblichen Zeitersparnis verbunden, da die Schritte der Übernachtskultur und Plasmidisolierung entfielen. Allerdings waren die Störanfälligkeit und die Möglichkeit, falsch positive Ergebnisse zu erzielen, aufgrund von Verunreinigungen stark erhöht. Daher wurde diese Methode nur in speziellen Fällen zur Überprüfung von Klonierungen eingesetzt. Anstatt von genomischer DNA wurden mit einem Zahnstocher Bakterienzellen von einer Agarplatte zum Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zur PCR (Kap. 6.4.1) bestand in einer Erhöhung der anfänglichen Denaturierungszeit von 2 auf 10 Minuten. Dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen und die enthaltene DNA als Templat freigesetzt.

6.4.1.2 Fusions-PCR

Zur Konstruktion von neuartigen A-Domänen wurde die Methode der Fusions-PCR verwendet. Hierzu wurden zunächst PCR-Produkte mit DNA-Überhängen von 20 bp zum für die Fusion vorgesehenen DNA-Fragment generiert (Tab. 6-8). Es wurden jeweils 0,5 µL der zu fusionierenden, aufgereinigten (siehe 6.4.1.4) DNA-Abschnitte hinzugegeben. Ansonsten war der PCR-Ansatz wie in Tab. 6-7 zusammengesetzt. Als Polymerase wurde die Expand High Fidelity PLUS DNA-Polymerase (0,5 µl, 5 U/µL) verwendet. Die eingesetzten Primer waren sogenannte „nested primer“ (O3nested F+R, siehe Tab. 6-12). Die DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen wurden dann mit einer speziell optimierten PCR-Methode nach Szewczyk et al.²⁶¹ fusioniert. Dabei wurde die Elongationszeit schrittweise verlängert. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 6-9 aufgeführt.

Tab.6-9: Temperaturprogramm für die Fusions-PCR

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholung
Heizdeckel			
Initiation Denaturierung	94	120	
Denaturierung	94	20	} 10x
Ramping	70	1	
Annealing	55	60	
Elongation	72	180	
Denaturierung	94	120	} 5x
Ramping	70	1	
Annealing	55	60	
Elongation	72	240	
Denaturierung	94	120	} 10x
Ramping	70	1	
Annealing	55	60	
Elongation	72	300	
Abkühlung	4		

6.4.1.3 verwendete Oligonucleotide (Primer)

Für die Amplifikation, Klonierung, und Sequenzierung wurden spezifische Primer konstruiert. Für die Suche nach dem *lmbX*-Homolog wurden dagegen degenerierte Primer entworfen. Bei Primern, die zur einfachen Klonierung in einen Expressionsvektor verwendet wurden, wurden Restriktionsschnittstellen zur *In Frame*-Klonierung angefügt. Als Templat diente genomische DNA von Bakterien oder Plasmide. Die Primer wurden in lyophilisierter Form von der Fa. Invitrogen bezogen. Die Oligonucleotide wurden in TE-Puffer (siehe 6.2.2) gelöst, um eine 500 µM Stammlösung zu erhalten. Aliquots wurden dann für die PCR mit dd-H₂O 1:10 verdünnt. In den Tabellen 6-10 - 6-15 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und ihre Funktion aufgeführt.

Tab. 6-10: Primer zur heterologen Expression von Hormaomycin-Biosynthesegenen in *E. coli*. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primer-name	Primersequenz (5' → 3')	Templat
<i>hrmJ</i>	F: AAAAAA <u>GAGCTC</u> ATGCCGCTCAACGACCGTG R: AAAAAAA <u>AAGCTTT</u> CAGCCCTCGGCCAGGG	<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384
<i>hrmK</i>	F: <u>GGATCC</u> CAGCAGCACCCCCGGAAC R: <u>AAGCTTT</u> CATTCGGTTACCTCG	
<i>hrmL</i>	F: <u>GGATCC</u> AACTCCGTAGAAGACCTCTG R: <u>AAGCTTT</u> CAGGAAACCTGTGTC	
<i>hrmR</i>	F: AAAAAA <u>CATATG</u> CGAGATCGAGAAAAGAATGGA R: AAAAAA <u>GAGCTC</u> TATGCCGCGCTCCCTTC	
<i>cdaX</i>	F: AAAAAA <u>CATATG</u> AGTAATCCCTTCGACGAC R: AAA AAA <u>CTCGAGT</u> CCGGTCAGTTGCCGGTG	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)

Tab. 6-11: Primer zur heterologen Expression der Hormaomycin A-Domänen in *E. coli*. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Templat
O1	F: AAAGAATTCAGCCGGCTGGACGTGGTTA R: AAAAAGCTTTCACCTCCTCGGGCGTACG	<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384
O2	F: AAAGAATTCGGCGACGTCGACGTCCTG R: AAAAAGCTTTCATTCCTCGGGGCGTCGCG	
O3	F: AAAGAATTCGGCCGGCTGGACGTCGTC R: AAAAAGCTTTCACCTCCTCCCGGGTGTGCG	
O4	F: AAAGAATTCCTGAATCTTGACATCGTCACTG R: AAAAAGCTTTCACCTCCTCGGGCGTACG	
P1	F: AAAGAATTCGGCCGGCTGGACGTCGT R: AAAAAGCTTTCACCTCCTCGGGCGTACGCG	
P2	F: AAACAATTGGGCCGCATCGACCTGGTC R: AAAAAGCTTTCACCTCCTCGGCCGGTACG	
P3	F: AAAGAATTCGGTCCGTCGGGCTGTTGT R: AAAAAGCTTTCACGCCTCCTCGGGGTGG	

Tab. 6-12: Primer zur Konstruktion der fusionierten A-Domänen. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Komplementäre Überhänge sind kursiv markiert.

Primer-name	Primersequenz (5' → 3')	Templat
O3 nested	F: CTGGACGTCGTCACGGCG R: CTCCTCCCGGGTGTGCG	<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384
O3 left	F: AAAGAATTCGCTTTCGCGGCCGATCCG R: ATGCGAAACCACCACCT	
O3 right	F: TACGGGGCGACGGAGGTG R: AAAAAGCTTACACCGACCCGCTCCAGC	
O4 insert	F: AAGGTGTGGTGGTTTCGCATGCGGGTCTGGGGAATTTGG R: CGTACCTCCGTCGCCCCGTACCCGTTACAGCAACCGCCG	
O2 insert	F: AAGGGTGTGGTGGTTTCGCATCGGAACGTCGTGCGCCTCT R: CGTACCTCCGTCGCCCCGTACATGTTGACCAGGGTTCGGA	
P2 insert	F: AAGGGTGTGGTGGTTTCGCATAGGGCCGTCTGCGCGTTG R: CGTACCTCCGTCGCCCCGTAGACGTGCACCACCAGCGT	
Asp insert	F: AAGGGTGTGGTGGTTTCGCATCACGCCCTGGCCACCTAC R: CGTACCTCCGTCGCCCCGTAGGCGTTGATGATCTGGGCG	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
HPG insert	F: AAGGGTGTGGTGGTTTCGCATCGCGGGTTCGTGGACCTG R: CGTACCTCCGTCGCCCCGTACAGGTGACGCAGTACGATCC	

Tab. 6-13: Primer zur heterologen Expression in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Templat
Promotor	F: <u>GGATC</u> CTTTTAGAATTTTTAGTGTCTTATTTT R: ATTAAT <u>TGCAT</u> TCGACAATCGTGGG	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5
<i>hrmN</i>	F: ATTAATCGCCGACACACCGAGGGG R: <u>AAGCTT</u> TCAGTCGAAGTTGCGCAC	<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384

Tab. 6-14: Primer zur Sequenzierung im Expressionsvektor

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Templat
DUET for	TTGTACACGGCCGCATAATC	pCDF DUET
pME for	GTAACATCAAGGCCCGATC	pME 6041
pHIS rev	GTGGGCGGCCCGCGGGGA	pHIS8

Tab. 6-15: Primer zur Suche nach einem *lmbX*-Homolog in *S. griseoflavus* W-384

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Templat
<i>hrmunknown1</i>	F: CARGARTGYGGNDSNMGN R: NGWNGCRCANGCRTC	<i>Streptomyces griseoflavus</i> W-384
<i>hrmunknown2</i>	F: GAYACNGYNTTYGTN R: CANGCNGGRTCYTCNGG	

6.4.1.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden vor ihrer weiteren Verwendung mit dem PCR-Purification Kit der Firma Fermentas aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

6.4.2 DNA-Isolierung

6.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien wurde eine Übernachtskultur (5 mL) angesetzt. Am nächsten Tag wurden 1,5 mL der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen für 30 s bei 10000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl Puffer 1 (Tab. 6-16) resuspendiert. Nachdem ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurden möglichst schnell hintereinander 200 µl Puffer 2 (Tab. 6-16) und 200 µl Puffer 3 (Tab. 6-16) hinzugefügt, wobei zwischendurch kräftig geschüttelt wurde. Anschließend wurde 3 min bei 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µl Chloroform vorgelegt war. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und 5 min bei 18000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 350 µl Isopropanol vorgelegt war. Das Gemisch wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C (18000 x g) für 20-30 min zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet für 5 min mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (4 °C, 18000 x g). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in der Speedvac getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer oder dH₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tab. 6-16: Verwendete Puffer zur Plasmidisolierung

Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1	50 mM Tris 10 mM EDTA pH=8,0 (HCl) 100 µg x mL ⁻¹ RNase A, gelöst in TE-Puffer*
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer 3	3 M Kaliumacetat pH=5,5 (KOH)

*10 mg RNase A wurden in 1 mL TE-Puffer gelöst, 1 min bei 99 °C gekocht und zu 99 mL der autoklavierten Lösung gegeben

6.4.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Pseudomonas*

Eine Übernachtskultur (5 mL) wurde zentrifugiert (10000 x g, 5 min) und in 500 µl STE-Puffer und 5 mg/mL Lysozym resuspendiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C 3 h geschüttelt. Es wurden 250 µl 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben und gründlich gemischt. Es wurde bei 37 °C 30 min geschüttelt. Anschließend wurden 250 µl Phenol-Chloroform-Lösung hinzugegeben und 30 s gründlich gemischt. Diese Mixtur wurde 10 min bei 18000 x g zentrifugiert. 600 µl des Überstands wurden vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem eine Mischung aus 600 µl Isopropanol und 60 µl 3M Natriumacetat pH 5,5 vorgelegt war. Das Gemisch wurde 2 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und etwa 1 h getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

6.4.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus *Streptomyces*

Es wurde wie in Kapitel 6.4.2.2 verfahren, nur dass anstelle von 250 µl 2% SDS 500 µl 10% SDS und gleichzeitig 100 µl 3M Natriumacetat zugegeben wurden. Das Natriumacetat wurde im weiteren Verlauf nicht mehr hinzugegeben.

6.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente einerseits zur Analytik von PCR, Plasmiden und Restriktionsspaltungen, außerdem wurde sie zur Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Üblicherweise wurde 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (siehe 6.2.2) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 70 °C wurde 0,1 µg x mL⁻¹ Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Agaroselösung wurde in einen Träger gegossen, ein Probenkamm eingesetzt und

nach dem Aushärten in eine Elektrophoresekammer plaziert. Als Laufmittel diene 1x TAE-Puffer. Vor der Probenauftragung wurde die DNA mit 10x Färbelösung (0,5 mg x mL⁻¹ Bromphenolblau, 0,5 mg x mL⁻¹ Xylencyanol, 0,5 mg x mL⁻¹ Orange G, 400 mg x mL⁻¹ Sucrose) versetzt. Nach dem Auftragen in die Probestaschen wurde eine Spannung von 100-120 V angelegt. Als Referenz zur Größen- und Konzentrationsbestimmung dienten 2 µl eines DNA-Markers der Firma Roth (100 bp extended oder 1 kB) oder 6 µl des 1 kBplus Markers der Firma Fermentas. Eine Auswertung der Banden erfolgte unter UV-Licht.

6.4.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde eine 1% Agaroselösung hergestellt (siehe 6.4.3). Anstelle von Ethidiumbromid wurden 1 µl x 50 mL⁻¹ Gel Green (Biotium) zugegeben, um eine Interkalation in die DNA zu vermeiden. Die Gelelektrophorese wurde analog zu 6.4.3 durchgeführt. Die Auswertung und das Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell geschah unter blauem Licht, um Mutationen durch UV-Licht zu vermeiden. Die Agarosestücke mit den gewünschten DNA-Banden wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit einem DNA-Extraction-Kit der Firma Fermentas entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Eine Elution der DNA erfolgte je nach gewünschter Konzentration mit 30-50 µl Elutionspuffer, die Isolierung wurde durch Auftragen von 1-4 µl der Probe auf ein Agarosegel kontrolliert. Die isolierten Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

6.4.5 Sequenzierung

Um die Richtigkeit der amplifizierten und klonierten DNA zu überprüfen, wurden die entstandenen Konstrukte von der Firma GATC Biotech sequenziert. Bei Subklonierungen wurde das T/A-Konstrukt (siehe Kap. 6.4.9.1) sequenziert, sonst wurde im Expressionsvektor sequenziert. Tab. 6-17 zeigt, welche Sequenzierprimer im jeweiligen Vektor verwendet wurden.

Tab. 6-17: Übersicht über die verwendeten Sequenzierprimer

Vektor	Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
pBluescript SK(+)	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pGEM-T Easy	SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pHIS8/pET28b	pET reverse	CTAGTTATTGCTCAGCGG

6.4.6 Restriktionspaltung von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet. Die Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und Jena Bioscience bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Restriktionsspaltungen wurden zur Analytik von Klonierungen, Plasmiden und Fusionen durchgeführt, hierfür wurden 1-2 µl DNA verwendet. Hier war eine Inkubationszeit von 0,5-2 h ausreichend. Die gespaltene DNA konnte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 6.4.3) analysiert werden. Für die präparative Vorbereitung von Klonierungsfragmenten wurden 15-40 µl DNA eingesetzt. Um die DNA möglichst vollständig zu spalten, wurde für mindestens 3 h inkubiert und bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Nach eventueller Dephosphorylierung (siehe 6.4.7) wurde die DNA dann aus Agarosegelen isoliert (siehe 6.4.4).

6.4.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Vor der Klonierung wurden die mit Restriktionsenzymen linearisierten Plasmide an ihrem 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden. Hierfür wurde das Enzym Antarctic Phosphatase (NEB) benutzt. Zu 40-50 µl eines präparativen inaktivierten Restriktionsansatzes wurden 5-6 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers und 1-2 µl der Phosphatase gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Das Plasmid wurde dann mit einem PCR-Aufreinigungs-Kit (siehe 6.4.1.4) oder über ein Agarosegel (siehe 6.4.4) aufgereinigt und bei -20 °C gelagert.

6.4.8 Ligation

Ligation von kompatiblen DNA-Enden wurde mit dem Enzym T4-Ligase von der Firma Jenapharm durchgeführt. Üblicherweise wurde ein 10 µl-Ansatz vorbereitet. 1 µl Ligase und 1 µl Reaktionspuffer wurden vorgelegt. Es wurden insgesamt 8 µl Vektor und zu klonierendes Insert hinzugegeben, wobei die Verhältnisse variieren konnten. Es wurde darauf geachtet, dass das Konzentrationsverhältnis Insert:Vektor in etwa 5:1 betrug. Es wurde über Nacht (mindestens 5 h) bei 16 °C oder 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 10 min bei 65 °C inaktiviert und in den die gewünschten kompetenten Bakterienzellen transformiert (siehe 6.3.3).

6.4.9 Klonierung von Plasmiden

6.4.9.1 T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten

Das T/A-Klonieren von DNA erlaubt einen einfachen Einbau in ein Plasmid und anschließende Detektion der positiven Kolonien durch Blau/Weiß-Selektion (siehe 6.3.4). Hierfür muss zunächst ein 3'dTTP-Überhang nach Restriktion des Vektors kreiert werden. Dieser wird dann mit dem PCR-Produkt, welches durch die Aktivität der verwendeten DNA-Polymerasen 3'dATP-Überhänge besitzt, ligiert. Als Vektoren zur Aufnahme der PCR-Produkte wurden die Vektoren pGEM-T Easy und

pBluescript SK(+) verwendet. pGEM-T Easy war bereits geschnitten und besaß an den 3'-Enden dTTP-Überhänge, so daß die Ligation direkt erfolgen konnte. Der Vektor pBluescript SK(+) musste für die T/A-Klonierung vorbereitet werden (siehe 6.4.9.1.1).

6.4.9.1.1 Konstruktion eines T/A-Klonierungsvektors²⁷⁸

Für die Generierung von glatten Enden in pBluescript SK(+) wurde das Enzym *EcoRV* ausgewählt, da die Schnittstelle in der multiple cloning site (MCS) liegt, und das System somit für Blau/Weiß-Selektion auf positive Klone geeignet ist (siehe 6.3.4).

Der Vektor pBluescript II SK(+) wurde in einem präparativen Ansatz mit *EcoRV* geschnitten, die Inkubation erfolgte 2 h bei 37 °C (siehe 6.4.6). Anschließend wurde das Enzym bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Es wurden 1 U/µg Plasmid/20 µl Volumen Taq-Polymerase und dTTP in einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben und bei 70 °C für 2 h inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform wurde kräftig geschüttelt und bei 18000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem 70 µl Isopropanol vorgelegt waren. Es wurde wieder kräftig geschüttelt und anschließend bei 18000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 200 µl eiskaltem Ethanol für 5 min bei 18000 x g gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in einer Speedvac getrocknet. Das Pellet wurde dann in 10 µl dH₂O gelöst. Der fertige T/A-Vektor wurde bei -20 °C gelagert.

6.4.9.1.2 T/A-Klonierung

Für die T/A-Klonierung mit pGEM-T Easy wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für die T/A-Klonierung in pBluescript II SK(+) wurde das aufgereinigte PCR-Fragment und der T/A-Vektor mit der T4-Ligase ligiert (siehe 6.4.8), transformiert (siehe 6.3.3), positive Kolonien mit Blau/Weiß-Selektion detektiert (siehe 6.3.4) und sequenziert (siehe 6.4.5). Eine Übersicht über die entstandenen und in dieser Arbeit verwendeten T/A-Konstrukte gibt Tabelle 6-18.

Tab. 6-18: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten T/A-Konstrukte

Konstrukt	Herkunft	Vektor	Insert	Genflankierende Schnittstellen
pMC3	diese Arbeit	pBluescript SK(-)	<i>hrmK</i>	<i>BamHI/HindIII</i>
pMC12	diese Arbeit	pBluescript SK(-)	Pyoluteorin Promoter	<i>BamHI/AseI</i>
pMC9	diese Arbeit	pBluescript SK(-)	<i>hrmN</i>	<i>AseI/HindIII</i>
pDC1	Denise Hissa	pGEM-T Easy	<i>hrmP1</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>
pDC2	Denise Hissa	pGEM-T Easy	<i>hrmP2</i> A-Domäne	<i>MfeI/HindIII</i>
pDC3	Denise Hissa	pGEM-T Easy	<i>hrmP3</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>
pDC4	Denise Hissa	pBluescript SK(-)	<i>hrmO1</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>
pDC5	Denise Hissa	pBluescript SK(-)	<i>hrmO2</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>
pDC6	Denise Hissa	pBluescript SK(-)	<i>hrmO3</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>
pDC7	Denise Hissa	pBluescript SK(-)	<i>hrmO4</i> A-Domäne	<i>EcoRI/HindIII</i>

6.4.9.2 Klonierung von *in vitro*-Expressionskonstrukten in *E. coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden A-Domänen und Biosynthesegene in die Expressionsvektoren pHIS8 und pET28 kloniert (siehe Tab. 6-2). Die Plasmide tragen einen N-terminalen His-Tag aus 6-8 Histidinen, der bei der Expression endständig an das Protein angefügt wird, und die selektive Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht (siehe 6.5.4). Es ergab sich folgendes Klonierungsschema: Die gewünschten Proteine oder Domänen wurden mit spezifischen Primern amplifiziert (siehe 6.4.1), aufgereinigt (siehe 6.4.1.4) und entweder mit einem TA-Vektor subkloniert (siehe 6.4.9.1) und sequenziert (siehe 6.4.5) oder direkt in den Expressionsvektor kloniert. Für die einfache Klonierung in den Expressionsvektor wurden das zu klonierende Gen und der Expressionsvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 6.4.6), das Plasmid wurde danach noch dephosphoryliert (siehe 6.4.7). Es erfolgte die Ligation (siehe 6.4.8), Transformation in *E. coli* XL-1 blue (siehe 6.3.3), Screening auf positive Kolonien und eventuelle Sequenzierung. Von positiven Klonen wurde eine Gefrierkultur angelegt (siehe 6.3.1), die Plasmide wurden für die Proteinexpression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Eine Übersicht der klonierten Expressionskonstrukte ist in Tabelle 6-19 aufgeführt.

Tab. 6-19: Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten Expressionskonstrukte

Konstrukt	Vektor	Insert	Genflankierende Schnittstellen	Größe des Inserts
pMC4	pHIS8	<i>hrmK</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	1584 bp
pMC5	pHIS8- <i>svp</i>	<i>hrmL</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	276 bp
pMC6	pHIS8	<i>hrmF</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	555 bp
pMC7	pHIS8	<i>hrmL</i>	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	276 bp
pMC10	pCDF-DUET	<i>hrmR</i>	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	219 bp
pMC17	pHIS8	<i>hrmP1</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1629 bp
pMC18	pHIS8	<i>hrmP2</i> A-Domäne	<i>Mfe</i> I/ <i>Hind</i> III	1641 bp
pMC19	pHIS8	<i>hrmP3</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1698 bp
pMC20	pHIS8	<i>hrmO1</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1623 bp
pMC21	pHIS8	<i>hrmO2</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1680 bp
pMC22	pHIS8	<i>hrmO3</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1629 bp
pMC23	pHIS8	<i>hrmO4</i> A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1623 bp
pMC34	pHIS8	O2fused A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1659 bp
pMC35	pHIS8	O4fused A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1617 bp
pMC36	pHIS8	P2fused A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1632 bp
pMC37	pHIS8	A5fused A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1599 bp
pMC41	pHIS8	H6 fused A-Domäne	<i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III	1629 bp
pMC44	pET28b	<i>hrmJ</i>	<i>Sac</i> I/ <i>Hind</i> III	684 bp
pMC46	pET28b	<i>hrmR</i>	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	219 bp
pMC65	pET28b	<i>cdaX</i>	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	221 bp
pMC66	pCDF-DUET	<i>cdaX</i>	<i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	221 bp

6.4.9.3 Konstruktion von Coexpressionsstämmen in *E. coli*

Um mehrere Proteine gleichzeitig in *E. coli* zu exprimieren, wurden Coexpressionsstämme durch Elektroporation hergestellt. Jeweils 1 µl einer Plasmidpräparation der beiden zusammen zu exprimierenden Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und auf Doppelselektivagar ausplattiert. Gewachsene Kolonien trugen beide Plasmide in sich, sie wurden flüssig kultiviert und eingefroren (siehe 6.3.1). Eine Übersicht über die konstruierten Coexpressionsstämme zeigt Tabelle 6-20.

Tab. 6-20: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Coexpressionsstämme

Stamm	Konstrukt 1	Konstrukt 2	Resistenzen
MC3	pMC6	pMC2	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC11	pMC4	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC26	pMC17	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC27	pMC18	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC28	pMC19	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC29	pMC20	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC30	pMC21	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC31	pMC22	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC32	pMC23	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC38	pMC34	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC39	pMC36	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC40	pMC35	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC42	pMC37	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC43	pMC41	pMC10	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC 68	pMC37	pMC66	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰
MC 69	pMC41	pMC66	Kan ⁵⁰ , Sm ⁵⁰

6.4.9.4 Klonierung von *in vivo*-Expressionskonstrukten in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

hrmN wurde zusammen mit einem Promoter der Pyoluteorinbiosynthese im Plasmid pME 6041 (Tab. 6-2) exprimiert. Der Promoter wurde aus pMC12 (Tab. 6-18) mit *KpnI* und *EcoRI* ausgeschnitten. *hrmN* wurde aus pMC9 mit *KpnI* und *SacI* ausgeschnitten. Beide Fragmente wurden mit Dreipunktligation in pME6041, das mit *EcoRI* und *SacI* linearisiert war, eingefügt. Das Konstrukt wurde pMC15 genannt. Ein Klonierungsschema befindet sich in Abbildung 5-37.

6.5 Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteanalytik

6.5.1 Alignments zur Festlegung des Leserahmens

Die Adenylierungsdomänen der NRPS enthalten als katalytische Untereinheiten eines Megaenzymen weder Start- noch Stopcodon. Zur korrekten Proteinexpression wurden daher Alignments mit anderen NRPS-A-Domänen mit dem Programm Bioedit durchgeführt. Generell musste bei der Klonierung in den Expressionsvektor (siehe 6.4.9.2) darauf geachtet werden, dass das zu exprimierende Protein bzw. Domäne im Leserahmen zum Histidintag eingefügt wurde.

6.5.2 Proteinexpression

Dieses Kapitel stellt die allgemeine Vorgehensweise bei einer heterologen Proteinüberexpression dar, etwaige Änderungen vom Protokoll sind im Ergebnisteil in den jeweiligen Kapiteln nachzulesen. Von einer Agarplatte oder einer Gefrierkultur wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsstammes angesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in 100-200 mL Medium (Testexpression) bzw. 500 mL - 1 L Medium überführt. Der Kolben hatte mindesten das doppelte Volumen wie die Kultur. Wenn möglich wurde ein Erlenmeyerkolben mit Schikane benutzt, um die Sauerstoffzufuhr für die Zellen zu erhöhen. Als Expressionsmedien wurden hauptsächlich 2xYT und TB verwendet (siehe 6.2.1). Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C, 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 (2xYT), bzw. 1,2-1,5 (TB) wachsen gelassen. Die Kultur wurde auf ca. 16 °C abgekühlt und die Proteinexpression mit 0,5-1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach der Induktion wurde die Kultur für 16-20 h bei 16 °C und 250 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur bei 5000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde aufgrund der intrazellulären Konzentration der Proteine verworfen, die Zellen wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.5.3 Zellaufschluss

Für die *in vitro*-Untersuchungen von überexprimierten Proteinen wurde das Zellpellet aus Kapitel 6.5.2 im Lysepuffer für die His-Tag-Aufreinigung (siehe 6.2.2) resuspendiert (ca. 2,5 mL pro g Zellpellet) und bei allen folgenden Schritten möglichst auf Eis oder bei 4 °C weiterbehandelt. Die Zellen wurden dann im Ultraschallhomogenisator einem Leistungseintrag von 50 W und einer Frequenz von 40 Hz für 10 s ausgesetzt. Die Beschallung wurde je nach Zellzahl 5 bis 10 Mal wiederholt, wobei zwischen jeder Wiederholung für 10 s auf Eis gekühlt wurde. Daraufhin wurden die unlöslichen von den gelösten Bestandteilen durch Zentrifugation bei 15000 g für 30 min voneinander getrennt.

6.5.4 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Zur selektiven Aufreinigung von überexprimierten His-Tag-Fusionsproteinen wurde Ni-NTA-Agarose verwendet. Der Überstand der aufgeschlossenen und zentrifugierten Expressionskulturen (6.5.3) wurde mit 200-1000 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und auf Eis für 1 h bei 100 min⁻¹ inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Polypresäule gegeben und mit 2-25 mL Lysepuffer und 2-25 mL Waschpuffer (siehe 6.2.2) gewaschen. Die Elution erfolgte entweder fraktioniert über eine ansteigende Imidazolkonzentration im Elutionspuffer (50-300 mM) oder stoßweise mit 300 mM Imidazol im Elutionspuffer. Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug zwischen 250 µl und 2,5 mL und wurde der zu erwartenden Proteinkonzentration und dem anschließenden Experiment angepaßt. Allen Fraktionen (Überstand, Durchlauf, Waschen und Elutionen) wurde 20 µl Lösung entnommen und für die anschließende SDS-PAGE-Analytik (siehe 6.5.7) gelagert.

6.5.5 Entsalzung und Aufkonzentrierung von Proteinen

Zur Entsalzung und Umpufferung von Proteinfraktionen wurden PD10-desalting-Columns der Firma GE verwendet. Es wurde nach den „gravity protocol“ entsprechend den Herstellerangaben gearbeitet. Zur Aufkonzentrierung von Proteinfraktionen wurden Vivaspin 500 Zentrifugationskonzentratoren der Firma Sartorius benutzt und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Diese enthalten eine vertikale Membran verschiedener spezifischer Molekulargewichtsausschlussgrößen (MWCO). Die jeweils gewählte MWCO war dabei maximal halb so groß wie die entsprechende Proteingröße.

6.5.6 TCA-Präzipitation

Bei sehr schwach konzentrierten Proteinfraktionen, die per SDS-PAGE (6.5.7) analysiert werden sollten, wurde eine Fällung des Gesamtproteins mit Trichloressigsäure (TCA) vorgenommen. Die Probe wurde mit 1/10 (v/v) 72% (w/v) TCA versetzt und 10 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde 10 min bei 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und der Rückstand in 10 µL 1M Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen.

6.5.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analytik von Proteinexpressionen und –aufreinigungen wurde die SDS-PAGE verwendet. Dabei wurden Proben aus den Abschnitten 6.5.4, 6.5.5 und 6.5.6 in einem Volumen von 1:1 mit 2xSDS-Probenpuffer (100 mM Tris; 200 mM DTT; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 20% (v/v) Glycerin) versetzt, gemischt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Danach wurde wieder gemischt und die Proben für 1 min zentrifugiert (10000 x g). Bei Proteinexpressionen wurde auch das Zellpellet aus Kap. 6.5.3 mit Lysepuffer versetzt, 30 s gemischt, und analog behandelt, um unlösliches Protein zu detektieren.

Die Trennung der Proteine wurde in einem vertikalen Multigel Elektrophoresesystem durchgeführt. Es kamen Gele in Konzentrationen von 12 bis 20% (v/v) Polyacrylamid:Bisacrylamid zum Einsatz und wurden nach der Literatur hergestellt.²⁸⁵ Zuerst wurde das Trenngel angesetzt und zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit Klammern fixiert und durch ein Gummi dreiseitig abgedichtet waren. Damit an der Grenzschicht zum späteren Sammelgel eine horizontale, gerade Fläche entstand, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das 5% (v/v) Polyacrylamid:Bisacrylamid-Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesetzt. Das fertige Gel wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt und mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS) überschichtet. Bei der Dokumentation von Expressionen von MbtH-artigen Proteinen wurde in der SDS-PAGE statt dem gängigen Laemmli-Laufpuffer mit Glycin ein Puffersystem aus Tris/Tricin²⁷⁹ verwendet werden. Tricin besitzt einen anderen pKs-Wert als Glycin und ändert die Auflösung von kleinen Proteinen in der Elektrophorese. Die kleinen Proteine laufen nicht mehr mit der Färbemittelfront aus dem Gel mit. Das Gel wurde hier

von oben mit Kathodenpuffer (100 mM Tris pH 8,25, 100 mM Tricin, 0,1% SDS) überschichtet, in die untere Pufferkammer wurde Anodenpuffer (200 mM Tris pH 8,9) gegeben.

Die Proben wurden in die Taschen überführt. Bei der Verwendung von kleinen Taschen wurde ein Volumen von 10 bis 12 μL und bei der Verwendung von großen Taschen ein Volumen von 20 bis 30 μL der Probe eingefüllt. Zur späteren Analyse kamen Proteinmarker zum Einsatz, die Proteine definierter Größe beinhalten. Verwendet wurden dabei der Roti-Mark-Standard (Firma Roth), wovon 3 μL aufgetragen wurden, sowie der Broad-Range-Marker (Firma NEB), wovon 8 bis 10 μL aufgetragen wurden. Die Proteine wurden durch das Anlegen einer Spannung von 90-120 V nach ihrer Größe getrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die Proteinbanden durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Das Gel der SDS-PAGE wurde nach der elektrophoretischen Trennung in die Coomassie Färbelösung (10% (v/v) Eisessig; 30% (v/v) Methanol; 0,25% (w/v) Brilliant-Blau R250) gegeben und für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt. Als Alternative wurde in einigen Fällen die Färbung in der Mikrowelle vorgenommen. Dabei wurde die Färbelösung kurz aufgekocht und für weitere 5 min auf dem Schüttler platziert. Nach der Färbung wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült und die Entfärber-Lösung (10% (v/v) Eisessig; 30% (v/v) Methanol) auf das Gel gegeben. Das Gel wurde auf dem Schüttler mit einem Zellstofftuch entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Zur Dokumentation schloss sich eine Trocknung in Cellophan-Folie mit 1 mL Glycerin an.

6.5.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

6.5.8.1 Bradford-Test

Die Konzentration von Proteinfraktionen wurde mit dem modifizierten Bradfordassay²⁸⁰ bestimmt. Der Test beruht auf dem klassischen Bradford-Verfahren zur Proteinbestimmung. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 und dem Protein, wobei sich die Farbe des Farbstoffs von rot nach blau ändert. Die proteingebundene, blaue Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, während die ungebundene, rote Form bei 450 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm lieferte eine Standardkurve, die keine Linearität aufweist. Die Linearität ergibt sich, wenn jede Probe bei 590 und bei 450 nm vermessen wird und der Quotient $\text{OD}_{590\text{nm}}$ und $\text{OD}_{450\text{nm}}$ gegen die Konzentration aufgetragen wird. Hierzu wurden 2 mL 5 x Roti-Nanoquant (Fa. Roth) mit 8 mL destilliertem Wasser verdünnt. 100 μL dieser Arbeitslösung wurden mit 25 μL der Proteinlösung in Mikroküvetten gut vermischt und eine Bestimmung der Absorption bei 590 und 450 nm vorgenommen. Die Proteinmenge wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, die mit BSA als Standardprotein erstellt wurde (Abb. 6-1). Die Messung erfolgte gegen Wasser als Referenzwert. Für die Erstellung der BSA-Kalibriergeraden und der Probemessung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die

Proben wurden vor der Messung verdünnt, sodass die resultierenden Messwerte im linearen Bereich der Kalibriergeraden liegen.

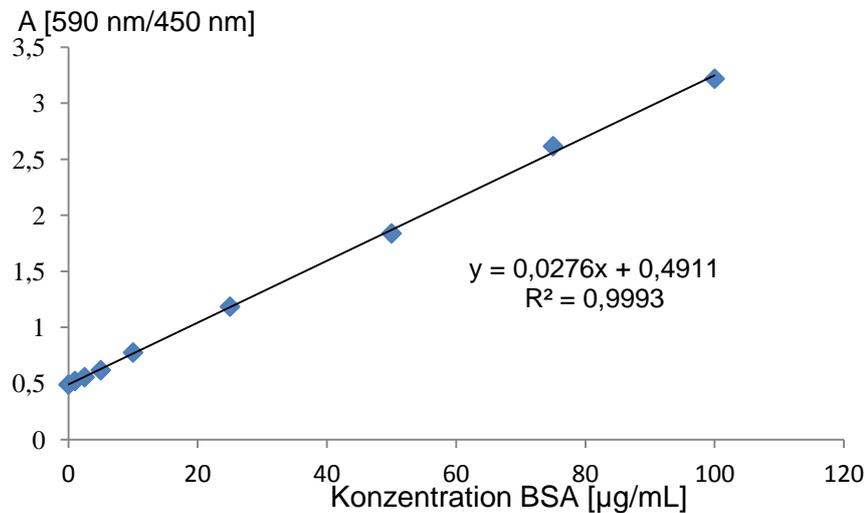


Abb. 6-1: BSA-Kalibriergerade für den Bradford-Test

6.5.8.2 SDS-PAGE-Absorptionsmessungen

Für die Konzentrationsmessungen von Proteinkomplexen (A-Domäne und MbtH-Protein) wurde die Proteinkonzentration über eine Absorptionsmessung der Proteinbanden auf den SDS-PAGE Gelen verifiziert. Hierzu wurden SDS-PAGE Gele angefertigt, die neben den unbekanntem Proben BSA-Proteinproben bekannter Konzentration enthielten. Die Software des Geldokumentationssystems Genius (Syngene) wandelte die Absorptionsmessungen der Banden in Peaks um. Aus den Flächen unter den Peaks konnte dann über eine Kalibrierkurve der bekannten BSA-Proben die Konzentration der unbekanntem Proben errechnet werden (Abb. 6-2).

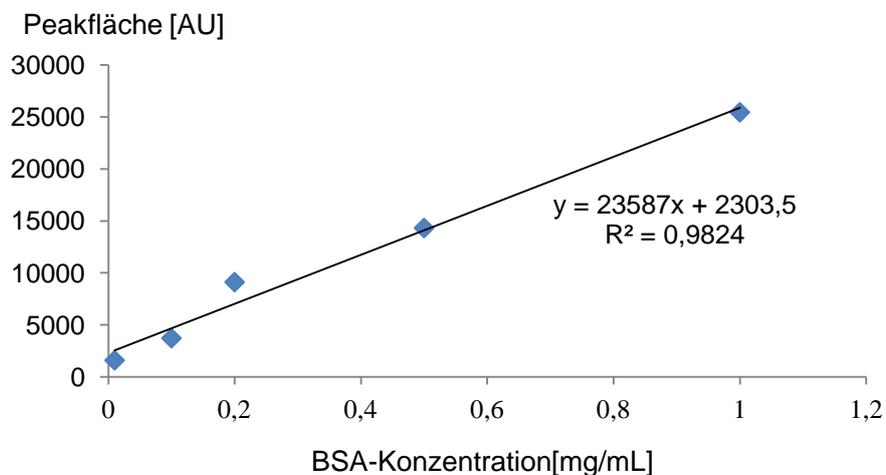


Abb. 6-2: Kalibriergerade zur Messung der Konzentration unbekannter Proteinproben am Geldokumentationssystem Genius

6.5.9 Massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen

Einige Proteine wurden massenspektrometrisch per MALDI-TOF-TOF-MS untersucht. Dazu mußte die Probe entsalzt und konzentriert vorliegen.

6.5.9.1 Probenvorbereitung

Die Proteinprobe wurde zunächst in das Vivaspin-Röhrchen (siehe 6.5.5) überführt und bei 15000 x g für 15 min zentrifugiert. Für die Entsalzung der Probe wurde zum Retentat 300 µL 50% Acetonitril hinzugefügt und bei 15000 x g für 15 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 5-10 Mal wiederholt. Das entsalzte Retentat wurde in den Messungen eingesetzt.

6.5.9.2 Massenspektrometrie von Proteinen

Mit den konzentrierten Proteinproben wurden matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight-Massenspektrometrie-(MALDI-TOF-MS) Messungen durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Bruker autoflex II TOF/TOF analysiert, wobei es sich bei der verwendeten Matrix um HCCA (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure) oder DHAP (2,5-Dihydroxyacetophenon) handelte. Die Probe wurde auf die Matrix gegeben, mit konzentrierter TFA gewaschen und anschließend vermessen.

6.5.10 Proteinaufreinigung mit FPLC

Die weitere Aufreinigung von Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung (siehe 6.5.4) wurde an einer Äkta-FPLC (GE-Healthcare) vorgenommen. Es wurde eine SepharoseQ-FF-Säule (1 mL) und eine 2 mL-Probenschleife verwendet. Es wurde ein Stufengradient mit Puffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) und Puffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1M NaCl) benutzt. Nach der Probenaufgabe (ca. 1 mL einer Proteinelution in Assaypuffer) wurde mit 5 Säulenvolumen 10% B gewaschen, und schrittweise mit 5 Säulenvolumen 20% B, 5 Säulenvolumen 30% B, 5 Säulenvolumen 40% B und 5 Säulenvolumen 80% B eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 1 mL. Nach Analyse der Fraktionen der größten Peaks mit Bradford-Test (siehe 6.5.8.1) wurden die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, gesammelt und mit Vivaspin-Röhrchen entsalzt und aufkonzentriert (siehe 6.5.5). Die übrigen Fraktionen mit Proteingehalt wurden TCA-präzipitiert (6.5.6) und zusammen mit den Fraktionen mit Zielprotein per SDS-PAGE (siehe 6.5.7) analysiert.

6.5.11 Lagerung von Proteinen

Proteine wurden, um die Aktivität über längere Zeit zu erhalten, mit einer Tropfpipette vorsichtig in flüssiges N₂ getropft. Dabei musste der Proteinpuffer mindestens 10% Glycerin enthalten. Die gefrorenen Kügelchen wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

6.6 Enzymassays

6.6.1 [γ - $^{18}\text{O}_4$]-ATP-Assay

6.6.1.1 Durchführung des Assays

Pro getesteter Aminosäure wurde ein Ansatz angefertigt. Die Versuche wurden in 200 μL -Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Ansatz umfasste folgende Komponenten:

- 2 μL Lösung 1: 3 mM γ - $^{18}\text{O}_4$ -ATP, 15 mM MgCl_2 in 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 2 μL Lösung 2: 3 mM einer Test-Aminosäure, 15 mM Na-Pyrophosphat (PPi) in 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 2 μL des konzentrierten Enzyms in Assaypuffer

Die Positivkontrolle für die Messung enthielt 2 μL Lösung 2 der aktivierten Aminosäure, 2 μL 3 mM γ - $^{16}\text{O}_4$ -ATP, 15 mM MgCl_2 in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2 μL der des Enzyms. Die Negativkontrolle enthielt 2 μL Lösung 2 der aktivierten Aminosäure, 2 μL der Lösung 1 und 2 μL des Assaypuffers. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde der Assay durch die Zugabe von 6 μL einer Lösung von 9-Aminoacridin in Aceton ($10 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) gestoppt.

6.6.1.2 Massenspektrometrische Analytik des Assays

Für die Analytik des [γ - $^{18}\text{O}_4$]-ATP-Assays wurden MALDI-TOF-MS-Messungen (siehe 6.5.9.2) durchgeführt. Alle Messungen wurden mit einem Bruker autoflex II TOF/TOF durchgeführt. Vor der Analyse wurde 1 μL der Proben/Matrix-Mischung auf ein Edelstahl-MALDI-Target aufgetragen. Die Massenspektren wurden im Negativmodus im Bereich von 450 bis 1200 m/z aufgenommen. Die Massenspektren für die ATP-PPi-Austauschanalyse wurden aufgenommen, indem 100 aufeinanderfolgende Laserstöße gemittelt wurden. Die Spektren wurden mit Hilfe der Bruker Compass Data Analysis Software der Firma Bruker Daltonic GmbH ausgewertet. Um den prozentualen Austausch zu errechnen, wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Prozent Austausch: } \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100$$

($^{18}\text{O} + ^{16}\text{O}$) bezeichnet die Summe der Integrale der Peaks bei m/z : 506, 508, 510, 512, 514, 528, 530, 532, 534, 536 und ^{16}O das Integral des Peaks bei m/z : 506. Die Aktivierung wurde dann wie folgt berechnet:

$$\text{Prozent Aktivierung: } \frac{\text{---}}{\text{---}} \times 100$$

Da die molare Gleichgewichtsrate von unmarkiertem PPI zu γ - $^{18}\text{O}_4$ -ATP unter Assay-Bedingungen 5:1 ist, entsprechen 83,33 % gemessener Austausch 100 % Aktivierung.

6.6.2 Assays zur Bildung von (3-Ncp)Ala aus Lysin

6.6.2.1 Assay von HrmJ

Es wurden 100 mM Stammlösungen von α -Ketoglutar säure, Ascorbinsäure, DTT, FeSO_4 und Lysin (alle gelöst in dH_2O) hergestellt. Eine typische Assaymischung bestand aus 1 mM Lysin, 1 mM DTT, 1 mM α -Ketoglutar säure, 1 mM Ascorbinsäure, 0,5 mM FeSO_4 und 1 mM HrmJ in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,5, oder pH 8. Das Reaktionsvolumen betrug 500 μL . Der Assay wurde 3 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μL eiskaltem Ethanol gestoppt.

6.6.2.2 Derivatisierung der Aminosäuren

Es wurden 50 μL der zu derivatisierenden Aminosäure oder der Assaylösung aus Abschnitt 6.6.2 mit 50 μL Dansylchlorid ($1,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ in Acetonitril) und 50 μL Li_2CO_3 (80 mM, pH 10) vermischt und unter Lichtausschluß 1 h bei RT inkubiert.²¹⁵ Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL einer 2% Ethylaminlösung gestoppt und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit HPLC (siehe 6.6.2.3) analysiert.

6.6.2.3 HPLC-Analytik der Assays

Es wurden zwei Methoden zur HPLC-Analytik der derivatisierten Aminosäuren (siehe 6.6.2.2) angewendet.

Methode 1:²¹⁸

30 min 59% Ammoniumformiat (9 mM, pH 3,4), 41 % Acetonitril, 1 $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$.

Die Ammoniumformiatlösung wurde mit Ameisensäure auf pH 3.40 eingestellt. Der Fluß betrug 1 $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$.

Säule: C18 250x4 mm Knauer 5 μm

Methode 2:²¹⁵

30 min 80 % KH_2PO_4 (0,1 mM, pH 7,5), 20 % Acetonitril.

Der Fluß betrug 1 $\text{mL} \times \text{min}^{-1}$.

Säule: C18 250x4 mm Knauer 5 μm

Die Proben wurden auf einer analytischen HPLC von Jasco (siehe 6.7.3) analysiert.

6.6.3 Kinetische Charakterisierung von HrmF

Isoliertes HrmF aus der Überexpression von pMC6 wurde in 100 mM Phosphatpuffer überführt (siehe 6.5.5) und mit L-DOPA in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Ein typischer Assay nach Colabroy et al.²²⁷ bestand aus 25 μL Enzym (1,3 μM , 10 μM L-DOPA und 10 μM Ascorbinsäure in 500 μL Phosphatpuffer (100 μM , pH 8). Die Enzymaktivität wurde 30 min durch die Änderung der Absorption bei 413 nm an einem BioMate 3 Photometer (Thermo) verfolgt. Es bildete sich ein gelb gefärbtes Reaktionsprodukt ($\epsilon=20.300\pm 890 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die kinetischen Parameter wurden ermittelt, indem die linearen Änderungsraten der Absorptionen gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurden und mit dem Hanes-Woolf-Diagramm linearisiert wurden. Die Michaelis-Menten-Kurve wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 errechnet.

6.6.4 PCP-Beladungsassay von HrmK/HrmL

Eine typische Assay-Mixtur bestand aus 5 mM Prolin, 5 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphonhydrochlorid (TCEP), 2,4 mM HrmL und 0,2 mM HrmK in 20 mM Tris, pH 7,5. Das Reaktionsvolumen betrug 500 μL . Die Reaktion wurde 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit Vivapin 5K MWCO aufkonzentriert (siehe 6.5.9.1) und mit dH_2O gewaschen, um die Probe für die Massenspektrometrie vorzubereiten. Die entsalzten Proteine wurden mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie (siehe 6.5.9.2) analysiert.

6.7 *In vivo*-Proteinexpression und Analytik

6.7.1 *In vivo*-Proteinexpression von Biosynthesegenen

Für Expressionen in *E. coli* wurde analog zu Abschnitt 6.5.2 verfahren. Die Größe der Expressionskulturen betrug 300 mL. *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 wurde bei 30 °C kultiviert (siehe 6.3.2). Die Größe der Kulturen betrug 50 mL. Eine Induktion der Proteinexpression war hier nicht nötig, da der Pyoluteorinpromoter während der Pyoluteorinbiosynthese induziert werden sollte. Es wurden vier verschiedene Kulturen (und Negativkontrollen) parallel angesetzt und nach verschiedenen Zeitpunkten (43 h, 51 h, 66 h, 76 h) aufgearbeitet.

6.7.2 Aufarbeitung der Zellen und Extraktion

Die Aufarbeitung der Überexpressionen von HrmF und HrmC in *E. coli* erfolgte nach Rütthlein.²³³ Die Zellen wurden nach der Expression zentrifugiert (4 °C, 3600 rpm, 30 min), mit 50 mL steriler NaCl-Lösung gewaschen und in 150 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer (100 mM, pH 8.0) resuspendiert. Von nun an wurde unter Lichtausschluß gearbeitet. Es wurde 11 mM (Endkonzentration) L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hinzugegeben, und 1 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden

die Zellen wieder abzentrifugiert (3600 rpm, 10 min) und der gelb gefärbte Überstand abgenommen und gefriergetrocknet. Der Extrakt wurde in Methanol gelöst und mit HPLC-MS (Methode CF, siehe 6.7.3) analysiert.

Die Zellkultur der Überexpression von HrmJ in *E. coli* wurde zunächst auf Eis und unter Rühren 5 Minuten per Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden dann bei 3600 rpm 30 Minuten abzentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet. Der trockene Extrakt wurde in 10 mL dH₂O gelöst, mit Dansylchlorid derivatisiert (siehe 6.6.2.3) und mit HPLC analysiert (siehe 6.6.2.4).

Die Aufarbeitung der Expressionen in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 erfolgte nach Sarniguet et al.²⁵⁸ Die Zellen wurden zentrifugiert (5000 x g, 5 min) und das Zellpellet wurde in 10 mL Aceton resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (10000 x g, 10 min) und der Überstand wurde gesammelt. Der Kulturüberstand wurde mit 1 M HCl auf pH 2.0 eingestellt und 3 mal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Alle organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 4 mL Methanol aufgenommen und mit HPLC (siehe 6.7.3) und HPLC, gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie [HPLC-HRMS (siehe 6.7.4) (Methode N)], analysiert.

6.7.3 HPLC-Analytik von Enzymexpressionen

Die Analyse von Enzymassays mittels HPLC wurde auf einer computergesteuerten Anlage der Firma Jasco (Darmstadt) mit einem zugehörigen MD-2015 Multiwavelength Detektor von Jasco durchgeführt. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde das Programm ChromPass (Jasco) verwendet.

Methode N:

Minute	%Acetonitril (+0,1% TFA)	% H ₂ O (+0,1% TFA)
0	5	95
30	45	55
31	100	0
40	100	0
45	5	95

6.7.4 HPLC-HRMS von Enzymexpressionen

Für die HPLC-massenspektrometrischen Untersuchungen (HPLC-MS) war ein micrOQ-TOF-Flugzeitspektrometer der Fa. Bruker Daltonik GmbH (Bremen) mit Apollo-ESI-Quelle mit einer HPLC-Anlage Agilent-1200-Serie gekoppelt. Das System wurde mit der HyStar Software (Bruker) gesteuert. Die Kalibrierung erfolgte intern mit Natriumformiat. Die Genauigkeit der Massen-

bestimmung lag bei 5 ppm (exakte Masse). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Data Analysis der Firma Bruker. Als HPLC-Methoden wurden die Methoden aus 6.7.3 verwendet.

6.8 Fermentation von *Streptomyces griseoflavus* W-384

Es wurde eine Vorkultur in 50 mL NM6 (siehe 6.2.1) angesetzt und bei 180 rpm und 27 °C für 48 h kultiviert. Die Vorkultur wurde dann in einem sterilen Labfors 10 L Fermenter mit 1,5 L NM10 (siehe 6.2.1) versetzt und für 72 h bei 27 °C, einem pH von 6.5 und einer Luftzufuhr von 1.6 vvm fermentiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden nach 24 h über 10 Stunden 3 mmol Pyrrol-2-carbonsäure, gelöst in 75 mL sterilem Wasser, zur Kulturbrühe gepumpt. Durch Zentrifugation wurde das Mycel vom Medium getrennt, letzteres wurde, da es kein Hormaomycin enthielt, verworfen. Das Mycel wurde nach Lyophilisation und Mörsern mit 3x 450 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wurde mit kaltem Pentan gewaschen. Der trockene Rohextrakt wurde in Methanol/Acetonitril (1:1, 6,75 mg x mL⁻¹) gelöst und über eine präparative HPLC-Anlage der Firma Knauer aufgetrennt. Als Säule wurde eine Knauer Eurospher 100 C-18, 7 µm, 250 x 16 mm verwendet. Die Flußrate betrug 14 mL x min⁻¹. Pro Lauf wurden 750 µL injiziert.

HPLC-Methode Streptomyces:

Minute	% Acetonitril (+0,1% TFA)	% H ₂ O (+0,1% TFA)
0	45	55
3	45	55
20	60	40
22	75	25
35	85	15
37	100	0
50	100	0
60	45	55

6.9 Analytik des *hrmB*-Überexpressionsextraktes

6.9.1 Analytische und präparative Auftrennung des Extraktes

Der Extrakt der *hrmB*-Überexpression wurde in Neapel/Italien auf einer Varian Prostar 210 HPLC, ausgestattet mit einem Varian Prostar 325 UV-Vis-Detektor (273 nm) zunächst mit einer semipräparativen Säule (C18, 25x10 cm, 5 µm) aufgetrennt. Die Trennung war isokratisch (Acetonitril/H₂O 75:25+ 0,1% TFA; 4 mL/min). Der Extrakt wurde im Laufmittel mit einer Konzentration von 18,75 mg/mL gelöst. Pro Lauf wurden 800 µL injiziert. Alle Fraktionen wurden gesammelt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Fraktionen 15,16,17,23,24 und 30 wurden dann mit einer analytischen Säule (C18, 250x4 mm, 5 µm) erneut aufgetrennt. Es wurde ein Methanol/H₂O-Gemisch (Fraktion 15: 8:2, Fraktionen 16 und 17: 85:15, Fraktionen 23,24 und 30: 9:1) als Fließmittel

eingesetzt. Die Fraktionen wurden im Laufmittel mit einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst. Flussrate betrug $1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$. Pro Lauf wurden 100 μL injiziert. Die Peaks wurden gesammelt und die Injektionen wiederholt, bis die Fraktionen komplett aufgetrennt waren.

6.9.2 Massenspektrometrie von Hormaomycin und Analoga

Hormaomycin und die isolierten Analoga (siehe 5.5.2) wurden in 100% Methanol (MeOH) gelöst und auf einem Thermo LTQ Orbitrap Massenspektrometer an der Universität Neapel/Italien vermessen.

6.9.3 NMR-Spektroskopie von Hormaomycin und Analoga

Hormaomycin und Analoga (siehe 5.5.2) wurden in deuteriertem Methanol (CD_3OD) gelöst, und in einem Varian UnityInova NMR-Spektrometer mit Kryokopf mit 700 MHz an der Universität Neapel/Italien vermessen.

6.10 Verwendete Chemikalien

Gewöhnliche Chemikalien sowie Lösungsmittel wie Aceton, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan, Isopropanol, Ethylacetat, Methanol etc. wurden von den Firmen Fluka/Riedel-de-Haën (Seelze), Merck (Darmstadt), Fisher Scientific (Schwerte), Sigma-Aldrich (Seelze) und J.T. Baker/Mallinckrodt Baker (Deventer, NL) mit dem Reinheitsgrad p.A. verwendet. In HPLC-Anwendungen wurden HPLC-grade-Lösungsmittel verwendet.

Acrylamid-bisacrylamid 37,5:1 (Rotiphoresegel 40)	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Qualität	Roth, Karlsruhe
1-Aminocyclopropancarbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
2-Amino-5-nitrobenzoesäure	Acros Organics, Geel (B)
L-Alanin	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
L-Arginin	AppliChem, Darmstadt
L-Asparagin,	AppliChem, Darmstadt
L-Asparaginsäure	Acros Organics, Geel (B)
Ameisensäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Antarctic Phosphatase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Benzoessäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Bovin Serum Albumin (BSA-Lösung $10 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$)	NEB, Frankfurt/Main
Brilliant-Blau R250	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem, Darmstadt

Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	KMF, Lohmar
Calcium-D-Panthenat	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
L-4-Chlorophenylalanin	Acros Organics, Geel (B)
Cyclohexancarbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Cyclopentancarbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Cystein	Roth, Karlsruhe
Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Fisher-Scientific, Schwerte
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat-Dihydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
100bp DNA ladder extended	Roth, Karlsruhe
1kb DNA ladder	Roth, Karlsruhe
1kbplus DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	KMF, Lohmar
Expand High FidelityPLUS PCR System	Roche, Grenzach-Wyhlen
Fleischextrakt	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Furan-2-carbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Gel green	Biotium, Hayward (USA)
D(+)-Glucose Monohydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
L-Glutamin	AppliChem, Darmstadt
L-Glutaminsäure-Mononatriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Fisher-Scientific, Schwerte
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
L-Histidin	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Roth, Karlsruhe

L-Isoleucin	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	ABCR; Karlsruhe
Kaliumcarbonat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Acros Organics, Geel (B)
Kanamycin-Sulfat	Roth, Karlsruhe
α -Ketoglutar säure	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Seelze
L-Lysin-HCl	Sigma-Aldrich, Seelze
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
α -Methylphenylalanin	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
β -Methylphenylalanin	Sigma-Aldrich, Seelze
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	Acros Organics, Geel (B)
Natriumcarbonat	KMF, Lohmar
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	KMF, Lohmar
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Nicotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺)	Roth, Karlsruhe
Nicotinsäure	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA Agarose	Macherey/Nagel, Duisburg
Orange G	Sigma-Aldrich, Seelze
PCR Purification Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
pGEM-Teasy Kit	Promega, Mannheim
L-Phenylalanin	AppliChem, Darmstadt
Picolinsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Pipicolinsäure	Alfa Aesar, Karlsruhe
Primer (DNA-Oligonucleotide)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Prolin	Acros Organics, Geel (B)
Proteinmarker Broad-Range	NEB, Frankfurt/Main
Proteinmarker RotiMark Standard	Roth, Karlsruhe
Pyrrol-2-carbonsäure	Alfa Aesar, Karlsruhe

Restriktionsenzyme + 10x Puffer + 100x BSA	NEB, Frankfurt/Main
Riboflavin	AppliChem, Darmstadt
Ribonuklease A (RNase A)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Riedel-de-Haën, Seelze
Salzsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
Schwefelsäure	Fluka / Riedel-de-Haën, Seelze
L-Serin	Roth, Karlsruhe
Sojamehl	Sigma-Aldrich, Seelze
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Seelze
T4 DNA Ligase + 10x Puffer	Jena Bioscience, Jena
<i>Taq</i> DNA Polymerase + 10x Puffer	NEB, Frankfurt/Main
Tetrahydrofuran-2-Carbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Thiophen-2-carbonsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
D-Threonin	Alfa Aesar, Karlsruhe
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris(2-carboxyethyl)phosphon-hydrochlorid (TCEP)	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triphenylmethylchlorid	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
L-Tryptophan	Acros Organics, Geel (B)
L-Tyrosin	Roth, Karlsruhe
L-Valin	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zinksulfat-Hexahydrat	Merck, Darmstadt

6.11 Verwendete Geräte und Materialien

Agarosegelelektrophorese-Kammer + Spannungsquelle	
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Autoklav V65	Systec, Wettenberg
Cellophan-Folien + Gelrocknungsrahmen	Roth, Karlsruhe
DC-Alufolie Kieselgel 60 F254	Merck, Darmstadt
Drehschiebervakuumpumpe RZ6	Vacuubrand, Wertheim

Elektroporationsküvette 2mm	Bio-Rad, München
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad, München
Geldokumentation Genius	Syngene, Cambridge (UK)
Halb-Mikroküvette (1,6 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubator B12	Thermo, Langenselbold
Kieselgel 60 (0,040- 0,063 mm)	Merck, Darmstadt
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroküvette UltraVette (70-850 µl)	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle	Lifetec Medion, Essen
Mikrozentrifuge ungekühlt Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge, gekühlt 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, gekühlt Mikro200R	Hettich, Tuttlingen
Multigel (Gelelektrophoresesystem vertikal),	Biometra, Göttingen
Multigel Long + Spannungsquelle	
Standard PowerPack P25	
Photometer (Biofotometer)	Eppendorf, Hamburg
Photometer BioMate 3	Thermo Electron, Cambridge(UK)
Pipetten Pipetman P2 - P10 mL	Gilson, Middleton (USA)
Poly-Prep Säule (leer)	Bio-Rad, München
Probenfläschchen für Autosampler	
(HPLC-Gefäße mit Deckel und Septum)	Roth, Karlsruhe
ProteanII xi cell (Gelelektrophoresesystem vertikal)	Bio-Rad, München
Rotationsverdampfer VV2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Kelheim
Speedvac / Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Biowizard	Kojair, Vilppula (FIN)
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat, FP 30/0,2),	Whatman , Dassel
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotina	35R Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Z513K	Hermle, Wehingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070	Bandelin, Berlin
UV-Crosslinker CL1000 UVP	Cambridge (UK)
Vortex-Mixer VTX-3000L	LMS, Tokio (J)
Waage 440-47N	Kern, Balingen-Frommern
Waage BP110	Sartorius, Göttingen

Wasserbad

GFL, Burgwedel

Zentrifugaleinheiten Vivaspin 500 (versch. MWCO)

Sartorius, Göttingen

7 Abkürzungsverzeichnis

Å=Ångström

A=Adenosin

Ala=Alanin

AMP=Adenosinmonophosphat

Arg=Arginin

AS=Aminosäure

Asn=Asparagin

Asp=Asparaginsäure

ATP=Adenosintriophosphat

BLAST= basic local alignment search tool

bp=Basenpaare

CDA=calcium-dependent antibiotic

COSY=Korrelationsspektroskopie

C=Cytosin

Cys=Cystein

dATP=Desoxyadenosintriophosphat

DNA=Desoxyribonucleinsäure

dNTP=Desoxynukleotidtriophosphat

DOPA=Dihydroxyphenylalanin

dTTP=Desoxythymidintriophosphat

ESI= Elektrosprayionization

EtOAc=Ethylacetat

FAD=Flavinadenindinukleotid

FPLC=fast protein liquid chromatography

G=Guanosin

Gln=Glutamin

Glu=Glutaminsäure

Gly=Glycin

Hpg=Hydroxyphenylglycin

HPLC=high performance liquid chromatography

HRMS=high resolution mass spectrometry

IC=inhibition concentration

Ile=Isoleucin

IPTG=Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid

LC=liquid chromatography

Leu=Leucin

Lys=Lysin

MALDI=matrix-assisted laser desorption/ionization

MeOH=Methanol

Met=Methionin

MCS=multiple cloning site

MS=Massenspektrometrie

MWCO=molecular weight cut-off

NMR=nukleare Magnetresonanz

NADPH=Nikotinamiddinukleotidphosphat

NRPS=nicht-ribosomale Peptidsynthetase

NTA=Nitrilotriessigsäure

OD=optische Dichte

Orn=Ornithin

PCP=peptidyl carrier protein

PCR=polymerase chain reaction

Phe=Phenylalanin

PKS=Polyketidsynthase

ppm=parts per million

Ppant=Phosphopanthetheinyl-

PPi=Pyrophosphat

PPTase=Phosphopanthetheinyltransferase

PSI-BLAST=position specific iterative BLAST

RT=Raumtemperatur

SAM=S-Adenosylmethionin

SDS-PAGE=sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis

Ser=Serin

T=Thymidin

TE=Thioesterase

TFA=Trifluoressigsäure

Thr=Threonin

TOCSY=total correlation spectroscopy

TOF=time of flight

Trp=Tryptophan

Tyr=Tyrosin

Val=Valin

8 Literatur

1. Demain, A.L., Sanchez, S.: Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot* **2009**, 62, 5–16.
2. Zhu, F., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z., Ma, X., Jia, J., Tan, Y., Cui, C., Lin, J., Tan, C., Jiang, Y., Chen, Y.: Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, 108, (31), 12943-12948.
3. Challis, G.L., Hopwood, D.A.: Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, Suppl 2, 14555-14561.
4. Hopwood, D.A.: *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, **2007**.
5. Keller, U., Lang, M., Crnovcic, I., Pfennig, F., Schauwecker, F.: The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. *J Bacteriol* **2010**, 192, (10), 2583-2595.
6. Park, S.R., Yoo, Y.J., Ban, Y.H., Yoon, Y.J.: Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. *J Antibiot (Tokyo)* **2010**, 63, (8), 434-441.
7. Song, J.Y., Jensen, S.E., Lee, K.J.: Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, 88, (3), 659-669.
8. Floss, H.G., Yu, T.W.: Rifamycin-mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chem Rev* **2005**, 105, (2), 621-632.
9. Zakeri, B., Wright, G.D.: Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochem Cell Biol* **2008**, 86, (2), 124-136.
10. Houghton, J.L., Green, K.D., Chen, W., Garneau-Tsodikova, S.: The future of aminoglycosides: the end or renaissance? *Chembiochem* **2010**, 11, (7), 880-902.
11. Waksman SA, Geiger WB, Reynolds DM.: Strain specificity and production of antibiotic substances: VII. Production of actinomycin by different actinomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1946**, 32, (5), 117-120.
12. Waksman, S.A., Reilly, H.C., Schatz, A.: Strain specificity and production of antibiotic substances: V. Strain resistance of bacteria to antibiotic substances, especially to streptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1945**, 31, (6), 157-164.
13. McGregor, J.F.: Nuclear division and the life cycle in a *Streptomyces* sp. *J Gen Microbiol* **1954**, 11, (1), 52-56.
14. Flårdh, K., Buttner, M.J.: *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **2009**, 7, (1), 36-49.
15. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A.: *Practical streptomyces genetics*. The John Innes Foundation: Norwich, **2000**.

16. Chater K.F.: Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* **1993**, 47, 685-713.
17. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A.: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **2002**, 417, (6885), 141-147.
18. Nett, M., Ikeda, H., Moore, B.S.: Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **2009**, 26, (11), 1362-1384.
19. Jenke-Kodama, H., Dittmann, E.: Evolution of metabolic diversity: insights from microbial polyketide synthases. *Phytochemistry* **2009**, 70, (15-16), 1858-1866.
20. Blodgett, J.A., Oh, D.C., Cao, S., Currie, C.R., Kolter, R., Clardy, J.: Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (26), 11692-11697.
21. Fischbach, M.A., Walsh, C.T., Clardy, J.: The evolution of gene collectives: How natural selection drives chemical innovation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, (12), 4601-4608. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, (5), 1679.
22. Kinashi, H.: Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J Antibiot (Tokyo)* **2011**, 64, (1), 19-25.
23. Liras, P., Martín, J.F.: Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int Microbiol* **2006**, 9, (1), 9-19.
24. Johnston, N.J., Mukhtar, T.A., Wright, G.D.: Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr Drug Targets* **2002**, 3, (4), 335-344.
25. van Wezel, G.P., McDowall, K.J.: The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep* **2011**, 28, (7), 1311-1333.
26. Chater, K. F., Merrick, M. J.: **1979** in *Developmental Biology of Prokaryotes*, ed. Parish, J. H. (Blackwell, Oxford), pp. 93-114.
27. Tomono, A., Tsai, Y., Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: Transcriptional control by A-factor of *strR*, the pathway-specific transcriptional activator for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **2005**, 187, (16), 5595-5604.
28. Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **2008**, 154, (3), 905-914.
29. Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **2003**, 185, (4), 1273-1283.

30. Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sigma(AdsA)) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **2000**, 182, (16), 4596-4605.
31. Kato, J.Y., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **2002**, 184, (21), 6016-6025.
32. Yamazaki, H., Takano, Y., Ohnishi, Y., Horinouchi, S.: amfR, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol* **2003**, 50, (4), 1173-1187.
33. Willey, J.M., Willems, A., Kodani, S., Nodwell, J.R.: Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **2006**, 59, (3), 731-742.
34. Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., Willey, J.M.: The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, (31), 11448-11453.
35. Keijsers, B.J., van Wezel, G.P., Canters, G.W., Vijgenboom, E.: Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the ramCSAB operon. *J Bacteriol* **2002**, 184, (16), 4420-4429.
36. Xu, D., Kim, T.J., Park, Z.Y., Lee, S.K., Yang, S.H., Kwon, H.J., Suh, J.W.: *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 379, (2), 319-323. A DNA-binding factor, ArfA, interacts with the *bldH* promoter and affects undecylprodigiosin production in *Streptomyces lividans*.
37. Bibb, M.J., Molle, V., Buttner, M.J.: sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **2000**, 182, (16), 4606-4616.
38. Kim, D.W., Chater, K., Lee, K.J., Hesketh, A.: Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **2005**, 187, (9), 2957-2966.
39. Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.: The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplins. *Mol Microbiol* **2004**, 53, (2), 433-443.
40. Elliot, M.A., Karoonuthaisiri, N., Huang, J., Bibb, M.J., Cohen, S.N., Kao, C.M., Buttner, M.J.: The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* **2003**, 17, (14), 1727-1740.
41. Sawyer, E.B., Claessen, D., Haas, M., Hurgobin, B., Gras, S.L.: The assembly of individual chaplin peptides from *Streptomyces coelicolor* into functional amyloid fibrils. *PLoS One* **2011**, 6, (4), e18839.
42. Capstick, D.S., Willey, J.M., Buttner, M.J., Elliot, M.A.: SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **2007**, 64, (3), 602-613.

-
43. Di Berardo, C., Capstick, D.S., Bibb, M.J., Findlay, K.C., Buttner, M.J., Elliot, M.A.: Function and redundancy of the chaplin cell surface proteins in aerial hypha formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **2008**, 190, (17), 5879-5889.
 44. Chater, K.F., Chandra, G.: The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* **2006**, 30, (5), 651-672.
 45. Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.: Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* **2006**, 14, (7), 313-319.
 46. Rokem, J.S., Lantz, A.E., Nielsen, J.: Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* **2007** 24, 1262-1287.
 47. Willey, J.M., Gaskell, A.A.: Morphogenetic signaling molecules of the streptomycetes. *Chem Rev* **2011**, 111, (1), 174-187.
 48. Takano, E.: Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **2006**, 9, (3), 287-294.
 49. Corre, C., Song, L., O'Rourke, S., Chater, K.F., Challis, G.L.: 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, (45), 17510-17515.
 50. Haneishi, T., Terahara, A., Hamano, K., Arai, M.: New antibiotics, methylenomycins A and B. 3. Chemical modifications of methylenomycin A and structure-activity correlations in methylenomycins. *J Antibiot (Tokyo)* **1974**, 27, (6), 400-407.
 51. Kawaguchi, T., Asahi, T., Satoh, T., Uozumi, T., Beppu, T.: B-factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in a *Nocardia* sp.. *J Antibiot (Tokyo)* **1984**, 37, (12), 1587-1595.
 52. Recio, E., Colinas, A., Rumbero, A., Aparicio, J.F., Martin, J.F.: PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarin production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem* **2004** 279, (40), 41586-41593.
 53. McCann, P.A., Pogell, B.M.: Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J Antibiot (Tokyo)* **1979**, 32, (7), 673-678.
 54. Hashimoto, M., Kondo, T., Kozone, I., Kawaide, H., Abe, H., Natsume, M.: Relationship between response to and production of the aerial mycelium-inducing substances pamamycin-607 and A-factor. *Biosci Biotechnol Biochem* **2003**, 67, (4), 803-808.
 55. Hashimoto, M., Katsura, H., Kato, R., Kawaide, H., Natsume, M.: Effect of pamamycin-607 on secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Biosci Biotechnol Biochem* **2011**, 75, (9), 1722-1726.
 56. Biró, S., Békési, I., Vitális, S., Szabó, G.: A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. *Eur J Biochem* **1980**, 103, (2), 359-363.
 57. Andres, N., Wolf, H., Zähler, H., Rössner, E., Zeeck, A., König, W.A., Sinnwell, V.: Hormaomycin, ein neues Peptid-lacton mit morphogener Aktivität auf Streptomyceten. *Helv Chim Acta* **1989**, 72, 426-437.
 58. Onaka, H., Tabata, H., Igarashi, Y., Sato, Y., Furumai, T.: Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **2001**, 54, (12), 1036-44.
-

59. Onaka, H., Nakaho, M., Hayashi, K., Igarashi, Y., Furumai, T.: Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **2005**, 151, (12), 3923-3933.
60. Onaka, H.: Biosynthesis of indolocarbazole and goadsporin, two different heterocyclic antibiotics produced by actinomycetes. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, 73, (10), 2149-2155.
61. Rössner, E., Zeeck, A., König, W.A.: Elucidation of the structure of hormaomycin. *Angew Chem Int Edit Engl* **1990**, 29, 64-65
62. Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J.: Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol* **2011**, 18, (3), 381-391.
63. McQuillen, K., Roberts, R.B., Britten, R.J.: Synthesis of nascent protein by ribosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1959**, 45, (9), 1437-1447.
64. Felnagle, E.A., Jackson, E.E., Chan, Y.A., Podevels, A.M., Berti, A.D., McMahon, M.D., Thomas, M.G.: Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. *Mol Pharmaceutics* **2008**, 5, (2), 191-211.
65. Robbel, L., Marahiel M.A.: Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem* **2010**, (36), 27501-27508.
66. Donadio, S., Sosio, M.: Biosynthesis of glycopeptides: prospects for improved antibacterials. *Curr Top Med Chem* **2008**, 8, (8), 654-666.
67. Velkov, T., Lawen, A.: Non-ribosomal peptide synthetases as technological platforms for the synthesis of highly modified peptide bioeffectors-Cyclosporin synthetase as a complex example. *Biotechnol Annu Rev* **2003**, 9, 151-197.
68. Galm, U., Hager, M.H., Van Lanen, S.G., Ju, J., Thorson, J.S., Shen, B.: Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enecladine, and Mitomycin. *Chem. Rev* **2005**, 105, 739-758.
69. Mach, B., Reich, E., Tatum, E.L.: Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1963**, 50, (1), 175-181.
70. Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F.: Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme-bound thioester intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, 63,(4), 1335-1342.
71. Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F.: The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**, 60, (1), 269-276.
72. Kleinkauf, H., Gevers, W., Lipmann, F.: Interrelation between activation and polymerization in gramicidin S biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, 62, (1), 226-233.
73. Weckermann, R., Fürbass, R., Marahiel, M.A.: Complete nucleotide sequence of the tycA gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res* **1988**, 16, (24), 11841.
74. Sieber, S.A., Marahiel, M.A.: Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **2005**, 105, (2),715-738.
75. Finking, R., Marahiel, M.A.: Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **2004**, 58, 453-488.

-
76. Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M.A.: Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **2003**, 20, (3), 275-287.
77. Meier, J.L., Burkart, M.D.: The chemical biology of modular biosynthetic enzymes. *Chem Soc Rev* **2009**, 38, (7), 2012-2045.
78. Walsh, C.T.: Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **2004**, 303, (5665), 1805-1810.
79. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Marahiel, M.A.: The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **1999**, (8), 493-505.
80. Challis, G.L., Ravel, J., Townsend, C.A.: Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **2000**, (3), 211-24.
81. von Döhren, H., Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M.: The nonribosomal code. *Chem Biol* **1999**, 6, (10), R273-279.
82. Lautru, S., Deeth, R.J., Bailey, L.M., Challis, G.L.: Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining *Nat Chem Biol* **2005**, (5), 265-269.
83. Kaysser, L., Tang, X., Wemakor, E., Sedding, K., Hennig, S., Siebenberg, S., Gust, B.: Identification of a Napsamycin Biosynthesis Gene Cluster by Genome Mining. *Chembiochem* **2011**, 12, (3), 477-487.
84. Du, L., Sánchez, C., Shen, B.: Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab Eng* **2001**, 3, (1), 78-95.
85. Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A.P., Koketsu, K., Migita, A., Boddy, C.N., Wang, C.C., Oguri, H., Oikawa, H.: Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* **2006**, 2, (8), 423-428.
86. Hoyer, K.M., Mahlert, C., Marahiel, M.A.: The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chem Biol* **2007**, 14, (1), 13-22.
87. Shaw-Reid, C.A., Kelleher, N.L., Losey, H.C., Gehring, A.M., Berg, C., Walsh, C.T.: Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem Biol* **1999**, 6, (6), 385-400.
88. Gunsior, M., Breazeale, S.D., Lind, A.J., Ravel, J., Janc, J.W., Townsend, C.A.: The biosynthetic gene cluster for a monocyclic beta-lactam antibiotic, nocardicin A. *Chem Biol* **2004**, (7), 927-938.
89. Davidsen, J.M., Townsend, C.A.: In Vivo Characterization of Nonribosomal Peptide Synthetases NocA and NocB in the Biosynthesis of Nocardicin A. *Chem Biol* **2012**, 19, (2), 297-306.
90. Galm, U., Wendt-Pienkowski, E., Wang, L., Huang, S.X., Unsin, C., Tao, M., Coughlin, J.M., Shen, B.: Comparative analysis of the biosynthetic gene clusters and pathways for three structurally related antitumor antibiotics: bleomycin, tallysomycin, and zorbamycin. *J Nat Prod* **2011**, 74, (3), 526-536.
-

91. Xu, W., Cai, X., Jung, M.E., Tang, Y.: Analysis of intact and dissected fungal polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Chem Soc* **2010**, 132, (39), 13604-13607.
92. Schwecke, T., Göttling, K., Durek, P., Dueñas, I., Käufer, N.F., Zock-Emmenthal, S., Staub, E., Neuhof, T., Dieckmann, R., von Döhren, H.: Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. *Chembiochem* **2006**, (4), 612-622.
93. Juguet, M., Lautru, S., Francou, F.X., Nezbedová, S., Leblond, P., Gondry, M., Pernodet, J.L.: An iterative nonribosomal peptide synthetase assembles the pyrrole-amide antibiotic congoic acid in *Streptomyces ambofaciens*. *Chem Biol* **2009**, 16, (4), 421-431.
94. Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., Brick, P.: Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* **1997**, 16, (14), 4174-83.
95. Gulick A.M.: Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* **2009**, 4, (10), 811-827.
96. May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., Stubbs, M.T.: Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (19), 12120-12125.
97. Jogl, G., Tong, L.: Crystal structure of yeast acetylcoenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* **2004**, 43, 1425-1431.
98. Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., Kato, H.: Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* **2006**, 440, 372-376.
99. Eppelmann, K., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A.: Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* **2002**, 41, (30), 9718-9726.
100. Chen, C.Y., Georgiev, I., Anderson, A.C., Donald, B.R.: Computational structure-based redesign of enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, (10), 3764-3769. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, (18), 7678.
101. Ruttenberg, M. A., Mach, B.: Studies on amino acid substitution in the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine. *Biochemistry* **1966**, 5, 2864-2869.
102. Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P.J., Rudd, B.A., Hayes, M.A., Smith, C.P., Micklefield, J.: Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol* **2002** (11), 1175-1187.
103. Weber, G, Schörgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E., Leitner, E.: The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet* **1994**, (2), 120-125.
104. Christiansen, G., Philmus, B., Hemscheidt, T., Kurmayer, R.: Genetic variation of adenylation domains of the anabaenopeptin synthesis operon and evolution of substrate promiscuity. *J Bacteriol* **2011**, 193, (15), 3822-3831.

-
105. Fewer, D.P., Rouhiainen, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Laakso, K., Wang, H., Sivonen, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evol Biol* **2007**,7, 11.
106. Ishida, K., Welker, M., Christiansen, G., Cadel-Six, S., Bouchier, C., Dittmann, E., Hertweck, C., de Marsac, N.T. Plasticity and Evolution of Aeruginosin Biosynthesis in Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **2009** 75, 2017-2026.
107. Tooming-Klunderud, A., Mikalsen, B., Kristensen, T., Jakobsen, K.S. The mosaic structure of the *mcyABC* operon in *Microcystis*. *Microbiology (UK)* **2008**, 154, 1886-1899.
108. Otten, L.G., Schaffer, M.L., Villiers, B.R., Stachelhaus, T., Hollfelder, F.: An optimized ATP/PP(i)-exchange assay in 96-well format for screening of adenylation domains for applications in combinatorial biosynthesis. *Biotechnol J* **2007**, 2, (2), 232-240.
109. Phelan, V.V., Du, Y., McLean, J.A., Bachmann, B.O.: Adenylation enzyme characterization using gamma-(18)O(4)-ATP pyrophosphate exchange. *Chem Biol* **2009**, 16, (5), 473-478.
110. Dorrestein, P.C., Blackhall, J., Straight, P.D., Fischbach, M.A., Garneau-Tsodikova, S., Edwards, D.J., McLaughlin, S., Lin, M., Gerwick, W.H., Kolter, R., Walsh, C.T., Kelleher, N.L.: Activity screening of carrier domains within nonribosomal peptide synthetases using complex substrate mixtures and large molecule mass spectrometry. *Biochemistry* **2006**, 45, (6), 1537-1546.
111. Lai, J.R., Koglin, A., Walsh, C.T.: Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **2006**, 45, (50), 14869-14879.
112. Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C.T.: A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **1996**, (11), 923-936.
113. Doekel, S., Marahiel, M.A.: Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem Biol* **2000**, 7, (6), 373-384.
114. Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T., Keating, A.E.: The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **2002**, 9, (7), 522-526.
115. De Crécy-Lagard, V., Marlière, P., Saurin, W.: Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C R Acad Sci III*. **1995**, 318, (9), 927-936.
116. Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., Marahiel, M.A.: Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **1998**, 273, (35), 22773-22781
117. Lautru, S., Challis, G.L.: Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* **2004**, 150, (6), 1629-1636.
118. Belshaw, P.J., Walsh, C.T., Stachelhaus, T.: Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **1999**, 284, (5413), 486-489.
119. Linne, U., Marahiel, M.A.: Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. *Biochemistry* **2000** 39, (34), 10439-10447.
-

120. Marshall, C.G., Burkart, M.D., Meray, R.K., Walsh, C.T.: Carrier protein recognition in siderophore-producing nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **2002**, 41, (26), 8429-8437.
121. Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., Huson, D.H.: Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol Biol* **2007**, 16, (7), 78.
122. Dewick, P.M.: Medicinal natural products. A biosynthetic approach. Third edition, Wiley, **2009**
123. Stein, D.B., Linne, U., Marahiel, M.A.: Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases. *FEBS J* **2005**, 272, (17), 4506-4520.
124. Stein, D.B., Linne, U., Hahn, M., Marahiel, M.A.: Impact of epimerization domains on the intermodular transfer of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide synthesis. *Chembiochem* **2006**, 7, (11), 1807-1814.
125. Schneider, T.L., Shen, B., Walsh, C.T.: Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry* **2003**, 42, (32), 9722-9730.
126. Duerfahrt, T., Eppelmann, K., Müller, R., Marahiel, M.A.: Rational design of a bimodular model system for the investigation of heterocyclization in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem Biol* **2004**, 11, (2), 261-271.
127. Du, L., Lou, L.: PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* **2010**, 27, (2), 255-278.
128. Kopp, F., Marahiel, M.A.: Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat Prod Rep* **2007**, 24, (4), 735-749.
129. Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., Stubbs, M.T.: Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **2002**, 10, (3), 301-310.
130. Kohli, R.M., Takagi, J., Walsh, C.T.: The thioesterase domain from a nonribosomal peptide synthetase as a cyclization catalyst for integrin binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, (3), 1247-1252.
131. Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., Sieber, S.A.: Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry* **2002**, 41, (45), 13350-13359.
132. Kohli, R.M., Walsh, C.T., Burkart, M.D.: Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature* **2002**, 418, (6898), 658-661.
133. Challis, G.L., Naismith, J.H.: Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **2004**, 14, (6), 748-756.
134. Koglin, A., Walsh, C.T.: Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep* **2009**, (8), 987-1000.
135. Strieker, M., Tanović, A., Marahiel, M.A.: Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **2010**, (2), 234-240.

-
136. Frueh, D.P., Arthanari, H., Koglin, A., Vosburg, D.A., Bennett, A.E., Walsh, C.T., Wagner, G.: Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase. *Nature* **2008**, 454, (7206), 903-906.
137. Samel, S.A., Schoenafinger, G., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., Essen, L.O.: Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **2007**, 15, (7), 781-792.
138. Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.O., Marahiel, M.A.: Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* **2008**, 321, (5889), 659-663.
139. Koglin, A., Mofid, M.R., Löhr, F., Schäfer, B., Rogov, V.V., Blum, M.M., Mittag, T., Marahiel, M.A., Bernhard, F., Dötsch, V.: Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* **2006**, 312, (5771), 273-276.
140. Guo, Z.F., Sun, Y., Zheng, S., Guo, Z.: Preferential hydrolysis of aberrant intermediates by the type II thioesterase in *Escherichia coli* nonribosomal enterobactin synthesis: substrate specificities and mutagenic studies on the active-site residues. *Biochemistry* **2009**, 48, (8), 1712-1722.
141. Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M.A., Stubbs, M.T.: Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J Biol Chem* **2008**, 283, (47), 32484-32491.
142. Baltz, R.H.: Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol* **2006**, (12), 1533-1540.
143. Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., Walsh, C.T.: Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **1998**, 5, (11), 631-645.
144. Baltz, R.H.: Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2011**, 38, (11), 1747-1760.
145. Sosio, M., Kloosterman, H., Bianchi, A., de Vreugd, P., Dijkhuizen, L., Donadio, S.: Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Microbiology* **2004**, 150, 95-102.
146. Edwards, D.J., Gerwick, W.H.: Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (37), 11432-11433.
147. Rhee, K.H., Davies, J.: Transcription analysis of daptomycin biosynthesis genes in *Streptomyces roseosporus*. *J Microbiol Biotechnol* **2006**, 16, 1841-1848.
148. Lautru, S., Oves-Costales, D., Pernodet, J.L., Challis, G.L.: MbtH-like protein-mediated cross-talk between non-ribosomal peptide antibiotic and siderophore biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* M145. *Microbiology* **2007**, 153, (5), 1405-1412.
149. Wolpert, M., Gust, B., Kammerer, B., Heide, L.: Effects of deletions of mbtH-like genes on chlorobiocin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **2007**, 153, (5), 1413-1423.
150. Drake, E.J., Cao, J., Qu, J., Shah, M.B., Straubinger, R.M., Gulick, A.M.: The 1.8 Å crystal structure of PA2412, an MbtH-like protein from the pyoverdine cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **2007**, 282, (28), 20425-20434.
-

151. Buchko, G.W., Kim, C.Y., Terwilliger, T.C., Myler, P.J.: Solution structure of Rv2377c-founding member of the MbtH-like protein family. *Tuberculosis (Edinb)* **2010**, 90, (4), 245-51.
152. Felnagle, E.A., Barkei, J.J., Park, H., Podevels, A.M., McMahon, M.D., Drott, D.W., Thomas, M.G.: MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* **2010**, 49, (41), 8815-8817.
153. Zhang, W., Heemstra, J.R. Jr, Walsh, C.T., Imker, H.J.: Activation of the pacidamycin PacL adenylation domain by MbtH-like proteins. *Biochemistry* **2010** 49,(46), 9946-9947.
154. Imker, H.J., Krahn, D., Clerc, J., Kaiser, M., Walsh, C.T.: N-acylation during glidobactin biosynthesis by the tridomain nonribosomal peptide synthetase module GlbF. *Chem Biol* **2010** 17, (10), 1077-1083.
155. Boll, B., Taubitz, T., Heide, L.: Role of MbtH-like proteins in the adenylation of tyrosine during aminocoumarin and vancomycin biosynthesis. *J Biol Chem* **2011**, 286, (42), 36281-36290.
156. Chen, H., Walsh, C.T.: Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: beta-hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem Biol* **2001**, 8, 301-312.
157. Keasling, J.D.: Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* **2010**, 330, (6009), 1355-1358.
158. Thiericke, R., Rohr, J.: Biological variation of microbial metabolites by precursor-directed biosynthesis. *Nat Prod Rep* **1993**, 10, (3), 265-289.
159. Weist, S., Süßmuth, R.D.: Mutational biosynthesis--a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 68, (2), 141-150.
160. Powell, A., Al Nakeeb, M., Wilkinson, B., Micklefield, J.: Precursor-directed biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified glutamate residues. *Chem Commun (Camb)* **2007**, (26), 2683-2685.
161. Powell, A., Borg, M., Amir-Heidari, B., Neary, J.M., Thirlway, J., Wilkinson, B., Smith, C.P., Micklefield, J.: Engineered biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified fatty acid side chains. *J Am Chem Soc* **2007** 129, (49), 15182-15191.
162. Amir-Heidari, B., Thirlway, J., Micklefield, J.: Auxotrophic-precursor directed biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified tryptophan residues. *Org Biomol Chem* **2008**, 6, (6), 975-978.
163. Zhang, W., Tang, Y.: Combinatorial biosynthesis of natural products. *J Med Chem* **2008**, 51, (9), 2629-2633.
164. Mootz, H.D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D., Marahiel, M.A.: Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, (37), 10980-10981.
165. Butz, D., Schmiederer, T., Hadatsch, B., Wohlleben, W., Weber, T., Süßmuth, R.D.: Module extension of a non-ribosomal peptide synthetase of the glycopeptide antibiotic balhimycin produced by *Amycolatopsis balhimycina*. *Chembiochem* **2008**, 9, (8), 1195-1200.

-
166. Uguru, G.C., Milne, C., Borg, M., Flett, F., Smith, C.P., Micklefield, J.: Active-site modifications of adenylation domains lead to hydrolysis of upstream nonribosomal peptidyl thioester intermediates. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (16), 5032-5033.
167. Hahn, M., Stachelhaus, T.: Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, (44), 15585-15590.
168. Hahn, M., Stachelhaus, T.: Harnessing the potential of communication-mediating domains for the biocombinatorial synthesis of nonribosomal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (2), 275-280.
169. Chiocchini, C., Linne, U., Stachelhaus, T.: In vivo biocombinatorial synthesis of lipopeptides by COM domain-mediated reprogramming of the surfactin biosynthetic complex. *Chem Biol* **2006**, 13, (8), 899-908.
170. Baltz, R.H.: Biosynthesis and genetic engineering of lipopeptide antibiotics related to daptomycin. *Curr Top Med Chem* **2008**, 8, (8), 618-638.
171. Nguyen, K.T., Ritz, D., Gu, J.Q., Alexander, D., Chu, M., Miao, V., Brian, P., Baltz, R.H.: Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006** 103, (46), 17462-17467.
172. Nguyen, K.T., He, X., Alexander, D.C., Li, C., Gu, J.Q., Mascio, C., Van Praagh, A., Mortin, L., Chu, M., Silverman, J.A., Brian, P., Baltz, R.H.: Genetically engineered lipopeptide antibiotics related to A54145 and daptomycin with improved properties. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, 54, (4), 1404-1413.
173. Doekel, S., Coëffet-Le Gal, M.F., Gu, J.Q., Chu, M., Baltz, R.H., Brian, P.: Non-ribosomal peptide synthetase module fusions to produce derivatives of daptomycin in *Streptomyces roseosporus*. *Microbiology* **2008**, 154, (9), 2872-2880.
174. Moyne, A.L., Cleveland, T.E., Tuzun, S.: Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiol Lett* **2004**, 234, (1), 43-49.
175. Wenzel, S.C., Meiser, P., Binz, T.M., Mahmud, T., Müller, R.: Nonribosomal peptide biosynthesis: point mutations and module skipping lead to chemical diversity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006** 45, (14), 2296-2301.
176. Fischbach, M.A., Lai, J.R., Roche, E.D., Walsh, C.T., Liu, D.R.: Directed evolution can rapidly improve the activity of chimeric assembly-line enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, (29), 11951-11956.
177. Villiers, B., Hollfelder, F.: Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Biol* **2011**, 28, 18, (10), 1290-1299.
178. Evans, B.S., Chen, Y., Metcalf, W.W., Zhao, H., Kelleher, N.L.: Directed evolution of the nonribosomal peptide synthetase AdmK generates new andrimid derivatives in vivo. *Chem Biol* **2011**, 27, 18, (5), 601-607.
179. Wessjohann, L.A., Brandt, W., Thiemann, T., Biosynthesis and metabolism of cyclopropane rings in natural compounds. *Chem Rev* **2003**, 103, (4), 1625-1648.
-

180. Brackmann, F. de Meijere, A.: Natural Occurrence, Syntheses, and Applications of Cyclopropyl-Group-Containing α -Amino Acids. 1. 1-Aminocyclopropanecarboxylic Acid and Other 2,3-Methanoamino Acids. *Chem. Rev* **2007**, 107, 4493-4537.
181. Brackmann, F., de Meijere, A.: Natural Occurrence, Syntheses, and Applications of Cyclopropyl-Group-Containing α -Amino Acids. 2. 3,4- and 4,5-Methanoamino Acids. *Chem Rev* **2007**, 107, 4538-4583.
182. Broberg, A., Menkis, A., Vasiliauskas, R.: Kutznerides 1-4, depsipeptides from the actinomycete *Kutzneria* sp. 744 inhabiting mycorrhizal roots of *Picea abies* seedlings. *J Nat Prod* **2006**, 69, (1), 97-102.
183. Fujimori, D.G., Hrvatin, S., Neumann, C.S., Strieker, M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T.: Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, (42), 16498-16503.
184. Yamada, K., Ojika, M., Kigoshi, H.: Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. *Nat Prod Rep* **2007**, (47), 98-813.
185. Pietruszka, J.: Synthesis and properties of oligocyclopropyl-containing natural products and model compounds. *Chem Rev* **2003**, 103, (4), 1051-1070.
186. Grogan, D.W., Cronan, J.E. Jr.: Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **1997**, 61, (4), 429-441.
187. He, J., Magarvey, N., Pirae, M., Vining, L.C.: The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene. *Microbiology* **2001**, 147(10), 2817-2829.
188. van Pée, K.H., Ligon, J.M.: Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat Prod Rep* **2000**, 17, (2), 157-164.
189. He, J., Hertweck, C.: Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster. *Chem Biol* **2003**, 10, (12), 1225-1232.
190. He, J., Hertweck, C.: Biosynthetic origin of the rare nitroaryl moiety of the polyketide antibiotic aureothin: involvement of an unprecedented N-oxygenase. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, (12), 3694-3695.
191. Winkler, R., Hertweck, C.: Biosynthesis of nitro compounds. *ChemBioChem* **2007**, 8, 973-977.
192. Loria, R., Bignell, D.R., Moll, S., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Johnson, E.G., Seipke, R.F., Gibson, D.M.: Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2008**, 94, (1), 3-10.
193. Choi, Y.S., Zhang, H., Brunzelle, J.S., Nair, S.K., Zhao, H.: In vitro reconstitution and crystal structure of p-aminobenzoate N-oxygenase (AurF) involved in aureothin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2008**, 105, (19), 6858-6563.
194. Omura, S., Mamda, H., Wang, N.-J., Imamura, N., Oiwa, R., Iwai, Y.: Takaokamycin, a new peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo)* **1984**, 37, (7), 700-705.

-
195. Zlatopolskiy, B.D., Loscha, K., Alvermann, P., Kozhushkov, S.I., Nikolaev, S.V., Zeeck, A., de Meijere, A.: Final elucidation of the absolute configuration of the signal metabolite hormaomycin. *Chem Eur J* **2004**, 10, 4708-4717.
196. Reinscheid, U.M., Farjon, J., Radzom, M., Haberz, P., Zeeck, A., Blackledge, M., Griesinger, C.: Effect of the solvent on the conformation of a depsipeptide: NMR-derived solution structure of Hormaomycin in DMSO from residual dipolar couplings in a novel DMSO-compatible alignment medium. *ChemBioChem* **2006**, 7, 287-296.
197. Zlatopolskiy, B.D., de Meijere, A.: First total synthesis of hormaomycin, a naturally occurring depsipeptide with interesting biological activities. *Chem Eur J* **2004**, 10, 4718-4727.
198. Otoguro, K., Ui, H., Ishiyama, A., Arai, N., Kobayashi, M., Takahashi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Yamada, H., Omura, S.: In vitro antimalarial activities of the microbial metabolites. *J. Antibiot (Tokyo)* **2003**, 56, 322-324.
199. Zlatopolskiy, B.D., Radzom, M., Zeeck, A., de Meijere, A.: Synthesis and precursor-directed biosynthesis of new hormaomycin analogues. *Eur J Org Chem*, **2006**, 6, 1525-1534.
200. Radzom, M.: Beiträge zur Biosynthese der antiparasitären Naturstoffe Hormaomycin und Borrelidin sowie Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten. Dissertation, Universität Göttingen **2006**.
201. Reinscheid, U.M., Zlatopolskiy, B.D., Griesinger, C., Zeeck, A., de Meijere, A.: The structure of hormaomycin and one of its all-peptide aza-analogues in solution: Syntheses and biological activities of new hormaomycin analogues. *Chem Eur J* **2005**, 11, 2929-2945.
202. Röttig, M., Medema, M.H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C., Kohlbacher, O.: NRSPredictor2 - a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res* **2011**, 39(Web Server issue):W362-367.
203. Thomas, M.G., Burkart, M.D., Walsh, C.T.: Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chem Biol* **2002**, 9, 171-184.
204. Garneau, S., Dorrestein, P.C., Kelleher, N.L., Walsh, C.T.: Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A₁ biosynthesis. *Biochemistry* **2005**, 44, 2770-2880.
205. Asai, A., Hasegawa, A., Ochiai, K., Yamashita, Y., Mizukami, T.: Belactosin A, a novel antitumor antibiotic acting on cyclin/CDK mediated cell cycle regulation, produced by *Streptomyces* sp. *J Antibiot* **2000**, 53, (1), 81-83.
206. Brandl, M., Kozhushkov, S.I., Zlatopolskiy, B.D., Alvermann, P., Geers, B., Zeeck, A., de Meijere, A.: The biosynthesis of 3-(trans-2-nitrocyclopropyl)alanine, a constituent of the signal metabolite hormaomycin. *Eur J Org Chem* **2004**, 123-135.
207. Altschul S.F., Koonin E.V.: Iterated profile searches with PSI-BLAST- a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem Sci* **1998**, 23, (11), 444-447.
208. Kodera T., Smirnov S.V., Samsonova N.N., Kozlov Y.I., Koyama R., Hibi M., Ogawa J., Yokozeki K., Shimizu S.: A novel l-isoleucine hydroxylating enzyme, l-isoleucine dioxygenase from *Bacillus thuringiensis*, produces (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**, 390, (3), 506-510.
209. Haefel , C., Bonfils, C., Sauvaire, Y.: Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. *Phytochemistry* **1997**, 44, (4), 563-566.
-

210. Hausinger, R.P.: Fe(II)/ α -Ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Bio* **2004**, 39, 21-68..
211. Goodwin, P.M., Anthony, C.: The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* **1998**, 40, 1-80.
212. Magnusson, O.T., Toyama, H., Saeki, M., Rojas, A., Reed, J.C., Liddington, R.C., Klinman, J.P., Schwarzenbacher, R.: Quinone biogenesis: Structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, (21), 7913-7918.
213. Toyama, H., Fukumoto, H., Saeki, M., Matsushita, K., Adachi, O., Lidstrom, M.E.: PqqC/D, which converts a biosynthetic intermediate to pyrroloquinoline quinone. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 299, (2), 268-272.
214. Toyama, H., Nishibayashi, E., Saeki, M., Adachi, O., Matsushita, K.: Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinone. *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, 354, (1), 290-295.
215. Yin, X., Zabriskie, T.M.: VioC is a non-heme iron, α -ketoglutarate-dependent oxygenase that catalyzes the formation of 3S-hydroxy-L-arginine during viomycin biosynthesis. *Chembiochem* **2004**, 5, (9), 1274-1277.
216. Mori, H., Shibasaki, T., Yano, K., Ozaki, A.: Purification and cloning of a proline 3-hydroxylase, a novel enzyme which hydroxylates free L-proline to cis-3-hydroxy-L-proline. *J Bacteriol* **1997**, 179, (18), 5677-5683.
217. Molnár-Perl, I.: Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2011**, 879, (17-18), 1241-1269.
218. Mazzucco, E., Gosetti, F., Bobba, M., Marengo, E., Robotti, E., Gennaro, M.C.: High-performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry. *J Agric Food Chem* **2010**, 58, (1), 127-134.
219. Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C.: Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2010**, 1217, (25), 3929-3937.
220. Saito, K., Kobayashi, M., Gong, Z., Tanaka, Y., Yamazaki, M.: Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *Plant J* **1999**, 17, (2), 181-189.
221. Minami, H., Dubouzet, E., Iwasa, K., Sato, F.: Functional analysis of norcoclaurine synthase in *Coptis japonica*. *J Biol Chem* **2007**, 282, (9), 6274-6282.
222. Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z., Piepersberg, W.: Molecular characterization of the lincomycin production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **1995**, 16, 1137-1156.
223. Hu, Y., Phelan, V., Ntai, I., Farnet, C.M., Zazopoulos, E., Bachmann, B.O.: Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem Biol* **2007**, 14, 691-701.
224. Li, W., Khullar, A., Chou, S., Sacramo, A., Gerratana, B.: Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor agent. *Appl Environ Microb* **2009**, 75, 2869-2878.

225. Li, W., Chou, S., Khullar, A., Gerratana, B.: Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog. *Appl Environ Microb* **2009**, 75, 2958-2963.
226. Neusser, D., Schmidt, H., Spizek, J., Novotna, J., Peschke, U., Kaschabeck, S., Tichy, P., Piepersberg, W.: The genes *lmbB1* and *lmbB2* of *Streptomyces lincolnensis* encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. *Arch Microbiol* 1998, 169, 322-332.
227. Colabroy K.L., Hackett, W.T., Markham, A.J., Rosenberg, J., Cohen, D.E., Jacobson, A.: Biochemical characterization of L-DOPA 2,3 dioxygenase, a single domain type I extradiol dioxygenase from lincomycin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **2008**, 479, 131-138.
228. Costas, M., Mehn, M.P., Jensen, M.J., Que Jr., L.: Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models and intermediates. *Chem Rev* **2004**, 104, 939-986.
229. Horsman, G.P., Bhowmik, S., Seah, Y.K., Kumar, P., Bolin, J.T., Eltis, I.D.: The tautomeric half-reaction of BphD, a C-C bond hydrolase: kinetic and structural evidence supporting a key role for histidine 265 of the catalytic triad. *J Biol Chem* **2007**, 282, 19894-19904.
230. Ulanova D., Novotná J., Smutná Y., Kameník Z., Gazák R., Sulc M., Sedmera P., Kadlcík S., Plháčková K., Janata J.: Mutasyntesis of lincomycin derivatives with activity against drug-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**, 54, (2), 927-930.
231. Kuo, M.S., Yurek, D.A., Coats, J.H., Chung, S.T., Li, G.P.: Isolation and identification of 3-propylidene-1-pyrroline-5-carboxylic acid, a biosynthetic precursor of lincomycin. *J. Antibiot* **1992**, 37 (45), 1773-1777.
232. Forouhar, F., Abashidze, M., Xu, H., Grochowski, L.L., Seetharaman, J., Hussain, M., Kuzin, A., Chen, Y., Zhou, W., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., Galinier, A., White, R.H., Tong, L.: Molecular insights into the biosynthesis of the F420 coenzyme. *J Biol Chem* **2008**, 283, (17), 11832-11840.
233. Rütthlein, E.: In vivo- und in vitro-Analyse von HrmF, eines ungewöhnlichen Enzyms aus der Biosynthese des Peptidantibiotikums Hormaomycin. Diplomarbeit, Universität Bonn **2011**.
234. Fischbach, M. et al. *Streptomyces griseoflavus* Tu4000 genomic scaffold supercont1.1, whole genome shotgun sequence. NCBI Accession number: NZ_GG657758 The Broad Institute Genome Sequencing Platform, Broad Institute Microbial Sequencing Center **2010**.
235. Loenen, W.A.: S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem Soc Trans* **2006**, 34, (2), 330-333.
236. Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Howard-Jones, A.R.: Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Nat Prod Rep* **2006**, 23, 517-531.
237. Méjean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D., Ploux, O.: In vitro reconstitution of the first steps of anatoxin-a biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: From free L-proline to acyl carrier protein bound dehydroproline. *Biochemistry* **2010**, 49, 103-113.
238. Dorrestein, P.C., Yeh, E., Garneau-Tsodikova, S., Kelleher, N.L., Walsh, C.T.: Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH(2)-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**, 102, 13843-13848.
239. Heide, L., Westrich, L., Anderle, C., Gust, B., Kammerer, B., Piel, J.: Use of a halogenase of hormaomycin biosynthesis for formation of new clorobiocin analogues with 5-chloropyrrole moieties. *Chembiochem* **2008**, 9, 1992-1999.

240. Zhang, X.J., Parry, R.J.: Cloning and characterization of the pyrrolomycin biosynthetic gene clusters from *Actinosporangium vitaminophilum* ATCC 31673 and *Streptomyces sp* strain UC 11065. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 946-957.
241. Sánchez, C., Du, L., Edwards, D.J., Toney, M.D., Shen, B.: Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide-polyketide antitumor drug bleomycin. *Chem Biol* **2001**, 8,(7), 725-738.
242. Izumikawa, W., Cheng, Q., Moore, B.S.: Priming type II polyketide synthases via a type II nonribosomal peptide synthetase mechanism. *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 1428.
243. Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K., Doyle, S.: A 4'-phosphopantetheinyl transferase mediates non-ribosomal peptide synthetase activation in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **2005**, 6, 679-685.
244. Seidle, H.F., Couch, R.D., Parry, R.J.: Characterization of a nonspecific phosphopantetheinyl transferase from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* FF5. *Arch Biochem Biophys* **2006**, 446, 167-174.
245. Niederkrüger, H.: Expressionssysteme zur Untersuchung der Pederin- und Psymberin-Biosynthese aus nicht kultivierten bakteriellen Symbionten. Dissertation, Universität Bonn, **2010**
246. Iwami, M., Kawai, Y., Kiyoto, S., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H.: A new antitumor antibiotic, chromoxymycin. I. Taxonomic studies on the producing strain: a new subspecies of the genus *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **1986**, 39, (1), 6-11.
247. Hori, Y., Hino, M., Kawai, Y., Kiyoto, S., Terano, H., Kohsaka, M., Aoki, H., Hashimoto, M., Imanaka, H.: A new antitumor antibiotic, chromoxymycin. II. Production, isolation, characterization and antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo)* **1986**, 39, (1), 12-16.
248. Kawai, Y., Furihatah, K., Seto, K., Otake, N.: The structure of a new antibiotic, chromoxymycin. *Tetrahedron Lett* **1985**, 26, 3273-3276.
249. Sugiyama, Y., Watanabe, K., Hirota, A.: Surugapyrroles A and B, Two New *N*-Hydroxypyrrroles, as DPPH Radical-Scavengers from *Streptomyces sp*. USF-6280 Strain *Biosci Biotech Biochem* **2009**, 73, (1) 230-232.
250. Schönewolf, M., Grabley, S., Hütter, K., Machinek, R., Wink, J., Zeeck, A., Rohr, J.: Secondary metabolites by chemical screening, 10. Glycerinopyrin, a novel metabolite from *Streptomyces violaceus*. *Liebigs Ann Chem* **1991**, 77-80.
251. Schönewolf, M., Rohr, J.: Biogenesis of the Carbon Skeleton of Glycerinopyrin: A New Biosynthetic Pathway for Pyrroles. *Angew Chem Int Ed Engl* **1991**, 30, (2), 183-184.
252. Ding, Y., Yu, Y., Pan, H., Guo, H., Li, Y., Liu, W.: Moving posttranslational modifications forward to biosynthesize the glycosylated thiopeptide nocathiacin I in *Nocardia sp*. ATCC202099. *Mol Biosyst* **2010**, 6, 1180-1185.
253. Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J., Loper, J.E.: Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol* **1999**, 181, (7), 2166-2174.
254. Yan, A., Wang, X., Zhang, X., Xu, Y.: LysR family factor PltR positively regulates Pyoluteorin production in a pathway-specific manner in *Pseudomonas sp*. M18. *Sci China C Life Sci* **2007**, 50, (4), 518-524.

-
255. Maddocks, S.E., Oyston, P.C.: Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **2008**, 154(12), 3609-3623.
256. Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., Haas, D.: Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon in gram-negative, plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe In* **2000**, 13, (2), 232-237.
257. O'Toole, G.A., Kolter, R.: Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology* **1998**, 28, 3, 449-461.
258. Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M.D., Muehlchen, A.M., Loper, J.E.: The sigma factor σ^S affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92, 12255-12259.
259. Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A., Patel, H.M.: Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **2001**, (5), 525-534.
260. Qiagen, The Qiaexpressionist, June **2003**, http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf
261. Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S.A., Oakley, B.R.: Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **2006**, 1, (6), 3111-3120.
262. Zhang, Y.: I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, 40.
263. Roy, A., Kucukural, A., Zhang Y.: I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **2010**, 5, 725-738.
264. Erol, O., Schäberle, T.F., Schmitz, A., Rachid, S., Gurgui, C., El Omari, M., Lohr, F., Kehraus, S., Piel, J., Müller, R., König, G.M.: Biosynthesis of the myxobacterial antibiotic coralopyronin A. *Chembiochem* **2010**, 11, (9), 1253-1265.
265. Mootz, H.D., Marahiel, M.A.: The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **1997**, 179, (21), 6843-6850.
266. Brymora, A., Valova, V.A., Robinson, P.J.: Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Curr Protoc Cell Biol* **2004** Chapter 17: Unit 17.5.
267. Titov, D.V., Liu, J.O.: Identification and validation of protein targets of bioactive small molecules. *Bioorg Med Chem* **2012**, 20, (6), 1902-1909.
268. Jewett, J.C., Bertozzi, C.R.: Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev* **2010**, 39, (4), 1272-1279.
269. Mamidyala, S.K., Finn, M.G.: In situ click chemistry: probing the binding landscapes of biological molecules. *Chem Soc Rev* **2010**, 39, (4), 1252-1261.
270. Baltz, R.H.: Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2011**, 38, (6), 657-666.
-

271. Esquenazi, E., Yang, Y.L., Watrous, J., Gerwick, W.H, Dorrestein, P.C.: Imaging mass spectrometry of natural products. *Nat Prod Rep* **2009**, (12), 1521-1534.
272. Jez, J.M., Ferrer, J.-L., Bowman, M.E., Dixon, R.A., Noel, J.P.: Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **2000**, 39, 890-902.
273. Bertani, G.: Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1951**, 62, 293-300.
274. Tartoff, K.D., Hobbs, C.A.: Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Labs Focus* **1987**, 9:12.
275. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **1954**, 44, 301-307.
276. Novella I.S., Barbes, C., Sanchez, J.: Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451 in submerged culture. *Can J Microbiol* **1992**, 38, 769-773.
277. Sambrook, J.; Russell, D. W.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **2001**.
278. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, F. S.: Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* **1991**, 19, (5), 1154.
279. Schägger, H.: Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **2006**, 1, (1), 16-22.
280. Zor, T., Selinger, Z.: Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **1996**, 236, 302-308.

9 Anhang

9.1 Plasmidkarten

Die folgenden Plasmidkarten zeigen die verwendeten Vektoren zur Lagerung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten. Die Beschreibung der jeweiligen Vektoren erfolgt unter 6.1.1.

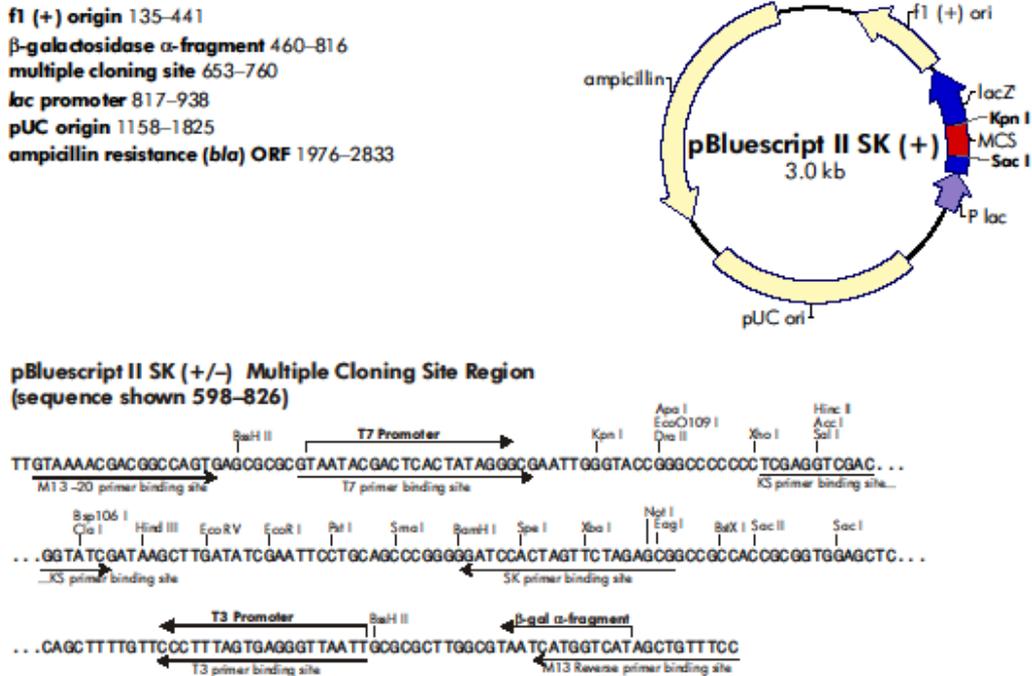


Abb. 9-1: Plasmidkarte und MCS von pBluescript SK(+)

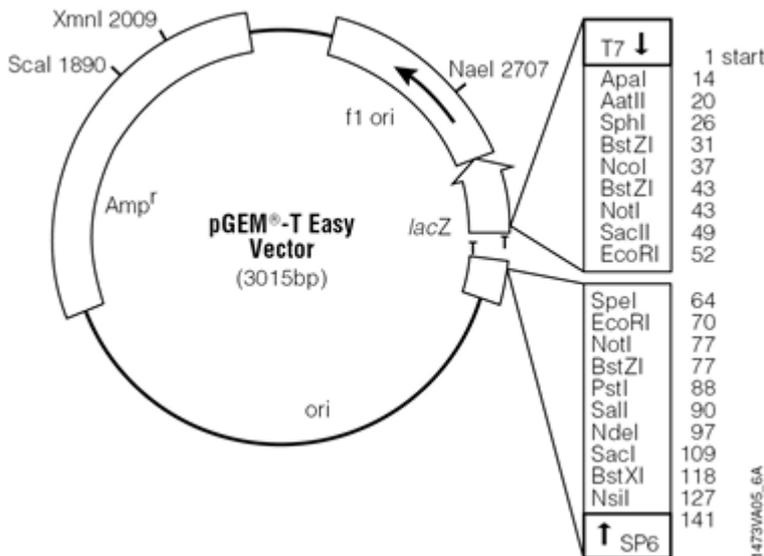


Abb. 9-2: Plasmidkarte mit MCS von pGEM-T Easy.



pCDFDuet-1 cloning/expression regions

Abb. 9-4: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pCDFDuet-1

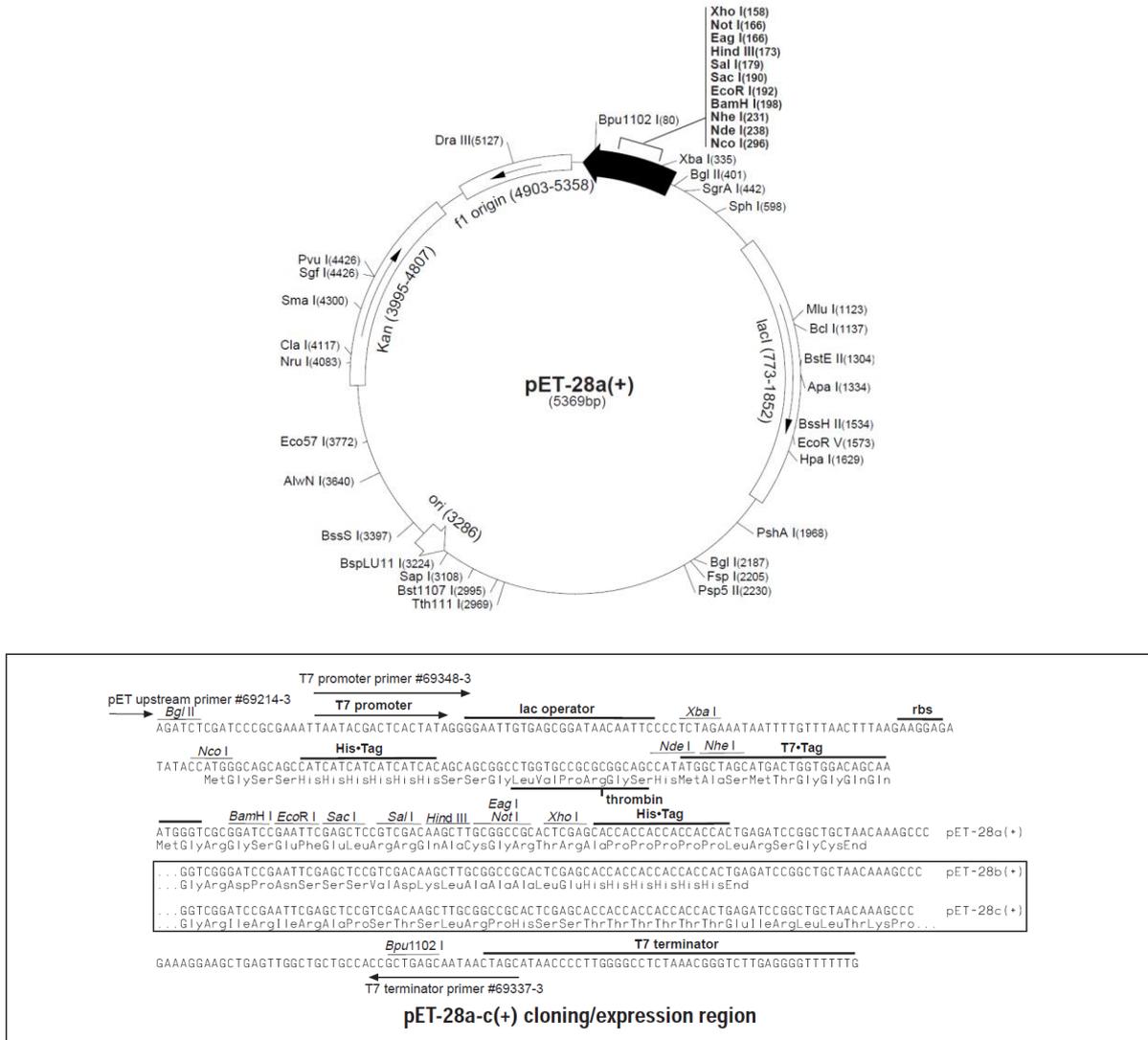


Abb. 9-5: Plasmidkarte und MCS für den Proteinexpressionsvektor pET28a. pET28b unterscheidet sich von pET28a nur durch eine deletierte Nucleobase vor der BamHI-Schnittstelle.

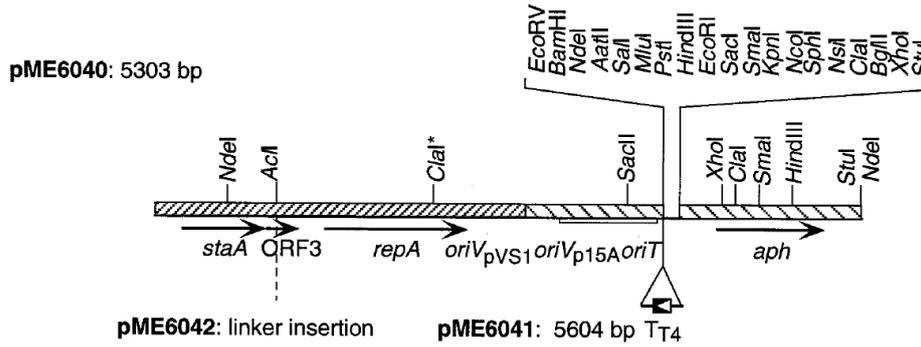


Abb. 9-6: MCS für den Proteinexpressionsvektor pME6041.²⁵⁶

9.2 Alignments und Proteinmodelle

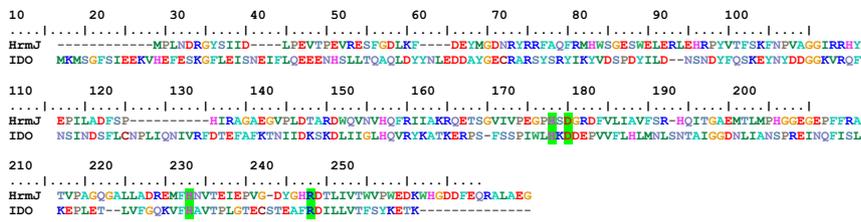


Abb. 9-7: Alignment von HrMJ (obere Sequenz) und der Isoleucin-4-Oxygenase (IDO) aus *Bacillus thuringiensis* (untere Sequenz), erstellt mit dem Programm Bioedit. Die markierten Aminosäuren sind konservierte Reste im aktiven Zentrum (siehe Tab. 5-1).

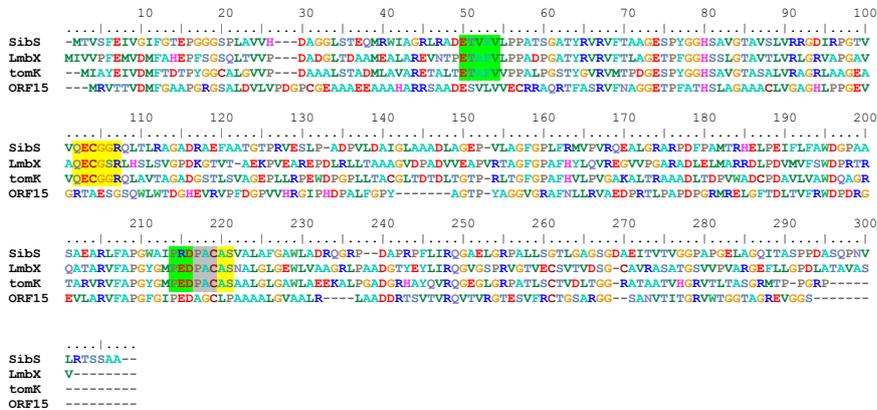
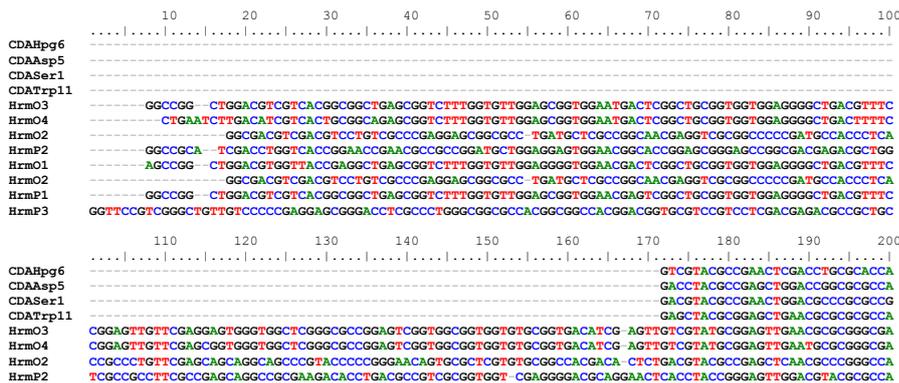


Abb. 9-8: Alignment der putativen C-C-Hydrolasen SibS, LmbX, TomK und ORF15. Konservierte Motive, die für degenerierte Primer genutzt wurden, sind grün bzw. gelb markiert, Überschneidungen von genutzten Motiven grau hinterlegt (siehe Tab. 5-3).



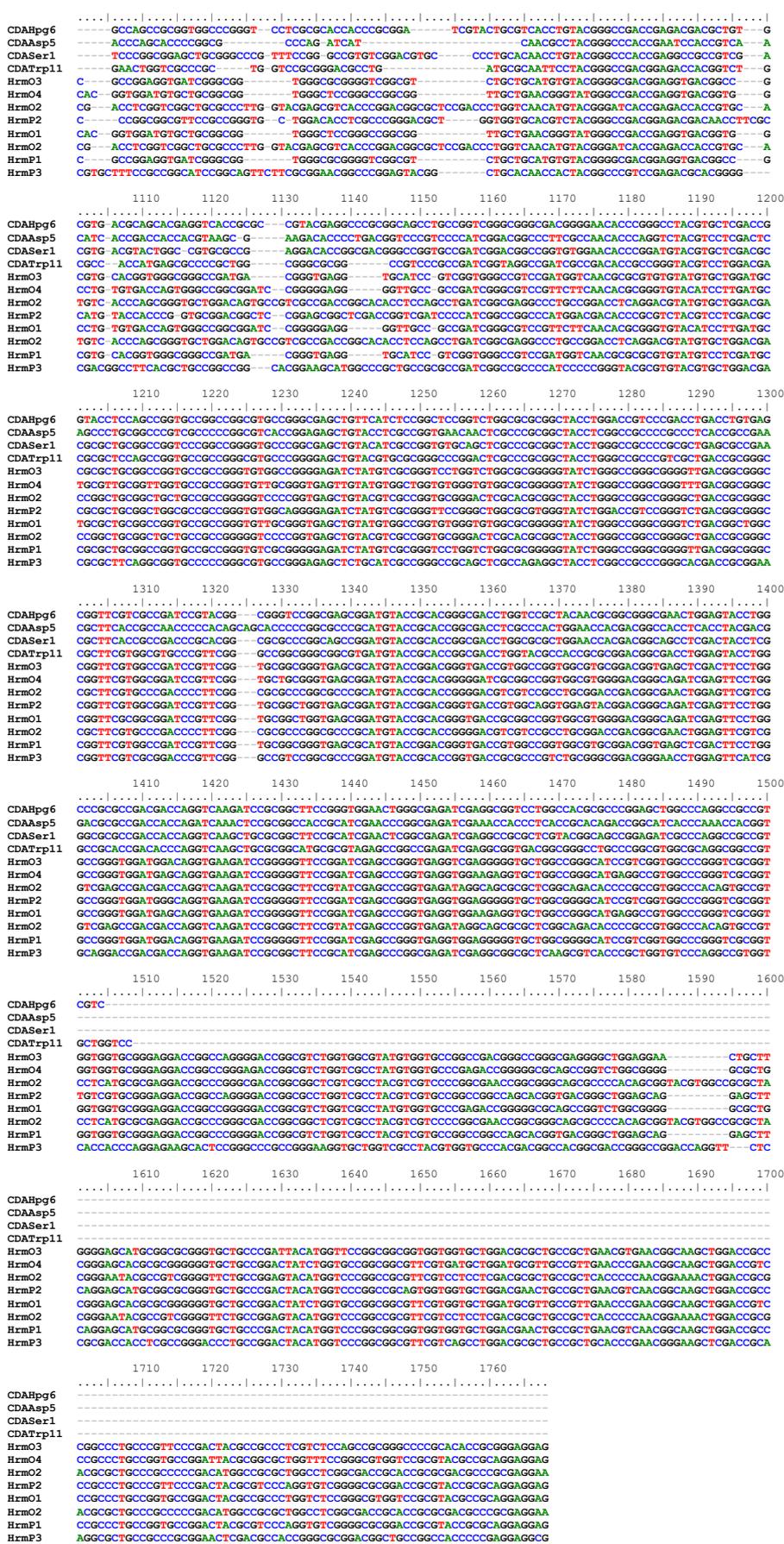


Abb. 9-9: Sequenzalignment für vier A-Domänen aus der NRPS des Antibiotikums CDA mit allen Hormamycin A-Domänen Hrm01_A-HrmP3_A, erstellt mit dem Programm Bioedit.

9.3 Massenspektren und zusammenfassende Tabellen

Tab. 9-1: Aktivierung verschiedener Substrate durch HrmK im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{-ATP}$ -Assay

Substrat	Aktivierung [%]
Prolin (94)	95,8
Glycin	1,8
Leucin	3,7
Alanin	1,3
Benzoessäure (101)	1,4
Pyrrol-2-carbonsäure (102)	0,7
Picolinsäure (103)	0,8
Nikotinsäure (104)	0,8
Cyclohexancarbonsäure (105)	1,2
Cyclopentancarbonsäure (106)	0,8
Thiophen-2-carbonsäure (107)	1,6
Furan-2-carbonsäure (108)	2,9
Tetrahydrofuran-2-carbonsäure (109)	1,3
Pipecolinsäure (110)	0,5

Tab. 9-2: Aktivierung von verschiedenen Aminosäuren durch HrmP1_A im $[\gamma\text{-}^{18}\text{O}_4]\text{-ATP}$ -Assay.

Substrat	Aktivierung[%]
(β-Me)Phe (31)	12,4
(4-Cl)Phe (126)	2,2
(α-Me)Phe (127)	4,2
Ala	4,0
Arg	1,1
Cys	2,6
L-DOPA (72)	1,3
Gly	1,5
His	2,7
Ile	5,5
Lys	1,8
Phe	2,0
Pro	1,9
Ser	3,1
Thr	6,1
Trp	5,3
Tyr	3,8
Val	5,0

Tab. 9-3: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP1_A mit HrmR vor und nach FPLC im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert

Substrat	absolute Aktivierung durch HrmP1 _A /HrmR [%]	Mittelwert [%]	relative Aktivierung durch HrmP1 _A /HrmR [%]	absolute Aktivierung durch HrmP1 _A /HrmR nach FPLC [%]	relative Aktivierung durch HrmP1 _A /HrmR nach FPLC [%]
(β -Me)Phe (31)	93,1 ; 90,7 ; 104,4	96,1	100	6,7	100
(α -Me)Phe (107)	1,4		1,5	0,2	3,5
(3-Ncp)Ala (27)	2,3		2,4		
(4-Cl)Phe (106)	2,9		3,0	0,4	5,4
Ala	2,6		2,7		
Arg	0,6		0,6		
Asn	0,5		0,4		
Asp	1		1,0		
Cys	0		0		
Gln	1,9		1,9		
Glu	1,2		1,2		
Gly	1,7		1,8		
His	2,4		2,5		
Hpg	1,2		1,2		
Ile	5		5,2	0,4	5,4
Leu	2,9		3,0		
Lys	16,3 ; 1,3	8,8	9,2	0,4	5,4
Orn	1,2		1,2		
Phe	10,9 ; 12,4	11,6	12,1	0,7	10,7
Pro	1,6		1,6		
Ser	0,6		0,6		
Thr	4,2		4,3		
Trp	1,7		1,8	0,6	8,9
Tyr	4,1 ; 4,8	4,6	4,6	0,5	7,1
Val	8,0 ; 1,0	4,5	4,7	0,6	8,9

Tab. 9-4: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO3_A mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	absolute Aktivierung durch HrmO3 _A /HrmR[%]	Mittelwert [%]	relative Aktivierung durch HrmO3 _A /HrmR[%]
(β -Me)Phe (31)	32,6 ; 52,0	42,3	100,0
(3-Ncp)Ala (27)	1,8		5,1
(4-Cl)Phe (126)	2,0		5,7
(α -Me)Phe (127)	1,0		2,7
Ala	4,4		12,5
Arg	1,6		4,4
Asn	0,2		0,7
Asp	1,4		4,1
Cys	1,4		4,1
Gln	3,1		8,8
Glu	1,4		4,1
Gly	2,5		7,1
His	1,7		4,7
Ile	1,9		5,4
Leu	6,2 ; 21,7	14,0	33,0
Lys	1,9		5,4
Phe	3,7		10,5
Pro	2,3		6,4
Ser	2,4		6,8
Thr	24,0 ; 0,7 ; 0,6	8,4	19,7
Trp	5,0 ; 8,7	6,7	15,8
Tyr	3,5 ; 5,3	4,4	10,4
Val	3,6		10,1

Tab. 9-5: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO4_A und O4f_A mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	Absolute Aktivierung durch HrmO4 _A /HrmR [%]	Relative Aktivierung durch HrmO4 _A /HrmR [%]	Absolute Aktivierung durch HrmO4f _A /HrmR [%]	Relative Aktivierung durch HrmO4f _A /HrmR [%]
(3-Ncp)Ala (27)	84,1	100	96,1	100
Ala	1,2	1,4	5,3	5,5
Asp	1,1	1,3	2,0	2,1
Cys	1,2	1,4	2,5	2,6
Gln	1,7	2,0	8,0	8,3
Gly	1,4	1,7	3,7	3,9
His	1,6	1,9	1,2	1,2
Ile	2,5	3,0	3,5	3,6
Leu	7,6	9,0	9,7	10,1
Lys	1,7	2,0	1,7	1,7

Phe	1,9	2,3	2,8	2,9
Pro	0,8	1,0	2,4	2,5
Ser	1,4	1,7	1,4	1,5
(β -Me)Phe (31)	1,1	1,3	1,1	1,1
Thr	5,9	7,0	6,5	6,7
Trp	6,2	7,4	5,2	5,4
Tyr	3,4	4,0	5,3	3,0
Val	10,9	12,8	7,1	7,4
5-Nitro-2-aminobenzoessäure (124)	1,0	1,1	1,4	1,5
Cyclopropylglycin (125)	0,7	0,9	2,5	2,6

Tab. 9-6: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO1_A mit HrmR vor und nach FPLC-Aufreinigung im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	absolute Aktivierung durch HrmO1 _A /HrmR [%]	Mittelwert [%]	relative Aktivierung durch HrmO1 _A /HrmR [%]	absolute Aktivierung durch HrmO1 _A /HrmR nach FPLC [%]	relative Aktivierung durch HrmO1 _A /HrmR nach FPLC [%]
(3-Ncp)Ala (27)	97,0 ; 78,5	84,0	100	78,0	100
Ala	6,5 ; 7,9	7,2	8,6	0,4	0,5
Arg	4,3		5,1		
Asn	1,3		1,5	0,5	0,6
Asp	1,6		1,9	0,4	0,5
Cys	3,4		4,0	2,2	2,8
Gln	1,8		2,1		
Glu	1,3		1,5		
Gly	4,7		5,6	0,2	0,3
His	3,8		4,5		
Ile	2,6		5,5	0,5	0,6
Leu	9,1 ; 8,9	9,0	10,7	5,8	7,4
Lys	4,2		5,0	1,7	2,2
Phe	5,5		6,5		
Pro	3,6		4,3	0,1	0,1
Ser	3,5		4,2		
(β -Me)Phe (31)	1,4		1,7	0,2	0,3
Thr	23,9 ; 61,4	42,7	50,8	15,4	19,7
Trp	11,2 ; 5,9	8,6	10,2	0,2	0,6
Tyr	6,0		7,1	0,6	0,8
Val	5,6		6,7	1,0	1,3
5-Nitro-2-aminobenzoessäure (124)	1,0		1,2	0,2	0,3
Cyclopropylglycin (125)	1,6		1,9	0,4	0,5

Tab. 9-7: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO_{2A} und O_{2fA} mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	absolute Aktivierung durch HrmO _{2A} /HrmR [%]	Mittelwert [%]	relative Aktivierung durch HrmO _{2A} /HrmR [%]	absolute Aktivierung durch O _{2fA} /HrmR [%]	Mittelwert [%]	relative Aktivierung durch O _{2fA} /HrmR [%]
Thr	62,0 ; 55,3 ; 75,6	64,3	100	29,6 ; 62,3	46	100
Ala	16,9 ; 12,4	14,6	21,9	4,8		10,4
Arg	5,2		7,7	1,8		3,9
Asn	9,4		14,0	3,5		7,6
Asp	7,6		11,3	2,5		5,5
Cys	3,1		4,7	1,1		2,3
D-Thr	4,9 ; 6,1	5,5	8,3	1,4		3,1
Gln				1,3		2,9
Glu	6,8		10,3	1,0		2,1
Gly	5,9 ; 10,7	8,3	12,4	1,9		4,2
His	14,2		21,2	4,2		9,1
Hpg	5,6		8,5			
Ile	22,7 ; 14,6 ; 28,2	21,8	32,7	3,6		7,8
Leu	22,0		32,9	8,0 ; 6,7	7,4	16,2
Lys				1,3		2,9
Phe	26,9 ; 17,8	22,3	33,5	0,2		0,5
Pro	8,9		13,3	4,8		10,4
Ser	15,2 ; 8,6	11,9	18,0	7,2 ; 3,1	5,2	11,2
(β-Me)Phe (31)	0,4		12,8	0,2		0,5
Trp	10,0		14,9	0,7		1,6
Tyr	11,5		17,3	1,0		2,1
Val	50,4 ; 53,0	51,7	77,5	12,8 ; 10,4	11,6	25,3

Tab. 9-8: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmO_{2A} und O_{2fA} mit HrmR nach FPLC im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	Absolute Aktivierung durch HrmO _{2A} /HrmR nach FPLC [%]	Relative Aktivierung durch HrmO _{2A} /HrmR nach FPLC [%]	Absolute Aktivierung durch O _{2fA} /HrmR nach FPLC [%]	Relative Aktivierung durch O _{2fA} /HrmR nach FPLC [%]
Thr	62,4	100	49,6	100
Ala	0,6	1,0	1,7	3,4
Asn	0,6	1,0	0,6	1,2
Cys			0,7	1,5
D-Thr	1,0	1,5	0,6	1,2
Gly	0,7	1,2	0,5	1,0
His	0,4	0,6	0,4	0,7
Ile	0,4	0,6	0,6	1,2
Leu	1,4	2,3	1,4	2,9
Lys	0,5	0,8	0,4	0,7
Phe	0,2	0,4	0,6	1,2

Ser	1,4	2,3	2,6	5,3
(β-Me)Phe (31)	0,4	0,6	0,6	1,2
Trp	0,5	0,8	0,5	1,0
Tyr	0,2	0,4	0,6	1,2
Val	1,1	1,7	2,4	4,8

Tab. 9-9: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP2_A und P2f_A mit HrmR im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	absolute Aktivierung durch HrmP2_A /HrmR [%]	relative Aktivierung durch HrmP2f_A/HrmR [%]	Mittelwert [%]	absolute Aktivierung durch P2f_A /HrmR [%]	relative Aktivierung durch P2f_A /HrmR [%]	Mittelwert [%]
Val	22,8 ; 5,8	100	100	15,8 ; 5,1	100	100
Ala	2,4 ; 1,1	10,5 ; 16,7	13,6	14,3 ; 2,8	90,2 ; 54,9	72,5
Arg	1,6	6,8	6,8	1,7	10,6	10,6
Asn	1,6	6,8	6,8	1,6	9,8	9,8
Asp	5,3	23,2	23,2	5,3	33,3	33,3
Cys	2,5	11,1	11,1	1,9	12,1	12,1
Gln	6,1	26,8	26,8	6,1	38,6	38,6
Glu	2,5	11,1	11,2	2,5	15,9	15,9
Gly	0,6	2,6	2,6	3,1 ; 1,7	19,7 ; 33,3	26,5
His	3,2	14,2	14,2	3,2	20,5	20,5
Ile	2,8 ; 2,5	12,1	12,1	5,3 ; 1,5	33,3 ; 29,4	31,4
Leu	3,6 ; 1,7	15,8 ; 33,3	24,6	6,7 ; 3,9	42,4 ; 76,5	59,5
Lys	1,9	8,4	8,4	1,6	9,8	9,8
Phe	2,5	11,1	11,1	4,7	29,5	29,5
Pro	2,2 ; 1	9,5 ; 14,8	12,1	1,6	9,8	9,8
Ser	0,6	2,6	2,6	1,9	12,1	12,1
(β-Me)Phe	1,3	5,8	5,8	1,8 ; 1,7	11,4 ; 33,3	22,3
Thr	4,9 ; 0,8	21,6 ; 42,6	32,1	10,1	63,6	63,6
Trp	0,7	3,2	3,2	5,4	34,1	34,1
Tyr	3,4	14,7	14,7	3,7	23,5	23,5

Tab. 9-10: Aktivierung verschiedener Aminosäuren durch HrmP3_A mit HrmR vor und nach FPLC-Aufreinigung im [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay. Die höchste Aktivität wurde als 100% normiert.

Substrat	Absolute Aktivierung durch HrmP3 _A /HrmR [%]	relative Aktivierung durch HrmP3 _A /HrmR [%]	Absolute Aktivierung durch HrmP3 _A /HrmR nach FPLC [%]	relative Aktivierung durch HrmP3 _A /HrmR nach FPLC [%]
(4-Pe)Pro (69)	89,6	100,0	87,8	100,0
(4-Ethynyl)Pro (128)	26,0	29,1	11,4	13,0
Ala	3,7	4,2	1,7	1,9
Arg	1,3	1,5	0,7	0,8
Asn	1,1	1,2		
Asp	1,9	2,1		
Cyclopentancarbonsäure (86)	1,9	2,1	0,7	0,8
Cys	1,3	1,5	0,5	0,5
Gln	1,4	1,6		
Glu	0,0	0,0	0,5	0,5
Gly	6,7	7,5	0,5	0,5
His	1,6	1,7	0,5	0,5
Ile	5,3	5,9	1,0	1,1
Leu	9,2	10,3	1,9	2,2
Lys	2,3	2,5	1,1	1,2
Phe	4,7	5,2	1,0	1,1
Picolinsäure (83)	2,8	3,1		
Pro	2,8	3,1	1,1	1,2
Pyrrolcarbonsäure (82)	2,5	2,8	0,4	0,4
Ser	1,2	1,3	0,7	0,8
Tetrahydrofuran-carbonsäure (89)	3,4	3,7		
Thr	12,0	13,4	10,9	12,4
Trp	2,9	3,2	0,5	0,5
Tyr	4,1	4,6	0,7	0,8
Val	26,4	29,5	5,0	5,7

9.4 HPLC- und FPLC-Läufe

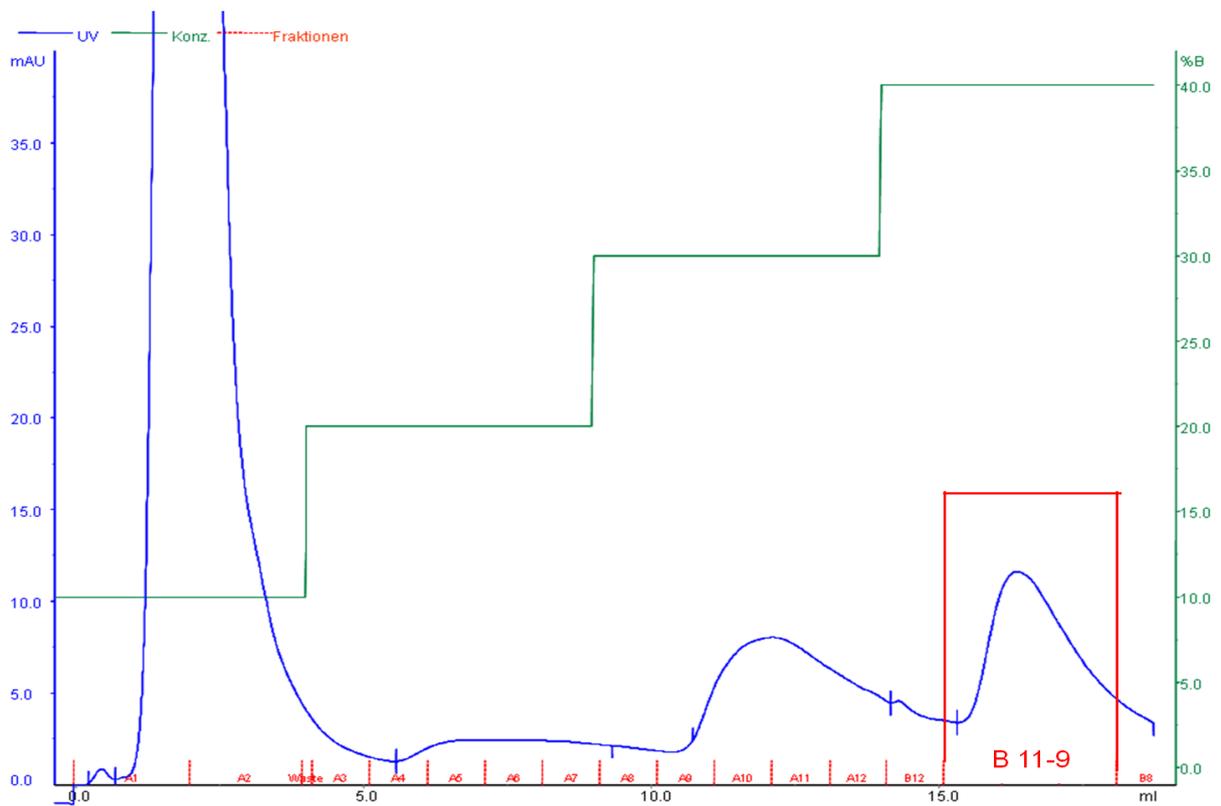


Abb. 9-18: Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von HrmP1_A. Blaue Spur: UV-Absorption, grüne Spur: Konzentration NaCl; Rote Zahlen: gesammelte Fraktionen. Die Fraktionen B11-9 wurden für den [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay verwendet.

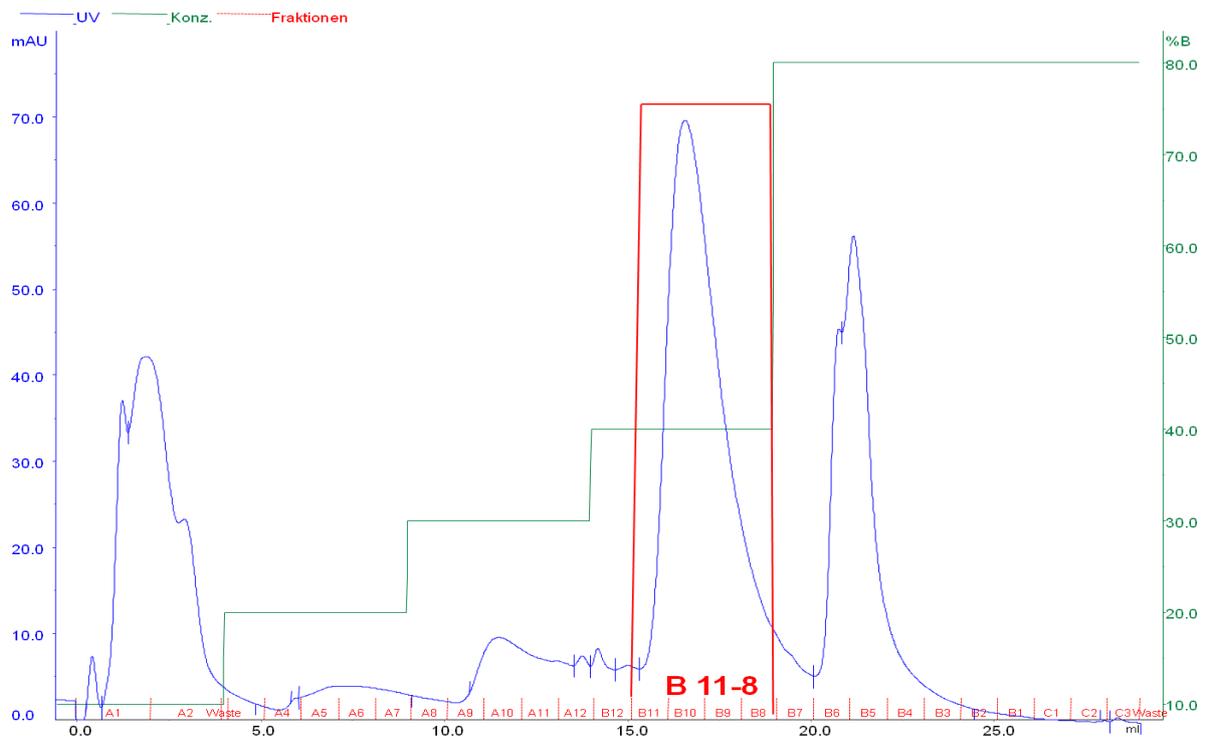


Abb. 9-19: Chromatogramm einer FPLC-Aufreinigung der Elutionsfraktion von O2f_A. Blaue Spur: UV-Absorption, grüne Spur: Konzentration NaCl; Rote Zahlen: gesammelte Fraktionen. Die Fraktionen B11-9 wurden für den [γ -¹⁸O₄]-ATP-Assay verwendet.

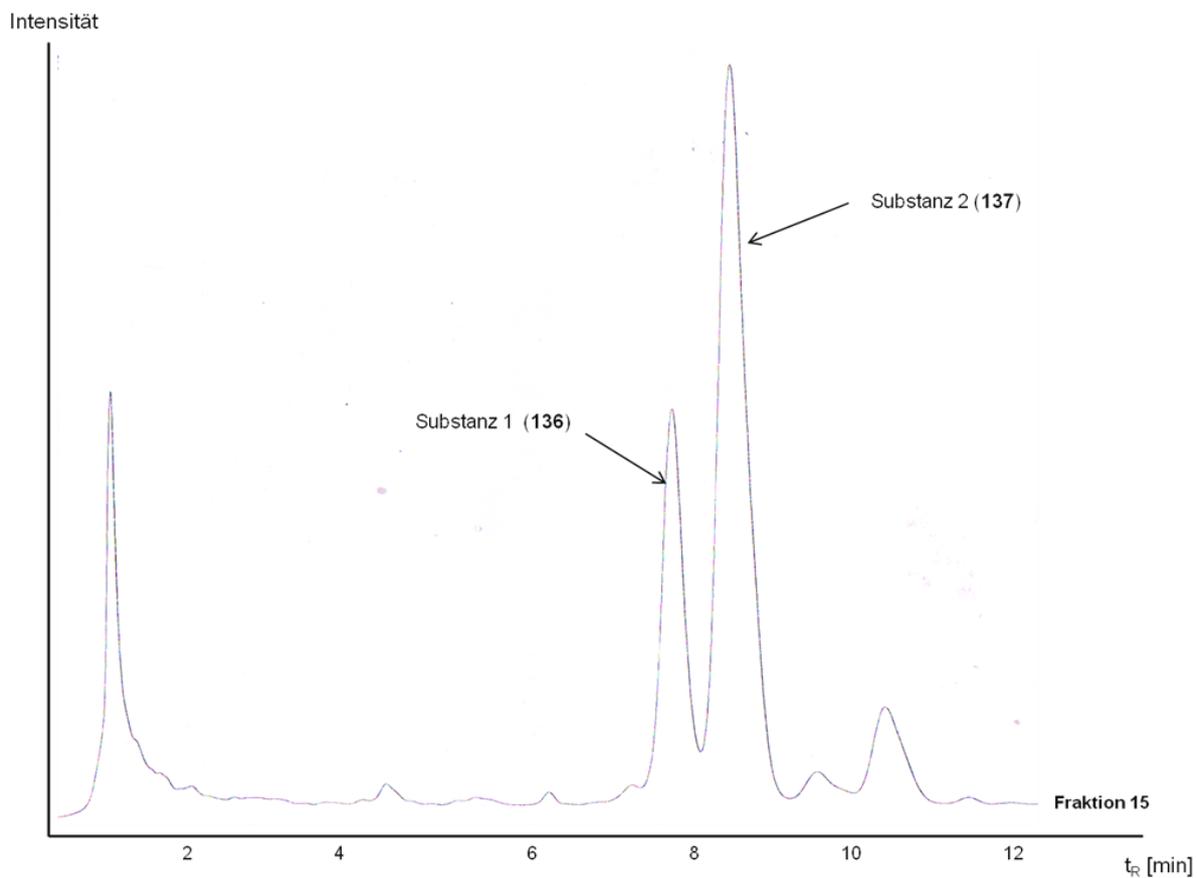


Abb. 9-20: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 15 aus Tabelle 5-16; Methanol/H₂O 85:15, 273 nm.

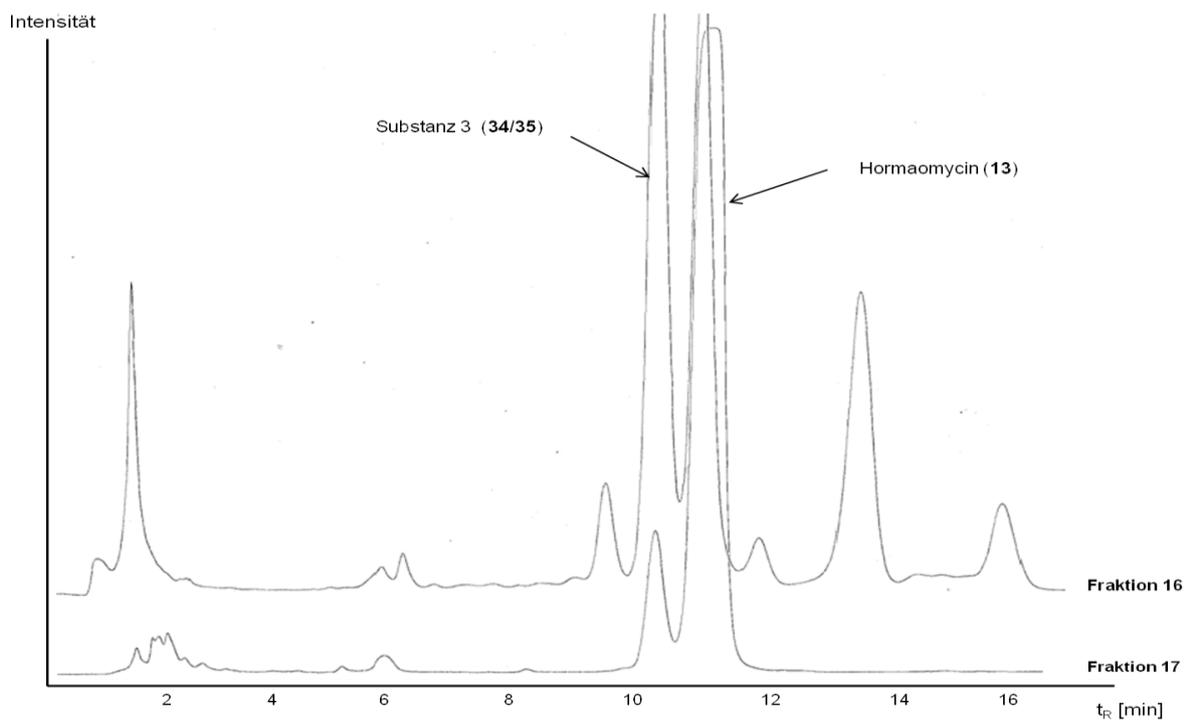


Abb. 9-21: HPLC-Chromatogramm der Fraktionen 16 und 17 aus Tabelle 5-16; Methanol/H₂O 85:15, 273 nm.

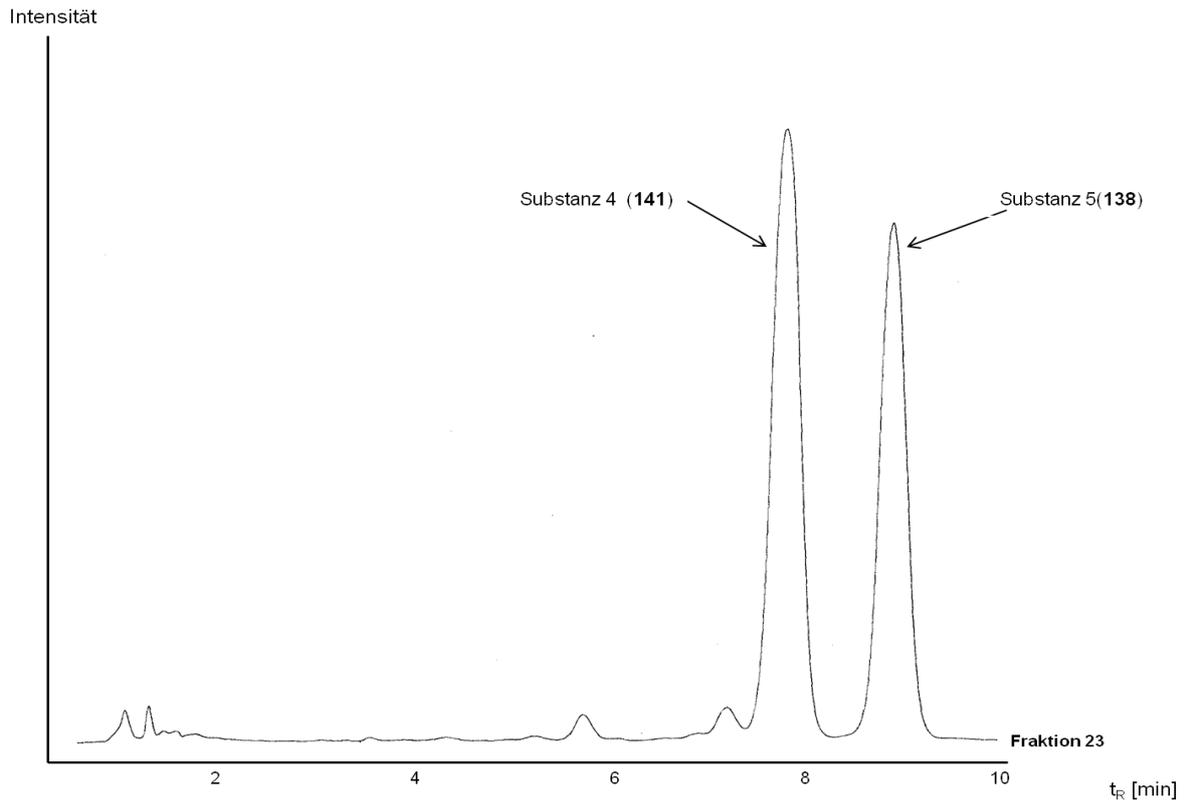


Abb. 9-22: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 23 aus Tabelle 5-16; Methanol/H₂O 8:2, 273 nm.

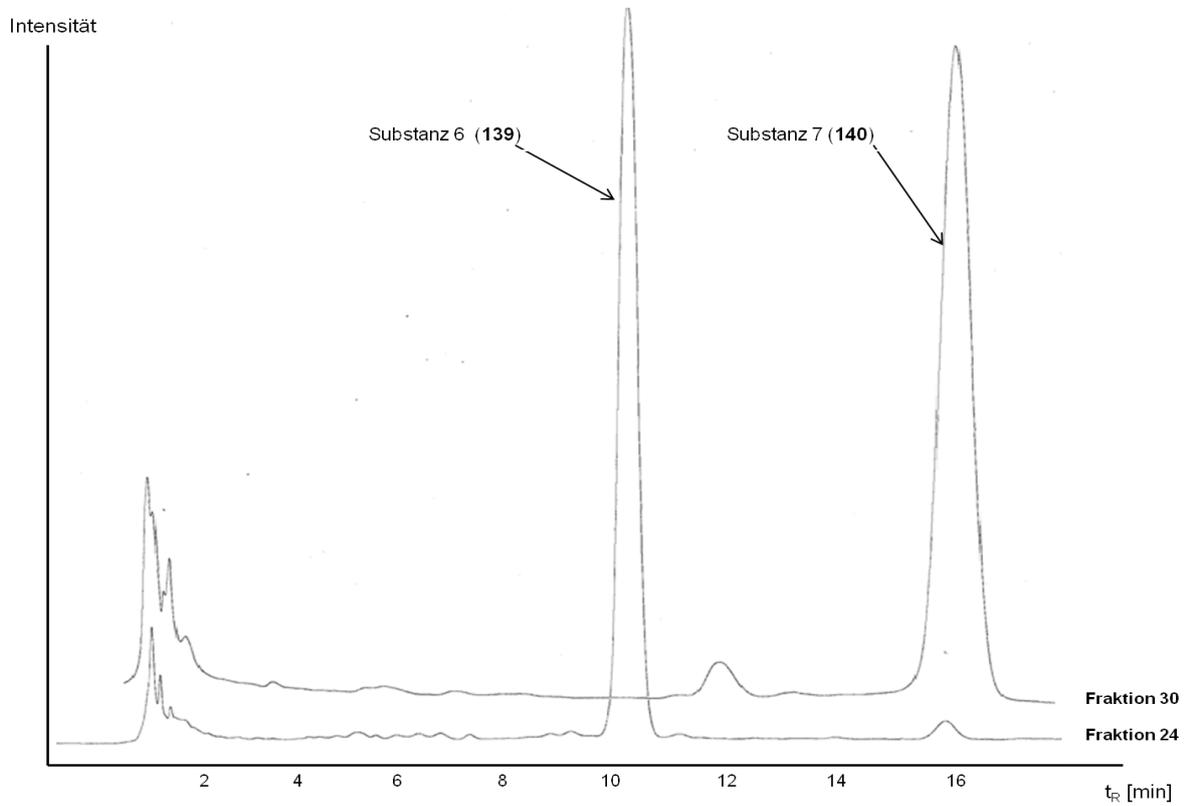


Abb. 9-23: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 30 aus Tabelle 5-16; Methanol/H₂O 8:2, 273 nm.

9.5 NMR-Spektren

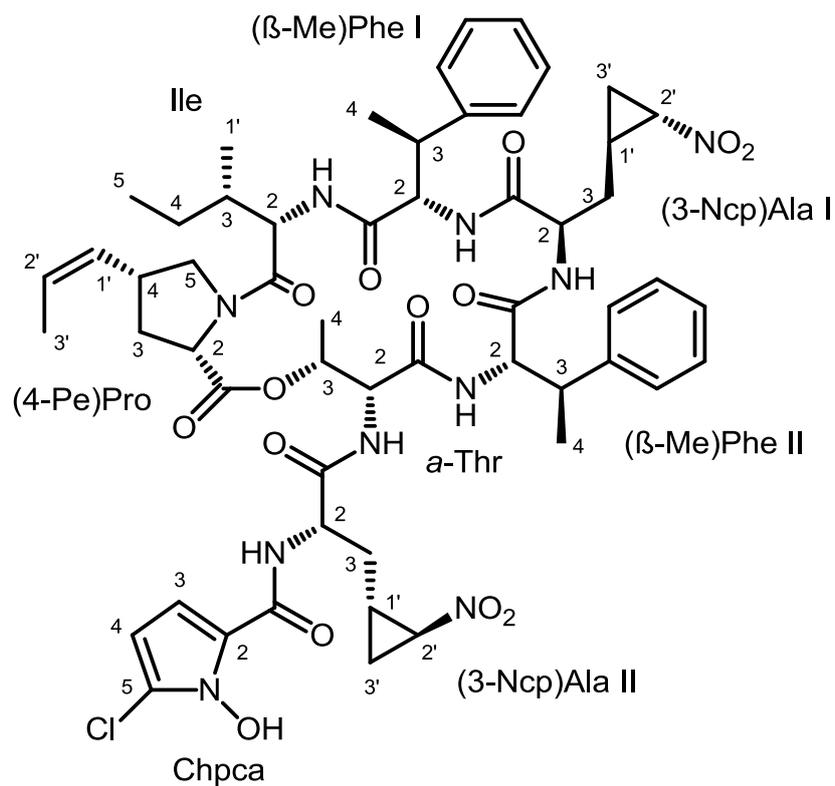


Abb. 9-24: Nummerierung der C-Atome der Bausteine des Hormaomycins (**13**). Die Tabellen 9-11 – 9-16 beziehen sich auf diese Nomenklatur.

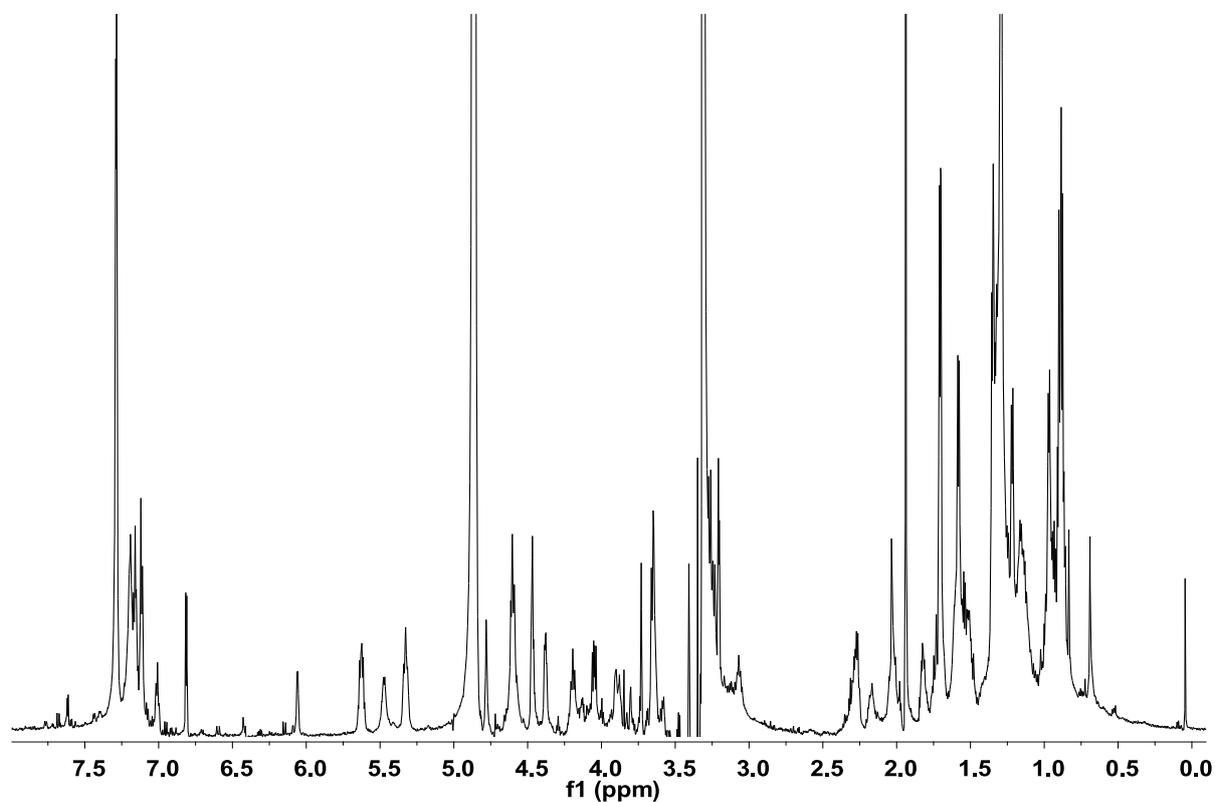


Abb. 9-25: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin (**13**) in CDCl_3 , 500 MHz.

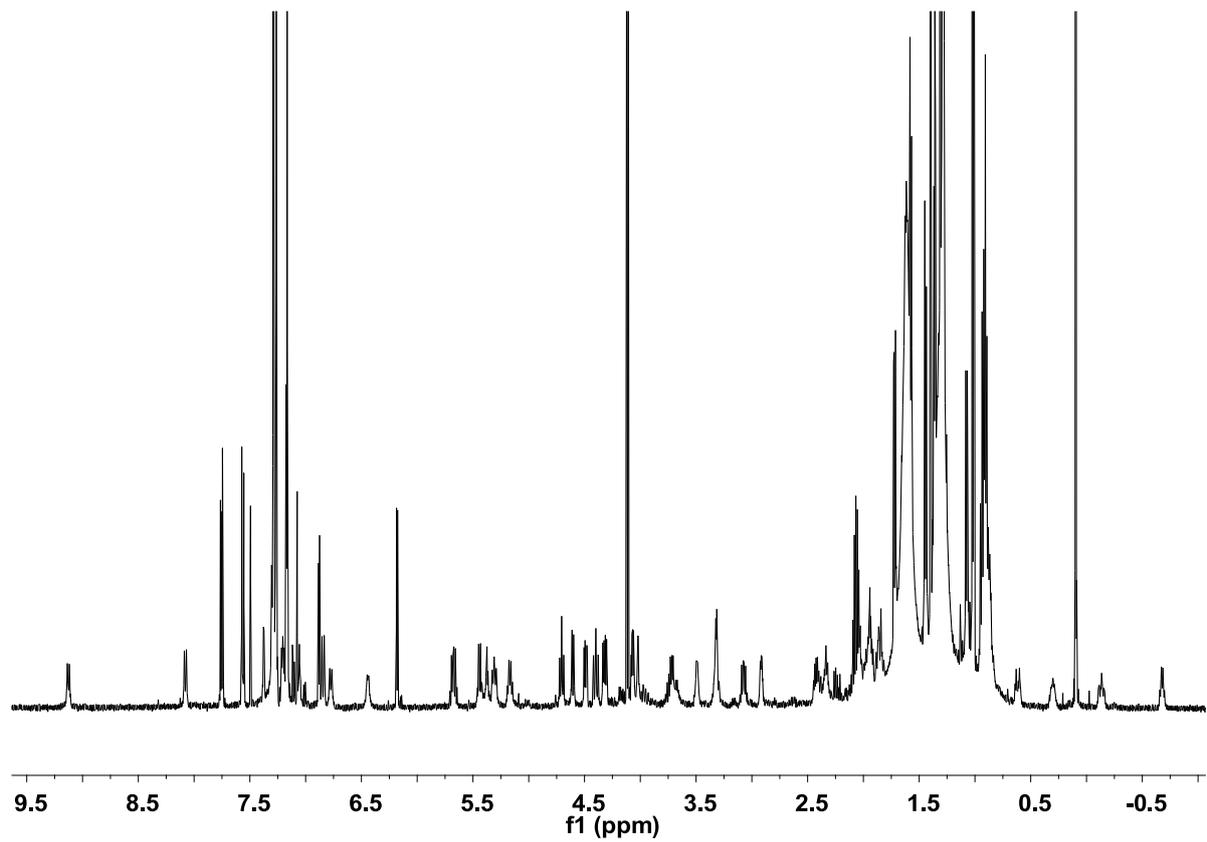


Abb. 9-26: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin (**13**) in CD_3OD , 700 MHz.

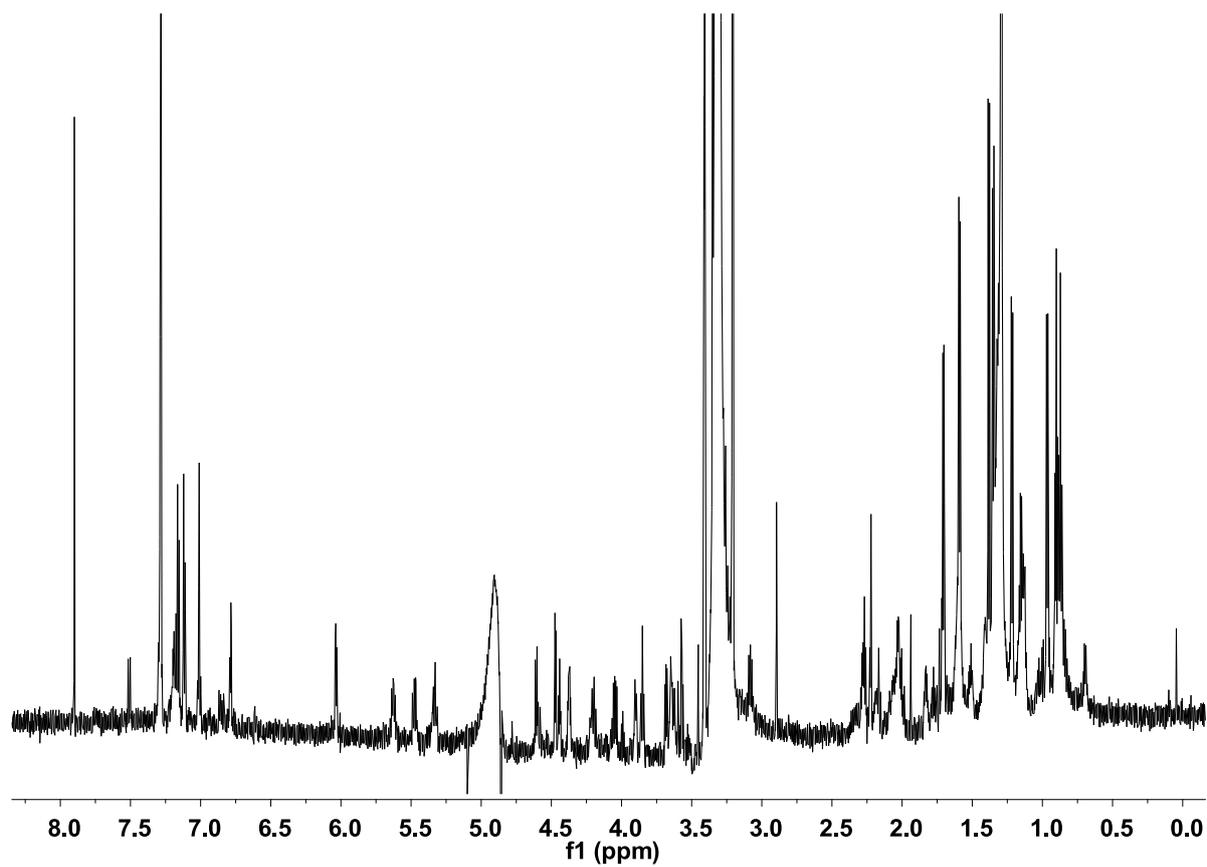
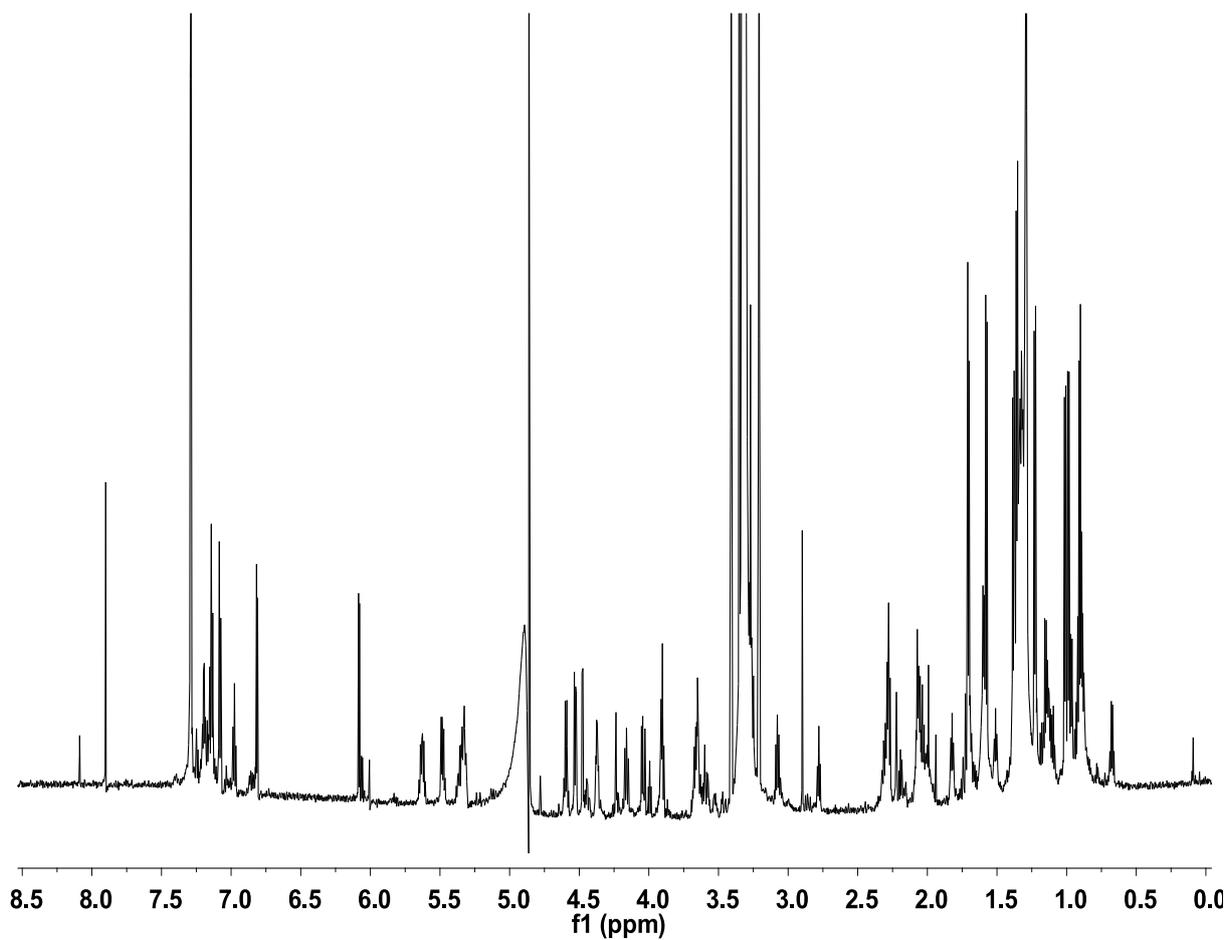


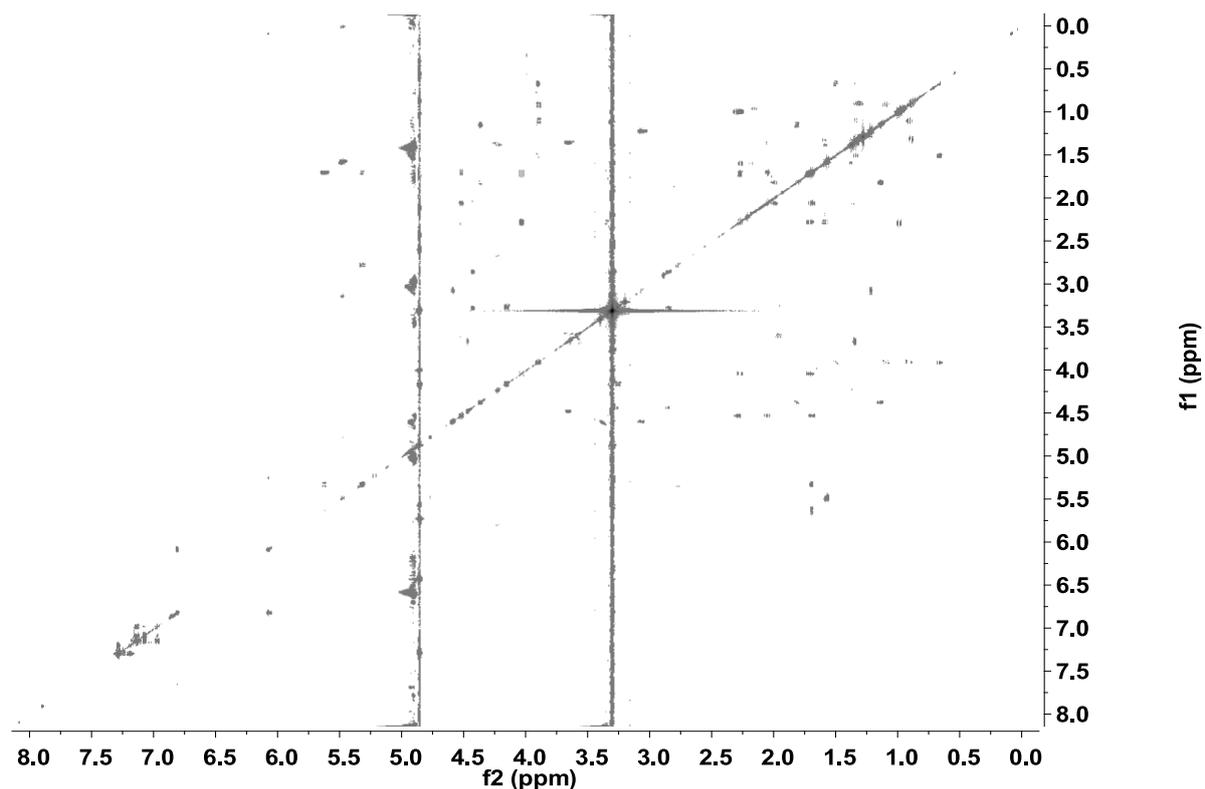
Abb. 9-27: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A1 (**136**) in CD_3OD , 700 MHz.

Tab. 9-11: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A1 (**136**) in CD₃OD, 700 MHz.

Baustein und Position	Δ ¹ H [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
Chpca			
3	6,79	dd	4,5 , 2,5
4	6,04	dd	4,5 , 3,0
5	7,02	m	
(3-Ncp)Ala II			
2	4,61	m	
3a	1,71	m	
3b	2,05	m	
1'	2,03	m	
2'	4,37	ddd	7,0 , 7,0 , 3,0
3'a	1,83	ddd	7,0 , 6,0 , 4,0
3'b	1,14	m	
α-Thr			
2	4,78	m	
3	5,47	dq	7,0 , 2,0
4	1,59	d	7,0
(β-Me)Phe II			
2	4,47	m	
3	3,08	dq	8,0 , 6,0
4	1,22	d	7,0
Ar	6,99-7,30		
(3-Ncp)Ala I			
2	3,90	dd	7,0 , 3,5
3a	0,87	ddd	14,0 , 7,0 , 7,0
3b	1,02	m	
1'	1,30	m	
2'	3,85	m	
3'a	1,51	ddd	10,0 , 5,0 , 4,0
3'b	0,70	m	
(β-Me)Phe I			
2	4,44	dd	6,0 , 4,0
3	3,57	m	
4	1,38	d	8,0
Ar	6,99-7,30		
Ile			
2	4,60	m	
3	2,22	m	
4a	1,35	m	
4b	1,59	m	
5	0,900	t	6,5
1'	0,97	d	6,5
(4-Pe)Pro			
1'	5,33	m	
2'	5,63	m	

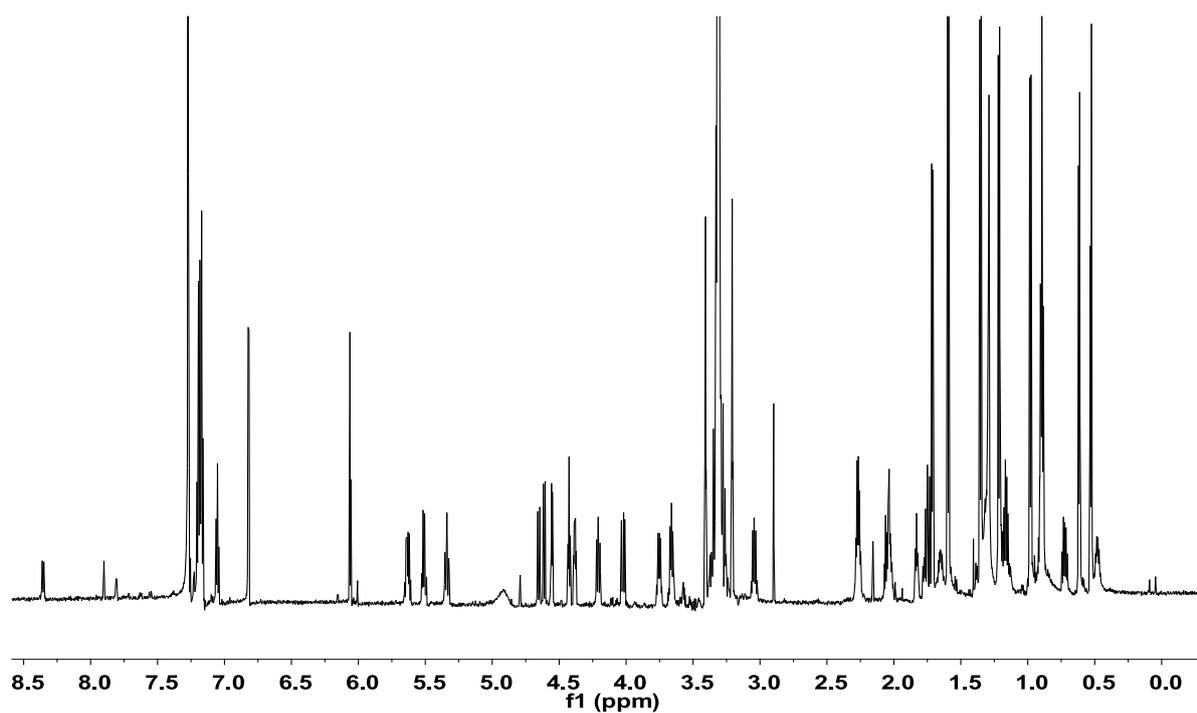
3'	1,71	dd	7,2
2	4,05	dd	11,5, 6,0
3a	2,27	m	
3b	1,73	m	
4	3,35	m	
5a	4,20	m	
5b	3,26	m	

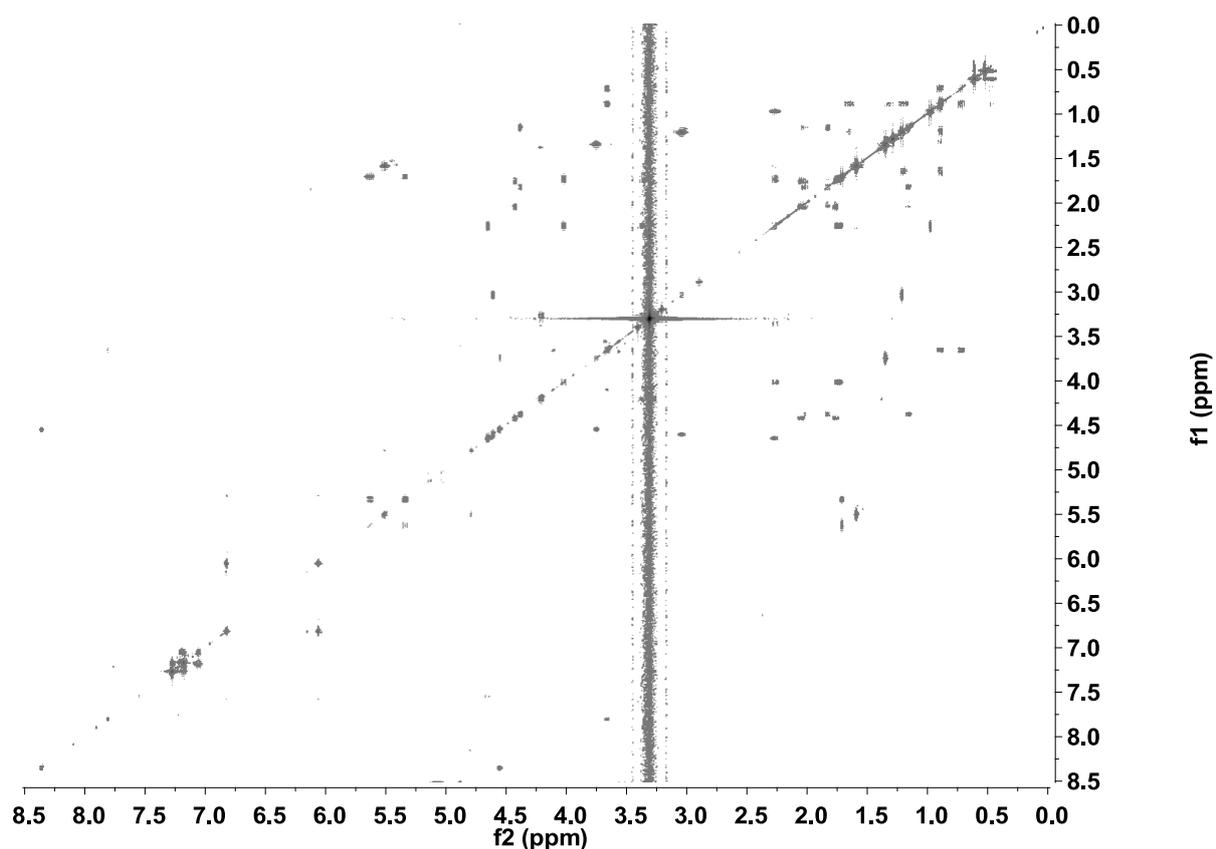
Abb. 9-28: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A2 (**137**) in CD_3OD , 700 MHz.

Abb. 9-29: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A2 (**137**) in CD_3OD , 700 MHz.Tab. 9-12: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A2 (**137**) in CD_3OD , 700 MHz.

Bausteine und Position	$\Delta^1\text{H}$ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	^1H - ^1H -COSY
Chpca				
3	6,82	d	5,0	4
4	6,08	d	5,0	3
(3-Ncp)Ala II				
2	4,53	ddd	9,0 , 6,5	3a,b
3a	1,69	m		2, 3b
3b	2,07	m		2, 3a, 1'
1'	2,02	m		3a, 2', 3'a,b
2'	4,37	ddd	7,0 , 3,0 , 3,0	3'a,b
3'a	1,82	ddd	9,0 , 5,0 , 4,0	3'b, 2', 1'
3'b	1,15	ddd	8,0 , 6,0 , 6,0	3'a, 2'
α-Thr				
2	4,78	m		3
3	5,48	dq	9,0 , 7,0	4
4	1,53	d	6,5	3
(β-Me)Phe II				
2	4,60	dd	8,5, 8,0	3
3	3,08	dq	7,5, 7,0	2, 4
4	1,20		7,5	3
Ar	6,95-7,31			
(3-Ncp)Ala I				
2	3,9	m		3a,b

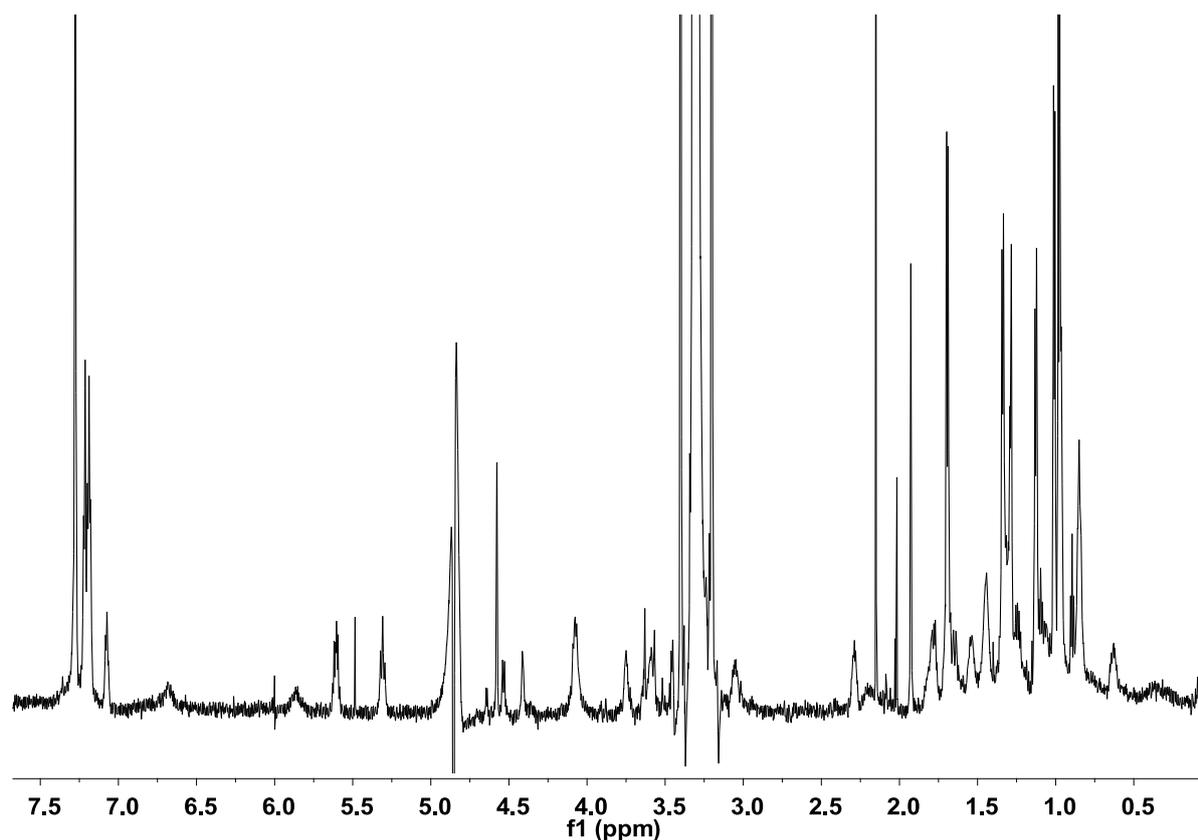
3a	0,91	ddd	7,5 , 7,0, 5,0	3b, 2, 1'
3b	1,13	ddd	14,0 , 8,0 , 7,0	3a, 2
1'	1,30	m		3a, 3'a,b
2'	3,91	m		3'a,b
3'a	1,51	ddd	6,0 , 6,0 , 6,0	3'b, 2', 1'
3'b	0,67		7,0 , 7,0 , 7,0	3'b, 2'
(β-Me)Phe I				
2	4,48	dd	5,0 , 5,0	3
3	3,66	m		2, 4
4	1,36	d	7,3	3
Ar	6,95-7,31			
Val				
2	4,53	m		3
3	2,28	m		1', 4, 2
4	1,01	d	6,5	3
1'	0,99	d	6,5	3
(4-Pe)Pro				
1'	5,34	dd	11,0 , 11,0	2', 3'
2'	5,63	dq	10,5 , 7,0	1', 3'
3'	1,70	d	7,2	1', 2'
2	4,04	dd	11,0 , 6,0	3a, 3b
3a	2,28	m		2, 3b
3b	1,71	m		2, 3a
4	2,78	m		1'
5a	4,16	dd	10,0 , 8,5	5b
5b	3,27	m		5a

Abb. 9-30: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A3 (**138**) in CD_3OD , 700 MHz.

Abb. 9-31: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A3 (**138**) in CD_3OD , 700 MHz.Tab. 9-13: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A3 (**138**) in CD_3OD , 700 MHz.

Bausteine und Position	$\Delta^1\text{H}$ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	^1H - ^1H -COSY
Chpca				
3	6,82	d	5,0	4
4	6,06	d	5,0	3
(3-Ncp)Ala II				
2	4,43	m		3a,b
3a	2,05	ddd	7,5, 3,0, 3,0	2, 3b
3b	1,76	m		2, 3a
1'	2,03	m	7,5, 6,0, 6,0	3a, 2', 3'a,b
2'	4,38	ddd	7,0, 3,0, 3,0	3'a,b
3'a	1,83	ddd	6,0, 4,0, 3,5	3'b, 2', 1'
3'b	1,15			3'a, 2', 1'
α-Thr				
2	4,79	dd	5,0, 5,0	3, NH
3	5,51	dq	7,5, 6,5	4
4	1,59	d	7,0	3
NH	8,09			2
(β-Me)Phe II				
2	4,61	dd	9,0, 9,0	3
3	3,04	dq	7,5, 7,5	2, 4
4	1,22	d	7,0	3

Ar	7,04-7,29			
Leu I				
NH	7,80	d	4,5	2
2	3,66	dd		NH, 3a,b
3a	0,72	ddd	7,0 , 7,0 , 7,0	2, 3b
3b	0,90	m		2, 3a
4	0,48	m		5, 1'
5	0,53	d	6,0	4
1'	0,62	d	6,0	4
(β-Me)Phe I				
2	4,55	dd	5,0 , 2,5	NH, 3
3	3,74	dq	7,5 , 5,0 , 5,0	2, 4
4	1,35	d	7,2	3
Ar	7,04-7,29			
NH	8,35	d	9,0	2
Ile				
2	4,65	dd	11,0 , 11,0	NH, 3
3	2,26	m		2, 1'
4a	1,22	m		4b, 5
4b	1,67	m		4a, 5
5	0,89	m		4a,b
1'	0,97	d	6,5	3
NH	7,54	d	9,5	2
(4-Pe)Pro				
1'	5,34	dd	10,5 , 10,5	2', 3'
2'	5,63	dq	10,5 , 7,0	1', 3''
3'	1,70	dd	7,0	1', 2'
2	4,02	dd	8,0 , 8,0	3a, 3b
3a	2,27	ddd	6,5 , 6,5	2, 3b
3b	1,71	m		2, 3a
4	3,41	m		3a
5a	4,46	dd	9,0 , 9,0	5b
5b	3,26	m		5a

Abb. 9-32: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A4 (**139**) in CD_3OD , 700 MHz.Tab. 9-14: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A4 (**139**) in CD_3OD , 700 MHz.

Baustein und Position	$\Delta ^1\text{H}$ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
Chpca			
3	6,67	d	4,0
4	6,00	d	4,5
Leu II			
2	4,07	m	
3a	1,65	m	
3b	1,78	m	
4	1,71	m	
5	1,01	d	6,5
1'	0,97	d	6,5
α-Thr			
2	4,64	dd	7,0 , 5,0
3	5,48	m	
4	1,54	m	
(β-Me)Phe II			
2	4,53	dd	8,5 , 8,5
3	3,05	m	
4	1,13	d	7,0
Ar	7,04-7,30		
(3-Ncp)Ala I			

2	3,90	m	
3a	0,90	m	
3b	1,03	m	
1'	1,29	m	
2'	3,75	m	
3'a	1,44	m	
3'b	0,63	m	
NH	8,02	d	5,0
(β-Me)Phe I			
2	4,42	m	
3	3,59	m	
4	1,33	d	7,2
Ar	7,04-7,30		
Ile			
2	4,58	m	
3	2,15	m	
4a	1,24	m	
4b	1,65	m	
5	0,85	m	
1'	0,94	d	7,0
(4-Pe)Pro			
1'	5,31	dd	8,5 , 8,5
2'	5,62	dq	11,0 , 7,5
3'	1,69	d	6,5
2	4,07	dd	8,0 , 6,0
3a	2,29	m	
3b	1,70	m	
4	3,34	m	
5a	4,07	m	9,0 , 9,0
5b	3,22	m	

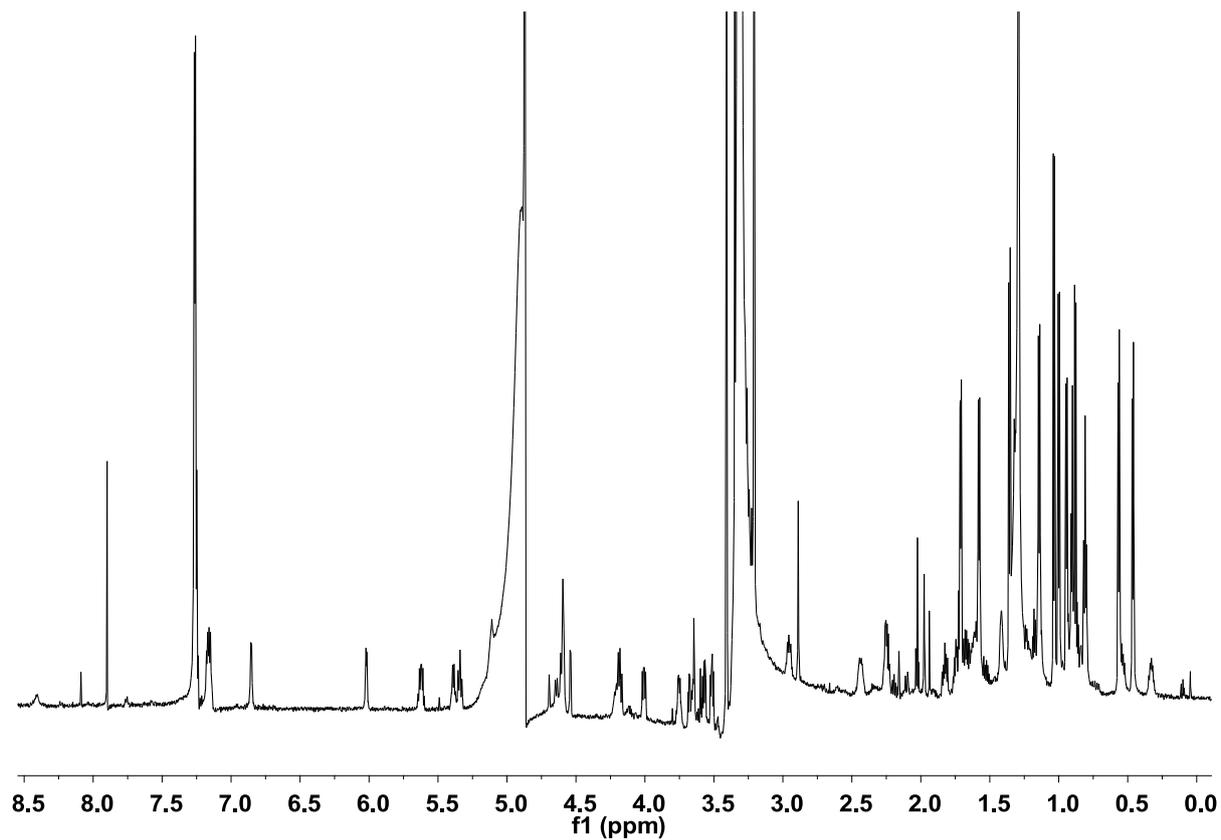


Abb. 9-33: ^1H -NMR-Spektrum von Hormaomycin A5 (**140**) in CD_3OD , 700 MHz.

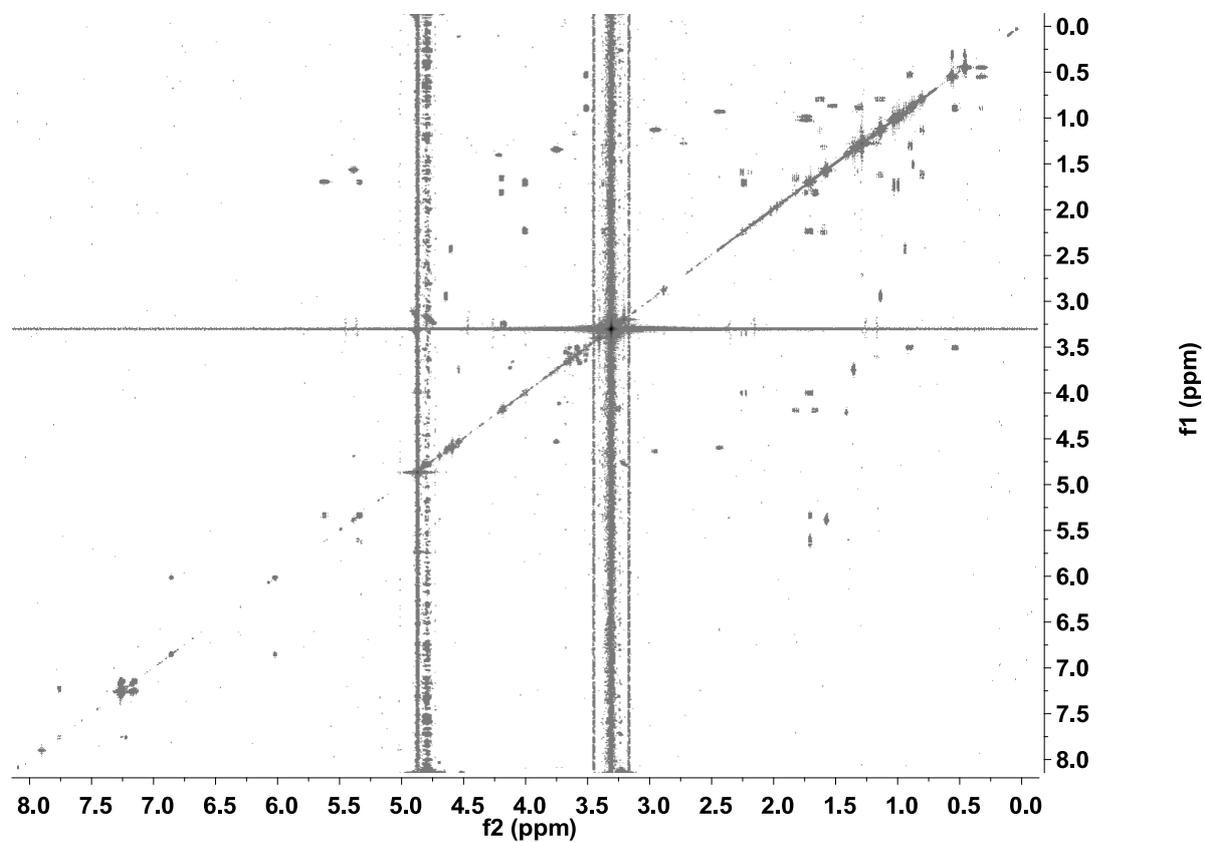


Abb. 9-34: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A5 (**140**) in CD_3OD , 700 MHz.

Tab. 9-15: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A5 (**140**) in CD₃OD, 700 MHz.

Bausteine und Position	$\Delta^1\text{H}$ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	^1H - ^1H -COSY
Chpca				
3	6,85	d	4,0	4
4	6,02	d	4,5	3
Leu II				
2	4,22	m		3a,b
3a	1,67	ddd	12,0 , 8,0 , 8,0	2, 3b, 4
3b	1,83	ddd	12,0 , 8,0 , 7,0	3a, 2
4	1,75	m		3b, 5, 1'
5	1,03	d	6,5	4
1'	1,00	d	6,5	4
α-Thr				
2	4,69	m		3
3	5,39	dq	7,5 , 6,5	2, 4
4	1,58	dq	7,0	3
(β-Me)Phe II				
2	4,65	m		3
3	2,96	dq	7,0 , 6,5	2, 4
4	1,14	d	7,0	3
Ar	7,12-7,29			
Leu I				
2	3,51	m		3a,b
3a	0,53	m		2, 3b
3b	0,90	m		2, 3a
4	0,33	sp	7,0	3b, 5, 1'
5	0,56	d	6,5	4
1'	0,46	d	6,5	4
(β-Me)Phe I				
2	4,54	dd	5,0 , 5,0	3
3	3,75	dq	4,0 , 4,0 , 3,5	2,4
4	1,35	d	7,2	3
Ar	7,12-7,29			
Ile				
2	4,60	m		3
3	2,44	m		2, 1'
4a	1,17	dq	7,0 , 6,0 , 5,0	4b, 5
4b	1,63	m		4a, 5
5	0,81	m		4a, 4b
1'	0,94	d	6,5	3
NH	7,54	d	9,5	2
(4-Pe)-Pro				
1'	5,34	dd	10,5 , 9,0	2', 3'
2'	5,62	dq	7,0 , 4,0	1', 3''
3'	1,71	d	6,5	1', 2'
2	4,01	dd	6,0 , 5,0	3a, 3b

3a	2,25	ddd	6,0 , 6,0 , 5,0	2, 3b,4
3b	1,72	m		2, 3a,4
4	3,35	m		3a,3b,5a
5a	4,18	dd	9,0 , 9,0	5b
5b	3,26	m		5a

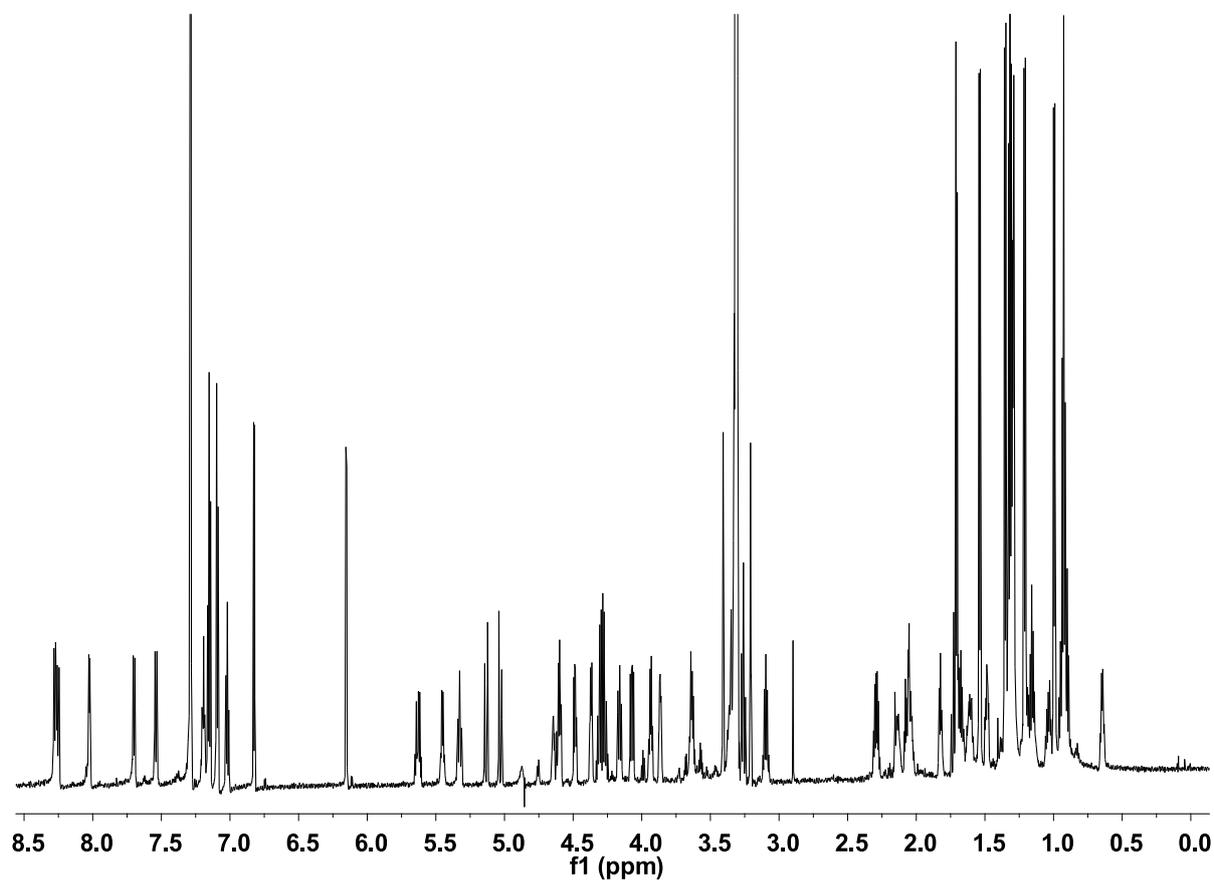
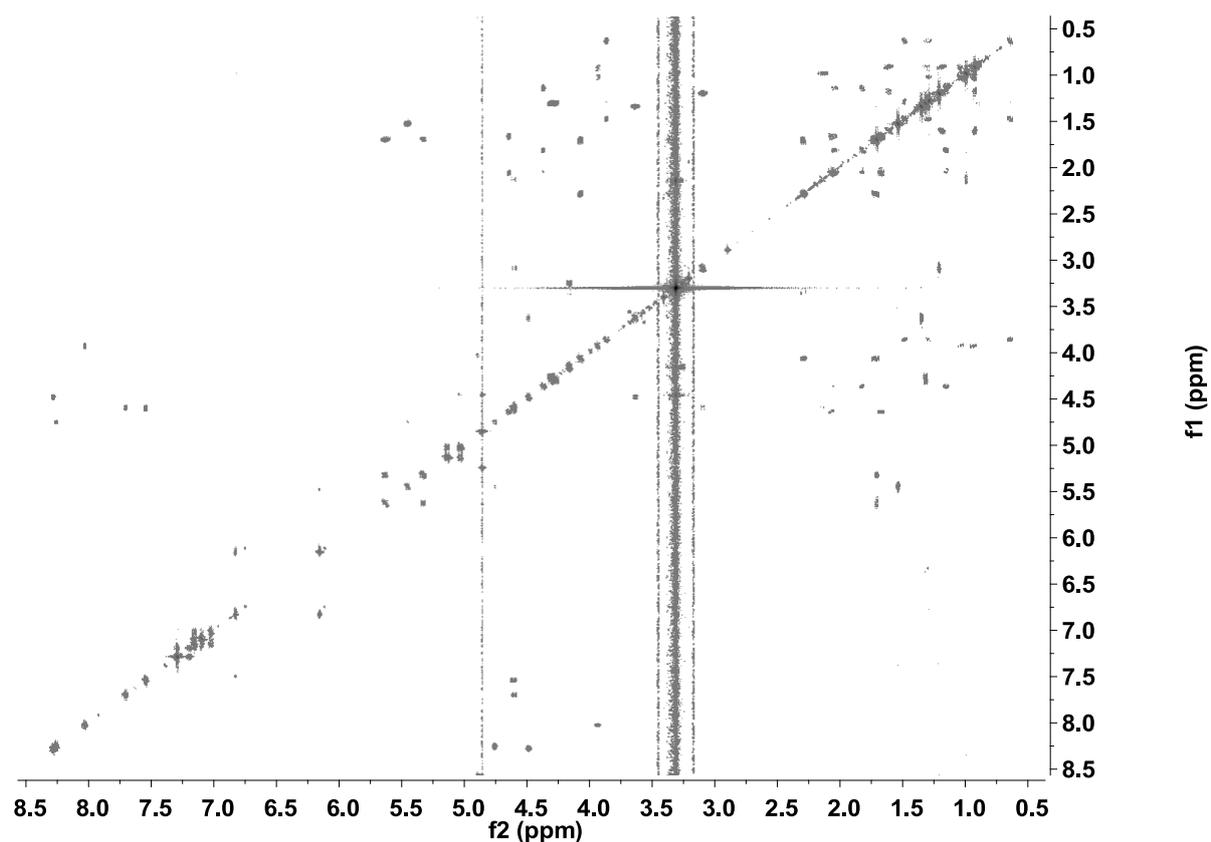


Abb. 9-35: ^1H -NMR-Spektrum von Hormamycin A6 (**141**) in CD_3OD , 700 MHz.

Abb. 9-36: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Hormaomycin A6 (**141**) in CD_3OD , 700 MHz.Tab. 9-16: Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse von Hormaomycin A6 (**141**) in CD_3OD , 700 MHz.

Bausteine und Position	$\Delta^1\text{H}$ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	^1H - ^1H -COSY
EtOAc				
2a	5,03	d	15,0	2b
2b	5,13	d	15,0	2a
1'	4,29	q	14,0 , 8,0	2'
2'	1,32	t	7,5	1'
Chpca				
3	6,82	d	5,0	4, NH [(3-Ncp)Ala II]
4	6,15	d	5,0	3
(3-Ncp)Ala II				
2	4,65	m		3a,b
3a	1,67	m		2, 3b
3b	2,07	m		2, 3a
1'	2,05	m		3a, 2', 3'a,b
2'	4,37	ddd	7,0 3,0 , 3,0	1', 3'a,b
3'a	1,82	ddd		3'b, 2', 1'
3'b	1,14	m		3'a,2', 1'
NH	7,54	d	9,5	
α-Thr				
2	4,75	dd	9,5	3, NH
3	5,45	dq	7,0 , 2,0	4

4	1,53	d	6,5	3
NH	8,25	d	12,0	2
(β-Me)Phe II				
2	4,59	m		NH,3
3	3,10	dq	7,5	2,4
4	1,20	d	7,0	3
Ar	7,00-7,30			
NH	7,70	d	8,0	2
(3-Ncp)Ala I				
2	3,93	dd	6,5 , 6,5	NH, 3a,b
3a	0,93	ddd	13,5 , 8,0 , 7,5	3b, 2, 1'
3b	1,02	ddd	14,0 , 9,0 , 4,5	3a, 2
1'	1,30	m		3a,b
2'	3,86	m		1', 3'a,b
3'a	1,48	m		3'b,2', 1'
3'b	0,64	ddd	6,0 6,0 , 6,0	3'b, 2', 1'
NH	8,02	d	5,0	2
(β-Me)Phe I				
2	4,49	dd	5,5	NH, 3
3	3,63	dq	7,5 , 7,0	2, 4
4	1,35	d	7,2	3
Ar	7,00-7,30			
NH	8,28	d	9,0	2
Ile				
2	4,6	m		NH, 3
3	2,13	m		2, 1'
4a	1,19	m		4b, 5
4b	1,61	m		4a, 5
5	0,92	t	7,5	4a, 4b
1'	0,99	d	6,5	3
NH	7,54	d	9,5	2
(4-Pe)Pro				
1'	5,33	dd	10,5 , 10,5	2', 3'
2'	5,63	dq	10,5 , 7,0	1', 3''
3'	1,70	dd	7,2	1', 2'
2	4,07	dd	10,5 , 10,5	3a, 3b
3a	2,29	ddd	12,0 , 7,5 , 6,5	2, 3b
3b	1,71	m		2, 3a
4	3,41	m		
5a	4,20	dd	9,0 , 9,0	5b
5b	3,28	m		5a

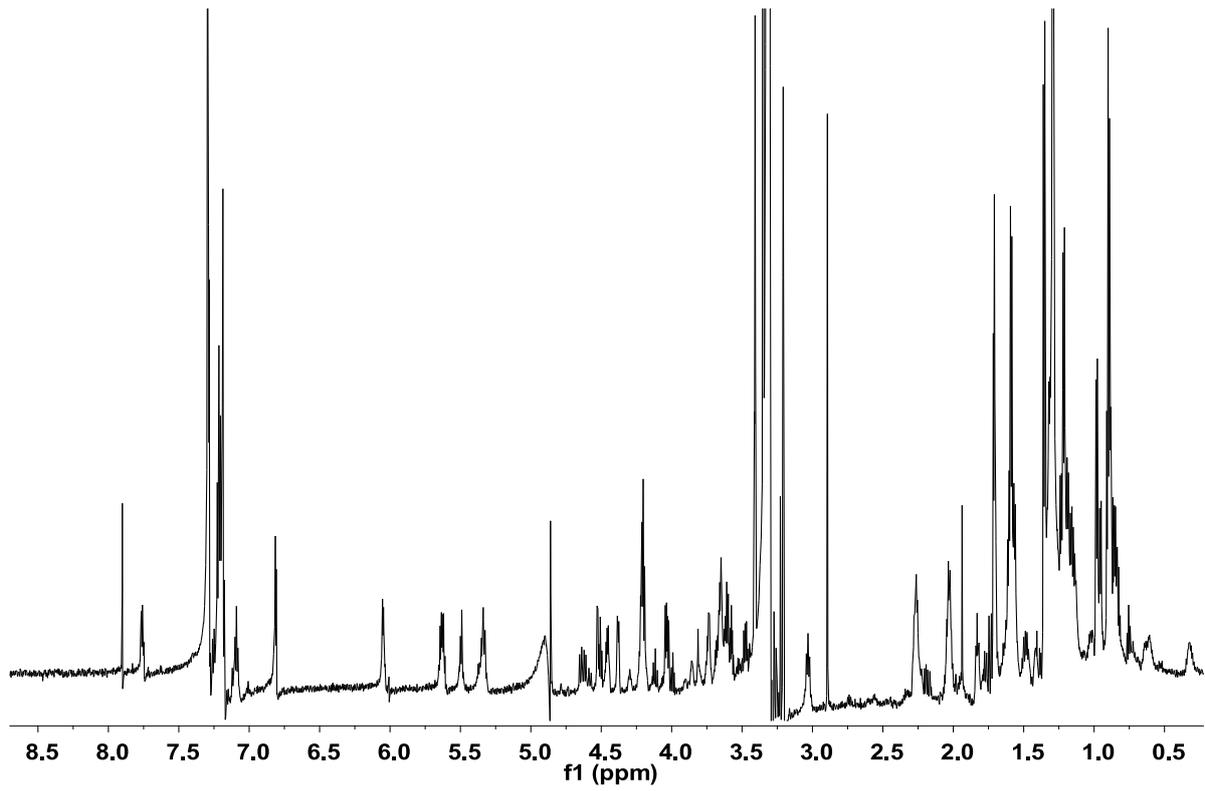


Abb. 9-37: ¹H-NMR-Spektrum von Hormaomycin E1/E2 (**40/41**) in CD₃OD, 700 MHz.

10 Publikationen

Veröffentlichungen:

Höfer, I., Crüsemann, M., Radzom, M., Geers, B., Flachshaar, D., Cai, X., Zeeck, A., Piel, J.: Insights into the biosynthesis of hormaomycin, an exceptionally complex bacterial signaling metabolite. *Chem Biol* **2011**, 18, (3), 381-391.

Crüsemann, M., Piel, J.: Characterization and evolution-guided engineering of the hormaomycin adenylation domains. *In Präparation*.

Cai, X., Crüsemann, M., Teta, R., Mangoni, A., Piel, J.: Overexpression of regulatory genes improves hormaomycin production dramatically and yields novel hormaomycin analogs. *In Präparation*.

Vorträge:

Max Crüsemann: Insights into the Biosynthesis of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signal Metabolite. 41. Doktorandenworkshop Naturstoffe: Chemie, Biologie, Ökologie. 13. 05. 2011, Bonn

Poster:

Max Crüsemann, Xiaofeng Cai, Elisabeth Rüthlein, Axel Zeeck and Jörn Piel: Insights into Biosynthesis and Regulation of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. FOR854 - International Symposium 2010: International Symposium of the DFG Research Unit 854 On the Current Trends in Antibacterial Research, 4. 10. - 6. 10. 2010, Königswinter

Xiaofeng Cai, Max Crüsemann, Elisabeth Rüthlein, Axel Zeeck and Jörn Piel: Insights into the Biosynthesis and Regulation of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. 23. Irseer Naturstofftage 23.02. - 25.02.2011, Kloster Irsee.

Max Crüsemann, Xiaofeng Cai, Elisabeth Rüthlein, Axel Zeeck and Jörn Piel: Insights into the Biosynthesis and Regulation of Hormaomycin, an Exceptionally Complex Bacterial Signaling Metabolite. DPhG-Doktorandentagung 30.03. - 02.04.2011, Heringsdorf (Insel Usedom)

Xiaofeng Cai, Max Crüsemann, Axel Zeeck and Jörn Piel: New Insights into the Biosynthesis and Regulation of the Nonribosomal Peptide Hormaomycin. VAAM meeting "Biology of Bacteria Producing Natural Compounds". 28.09 - 30.09.2011, Bonn.

Max Crüsemann, Xiaofeng Cai, Roberta Teta, Alfonso Mangoni and Jörn Piel: New Insights into the Biosynthesis and Regulation of the Nonribosomal Peptide Hormaomycin. 12th Leibniz-Symposium on Chemical Biology "Artwork from bits and pieces: Strategies to build up molecular complexity" 03.02.2012, Hannover

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

Diese Arbeit ist weder identisch noch teilentworfen mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ist mir bekannt.

Max Crüsemann

Bonn, den 11. 05. 2012