

**Untersuchung zur Bildung von Protease-Inhibitoren
aus Actinobakterien:
„Genome-Mining“ nach neuen Epoxyketon-Derivaten
und Charakterisierung des Biosynthesewegs von
Phosphoramidon und Talopeptin**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Agrarbiol. Alexandra Baulig
aus Köln

Tübingen
2020

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	29.03.2021
Stellvertretender Dekan:	Prof. Dr. József Fortágh
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Leonard Kaysser
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Harald Groß
3. Berichterstatter:	PD Dr. Bertolt Gust

**Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
Nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.**

Johann Wolfgang von Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
PUBLIKATION UND KONFERENZBEITRÄGE	v
ABBILDUNGEN	vi
TABELLEN.....	viii
ABKÜRZUNGEN.....	ix
ZUSAMMENFASSUNG.....	xv
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Suche nach neuen Naturstoffen aus Actinobakterien.....	1
1.1.1 Allgemeine Information.....	1
1.1.2 Die Amidbindung in der Natur.....	3
1.1.2.1 Bildung ribosomaler Peptidbindungen.....	3
1.1.2.2 Bildung nicht-ribosomaler Peptidbindungen.....	4
1.1.2.3 ATP-abhängige Carboxylat-Amin/Ammoniak-Ligasen.....	7
1.2 Peptidasen.....	8
1.2.1 Allgemeine Information.....	8
1.3 Proteasom.....	11
1.3.1 Allgemeine Information.....	11
1.3.2 Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren.....	13
1.3.2.1 Biosynthese von Epoxomicin und Eponemycin.....	16
1.4 Metalloproteasen.....	20
1.4.1 Allgemeine Information.....	20
1.4.2 Metalloprotease-Inhibitoren.....	23
1.4.2.1 Phosphoramidon und Talopeptin.....	23
1.5 Zielstellung der Arbeit.....	30
2 ERGEBNISSE	34
2.1 Untersuchung neuer Epoxyketon-Biosynthesegencluster.....	34
2.1.1 Generierung und Screening von vier Fosmid-Bibliotheken.....	34
2.1.2 Sequenzanalyse des <i>b-2517</i> -Genclusters.....	35
2.1.3 Sequenzanalyse des <i>s-1022</i> -Genclusters.....	38

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.4	Sequenzanalyse des <i>s-646</i> -Genclusters	40
2.1.5	Heterologe Expression der putativen „Epoxyketon“-Gencluster.....	43
2.1.6	Identifizierung neuer Eponemycin-Verbindungen durch “MS Molecular Networking”.....	45
2.1.7	Erzeugung von <i>in frame</i> -Gendeletionsmutanten und Einführung einer induzierbaren Promotorkassette in einem heterologen <i>Streptomyces</i> -Expressionssystem	46
2.1.8	Proteasom-Inhibitor-Assays.....	48
2.2	Identifizierung des Talopeptin-Biosynthesegenclusters	52
2.2.1	Sequenzierung und Klonierung des Talopeptin-Genclusters	52
2.2.2	Sequenzanalyse des Talopeptin-Genclusters.....	53
2.2.3	Funktionsnachweis der Identität des Talopeptin-Genclusters durch Heterologe Expression	56
2.2.4	Bestimmung der Grenzen des Talopeptin-Genclusters durch Gendeletionsexperimente	58
2.3	Charakterisierung von TalE als eine N–P-Bindung bildende Kinase	61
2.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung von <i>talC</i> /TalC und <i>talE</i> /TalE	61
2.3.2	Biochemische Charakterisierung der Phosphoryltransferase TalE	62
2.3.3	Strukturaufklärung des isolierten Produkts der TalE-Kinase	65
2.3.4	Untersuchung der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetischen Vorläufern	68
2.4	Untersuchung zur Rolle der Glycosyltransferase TalC in der Phosphoramidon-Biosynthese	71
2.4.1	Herstellung TalC/TalE-haltiger Proteinextrakte	71
2.4.2	Reaktion von TalC mit dTDP-L-Rhamnose und TalE-Assay Produkt.....	72
2.4.3	Co-Expression von Zuckerplasmiden und dem Talopeptin-Gencluster.....	74
2.4.4	Einführung des Talopeptin-Genclusters in <i>S. fradiae</i> A0	77
3	DISKUSSION	78
3.1	Untersuchung neuer Epoxyketon-Biosynthesegencluster	79
3.2	Identifizierung des Talopeptin-Biosynthesegenclusters	92

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Charakterisierung von TalE als eine N–P-Bindung bildende Kinase	96
3.4	Untersuchung zur Rolle der Glycosyltransferase TalC in der Phosphoramidon-Biosynthese	101
3.5	Ein Modell für den Biosyntheseweg von Phosphoramidon und Talopeptin.....	104
3.6	Identifizierung des Genclusters für die 6-Desoxy-L-Talose-Biosynthese	106
4	MATERIAL UND METHODEN	111
4.1	Medien, Puffer und Lösungen	111
4.1.1	Medien für Bakterienkulturen	111
4.1.2	Antibiotika	116
4.1.3	Puffer und Lösungen	117
4.2	Plasmide, Bakterienstämme und Primer.....	120
4.2.1	Vektoren, Plasmide und Fosmide	120
4.2.2	Bakterienstämme.....	123
4.2.3	Primer	126
4.3	Kultivierungsbedingungen	128
4.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	128
4.3.2	Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	128
4.4	Molekular- und mikrobiologische Methoden	130
4.4.1	Aufreinigung, Konzentration und Quantifizierung von DNA.....	130
4.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	131
4.4.3	Manipulation von DNA mit Enzymen	131
4.4.4	Plasmid-/Fosmidisolierung aus <i>E. coli</i>	131
4.4.5	Isolierung von gDNA aus <i>Streptomyces</i>	132
4.4.6	Polymerase-Kettenreaktion	133
4.4.7	Übertragung von DNA in <i>E. coli</i>	135
4.4.8	Übertragung von DNA in <i>Streptomyces</i>	136
4.4.9	Aufbau und Screening von Genombibliotheken	138
4.4.10	DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	139
4.4.11	Genomsequenzierung, Assemblierung und Annotation	139

INHALTSVERZEICHNIS

4.5	Biochemische Methoden	140
4.5.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	140
4.5.2	Heterologe Überexpression und Reinigung von rekombinantem Protein aus <i>E. coli</i>	140
4.5.3	Produktion von zellfreien Proteinextrakten.....	141
4.5.4	Enzymassay von TalE und TalC.....	142
4.5.5	Biologische Aktivitätstests	144
4.6	Konstruktion von <i>Streptomyces</i> -Mutantenstämmen	145
4.6.1	RED/ET-vermittelte Rekombination	145
4.6.2	Entfernen der Resistenzkassetten durch die Flippase	145
4.6.3	Erzeugung einzelner Gendeletionen auf epnAB01 und epnAB03.....	146
4.6.4	Einbringen des induzierbaren <i>tcp</i> ₈₃₀ -Promotors in epnAB02.....	146
4.6.5	Geninaktivierung zur Bestimmung der Grenzen des Talopeptin-Genclusters in <i>S. mozunensis</i> MK-23.....	146
4.6.6	Heterologe Expression der putativen „Epoxyketon“-Gencluster und des Talopeptin-Genclusters.....	147
4.6.7	Einführung von Zuckerplasmiden in <i>Streptomyces</i> -Mutantenstämme	148
4.7	Analytische Methoden	148
4.7.1	Extraktion.....	148
4.7.2	HPLC-Analyse	149
4.7.3	LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	149
4.7.4	HR-MS-Analyse.....	150
4.7.5	NMR-Messung.....	151
4.7.6	„MS Molecular Networking“	151
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	152
6	DANKSAGUNG.....	178
7	ANHANG.....	180

PUBLIKATION UND KONFERENZBEITRÄGE

Publikation

Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation zusammengefasst:

Baulig, A., Helmle, I., Bader, M., Wolf, F., Kulik, A., Al-Dilaimi, A., Wibberg, D., Kalinowski, J., Groß, H., Kaysser, L.

"Biosynthetic reconstitution of deoxysugar phosphoramidate metalloprotease inhibitors using an N–P-bond-forming kinase"

Chemical Science (2019), 10(16):4486–4490.

Konferenzbeiträge

"Identification And Heterologous Expression Of The Talopeptin Gene Cluster"

Alexandra Baulig, Marius Bader and Leonard Kaysser

International VAAM Workshop 2017: Biology of natural product producing microorganisms, September 2017, Tübingen, Posterpräsentation

"Investigation Of Novel Epoxyketone Derivatives From "Orphan" Biosynthetic Gene Clusters"

Alexandra Baulig and Leonard Kaysser

International VAAM Workshop 2016: Biology of Bacteria Producing Natural Products, September 2016, Freiburg im Breisgau, Posterpräsentation und 3-minütige mündliche Kommunikation

"Novel Epoxyketone Proteasome Inhibitors From "Orphan" Biosynthetic Gene Cluster"

Alexandra Baulig and Leonard Kaysser

International VAAM Workshop 2015: Biology of natural product producing microorganisms, September 2015, Frankfurt am Main, Posterpräsentation und 3-minütige mündliche Kommunikation

ABBILDUNGEN

Abbildung 1.1 Peptidbiosynthese mit der ribosomalen Maschinerie 4

Abbildung 1.2 Modell der NRPS-Biosynthese 6

Abbildung 1.3 Mechanismus der ATP-abhängigen Carboxylatamid-Ligase 8

Abbildung 1.4 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg 12

Abbildung 1.5 Strukturen von Peptidyl-Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren 14

Abbildung 1.6 Biosynthetische Gencluster von Epoxomicin und Eponemycin 16

Abbildung 1.7 Biosynthese natürlicher Epoxyketone. Voraussichtliche Synthese
von Epoxomicin (Epx) (2) aus NRPS/PKS 17

Abbildung 1.8 Biosynthese-Modell zur Bildung von Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren. .
Biosynthese von Eponemycin (Epn) 18

Abbildung 1.9 Vorgeschlagener Katalysemechanismus von Thermolysin 21

Abbildung 1.10 Offensichtliche Wechselwirkungen zwischen zwei Phosphoramidat-
Inhibitoren (Phosphoramidon und Talopeptin) und Thermolysin 24

Abbildung 1.11 Ausgewählte Naturstoffen mit Phosphoramidat- oder
Phosphonamideinheiten 27

Abbildung 1.12 Vorgeschlagener Mechanismus der MccB-vermittelten N–P-Bildung in der
Biosynthese von Microcin C7 28

Abbildung 2.1 Biosynthese eines Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors durch
S. pyridomyceticus NRRL B-2517 35

Abbildung 2.2 Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-1022...
..... 38

Abbildung 2.3 Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-646. 41

Abbildung 2.4 Dargestellt sind LC-MS-BPCs von Kulturextrakten von *S. albus* J1074-
Wildtyp und clustertragender Mutanten 45

Abbildung 2.5 Darstellung der *S. cerevisiae* 20S-Proteasom-inhibitorische Aktivitäten 50

Abbildung 2.6 Biosynthesegencluster von Talopeptin aus *S. mozunensis* MK-23 53

Abbildung 2.7 LC-MS-Analysen von Phosphoramidon-SD, Kulturextrakten von
Streptomyces sp. MK730-62F2-Wildtyp und clustertragender Mutante und *S. mozunensis*
MK-23 57

Abbildung 2.8 HR-ESI-TOF-MS-Spektrum von PA aus Wirt + *tal*-Cluster 58

Abbildung 2.9 LC-MS-Analysen von Kulturextrakten von *Streptomyces* sp. MK730-
62F2/*tal*MB01 und verschiedener Mutanten 60

Abbildung 2.10 LC-MS-Analysen des *TalE*-Enzymassays 63

ABBILDUNGEN

Abbildung 2.11 LC-MS-Analysen des TalE-Enzymassays mit verschiedenen Inkubationszeiten	64
Abbildung 2.12 HR-ESI-TOF-MS-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp aus TalE-Enzymassay	65
Abbildung 2.13 Struktur des Produkts P-Leu-Trp	66
Abbildung 2.14 MS/MS-Spektrum und vorgeschlagenes Fragmentierungsschema von Produkt P-Leu-Trp	68
Abbildung 2.15 LC-MS-Analysen der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetischen Vorläufern	69
Abbildung 2.16 LC-MS-Analyse von Enzymreaktionen	72
Abbildung 2.17 UV-sichtbare spektroskopische Analyse.....	73
Abbildung 2.18 MS-Analyse des TalC-Assays	74
Abbildung 2.19 LC-MS-Analyse von Phosphoramidon-SD, Kulturextrakten von <i>S. coelicolor</i> M512-Wildtyp, <i>S. coelicolor</i> M512 und dem <i>tal</i> -Gencluster talMB01, sowie <i>S. coelicolor</i> M512/talMB01 mit pRHAM.....	75
Abbildung 3.1 Vorgeschlagener Biosyntheseweg für Phaseolotoxin- und Agrocin 84 N-P-Bindungen.....	100
Abbildung 3.2 Vorgeschlagener Reaktionsweg für die Biosynthese von Phosphoramidon (1) (und Talopeptin)	104
Abbildung 3.3 Organisation des 6-Desoxy-L-Talose-Genclusters <i>talol</i> zu <i>talov</i> aus <i>S. mozunensis</i> MK-23	108
Abbildung 3.4 Biosyntheseweg von dTDP-Rha und dTDP-6dTal.....	109
Abbildung 7.1 SDS-PAGE-Analyse der Expression und Reinigung von TalE	180
Abbildung 7.2 SDS-PAGE-Analyse der Expression von talC	180
Abbildung 7.3 ¹ H-NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ + H ₂ O (400 MHz)	181
Abbildung 7.4 ¹³ C-NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (101 MHz).....	181
Abbildung 7.5 ¹ H- ¹⁵ N-HMBC-NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz)	182
Abbildung 7.6 ¹ H-NMR-Spektrum von P-Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz).....	183
Abbildung 7.7 DEPT135-NMR-Spektrum von P-Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (101 MHz)	183
Abbildung 7.8 ³¹ P-NMR-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (162 MHz) ...	184
Abbildung 7.9 ¹ H- ³¹ P-HMBC-NMR-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆ (400 MHz)	184
Abbildung 7.10 Homologe Phosphoramidat-Biosynthesewege	185
Abbildung 7.11 NRPS/PKS-Hybridgencluster aus verschiedenen Bakterien, die ein EpxF (ACAD)-Homolog enthalten	185

TABELLEN

Tabelle 1.1 Klassifizierung von Peptidasen	9
Tabelle 2.1 Abgeleitete Funktionen der Gene des <i>b-2517</i> -Genclusters.....	36
Tabelle 2.2 Abgeleitete Funktionen der Gene des <i>s-1022</i> -Genclusters.....	39
Tabelle 2.3 Abgeleitete Funktionen der Gene des <i>s-646</i> -Genclusters.....	41
Tabelle 2.4 Abgeleitete Funktionen der Gene des Talopeptin (<i>tal</i>)-Genclusters	54
Tabelle 2.5 Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten von Leu-Trp und P-Leu-Trp in DMSO- <i>d</i> ₆	67
Tabelle 2.6 Übersicht über die transformierten Entrechem-Plasmide und die erwarteten Desoxyzucker	76
Tabelle 3.1 Abgeleitete Funktionen von Genen innerhalb des 6-Desoxy-L-Talose- Genclusters.....	108
Tabelle 4.1 Antibiotikallösungen.....	116
Tabelle 4.2 Lösungen für die DNA-Isolierung	117
Tabelle 4.3 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.....	117
Tabelle 4.4 Puffer und Lösungen zur Herstellung von Protoplasten und zur Transformation von <i>Streptomyces</i>	118
Tabelle 4.5 Puffer und Lösungen für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und für die Coomassie-Färbung	118
Tabelle 4.6 Puffer für die Proteinreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie	120
Tabelle 4.7 Vektoren, Plasmide und Fosmide	120
Tabelle 4.8 Bakterienstämme.....	123
Tabelle 4.9 PCR Primer für die konventionelle PCR, Colony-PCR und für die Verlängerung der Resistenzkassetten.....	126
Tabelle 4.10 Pipettierschema für die Standrad-Taq/Pfu-PCR.....	133
Tabelle 4.11 PCR-Programm der Standrad-Taq/Pfu-PCR	133
Tabelle 4.12 Pipettierschema zur Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette	134
aus pIJ773 und pMS80	134
Tabelle 4.13 PCR-Programm zur Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette	134
von pIJ773 und pMS80	134
Tabelle 4.14 Synthetische Vorläufer-Analoga.....	143

ABKÜRZUNGEN

(v/v)	volume per volume (Volumen pro Volumen)
(w/v)	weight per volume (Masse pro Volumen)
°C	Grad Celsius
M	Mikro
µm	Mikrometer
AA	Aminosäuren
<i>aac(3)/IV</i>	Apramycin-Resistenzgen
ACAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
AMP	Adenosinmonophosphat
Apra	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AT-Domäne	Acyltransferase-Domäne
aTc	Anhydrotetrazyklin
ATP	Adenosintriphosphat
BGC	Biosynthesegencluster
<i>bla</i>	Ampicillin/Carbenicillin-Resistenzgen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BPC	Basispeak-Chromatogramm
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa (ungefähr)
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat

ABKÜRZUNGEN

Carb	Carbenicillin
C-Domäne	Kondensations-Domäne
Cm	Chloramphenicol
cMT	C-Methyltransferase-Domäne
COSY	correlation spectroscopy (Korrelationsspektroskopie)
Cpz	Caprazamycin
CuCl ₂	Kupfer(II)-chlorid
CuSO ₄	Kupfersulfat
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
Da	Dalton
DEPT135	distortionless enhancement by polarization transfer (Verzerrungsfreie Verbesserung durch Polarisationstransfer)
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
gDNA	genomische DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
Epn	Eponemycin
Epx	Epoxomicin
ESI	Elektrospray-Ionisation
etc.	et cetera
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FeSO ₄	Eisen(II)-sulfat

ABKÜRZUNGEN

FRT	Flippase (FLP) recognition target
g	Gramm
GC	Guanin/Cytosin
h	Stunde
HCl	hydrochloric acid (Salzsäure)
His8	octa Histidin-Tag
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation (Heteronukleare Mehrfachbindungskorrelation)
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSQC	heteronuclear single quantum correlation (Heteronukleare Einzelquantenkorrelation)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	<i>J</i> -coupling; indirekte Dipol-Dipol Kopplung zwischen zwei nukleären Spins
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
K(CH ₃ COO)	Kaliumacetat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KS	Ketosynthase
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LC	liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
L-Leu	L-Leucin

ABKÜRZUNGEN

m	Milli
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MFS	Major-Facilitator-Superfamilie
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MnSO ₄	Mangan(II)-sulfat
MS	Mannitol-Sojamehl
MS	Massenspektrometrie
n	nano
Na ₂ B ₄ O ₆	Natriumborat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDP	Nukleosiddiphosphat
<i>neo</i>	Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniumheptamolybdat
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase

ABKÜRZUNGEN

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
<i>oriT</i>	origin of transfer
orphan	verwaist
PA	Phosphoramidon
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	potentia Hydrogenii
PKS	Polyketidsynthase
P-Leu-Trp	Phospho-L-Leucin-L-Trptophan
PPDK	Pyruvat, Phosphatdikinase
ppm	parts per million (Anteile pro Million)
R	resistent
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
t _R	Retentionszeit
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
s	Sekunde
S.	<i>Streptomyces</i>
SD	Standard
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOB	Super Optimal Broth

ABKÜRZUNGEN

sp.	Spezies
<i>tal</i>	Talopeptin
TB	Terrific Broth-Medium
<i>tcp</i>	Tetrazyklin-kontrollierbarer Promotor
T-Domäne	Thiolierungs-Domäne
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl) methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tet	Tetrazyklin
Thio	Thiostrepton
TIC	total ion current-chromatogram (Total Ionenchromatogramm)
TM	TransforMax
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl) propan-1,3-diol
Trp	Tryptophan
ts	Temperatursensitiv
TSB	Tryptic Soy Broth
TOF	time-of-flight (Flugzeit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
×g	mittlere Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnSO ₄	Zinksulfat
Δ	Deletion
δ	Chemische Verschiebung
©	Copyright

ZUSAMMENFASSUNG

Die Suche nach neuartigen und wirksamen Antibiotika, Antiinfektiva und Zytostatika nimmt jüngst steigender Anzahl bakterieller Krankheitserreger, die Resistenzen gegen vorhandene Antibiotika entwickeln, eine immer größere Bedeutung an. Actinobakterien produzieren eine Vielzahl an Naturstoffen, aus denen eine Reihe hochwirksamer Verbindungen isoliert und anschließend in klinische Anwendungen gebracht werden konnten, darunter unter anderem Proteasom-Inhibitoren und Metalloprotease-Hemmer. Die Identifizierung und Charakterisierung der Biosynthesegencluster dieser Verbindungen erleichtert die Suche nach neuen Naturstoffen dieser Substanzklassen bzw. nach möglichen Derivaten, die eine verbesserte Wirksamkeit besitzen. Die Untersuchung einzelner Reaktionsschritte kann dabei wichtige Einblicke bezüglich neuer biosynthetischer Mechanismen geben.

Vor Kurzem wurden die ersten biosynthetischen Gencluster von zwei Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren, Epoxomicin und Eponemycin aus den filamentösen Actinobakterienstämmen *Goodfellowiella coeruleoviolacea* ATCC 53904 (Hanada *et al.*, 1992) und *Streptomyces hygrosopicus* ATCC 53709 (Sugawara *et al.*, 1990) identifiziert und charakterisiert (Schorn *et al.*, 2014). Beide Gencluster kodieren für eine lineare nicht-ribosomale Peptidsynthetase/Polyketidsynthetase (NRPS/PKS)-Assemblierungsmaschine, die die Konstruktion eines acylierten Peptids und die Verlängerung eines terminalen Leucinrests katalysiert. Die Bildung des einzigartigen α' , β' -Epoxyketons, welches die Bindung an die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms ermöglicht (Groll *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2016) wird durch einen beispiellosen Mechanismus konstruiert, an dem ein Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD)-ähnliches Enzym beteiligt ist (Zettler *et al.*, 2016).

Der erste Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die Identifizierung, Klonierung und Sequenzierung von „orphan“ Biosynthesegenclustern (BGCs) in anderen Bakterien, die homolog zu den Epoxyketon-Biosynthesegenclustern sind. Durch eine Proteinhomologiesuche unter Verwendung der ACAD (EpnF) wurden vier vielversprechende homologe „orphan“ Biosynthesegencluster in den *Streptomyces*-Stämmen *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces achromogenes* NRRL B-2120, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 lokalisiert und zur weiteren Erforschung ausgewählt. Die anfänglich vorgeschlagenen

ZUSAMMENFASSUNG

homologen Biosynthesewege versprochen die Bildung neuer Epoxyketonmoleküle. Die Generierung und das anschließende positive Screening konnte von drei Fosmid-Bibliotheken bestätigt werden. Die Sequenzanalysen ergaben, dass vermutlich 11 mögliche Gene auf dem *b-2517*-Cluster, 5 mögliche Gene auf dem *s-1022*-Cluster und 13 mögliche Gene auf dem *s-646*-Cluster am Transport, der Regulation und an der Biosynthese neuer Sekundärmetaboliten von Proteasom-Inhibitoren beteiligt sein könnten. Die heterologe Expression der drei Gencluster, auf den Fosmiden epnAB01, epnAB02 und epnAB03, in den etablierten Wirt *Streptomyces albus* J1074 führte zur Produktion einer Reihe neuer und identischer Massenpeaks aller drei Mutanten. Ein direkter Zusammenhang zwischen den hergestellten Massen und den drei Genclustern konnte jedoch nicht bestätigt werden und versprach zu diesem Zeitpunkt kein entsprechendes Epoxyketon-Derivate. Daher bedarfte es weiterer Untersuchungen, die zur Identifizierung von neuen Epoxyketon-Proteasome-Inhibitoren beitragen. Mittels „MS Molecular Networking“ wurde versucht, neue Eponemycin-Derivate, die durch heterologe Expression von „orphan“ Biosynthesewegen hergestellt werden, zu identifizieren. Die molekularen Netzwerke, die wir aus den kombinierten Daten generiert haben, repräsentierten keine strukturell verwandten Moleküle zum Eponemycin. Die klonierten Gencluster werden unter unseren Kulturbedingungen wahrscheinlich nicht oder nur in geringen Mengen transkribiert oder sind stillgelegt.

Der nächste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Strategien zur Aktivierung der drei mutmaßlichen stillen Gencluster. Dazu wurden eine Reihe von Knockout-Mutanten der putativen regulatorischen Gene im *b-2517*-Gencluster und *s-646*-Gencluster konstruiert. Erste analytische Daten zeigten, dass durch die Inaktivierung der Gene *b-2517A* und *b-2517B*, sowie der Gene *s-646A*, *s-646B* und *s-646M* keine Produktion eines neuen möglichen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors beobachtet werden konnte. Ebenfalls konnte durch das Einbringen eines induzierbaren *tcp₈₃₀*-Promotors vor das *s-1022E*-Gen im *s-1022*-Gencluster, kein verändertes Stoffwechselprofil im Vergleich zum unmodifizierten *s-1022*-Cluster nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen auf eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Expression von „orphan“ Biosynthesegenclustern in den Wirtstamm *S. albus* J1074 hindeuten. Der Wirt produziert eine Vielzahl von neuen Sekundärmetaboliten, mit dem Resultat, dass diese zurzeit nicht weiter charakterisiert werden können.

Bekanntlich ist der Epoxyketon-Proteasome-Inhibitor Epoxomicin gegen das *Saccharomyces cerevisiae* 20S-Proteasom besonders effektiv (Pereira *et al.*, 2012). Im

ZUSAMMENFASSUNG

letzten Teil dieser Arbeit sollten proteasomhemmende Eigenschaften der identifizierten homologen Biosynthesewege gegen das 20S-Proteasom getestet werden. Dazu wurden etablierte Proteasom-Inhibitor-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse lieferten erste Aufschlüsse über eine inhibitorische Aktivität von Kulturextrakten aller modifizierten Gencluster in *S. albus* J1074, sowie der jeweiligen Wildtyp-Stämmen verglichen mit dem Wirtsstamm *S. albus* J1074. Es konnten unterschiedliche Hemmungen der Aktivitäten des Proteasoms innerhalb der Wildtyp-Produzenten (*S. pyridomyeticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-646 und *Streptomyces* sp. NRRL S-1022), sowie minimale Unterschiede der Aktivität von Extrakten einzelner heterologer Mutanten (*S. albus* J1074/epnAB06(1,2), *S. albus* J1074/epnAB10(1,2), *S. albus* J1074/epnAB11(1,2), *S. albus* J1074/epnAB12(1,2) und *S. albus* J1074/epnAB13(1,2)) beobachtet werden. Eine zukünftige Kombination aus wiederholenden Bioassays und ¹H-NMR gesteuerten Fraktionen könnte zur Isolierung und Strukturaufklärung von möglichen aktiven neuen Verbindungen führen, die das 20S-Proteasom hemmen.

Talopeptin (Muraio *et al.*, 1980) und sein Stereoisomer Phosphoramidon (Umezawa *et al.*, 1972) wurden aus *Streptomyces*-Kulturen isoliert und gehören zu der Gruppe wirksamer Inhibitoren von Metalloendopeptidasen, einschließlich Thermolysin, *Pseudomonas*-Elastase LasB, neutraler Endopeptidase und Endothelin-konvertierendem Enzym (Suda *et al.*, 1973). Ihre Hemmaktivität wurde den metallchelatierenden Eigenschaften einer Phosphoramidateinheit zugeschrieben, die einen Desoxyzucker eindeutig mit dem N-Terminus eines L-Leucin-L-Trptophan-Dipeptids verknüpft (Weaver *et al.*, 1977). Diese besonderen Eigenschaften machen sie zu nützlichen Werkzeugen mit klinischer Verwendung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die bis dato noch unbekannte Biosynthese der beiden Metalloprotease-Inhibitoren Phosphoramidon und Talopeptin untersucht. Dazu wurde das Genom des Produzenten *Streptomyces mozunensis* MK-23 sequenziert und das erste Biosynthesegencluster von Talopeptin unter Entwicklung einer spezifischen Sonde (Cpz31) für das „Genome-Mining“ identifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass 5 mögliche Gene (*talA-talE*) auf dem Cluster an der Produktion, dem Transport, der Regulation und an der Biosynthese beteiligt sind. Die heterologe Expression des Clusters, auf dem Fosmid talMB01 in *Streptomyces* sp. MK730-62F2, welcher den nah verwandten Desoxyzucker dTDP-L-Rhamnose produziert, ergab die Produktion des Metalloprotease-Inhibitors Phosphoramidon. Durch die Konstruktion von 5 Deletionsmutanten konnten zum einen die Grenzen des Talopeptin-Genclusters

ZUSAMMENFASSUNG

bestimmt werden und zum anderen wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Einflusses einzelner Gene auf die Biosynthese gegeben werden. Die Untersuchung der Deletionsmutanten ΔtaC , ΔtaD und ΔtaE zeigte, dass diese für die Produktion von Phosphoramidon bzw. Talopeptin essentiell sind. Weiterhin konnte durch chemische Komplementierung von Kulturen der ΔtaD -Mutante mit einem synthetischen L-Leu-L-Trp-Dipeptid die Funktion des ATP-grasp-Enzyms TalD, als Dipeptidsynthetase, bei der weitgehenden Wiederherstellung des Phosphoramidons aufgezeigt werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde durch Proteinisolierung und anschließende *in vitro*-Untersuchung der Einfluss der Phosphoryltransferase TalE auf die Biosynthese des Metalloprotease-Inhibitors untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass TalE das erste Enzym in der Naturstoffbiosynthese darstellt, das durch einfache Phosphorylierung eines Amins ein Phosphoramidatmolekül erzeugt. Mittels 1D- und 2D-NMR-Analytik konnte zudem bestätigt werden, dass das dipeptidische L-Leu-L-Trp-Rückgrat an seinem N-terminalen Ende phosphoryliert wurde. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetisch hergestellten Strukturanaloga legten nahe, dass das Vorläufer-Analog 1 aus den Aminosäuren Met-Trp von TalE mit 5-fach höherer Umwandlungsrate als das Vorläufer-Analog 3 (Ala-Trp) phosphoryliert wurde. Auch das Dipeptid 2 aus den Aminosäuren Leu-Leu wies eine bessere Umsatzrate durch TalE auf. Dagegen wurde ein niedriger Umsatz bei den Strukturanaloga 4 (Thr-Trp) und 5 (Leu-Tyr) beobachtet. Das Dipeptid-Rückgrat scheint für die Substraterkennung durch TalE wichtig zu sein. Die Kinase ist spezifisch für die Herstellung eines phosphorylierten Produkts, wie Phospho-L-Leucin-L-Trptophan (P-Leu-Trp) in der Phosphoramidon- und Talopeptin-Biosynthese.

Der nächste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der Desoxyzuckertransferase TalC in der Phosphoramidon-Biosynthese. Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TalC als eine Glycosyltransferase fungiert, welche die Desoxyzuckereinheit durch Phosphoester-Verbindung installiert und P-Leu-Trp als echtes Zwischenprodukt in der Biosynthese von Phosphoramidon etabliert ist. Der enzymatische Einbau einer L-Rhamnoseeinheit zum Phosphoramidat von P-Leu-Trp stellt eine bis dato unbekannte Reaktion in der Naturstoffbiochemie dar und fügt TalE als einzigartigen Biokatalysator zur Familie der 6-Desoxyzuckertransferasen hinzu.

ZUSAMMENFASSUNG

Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Herstellung von Phosphoramidon und möglichen Derivaten, sowie der gleichzeitigen Untersuchung der Substratspezifität der Glycosyltransferase TalC in verschiedenen heterologen Wirten. Auf dem Fosmid talMB01, welches das Talopeptin-Gencluster trägt, konnten anfänglich keine Gene identifiziert werden, die für die Biosynthese der benötigten 6-Desoxyzuckereinheit zuständig sein könnten. Durch die Co-Expression von talMB01 mit dem Plasmid pRHAM, welches die entsprechenden Gene zur Herstellung der dTDP-L-Rhamnose trägt, konnte die Gewinnung von Phosphoramidon im heterologen Stamm *Streptomyces coelicolor* M512 ermöglicht werden. Es konnten hingegen keine Derivate des Phosphoramidons bzw. Talopeptins durch die Co-Expression weiterer Zuckerplasmide, die die Gene für die Biosynthese diverser Desoxyzucker beinhalten, im heterologen Wirt *S. coelicolor* M512 bestätigt werden. Ebenfalls zeigte die Analyse zur Einführung des Talopeptin-Genclusters in *Streptomyces fradiae* A0, welcher die Desoxyzucker L-Rhodinose und D-Olivose produziert, keine neue Strukturderivate des Phosphoramidons bzw. Talopeptins. Dies könnte möglicherweise an einer hohen Substratspezifität der Glycosyltransferase (TalC) für die dTDP-L-Rhamnose bzw. 6-Desoxy-L-Talose liegen.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichten ein erstes Modell zur Biosynthese der beiden Metalloprotease-Inhibitoren Phosphoramidon und Talopeptin aufzustellen. Die Suche in öffentlichen Genom-Datenbanken ergab eine Reihe homologer „orphan“ Biosynthesewege, die ein *talCDE*-ähnliches putatives Operon enthielten. Angesichts der Möglichkeit, dass die kodierten Enzyme eine andere Substrattoleranz als TalE, TalD und TalC aufweisen, könnten die identifizierten Gencluster die Synthese neuer Metalloprotease-Inhibitoren steuern.

Zum Ende konnten durch BLAST-Analysen im Genom des Talopeptin-Produzenten *S. mozunensis* MK-23, die fehlenden Gene (*talO*–*talO*V) für die Biosynthese der 6-Desoxy-L-Talose auf einem gesonderten Gencluster gefunden werden. Die zukünftige Vereinigung und Expression des Clusters mit dem Talopeptin-Gencluster könnten zur heterologen Produktion des Talopeptins in *S. coelicolor* M512 führen.

1 EINLEITUNG

1.1 DIE SUCHE NACH NEUEN NATURSTOFFEN AUS ACTINOBAKTERIEN

1.1.1 Allgemeine Information

Naturstoffe sind eine wichtige Quelle für die Identifizierung neuer bioaktiver Verbindungen. In den letzten Jahrzehnten stammten mehr als 60% der niedermolekularen Chemikalien, die als neue Arzneimittel eingeführt wurden, aus natürlichen Stoffen oder deren Derivaten (Newman, 2008). Naturstoffe haben vielfältigere und komplexere chemische Strukturen als ihre synthetischen Gegenstücke. Dennoch haben in den 1980er Jahren viele Pharmaunternehmen ihre Entdeckung von Naturstoffarzneimitteln aufgrund staatlicher Vorschriften für die Zulassung von Arzneimitteln, Marktkräfte und wissenschaftlicher Engpässe, einschließlich beispielsweise der hohen Wiederentdeckungsrate bereits bekannter Naturstoffe, reduziert (Wright, 2014). In den 1990er Jahren verlagerte sich der Schwerpunkt der Pharmaindustrie auf die Entwicklung neuartiger Technologien, wie der kombinatorische Chemie, dem Hochdurchsatz-Screening von Bibliotheken synthetischer Chemikalien und dem computergestützten Medikamentendesign (Christoffersen, 2006). Die hohen Erwartungen, neue und wirksame Wirkstoffe zur Bekämpfung von Krankheiten zu finden, konnten jedoch nicht erfüllt werden (von Bubnoff, 2006). Mit dem gleichzeitigen Aufkommen von multiresistenten Krankheitserregern in den letzten Jahren besteht nun ein dringender Bedarf an neuen Antibiotika, Antiinfektiva und Zytostatika (Arias and Murray, 2009). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die antimikrobielle Resistenz heutzutage als eines der dringlichsten Probleme der öffentlichen Gesundheit und Gefährdung der weltweiten Behandlung von Infektionskrankheiten anerkannt (Shankar, 2014). Um eine Kreuzresistenz mit den auf dem Markt befindlichen antimikrobiellen Wirkstoffen zu vermeiden, wird insbesondere auf Verbindungen hingewiesen, die aus neuartigen Strukturgerüsten bestehen und gegen neue „Targets“ wirken sollen (Clardy *et al.*, 2006; Falconer and Brown, 2009; Fischbach and Walsh, 2009; Ziemert *et al.*, 2016). Wesentliche Fortschritte in den Bereichen DNA-Sequenzierung, Bioinformatik, Gentechnik, analytische Chemie, synthetischer Biologie und die Zugänglichkeit bisher unerforschter mikrobieller Lebensräume haben das Interesse an der Erforschung neuer Arzneimittel auf

EINLEITUNG

Naturstoffbasis wiederbelebt (Harvey, 2007; Lam, 2007; Newman, 2008; Li and Vederas, 2009; Wright, 2014). Dies ist wichtig, denn Naturstoffe sind nach wie vor essentiell für die Entdeckung neuer struktureller Diversität und gelten als bevorzugte Gerüste für die Entwicklung neuer Medikamente (Kumar and Waldmann, 2009; Wohlleben *et al.*, 2016).

Historisch gesehen sind Bakterien eine hochproduktive Quelle für klinisch wichtige Naturstoffe. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche natürlichen Verbindungen aus denen in Böden lebenden filamentösen grampositiven Actinobakterien isoliert, darunter antimikrobielle, antibiotische, chemotherapeutische und entzündungshemmende Wirkstoffe (Pelaez, 2006; Baltz, 2007; Procopio *et al.*, 2012; Demain, 2014). Nur ein kleiner Teil davon wird jedoch klinisch eingesetzt.

In den meisten dieser Naturstoff-produzierenden Organismen sind die Gene, die für Regulation, Biosynthese, Export und Selbstresistenz erforderlich sind, im Bakteriengenom in kompakten Biosynthesegenclustern (BGCs) kolokalisiert (Smanski *et al.*, 2016). Tausende von bakteriellen Genomsequenzen sind heutzutage öffentlich verfügbar und enthalten eine noch größere Anzahl und Vielfalt von Sekundärmetaboliten-Genclustern, die auf die Verknüpfung mit ihren kodierten Naturstoffen warten (Ziemert *et al.*, 2016). Mit der Entwicklung von Sequenzierungsmethoden und der Fülle verfügbarer DNA-Daten wurde eine Vielzahl von „Genome-Mining“-Methoden entwickelt, um die Entdeckung und Charakterisierung dieser Verbindungen zu steuern.

Eine der funktional bedeutendsten Hauptklassen der Sekundärmetaboliten aus Actinobakterien sind peptidische Naturstoffe, die entweder aus Ribosomen oder die überwiegende Mehrheit aus nicht-ribosomalen Peptidsynthesystemen, sowie durch diskrete ATP-abhängige Amidligaseenzyme hergestellt werden können. Amidbindungshaltige Biomoleküle gehören zu den faszinierendsten Naturstoffen, die in der Medizin, Landwirtschaft und Biotechnologie eine beispiellose Nützlichkeit haben (Medema *et al.*, 2014; Goswami and Van Lanen, 2015).

1.1.2 Die Amidbindung in der Natur

1.1.2.1 Bildung ribosomaler Peptidbindungen

Ribosomen sind makromolekulare Komplexe in Zellen, die als Herzstück der Translationsmaschinerie fungieren und die Umwandlung von in mRNA kodierter Information in Proteine ermöglichen. Die Ribosomen sind in allen Organismen (Eukaryoten: 80S, Prokaryoten: 70S) aus zwei unterschiedlich großen und funktionell verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Fromont-Racine *et al.*, 2003; Kressler *et al.*, 2010). Diese bestehen aus einer größeren (Eukaryoten: 60S, Prokaryoten: 50S) und einer kleineren Untereinheit (Eukaryoten: 40S, Prokaryoten 30S) (Nierhaus, 1980).

Die Ribosombiosynthese ist eine der energetisch anspruchsvollsten zellulären Aktivitäten und ein Prozess von außerordentlicher Komplexität (Henras *et al.*, 2008). Die Polypeptide, die von Ribosomen synthetisiert werden, werden aus L-Aminosäuren (AAs) zusammengesetzt. Die Spezifität für die 21 natürlichen L-Aminosäuren wird weitgehend durch ATP-abhängige Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bestimmt, die tRNAs und die passenden Aminosäuren kombinieren, um die Aminoacyl-tRNA zu generieren (Rodnina, 2013; Rodnina, 2016). Für den Translationsprozess sammelt sich das Ribosom um die Ziel-mRNA und das erste AA-tRNA-Shuttle wird am Startcodon angebracht. Dann wird das Peptid durch den AA-Transfer zwischen zwei beladenen tRNAs erzeugt (Abbildung 1.1). Das Ribosom enthält drei RNA-Bindungsstellen, die als A, P und E bezeichnet werden. Die A-Stelle bindet an eine Aminoacyl-tRNA, die P-Stelle bindet die Peptidyl-tRNA und die E-Stelle ist durch die entstehende freie tRNA belegt, bevor sie das Ribosom verlässt. Ein wichtiger Schritt ist die Bindung der beiden Substrate, Peptidyl-tRNA und AA-tRNA, an die aktiven Stellen des Ribosoms. Dabei erfolgt die Peptidyltransferase-Reaktion durch nukleophilen Angriff der Aminogruppe der Aminosäure der AA-tRNA auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-tRNA. Die Terminierung des Polypeptids erfolgt, wenn die A-Stelle des Ribosoms einem Stopcodon zugewandt ist, welches die Bindung eines Terminations- oder Release-Faktors (RFs) induziert und den gesamten Ribosom/mRNA-Komplex trennt.

EINLEITUNG

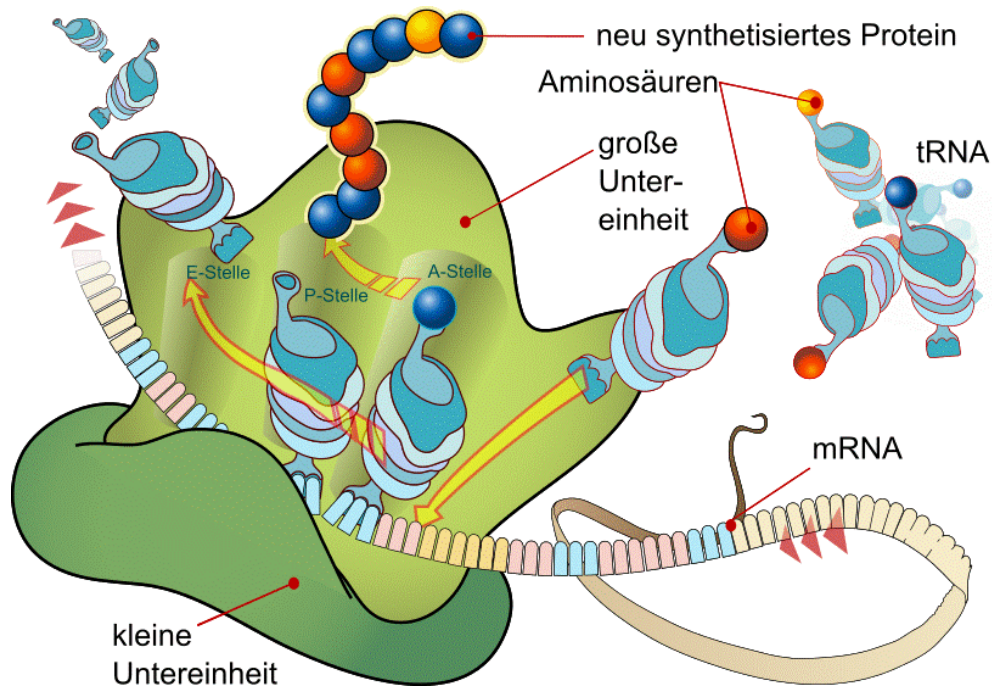


Abbildung 1.1 Peptidbiosynthese mit der ribosomalen Maschinerie abgerufen von (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ribosom_mRNA_translation_de.svg). Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text, gedruckt mit Genehmigung der Public domain, Wikicommonsuser: LadyOfhats, Mariana Ruiz Villarreal.

Zusätzlich zu Proteinen werden auch kleine Moleküle, d. h. ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs), von Vorläufer-Peptiden mit einer Länge von etwa 100 Aminosäuren durch die ribosomale Bakterienmaschinerie hergestellt (Dunbar and Mitchell, 2013). Diese kleinen Peptide haben viele verschiedene biologische Rollen, z.B. beim Quorum Sensing, bei der Einführung genetischer Kompetenzen und bei enzymatischen Reaktionen (Freeman *et al.*, 2012), aber in vielen Fällen ist ihre Funktion unbekannt. RiPPs können posttranslationale Modifikationen enthalten, z.B. Makrocyclisierung, Dehydratisierung von Serin und Threonin etc. (Pitzer and Steiner, 2016). Ein großer Vorteil der ribosomalen Peptidsynthese (RPS) und der RiPPs ist, dass ihre Sequenzen durch einfache Manipulation einiger Codons modifiziert werden können (Bierbaum and Sahl, 2009).

1.1.2.2 Bildung nicht-ribosomaler Peptidbindungen

Neben der ribosomalen Biosynthese von Peptiden und Proteinen nutzt die Natur große multifunktionale Enzyme, die sogenannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), zur Bildung verschiedener Strukturen (Sussmuth and Mainz, 2017). Im

EINLEITUNG

Vergleich zu ribosomal abgeleiteten Peptiden (RPs), die aus den 21 proteinogenen Aminosäuren bestehen, umfassen nicht-ribosomale Peptide auch nicht-proteinogene Aminosäuren, einschließlich D- und β -Aminosäuren, sowie glykosylierte, phosphorylierte und methylierte Reste oder von Cystein, Serin und Threonin abgeleitete Heterozyklen, von Isopren abgeleitete Gruppen und dehydrierte Reste (Caboche *et al.*, 2008; Marahiel, 2009; Winn *et al.*, 2016). Aufgrund dieser Fülle unterschiedlicher Bausteine weisen nicht-ribosomale Peptide eine große strukturelle Vielfalt auf (Finking and Marahiel, 2004), zu denen wirksame Antibiotika wie Vancomycin, Penicillin, Cephalosporin und Cyclosporin gehören (Aharonowitz *et al.*, 1992; van Wageningen *et al.*, 1998; Fischbach and Walsh, 2006; Marahiel, 2009). NRPS bestehen aus riesigen, modularen, multifunktionalen Enzymen, die häufig in einer aufeinanderfolgenden Reihenfolge von Genen im Biosynthesegencluster kodiert werden. Jedes Modul eines solchen Enzyms ist für den Einbau einer bestimmten Aminosäure in die endgültige Polypeptidkette verantwortlich. Die Module bestehen aus verschiedenen Domänen, die jeweils für einen bestimmten Schritt des Einbaus von Aminosäuren verantwortlich sind. Das erste Modul heißt Initiationsmodul, gefolgt von einer unterschiedlichen Anzahl von Elongationsmodulen, und endet schließlich mit einem Terminationsmodul (Winn *et al.*, 2016). Das Initiationsmodul besteht aus einer Adenylierung (A)- und Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)-Domäne, auch als Thiolierungs (T)-Domäne bekannt, während ein Elongationsmodul eine zusätzliche Kondensations (C)-Domäne vor der A-Domäne trägt. Das Terminationsmodul enthält dann neben der C-, A- und T-Domäne eine Thioesterase (TE)-Domäne, die die Produktfreigabe katalysiert (Marahiel, 2009). T-Domänen werden durch Anlagerung einer 4'-Phosphopantethein (PPT)-Einheit aktiv. Diese Reaktion wird von einer 4'-Phosphopantetheinyltransferase (PPTase) durchgeführt, die normalerweise an anderer Stelle im Genom kodiert wird. Die Substratauswahl in der Peptidsynthese erfolgt typischerweise über die A-Domäne, die dann die verwandte Aminosäure unter Verwendung von ATP aktiviert. Das erzeugte Aminoacyl-AMP kann dann mit der Thiolgruppe des flexiblen 4'-Phosphopantetheinyl-Arms der T-Domäne reagieren (Abbildung 1.2). Die C-Domäne katalysiert die Bildung einer Peptidbindung zwischen den zwei benachbarten T-Domänen eines Initiations- bzw. Elongations- und eines weiteren Elongationsmoduls. In einem letzten Schritt setzt eine TE-Domäne das Peptid durch Hydrolyse oder Cyclisierung aus dem NRPS frei (Finking and Marahiel, 2004). Eine beliebige Anzahl von Modulen aus C-A-T-Domänen führt zur Verlängerung des Polypeptids, bis eine TE-Domäne die bezeichnete Struktur vervollständigt (Gao *et al.*,

EINLEITUNG

2012). Je nach Art der TE wird das endgültige Peptid entweder als lineares oder cyclisches Peptidprodukt freigesetzt (Marahiel, 2009). NRPSs können zusätzlich weitere Domänen zur Strukturvariation enthalten, wie Epimerisierungs (E)-, Methylierungs (MT)- und Cyclisierungs (Cy)-Domänen (Winn *et al.*, 2016). Nach Stachelhaus *et al.* (Stachelhaus *et al.*, 1999) lässt sich die hohe Spezifität der eingebauten Aminosäuren auf ein hochkonserviertes Kernmotiv der A-Domänen zurückführen, die an der ATP-Bindung an die spezifische Aminosäure beteiligt sind. Da jede Domäne nur eine oder eine geringe Anzahl ähnlicher Aminosäuren aktiviert, ist die Strukturvariation welche durch die NRPS erzeugt wird begrenzt.

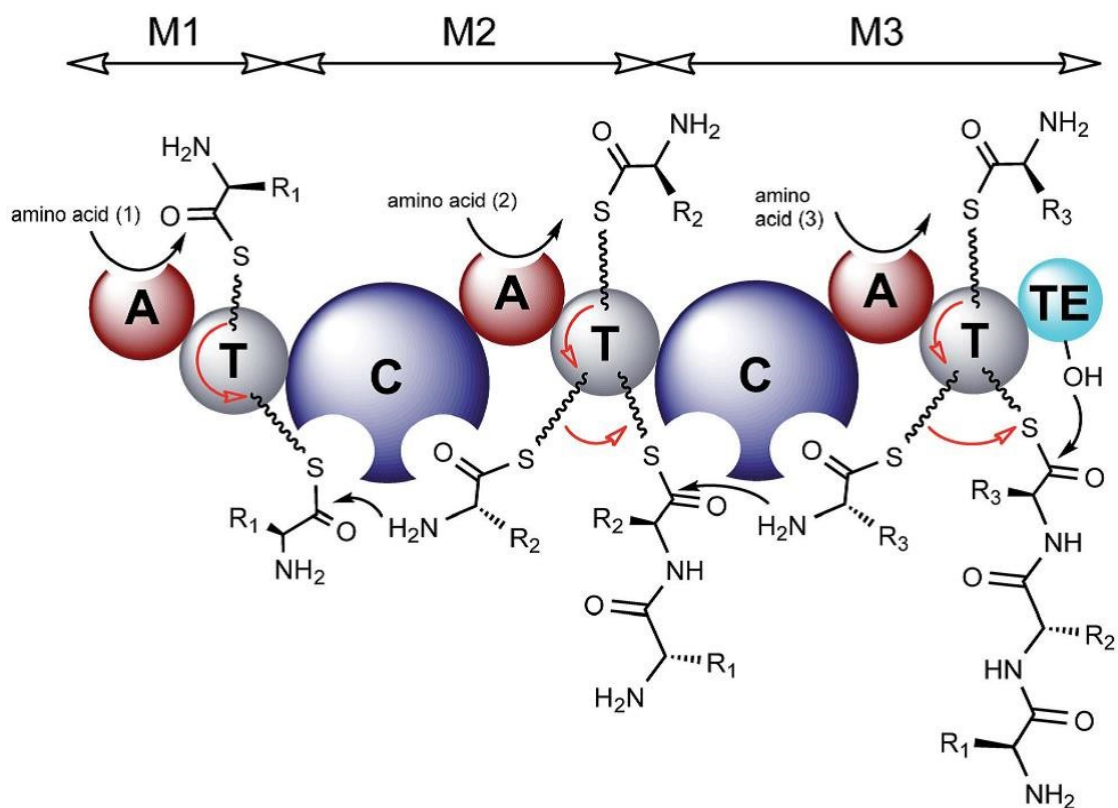


Abbildung 1.2 Modell der NRPS-Biosynthese übernommen aus Winn *et al.* (Winn *et al.*, 2016), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. A-Domänen (rot; A) aktivieren Aminosäuren durch ATP-Verbrauch und erzeugen so Aminoacyl-AMP-Intermediate, die dann an die Thiolgruppe eines 4'-Phosphopantethein-Arms einer PCP-Domäne (grau; T) angefügt werden. Die C-Domänen (blau; C) katalysieren die Bildung von Peptidbindungen zwischen PCP-gebundenen Aminoacylthioestern zweier benachbarter PCP-Domänen. Das letzte Modul enthält eine zusätzliche TE-Domäne (Cyan; TE), die die Hydrolyse oder Cyclisierung katalysiert, um das Peptid aus dem NRPS freizusetzen.

1.1.2.3 ATP-abhängige Carboxylat-Amin/Ammoniak-Ligasen

ATP-abhängige Carboxylat-Amin/Ammoniak-Ligasen gehören zur Gruppe der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen bildenden Ligasen (EC 6.3.-.-) (Pitzer and Steiner, 2016). Mitglieder dieser Enzyme, katalysieren eine Reaktion, die eine ATP-abhängige Ligation eines Carboxylgruppenkohlenstoffs eines Substrats mit einem Amino- oder Iminogruppestickstoff des zweiten Substrats beinhaltet und jeweils die Bildung von Acylphosphat-Zwischenprodukten einschließt (Gushima *et al.*, 1983; Ogita and Knowles, 1988; Fan *et al.*, 1994). Während die meisten Mitglieder der Superfamilie diesem Mechanismus folgen, haben Studien gezeigt, dass zwei Enzyme (Pyruvat, Phosphatdikinase (PPDK) und Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-kinase (IP56K)) nur den Phosphoryltransferschritt katalysieren und somit Kinasen anstelle von Ligasen sind (Fawaz *et al.*, 2011). Viele Mitglieder der ATP-abhängigen Carboxylat-Amin/Ammoniak-Ligase-Familie enthalten eine ATP-grasp c-Domäne (Galperin and Koonin, 1997), die durch zwei α/β -Subdomänen und ein ATP-Molekül charakterisiert ist. Die Tertiärstruktur besteht aus drei konservierten Domänen; A-, B- und C-Domäne (Fan *et al.*, 1995; Thoden *et al.*, 2000). ATP bindet zwischen der B- und C-Domäne und koordiniert mit Mg^{2+} oder Ca^{2+} -Ionen. Die Domänen A und C sind an der Substratbindung und -orientierung eines Nukleophils und des Acylphosphat-Zwischenprodukts beteiligt. Wichtige Beispiele für ATP-grasp-Enzyme sind einzelständige L-Aminosäureligasen, die die Bildung von Dipeptiden aus zwei Aminosäuren katalysieren. Dipeptide können viele vorteilhafte Wirkungen als Pharmazeutika und in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie haben (Mills *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012). Die erweiterte ATP-grasp-Familie umfasst derzeit 15 Enzymgruppen, die die ATP-abhängige Reaktion einer Carboxylgruppe aus einem organischen Molekül mit einem Nukleophil z.B. einer Aminogruppe über die Bildung eines Acylphosphat-Zwischenprodukts katalysieren (Abbildung 1.3) (Galperin and Koonin, 1997; Fawaz *et al.*, 2011). Die Liste der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen zeigt ihre Flexibilität sowohl in Bezug auf Carboxyl- als auch in Bezug auf Amino/Thiolgruppen enthaltende Substrate (Galperin and Koonin, 1997).

EINLEITUNG

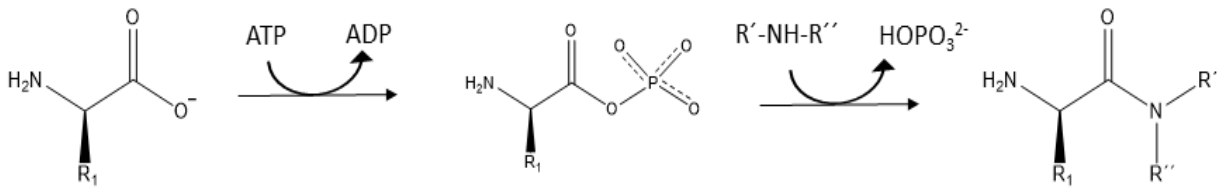


Abbildung 1.3 Mechanismus der ATP-abhängigen Carboxylatamid-Ligase adaptiert von (Galperin and Koonin, 1997). Gedruckt mit Genehmigung von © 2008 John Wiley and Sons. 1. Aktivierung der Carboxylgruppe aus einem organischen Molekül mit einer Phosphatgruppe aus ATP. Der nächste Schritt katalysiert den nukleophilen Angriff der Aminogruppe eines organischen Moleküls auf den Carboxylkohlenstoff. R₁ = Wasserstoffatom, Hydroxylgruppe, organisches Molekül oder Protein; R' = Wasserstoffatom, Teil eines Biotinrings; R'' = Aminogruppe, die ein Molekül oder einen Teil eines Biotinrings enthält.

Unter anderem sind ATP-grasp-Enzyme an vielen essentiellen Reaktionen in den Zellen beteiligt, z.B. an der Biosynthese eines Vorläufer-Peptid D-Alanin-D-Alanin der bakteriellen Murein-Zellschicht, der Succinyl-CoA-Einheit am Citratzyklus, der Glutathion-Synthetase und der Modifikation des ribosomalen Proteins S6 (Fan *et al.*, 1994; Evers and Courvalin, 1996; Galperin and Koonin, 1997).

1.2 PEPTIDASEN

1.2.1 Allgemeine Information

Peptidasen (auch als Proteasen, Proteinasen oder proteolytische Enzyme benannt) sind Enzyme, die Proteine oder Peptide spalten können. Sie katalysieren dabei die Hydrolyse von Peptidbindungen in ihrem Zielprotein (Barrett and McDonald, 1986). Da Peptidasen für lebende Organismen physiologisch notwendig sind, sind sie allgegenwärtig und kommen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vor (Rao *et al.*, 1998; Rani *et al.*, 2012). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen intrazellulären Peptidasen, die z.B. die Verarbeitung und den Transport von sekretorischen Proteinen durch die Membranen übernehmen oder am Antigen-Abbau beteiligt sind und extrazellulären Peptidasen, die für die einfache Verdauung von Nahrungsproteinen bis hin zur Aktivierung des Blutgerinnungssystems und des Komplementsystems sorgen, sowie für Apoptosewege, Metastasierung maligner Tumoren oder der Freisetzung von Hormonen eine wichtige Rolle spielen (Rao *et al.*, 1998; Badgujar and Mahajan, 2010). Neben verschiedenen

EINLEITUNG

physiologischen Funktionen in höheren Organismen sind insbesondere Peptidasen aus mikrobiellen Quellen, im Hinblick auf ihr schnelles Wachstum und die leichte Zugänglichkeit zur genetischen Manipulation für biotechnologische Anwendungen auf dem Markt geeignet (Kumar and Takagi, 1999; Ali *et al.*, 2016). Mikrobielle Proteasen werden wegen ihrer Verwendung in verschiedenen Formen medizinischer Therapien gegen die Ausbreitung tödlicher Krankheiten wie z.B. Krebs, Malaria und AIDS (Rawlings and Barrett, 1993; Rawlings *et al.*, 2004), sowie wegen ihrer Bedeutung in der Lebensmittel-, Waschmittel- oder Gerbereiindustrie seit der Antike geschätzt (Tegge, 1984; Rao *et al.*, 1998; Badgajar and Mahajan, 2010; Razzaq *et al.*, 2019).

Nach Angaben des Nomenklaturausschusses der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie werden Peptidasen, wie alle weiteren Enzyme auch, in Gruppen aufgeteilt. Peptidasen gehören zur Klasse 3 der Hydrolasen und formen dort die Unterklasse EC 3.4 (Tabelle 1.1) (1994). Peptidasen lassen sich jedoch aufgrund ihrer enormen Vielfalt an Wirkungen und Strukturen nicht leicht mit dem allgemeinen System der Enzymnomenklatur vereinbaren. Derzeit werden Peptidasen anhand von drei Hauptkriterien klassifiziert: 1. Art der katalysierten Reaktion, 2. chemische Natur der katalytischen Stelle und 3. evolutionäre Beziehung in Bezug auf die Struktur (MEROPS-Klassifizierung) (Argos, 1987; Rawlings and Barrett, 1993; Barrett, 1994; Rawlings *et al.*, 2004). Folglich werden Peptidasen nach ihrem Angriffsort in der Polypeptidkette grob in zwei Hauptgruppen weiter unterteilt: 1. Exopeptidasen und 2. Endopeptidasen (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Klassifizierung von Peptidasen abgeleitet von Enzyme Nomenklaturausschuss der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie (1994).

Peptidase-Typ	EC-Nummer
Exopeptidasen	3.4.11–19
Aminopeptidasen	3.4.11
Dipeptidylpeptidase	3.4.14
Tripeptidylpeptidase	3.4.14
Carboxypeptidasen	3.4.16–3.4.18
Serin-Carboxypeptidasen	3.4.16
Metallo-Carboxypeptidasen	3.4.17
Cystein-Carboxypeptidasen	3.4.18
Peptidyldipeptidasen	3.4.15
Dipeptidasen	3.4.13
Omegapeptidasen	3.4.19
Endopeptidasen	3.4.21–3.4.34
Serin-Endopeptidasen	3.4.21

EINLEITUNG

Cystein-Endopeptidasen	3.4.22
Aspartat-Endopeptidasen	3.4.23
Metallo-Endopeptidasen	3.4.24
Threonin-Endopeptidasen	3.4.25
Endopeptidasen unbekanntem Typs	3.4.99

Exopeptidasen spalten die Peptidbindung proximal zu den Amino- oder Carboxyenden des Substrats. Je nach bevorzugtem Ende werden diese weiter eingeteilt in 1. Aminopeptidasen, welche einzelne Aminosäuren, Di- oder Tripeptide am N-Terminus eines Proteins spalten und 2. Carboxypeptidasen, die einzelne Aminosäuren oder Dipeptide am C-Terminus abspalten (Tabelle 1.1). Carboxypeptidasen werden in drei weitere Hauptgruppen unterteilt: Serin-Carboxypeptidasen, Metallo-Carboxypeptidasen und Cystein-Carboxypeptidasen, basierend auf der Art der Aminosäurereste am aktiven Zentrum der Enzyme (Badgular and Mahajan, 2010). Endopeptidasen hingegen spalten an spezifischen Stellen innerhalb der Peptidbindungen, die von den N- und C-Termini entfernt sind. Basierend auf der am aktiven Zentrum vorhandenen funktionellen Gruppe werden die Endopeptidasen weiter in vier hervorgehobene Gruppen eingeteilt (Tabelle 1.1): 1. Serinproteasen mit einem Serinrest in ihrem aktiven Zentrum, wie z.B. Chymotrypsin, Trypsin (Evnin *et al.*, 1990), Elastase und andere; 2. Aspartatproteasen mit einem Asparaginsäurerest, wie Pepsin, Rennin (Hiramatsu *et al.*, 1989) und andere; 3. Cysteinproteasen mit einem Cystein- und Histidinrest z.B. Papain (Schechter and Berger, 2012), Cathepsin und andere und 4. Metalloproteasen mit einem divalenten Metallion wie Zink, Kobalt oder Mangan in ihrem aktiven Zentrum z.B. Carboxypeptidase A, Thermolysin (Weaver *et al.*, 1977) und andere (Hartley, 1960; Baricos and Shah, 1991; Barrett, 1994; Rawlings *et al.*, 2004). Im Jahr 2010 wurde eine neue Klasse von Threoninproteasen mit einem Threoninrest in ihrem aktiven Zentrum charakterisiert (Madala *et al.*, 2010), wie z.B. die katalytischen Untereinheiten des Proteasoms. Es gibt einige Proteasen, die nicht genau in die Standardklassifikation passen, z.B. ATP-abhängige Proteasen, für deren Aktivität ATP erforderlich ist (Menon and Goldberg, 1987). Es wurde eine Datenbank namens MEROPS entwickelt, in der proteolytische Enzyme basierend auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen und evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen in Familien und Clans eingeteilt werden (Rawlings and Barrett, 1993; Rawlings *et al.*, 2004). Im Allgemeinen werden Proteasen aufgrund des pH-Werts ihrer optimalen Aktivität auch als saure, neutrale oder alkalische Proteasen bezeichnet (Rao *et al.*, 1998).

1.3 PROTEASOM

1.3.1 Allgemeine Information

Das 26S-Proteasom ist ein großer essentieller Proteinkomplex mit mehreren Untereinheiten in allen eukaryotischen Zellen, sowie in einigen Prokaryoten und spielt als zentrale Protease des Ubiquitin-abhängigen Signalweges eine wesentliche Rolle für den nicht-lysosomalen Proteinabbau (Ravid and Hochstrasser, 2008; Finley, 2009). Dieser ATP-abhängige enzymatischer Komplex besteht aus einem tonnenförmigen proteolytischen 20S-Kernteilchen und aus einem oder zwei 19S-regulatorischen Partikeln (Peters *et al.*, 1993), die an jedem Ende der Tonne anliegen (der Boden und der Deckel) (Glickman *et al.*, 1998), um den Eintritt von Proteinen zum 20S-Komplex zu regulieren (Abbildung 1.4) (Glickman *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 1998; Bedford *et al.*, 2010). Die Umgebung innerhalb des 20S-Proteasoms beherbergt die Orte des Proteinabbaus, die aus zwei gestapelten Ringen von sieben β -Untereinheiten bestehen, die zwischen zwei Ringen von jeweils sieben α -Untereinheiten angeordnet sind (Groll *et al.*, 1997). Während des Proteasomaufbaus werden jedoch nur die katalytischen β -Untereinheiten durch eine Threonin-abhängige Autolyse des N-terminalen Vorläufers posttranslational modifiziert, was zu frei zugänglichen aktiven Stellen führt (Heinemeyer *et al.*, 1997; Arendt and Hochstrasser, 1999; Groll *et al.*, 1999). Jeder der inneren β -Ringe (β 1, β 2 und β 5) enthält drei aktive Zentren, die den gleichen katalytischen Mechanismus aufweisen, sich jedoch in ihrer Präferenz für die Substratspaltung unterscheiden (Wilk and Orłowski, 1983; Groll *et al.*, 1999). Diese Aktivitäten wurden nach Enzymen benannt (Heinemeyer *et al.*, 1993; Enenkel *et al.*, 1994; Fenteany *et al.*, 1995). β 1 hat eine Caspase-ähnliche (Peptidyl-Glutamyl-Peptid-hydrolysierenden) Aktivität und bevorzugt die Spaltung nach sauren Resten, β 2 hat eine Trypsin-ähnliche Aktivität, spaltet bevorzugt nach basischen Resten und β 5 weist eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf, spaltet bevorzugt nach hydrophoben Resten (Orłowski *et al.*, 1993; Groll *et al.*, 1999; Verdoes *et al.*, 2009).

EINLEITUNG

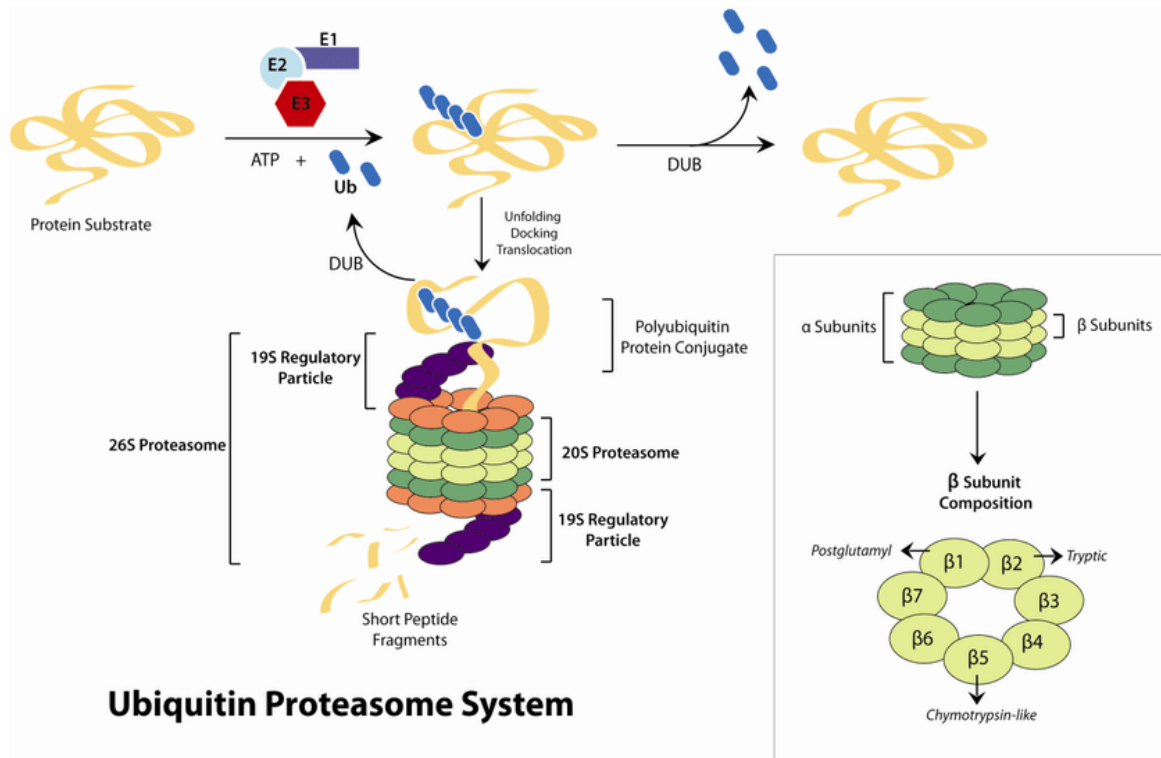


Abbildung 1.4 Der Ubiquitin-Proteasom-Weg aus Mattern *et al.* (Mattern *et al.*, 2014), gedruckt mit Genehmigung von © 2014 Springer Nature. Das Targeting von Proteinsubstraten durch Ubiquitin erfordert die sequenzielle Wirkung von drei Enzymen: Ubiquitin wird durch ein spezifisches aktivierendes Enzym (E1) aktiviert, um einen Ubiquitin-E1-Thiolester zu ergeben. Aktiviertes Ubiquitin wird auf ein Trägerprotein oder eine "Konjugase", E2, übertragen. Ubiquitin wird anschließend durch eine Ligase (E3) übertragen und über eine Isopeptidbindung an einen Lysinrest auf dem Substratprotein gebunden. Nach der Bindung von Ubiquitin an das Substrat wird üblicherweise eine Polyubiquitinkette gebildet. Ubiquitylierte Proteine können durch spezifische Isopeptidasen (DUBs) desubiquityliert oder vom 26S-Proteasom erkannt und zu kurzen Peptidfragmenten verarbeitet werden.

Im Allgemeinen reguliert das Proteasom zahlreiche zelluläre Funktionen, einschließlich des normalen Umsatzes von Proteinen, des Abbaus fehlgefalteter Proteine und der Regulation biologischer Wege durch selektiven Abbau von regulatorischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren (D. Voges *et al.*, 1999; Voorhees *et al.*, 2003). Diese Funktionen machen das Proteasom zu einem zentralen Schalter innerhalb der Zelle. Insbesondere auch wegen seiner Funktionen im Zellzyklus wird das Proteasom als ein mögliches Ziel für die Therapie verschiedener Krankheiten, unter anderem von Krebserkrankungen, angesehen (Adams, 2002; Frankland-Searby and Bhaumik, 2012). In schnell proliferierenden Tumorzellen führt die Exposition gegenüber Proteasom-Inhibitoren zum Stillstand des Zellzyklus und zur anschließenden Apoptose (Drexler, 1997; Orlowski and Kuhn, 2008; Grawert and Groll, 2012). Diese erhöhte

Empfindlichkeit gegenüber der Proteasom-Hemmung gegenüber ruhenden Zellen führte zur Entwicklung des ersten Proteasom-Inhibitors Bortezomib (vertrieben als Velcade™ von Millennium Pharmaceuticals), welcher 2003 von der US-amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zugelassen wurde. Der Arzneistoff wird als Erstlinientherapie bei multiplen Myelom und Mantelzelllymphom eingesetzt (Kane *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011). Bortezomib ist ein synthetisches Dipeptid auf Boronsäurebasis und bindet spezifisch an die $\beta 5$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms (Adams *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 2000). Aufgrund des extrem toxischen Boronsäure-Pharmakophors von Bortezomib ist eine längere intravenöse Verabreichung des Arzneimittels jedoch mit Toxizität und Nebenwirkungen aufgrund der erheblichen Aktivität außerhalb des Zielbereichs verbunden (Argyriou *et al.*, 2008). Daher ist die Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren mit verbesserten Eigenschaften ein ständiges Bestreben der Wissenschaft und Pharmaindustrie, und die Zahl der Studien zur Hemmung des Proteasoms in den letzten Jahren exponentiell angestiegen (Genin *et al.*, 2010).

1.3.2 Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren

Interessanterweise wurden eine Reihe potenter Proteasom-Inhibitoren aus der Natur isoliert, vorwiegend aus Mikroorganismen (Grawert and Groll, 2012). Die bekannteste Klasse sind die Peptid epoxyketone, wie das Epoxomicin (2) (Hanada *et al.*, 1992), das Eponemycin (1) (Sugawara *et al.*, 1990) und weitere verwandte Verbindungen (Koguchi *et al.*, 2000; Koguchi *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2012) ((1), (2), Abbildung 1.5). Nach der Erstbeschreibung des Epoxomicin und des Eponemycin-Genclusters (Schorn *et al.*, 2014) wurden weitere Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren, z.B. die Clarepoxcine, Landepoxcine und Macyranon A, durch „Metagenome-Mining“- und NMR-Screening-Ansätze entdeckt (Abbildung 1.5) (Keller *et al.*, 2015; Owen *et al.*, 2015). Die natürlich vorkommenden Peptidyl-Epoxyketone bestehen aus einem kurzen Peptidkern und einer terminalen Epoxyketoneinheit. Der mikrobielle Naturstoff Epoxomicin ist mit IC_{50} -Werten gegen das Proteasom von nur 2,5 nM besonders potent (Pereira *et al.*, 2012) und hemmt selbst bei hohen Konzentrationen keine anderen Proteasen, einschließlich Papain, Chymotrypsin, Trypsin, Cathepsin B oder Calpain (Grawert and Groll, 2012). Es überrascht nicht, dass in der medizinischen Chemie große Anstrengungen unternommen wurden, neue und noch wirksamere Epoxomicin-Analoga zu entwickeln (Elofsson *et al.*, 1999). Diese Bemühungen führten zur Entwicklung von Carfilzomib (Abbildung 1.5) (vermarktet als Kyprolis™ von Onyx Pharmaceuticals) dem ersten

EINLEITUNG

potenten Epoxyketon-Proteasom-Inhibitor, der 2012 von der US-amerikanischen FDA für die Behandlung des refraktärem und rezidiviertem multiplen Myeloms zugelassen wurde.

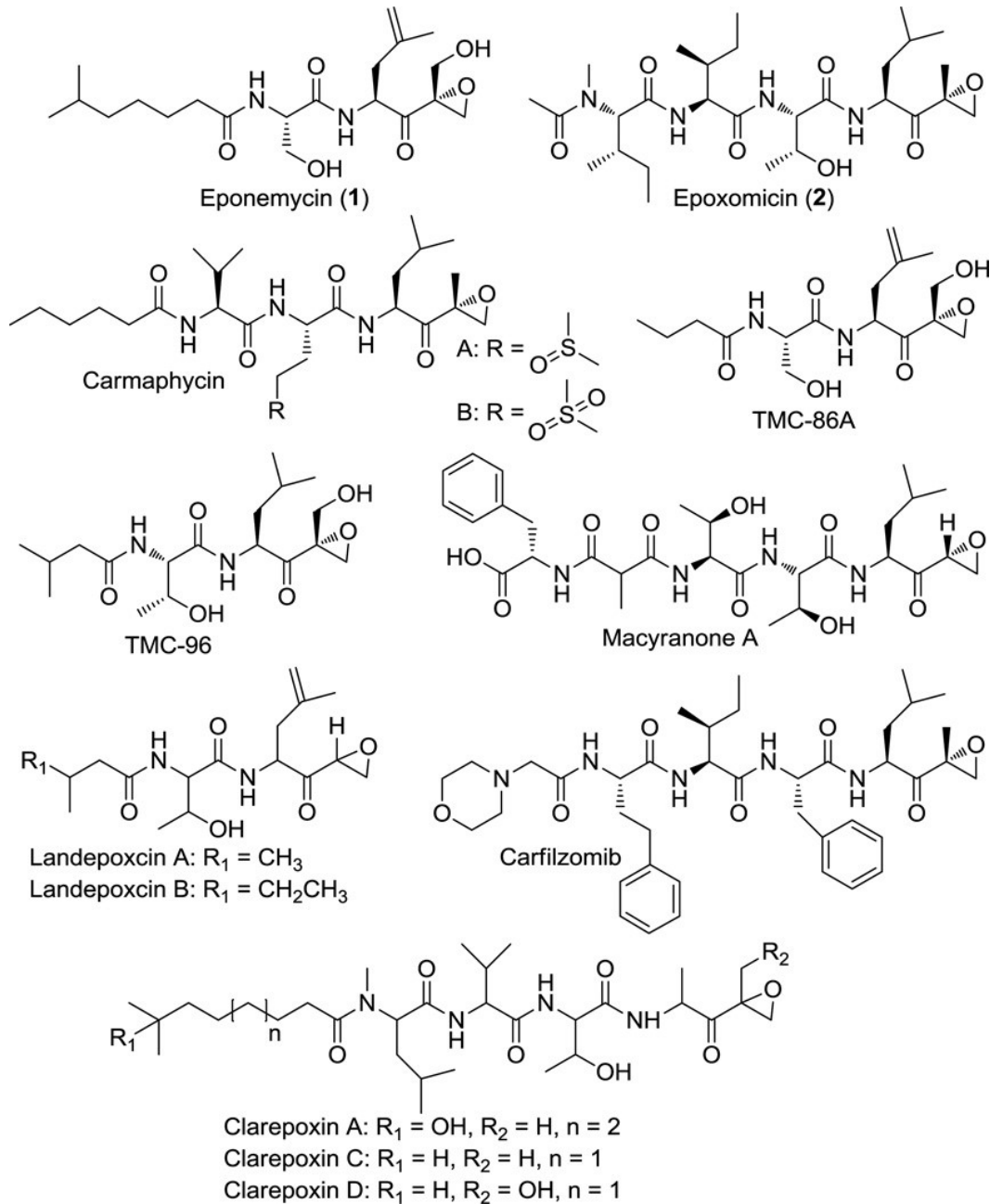


Abbildung 1.5 Strukturen von Peptidyl-Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren übernommen aus Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2015). Gedruckt mit Genehmigung von © 2015 John Wiley and Sons.

Das synthetische Tetrapeptid Carfilzomib ist ein starker, hochselektiver und irreversibler Inhibitor des Proteasoms. (Demo *et al.*, 2007). Das Medikament scheint von Patienten, aufgrund geringfügiger Nebenwirkungen besser vertragen zu werden als Bortezomib und kann daher in höheren und effektiveren Dosen angewendet werden (Kuhn *et al.*,

2007; McCormack, 2012). Neben ihrer Verwendung als Krebsmedikamente haben Epoxyketone eine hervorragende Wirksamkeit gegen Parasiten, insbesondere *Plasmodium falciparum*, gezeigt (Glenn *et al.*, 2004; Lindenthal *et al.*, 2005; Czesny *et al.*, 2009). Zudem werden Proteasom-Inhibitoren als Antimycotika zur Bekämpfung von Tuberkulose untersucht (Lin *et al.*, 2009).

Eine Erklärung für den hohen Grad an Spezifität von Epoxomicin und seinen Derivaten an das N-terminale katalytische Threonin von β 5-Proteasom-Untereinheiten wurde mit der Aufklärung des einzigartigen Bindungsmodus des α' , β' -Epoxyketon-„Warhead“ gegeben (Kim *et al.*, 1999; Groll *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2016). In biologischen kleinen Molekülen sind elektrophile Gruppen häufig vorkommend, welche z.B. β -Lactone und β -Lactame, Epoxide, Carbamate und α , β -ungesättigte Aldehyde umfassen. Oftmals sind diese Gruppen essentiell für die biologische Aktivität von Naturstoffen, die auf nukleophile Zentren in Proteinen, DNA oder anderen zellulären Komponenten abzielen, und somit von großer Bedeutung für die Entdeckung neuer Naturstoffe (Gersch *et al.*, 2012). Insbesondere die beispiellose terminale α' , β' -Position des C3-Carbonyls und des ringgespannten Epoxids bildet zwei starke elektrophile Gruppen in unmittelbarer Nähe zueinander, die sehr anfällig für einen doppelten nukleophilen Angriff durch das N-terminale Threonin des 20S-Proteasoms sind. Das Epoxyketon-Carbonyl wird zuerst durch die β -Hydroxylgruppe des Threonins angegriffen. Das α -Amin greift dann den Epoxidring an und bildet ein kovalentes heterozyklisches Addukt, welches zu einer Hemmung der proteolytischen Aktivität führt (Kim *et al.*, 1999; Groll *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2016).

Angesichts der Wirksamkeit und der einzigartigen Struktur dieser Peptidyl-Epoxyketon-Naturstoffe besteht ein großes Interesse an der biosynthetischen Herkunft dieser Verbindungen. Die Grundlage neuster Forschungsansätze ist ein detailliertes Verständnis der genetischen Basis, die die einzigartige Bildung des α' , β' -Epoxyketon-„Warhead“ und die Kopplung an das Peptidgerüst steuert und somit die gezielte Gewinnung von Genomen für die Entdeckung neuer Derivate ermöglicht.

1.3.2.1 Biosynthese von Epoxomicin und Eponemycin

In den letzten Jahren wurde die genetische Basis für die Biosynthese von Epoxomicin und Eponemycin ausgiebig untersucht (Schorn *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Zettler *et al.*, 2016). Die Identifizierung und Charakterisierung der ersten beiden biosynthetischen Gencluster von Epoxomicin und Eponemycin (Abbildung 1.6), aus den actinobakteriellen Produzentenstämmen *Goodfellowiella coeruleoviolacea* ATCC 53904 (Hanada *et al.*, 1992) und *Streptomyces hygrosopicus* ATCC 53709 (Sugawara *et al.*, 1990), ermöglichte erstmals einen detaillierte Einblicke in den Biosynthesemechanismus solcher natürlichen Peptidyl-Epoxyketone und ihrem einzigartigen Pharmakophor (Abbildung 1.7 und 1.8) (Schorn *et al.*, 2014; Zettler *et al.*, 2016). Darüber hinaus wurden kürzlich Gencluster identifiziert, die für die Biosynthese der Epoxyketon-Verbindung Macyranon A aus *Cystobacter fuscus* (Keller *et al.*, 2015) und die für die Biosynthese der beiden Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren Clarepoxcin und Landepoxcin verantwortlich sind (Owen *et al.*, 2015). Diese Gencluster veranschaulichen einen archetypischen Charakter der Epoxomicin- und Eponemycin-Biosynthesewege für die Bildung des Epoxyketons.

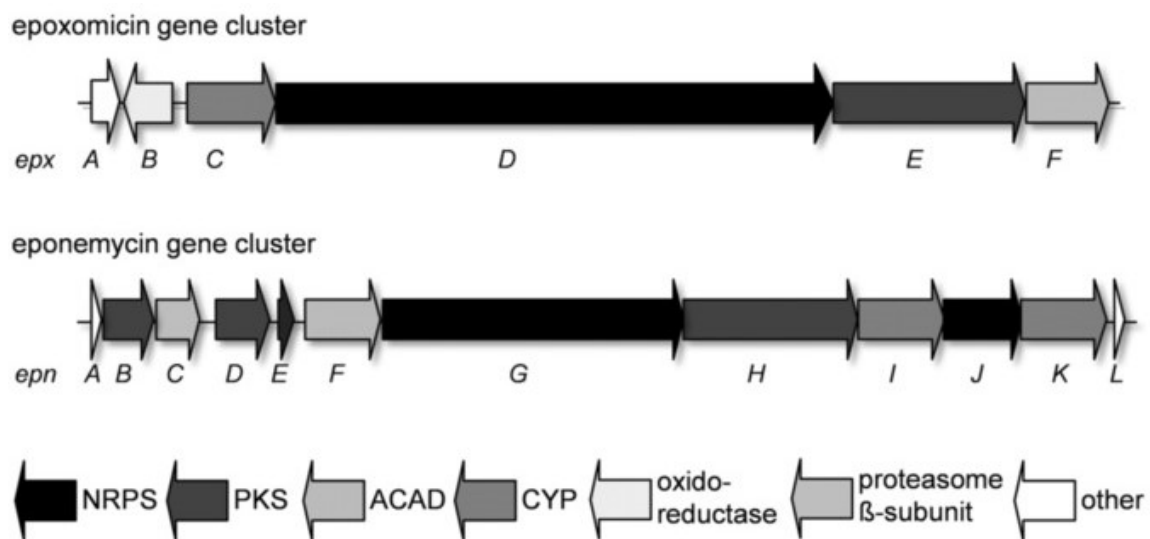


Abbildung 1.6 Biosynthetische Gencluster von Epoxomicin und Eponemycin aus (Zettler *et al.*, 2016). Gedruckt mit Genehmigung von © 2016 John Wiley and Sons. ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; CYP = Cytochrom P450-Enzym; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; PKS = Polyketidsynthase.

Das Peptidrückgrat der beiden Epoxyketon-Verbindungen Epoxomicin und Eponemycin wird durch hybride nicht-ribosomale Peptidsynthetase/Polyketidsynthase (NRPS/PKS) multifunktionaler Enzyme zusammengesetzt (Abbildung 1.7 und 1.8). Diese katalysieren voraussichtlich die Gestaltung eines acylierten Peptids und die Verlängerung des

EINLEITUNG

terminalen Leucinrests. Der Vergleich der beiden Biosynthesewege zeigte die Beteiligung einer konservierten Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD) und eines Cytochrom P450-Enzyms (CYP) in der Formation des α' , β' -Epoxyketons (Abbildung 1.6, und 1.8) (Schorn *et al.*, 2014; Zettler *et al.*, 2016).

Das Epoxomicin-NRPS, EpxD besteht aus vier Modulen und die Analyse der Substratspezifitäten der jeweiligen Adenylierungs-Domänen (A1-A4) korrelierten offensichtlich mit der Aktivierung von Isoleucin (2x) Threonin und Leucin (Abbildung 1.7) (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000).

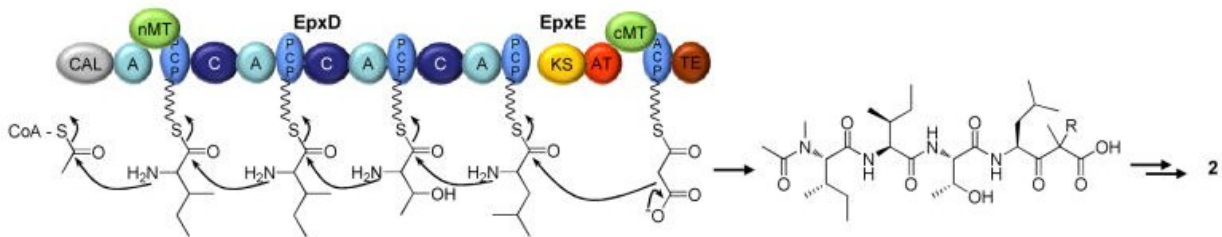


Abbildung 1.7 Biosynthese natürlicher Epoxyketone. Voraussichtliche Synthese von Epoxomicin (Epx) (2) aus NRPS/PKS (nicht-ribosomale Peptidsynthetase/Polyketidsynthase) nach (Schorn *et al.*, 2014). Gedruckt mit Genehmigung von © 2014 American Chemical Society. A: Adenylierungs-Domäne; ACP: Acyl-Carrier-Protein; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; C: Kondensations-Domäne; MT: Methyltransferase; TE: Thioesterase; KS: Ketosynthase; AT: Acyltransferase-Domäne.

Die Megasynthetase beginnt mit einer mutmaßlichen Primer-Fettacyl-Kondensations (C)-Domäne (Rausch *et al.*, 2007), die bekanntermaßen Fettsäuren auf den ursprünglichen Aminosäurerest überträgt (Kraas *et al.*, 2012) und somit für die Installation der Acetyleinheit in Epoxomicin verantwortlich ist. Die Methyltransferase (MT)-Domäne im ersten Modul von EpxD modifiziert wahrscheinlich den Ile1-Rest durch Einführung der *N*-Methylgruppe weiter (Schorn *et al.*, 2014).

Das entsprechende Eponemycin-NRPS, EpnG, enthält jedoch nur 2 NRPS-Module und die Analyse der Substratspezifitäten der jeweiligen Adenylierungs-Domänen (A1-A2) korrelierten offensichtlich mit der Aktivierung von Serin und Leucin (Abbildung 1.8) (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000). Zudem besitzt EpnG keine spezifische Primer-C-Domäne. Die Eponemycin-Fettacyl-Einheit wird demnach auf eine andere Weise wie im Epoxomicin hergestellt. Fütterungsstudien ergaben, dass die 6-Methylheptanoyleinheit aus Valin-abgeleitetem 2-Methylpropanoyl-CoA und Acetat aufgebaut ist und demnach das FabH-Homologe EpnD und die diskrete NRPS-

EINLEITUNG

Tridomäne EpnJ eher eine Nebenfunktion auf diesem Biosyntheseweg haben könnten (Abbildung 1.8) (Zettler *et al.*, 2016).

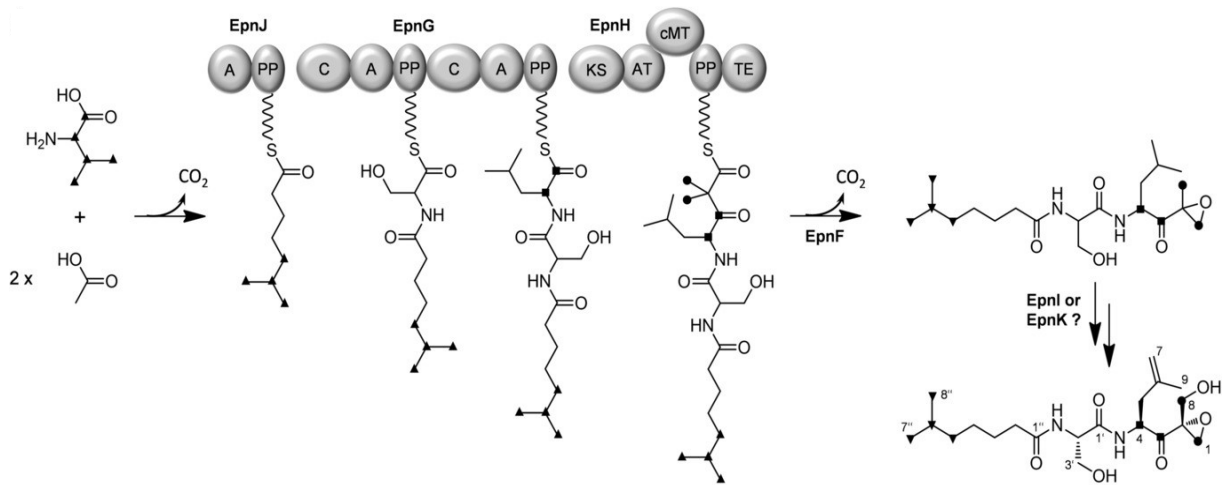


Abbildung 1.8 Biosynthese-Modell zur Bildung von Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren. Biosynthese von Eponemycin (Epn) nach (Zettler *et al.*, 2016). Gedruckt mit Genehmigung von © 2016 John Wiley and Sons. Die hervorgehobenen schwarzen Dreiecke in der Strukturformel repräsentieren den vorgeschlagenen Einbau eines von Valin abgeleiteten [$^{13}\text{C}_4$]-Zwischenprodukts in die Fettsäureseitenkette. Die schwarzen Punkte symbolisieren den Einbau eines Moleküls [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]-L-Leucin, sowie den Einbau von [Methyl- $^{13}\text{C}_1$]-L-Methionin in C-1 und C-8 der Epoxyketoneinheit.

Die terminalen PKS-Module der Epoxomicin- und Eponemycin-Assemblierungslinien, EpxE bzw. EpnH, sind identisch organisiert. Beide enthalten eine Malonyl-CoA spezifische AT-Domäne und eine mutmaßliche C-Methyltransferase-Domäne (cMT). Das substituierte Epoxid lässt sich von Malonyl-CoA und S-Adenosylmethionin ableiten (Abbildung 1.7 und 1.8) (Schorn *et al.*, 2014; Zettler *et al.*, 2016). Kürzlich berichtete Fütterungsstudien belegen den Einbau von L-Leucin und zwei Methylgruppen von S-Adenosylmethionin in den Epoxyketon-„Warhead“ (Abbildung 1.8) (Zettler *et al.*, 2016). Das terminale L-Leucin kondensiert mit einer Malonyleinheit, die dann durch Einwirkung eines einzelnen PKS-Moduls, das eine Methyltransferasedomäne enthält, zweimal aus S-Adenosylmethionin α -methyliert wird (Zabala *et al.*, 2016). Die Dimethylierung von Polyketid-Intermediaten durch PKS-C-Methylierungs-Domänen wurde darüber hinaus für weitere Reaktionswege vorgeschlagen (Ishida *et al.*, 2007; Schenk *et al.*, 2007; Poust *et al.*, 2015). Basierend auf den aktuellen Studien von Liu *et al.* und Zettler *et al.* könnte angenommen werden, dass die Bildung des Epoxyketons eine Decarboxylierung und eine Epoxidierungsreaktion nach der Freisetzung des durch die EpnH-TE-Domäne gebundenen Enzyms beinhaltet (Abbildung 1.8) (Liu *et al.*, 2015; Zettler *et al.*, 2016). Die Decarboxylierung könnte spontan erfolgen, ähnlich dem, was Poust *et al.* für gem-

EINLEITUNG

dimethylierte Polyketid-Vorläufer beobachtet hat (Poust *et al.*, 2015) oder könnte enzymunterstützt sein. Angesichts der Natur von EpnF (und EpxF) als Flavoenzyme könnte über eine Dehydrierungs-/Oxygenierungsreaktion vermutet werden, die durch eine vorangegangene Decarboxylierung ausgelöst wird. EpnF wäre vergleichbar mit der Gruppe der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängigen „interne Monooxygenasen“, die ihr Substrat als Elektronendonator anstelle einer externen Quelle wie NAD(P)H verwenden (Huijbers *et al.*, 2014). EpnF würde in Analogie zu gewöhnlich ACADs als Dehydrogenase wirken. ACADs katalysieren typischerweise die Dehydrierung von Acyl-CoA-Thioestern zu dem entsprechenden trans-2-Enoyl-CoA über die Reduktion eines FAD-Cofaktors (Ghisla and Thorpe, 2004). Challis *et al.* postulierten für EpnF, dass nach anfänglicher Decarboxylierung zur Erzeugung eines Enolat-Zwischenprodukts, das β -Kohlenstoffatom unter Reduzierung des Flavin-Cofaktors dehydriert wird, um ein α' , β' -ungesättigtes Keton zu formen. Dann würde das reduzierte Flavin mit molekularem Sauerstoff reagieren, um ein Flavinhydroperoxid bereitzustellen, die das ungesättigte Keton in das Epoxyketon umwandeln kann (Zabala *et al.*, 2016).

Durch Gendelektionsexperimente wurde gezeigt, dass die konservierten Cytochrome EpnI/EpxC hingegen keine entscheidende Rolle bei der Umwandlung der terminalen Carbonsäure in die Epoxyketoneinheit spielen, sondern scheinen vielmehr an üblichen oxidativen modifizierenden Reaktionen (z.B. Hydroxylierung) teilzunehmen (Abbildung 1.8) (Zettler *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse würden mit dem Befund von von Zabala *et al.* übereinstimmen (Zabala *et al.*, 2016). Die Erkenntnis der genetischen Information, die die Bildung der spezialisierten, Aktivität verleihenden Einheit dieser Proteasom-Inhibitoren steuert, könnte darüber hinaus das Vorhandensein homologer Biosynthesewege in verschiedenen Bakterien in naher Zukunft für die Entdeckung neuer bioaktiver Derivatmoleküle ermöglichen.

1.4 METALLOPROTEASEN

1.4.1 Allgemeine Information

Metalloproteasen sind einer der vier oben hervorgehobenen Hauptendopeptidase-Typen (Barrett, 1994). Das Erfordernis eines zweiwertigen Metallions ist für die Aktivität neutraler Proteasen vom Metalloprotease-Typ bezeichnend. Die meisten Metalloproteasen erfordern Zink, aber einige verwenden auch Kobalt oder Mangan (Rao *et al.*, 1998). Das Metallion wird über drei Aminosäure-Liganden an das Protein koordiniert. Die das Metallion koordinierenden Liganden können mit Histidin, Glutamat, Aspartat, Lysin und Arginin variieren. Die vierte Koordinationsposition wird von einem labilen Wassermolekül eingenommen (Abbildung 1.9). Hierzu gehören Enzyme unterschiedlicher Herkunft wie zum Beispiel Kollagenasen höherer Organismen (Matrix-Metalloproteasen), Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Neprilysin aus dem menschlichen Körper, hämorrhagische Toxine aus Schlangengiften (Bitisgabonine-Untereinheit), Botulinumtoxin, sowie Thermolysin (Neutrale Zink-Metallopeptidasen) aus Bakterien (Weaver *et al.*, 1977; Hibbs *et al.*, 1985; Shannon *et al.*, 1989) und andere. Die Substratspezifitäten dieser Enzyme wurden entweder durch Identifizierung der Spaltungsstellen von Proteinsubstraten oder durch eine Reihe von synthetischen Peptidsubstrate untersucht (Nagase, 1997). Beispielsweise ist die thermostabile neutrale Metallopeptidase Thermolysin, isoliert von *Bacillus thermoproteolyticus* eines der am gründlichsten charakterisierten Enzyme dieser Superfamilie (Colman *et al.*, 1972). Im Allgemeinen spaltet es Peptidbindungen vor hydrophoben Seitenketten, beispielsweise nach Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin oder Tyrosin (Moriyama and Tsuzuki, 1970). Es enthält ein essentielles Zink-Atom im katalytischen Zentrum und vier Calcium-Atomen, die dem Protein Thermostabilität verleihen (Tajima *et al.*, 1976; Kester and Matthews, 1977). Das Zinkion hat in diesem Fall eine ungefähre tetraedrische Koordination mit den drei Aminosäure-Liganden His 142, His 146 und Glu 166 und einem Wassermolekül (Abbildung 1.9) (Hangauer *et al.*, 1984; Matthews, 1988; Pelmenchikov *et al.*, 2002). Das Zinkion wird für die Polarisierung der Carbonylgruppe des Substrats verwendet und erleichtert die Deprotonierung des Wassernukleophils. Das Proton wird von Glutaminsäure (Glu 143) aufgenommen und sofort in die Stickstoffgruppe überführt. Das Peptid interagiert mit dem Zinkion und den Wasserstoffbrückenbindungen vom Histidin (His 231) und Tyrosin (Tyr 157) (A). Die dreigliedrige Wechselwirkung zwischen dem Histidin, das die Sauerstoffgruppe, die

EINLEITUNG

Glutaminsäure und das Zinkion stabilisiert und ein Wassermolekül aktiviert, führt zu einem nukleophilen Angriff des Wassermoleküls auf den Carbonylkohlenstoff des Substrats (B). Der zweite Sauerstoff wird durch Wechselwirkung mit dem Zinkion und der Glutaminsäure stabilisiert. Der Sauerstoff der Seitenkette von Asparagin (Asp 226) und das Carbonyl des Rückgrats von Alanin nehmen Wasserstoffbrückenbindungen vom doppelt protonierten tetraedrischen Stickstoff der spaltbaren Bindung auf, was zur Spaltung des Peptids führt. Das Aminprodukt verlässt das aktive Zentrum (C).

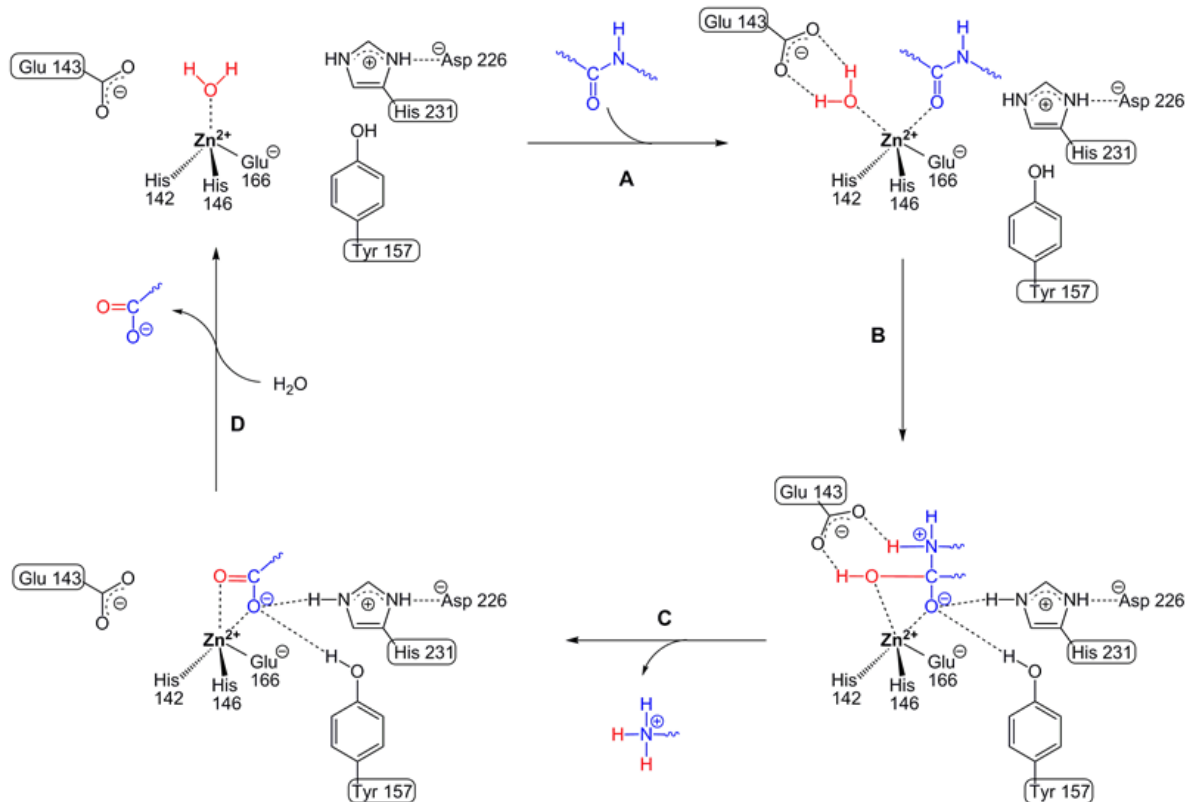


Abbildung 1.9 Vorgeschlagener Katalysemechanismus von Thermolysin abgerufen von (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thermolysin_reaction_cycle.png) und angelehnt an (Hangauer *et al.*, 1984; Matthews, 1988; Pelmeshikov *et al.*, 2002). Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. Gedruckt mit Genehmigung der Public domain, Wikicommonsuser: Yikrazuul, sowie von © 1984 und © 1988 American Chemical Society und von © 2014 Springer Nature.

Das restliche gespaltene Produkt bleibt zunächst an das Enzym gebunden. Die Bindung des Zinkions an ein Lösungsmittelmolekül führt zum Ausstoß des Peptidmoleküls. Das Carboxylprodukt wird dann durch ein neues Wassermolekül ersetzt, dadurch liegt das Zinkatom wieder tetraedrisch koordiniert vor und ein neuer Reaktionsmechanismus kann somit beginnen (D) (Abbildung 1.9). In diesem Fall formt der Glu-143-Rest mit den beiden Histidinen His 142 und His 146 das Sequenzmotiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH). Dieses zinkbindende HEXXH-Motiv ist in allen Mitgliedern der Zink-

EINLEITUNG

Endoprotease-Familie stark konserviert (Weaver *et al.*, 1977; Pelmeshnikov *et al.*, 2002; Manzetti *et al.*, 2003).

Die von *Pseudomonas aeruginosa* produzierte Elastase (LasB) ist ein Beispiel für ein weiteres wichtiges Mitglied der Familie der neutralen Metalloproteasen (Jaouadi *et al.*, 2013). Die Metalloproteinase wird unter anderem in Verbindung mit *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion gebracht (siehe United States Patent US4382888, Murao *et al.*, 1980).

Wenn Proteinase im Allgemeinen keiner räumlichen und zeitlichen Kontrolle unterliegen, werden sie häufig destruktiv, was zu Pathologien wie Arthritis, Entzündungen und Krebs führen kann (Tallant *et al.*, 2010). Dementsprechend ist es auf dem Gebiet der Medizin und Biochemie von Bedeutung wichtigste therapeutische Strategien zur Bekämpfung dieser Dysregulation von Proteinase zu entwickeln, wie die Herstellung von Wirkstoffen, die auf ihre katalytischen Domänen abzielen (Tallant *et al.*, 2010). Neuere Ansätze haben spezifische Inhibitoren zur Hemmung ausgewählter Proteinase hervorgebracht, so dass in naher Zukunft die Entwicklung erfolgreicher Medikamente erwartet werden kann (Whittaker and Ayscough, 2001; Tallant *et al.*, 2010). Die meisten dieser Medikamente werden synthetisch hergestellt, aber ein wesentlicher Teil davon wurde aus Naturstoffen entwickelt oder ist von diesen inspiriert. Natürliche Proteinase-Inhibitoren sind weit verbreitet und können aus einer Vielzahl von Organismen, einschließlich Pflanzen, Tieren und vorallem Mikroorganismen stammen (Hass *et al.*, 1975; Weaver *et al.*, 1977; Kitagishi *et al.*, 1983; Barrett, 1987; Mares *et al.*, 1989; Valueva *et al.*, 2000; Christeller and Laing, 2005).

Zur spezifischen Hemmung von Metalloproteinasen können Proteinase-Inhibitoren entweder reversibel durch Verdrängung des Substrats oder irreversibel durch kovalente Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum binden ("Suizid"-Inhibitoren) (von Jagow, 1980). Klassische Schloss- und Schlüsselinhibitoren von Metalloproteinasen binden extrem eng, indem sie durch spezialisierte Einheiten den Übergangszustand der Hydrolyse des Peptids approximieren und verhindern, dass es auf andere Substrate wirkt. Phosphoramidon (Kitagishi and Hiromi, 1984) und sein Stereoisomer Talopeptin (Kitagishi *et al.*, 1983; Kitagishi and Hiromi, 1984) sind beispielsweise zwei potente reversibel Metalloproteinasen-Inhibitoren aus Actinobakterien, die durch eine Phosphoramidat-Gruppe das tetraedrische Intermediat der enzymatischen Reaktion nachahmen (Weaver *et al.*, 1977; Tronrud *et al.*, 1986; Holden *et al.*, 1987).

1.4.2 Metalloprotease-Inhibitoren

1.4.2.1 Phosphoramidon und Talopeptin

Phosphoramidon und Talopeptin (Abbildung 1.11) wurde aus Kulturen von *Streptomyces tanashiensis* (Umezawa *et al.*, 1972) und aus *Streptomyces mozunensis* MK-23 (Muraio *et al.*, 1980) isoliert. Die beiden Metalloproteinasen-Inhibitoren bestehen aus einem L-Leucin-L-Tryptophan-Dipeptidrückgrat, das über eine Phosphoramidatbrücke mit einem 6-Desoxyzucker verknüpft ist. Talopeptin enthält 6-Desoxy-L-Talose, während L-Rhamnose in Phosphoramidon vorhanden ist. Chemisch unterscheiden sich die beiden Verbindungen nur in der Ausrichtung einer Hydroxylgruppe an C4 der Zuckereinheit, welches ihre inhibitorische Aktivität nicht wesentlich zu beeinflussen scheint (Abbildung 1.11) (KITAGISHI and HIROMI, 1983; Kitagishi *et al.*, 1983). Die Hemmwirkung von Phosphoramidon (Weaver *et al.*, 1977) und Talopeptin wurde auf die Metall-Chelat-Eigenschaften einer Phosphoramidateinheit zurückgeführt. Phosphoramidat- und Phosphonamideinheiten sind häufige Motive in der medizinischen Chemie. Die erhöhte Stabilität von N–P-Bindungen gegenüber der Hydrolyse im Vergleich zu O–P-Bindungen machen sie zu vielversprechenden Inhibitoren wichtiger Proteinziele (Waldman *et al.*, 2017). N–P-Bindungen sind zum Beispiel als Verknüpfung in mehreren synthetischen Prodrugs vorhanden. Insbesondere werden Nukleosid-Analoga mit N–P-Bindungen seit Jahrzehnten mit großem Erfolg als antivirale und Antikrebs-Prodrugs entwickelt (Freel Meyers and Borch, 2000; Tobias and Borch, 2001; Venkatachalam *et al.*, 2004; Mehellou *et al.*, 2009; Slusarczyk *et al.*, 2018). In Protease-Inhibitoren dienen Sie generell als Peptidomimetika, die den Carbonylkohlenstoff in der Amidbindung ersetzen (Vagner *et al.*, 2008). Basierend auf vorherigen kristallographischen Analysen des natürlich vorkommenden Thermolysin-Inhibitors Phosphoramidon können sie als Übergangszustands-Analoga der Enzymreaktion angesehen werden und koordinieren an das Metallion des aktiven Zentrums in Metalloproteasen (Tronrud *et al.*, 1986).

Phosphoramidon und Talopeptin hemmen Metalloproteinasen als sogenannte reversible Typ-I-Inhibitoren. Das Dipeptid L-Trp-L-Leu imitiert dabei beispielsweise die Erkennungssequenz von L-Trp-L-Val aus Metalloproteinasen wie ECE (Yanagisawa *et al.*, 1988; Mattera *et al.*, 1993) und die Phosphoramidat-Gruppe imitiert das tetraedrische Zwischenprodukt, das während der Hydrolyse von Peptiden gebildet wird (Abbildung 1.10) (Weaver *et al.*, 1977; Tronrud *et al.*, 1986). Der negativ geladene Sauerstoff der Phosphatgruppe wechselwirkt dabei stark mit dem Zinkion und den

EINLEITUNG

Aminosäuren Histidin (His 231) und Tyrosin (Tyr 157). Außerdem interagieren das Zinkion und das Lösungsmittelmolekül mit dem Sauerstoff, Glutaminsäure (Glu 143) und Alanin (Ala 113) interagieren mit der Sauerstoff- und Amidgruppe (Tronrud *et al.*, 1986).

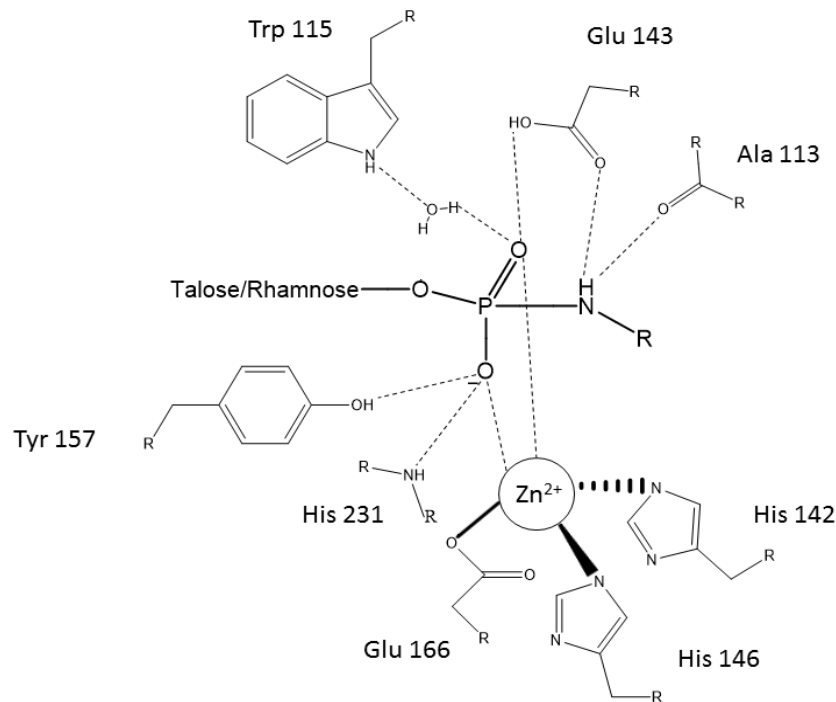


Abbildung 1.10 Offensichtliche Wechselwirkungen zwischen zwei Phosphoramidat-Inhibitoren (Phosphoramidon und Talopeptin) und Thermolysin, angepasst aus (Tronrud *et al.*, 1986). Gedruckt mit Genehmigung von © 2005 John Wiley and Sons. Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. Vermutete Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen mit dem Zink sind gestrichelt eingezeichnet, andere enge Ansätze werden als gepunktete Linien angegeben.

Phosphoramidon ist ein Inhibitor der langsamen Bindung und sein K_i -Wert ist stark vom pH-Wert abhängig und variiert zwischen 1,4 nM bei pH 5,0 und 8,5 μ M bei pH 8,5 (van den Burg and Eijsink, 2013). Der bisher wirksamste beschriebene Thermolysin-Inhibitor, mit einem K_i -Wert von 68 pM (van den Burg and Eijsink, 2013), ist das artifizielle ZF^PLA (Carbobenzoxy-L-Phe^P-L-Leu-L-Ala). ZF^PLA bindet in der für den Übergangszustand erwarteten Weise an Thermolysin (Holden *et al.*, 1987). Ein weiterer Thermolysin-Inhibitor namens FMPI hat ein einfacheres Gerüst: N-Phospho-L-Phenylalanin-L-Arginin, hergestellt von *Streptomyces rishirensis* NK-122 (Murao *et al.*, 1982). FMPI fehlt der in den beiden anderen Verbindungen Phosphoramidon und Talopeptin vorhandene Zucker (Kasai *et al.*, 1982) und zeigt eine mäßige Hemmung gegen Thermolysin.

Die oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen den Phosphoramidat-Inhibitoren und Thermolysin belegen deutlich die Bedeutung der tetraedrischen N-

Phosphoryleinheit für die Bindung dieser Inhibitoren (Weaver *et al.*, 1977; Tronrud *et al.*, 1986). In der Natur sind solche N–P-Bindungen jedoch vergleichsweise selten und über ihre Biosynthese ist wenig bekannt (Waldman *et al.*, 2017). Ausnahmen sind z.B. Arginin- oder Kreatinphosphat (Morrison *et al.*, 1957; Reddick and Kenyon, 1987). Kreatinphosphat stellt die Phosphorylgruppe zur Verfügung, die zur Rückwandlung des bei der Muskelkontraktion entstandenen ADP in ATP genutzt wird (Wallimann *et al.*, 1992).

Phosphoramidon und Talopeptin sind wirksame Inhibitoren von Thermolysin, sowie einer Reihe weiterer Metalloendopeptidasen wie *Pseudomonas*-Elastase LasB, neutraler Endopeptidasen (z.B. NEP-2, Neprilysin, Endopeptidase E.C. 24.11), Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Kollagenasen und Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) aus Säugetieren (Moriyama *et al.*, 1965; Suda *et al.*, 1973; Weaver *et al.*, 1977; Ichikawa *et al.*, 1983; Kasai *et al.*, 1983; KITAGISHI and HIROMI, 1983; Kitagishi *et al.*, 1983; Kessler and Spierer, 1984; Kitagishi and Hiromi, 1984; Poncz *et al.*, 1984; Tsura *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1994; Kukkola *et al.*, 1995; Keller *et al.*, 1996; Hanson *et al.*, 2011) (siehe auch United States Patent US4382888, Murao *et al.*, 1980). Phosphoramidon wurde in Tiermodellen und klinischen Pilotstudien eingehend auf seine Auswirkungen auf Asthma, Alzheimer, regionale Schmerzsyndrome, *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen, Herzinsuffizienz, zerebralen Vasospasmus, Brust- und Prostata-Krebszellen und verschiedene andere Krankheiten untersucht und stellt bis heute ein weit verbreitetes pharmakologisches Instrument in der zellbiologischen Forschung dar (Kessler and Spierer, 1984; Poncz *et al.*, 1984; Matsumura *et al.*, 1991; Vemulapalli *et al.*, 1993; Crimi *et al.*, 1995; Kirshbom *et al.*, 1995; Patel and Schrey, 1995; Love *et al.*, 1996; Eckman *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2016). Studien belegten eine Vielzahl von Nebenwirkungen durch den Metalloprotease-Hemmer. Zum Beispiel führt bei Asthmatikern unter anderem die Hemmung der neutralen Endopeptidase E.C. 24.11 durch inhalatives Phosphoramidon zu einer geringfügigen, aber signifikanten Verstärkung der durch Bradykinin ausgelösten bronchospastischen Reaktion in der Lunge (Crimi *et al.*, 1995). Zudem verursacht die Behandlung endogener ECE-exprimierender Zelllinien mit Phosphoramidon eine 2 bis 3-fache Erhöhung der extrazellulären β -Amyloid ($A\beta$)-Konzentration, die auf die Hemmung des intrazellulären $A\beta$ -Abbaus zurückzuführen ist. Die Ablagerung von β -Amyloid ($A\beta$)-Peptiden im Gehirn ist ein frühes und unveränderliches Merkmal aller Formen der Alzheimer-Krankheit (Eckman *et al.*, 2001). Allgemein hemmt der Wirkstoff Phosphoramidon die Spaltung

einer Reihe von verschiedenen Metalloproteasen und ist daher für mechanistische Studien, die eine selektive Blockade z.B. ausschließlich des ECE-Enzyms erfordern ungeeignet (Krum and Martin, 2007). Aufgrund dieser Komplexität ist die Entwicklung nicht nur potenter, sondern auch selektiver, in diesem Fall von ECE-Inhibitoren wichtig. Um die selektive Natur dieser Hemmung zu verbessern wurden eine Reihe neuer Analoga von Phosphoramidon und Talopeptin, durch Modifizieren verschiedener Regionen der Moleküle synthetisiert und auf ihre inhibitorische Aktivität getestet (Keller *et al.*, 1996). Dabei wurden beispielsweise der Zuckeranteil, die Aminosäuren oder die Phosphatgruppe modifiziert oder verändert (Komiya *et al.*, 1975; Kam *et al.*, 1979; Kitagishi and Hiromi, 1986; Kukkola *et al.*, 1995; Nanteuil *et al.*, 1995; Donahue and Johnston, 2006; van der Heden van Noort *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2013).

Beispielsweise zeigte die Modifizierung des Tryptophanrests des spezifischen Inhibitors Talopeptin mit N-Bromsuccinimid (NBS) eine fast vollständige Zerstörung der Hemmwirkung gegen Thermolysin (KITAGISHI and HIROMI, 1983). Durch Co-Kristallisations-Untersuchungen von Thermolysin mit zwei cyclischen Phosphonamidat-Inhibitoren konnte eine 1000-fach geringere Affinität der Phosphonatester-Inhibitoren zu Thermolysin gegenüber ihre Phosphonamidat-Analoga belegt werden (van den Burg and Eijssink, 2013). Ein ähnlicher, aber weniger dramatischer Wirkungsverlust wurde mit ECE erzielt, wenn z.B. Leucin durch Isoleucin ersetzt wurde (Keller *et al.*, 1996). Durch die Entfernung der Rhamnosyleinheit aus Phosphoramidon konnte eine Zunahme der Wirksamkeit gegen Thermolysin und ECE beobachtet werden (Kam *et al.*, 1979; Pollock *et al.*, 1992). Der Ersatz des L-Rhamnosyl-1-phosphats mit Naphthalin mono- oder dicarboxyimidoethylgruppen verbunden mit einem Methylphosphorsäure-Analogen verursachte eine 3-fach niedrigere halbmaximale Inhibitor-Konzentration (IC_{50}) als Phosphoramidon, zeigte jedoch eine verbesserte Selektivität für ECE gegenüber NEP 24.11 (Keller *et al.*, 1996). Berichten zufolge wurden in jüngerer Zeit somit hochselektive ECE-Inhibitoren *in vitro* und in verschiedenen Tiermodellen entwickelt und untersucht (Krum and Martin, 2007).

EINLEITUNG

Im Allgemeinen gehören die beiden Moleküle Phosphoramidon und Talopeptin zu einer kleinen faszinierenden und bekannten Gruppe strukturell unterschiedlicher Naturstoffe mit N–P-Bindungen (Abbildung 1.11) (Baulig *et al.*, 2019).

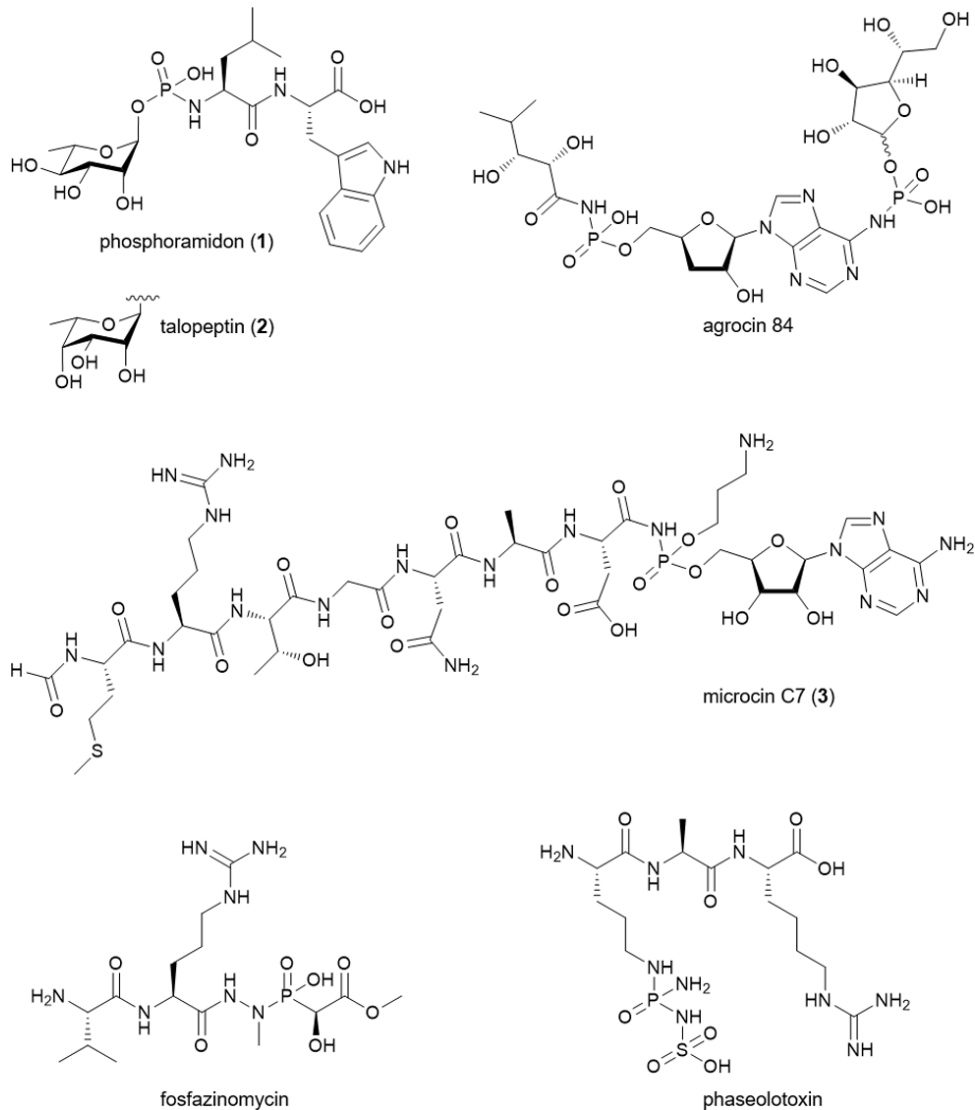


Abbildung 1.11 Ausgewählte Naturstoffen mit Phosphoramidat- oder Phosphonamideinheiten aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Natürlich vorkommende Phosphoramidate zeigen ein breites Bioaktivitätsspektrum, das der Rolle als Inhibitor bestimmter notwendiger Enzyme im Zellzyklus zugeschrieben wird.

Seit Jahrzehnten hat die Biosynthese solcher Verbindungen großes Interesse geweckt, und rasche Fortschritte beim Verständnis der enzymatischen Chemie des Aufbaus dieser N–P-Bindungen konnten durch die Entdeckung von Biosynthesegenclustern ermöglicht werden, vorallem für Microcin C7 ((3), Abbildung 1.11) in *Escherichia coli*

EINLEITUNG

(Novoa *et al.*, 1986; Gonzalez-Pastor *et al.*, 1995), Agrocin 84 in *Agrobacterium radiobacter* (Kim *et al.*, 2006), Fosfazinomycin in *Streptomyces* sp. WM6372 (Gao *et al.*, 2014) und Phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Aguilera *et al.*, 2007). Der enzymatische Mechanismus für die Bildung der N–P-Bindung ist bisher nur für den Naturstoff Microcin C7 ((3), Abbildung 1.11), einem Peptid-Antibiotikum-Inhibitor der Proteinsynthese, genauer bekannt. Hier verbindet das Phosphoramidat eine C-terminale Adenosinmonophosphateinheit mit einem Peptidrückgrat mit sieben Resten (Abbildung 1.12). Der Asp-NH-AMP-„Warhead“ von Microcin C7 ((3), Abbildung 1.11) hemmt die Proteinsynthese, nachdem er durch proteolytische Spaltung in Zielzellen freigesetzt wurde (Metlitskaya *et al.*, 2006). Im vorgeschlagenen Mechanismus katalysiert das vom MccC7-Gencluster kodierte adenylierende Enzym MccB die Bildung der Phosphoramidatbindung eines Vorläuferpeptids und von AMP über die Erzeugung eines Succinimid-Intermediats und den Verbrauch von zwei ATP-Molekülen (Abbildung 1.12) (Roush *et al.*, 2008).

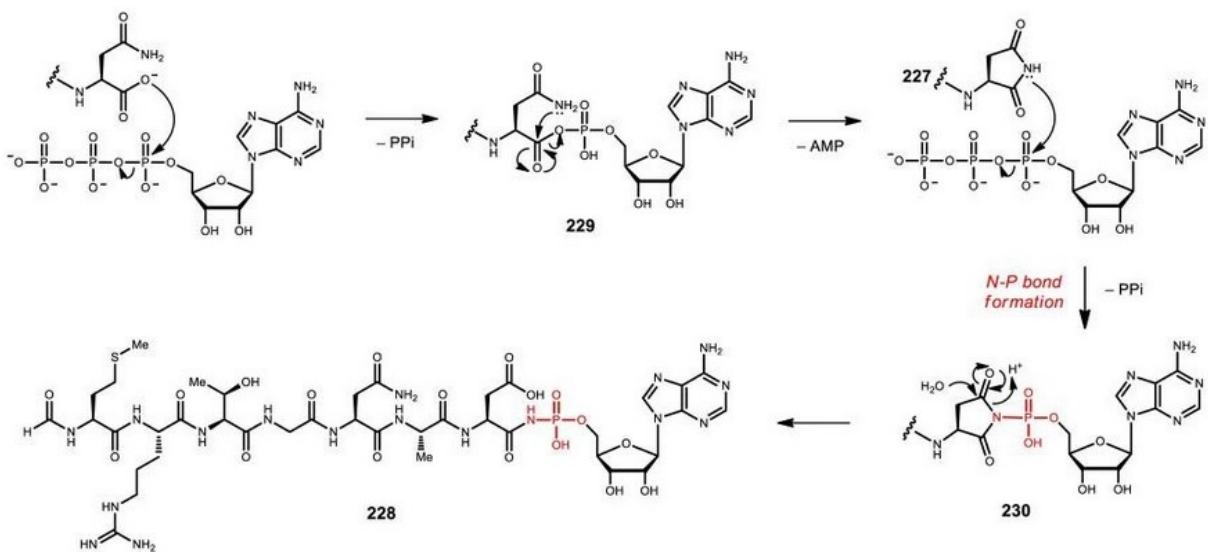


Abbildung 1.12 Vorgeschlagener Mechanismus der MccB-vermittelten N–P-Bildung in der Biosynthese von Microcin C7 nach (Waldman *et al.*, 2017). Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. Gedruckt mit Genehmigung von © 2017 American Chemical Society.

Zuerst wird das C-terminale Carboxylat des Vorläuferpeptids durch ATP aktiviert, um ein Acyladenylat-Zwischenprodukt (229) zu bilden (Abbildung 1.12). Das Stickstoffatom der β -Carboxamidogruppe greift dann das aktivierte Carbonyl an, setzt AMP frei und bildet das Succinimid-Intermediat (227). Anschließend greift das Stickstoffatom der Succinimidylgruppe die α -Phosphatgruppe eines zweiten ATP-Äquivalents an, um die

N–P-Bindung zu bilden und (230) zu bilden. Dieses Intermediat wird anschließend hydrolysiert, um (228) zu erhalten, ein spätes Intermediat in der Microcin C7-Biosynthese ((3), Abbildung 1.11) (Gonzalez-Pastor *et al.*, 1995; Roush *et al.*, 2008; Waldman *et al.*, 2017). Auf der Grundlage von Untersuchungen zur Fosfazinomycin-Biosynthese wurden eine Biosyntheselogik und potenzielle Enzyme für die Installation einer N–P-Bindung vorgeschlagen. Die dabei verwendete Biosynthesestrategie scheint den nukleophilen Angriff eines distalen Stickstoffatoms eines Hydrazids auf ein aktiviertes, elektrophiles Phosphoratom zu beinhalten, das durch ein ATP-abhängiges Enzym vermittelt wird. Die Konstruktion wäre analog zu derjenigen, die bei der Biosynthese von Microcin C7 beobachtet wird. Jedoch gibt es noch keine experimentellen Beweise, die diesen Vorschlag stützen (Waldman *et al.*, 2017). Erste bioinformatische Analysen des Phaseolotoxin-Genclusters legen nahe, dass sogenannte Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthase/Pyruvat, Phosphatdikinase (PPDK)-Homologe mögliche Enzym-Kandidaten für die Bildung der drei N–P-Bindungen in Phaseolotoxin sind (siehe Dissertation R. F. Roush, Cambridge, MA, 2011). Zudem zeigt ein neuartiges phosphorhaltiges Antimykotikum namens JU-2, aus *Streptomyces kanamyceticus* M8, welches nicht als Protease-Inhibitor bekannt ist, einen ähnlichen Kern mit einem Phosphoramidat, das ein Peptid und Zucker verbindet. Es wird wahrscheinlich durch vergleichbare Mechanismen hergestellt, möglicherweise mit anschließender Hydrolyse der Zuckerphosphatesterbindung (Datta *et al.*, 2001). Der genaue biosynthetische Ursprung bleibt bisher unbekannt (siehe auch Dissertation R. F. Roush, Cambridge, MA, 2011).

Angesichts des strukturellen Unterschieds zu Microcin C7 ((3), Abbildung 1.11) und des Fehlens einer Adenylgruppe spekulierten wir über eine neuartige Biosynthesestrategie zur Bildung der Phosphoramidatbrücke in Phosphoramidon und Talopeptin. In Anbetracht ihrer einzigartigen Strukturmerkmale muss die N–P-Bindung nach einer anderen Logik als die durch MccB im Microcin C7-Biosyntheseweg veranschaulichten Weg gebildet werden (Baulig *et al.*, 2019). Die Erforschung dieses Biosynthesewegs war ein wichtiges Thema meiner Doktorarbeit.

1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die beiden Hauptziele dieser Arbeit waren die Untersuchung von neuen Epoxyketon-Derivaten aus „orphan“ Biosynthesegenclustern und die Charakterisierung der Biosynthese von Phosphoramidat-Metalloprotease-Inhibitoren aus Actinobakterien.

Zielstellung 1: Untersuchung von neuen Epoxyketon-Derivaten aus „orphan“ Biosynthesegenclustern

Eine namhafte Klasse von Proteasom-Inhibitoren für natürliche Stoffe sind die Peptidyl-Epoxyketone, wie das Epoxomicin (Hanada *et al.*, 1992) und das Eponemycin (Sugawara *et al.*, 1990). Diese klinisch wirksamen Verbindungen sind ausschlaggebend für die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Krebs und Infektionen. Für die „Genome-Mining“-Kampagne zur Entdeckung von Proteasom-Inhibitoren konzentrierte sich die Arbeitsgruppe um Prof.Dr. Leonard Kaysser (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) in vorherigen Arbeiten auf die bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntem Biosynthesewege von Epoxyketonen. Die dabei identifizierten Biosynthesegencluster von Epoxomicin und Eponemycin bestehen aus kleinen hybriden nicht-ribosomalen Peptidsynthetase/Polyketidsynthetase (NRPS/PKS)-Systemen, die mit der mutmaßlichen Bildung der Kernstruktur der Verbindungen übereinstimmen (Schorn *et al.*, 2014), und zeigten die Beteiligung von konservierten Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD)-ähnlichen Enzymen an der Bildung des einzigartigen α' , β' -Epoxyketons (Zettler *et al.*, 2016).

Der erste Teil der Arbeit konnte auf diesen Vorarbeiten aufbauen. EpnF, die ACAD, welche für die Bildung von Epoxyketonen als essentiell erachtet wird, wurde als spezifische Sonde für eine BLAST-Sequenzhomologiesuche in der NCBI-Datenbank verwendet. Dabei wurden eine Reihe homologer Gencluster in verschiedenen Bakterien lokalisiert. Das allgemeine Ziel dieser Studie war es, neue Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren aus „orphan“ Biosynthesegencluster diverser *Streptomyces*-Stämmen genauer zu untersuchen. Dazu isolierten wir vier vielversprechende homologe Gencluster aus *Streptomyces* zur weiteren Erkundung:

- Erzeugung und Screening von vier Fosmid-Bibliotheken aus der genomischen DNA von *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces*

EINLEITUNG

achromogenes NRRL B-2120, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646.

- Etablierung hypothetischer Modelle für die Biosynthesewege neuer Epoxyketon-Derivate unter Anwendung von antiSMASH.
- Heterologe Expression der gefundenen Gencluster in diversen *Streptomyces*-Wirtsstämmen und anschließender LC-MS/MS-Analyse von Kulturextrakten.
- Identifizierung neuer Eponemycin-Derivate u. a. durch „MS Molecular Networking“ (Ansatz der vergleichenden Metabolomik in einem heterologen System mittels LC-MS/MS-Analysen) mit Hilfe von Dr. Florian Zubeil (Institut für organische Chemie, Universität Tübingen).
- Aktivierung der Gencluster durch Generierung einer Reihe von Knockout-Mutanten der putativen regulatorischen Gene im *b-2517*-Gencluster und sowie *s-646*-Gencluster.
- Aktivieren des *s-1022*-Genclusters durch einbringen eines induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors.

Um in einem letzten Schritt dieses Projekts die vorhergesagten homologen „orphan“ Biosynthesewege, welche die Bildung von Epoxyketon-Derivaten versprochen, auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der β 5-Untereinheit (Chymotrypsin-ähnlich) des *Saccharomyces cerevisiae* 20S-Proteasoms zu untersuchen, war folgender Versuch notwendig:

- Untersuchung der Kulturextrakte mittels eines etablierten Proteasom-Inhibitor-Assays in Kooperation mit Dr. Nicole Staudt (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen).

Zielstellung 2: Untersuchung und Charakterisierung der Biosynthese von Phosphoramidat-Metalloprotease-Inhibitoren aus Actinobakterien

Die beiden chemischen Verbindungen Talopeptin (Murao *et al.*, 1980) und Phosphoramidon (Umezawa *et al.*, 1972) gehören zur Klasse von Metalloprotease-Inhibitoren. Sie enthalten ein L-Leu-L-Trp-Dipeptidrückgrat, das über eine Phosphoramidatbrücke eindeutig mit einem 6-Desoxyzucker verknüpft ist (Weaver *et al.*, 1977). Bis heute stellen solche ausergewöhnlichen Verbindungen ein geeignetes pharmakologisches Instrument in der Forschung dar. In Naturstoffen sind solche Bindungen jedoch vergleichsweise selten und über ihre Biosynthese ist wenig bekannt (Waldman *et al.*, 2017).

Das allgemeine Ziel dieser Studie war es, Einblicke in die Biosynthese des Metalloprotease-Inhibitors Talopeptin zu erhalten. Dazu musste das biosynthetische Gencluster identifiziert werden. Dieser Teil der Arbeit konnte auf Vorarbeiten aufbauen. Zunächst wurde das Genom des Produzentenstammes *Streptomyces mozunensis* MK-23 mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Kalinowski am CeBiTec der Universität Bielefeld analysiert und sequenziert. Im Anschluss gelang es der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Leonard Kaysser (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen), durch die Entwicklung einer spezifischen Sonde (Cpz31, Rhamnosyltransferase) für das „Genome-Mining“, das Talopeptin-Biosynthesegencluster zu identifizieren (Baulig *et al.*, 2019). Um die Identität des mutmaßlichen Genclusters an der Biosynthese von Talopeptin zu bestätigen, wurden folgende Strategien verfolgt:

- Konstruktion einer Fosmid-Bibliothek aus genomischer DNA von *S. mozunensis* MK-23.
- Screening und Identifizierung eines Fosmid-Klons welches das komplette Talopeptin-Gencluster enthält in Zusammenarbeit mit Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen).
- Funktionsnachweis der Identität des Talopeptin-Genclusters durch Gendeletionsexperimente und heterologe Expression in *Streptomyces* sp. MK730-62F2 in Zusammenarbeit mit Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen).
- Bestimmung der Grenzen des Talopeptin-Genclusters durch Gendeletionsexperimente.

EINLEITUNG

- Postulierung eines Modells für die Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin.
- Analyse von Kulturextrakten zur Identifizierung von Phosphoramidon und Talopeptin mittels LC-MS/MS in Kooperation mit Andreas Kulik (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Universität Tübingen).

Mein zweites Ziel war es, die genaue Rolle des mutmaßlichen ATP-grasp-Enzyms (TalD) als Dipeptidsynthetase in der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin eindeutig zuzuordnen. Zudem wollte ich den Einfluss der mutmaßlichen Phosphoryltransferase TalE und die Bedeutung der mutmaßlichen Glycosyltransferase TalC näher untersuchen. Damit hoffte ich, den Biosynthesemechanismus, der die einzigartige Desoxyzucker-Phosphoramidateinheit auf das L-Leu-L-Trp-Dipeptid installiert, nachweisen zu können, und neue Strukturanaloga von Phosphoramidon bzw. Talopeptin herzustellen. Für diese Aufgabe sollten folgende Versuche durchgeführt werden:

- Chemische Komplementierung von Kulturen der $\Delta talD$ -Mutante mit einem synthetischen L-Leu-L-Trp-Dipeptid.
- Heterologe Expression und Reinigung der mutmaßlichen Phosphoryltransferase TalE und der Glycosyltransferase TalC.
- *In vitro*-Studien zur biochemischen Charakterisierung von TalE als eine Phosphoramidat-bildende Kinase.
- Strukturaufklärung des erhaltenen TalE-Produkts durch NMR-Analyse in Zusammenarbeit mit Irina Helmle und Prof. Dr. Harald Groß (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen).
- *In vitro*-Untersuchungen der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetischen Vorläufer-Analoga.
- *In vitro*-Studien zur Rolle von TalC bei der Bindung der Rhamnosyleinheit in der Phosphoramidon-Biosynthese.
- Co-Expression des Talopeptin-Genclusters und Genen aus verschiedenen Desoxyzucker-Biosynthesen zur heterologen Produktion von Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Derivaten.

2 ERGEBNISSE

2.1 UNTERSUCHUNG NEUER EPOXYKETON-BIOSYNTHESEGENCLUSTER

2.1.1 Generierung und Screening von vier Fosmid-Bibliotheken

Mit der Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD, EpnF aus dem Eponemycin-BGC) als spezifische Sonde für das „Genome-Mining“ wurden eine Reihe von Genclustern mit Homologen von Genen verschiedener Bakterien, die an der Epoxyketon-Biosynthese beteiligt sind, durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Leonard Kaysser (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) identifiziert (Anhang Abbildung 7.11). Vier dieser „orphan“ Biosynthesegencluster in *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517, in *Streptomyces achromogenes* NRRL B-2120, in *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und in *Streptomyces* sp. NRRL S-646 weckten, aufgrund ihrer ungewöhnlichen nicht-linearen NRPS/PKS-Assemblierungslinie oder eines beispiellosen Aminosäureeinbaus, besonders unser Interesse und versprachen die Bildung neuer Epoxyketonmoleküle (Anhang Abbildung 7.11). Um die identifizierten Biosynthesewege genauer charakterisieren zu können, wurden perfekt passende Primer auf eine pCC1FOS-basierte genomische Bibliothek von *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *S. achromogenes* NRRL B-2120, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 konstruiert. Es konnten positive Fosmide aus einer Fosmid-Bibliothek mit 2640 Klonen im Falle von *Streptomyces* sp. NRRL B-2517, mit 1000 Klonen im Falle von *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und mit 1024 Klonen im Falle von *Streptomyces* sp. NRRL S-646 mittels PCR identifiziert werden. Durch Endsequenzierungs- und Restriktionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass der Fosmid-Klon 6H7 (B-2517), der Fosmid-Klon 6A2 (S-1022) und der Fosmid-Klon 18F1 (S-646) das jeweilige putative „Epoxyketon“-Cluster trägt. Leider konnte kein positiver Fosmid-Klon aus einer Fosmid-Bibliothek im Falle von *S. achromogenes* NRRL B-2120 gefunden werden, welcher das homologe Gencluster für die Bildung eines möglichen neuen bioaktiven Derivats trägt. Im Verlauf dieser Dissertation wurden die Arbeiten mit den drei Fosmid-Klonen 6H7, 6A2 und 18F1 fortgesetzt.

2.1.2 Sequenzanalyse des *b-2517*-Genclusters

Die Sequenzierung des Fosmid-Klons ergab ein 21,6-kb-Insert mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 70,11%, ähnlich zu anderen Sequenzen aus *Streptomyces*-DNA. Mittels der lokalen BLAST-Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1997) und der GC-Frame-Plot-Methode (Bibb *et al.*, 1984) wurden 11 offene Leserahmen (ORFs) gefunden (Abbildung 2.1). Das Cluster kodiert für ein putatives hybrides nicht-ribosomales Peptidsynthetase/Polyketidsynthase (NRPS/PKS)-System. Das Vorhandensein eines alleinigen putativen Typ-I-PKS-Moduls (B-2517J) sowie einer diskreten TE (B-2517G) gemeinsam mit dem Homolog der ACAD (B-2517F) deuteten anfänglich auf die Verbindung eines neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors hin.

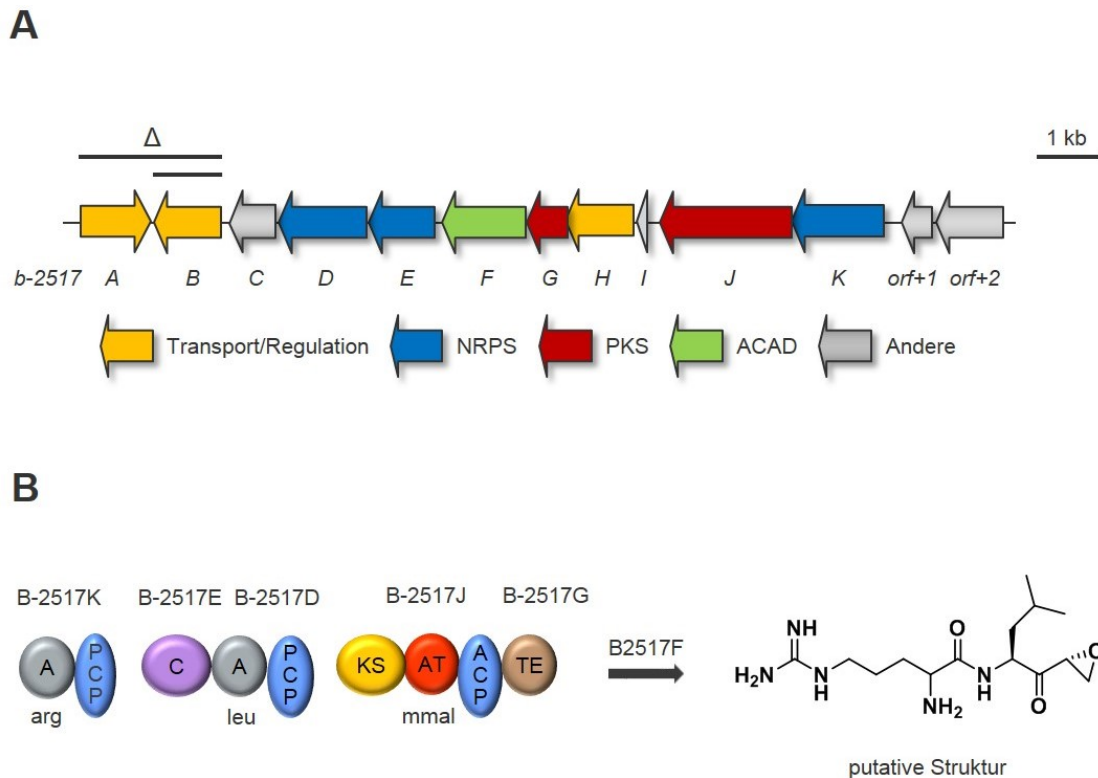


Abbildung 2.1 Biosynthese eines Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors durch *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517. (A) Organisation des *b-2517*-BGC aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517. Balken über dem Cluster markieren die in dieser Studie durchgeführten Gendeletionen (Δ). Gefärbte Gene entsprechen ihrer biosynthetischen Zuordnung (Tabelle 2.1). ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; PKS = Polyketidsynthase. (B) Vorgeschlagene Synthese der NRPS/PKS-Assemblierungslinie des neuen putativen “Epoxyketonmoleküls”. A: Adenylierungs-Domäne; ACP: Acyl-Carrier-Protein; AT: Acyltransferase-Domäne; C: Kondensations-Domäne; KS: Ketosynthase; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase.

ERGEBNISSE

Da die Domänen der putativen NRPS-Module im Cluster auf mehreren getrennten Genen (*b-2517D*, *b-2517E* und *b-2517K*) kodiert sind, erschwert die nicht-lineare NRPS-Assemblierungslinie eine genaue Voraussage und Reihenfolge der Aminosäuren der erzeugten Peptidstruktur. Die Biosynthese eines Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors durch *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517 ist bisher unbekannt. Die vorgeschlagenen Funktionen aller annotierten Gene und die besten Übereinstimmungen bei der Homologiesuche sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1 Abgeleitete Funktionen der Gene des *b-2517*-Genclusters.

Gen	Protein-Homolog	Identität/ Ähnlichkeit ^[a]	Vorhergesagte Funktion
<i>b-2517A</i>	C2142_31790, <i>Streptomyces</i> sp. CB01881	54/53	SARP-Familie TR
<i>b-2517B</i>	C2142_31790, <i>Streptomyces</i> sp. CB01881	51/70	SARP-Familie TR
<i>b-2517C</i>	ASC99_RS26510, <i>Kitasatospora</i> sp.	59/91	Hypotetisches Protein
<i>b-2517D</i>	IF92_RS0109220, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-1448	49/65	NRPS
<i>b-2517E</i>	ADK70_RS33250, <i>Streptomyces rimosus</i>	55/99	NRPS
<i>b-2517F</i>	EpnF, <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	44/99	ACAD
<i>b-2517G</i>	AQJ64_RS43445, <i>Streptomyces griseoruber</i>	54/88	Thioesterase
<i>b-2517H</i>	EYS09_RS33095, <i>Streptomyces</i> sp. AM-2504	52/62	MFS-Transporter
<i>b-2517I</i>	BS80_RS08980, <i>Kitasatospora mediocidica</i>	65/91	MbtH Protein
<i>b-2517J</i>	BS80_RS32735, <i>Kitasatospora mediocidica</i>	54/97	Typ-I-PKS
<i>b-2517K</i>	BS80_RS32720, <i>Kitasatospora mediocidica</i> KCTC 9733	50/86	NRPS
<i>orf+1</i>	IF30_RS0109895, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-350	85/99	Maleylpyruvat- Isomerase
<i>orf+2</i>	IF30_RS0109890, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-350	93/99	Aldehyd- Dehydrogenase

[a] = Aminosäuresequenzhomologie [%] aus der Blastp-Analyse; ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; MFS = Major-Facilitator-Superfamilie; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; *orf* = open reading frame (offener Leserahmen); PKS = Polyketidsynthase; SARP = *Streptomyces* Antibiotikum regulatorisches Protein; sp. = Spezies; TR = Transkriptionsregulator; fettgedruckte Gene könnten das vorgeschlagene *b-2517*-Gencluster repräsentieren.

ERGEBNISSE

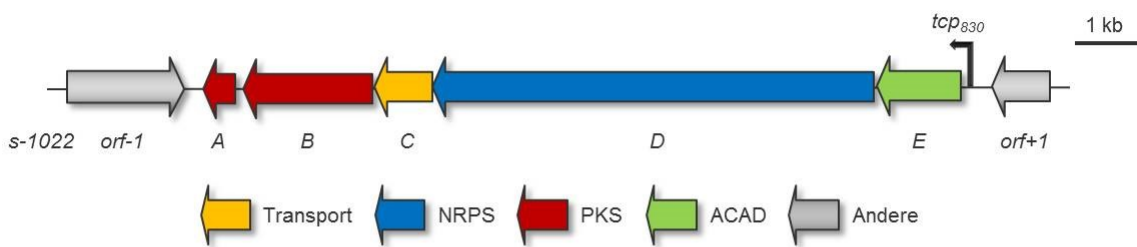
Die Analyse des putativen "Epoxyketon"-Genclusters von *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517 ergab, dass das Cluster wie vorgeschlagen mit den Genen *b-2517A* und *b-2517B* beginnen würde, welche für einen Regulator der SARP-Familie kodieren. Die SARP-Familie ist eine bekannte Gruppe von Transkriptionsaktivatoren. SARPs binden wiederholte Motive über ihre Transkriptionsregulator-Protein-Domäne (TRC-Domäne), die ein geflügeltes Helix-Turn-Helix-DNA-Bindungsmotiv aufweist, und die angrenzende Transkriptionsaktivator-Domäne (BTAD-Domäne) aktiviert die Expression von Ziel-Antibiotika-Biosynthesegenen (Wietzorrek and Bibb, 1997; Arias *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2013). Die Gene, *b-2517D* und *b-2517E* kodieren für eine modulare NRPS-Assemblierungslinie. Dabei besteht *B-2517D* aus einer A-Domäne und einem PCP und *B-2517E* bemerkenswerterweise nur aus einer C-Domäne. Die bioinformatische Untersuchung von *B-2517D* legt die Aktivierung von Leucin durch die A-Domänen des Genclusters nahe. Desweiteren weist *B-2517K* eine alleinstehende A-Domäne und ein PCP auf. Es konnte keine funktionsfähige C-Domäne gefunden werden. Die bioinformatische Analyse der A-Domänen des Genclusters legt nahe, dass *B-2517K* Arginin aktiviert. Das im Folgenden genannte Gen *b-2517J* kodiert für die Anwesenheit eines einzigen putativen PKS-Moduls bestehend aus einer Ketosynthase (KS), einer Methylmalonyl-CoA-spezifischen AT-Domäne, einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) und einer alleinstehenden TE (*B-2517G*). Durch das Fehlen einer cMT im putativen PKS-Modul *B-2517J*, scheint die substituierte Epoxyeinheit aller Voraussicht nach von Methylmalonyl-CoA abzustammen. Das *b-2517*-Gencluster in *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517 besitzt zudem ein weiteres Gen (*b-2517F*), welches eine gewisse Homologie zu dem konservierten ACAD-Gen *epnF* aus dem Gencluster des Proteasom-Inhibitors Eponemycin (Schorn *et al.*, 2014) aufzeigt. Hier konnte gezeigt werden, dass die ACAD des Eponemycin-Clusters, einen entscheidenden Einfluss bei der Umwandlung eines Dimethyl- β -Ketosäure-Derivats zu einem α -Methyl- α' , β' -Epoxyketon hat (Liu *et al.*, 2015; Zettler *et al.*, 2016). Bei näherer Betrachtung des Reaktionsmechanismus der Epoxyketonsynthase *EpnF* konnte ein bis dato beispielloser Flavin-abhängiger Decarboxylierungs-, Dehydrierungs- und Monooxygenierungs-Mechanismus beobachtet werden (Zabala *et al.*, 2016). Weiterhin hat das im Folgenden genannte *b-2517H*-Gen eine hohe Identität (97%) zu einem Major-Facilitator-Superfamilie (MFS)-Transporter aus *Streptomyces* sp. AM-2504. Dieser könnte am Epoxyketon-Export beteiligt sein (Saidijam *et al.*, 2006). Zudem kodieren im *b-2517*-Cluster Gene für ein hypothetisches Protein (*B-2517C*) ein MbtH-Protein (*B-2517I*) eine Maleylpyruvat-Isomerase (*Orf+1*)

und eine Aldehyd-Dehydrogenase (Orf+2), welche jedoch keine entscheidene Rolle bei einer Epoxyketon-Biosynthese aufzeigen. Theoretisch könnte davon ausgegangen werden, dass die mutmaßlichen Gene *b-2517A* bis *b-2517K* an der vorgeschlagenen Biosynthese eines neuen Epoxyketonmoleküls beteiligt sind.

2.1.3 Sequenzanalyse des *s-1022*-Genclusters

Die Sequenzierung des Fosmid-Klons ergab ein 22,0-kb-Insert mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 70,23%. Durch die *in silico*-Analyse mit Hilfe der lokalen BLAST-Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1997) und der GC-Frame-Plot-Methode (Bibb *et al.*, 1984) wurden 5 ORFs gefunden, von denen drei für eine putative hybride NRPS/PKS-Assemblierungslinie kodieren. Die Anwesenheit eines putativen Typ-I-PKS-Moduls (S-1022B) mit einer diskreten TE (S-1022A) zusammen mit dem Homolog der ACAD (S-1022E), schlug zunächst die Synthese eines neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors vor (Abbildung 2.2).

A



B

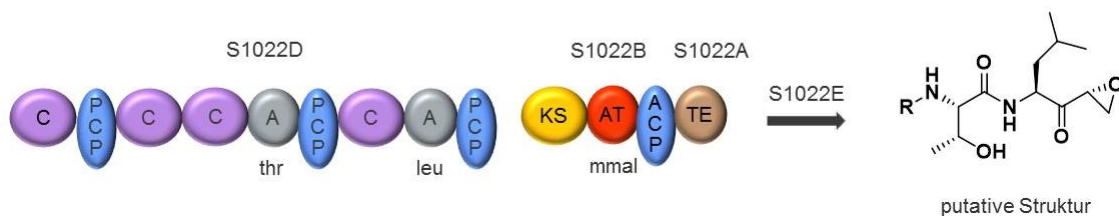


Abbildung 2.2 Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-1022. (A) Aufbau des *s-1022*-BGC aus *Streptomyces* sp. NRRL S-1022. Balken über dem Cluster markieren die in dieser Studie durchgeführten Gendelektionen (Δ). Bunt markierte Gene entsprechen ihrer biosynthetischen Zuordnung (Tabelle 2.2). ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; PKS = Polyketidsynthase. (B) Voraussichtliche Synthese der NRPS/PKS-Assemblierungslinie des neuen putativen "Epoxyketonmoleküls". A: Adenylierungs-Domäne; ACP: Acyl-Carrier-Protein; AT: Acyltransferase-Domäne; C: Kondensations-Domäne; KS: Ketosynthase; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase.

ERGEBNISSE

Die Domänen der zwei putativen NRPS-Module sind im Cluster auf einem einzigen Gen kodiert (*s-1022D*), welches die Voraussage und Abfolge der Aminosäurezusammensetzung des neu entstandenen Peptids erleichtern sollte. Die Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 ist bislang nicht bekannt. Die vorgeschlagenen Funktionen aller annotierten Gene und die besten Übereinstimmungen bei der Homologiesuche sind in Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2 Abgeleitete Funktionen der Gene des *s-1022*-Genclusters.

Gen	Protein-Homolog	Identität/ Ähnlichkeit ^[a]	Vorhergesagte Funktion
<i>orf-1</i>	IF34_RS19620, <i>Streptomyces griseofuscus</i>	89/64	Hypotetisches Protein
<i>s-1022A</i>	D187_RS39950, <i>Cystobacter fuscus</i>	59/92	Thioesterase
<i>s-1022B</i>	H293_RS0137980, <i>Streptomyces canus</i>	88/99	Typ-I-PKS
<i>s-1022C</i>	H293_RS0137985, <i>Streptomyces canus</i>	87/86	MFS-Transporter
<i>s-1022D</i>	EpxD, <i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	44/83	NRPS
<i>s-1022E</i>	EpxF, <i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	52/93	ACAD
<i>orf+1</i>	SSF3_RS33370, <i>Streptomyces viridosporus</i> ATCC 14672	82/68	Hypotetisches Protein

[a] = Aminosäuresequenzhomologie [%] aus der Blastp-Analyse; ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; MFS = Major-Facilitator-Superfamilie; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; *orf* = open reading frame (offener Leserahmen); PKS = Polyketidsynthase; fettgedruckte Gene könnten das vorgeschlagene *s-1022*-Gencluster repräsentieren.

Wie vorgeschlagen, würde das putative "Epoxyketon"-Genclusters von *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 mit einer TE (*S-1022A*) gefolgt von einem einzigen putativen PKS-Modul (*S-1022B*) beginnen. *S-1022B* besteht aus einer KS, einer Methylmalonyl-CoA-spezifischen AT-Domäne und einem ACP. Da das putative PKS-Modul *S-1022B* keine cMT-Domäne besitzt, leitet sich die substituierte Epoxyeinheit mutmaßlich von Methylmalonyl-CoA ab. Das vorhergesagte Genprodukt von *s-1022C* kodiert für die Anwesenheit eines MFS-Transporters. Dieses Protein könnte für den Epoxyketon-Export verantwortlich sein, da solche MFS-Transporter bekanntlicherweise am Austritt von chemischen Verbindungen beteiligt sind (Pao *et al.*, 1998). Das Folgende, mit *s-1022D*

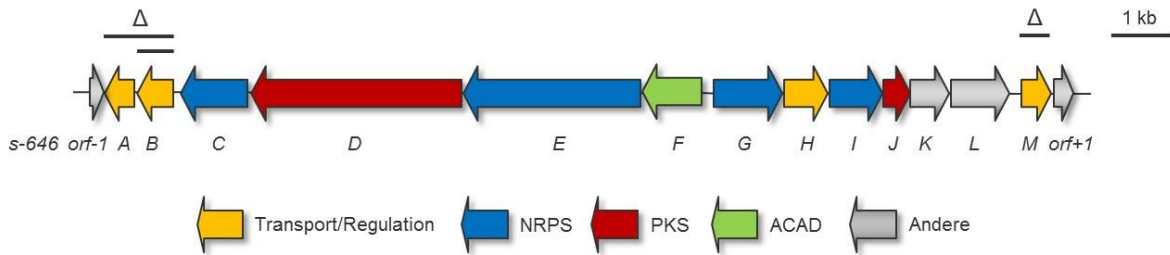
bezeichnete Gen, besteht aus zwei NRPS-Modulen. Die bioinformatische Analyse der A-Domänen des Genclusters legt die Aktivierung von Threonin und Leucin nahe. Anliegend konnten zwei weitere C-Domänen und ein PCP lokalisiert werden. Zudem besitzt das *s-1022*-Gencluster ein Gen (*s-1022E*), welches eine bestimmte Homologie zu der konservierten ACAD (EpnF) aus dem Eponemycin-Gencluster zeigt (Schorn *et al.*, 2014; Zettler *et al.*, 2016). Sowohl am linken als auch am rechten Ende des *s-1022*-Clusters fanden wir offene Leserahmen, die als *orf-1* und *orf+1* bezeichnet wurden. Diese kodieren jeweils für ein hypothetisches Protein und weisen keine Homologien zu Proteinen mit ersichtlicher Funktion an einer Epoxyketon-Biosynthese auf. Man könnte spekulieren, dass die putativen Gene *s-1022A* bis *s-1022E* an der vorgeschlagenen Bildung eines neuen Epoxyketons zugehörig sind.

2.1.4 Sequenzanalyse des *s-646*-Genclusters

Die Sequenzierung des Fosmid-Klons ergab ein 32,0-kb-Insert mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 70,34%, ähnlich zu anderen Sequenzen aus *Streptomyces*-DNA. Durch die lokalen BLAST-Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1997) und der GC-Frame-Plot-Methode (Bibb *et al.*, 1984) wurden 13 ORFs lokalisiert. Das Gencluster kodiert für eine putative hybride NRPS/PKS-Assemblierungslinie. Das Vorkommen eines einzigen putativen PKS-Moduls (S-646D), einer diskreten TE (S-646J) gemeinsam mit dem Homolog der ACAD (S-646F) legten anfangs die Herstellung eines neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors nahe (Abbildung 2.3). Die Domänen der drei modularen NRPS-Module sind im Cluster auf vier getrennten Genen kodiert (*s-646C*, *s-646E*, *s-646G* und *s-646I*). Diese nicht-lineare NRPS-Assemblierungslinie beeinträchtigt eine detaillierte Vorhersage und Anordnung der Aminosäuren des produzierten Peptids. Über die Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-646 ist bis jetzt nichts bekannt. Die vorgeschlagenen Funktionen aller annotierten Gene und die besten Übereinstimmungen bei der Homologiesuche sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

ERGEBNISSE

A



B

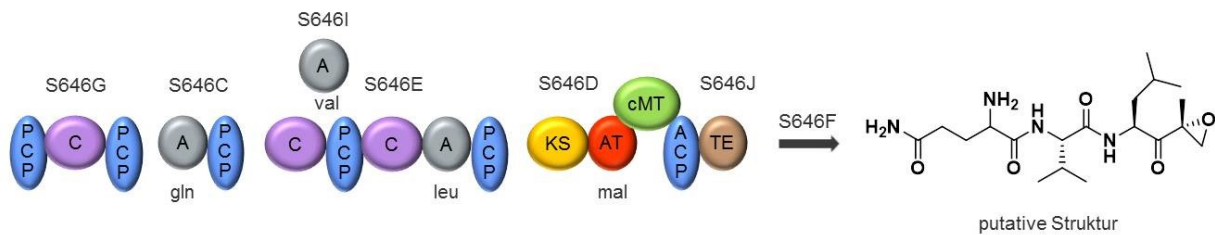


Abbildung 2.3 Biosynthese eines Epoxyketons durch *Streptomyces* sp. NRRL S-646. (A) Organisation des *s-646*-BGC aus *Streptomyces* sp. NRRL S-646. Balken über dem Cluster markieren die in dieser Studie durchgeführten Gendeletionen (Δ). Gene sind entsprechend ihrer biosynthetischen Zuordnung gefärbt (Tabelle 2.3). ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; PKS = Polyketidsynthese. (B) Vorgeschlagene Zusammensetzung der NRPS/PKS-Assemblierungslinie des neuen putativen “Epoxyketonmoleküls”. A: Adenylierungs-Domäne; ACP: Acyl-Carrier-Protein; AT: Acyltransferase-Domäne; C: Kondensations-Domäne; cMT: C-Methyltransferase-Domäne; KS: Ketosynthase; PCP: Peptidyl-Carrier-Protein; TE: Thioesterase.

Tabelle 2.3 Abgeleitete Funktionen der Gene des *s-646*-Genclusters.

Gen	Protein-Homolog	Identität/ Ähnlichkeit ^[a]	Vorhergesagte Funktion
<i>orf-1</i>	AQI70_RS07595, <i>Streptomyces curacoii</i>	91/49	Hypotetisches Protein
<i>s-646A</i>	OK074_RS12720, <i>Actinobacteria bacterium</i> OK074	73/76	SARP-Familie TR
<i>s-646B</i>	AMIS_RS11020, <i>Actinoplanes missouriensis</i>	43/99	LuxR-TR
<i>s-646C</i>	NI25_RS08205, <i>Streptomyces</i> sp. CCM_MD2014	70/92	NRPS
<i>s-646D</i>	EpxE, <i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	45/90	PKS
<i>s-646E</i>	EpxD, <i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	47/92	NRPS
<i>s-646F</i>	EpxF, <i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	47/90	ACAD
<i>s-646G</i>	SHJG_RS03245, <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	41/97	NRPS
<i>s-646H</i>	OK074_RS05930, <i>Actinobacteria bacterium</i> OK074	86/99	MFS-Transporter

ERGEBNISSE

s-646I	IF01_RS0127430, <i>Kitasatospora purpeofusca</i> NRRL B-1817	42/89	NRPS
s-646J	IQ63_RS27310, <i>Streptomyces acidiscabies</i>	71/86	Thioesterase
s-646K	IQ63_28280, <i>Streptomyces acidiscabies</i>	79/93	Aminotransferase
s-646L	OK074_RS05950, <i>Actinobacteria bacterium</i> OK074	81/99	2-Isopropylmalat-Synthase
s-646M	AQJ58_RS29870, <i>Streptomyces</i> sp. DSM 15324	45/30	LuxR-TR
<i>orf+1</i>	CLW09_RS34025, <i>Streptomyces</i> sp. 70	95/99	Hypotetisches Protein

[a] = Aminosäuresequenzhomologie [%] aus der Blastp-Analyse; ACAD = Acyl-CoA-Dehydrogenase; MFS = Major-Facilitator-Superfamilie; NRPS = nicht-ribosomale Peptidsynthetase; *orf* = open reading frame (offener Leserahmen); PKS = Polyketidsynthase; SARP = *Streptomyces* Antibiotikum regulatorisches Protein; sp. = Spezies; TR = Transkriptionsregulator; fettgedruckte Gene könnten das vorgeschlagene *s-646*-Gencluster repräsentieren.

Die genaue Untersuchung des identifizierten putativen "Epoxyketon"-Genclusters von *Streptomyces* sp. NRRL S-646 deutete darauf hin, dass das Cluster mit den bezeichneten Genen *s-646A* und *s-646B* beginnen würde, welche für einen Regulator der SARP-Familie (*s-646A*) (Wietzorrek and Bibb, 1997; Liu *et al.*, 2013) und LuxR-Familie (*s-646B*, sowie *s-646M*) kodieren. Es ist bekannt, dass LuxR-TR als Aktivatoren und/oder Repressoren wirken. LuxR ist ein Mitglied der TetR-Protein-Superfamilie und koordiniert die Expression einer Vielzahl von Genen (Pompeani *et al.*, 2008). LuxR-Typ-Proteine haben eine charakteristische Struktur, ein Carboxyl-terminales Modul zur Bindung spezifischer DNA-Stellen in der Nähe von Zielpromotoren und ein Amino-terminales Modul zur Bindung von Autoinducern (Chen and Xie, 2011). Beide Transkriptionsregulator-Proteine könnten wahrscheinlich am Epoxyketon-Export und an der Regulation der Biosynthese beteiligt sein. Direkt nach den genannten Genen befindet sich ein putatives Gen *s-646C*, das aus einer A-Domäne und einem PCP besteht. Eine C-Domäne konnte nicht gefunden werden. Bemerkenswerterweise ist eine alleinstehende C-Domänen (S-646G) mit zwei weiteren PCPs im Biosynthesecluster kodiert. Die bioinformatische Untersuchung von S-646C legt die Aktivierung von Glutamin durch die A-Domänen des Genclusters nahe. Die Domänen der zwei weiteren putativen NRPS-Module sind im Cluster durch die Gene *s-646E* und *s-646I* kodiert. Das mit *s-646E* bezeichnete Gen kodiert für zwei C-Domänen, einer A-Domäne und zwei PCPs. Die bioinformatische Analyse der A-Domänen von S-646E legt eine Aktivierung

von Leucin nahe. S-646I weist eine alleinstehende A-Domäne auf, welche für die Aktivierung von Valin zuständig ist und aller Voraussicht nach in die Struktur zwischen Glutamin und Leucin integriert werden könnte. Das im Folgenden mit *s-646D* bezeichnete Gen kodiert für ein putatives PKS-Modul zusammengesetzt aus einer KS, einer Malonyl-CoA-spezifischen AT-Domäne, und einer cMT, was darauf hindeuten könnte, dass die substituierte Epoxyeinheit von Malonyl-CoA und S-Adenosylmethionin stammen würde, einem ACP und einer TE (S-646J) (Zettler *et al.*, 2016). Das vorhergesagte Genprodukt von S-646F zeigt eine Homologie zu einer konservierten ACAD. Diese ist homolog zu dem ACAD-Gen *epnF* aus dem Gencluster des potenten Proteasom-Inhibitors Eponemycin (Schorn *et al.*, 2014; Zettler *et al.*, 2016). Weiterhin wurde im *s-646*-Cluster ein MFS-Transporter (S-646H) lokalisiert, welcher am Epoxyketon-Export beteiligt sein könnte (Pao *et al.*, 1998). Desweiteren kodieren eine Aminotransferase (S-646K), eine 2-Isopropylmalat-Synthase (S-646L), sowie zwei hypothetische Proteine (Orf-1 und Orf+1) am Anfang und am Ende des *s-646*-Clusters, welche keinen erkennbaren Einfluss auf eine Epoxyketon-Biosynthese haben. Es könnten also davon ausgegangen werden, dass nur die mutmaßlichen Gene *s-646A* bis *s-646M* für die vorgeschlagene Biosynthese eines neuartigen Epoxyketonmoleküls verantwortlich sind.

2.1.5 Heterologe Expression der putativen „Epoxyketon“-Gencluster

Um die Identität der drei einzelnen Cluster aus den Produzentenstämmen *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 zu bestätigen, wurde ein heterologer Expressionsansatz verwendet. Zu diesem Zweck ersetzten wir die Chloramphenicol-Resistenzgene im jeweiligen Fosmidrückgrat (6H7, 6A2 und 18F1) durch λ -RED-vermittelte Rekombination mit einer zuvor erzeugten Integrationskassette (Kaysser *et al.*, 2012). Die Genkassette (*int_neo*) besteht aus einer *attP*-Bindungsstelle, einem Integrasegen (*int*) des Bakteriophagen Φ C31, ein Kanamycin-Resistenzgen (*neo*) und einen Ursprung des Transfers (*oriT*) und ermöglicht somit die ortsspezifische Integration in die meisten *Streptomyces*-Chromosomen (Bierman *et al.*, 1992). Die resultierenden Fosmide *epnAB01*, *epnAB02* und *epnAB03* wurden durch intergenerische triparentale Konjugation in verschiedene *Streptomyces*-Wirtsstämmen, wie *Streptomyces albus* J1074, *Streptomyces coelicolor* M512 und *Streptomyces coelicolor* M1152 transferiert, (Flett *et al.*, 1997), um die besten Produktionsraten der gewünschten Verbindung zu erhalten (Daten nicht alle gezeigt).

ERGEBNISSE

Der gut charakterisierte heterologe Wirt *S. albus* J1074 etablierte sich in früheren Versuchen als bester Produzent (Schorn *et al.*, 2014). Drei einzelne kanamycinresistente Klone wurden jeweils ausgewählt, mit *S. albus* J1074/epnAB01(1–3), *S. albus* J1074/epnAB02(1–3) und *S. albus* J1074/epnAB03(1–3) bezeichnet und für die heterologen Produktion von möglichen Sekundärmetaboliten in *S. albus* J1074, und basierend auf vorherigen Erfahrungen und Literaturrecherchen, in dem R5-Modellmedium final kultiviert (Schorn *et al.*, 2014). Anschließend wurden die Ethylacetat-Kulturextrakte der Mutantenstämme mittels LC-MS und MS/MS (MS/MS-Daten nicht gezeigt) analysiert und mit den Stoffwechselprofilen des nativen Stamm *S. albus* J1074 verglichen. Die Ergebnisse der Basispeak-Chromatogramme (BPCs) ergaben eine Reihe neuer und identischer Massenpeaks in allen drei Mutanten (m/z 138,1 [M+H]⁺, t_R = 2,3 min; m/z 265,1 [M+H]⁺, t_R = 8,1 min; m/z 249,2 [M+H]⁺, t_R = 11,2 min; m/z 233,2 [M+H]⁺, t_R = 16,3 min und m/z 241,2 [M+H]⁺, t_R = 17,3 min) (Abbildung 2.4), die in *S. albus* J1074 nicht beobachtet wurden. Keiner der gefundenen Massen zeigte ein charakteristisches Fragmentierungsschema, um einem bestimmten Biosyntheseweg zugeordnet zu werden. Es konnten keine unterschiedlichen Massen in den analysierten Kulturextrakten der einzelnen Mutanten beobachtet werden. Die Resultate deuteten bis dato auf keine Produktion einer neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitor-Verbindung in anderen Bakterien hin. Durch die Expression von „orphan“ Genclustern in *S. albus* J1074 scheint zudem eine schnelle Identifikation des Produkts problematisch, da der Wirtsstamm eine Vielzahl von eigenen endogenen Sekundärmetaboliten produziert (Olano *et al.*, 2014). Für die chromatographischen Profile der Extrakte der Wildtyp-Stämme *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 konnten hinzu keine eindeutigen Massen beobachtet werden, die auf die Bildung eines neuen Epoxyketons hindeuteten. (Daten nicht gezeigt). Die Biosynthesegencluster (BGCs) scheinen bei heterologer Expression im Wildtyp-Stamm unter unseren Kulturbedingungen schwach oder gar nicht transkribiert zu werden. Daher wurden verschiedene Ansätze zur Identifizierung der Moleküle auch in geringen Mengen und zur möglichen Aktivierung der Gencluster vorgeschlagen.

ERGEBNISSE

Basispeak-Chromatogramme

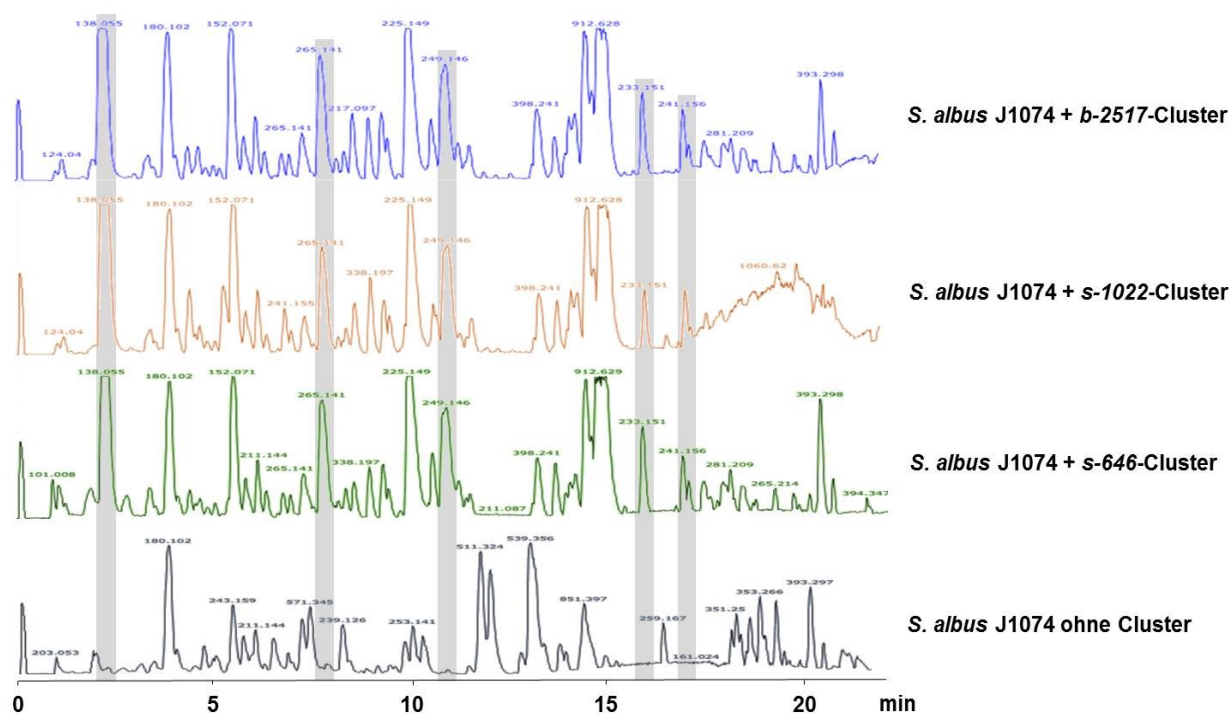


Abbildung 2.4 Dargestellt sind LC-MS-BPCs von Kulturextrakten von *S. albus* J1074-Wildtyp und clustertragender Mutanten. Neue Massenpeaks bei m/z 138,1 $[M+H]^+$, $t_R = 2,3$ min; m/z 265,1 $[M+H]^+$, $t_R = 8,1$ min; m/z 249,2 $[M+H]^+$, $t_R = 11,2$ min; m/z 233,2 $[M+H]^+$, $t_R = 16,3$ min und m/z 241,2 $[M+H]^+$, $t_R = 17,3$ in allen heterologen *S. albus* J1074-Mutanten sind in hellgrau hervorgehoben.

2.1.6 Identifizierung neuer Eponemycin-Verbindungen durch “MS Molecular Networking”

Dieser Teil der Doktorarbeit wurde mit Hilfe von Dr. Florian Zubeil (Institut für organische Chemie, Universität Tübingen) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephanie Grond durchgeführt. *S. albus* J1074 enthielt jeweils eins der drei putativen „Epoxyketon“-Gencluster und wir beobachteten eine Reihe zusätzlicher Massenpeaks in der LC-MS-Analyse (Abbildung 2.4). Angeregt durch die Aussicht auf neue Derivate des Eponemycins haben wir *S. albus* J1074/epnAB01, *S. albus* J1074/epnAB02 und *S. albus* J1074/epnAB03 verglichen mit *S. albus* J1074 und dem Eponemycin-Gencluster tragenden Fosmid epnLK01 (*S. albus* J1074/epnLK01) einem molekularen „MS Networking“ unterzogen, um vergleichende Stoffwechselprofile zu erstellen (Schorn *et al.*, 2014). Das Spektralnetzwerk-Paradigma wurde ursprünglich für die Anwendung in der Proteomik entwickelt (Bandeira *et al.*, 2007), jedoch kürzlich als allgemeines MS/MS-Datenanalyse-Tool angepasst (Guthals *et al.*, 2012; Watrous *et al.*, 2012). Ein molekulares Netzwerk wird basierend auf den Beziehungen von MS/MS-Spektren für

jedes Molekül erstellt, das durch Massenspektrometrie erfasst wird. Die molekularen Netzwerke, die wir aus den kombinierten Daten von *S. albus* J1074/epnAB01, *S. albus* J1074/epnAB02, *S. albus* J1074/epnAB03 und *S. albus* J1074 mit und ohne das *epn*-Gencluster generiert haben, wiesen zwar MS/MS-Cluster mit unterschiedlichen Massenfragmentierungen auf, jedoch repräsentierten die Cluster keine strukturell verwandten Moleküle zum Eponemycin (Daten nicht gezeigt). Keines der clustertragenden Mutanten bildete ein dichtes Netzwerk um die Masse von m/z 399.246 $[M+H]^+$ herum, welches für Eponemycin steht (Schorn *et al.*, 2014). Die Analyse der im Netzwerk enthaltenen MS/MS-Spektren deutete somit nicht auf Strukturderivate von Eponemycin hin. Durch die Ergebnisse der molekularen Vernetzung konnte kein Vorteil dieser neuen Technik für die vergleichende Metabolomik demonstriert werden.

2.1.7 Erzeugung von *in frame*-Gendeletionsmutanten und Einführung einer induzierbaren Promotorkassette in einem heterologen *Streptomyces*-Expressionssystem

Möglicherweise werden die klonierten Gencluster unter unseren Laborwachstumsbedingungen nicht transkribiert oder sind sogar stillgelegt. Um die Biosynthesewege der neuen putativen „Epoxyketonmoleküle“ zu aktivieren, arbeiteten wir an der genetischen Manipulation der clusterspezifischen regulatorischen Elemente. Die Expression vieler Biosynthesegencluster wird durch clusterassoziierte Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren gesteuert. Das Löschen von clusterspezifischen Repressor- und/oder Aktivator-Genen kann daher eine vielversprechende Methode zur Aktivierung stiller Biosynthesegencluster sein (Yamanaka *et al.*, 2014). Demnach wurden eine Reihe von Knockout-Mutanten für die putativen regulatorischen Gene der zwei Gencluster aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 erstellt. Zum Beispiel weisen die Gene *s-646B* und *s-646M* eine Homologie zu LuxR-TRs auf, die aus anderen Sekundärmetaboliten-Genclustern bekannt sind (Chen *et al.*, 2003). Angesichts der Tatsache, dass LuxR-ähnliche Regulatoren zum Beispiel in der Lage sind, eine Vielzahl von Genen sowohl zu aktivieren als auch zu unterdrücken (Pompeani *et al.*, 2008), vermuteten wir dass die Expression des entsprechenden Genclusters *s-646* durch den LuxR-Regulator möglicherweise unterdrückt wird. Obwohl bekannt ist, dass SARP-Regulatoren Transkriptionsaktivatoren sind (Wietzorrek and Bibb, 1997), scheinen die S-646A-, B-2517A- und B-2517B-SARP-TRs die Biosynthese eines neuen Eponemycin-Derivats in

ERGEBNISSE

unserem Fall nicht zu steuern. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die fehlende Aktivierung der regulatorischen Bereiche. Zu diesem Zweck wurden die Gene *s-646A* und *s-646B*, sowie nur *s-646B* und nur *s-646M* einzeln auf dem Fosmid epnAB03 und die Gene *b-2517A* und *b-2517B*, sowie lediglich *b-2517B* einzeln auf dem Fosmid epnAB01 durch eine Apramycin-Resistenzkassette unter Verwendung des PCR-Targeting-Systems ersetzt (Gust *et al.*, 2003). *In frame*-Deletionen wurden durch anschließende Entfernung der Kassette durch FLP-Rekombination erhalten (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Ein weiterer gängiger Ansatz zur Aktivierung stiller kryptischer Biosynthesegencluster beinhaltet gewöhnlich den Ersatz der natürlichen Promotoren durch z.B. induzierbare Promotoren. Auf diese Art und Weise soll die Transkription der Gene und damit die Expression des jeweiligen Naturstoffes sichergestellt werden. Frühere Studien berichteten die Verwendung eines Tetrazyklin-induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors zur Expression des Novobiocin-Genclusters im heterologen Wirt, dass eine erhöhte Biosynthese des sekundären Metaboliten steuert (Dangel *et al.*, 2009). Da keine Regulator-ähnliche DNA-Bindestellen vor *s-1022E* gefunden werden konnte, könnte davon ausgegangen werden, dass die Gene des *s-1022*-Gencluster nicht in ausreichenden Mengen exprimiert werden. Zur möglichen Expression des stillen *s-1022*-Genclusters wurde auf dem Fosmid epnAB02 eine induzierbare *tcp*₈₃₀-Promotor-Resistenzkassette [*aac(3)/IV*] über eine durch RED/ET-vermittelte Rekombination (Gust *et al.*, 2003) vor das entsprechende Gen *s-1022E* integriert. Die resultierenden mutierten Fosmide epnAB06, epnAB10, epnAB11, epnAB12, epnAB13 und epnAB14 wurden durch intergenerische triparentale Konjugation und ortsspezifische chromosomale Integration in die drei *Streptomyces*-Wirtsstämme, *S. albus* J1074, *S. coelicolor* M512 und *S. coelicolor* M1152 integriert (Daten nicht komplett gezeigt). Auch hier erwies sich *S. albus* J1074 als bester heterologer Wirtsstamm. Die daraus entstandenen Mutantenstämme *S. albus* J1074/epnAB06(1–3), *S. albus* J1074/epnAB10(1–3), *S. albus* J1074/epnAB11(1–3), *S. albus* J1074/epnAB12(1–3), *S. albus* J1074/epnAB13(1–3) und *S. albus* J1074/epnAB14(1–3) wurden anschließend unter gleichen Bedingungen, wie sie zuvor für die heterologe Expression der „natürlichen“ Biosynthesegencluster beschrieben wurden, kultiviert und mittels LC-MS analysiert. Im Falle von *S. albus* J1074/epnAB06(1–3) wurde aTc zu den Hauptkulturen als Induktor des *tcp*₈₃₀-Promotors gegeben. Die Ergebnisse der BPCs zeigten, vergleichend zu den Ergebnissen der heterologen Expression unmodifizierter putativer „Epoxyketon“-Gencluster (Abbildung

2.4), ebenfalls keine Produktion mutmaßlicher neuer Verbindungen (Daten nicht gezeigt). Es entstanden keine weiteren neuen Massen, die auf eine Produktion von Eponemycin-Derivaten hindeutete, bedingt durch entweder die Inaktivierung der clusterspezifischen regulatorischen Elemente noch durch den Ersatz eines induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors in den entsprechenden Biosynthesegenclustern. Angesichts der Tatsache, dass die zuvor beschriebenen Analyseergebnisse, nicht auf eine erfolgreiche heterologe Expression eines Eponemycin-Derivats durch die in *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 gefundenen homologen „orphan“ Biosynthesegencluster hindeuteten, ungeachtet der einzelnen Versuche, die mutmaßlichen stillen Cluster zu aktivieren, wurde das Projekt zu diesem Zeitpunkt unterbrochen.

2.1.8 Proteasom-Inhibitor-Assays

Dieser Teil der Doktorarbeit wurde in Kooperation mit Dr. Nicole Staudt (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) durchgeführt. Die drei vorhergesagten homologen „orphan“ Biosynthesewege deuteten anfangs auf die Bildung von neuen putativen „Epoxyketonmoleküle“ hin (Abbildung 2.1, 2.2 und 2.3) und scheinen einem von Leucin abgeleiteten α' , β' -Epoxyketon-„Warhead“, wie dem der potenten Proteasom-Inhibitoren Epoxomicin (Hanada *et al.*, 1992) und Eponemycin (Sugawara *et al.*, 1990) zu ähneln. Bekanntlicherweise verleiht die α' , β' -Epoxyketoneinheit von Proteasom-Inhibitoren dem N-terminalen Threonin in katalytischen Proteasom- β -Untereinheiten eine hohe Bindungsspezifität (Groll *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2016). Die Verbindung Epoxomicin ist mit IC₅₀-Werten gegen das *Saccharomyces cerevisiae* 20S-Proteasom von 2,5 nM auffallend wirksam, vergleichbar mit dem Peptid-Proteasom-Inhibitor Carmaphycin (Abbildung 1.5) (Pereira *et al.*, 2012). Diese Beobachtungen veranlassten uns, in einem letzten Versuch, alle Kulturextrakte der jeweiligen Wildtypen und heterologen Mutanten auf ihre Fähigkeit zur möglichen Hemmung der β 5-Untereinheit (Chymotrypsin-ähnlich) des *S. cerevisiae* 20S-Proteasoms zu untersuchen. Etablierte Proteasom-Inhibitionstests angelehnt an Nett *et al.* wurden unter Verwendung des *S. cerevisiae* 20S-Proteasoms, des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-AMC für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und Reihenverdünnungen jedes möglichen Inhibitors (Kulturextrakte der Wildtypen- und Mutantenstämmen) in einen Assaypuffer inkubiert. Die Aktivität des Proteasoms wurde durch Ablesen der Fluoreszenz des gespaltenen Substrats unter Verwendung des TECAN-Plattenlesegeräts bestimmt (Nett *et al.*, 2009)

ERGEBNISSE

und im Anschluss ein Balkendiagramm mit der Graphpad Prism 7[®] Software erstellt. Ausstehende IC₅₀-Werte müssen zukünftig über die Dosis-Wirkungs-Kurve, die die Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der Suc-LLVY-AMC-Spaltung durch das *S. cerevisiae* 20S-Proteasom in Gegenwart steigender Konzentrationen eines Inhibitors beschreibt, bestimmt werden. Erste Auswertungen des Proteasom-Inhibitionstests lieferten vorzeitige Erkenntnisse einer inhibitorischen Aktivität des Proteasoms durch die jeweiligen Kulturextrakte der modifizierten Gencluster in *S. albus* J1074 und den Wildtyp-Produzenten *S. pyridomyeticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-646 und *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 verglichen mit dem Wirt *S. albus* J1074 (Abbildung 2.5). Das Balkendiagramm zeigt erwartete unterschiedliche Aktivitäten innerhalb der einzelnen Extrakte der Wildtyp-Produzenten, sowie geringe Unterschiede der Aktivität innerhalb der jeweiligen Mutantenstämme. Es wurde eine höhere inhibitorische Aktivität bei *S. pyridomyeticus* NRRL B-2517, verglichen mit den modifizierten Mutantenstämmen *S. albus* J1074/epnAB10(1,2) und *S. albus* J1074/epnAB11(1,2) festgestellt. Ebenfalls weist der Wildtyp *Streptomyces* sp. NRRL S-1022, sowie der Mutantenstamm *S. albus* J1074/epnAB06(1,2) eine höhere inhibitorische Aktivität auf. Dagegen zeigte der Wildtyp-Stamm *Streptomyces* sp. NRRL S-646 verglichen zu den anderen Wildtyp-Stämmen, sowie den entsprechenden heterologen Mutantenstämmen *S. albus* J1074/epnAB12(1,2), *S. albus* J1074/epnAB13(1,2) und *S. albus* J1074/epnAB14(1,2) eine geringere Hemmung des Proteasoms auf. In einem weiteren durchgeführten Assay wurde kein entscheidender Einfluss auf die Proteasomaktivität der modifizierten Gencluster in *S. albus* J1074 gegenüber den nicht-modifizierten Gencluster in *S. albus* J1074, sowie gegenüber den Wildtyp-Stämmen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es wurden keine biologischen Aktivitäten in den jeweiligen Kontrollen, ohne Inhibitor, beobachtet.

ERGEBNISSE

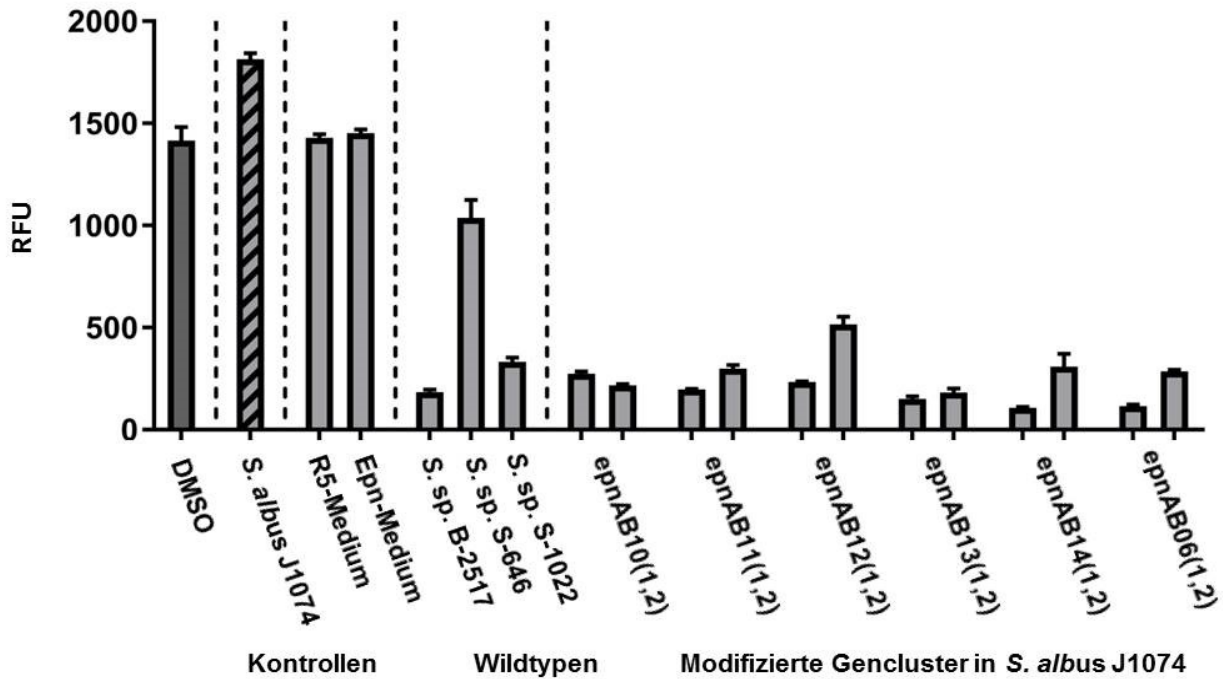


Abbildung 2.5 Darstellung der *S. cerevisiae* 20S-Proteasom-inhibitorische Aktivitäten gemessen anhand des Fluoreszenzanstiegs nach 30 min. Bestimmt für Zellkulturextrakte der Wildtypen *S. pyridomyeticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-646 und *Streptomyces* sp. NRRL S-1022, sowie jeweils 2x der Mutantenstämmen *S. albus* J1074/*epnAB10*(1,2), *S. albus* J1074/*epnAB11*(1,2), *S. albus* J1074/*epnAB12*(1,2), *S. albus* J1074/*epnAB13*(1,2), *S. albus* J1074/*epnAB14*(1,2), *S. albus* J1074/*epnAB06*(1,2) und Kontrollen ohne Inhibitor.

Erste Ergebnisse spiegeln die erwarteten Unterschiede in der Bioaktivität wieder, die durch die entsprechenden Kulturextrakte der verschiedenen Wildtypstämmen, sowie der modifizierter Gencluster in *S. albus* J1074 gegen das 20S-Proteasom beobachtet wurden, trotzdem müssen diese vorläufigen Ergebnisse der Proteasom-Inhibitor-Assays in Zukunft wiederholt werden und statistisch bereitgestellt werden.

Unterschiede in der Bioaktivität von verschiedenen natürlichen Proteasom-Inhibitoren ist keine Seltenheit. Studien zufolge, ist beispielsweise der Unterschied in der Biosynthese der Seitenkette der beiden Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren Epoxomicin und Eponemycin für den Unterschied in der Antitumor-Aktivität gegen das B16-Melanom verantwortlich (Hanada *et al.*, 1992). Zu einer weiteren bekannten Gruppe von natürlichen Proteasom-Inhibitoren gehören auch die β -Lacton-haltigen Sekundärmetaboliten wie z.B. das Belactosin A (Asai *et al.*, 2000), die Cystargolide A & B (Gill *et al.*, 2015) oder das Salinosporamid A (Feling *et al.*, 2003). Auch hier haben Struktur-Aktivitäts-Studien ergeben, dass besonders die Stereochemie der β -Lactoneinheit für die inhibitorische Aktivität z.B. der Cystargolide gegenüber des

ERGEBNISSE

Proteasoms eine essentielle Rolle spielt (Tello-Aburto *et al.*, 2015). Desweiteren konnten durch Proteasome-Inhibitor-Assays gezeigt werden, dass die Bioaktivität variieren kann, wenn die Seitenketten des Salinosporamids modifiziert wurden (Nett *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse der BPCs aus den Rohextrakte von *S. albus* J1074/epnAB01(1–3), *S. albus* J1074/epnAB02(1–3) und *S. albus* J1074/epnAB03(1–3), verglichen mit dem des heterologen Wirt *S. albus* J1074 zeigten zu Beginn einige neue Massenpeaks (Abbildung 2.4), welche bisher keinem bestimmten Biosyntheseweg zugeordnet werden konnten. Ob einer der beobachteten neue Massenpeaks im direkten Zusammenhang mit den gezeigten inhibitorische Aktivitäten gegen das Proteasom durch die Kulturextrakte der verschiedenen heterologen Mutanten stehen könnten, bleibt bislang eine offene Frage (Abbildung 2.5). Zur detaillierten Untersuchung könnte man in einem nächsten Schritt die Rohextrakte mittels präparative HPLC fragmentieren und die einzelnen Fraktionen anschließend erneut einem Proteasome-Inhibitor-Assay unterziehen. Die daraus resultierenden möglichen unterschiedlichen proteasomhemmenden Eigenschaften der jeweiligen Fraktionen könnte im Folgenden mit bekannten Proteasom-Inhibitoren wie z.B. dem Epoxomicin verglichen werden. Zudem könnten die mittels präparativer HPLC gereinigten Fraktionen erneut einer LC-MS- und MS/MS-Analyse unterzogen werden, sowie in einem weiteren Anbauversuch im größeren Maßstab zur Aufklärung der Struktur möglicher neuer aktiver Verbindung auf der Grundlage der NMR-Analyse durchgeführt werden.

2.2 IDENTIFIZIERUNG DES TALOPEPTIN-BIOSYNTHESEGENCLUSTERS

2.2.1 Sequenzierung und Klonierung des Talopeptin-Genclusters

Um die genetischen Grundlagen für den Aufbau von Phosphoramidon und Talopeptin zu untersuchen, wurde die genomische DNA von *Streptomyces mozunensis* MK-23, dem ursprünglichen Talopeptin-Produzenten, isoliert und sequenziert. Die im Anschluss automatisierte Assemblierung des Genoms und die Annotationen der kodierenden Sequenzen wurden mit den Genom-Annotationssystemen Prokka v1.11 (Seemann, 2014) und GenDB 2.0 (Meyer *et al.*, 2003) mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Kalinowski am CeBiTec der Universität Bielefeld durchgeführt. Dieser Ansatz führte zu einem qualitativ hochwertigen „Draft-Genome“ bestehend aus acht Scaffolds und 7708 Protein-kodierenden Genen. Das assemblierte Genom weist eine Größe von 8,744,153 bp sowie einen GC-Gehalt von 72,86% auf.

Die gesamte Sequenz wurde durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Leonard Kaysser (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) mittels antiSMASH (Medema *et al.*, 2011), einer Plattform zur Identifizierung von Biosynthesegenclustern für sekundäre Metaboliten in Bakteriengenomen, analysiert. Unerwarteterweise führte diese Analyse, auf das Vorhandensein von NRPS-Genen, nicht zur Identifizierung eines geeigneten Kandidaten. In der Annahme, dass ein homologes Enzym an der Verknüpfung des Desoxyzuckers im Talopeptin beteiligt sein könnte, wurde Cpz31, eine Rhamnosyltransferase aus dem bekannten Caprazamycin-Gencluster (Kaysser *et al.*, 2010), als Referenz verwendet, um die Genomsequenz zu scannen. Ein BLAST-Vergleich ergab genau ein Homolog mit einer 45%igen Sequenz-Identität zu Cpz31. Das gefundene *talC*-Gen wurde zusammen mit Genen für ein mutmaßliches ATP-grasp-Enzym (TalD) und ein mutmaßliches Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthase/Pyruvat, Phosphatdikinase (PPDK) Enzym (TalE) lokalisiert. Benachbart zu diesem kleinen Operon gehörten mutmaßliche Gene, die für Transport (*talB*)- und Regulierungsfunktionen (*talA*) kodieren.

Um den identifizierten Biosyntheseweg genauer charakterisieren zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen), perfekt passende Primer auf eine pCC1FOS-basierte genomische Bibliothek von *S. mozunensis* MK-23 konstruiert. Es konnten fünf positive Fosmide aus einer Fosmid-Bibliothek mit 1920 Klonen mittels PCR identifiziert und nachgewiesen werden. Durch

Endsequenzierungs- und Restriktionsanalysen konnte bestätigt werden, dass der Fosmid-Klon 8G9 das intakte *tal*-Cluster trägt (siehe auch Masterarbeit von Marius Bader). Die Nukleotidsequenz des Genclusters wurde in NCBI unter der Zugangsnummer MK644118 hinterlegt (Baulig *et al.*, 2019).

2.2.2 Sequenzanalyse des Talopeptin-Genclusters

Die Sequenzierung des Fosmid-Klons ergab ein 39,4-kb-Insert mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 72%, ähnlich zu anderen Sequenzen aus *Streptomyces*-DNA. Mit Unterstützung von Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) wurden durch die *in silico*-Analyse mit Hilfe der BLAST-Homologiesuche (Altschul *et al.*, 1997) und der GC-Frame-Plot-Methode (Bibb *et al.*, 1984) 24 mutmaßliche Gene gefunden. Davon insgesamt 5 offene Leserahmen (*orfs*), die als *talA-talE* bezeichnet wurden, und vermutlich für Produktion, Transport, Regulation und Biosynthese kodieren (Abbildung 2.6). Die vorgeschlagenen Funktionen der annotierten Gene und die besten Übereinstimmungen bei der Homologiesuche sind in Tabelle 2.4 dargestellt (Baulig *et al.*, 2019).

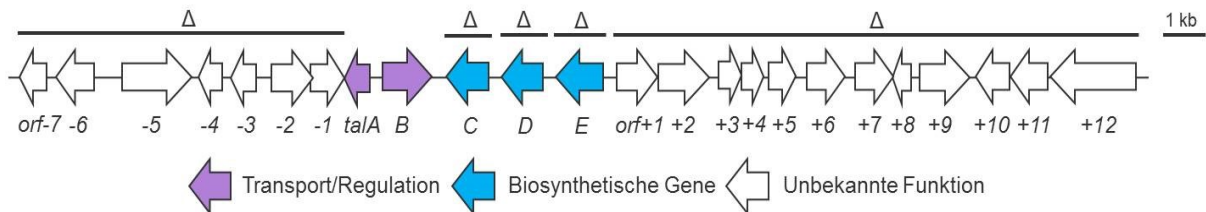


Abbildung 2.6 Biosynthesegencluster von Talopeptin aus *S. mozunensis* MK-23 adaptiert von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Balken über dem Cluster markieren die in dieser Studie durchgeführten Gendeletionen (Δ). Gene sind entsprechend ihrer biosynthetischen Zuordnung koloriert (Tabelle 2.4).

Wie vorgeschlagen, würde das Talopeptin-Gencluster mit TalA beginnen, das für einen Regulator der MerR-Familie kodiert. Die MerR-Familie ist eine Gruppe von Transkriptionsaktivatoren, die eine Helix-Turn-Helix-DNA-Binderegion enthalten. Die wenigen MerR-ähnlichen Regulatoren die bisher experimentell untersucht wurden, haben gezeigt, dass sie Sigma(70)-abhängige Promotoren aktivieren und für Umweltreize wie oxidativer Stress, Schwermetalle oder Antibiotika verantwortlich sind. Eine Untergruppe der Familie aktiviert die Transkription als Reaktion auf Metallionen (Stoyanov *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Hobman *et al.*, 2005; Julian *et al.*, 2009). Das

ERGEBNISSE

vorhergesagte Genprodukt von *talB* zeigt eine gewisse Homologie zu MFS-Transportern. Ähnliche Proteine solcher Familien sind in allen Klassifikationen lebender Organismen allgegenwärtig und sind in der Regel an Efflux-Systemen und Antibiotikaresistenzen beteiligt (Pao *et al.*, 1998; Saidijam *et al.*, 2006).

In *S. mozunensis* MK-23 könnte dieses Protein vermutlich für den Talopeptin-Efflux verantwortlich sein. Das Folgende, mit *talC* bezeichnete Gen hat eine Identität mit einer Glycosyltransferase von etwa 90% aus *Kitasatospora* sp. MY 5-36 und eine 45%ige Ähnlichkeiten mit der Desoxyzuckertransferase Cpz31 aus dem bekannten Caprazamycin-Gencluster (Kaysser *et al.*, 2010). TalC könnte demnach für die Installation des Desoxyzuckers am Talopeptin beteiligt sein. Das im Folgenden genannte *talD*-Gen hat eine Identität von 92% eines mutmaßlichen ATP-grasp-Enzyms aus *Kitasatospora* sp. MY 5-36. Die Fähigkeit dieses Enzyms könnte an der Herstellung des Dipeptids aus L-Leu und L-Trp beteiligt sein, denn von ATP-grasp-Enzymen ist bekannt, dass sie die Bildung von Peptidbindungen katalysieren können (Fawaz *et al.*, 2011). Das Gen *talE*, das sich am Ende des vorhergesagten Genclusters befindet, kodiert für eine mutmaßliche PEP-Synthase/PPDK. Es ist bekannt, dass solche Enzyme die ATP- und Phosphat (P_i)-abhängige Umwandlung von Pyruvat in PEP in C₄-Pflanzen, die umgekehrte ATP-Bildungsreaktion in Bakterien und Protozoen katalysieren (Evans and Wood, 1968; Ciupka and Gohlke, 2017) und unter Verwendung eines katalytischen Histidinrests, ein Phosphohistidin-Intermediat mit einer N–P-Bindung erzeugen können (Herzberg *et al.*, 1996). Am linken Ende, vor TalA, fanden wir eine Reihe weiterer offener Leserahmen, die als *orf-7–orf-1* bezeichnet wurden. Stromabwärts des kleinen Operons *talCDE* wurden 12 offene Leserahmen, mit der Bezeichnung *orf+1–orf+12*, lokalisiert. Die meisten dieser Gene kodieren für ein hypothetisches Protein oder weisen keine Homologien zu Proteinen mit offensichtlicher Funktion an der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin auf.

Tabelle 2.4 Abgeleitete Funktionen der Gene des Talopeptin (*tal*)-Genclusters modifiziert von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Gen	Protein-Homolog	Identität/Ähnlichkeit ^[a]	Vorhergesagte Funktion
<i>orf-7</i>	IF30_RS0112000, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-350	93/98	Sterol-Desaturase
<i>orf-6</i>	DR950_RS10775, <i>Streptomyces xanthocidicus</i> MMS17	77/90	XRE-Familie TR

ERGEBNISSE

<i>orf-5</i>	A6F73_RS03440, <i>Streptomyces</i> sp. MJM8645	91/93	M28-Familie Peptidase
<i>orf-4</i>	AE652_RS27890, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	87/95	Hypotetisches Protein
<i>orf-3</i>	AE652_RS27880, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	71/49	Hypotetisches Protein
<i>orf-2</i>	AE652_RS27885, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	88/94	Cytochrom P450
<i>orf-1</i>	IF25_RS0114065, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-5680	86/99	Cytochrom P450
<i>talA</i>	AE652_RS27875, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	80/87	MerR-Familie TR
<i>talB</i>	IF01_RS0110065, <i>Kitasatospora purpeofusca</i> NRRL B-1817	71/77	MFS-Transporter
<i>talC</i>	AE652_RS02225, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	90/97	Glycosyltransferase
<i>talD</i>	AE652_RS02230, <i>Kitasatospora</i> sp. MY 5-36	92/99	ATP-grasp-Enzym
<i>talE</i>	BX285_3786, <i>Streptomyces</i> sp. 1114.5	83/99	PEP-Synthase/PPDK
<i>orf+1</i>	IF25_RS0118230, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-5680	93/94	Glycerophosphodiester- Phosphodiesterase
<i>orf+2</i>	OP86_RS03015, <i>S. novaecaesareae</i> NRRL B-1267	90/99	MFS-Transporter
<i>orf+3</i>	UK12_RS04425, <i>Saccharothrix</i> sp. ST-888	84/94	Muconolacton Delta- Isomerase
<i>orf+4</i>	H305_RS0106560, <i>Streptomyces</i> sp. 142MFCol3.1	76/97	Hypotetisches Protein
<i>orf+5</i>	IG62_RS0101595, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-337	83/98	Carboxymuconolacton- Decarboxylase
<i>orf+6</i>	A6F73_RS03505, <i>Streptomyces</i> sp. MJM8645	80/97	Hypotetisches Protein
<i>orf+7</i>	GMOD_00006458, <i>Pyrenophora seminiperda</i> CCB06	31/46	Monocarboxylat- Transporter 4
<i>orf+8</i>	ACZ90_10985, <i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> NRRL B-2513	86/16	RNA-Polymerase- Untereinheit Sigma24
<i>orf+9</i>	M878_RS95705, <i>Streptomyces</i> <i>roseochromogenus</i> subsp. <i>oscitans</i> DS 12.976	89/99	Hypotetisches Protein
<i>orf+10</i>	IF25_RS37595, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-5680	73/95	Hypotetisches Protein
<i>orf+11</i>	A6F73_RS03520, <i>Streptomyces</i> sp. MJM8645	86/99	Hypotetisches Protein
<i>orf+12</i>	BS80_RS27265, <i>Kitasatospora medicidica</i> KCTC 9733	75/99	Glycosidhydrolase

[a] = Aminosäuresequenzhomologie [%] aus der Blastp-Analyse; MFS = Major-Facilitator-Superfamilie; *orf* = open reading frame (offener Leserahmen); PEP = Phosphoenolpyruvat; PPDK = Pyruvat, Phosphatdikinase; *S.* = *Streptomyces*; sp. = Spezies; *tal* = Talopeptin; TR = Transkriptionsregulator; fettgedruckte Gene sollen für die Talopeptin-Produktion essentiell sein.

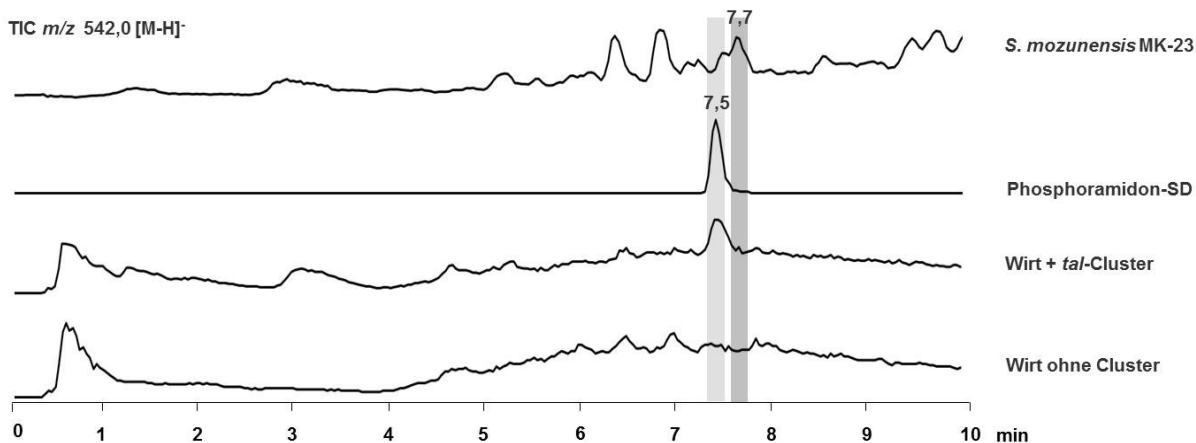
Theoretisch könnte davon ausgegangen werden, dass nur diese wenigen mutmaßlichen Gene *talA-talE* an der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin beteiligt sind und es sich möglicherweise um das *tal*-Biosynthesegencluster handeln könnte.

2.2.3 Funktionsnachweis der Identität des Talopeptin-Genclusters durch Heterologe Expression

Dieser Teil der Doktorarbeit wurde von Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) unter meiner Anleitung durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die auf dem Fosmid 8G9 gefundenen Gene für die Biosynthese der Metalloprotease-Hemmer ausreichend waren, wollten wir das Fosmid heterolog exprimieren. Aus diesem Zweck wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *cat* mittels RED/ET-vermittelte Rekombination durch eine Integrationskassette (*int_neo*) ersetzt (Kaysser *et al.*, 2012). Das resultierende Fosmid *talMB01* besitzt eine Attachment-Site (*attP*), ein Integrasegen (*int*), des Bakterienphagen Φ C31, ein Kanamycin-Resistenzgen (*neo*) und einen origin of transfer (*oriT*), welche die Selektion, Konjugation und ortsspezifische chromosomale Integration in die meisten *Streptomyces* erlauben (Bierman *et al.*, 1992). Anschließend wurde *talMB01* durch intergenerische triparentale Konjugation in den entsprechenden heterologen Wirt *Streptomyces* sp. MK730-62F2 transferiert (Flett *et al.*, 1997), ein bekannter Produzent von dTDP-L-Rhamnose (Kaysser *et al.*, 2010) ein mit der 6-Desoxy-L-Talose verwandten Desoxyszucker. Drei kanamycinresistente Klone wurden isoliert und als *Streptomyces* sp. MK730-62F2/*talMB01*(1–3) bezeichnet. Alle Mutantenstämme wurden im Anschluss in ihren entsprechenden Medien kultiviert und mit Butanol extrahiert. Die Extrakte wurden mittels LC-MS, MS/MS und HR-MS analysiert und mit einem kommerziell erworbenen Phosphoramidon-Standard (SD) und dem Wildtyp-Produzenten *S. mozunensis* MK-23 verglichen. Die LC-MS-Analyse von Kulturextrakten der heterologen Mutanten zeigten die Produktion eines einzelnen neuen Peaks mit einer Masse von m/z 542,0 $[M-H]^-$ im negativen Modus bei einer Retentionszeit (t_R) von 7,5 min (Abbildung 2.7A) und einem UV-Spektrum bei 280 nm (Abbildung 2.17), die mit den Eigenschaften von Phosphoramidon identisch waren. Dieser Massenpeak fehlte in den Kulturextrakten des Wirts ohne das *tal*-Cluster. Die Extrakte des Wildtyp-Produzenten *S. mozunensis* MK-23 zeigten einen identischen Massenpeak bei m/z 542,0 $[M-H]^-$, jedoch bei einer t_R von 7,7 min. (Abbildung 2.7A).

ERGEBNISSE

A



B

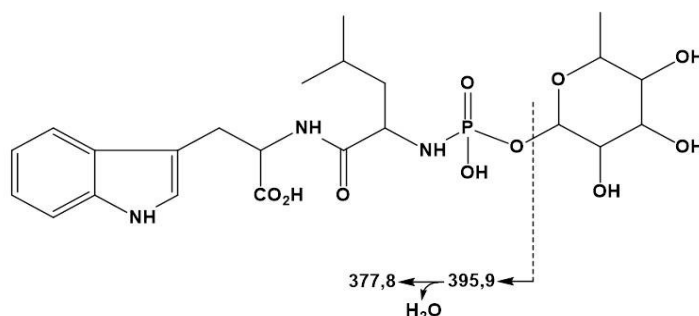
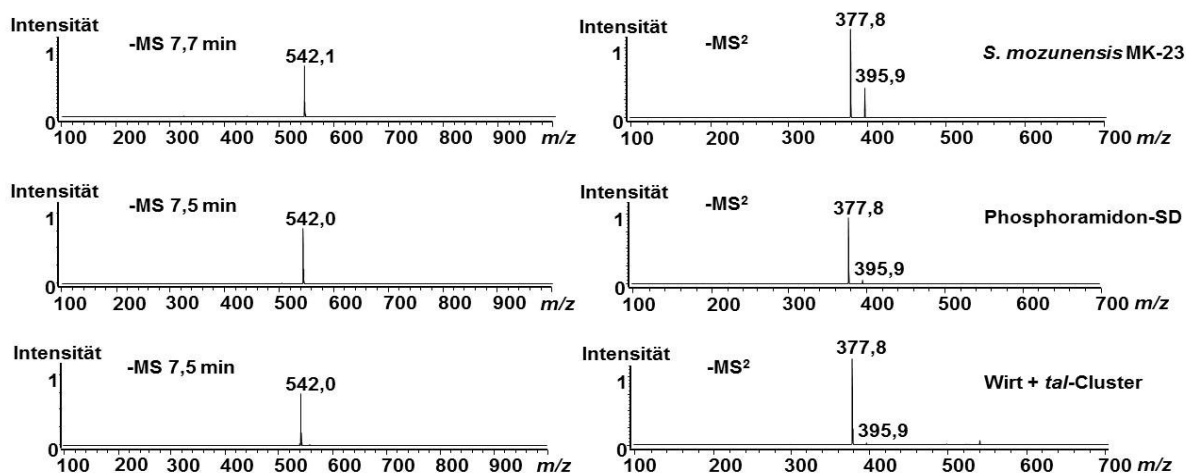


Abbildung 2.7 LC-MS-Analysen von Phosphoramidon-SD, Kulturextrakten von *Streptomyces* sp. MK730-62F2-Wildtyp und clustertragender Mutante und *S. mozunensis* MK-23. (A) Total Ionenchromatogramme (TICs) mit m/z 542,0 $[M-H]^-$ von Phosphoramidon (7,5 min) in *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talMB01 (hellgrau hervorgehoben) und Talopeptin (7,7 min) in *S. mozunensis* MK-23 (dunkelgrau hervorgehoben) (siehe auch Masterarbeit von Marius Bader). (B) MS-Spektren im negativen Modus (links) und MS/MS-Spektren (rechts) aus der LC-Analyse von Talopeptin in *S. mozunensis* MK-23, Phosphoramidon im SD und Phosphoramidon im Wirt + *tal*-Cluster modifiziert von (Baulig *et al.*, 2019), sowie einem vorgeschlagenen Fragmentierungsschema der Verbindung Phosphoramidon und Talopeptin (Rose *et al.*, 1984). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

ERGEBNISSE

Die MS/MS-Spektren des kommerziellen SDs und die gefundenen Peaks der Mutanten beziehen sich auf das Mutterion mit der Masse m/z 542,0 $[M-H]^-$. Die Fragmentierung des Mutterions zeigte zwei identische Tochterfragmente mit den Massen m/z 377,8 $[M-H]^-$ und m/z 395,9 $[M-H]^-$ (Abbildung 2.7B) (Baulig *et al.*, 2019). Um die Verbindung mittels HR-ESI-TOF-MS zu analysieren, wurde der Peak mittels HPLC aus einer 1 L-Kultur aus *Streptomyces* sp. MK730-62F2/*tal*MB01 gereinigt und unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurden insgesamt ~11,0 mg gesammelt. Durch das hochaufgelöste Massenspektrum wurde die Identität von Phosphoramidon ($[M-H]^-$ Quasi-Molekülion m/z 542,19152, $\Delta = +1,13$ ppm) mit der Summenformel $C_{23}H_{33}N_3O_{10}P$ bestätigt (Abbildung 2.8). Die HR-MS-Analyse wurde mit Hilfe von Dr. Dorothee Wistuba (Institut für Chemie, Universität Tübingen) durchgeführt und ausgewertet.

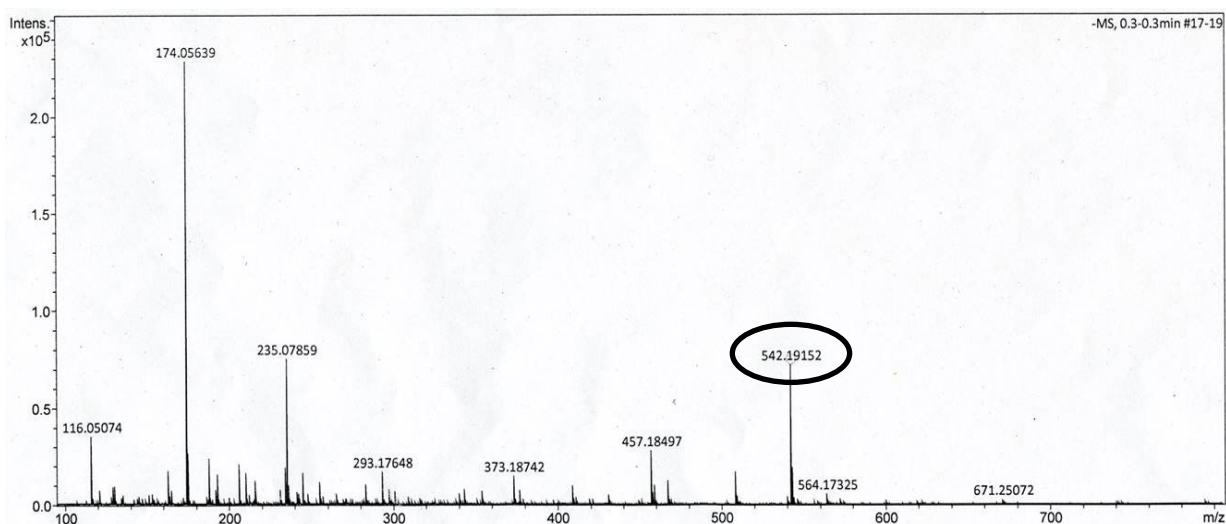


Abbildung 2.8 HR-ESI-TOF-MS-Spektrum von PA aus Wirt + *tal*-Cluster mit m/z 542,19152 $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{23}H_{33}N_3O_{10}P$, 542,19090, $\Delta = +1,13$ ppm) ist dargestellt aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Diese Ergebnisse bekräftigen, dass wir ein Biosynthesegencluster für die Herstellung von Phosphoramidon und Talopeptin gefunden haben, wahrscheinlich bestehend aus dem *talCDE*-Operon (Baulig *et al.*, 2019).

2.2.4 Bestimmung der Grenzen des Talopeptin-Genclusters durch Gendeletionsexperimente

Um die Organisation und die Grenzen des *tal*-Clusters eindeutig zu bestimmen, haben wir einzelnen Knockout-Mutanten der Gene *talC*, *talD* und *talE*, sowie Deletionen der

ERGEBNISSE

angrenzenden Regionen *orf-7* bis *orf-1* und *orf+1* bis *orf+12* konstruiert. Die jeweiligen Genregionen wurden, unter Verwendung des PCR-Targeting-Systems (Gust *et al.*, 2003) einzeln auf dem Fosmid talMB01 mit einer Apramycin-Resistenzkassette ersetzt. *In frame*-Deletionen wurden durch nachfolgendes Herausschneiden der Kassette mittels FLP-Rekombination erhalten (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Die resultierenden mutierten Fosmide talAB09, talAB10, talAB11, talAB12 und talAB13 wurden durch intergenerische triparentale Konjugation und ortsspezifische chromosomale Integration in den heterologen Wirt *Streptomyces* sp. MK730-62F2 integriert. Die daraus entstandenen Mutantenstämme *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB09(1–3), *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB10(1–3), *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB11(1–3), sowie *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB12(1–3), und *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB13(1–3) wurden durch PCR verifiziert, anschließend unter gleichen Bedingungen, wie sie zuvor für die heterologe Expression der natürlichen Biosynthesegencluster beschrieben, kultiviert und die Extrakte mittels LC-MS-Analyse auf Phosphoramidon-Produktion analysiert (Abbildung 2.9). Die LC-MS-Analyse von Kulturextrakten aus den mutierten Stämmen verglichen mit *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talMB01 zeigte, dass die Biosynthese von Phosphoramidon bzw. Talopeptin nicht durch die $\Delta orf-7-orf-1$ - und $\Delta orf+1-orf+12$ -Deletionen beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen $\Delta talC$, $\Delta talD$ und $\Delta talE$ zu einem deutlichen Produktionsverlust (kein m/z 542,0 [M-H]⁻ Signal bei 7,5 min) (Abbildung 2.9). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die Gene *orf-7* bis *orf-1* am linken Rand des Clusters, als auch die Gene *orf+1* bis *orf+12* am rechten Ende, nicht an der Biosynthese, Regulierung oder dem Transport von Phosphoramidon bzw. Talopeptin beteiligt sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *talA*, ein MerR-ähnliches regulatorisches Gen und *talB*, welches für einen mutmaßlichen MFS-Transporter kodiert, gemeinsam mit dem *talCDE*-Operon das Biosynthesegencluster für Phosphoramidon bzw. Talopeptin formen. Demnach könnte TalD aus L-Leu und L-Trp ein Dipeptid bilden, welches als Vorstufe für TalE dienen könnte, ein N-terminales Phosphoramidat zu installieren. Die anschließende Übertragung des Desoxyzuckers könnte von TalC katalysiert werden, um Phosphoramidon bzw. Talopeptin zu erhalten. Bemerkenswerterweise konnten, durch die MS-Analyse, noch Spuren Mengen von Phosphoramidon in Kulturen der $\Delta talD$ -Mutante beobachtet werden (Abbildung 2.9). Dies könnte durch die Bereitstellung eines L-Leu-L-Trp-Dipeptids aus Standard-Proteinabbauprozessen erklärt werden. ATP-grasp-Enzyme wurden seit Jahrzehnten im Primärmetabolismus, z.B. in der Fettsäure-,

ERGEBNISSE

Glutathion- oder bakteriellen Zellwandbiosynthese, untersucht und erhalten zunehmende Aufmerksamkeit wegen ihrer Fähigkeit, Peptidbindungen in der Biosynthese von Naturstoffen zu bilden (Ogasawara and Dairi, 2017). Für Enzyme wie TalD, wurde gezeigt, dass sie Moleküle durch die Erzeugung von Acylphosphat-Zwischenprodukten aktivieren können (Fawaz *et al.*, 2011). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass das Peptidrückgrat von Phosphoramidon und Talopeptin durch solche Enzyme analog zu anderen niedermolekularen Molekülen abgeleitet werden (Kawata *et al.*, 2017). Um die Funktion von TalD in der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin eindeutig zu bestimmen, wurde die Kultur der $\Delta talD$ -Mutante nach 24 Stunden mit einem synthetisch hergestellten L-Leu-L-Trp-Dipeptid, in einer Konzentration von 5 mM, gefüttert.

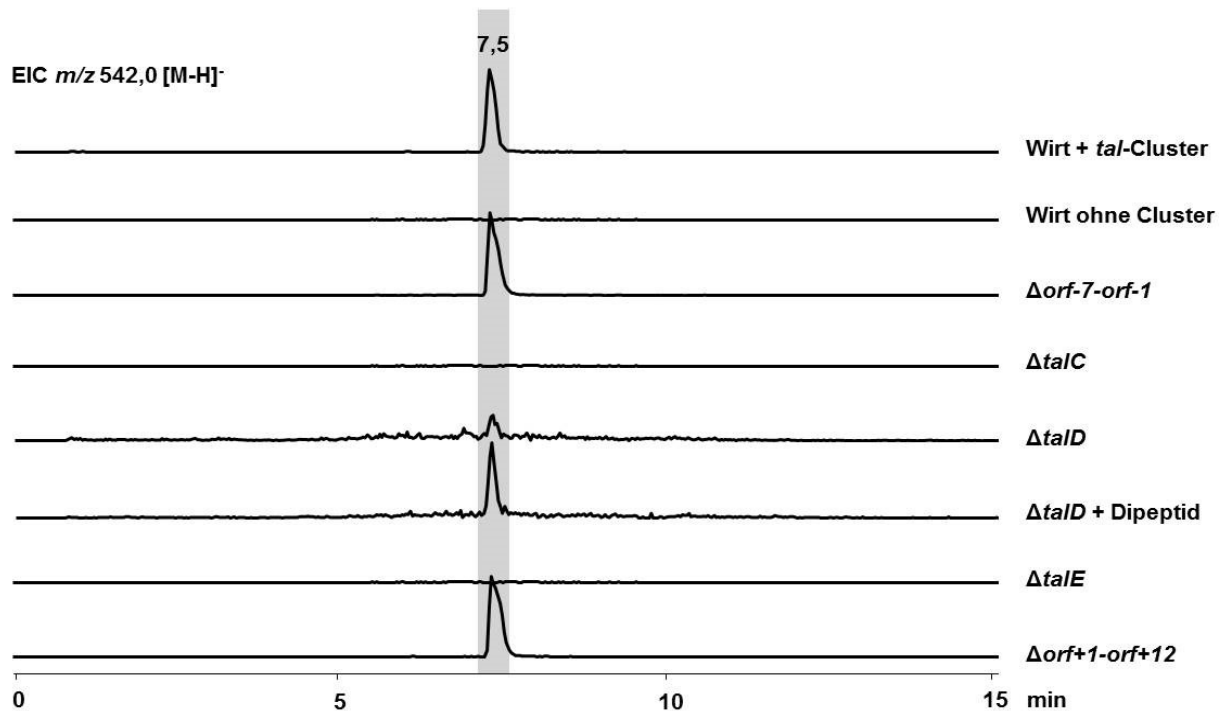


Abbildung 2.9 LC-MS-Analysen von Kulturextrakten von *Streptomyces* sp. MK730-62F2/*talMB01* und verschiedener Mutanten modifiziert von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) mit m/z 542,0 [M-H]⁻ im negativen Modus von PA bei 7,5 min ist in grau hervorgehoben. Die Signalintensität wurde für alle Experimente auf 100% eingestellt.

Die LC-MS-Analyse der Kulturextrakte zeigte, dass durch die Zugabe des Dipeptids die Produktion von Phosphoramidon (m/z 542,0 [M-H]⁻ Signal bei 7,5 min) in der Mutante zu einem guten Teil wieder hergestellt werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle von TalD als Dipeptidsynthetase bei der Formung von Phosphoramidon und Talopeptin.

2.3 CHARAKTERISIERUNG VON TALE ALS EINE N–P-BINDUNG BILDENDE KINASE

TalE zeigt Übereinstimmungen zu PEP-Synthasen/PPDKs. Diese Enzyme katalysieren die gegenseitige Umwandlung von ATP, P_i (Phosphat) und Pyruvat mit AMP, PP_i (Pyrophosphat) und Phosphoenolpyruvat. PPDKs wurde in Bakterien, in C₄- und Crassulacean-Säurestoffwechsel-Pflanzen und in Parasiten gefunden, jedoch nicht in höheren Tierformen (Evans and Wood, 1968; Pocalyko *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 2007). In Bakterien und Parasiten wirkt PPDK in die Richtung der ATP-Synthese (Evans and Wood, 1968). In Pflanzen und in photosynthetischen Bakterien wirkt PPDK bei der PEP-Bildung (Hatch and Slack, 1968). Sie verwenden einen katalytischen Histidinrest, um ein Phosphohistidin-Zwischenprodukt, mit einer hochenergetischen N–P-Bindung zu erzeugen, die als ein Phosphat-Shuttle zwischen den beiden Reaktionszentren der Enzyme dient (Herzberg *et al.*, 1996). Phosphohistidin tritt beispielsweise in Phosphattransferreaktionen auf, die durch Nukleosiddiphosphatkinasen (Edlund *et al.*, 1969) und Hpr, dem Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phospho-Carrier-Protein von *Escherichia coli* (Anderson *et al.*, 1971) katalysiert werden.

Ob TalE eine ähnliche Reaktion katalysieren könnte, indem das terminale Amin eines Dipeptids als Akzeptorsubstrat anstelle eines proteinogenen Histidins verwendet wird, war zu Beginn dieser Dissertation fraglich.

2.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung von *talC*/TalC und *talE*/TalE

Zur genauen Untersuchung des Biosynthesemechanismus, der die einzigartige Desoxyzucker-Phosphoramidateinheit auf das L-Leu-L-Trp-Dipeptid installiert, wurden die zwei Biosynthesegene *talC* und *talE* in einen Vektor für die Expression als N-terminale His8-markierte Proteine kloniert und in *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS eingeführt. Die Induktion mit IPTG führte zur Produktion eines Proteins mit ~79 kDa, das mit der berechneten Molekülmasse von His8-TalE (79,24 kDa) übereinstimmt. Ni-NTA-Affinitätschromatographie und nachfolgende Gelchromatographie ergaben eine Ausbeuten von 2,71 mg Protein aus 1 L Kultur, was eine Reinheit von >90% in der SDS-PAGE zeigt.

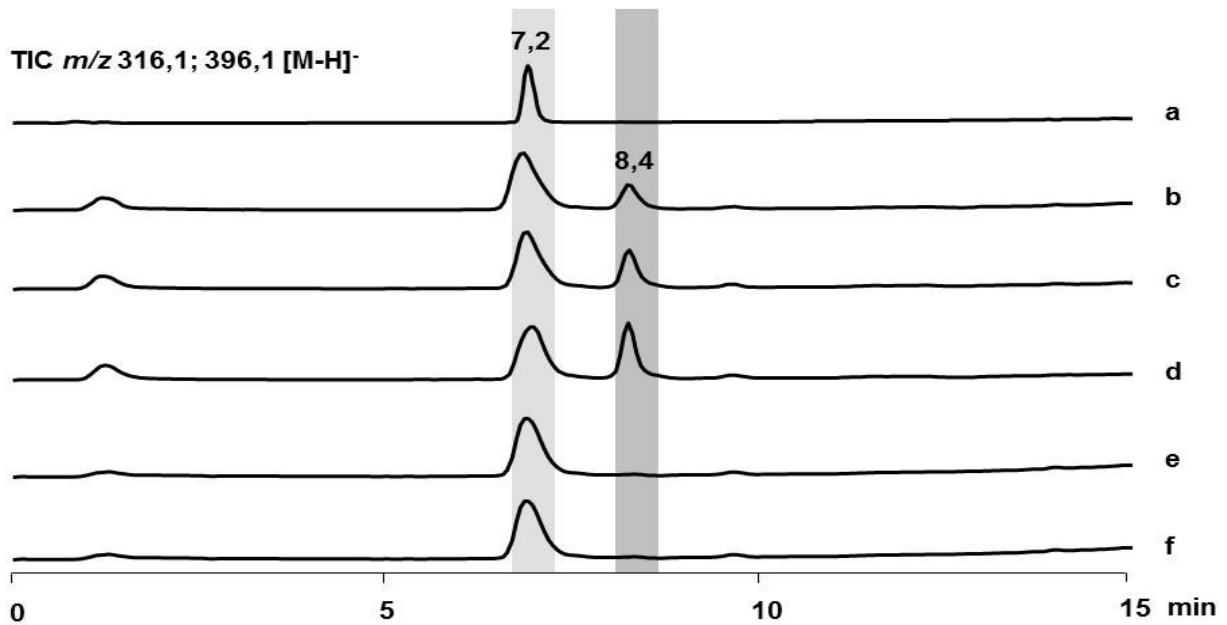
His-TalC konnte, unter diversen Bedingungen, nicht als lösliches Protein erlangt werden (Anhang Abbildung 7.1 und 7.2). Daher wurde zunächst nur TalE für weitere biochemische Studien verwendet.

2.3.2 Biochemische Charakterisierung der Phosphoryltransferase TalE

Zur Überprüfung der Hypothese, ob TalE durch Phosphorylierung eines Amins ein Phosphoramidat erzeugt, wurden in einem anschließenden Standard-TalE-Enzymassay, synthetisches L-Leu-L-Trp-Dipeptid als Akzeptorsubstrat mit ATP und gereinigtem His-TalE bei 30 °C inkubiert. Die LC-MS-Analyse des Reaktionsgemisches zeigte eindeutig das Vorhandensein eines zweiten Massenpeaks (m/z 396,1 [M-H]⁻; t_R = 8,4 min) neben dem Peak des Edukts Leu-Trp (m/z 316,1 [M-H]⁻; t_R = 7,2 min) (Abbildung 2.10 A und B). Desweiteren zeigte die Herstellung dieser neuen Verbindung Phospho-L-Leucin-L-Trptophan (P-Leu-Trp) eine lineare Abhängigkeit von der Menge an aktivem TalE (bis zu 10 µM) und fehlte, wenn eine der Assaykomponenten weggelassen wurde (Abbildung 2.10) (Baulig *et al.*, 2019). Für weitere Versuche in dieser Arbeit wurde eine TalE-Konzentration von 10 µM gewählt.

ERGEBNISSE

A



B

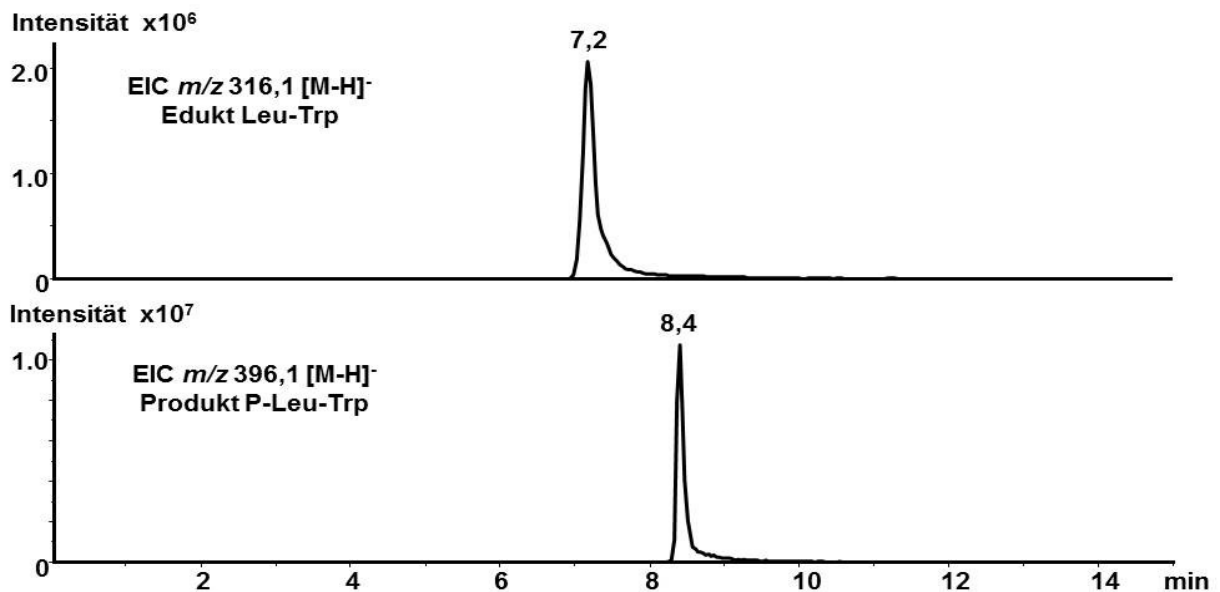


Abbildung 2.10 LC-MS-Analysen des TalE-Enzymassays angepasst aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. (A) TICs im negativ Modus von a) synthetischem L-Leu-L-Trp-Dipeptid (Edukt) bei 7,2 min (hellgrau hervorgehoben). b) Enzymatischer Assay von 5 μ M TalE mit Edukt Leu-Trp und ATP zeigte eine Umwandlung von Edukt Leu-Trp zu Produkt P-Leu-Trp bei 8,4 min (dunkelgrau hervorgehoben). c) Assay mit 7,5 μ M TalE. d) Assay mit 10 μ M TalE. e) Kontrollassay von b) ohne TalE. f) Kontrollassay von b) ohne ATP. Die Signalintensität wurde für alle Experimente auf 100% eingestellt. (B) EICs im negativen Modus von Edukt Leu-Trp mit m/z 316,1 [M-H]⁻ und Produkt P-Leu-Trp mit m/z 396,1 [M-H]⁻.

ERGEBNISSE

Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit

Um eine geeignete Inkubationszeit für den TalE-Assays zu bestimmen, wurde die Reaktion in Abhängigkeit über die Zeit (von 240 min) durchgeführt. Die Umwandlungsrate wurde alle 10 Minuten über 4 Stunden Inkubation gemessen. In der LC-MS-Analyse mit verschiedenen Inkubationszeiten des TalE-Assays konnte zuerst die Bildung von Edukt Leu-Trp (m/z 316,1 [M-H]⁻; $t_R = 7,2$ min) über kürzere Zeiträume (0 bis 20 min) nachgewiesen werden. Erst ab einer längeren Inkubationszeit von 25 Minuten wurde ein zusätzlicher Produktpeak für P-Leu-Trp (m/z 396,1 [M-H]⁻; $t_R = 8,4$ min) detektiert, während die Menge von Edukt Leu-Trp abnahm (Abbildung 2.11).

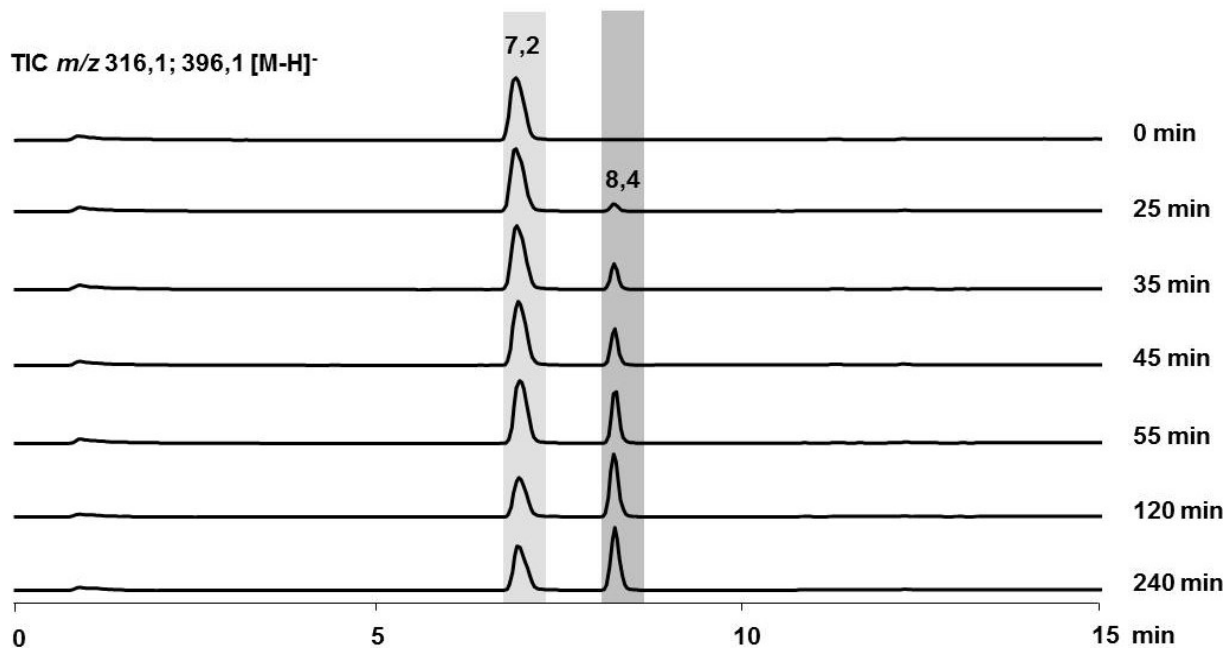


Abbildung 2.11 LC-MS-Analysen des TalE-Enzymassays mit verschiedenen Inkubationszeiten. TICs im negativ Modus von synthetischem L-Leu-L-Trp-Dipeptid als Akzeptorsubstrat mit m/z 316,1 [M-H]⁻ bei 7,2 min (hellgrau hervorgehoben). Umwandlungsrate von Edukt Leu-Trp zu Produkt P-Leu-Trp mit m/z 396,1 [M-H]⁻ bei 8,4 min ist in dunkelgrau hervorgehoben. Die Signalintensität wurde für alle Experimente auf 100% eingestellt.

Unter diesen Bedingungen wurde eine Linearität der Produktbildung ab 25 Minuten bis zu 240 Minuten beobachtet. Für weitere Versuche in dieser Arbeit wurde eine Inkubationszeit von 2 Stunden gewählt. Desweiteren wurden unterschiedliche Dipeptid- und Proteinkonzentrationen, pH-Werte des Puffers, verwendete Konzentrationen an Mg^{2+} und ATP für die Enzymassays getestet (Daten nicht gezeigt). Die oben beschriebene Enzymtestmethode lieferte die besten Ergebnisse.

2.3.3 Strukturaufklärung des isolierten Produkts der Tale-Kinase

Zur weiteren Charakterisierung des mutmaßlichen Produkts wurde ein Enzymassay mit Tale auf ein Gesamtvolumen von 10 mL hochskaliert und der jeweilige Peak mittels HPLC isoliert und gereinigt. Die Ausbeute an getrocknetem Produkt P-Leu-Trp betrug ~4,4 mg als weißes Pulver. Aus dem anschließenden hochaufgelösten Massenspektrum von Substanz P-Leu-Trp ($[M-H]^-$ Quasi-Molekülion m/z 396,13400, $\Delta = +2,53$ ppm) konnte die Summenformel $C_{17}H_{23}N_3O_6P$ mit Hilfe von Dr. Dorothee Wistuba (Institut für Chemie, Universität Tübingen) bestimmt werden (Abbildung 2.12) (Baulig *et al.*, 2019), was bereits den Schluss zuließ, dass es sich bei dem katalytischen Produkt von Tale möglicherweise um ein Phosphoramidat handelte. Für eine vollständige Strukturaufklärung war eine NMR-spektroskopische Analyse der Substanz erforderlich.

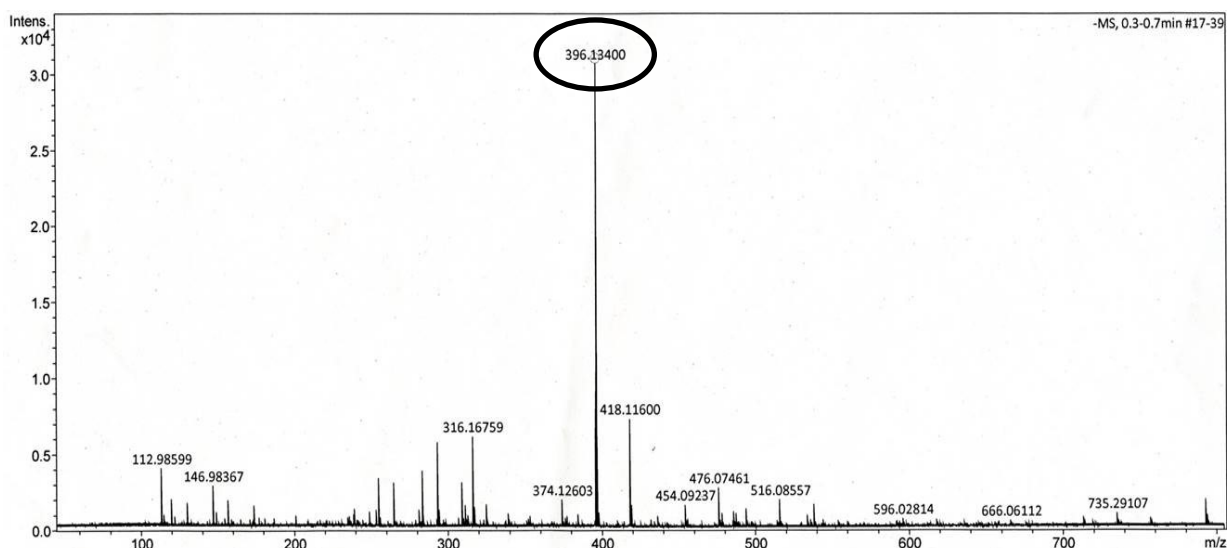


Abbildung 2.12 HR-ESI-TOF-MS-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp aus Tale-Enzymassay mit m/z 396,13400 $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{17}H_{23}N_3O_6P$, 396,13300, $\Delta = +2,53$ ppm) ist dargestellt aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Die Strukturaufklärung wurde mit Hilfe von Irina Helmle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Groß (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) durchgeführt und ausgewertet. Die entsprechenden Abbildungen und Tabellen dieser Auswertungen stammen ebenfalls von Irina Helmle und wurden, mit ihrem Einverständnis, zur besseren Anschaulichkeit in dieser Dissertation eingefügt. Um einen kompletten Struktur-Beweis durchzuführen, wurde das Produkt P-Leu-Trp im Hinblick auf seine spektralen Eigenschaften mit dem entsprechenden Edukt Leu-Trp verglichen. Hierzu wurden beide Substanzen mit einer Folge von ein- und zweidimensionalen (1D und 2D) $^1H/^{13}C/^{15}N$ -basierten Standard-NMR-Experimenten untersucht (Abbildung 2.13, Spektren siehe

ERGEBNISSE

Anhang Abbildung 7.3 bis Abbildung 7.7) (Baulig *et al.*, 2019). Die anschließende Auswertung der NMR-Spektren bestätigte, dass sowohl in Substanz Leu-Trp als auch in Substanz P-Leu-Trp das dipeptidische Leucin-Tryptophan-Rückgrat enthalten war. Die entsprechenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der beiden Substanzen waren nahezu kongruent, jedoch fiel bei der komparativen Analyse der Spektren auf, dass die chemischen Verschiebungen der α - und β -Leucin-Atomkerne des Produkts P-Leu-Trp im Vergleich mit seinem Edukt Leu-Trp im ^1H -NMR-Spektrum eine Hochfeld- und im ^{13}C -NMR Spektrum eine Tieffeldverschiebung erfahren hatten (Tabelle 2.5) (Baulig *et al.*, 2019). Dies legte bereits die Vermutung nahe, dass das Dipeptid Leu-Trp an seinem N-terminalen Ende phosphoryliert wurde. Diese Hypothese konnte durch die Aufnahme von weiterführenden ^{31}P -basierten 1D- und 2D-NMR-Experimenten validiert werden. Während keine Signale im ^1H -entkoppelten ^{31}P -1D-NMR-Experiment mit Edukt Leu-Trp detektiert werden konnten, wurde im entsprechenden Spektrum von Produkt P-Leu-Trp ein Signal mit einer - für Phosphoramidat-Gruppen charakteristischen - chemischen Verschiebung von $-0,25$ ppm beobachtet (Spektrum siehe Anhang Abbildung 7.8) (Bentrude and Tan, 1973; Stec *et al.*, 1976; Gonzalez-Pastor *et al.*, 1995; Moriguchi *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde mit Produkt P-Leu-Trp ein ^1H - ^{31}P -HMBC-NMR-Experiment aufgenommen. Die hierin beobachtete Kopplung des α -Leucin-Protons mit einem Phosphatatomkern lieferte schließlich den finalen Beweis, dass eine direkte N-P-Bindung in P-Leu-Trp vorlag (Abbildung 2.13, Spektrum siehe Anhang Abbildung 7.9) (Baulig *et al.*, 2019).

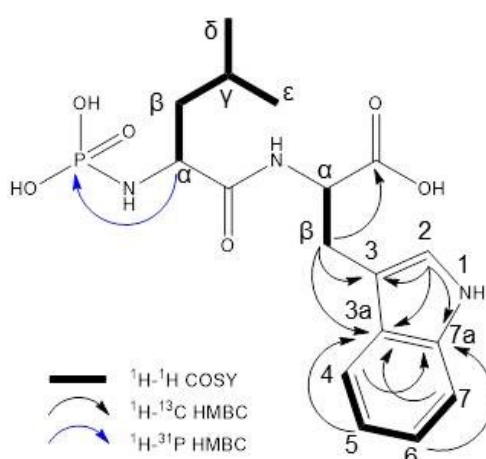


Abbildung 2.13 Struktur des Produkts P-Leu-Trp adaptiert von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Die hervorgehobenen Bindungen stehen für die beobachteten ^1H - ^1H -COSY-NMR-Korrelationen. Schwarze Pfeile kennzeichnen Schlüssel- ^1H - ^{13}C -HMBC-NMR-Korrelationen und der blaue Pfeil symbolisiert die wichtige Korrelation im ^1H - ^{31}P -HMBC-NMR-Spektrum.

ERGEBNISSE

Tabelle 2.5 Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten von Leu-Trp und P-Leu-Trp in DMSO- d_6 (δ in ppm) aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Position		Dipeptid Leu-Trp		Produkt P-Leu-Trp	
		$\delta_{C/N}^a$	δ_H (Protonen, J in Hz) ^b	$\delta_{C/P}^a$	δ_H (Protonen, J in Hz) ^b
Phosphat	P			-0.25 P	
L-Leu	α	50.7 CH	3.76 (1, dd, 6.0, 6.0)	52.0 CH	3.30 ^d
	β_a	40.3 CH ₂	1.55 (2, m)	42.7 CH ₂	1.23 (1, m)
	β_b				1.42 (1, m)
	γ	23.4 CH	1.68 (1, m)	23.6 CH	1.66 (1, m)
	δ	21.7 CH ₃	0.88 (3, d, 6.7)	21.4 CH ₃	0.83 (3, d, 6.5)
	ϵ	22.9 CH ₃	0.90 (3, d, 6.8)	23.0 CH ₃	0.86 (3, d, 6.5)
	α -CO _{Leu}	169.3 C _q		n.d. ^e	
	α -NH _{Leu}	38.8 ^c NH ₂	8.1 ^c (2, br s)	n.d. ^e	n.d. ^e
L-Trp	α	53.2 CH	4.54 (1, ddd, 8.1, 7.6, 5.2)	52.9 CH	4.42 (1, br s)
	β_a	27.0 CH ₂	3.09 (1, dd, 14.7, 8.1)	27.1 CH ₂	3.07 (1, dd, 14.6, 7.3)
	β_b		3.20 (1, dd, 14.7, 5.2)		3.17 (1, dd, 14.6, 5.6)
	NH-1	131.8 NH	10.91 (1, br s)	n.d. ^e	10.83 (1, br s)
	2	123.8 CH	7.19 (1, d, 2.3)	123.3 CH	7.11 (1, d, 1.7)
	3	109.4 C _q		109.9 ^f C _q	
	3a	127.1 C _q		127.4 ^f C _q	
	4	118.1 CH	7.55 (1, d, 7.9)	118.1 CH	7.52 (1, d, 7.6)
	5	118.4 CH	6.99 (1, m)	118.0 CH	6.95 (1, t, 7.6, 7.3)
	6	121.0 CH	7.07 (1, m)	120.5 CH	7.05 (1, t, 7.9, 7.3)
	7	111.4 CH	7.35 (1, dt, 8.1, 0.8)	111.0 CH	7.31 (1, d, 7.9)
	7a	136.1 C _q		136.0 ^f C _q	
	α -CO _{Trp}	172.8 C _q		173.5 ^f C _q	
	α -NH _{Trp}	121.6 NH	8.80 (1, d, 7.6)	n.d. ^e	n.d. ^e

Die NMR-Spektren wurden in DMSO- d_6 aufgenommen. ^a Aufgenommen bei 101 MHz für ¹³C und bei 162 MHz für ³¹P. Die entsprechende chemische Verschiebung für ¹⁵N wurde aus dem zugehörigen ¹H-¹⁵N-HMBC-NMR-Experiment bestimmt. Die Multiplizität wurde mittels eines multiplizitäten-editierten ¹H-¹³C-HSQC und eines DEPT135-NMR-Experiments bestimmt. ^b Aufgenommen bei 400 MHz. ^c Nur sichtbar nach Wasserzugabe. ^d Die entsprechende chemische Verschiebung wurden aus dem zugehörigen ¹H-¹H-COSY-NMR-Spektrum extrahiert. Aufgrund eines breiten Wassersignals konnten die Kopplungskonstante und das zugehörige Integral nicht bestimmt werden. ^e Nicht detektierbar. ^f Die entsprechende chemische Verschiebung wurde aus dem ¹H-¹³C-HMBC-NMR-Experiment ermittelt.

ERGEBNISSE

Komplementär zur NMR-Analytik wurden zusätzlich Tandem-MS-Untersuchungen mit dem Produkt P-Leu-Trp durchgeführt. Die Fragmentierung des $[M+H]^+$ Quasimoleküls (m/z 398,1) von P-Leu-Trp lieferte entsprechende Fragment-Ionen der b - und y -Serie, die komplett im Einklang mit der vorgeschlagenen Struktur von P-Leu-Trp waren (Abbildung 2.14) (Baulig *et al.*, 2019).

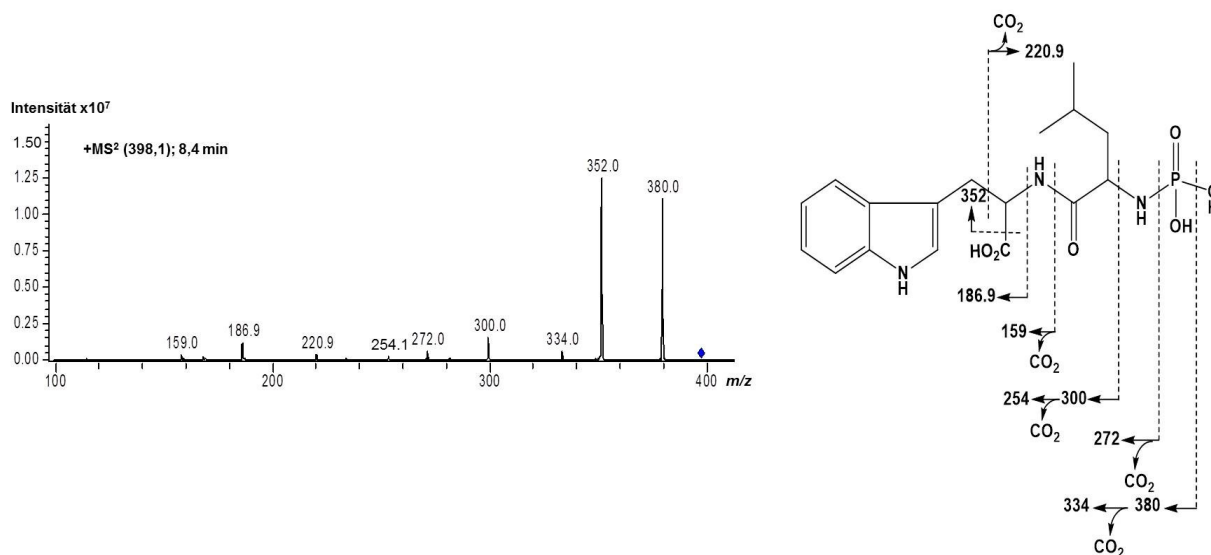


Abbildung 2.14 MS/MS-Spektrum und vorgeschlagenes Fragmentierungsschema von Produkt P-Leu-Trp im positiven Modus mit m/z 398,1 übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Die Fragmente der MS/MS-Analyse wurden von MetFrag (Wolf *et al.*, 2010) vorhergesagt und sind durch Pfeile in der Strukturformel dargestellt.

Diese Gesamtergebnisse bewahren, dass TalE den zweiten Schritt in der Phosphoramidon- und Talopeptin-Biosynthese katalysiert, indem das TalD-Produkt Leu-Trp und ATP als Substrate zur Formung von P-Leu-Trp gebraucht werden. Damit stellt TalE das erste Enzym in der Naturstoffbiosynthese dar, das durch einfache Phosphorylierung eines Amins ein niedermolekulares Phosphoramidat erzeugt (Baulig *et al.*, 2019).

2.3.4 Untersuchung der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetischen Vorläufern

In einem weiteren Experiment sollte, zur Bildung neuer Derivaten von Produkt P-Leu-Trp, die Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit mehreren strukturellen synthetischen Vorläufer-Analoga in einem, wie zuvor beschriebenen TalE-Enzymassay, untersucht werden (Abbildung 2.15). Alle Akzeptorsubstrate wurden in einer Konzentration von 2,5

ERGEBNISSE

mM verwendet. Der enzymatische Assay von 10 μ M TalE zeigte für die Vorläufer-Analoga 3 (Ala-Trp), 4 (Thr-Trp) und 5 (Leu-Tyr) (Tabelle 4.14) eine sehr niedrige Umwandlung des Edukts zum jeweiligen Produkt P-X-X (Abbildung 2.15). Ein höherer Umsatz wurde mit Dipeptid 1 (Met-Trp) und Dipeptid 2 (Leu-Leu) beobachtet. Das Vorläufer-Analog aus Met-Trp wurde durch TalE mit 5-fach höherer Umwandlungsrate als Ala-Trp phosphoryliert. Dies legt nahe, dass TalE eine spezifische Kinase für die Biosynthese phosphorylierter Produkte, insbesondere für Produkt P-Leu-Trp ist.

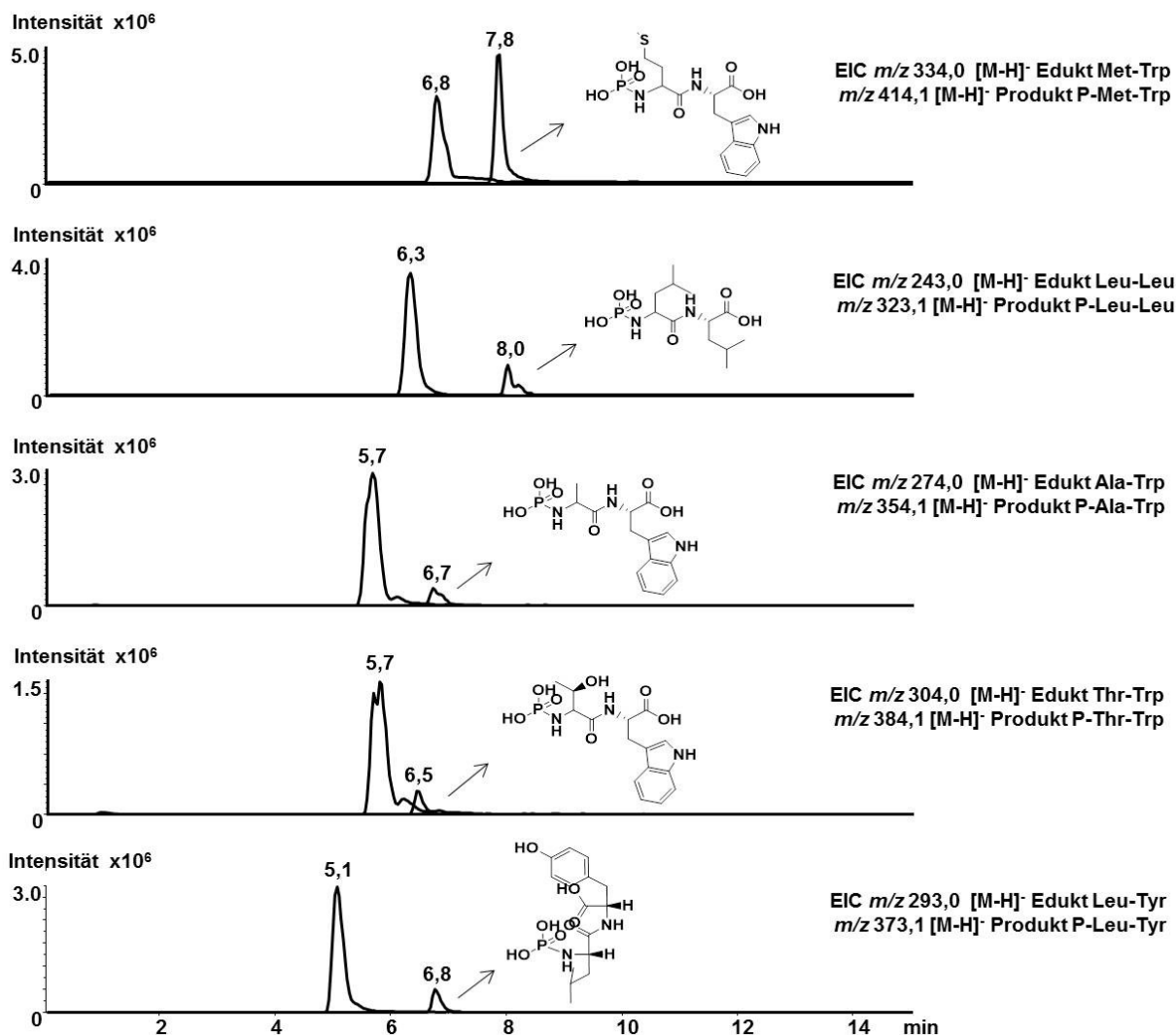


Abbildung 2.15 LC-MS-Analysen der Akzeptorsubstratspezifität von TalE mit verschiedenen synthetischen Vorläufern. EICs im negativ Modus der jeweiligen Substraten Met-Trp mit m/z 334,0 [M-H]⁻ bei 6,8 min; Leu-Leu mit m/z 243,0 [M-H]⁻ bei 6,3 min; Ala-Trp mit m/z 274,0 [M-H]⁻ bei 5,7 min; Thr-Trp mit m/z 304,0 [M-H]⁻ bei 5,7 min und Leu-Tyr mit m/z 293,0 [M-H]⁻ bei 5,1 min. Massenpeaks der phosphorylierten Produkte wurden für P-Met-Trp mit m/z 414,1 [M-H]⁻ bei 7,8 min und P-Leu-Leu mit m/z 323,1 [M-H]⁻ bei 8,0 min verifiziert. Ionen mit m/z 354,1 [M-H]⁻ bei 6,7 min wurden für Produkt P-Ala-Trp; mit m/z 384,1 [M-H]⁻ bei 6,5 min für Produkt P-Thr-Trp und für die Verbindung P-Leu-Tyr mit m/z 373,1 [M-H]⁻ bei 6,8 min gefunden.

ERGEBNISSE

Die Bildungen neuer Verbindungen wurden durch LC-MS- und MS/MS-Analysen (Daten nicht gezeigt) verifiziert. Für die phosphorylierten Produkte wurden Massenpeaks für P-Met-Trp mit m/z 414,1 $[M-H]^-$ bei 7,8 Minuten gefunden und für P-Leu-Leu mit m/z 323,1 $[M-H]^-$ bei 8,0 Minuten. Ionen mit m/z 354,1 $[M-H]^-$ wurden für Produkt P-Ala-Trp, mit m/z 384,1 $[M-H]^-$ für Produkt P-Thr-Trp und für die Verbindung P-Leu-Tyr wurden Ionen mit m/z 373,1 $[M-H]^-$ gefunden. Erste Auswertungen der MS/MS-Spektren der neuen Verbindungen (Daten nicht gezeigt) deuteten auf eine Übereinstimmung der erwarteten Fragmente im Vergleich zu Produkt P-Leu-Trp hin (Abbildung 2.14). Ebenso weisen erste MS/MS-Fragmentierungsmuster aller neu gebildeten Produkte P-X-X (Fragmentierungsschema nicht gezeigt) eine analoge Situation zu Produkt P-Leu-Trp auf (Abbildung 2.14).

2.4 UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER GLYCOSYLTRANSFERASE TALC IN DER PHOSPHORAMIDON-BIOSYNTHESE

Zuvor wurde die Klonierung und heterologe Expression des Fosmids talMB01 in *Streptomyces* sp. MK730-62F2 beschrieben, welches das erste identifizierte *tal*-Gencluster des Metalloproteinase-Inhibitors Phosphoramidon enthält. Phosphoramidon enthält ein L-Leu-L-Trp-Dipeptidrückgrat, das über eine Phosphoramidatbrücke eindeutig an eine L-Rhamnoseeinheit gebunden ist und zählt somit zur Struktur bioaktiver Verbindungen, die einen 6-Desoxyzucker enthalten. In den meisten Fällen tragen solche bioaktive 6-Desoxyhexoseeinheiten wesentlich zur Beeinflussung der Verbindungseigenschaften bei, wie z.B. Molekül/Target-Interaktionen, Import und Export von Zellen, Pharmakokinetik und Löslichkeit (Williams *et al.*, 2008). 6-Desoxyzucker wurden in ihrer Biosynthese detailliert untersucht und gehen in der Regel von NDP-aktivierten Hexosen über 4-Keto-6-Desoxy-Intermediate aus (Liu and Thorson, 1994) und sind insbesondere in bakteriellen Sekundärmetaboliten vorherrschende Merkmale. Die Promiskuität des Substrats der jeweiligen Glycosyltransferasen wurde ergiebig verwendet, um die Struktur bioaktiver Kleinmoleküle zu konstruieren (Gantt *et al.*, 2011). Normalerweise bilden Glycosyltransferasen eine direkte *O-glykosidische* Verknüpfung zum Aglykon, obgleich auch die Bildung von Thioglykosiden, *N-Glykosiden* und auch *C-Glykosiden* publik ist (Durr *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2005; Oman *et al.*, 2011). Die Bindung von Zuckern in der Naturstoffbiosynthese über Phosphoester-Verknüpfung ist jedoch sehr selten und wurde nur bei Moenomycinen funktionell untersucht (Ostash *et al.*, 2009).

2.4.1 Herstellung TalC/TalE-haltiger Proteinextrakte

TalC zeigt eine Sequenzhomologie zu bekannten Glycosyltransferasen von anderen Antibiotika-Gencluster, wie z.B. Cpz31 (45% Ähnlichkeit) aus *Streptomyces* sp. MK730-62F2 (Kaysser *et al.*, 2010). Demnach könnte TalC für die Installation des Desoxyzuckers am Phosphoramidon beteiligt sein. Das Plasmid pAB01, das *talC* enthält, wurde in *E. coli* überexprimiert. TalC konnte jedoch nicht als lösliches Protein erhalten werden. Daher wurde die Produktion von TalC/TalE-haltigen, zellfreien Extrakten durch Inokulieren und Kultivieren von Sporensuspension von *Streptomyces* sp. MK730-62F2 ($\Delta talC/\Delta talE$ -Mutanten) erreicht. Nach der Zelllyse (1 mg/mL Lysozym)

ERGEBNISSE

wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung zerstört. Die daraus enthaltenen zellfreien Proteinextrakte wurden für weitere Enzymtests verwendet.

2.4.2 Reaktion von TalC mit dTDP-L-Rhamnose und TalE-Assay Produkt

Als nächstes wollten wir überprüfen, ob TalC, P-Leu-Trp als echtes Zwischenprodukt in der Biosynthese von Phosphoramidon verwendet. Daher haben wir dem TalE-Assay, dTDP-L-Rhamnose und einen TalC-haltigen Proteinextrakt zugesetzt. Nach 16-stündiger Inkubation bei 30 °C analysierten wir das Reaktionsgemisch mittels LC-MS und identifizierten einen einzelnen Produktpeak (2), der in Retention ($t_R = 7,9$ min), Masse (m/z 542,0 $[M-H]^-$) und einem UV-Spektrum (280 nm) Phosphoramidon entspricht (Abbildung 2.16 und 2.17). Phosphoramidon (1) wurde nicht produziert, wenn entweder P-Leu-Trp, dTDP-L-Rhamnose oder TalC im Assay fehlten (Baulig *et al.*, 2019).

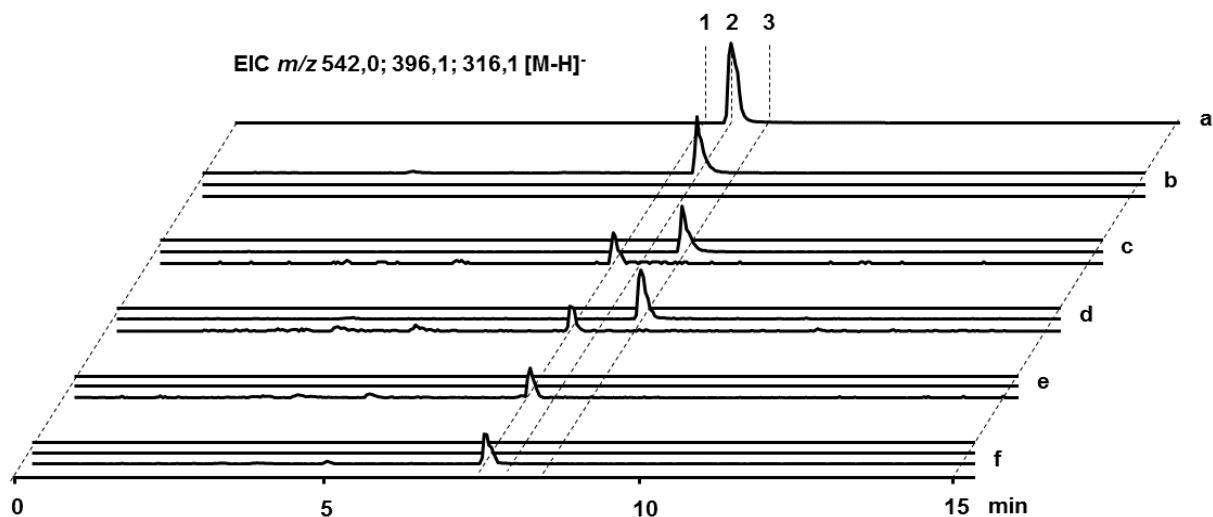


Abbildung 2.16 LC-MS-Analyse von Enzymreaktionen adaptiert von (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. (EICs) für m/z 542,0 $[M-H]^-$ bei 7,9 min (PA, 2); m/z 396,1 $[M-H]^-$ bei 8,4 min (Produkt P-Leu-Trp, 3) und m/z 316,1 $[M-H]^-$ bei 7,2 min (Edukt Leu-Trp, 1). (a) Kommerzieller Standard von PA (2). (b) Enzymatischer Assay mit TalC (Proteinextrakt der $\Delta talE$ -Mutante), dTDP-L-Rhamnose, TalE, Edukt Leu-Trp und ATP zeigte eine Umwandlung von Edukt Leu-Trp zu PA (2). (c) Kontrollassay von (b) ohne TalC unter Verwendung eines Proteinextrakts der $\Delta talC$ -Mutante. (d) Kontrollassay von (b) ohne dTDP-L-Rhamnose. (e) Kontrollassay: Proteinextrakt der $\Delta talC$ -Mutante mit Edukt Leu-Trp. (f) Kontrollassay: Proteinextrakt der $\Delta talE$ -Mutante mit Edukt Leu-Trp. Die Signalintensität wurde für alle Experimente auf 100% eingestellt.

ERGEBNISSE

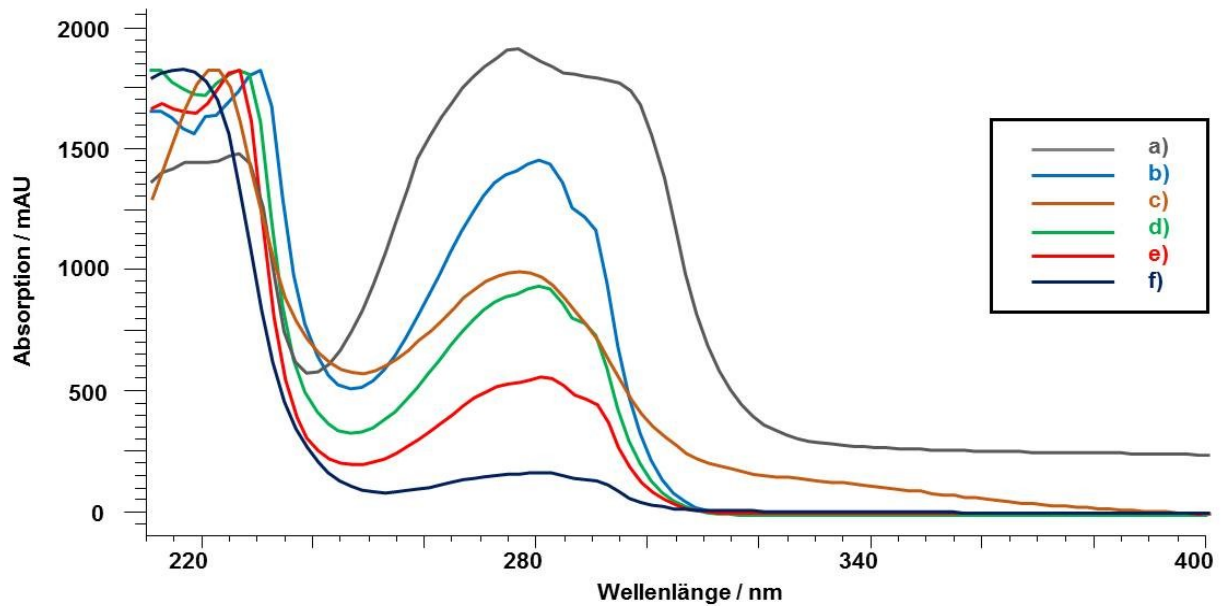


Abbildung 2.17 UV-sichtbare spektroskopische Analyse von a) *S. mozunensis* MK-23. b) Phosphoramidon-SD. c) Wirt + *tal*-Cluster. d) Synthetisches L-Leu-L-Trp-Dipeptid (Edukt). e) TalE-Assay Produkt (P-Leu-Trp) und f) TalC-Testprodukt (PA) übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Eine anschließende MS/MS-Analyse auf das Mutterion des kommerziellen Phosphoramidon-SDs und des gefundenen TalC-Produktpeaks mit der Masse m/z 542,0 $[M-H]^-$ zeigte zwei identische Tochterfragmente mit den Massen m/z 377,8 $[M-H]^-$ und m/z 395,9 $[M-H]^-$ (Abbildung 2.18A und 2.18B). Durch eine HPLC-Analyse konnte die Identität von Phosphoramidon ($\sim 0,1$ mM) im TalC-Assaygemisch (50 μ L) vergleichend zu Verdünnungsreihen des Phosphoramidon-SDs sowie einem anschließenden hochaufgelösten Massenspektrum ($[M-H]^-$ Quasi-Molekülion m/z 542,19099, $\Delta = +0,17$ ppm) mit der Summenformel $C_{23}H_{33}N_3O_{10}P$ bestätigt werden (Abbildung 2.18C). Diese Ergebnisse zeigen, dass TalC, unter Gebrauch von dTDP-L-Rhamnose, P-Leu-Trp als Akzeptorsubstrat verwendet, um den Transfer eines Desoxyzuckers auf die Phosphorylgruppe zu katalysieren und somit eine bis dato unbeschriebene Reaktion in der Naturstoffbiochemie darstellt (Baulig *et al.*, 2019).

ERGEBNISSE

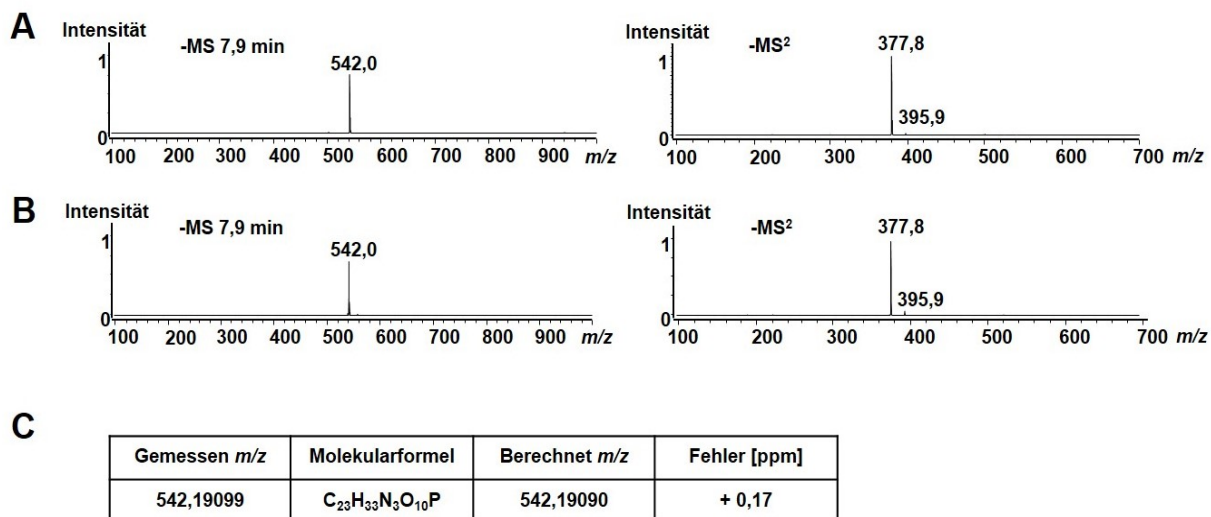


Abbildung 2.18 MS-Analyse des TalC-Assays übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. MS-Spektren im negativen Modus (links) mit m/z 542,0 $[M-H]^-$ bei 7,9 min und MS/MS-Spektren (rechts) aus der LC-Analyse von (A) Phosphoramidon-SD und (B) TalC-Assay-Produkt (PA). (C) HR-ESI-TOF-MS-Messungen des TalC-Produktpeaks mit m/z 542,19099 $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{23}H_{33}N_3O_{10}P$, 542,19090, $\Delta = +0,17$ ppm).

2.4.3 Co-Expression von Zuckerplasmiden und dem Talopeptin-Gencluster

Um die Herstellung und Gewinnung von Phosphoramidon in einem gut charakterisierten Wirtstamm wie *S. coelicolor* M512 zu untersuchen, wurde das Fosmid talMB01 zunächst durch intergenerische triparentale Konjugation in den heterologen Produzenten transferiert. Drei kanamycinresistente Klone wurden isoliert, die chromosomale Integration von talMB01 mittels PCR verifiziert und anschließend die einzelnen Klone im Produktionsmedium kultiviert. Erste LC-MS-Ergebnisse führten erwartungsgemäß nicht zu einer heterologen Phosphoramidon-Produktion. Die fehlende Produktion korreliert mit dem Fehlen mutmaßlicher Gene für die Desoxyzuckerbildung innerhalb des Genclusters. Zudem ist *S. coelicolor* M512 alleine nicht in der Lage intaktes Phosphoramidon zu produzieren (Abbildung 2.19), denn dem heterologen Wirtstamm fehlen die entsprechenden eigenen Gene im Genom für eine vollständige dTDP-L-Rhamnose-Biosynthese. Die Bildung von dTDP-L-Rhamnose umfasst vier Enzyme, eine dTDP-D-Glucose-Synthase, eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase, eine dTDP-Desoxyglucose-3,5-Epimerase und eine 4-Ketoreduktase.

Um zu untersuchen, ob alle Gene, die für die vollständige Biosynthese von Phosphoramidon erforderlich sind, auf talMB01 funktionell exprimiert werden, wurde das Plasmid pRHAM (Rodriguez *et al.*, 2000), das alle notwendigen Gene der dTDP-L-Rhamnose-Biosynthese aus dem Oleandomycin-Cluster aus *Streptomyces antibioticus*

ERGEBNISSE

enthält, über PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation erfolgreich in den heterologen Stamm *S. coelicolor* M512/talMB01 transformiert. Dabei kodiert das Gen *oleS*, für eine dTDP-Glucose-Synthase, *oleE*, für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase, *oleL*, für eine dTDP-Desoxyglucose-3,5-Epimerase und *oleU*, für eine 4-Ketoreduktase (Tabelle 2.6). Drei einzelne Klone, bezeichnet als *S. coelicolor* M512/talMB01/pRHAM(1–3), wurden aufgrund ihrer Thiostrepton-Resistenz ausgewählt und in Produktionsmedium kultiviert. Die Analyse der Kulturextrakte mittels LC-MS ergab, dass der Mutantenstamm *S. coelicolor* M512/talMB01/pRHAM im Vergleich zu *S. coelicolor* M512 und *S. coelicolor* M512/talMB01 Phosphoramidon mit einer Masse von m/z 542,0 $[M-H]^-$ bei einer t_R von 7,5 min produziert (Abbildung 2.19).

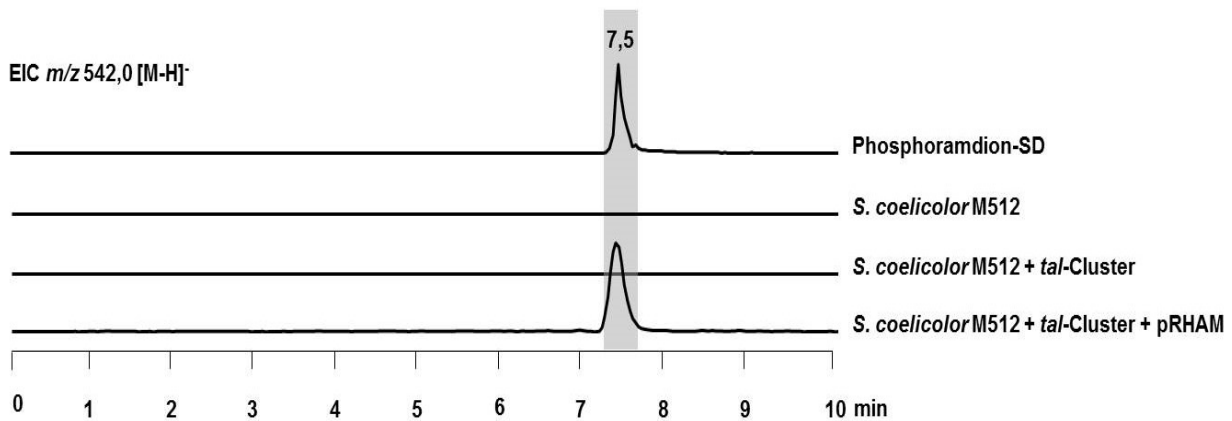


Abbildung 2.19 LC-MS-Analyse von Phosphoramidon-SD, Kulturextrakten von *S. coelicolor* M512-Wildtyp, *S. coelicolor* M512 und dem *tal*-Gencluster talMB01, sowie *S. coelicolor* M512/talMB01 mit pRHAM, das die biosynthetischen Gene für die dTDP-L-Rhamnose co-exprimiert. EICs mit m/z 542,0 $[M-H]^-$ im negativen Modus von PA bei 7,5 min ist in grau hervorgehoben. Die Signalintensität wurde für alle Experimente auf 100% eingestellt.

Das Ergebnis bestätigt die Gewinnung von Phosphoramidon in *S. coelicolor* M512/talMB01 unter Verwendung des Plasmids pRHAM. Wir können zudem davon ausgehen, dass ein potentiell Gen für eine mutmaßliche Glycosyltransferase (*talC*), welches im Talopeptin-Gencluster kodiert, der wahrscheinlichste Kandidat für die Bindung der dTDP-L-Rhamnose bzw. 6-Desoxy-L-Taloseeinheit in der Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Produktion ist.

Nachdem die Co-Expression von pRHAM in *S. coelicolor* M512/talMB01 gelang, wollten wir die Herstellung neuer Derivate in weiteren Experimenten versuchen. Wie bereits oben beschrieben sind Desoxyzuckereinheiten in den meisten Naturstoffen essentiell für deren Wirkung. Die Herstellung von Substanzen mit veränderten Desoxyzuckern-

ERGEBNISSE

Gruppen und die damit verbundenen veränderten Eigenschaften wurden vielfach mit Erfolg durchgeführt. Diese Ansätze benötigen aber eine gewisse Flexibilität der jeweils beteiligten Glycosyltransferasen. Dazu wurde in weiteren Versuchen die Expression von Genen, die für die Biosynthese anderer Desoxyzucker zuständig sind, gestartet (Tabelle 2.6). Hierfür wurden die Plasmide pLN2, pLNBIV, pLNRHO und pFL947 (Entrechem) in den heterologen Wirt *S. coeliolor* M512/talMB01 gebracht. Sollte also die Glycosyltransferase TalC diese akzeptieren, könnte die L-Rhamnoseeinheit durch eine andere Desoxyzucker-Gruppen ausgetauscht werden. So könnten zum einen neue Strukturen entstehen und zum anderen die Substratspezifität der Glycosyltransferase (TalC) getestet werden.

Tabelle 2.6 Übersicht über die transformierten Entrechem-Plasmide und die erwarteten Desoxyzucker.

Plasmid	Gene	Zucker
pRHAM	<i>oleU, oleL, oleS, oleE</i>	L-Rhamnose
pLN2	<i>oleV, oleW, oleU, oleY, oleL, oleS, oleE</i>	L-Olivoose
pLNBIV	<i>oleV, oleW, eryBIV, oleY, oleL, oleS, oleE</i>	L-Digitoxose
pLNRHO	<i>oleV, oleW, urdZ3, oleY, oleL, oleS, oleE, urdQ</i>	L-Rhodinoose
pFL947	<i>oleV, oleW, eryBIV, mtmC, eryBVII, mtmE, mtmD,</i>	L-Chromoose B

EryBIV = 4-Ketoreduktase; *eryBVII* = 3,5-Epimerase; *mtmC* = C-Methyltransferase; *mtmD* = NDP-D-Glucose-Synthase; *mtmE* = NDP-D-Hexose 4,6-Dehydratase; *oleE* = dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase; *oleL* = dTDP-Desoxyglucose-3,5-Epimerase; *oleS* = dTDP-Glucose-Synthase; *oleU* = 4-Ketoreduktase; *oleV* = 2,3-Dehydratase; *oleW* = 3-Ketoreduktase; *oleY* = 3-O-Methyltransferase; *urdQ* = 3,4-Dehydratase; *urdZ3* = 4-Ketoreduktase.

Je drei Klone wurden mit Thiostrepton selektiert, isoliert und in Produktionsmedium kultiviert. Die LC-MS-Analyse der Kulturextrakte führte zu keiner Herstellung von neuen Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Derivaten. Eine mögliche Erklärung der fehlgeschlagenen Versuche wäre, eine hohe Substratspezifität der Glycosyltransferase (TalC) für die dTDP-L-Rhamnose bzw. 6-Desoxy-L-Talose. Die Homologie von TalC zu Cpz31 aus dem Caprazamycin-Gencluster könnte für eine ähnlich hohe Spezifität sprechen. Weitere Experimente müssen diese Annahme belegen.

2.4.4 Einführung des Talopeptin-Genclusters in *S. fradiae* A0

Dieser Teil der Doktorarbeit wurde mit Unterstützung von Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) durchgeführt. Glycosyltransferasen wurden vielfach zur strukturellen Diversifizierung von glykosylierten Verbindungen verwendet (Blanco *et al.*, 2001; Luzhetskyy *et al.*, 2007; Olano *et al.*, 2008; Gaisser *et al.*, 2009), da sie oft eine hohe Flexibilität gegenüber dem Donor-Substrat aufzeigen. Um die Herstellung von Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Derivaten mit veränderten Desoxyzuckereinheiten zu erzeugen, wurde das Fosmid talMB01 in *Streptomyces fradiae* A0 eingeführt, welcher die Desoxyzucker L-Rhodinose und D-Olivose produziert. Die Übertragung der Fosmid-DNA in den Wirtstamm wurde durch intergenerische triparentale Konjugation durchgeführt. Jeweils drei einzelne Klone wurden aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz ausgewählt und als *S. fradiae* A0/talMB01(1–3) bezeichnet (siehe auch Masterarbeit Marius Bader). Die Kultivierung und anschließender LC-MS-Analyse von Extrakten der heterologen Mutanten erzielte jedoch nicht die Identifizierung erwarteter Derivate von Phosphoramidon oder Talopeptin (siehe auch Masterarbeit von Marius Bader). Leider war die Konzentration der Verbindungen zu niedrig, so dass zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Untersuchungen möglich waren. TalC könnte möglicherweise spezifischer für die dTDP-L-Rhamnose bzw. die 6-Desoxy-L-Talose sein als andere Glycosyltransferasen, wie z.B. ElmGT aus *S. olivaceus* (Blanco *et al.*, 2001) oder StfG aus *S. steffisburgensis* (Olano *et al.*, 2008). Kaysser *et al.* vermuten ebenfalls, dass die Rhamnosyltransferase Cpz31 aus dem bekannten Caprazamycin-Gencluster spezifischer für die dTDP-L-Rhamnose ist als verwandte Glycosyltransferasen (Kaysser *et al.*, 2010).

3 DISKUSSION

Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren haben sich in den letzten Jahren als therapeutische Strategie insbesondere in der Krebschemotherapie herauskristallisiert und damit großes Interesse auf sich gezogen. Ihr einzigartiges α' , β' -Epoxyketon-Pharmakophor ermöglicht die Bindung an die katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms mit auffallender Besonderheit (Groll *et al.*, 2000; Schrader *et al.*, 2016). Die dadurch bedingte Proteasom-Hemmung hat somit wichtige Auswirkungen auf zahlreiche entzündliche und maligne Erkrankungen (Meiners *et al.*, 2008; Orłowski and Kuhn, 2008). Filamentösen Actinobakterien produzieren eine Reihe von Metaboliten, die auf das Proteasom abzielen, wie die beiden Peptidyl-Epoxyketon-Naturstoffe, Epoxomicin und Eponemycin (Moore *et al.*, 2008). Kürzlich wurden die ersten Biosynthesegencluster der beiden Verbindungen identifiziert und charakterisiert (Schorn *et al.*, 2014). Sie bestehen aus multifunktionalen Enzymen der hybriden nicht-ribosomalen Peptidsynthetase/Polyketidsynthase (NRPS/PKS), welche den Aufbau einer kurzen Peptidkernstruktur mit einem terminalen C3-verlängerten Leucin katalysieren. Zudem wird die Bildung des α' , β' -Epoxyketons durch Acyl-CoA-Dehydrogenase (ACAD)-ähnliche Enzyme vermittelt (Zettler *et al.*, 2016). Mit der Aussicht analoge Biosynthesewegen zu neuen Proteasom-Inhibitoren in anderen Bakterien zu identifizieren, wurde eine spezifische Sonde für das „Genome-Mining“ verwendet (Schorn *et al.*, 2014).

Der erste Teil dieser Dissertation beschreibt die Identifizierung und Analyse von drei homologen „orphan“ Genclustern zur möglichen Bildung neuer Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren, aus *Streptomyces pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646. Die heterologe Expression der drei Gencluster *b-2517*, *s-1022* und *s-646* in *Streptomyces albus* J1074 ergab keine eindeutige Verbindung, welche auf ein entsprechendes Epoxyketon-Derivate hindeutete. Auch die Verwendung des „MS Molecular Networking“ für einen neuen Ansatz der vergleichenden Metabolomik in einem heterologen System führte nicht zur Entdeckung einer Reihe mutmaßlicher Epoxyketon-Derivate. Die klonierten Gencluster werden unter unseren Kulturbedingungen wahrscheinlich nicht transkribiert oder sind stillgelegt. Die Inaktivierung aller regulatorischen Gene im *b-2517*-Gencluster und *s-646*-Gencluster, sowie das Einbringen eines induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors in das *s-1022*-Gencluster

zur möglichen Aktivierung der stillen Cluster, brachten keine neuen Stoffwechselprofile mit sich. Durch die Expression der Gencluster in den Wirtstamm *S. albus* J1074 werden zwar eine Reihe von Verbindungen produziert, die bislang nicht weiter charakterisiert werden können. Zusammenfassend lieferten die verschiedenen Analysemethoden der drei „orphan“ Biosynthesegencluster aus *Streptomyces*-Spezies keine Einblicke in die Bildung eines neuen bioaktiven Epoxyketon-Derivats. Abschließende Proteasom-Inhibitor-Assays lieferten erste Aufschlüsse über die Hemmungen der Proteasomaktivität durch die einzelnen Kulturextrakte. Unterschiedliche inhibitorische Aktivitäten konnten innerhalb der Kulturextrakte der Wildtyp-Produzenten *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-646 und *Streptomyces* sp. NRRL S-1022, sowie innerhalb der einzelnen Mutantenstämmen *S. albus* J1074/epnAB06(1,2), *S. albus* J1074/epnAB10(1,2), *S. albus* J1074/epnAB11(1,2), *S. albus* J1074/epnAB12(1,2) und *S. albus* J1074/epnAB13(1,2) festgestellt werden. Eine genaue statistische Auswertung dieser Resultate müsste durch weitere Experimente folgen.

3.1 UNTERSUCHUNG NEUER EPOXYKETON-BIOSYNTHESEGENCLUSTER

Das „Genome-Mining“ für die Entdeckung neuer Naturstoffe nutzt im Allgemeinen genomische Informationen sequenzierter Organismen, um mutmaßliche biosynthetische Gencluster zu identifizieren und diese Gene mit chemischen Verbindungen zu verbinden (Zerikly and Challis, 2009; Gomez-Escribano and Bibb, 2014; Wohlleben *et al.*, 2016). Die Entdeckung der mutmaßlichen biochemischen Biosynthesewege im Genom basiert auf spezialisierte Bioinformatik-Tools und -Ressourcen (Medema *et al.*, 2011).

Interessanterweise gelang es Schorn *et al.* durch eine Proteinhomologiesuche unter Verwendung der ACAD (EpnF), der Epoxyketonsynthase aus dem Eponemycin-Biosynthesegencluster (BGC), eine Reihe homologer Gencluster in verschiedenen Mikroorganismen zu lokalisieren, die die Entdeckung neuer bioaktiver Derivatmoleküle in naher Zukunft versprechen sollten (Abbildung 7.11) (Schorn *et al.*, 2014). Drei der ausgewählten homologen „orphan“ Gencluster aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 schienen auf den ersten Blick sehr faszinierend zu sein, da sie mit dem Eponemycin-Gencluster

DISKUSSION

Ähnlichkeiten aufweisen. Die jeweiligen Cluster kodieren für eine ungewöhnliche nicht-lineare NRPS/PKS-Assemblierungslinie oder weisen auf einen beispiellosen Aminosäureeinbau hin, die möglicherweise den Aufbau eines acylierten Peptids und die Verlängerung des terminalen Leucinrests katalysieren könnten (Zettler *et al.*, 2016). Eine genaue Reihenfolge der Aminosäuren der erzeugten Peptidstrukturen war jedoch anfangs erschwert, da die Domänen der putativen NRPS-Module im *b-2517*- und *s-646*-Cluster auf mehreren getrennten Genen kodiert sind. Dagegen sind die putativen NRPS-Module im *s-1022*-Cluster auf einem einzigen Gen kodiert, welches die Voraussage und Abfolge der Aminosäuren des neuen Peptids vereinfachen sollte. Das Vorhandensein eines einzigen putativen Typ-I-PKS-Moduls (B-2517J, S-1022B, S-646D) sowie einer Thioesterase (B-2517G, S-1022A, S-646J) gemeinsam mit dem Homolog der ACAD (B-2517F, S-1022E, S-646F) in den jeweiligen drei Genclustern deutete anfangs auf die Verbindung von neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren hin.

Im Fall von Epoxomicin und Eponemycin berichteten Studien zur Gendeletion dieser Gene über die entscheidende Aktivität der konservierten ACAD-ähnlichen Enzyme an der Bildung des α' , β' -Epoxyketons (Liu *et al.*, 2015; Zettler *et al.*, 2016). Durch die Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Epoxyketonsynthese EpnF konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Epoxyketonsynthese EpnF eine α -dimethylierte β -Ketosäure als Substrat verwendet (Zabala *et al.*, 2016). Dieser Vorläufer stammt von einem NRPS-Peptidprodukt, in dem das terminale Leucin mit einer Malonyleinheit kondensiert, die dann durch Einwirkung eines einzelnen PKS-Moduls, das eine Methyltransferase-Domäne enthält, zweimal aus S-Adenosylmethionin α -methyliert wird. Die Autoren Challis *et al.* haben kürzlich für EpnF gezeigt, dass nach beginnender Decarboxylierung zur Erzeugung eines Enolat-Zwischenprodukts, das β -Kohlenstoffatom unter Reduzierung des Flavin-Cofaktors dehydriert wird, um ein α' , β' -ungesättigtes Keton zu formen. Im letzten Schritt würde das reduzierte Flavin mit molekularem Sauerstoff reagieren, um eine Hydroperoxidspezies bereitzustellen, die das ungesättigte Keton in das Epoxyketon umwandeln kann (Zabala *et al.*, 2016). Wie anfänglich vermutet könnten analog dazu die EpnF-Homologe B-2517F, S-1022E, S-646F an der Bildung eines solchen α' , β' -Epoxyketons beteiligt sein.

Ein weiteres gefundenes Merkmal in Epoxyketon-Genclustern sind Gene für Cytochrom P450-Enzyme (Schorn *et al.*, 2014; Owen *et al.*, 2015; Zettler *et al.*, 2016). Erstaunlicherweise fehlen jedoch den drei homologen Genclustern *b-2517*, *s-1022* und *s-646* die vorgeschlagenen Cytochrom P450-Homologen wie EpnI/EpxC (Schorn *et al.*,

DISKUSSION

2014), die auch an Epoxidierungsreaktionen beteiligt sein können (Thibodeaux *et al.*, 2012). Interessanterweise fehlt dem vor Kurzem identifizierten Gencluster für die Epoxyketon-Verbindung Macyranon aus *Cystobacter fuscus* ebenfalls ein Gen, das für ein Cytochrom P450-Enzym kodiert, was zu einem alternativen Acyl-Carrier-gebundenen vorgeschlagenen Mechanismus für die Epoxyketonbildung führte, an dem das ACAD-Homolog MynC und möglicherweise die Typ-II-Thioesterase MynH beteiligt sind (Keller *et al.*, 2015). Nicht alle Epoxyketon-Gencluster kodieren somit für ein Cytochrom P450-Enzym. Zudem zeigen kürzlich veröffentlichte Studien von Liu *et al.*, dass z.B. in einem heterologen *Escherichia coli*-System nur die Gene für die ACAD (*epnF*) und die NRPS/PKS-Maschinerie (*epnG/epnH*), sowie die externe Zugabe von Fettsäuren zur Herstellung einer Epoxyketoneinheit benötigt werden (Liu *et al.*, 2015). Knockout-Studien legten nahe, dass Cytochrom P450-Enzyme, wie EpnI/EpxC zwar eine bedeutende Rolle im Eponemycin-Biosyntheseweg spielen können, aber für die generelle Umwandlung von terminalen Carbonsäure in der Epoxyketoneinheit nicht unbedingt erforderlich zu sein scheinen, sondern vielmehr an üblichen oxidativen modifizierenden Reaktionen, wie Hydroxylierung beteiligt zu sein (Abbildung 1.8) (Zettler *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse stimmen mit den Studien von Zabala *et al.* überein (Zabala *et al.*, 2016).

Basierend auf diesen Hintergründen wurden hypothetische Modelle für die Biosynthesewege der drei homologen „orphan“ Gencluster für die Bildung neuer Epoxyketon-Strukturen vorgeschlagen.

Mit der Absicht, neue Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren herzustellen, mussten die in *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 gefundenen Cluster in ein passendes Vektor-System kloniert, und anschließend in einen geeigneten heterologen Expressionswirt transferiert werden. Ein traditioneller Ansatz zur Klonierung von biosynthetischen Genclustern erfolgt durch den Aufbau von Cosmid/Fosmid-Bibliotheken (CopyControl™ Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS™ Vector, Epicentre®). Wenn der interessierende Biosyntheseweg eine Größe von ~40 kb nicht überschreitet, wie in unserem Fall, ist ein einzelner Fosmid-Vektor in der Lage, dass komplette Biosynthesegencluster zu erfassen. Wenn Biosynthesewege jedoch eine Größe von 100 kb erreichen, können andere Methoden der Molekularbiologie verwendet werden, wie z.B. das bakterielle künstliche Chromosom (BAC) als Vektor-System oder die transformationsassoziierte Rekombination (TAR) in Hefe, um im Allgemeinen das Klonieren und Manipulieren von Genclustern zu

DISKUSSION

ermöglichen (Alduina *et al.*, 2003; Kouprina and Larionov, 2008). Die am häufigsten verwendeten Modelle für die heterologe Expression bioaktiver Naturstoff-Gencluster, sind z.B. die Wirtsstämme *S. albus* J1074, *Streptomyces coelicolor* M512 und *Streptomyces coelicolor* M1152 (Eustaquio *et al.*, 2005; Gomez-Escribano and Bibb, 2011; Zaburannyi *et al.*, 2014). Diese oftmals verwendeten Produzentenstämme sind gut charakterisiert, genetisch aufgeklärt und ihre Genomsequenzen sind in öffentlichen Datenbanken hinterlegt.

Während die Identifizierung und Klonierung der drei „orphan“ Gencluster ziemlich unkompliziert verlief, blieb ihre heterologe Expression in den entsprechenden Wirten jedoch eine Herausforderung. Folgende Forschungsarbeiten wurden mit dem Stamm *S. albus* J1074 aufgrund seiner aussichtsreichen Produktionsraten, sowie seiner Zugänglichkeit zur genetischen Manipulation durchgeführt. Die Ergebnisse der heterologen Expression der drei homologen „orphan“ Gencluster (*b-2517*, *s-1022* und *s-646*) in *S. albus* J1074 zeigten die Produktion einiger neuer Massenpeaks aller drei Mutanten. Keiner dieser gefundenen Massen konnte bisher einem bestimmten Biosyntheseweg zugeordnet werden. Die Fragmentierungsmuster waren nicht charakteristisch für die Bildung eines neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors. Es wurden keine Unterschiede in Bezug auf die hergestellten Massen in den analysierten Kulturextrakten der Mutanten beobachtet. Die Produktion neuer bioaktiver Epoxyketonmoleküle aus homologen „orphan“ Genclustern in verschiedenen Bakterien konnten, in unserem Fall, bis jetzt nicht bestätigt werden, wie zunächst unter Schorn *et al.* vermutet (Abbildung 7.11) (Schorn *et al.*, 2014).

Dies könnte auf verschiedene Gründe zurückzuführen zu sein. Eine Möglichkeit wäre, dass die eingeführten Biosynthesewege nicht oder nur in geringen Mengen vom heterologen Wirt oder sogar nicht einmal im Wildtyp-Stamm richtig transkribiert werden können. Dies ist keine Seltenheit in Bezug auf die genomgetriebene Entdeckung neuer Sekundärmetaboliten. Bekanntlicherweise geht aus Genominformation hervor, dass die meisten Mikroorganismen das Potenzial haben, eine weitaus größere Anzahl von Naturstoffen zu produzieren, die für klinische oder pharmazeutische Anwendungen nützlich sein können, als sie zuvor isoliert wurden (Scherlach and Hertweck, 2009). Fortschrittliche bioinformatische Analysen des Genoms von beispielsweise *S. albus* J1074 sagt das Vorhandensein von einer großen Anzahl von Genclustern für Sekundärmetaboliten voraus (Olano *et al.*, 2014). Die Meisten von Ihnen werden jedoch nicht unter Standard-Laborwachstumsbedingungen exprimiert und gelten allgemein als

„still“ (Chiang *et al.*, 2011). Man geht davon aus, dass solche "kryptischen" Gencluster nur in Abhängigkeit von bestimmten Umgebungsbedingungen aktiviert werden können (van Wezel and McDowall, 2011). Ein Schlüssel für den Erfolg bei der Suche und Herstellung neuer Verbindungen ist die Recherche nach Strategien, um die Expression dieser „kryptischen“ oder niedrig exprimierten Biosynthesewege zu erwecken oder zu erhöhen. Hierzu wurden verschiedene Strategien in den letzten Jahren entwickelt (Gross, 2007; Scherlach and Hertweck, 2009; Reen *et al.*, 2015). Zum Beispiel wurde der Ansatz OSMAC (One Strain Many Compounds), bei dem neue Verbindungen durch Kultivierung von Mikroorganismen unter verschiedenen Fermentationsbedingungen hervorgerufen werden können, eingesetzt. (Bode *et al.*, 2002). Dieser Ansatz scheint in vielen Fällen nützlich, kann jedoch auch sehr mühsam sein und es besteht keine absolute Gewissheit. Die Analysen der jeweiligen Kulturextrakte (*S. albus* J1074/epnAB01(1–3), *S. albus* J1074/epnAB02(1–3) und *S. albus* J1074/epnAB03(1–3)) zeigten die Produktion einiger neuer Massenpeaks, wenn der rekombinante Stamm in R5-Medium kultiviert wurde. Laut Literaturrecherchen konnte bestätigt werden, dass das R5-Medium für die erfolgreiche Herstellung von Epoxyketon-Proteasom-Inhibitoren in heterologen *S. albus*-Stämmen verwendet wurde (Schorn *et al.*, 2014) und scheinen somit für die Bedürfnisse des produzierenden Organismus gut geeignet zu sein. Trotzdem könnten weitere Produktionsmedien getestet werden, um die Produktion gewünschter Verbindungen zu erzeugen. Wie unter Zettler *et al.* beschrieben konnte zum Beispiel die Gesamtproduktion an Cacibiocinen durch heterologe Expression und Screening verschiedener Kulturmedien erhöht werden (Zettler *et al.*, 2014).

Alternative Ansätze nutzen z.B. die genetische Manipulation (Inaktivierung) von clusterspezifischen regulatorischen Elementen (Aktivator- und Repressorgenen), um die Expression stiller Gencluster zu aktivieren. Yamanaka *et al.* konnte bereits in früheren Studien, für den Sekundärmetaboliten Taromycin A, eine erfolgreiche Aktivierung des stillen Biosynthesegenclusters durch Inaktivierung des LuxR-Regulators, eines möglichen Transkriptionsrepressors, bestätigen (Yamanaka *et al.* 2014). Eine weitere Strategie zur Aktivierung eines stillen Biosynthesegenclusters beinhaltet die Einführung eines synthetischen Promotors in das gewünschte Biosynthesegencluster. Ein relativ gut charakterisierter Promotor, der oft in der *Streptomyces*-Forschung für die Expression heterologer Gene verwendet wird, ist z.B. der Tetrazyklin-induzierbare Promotor *tcp*₈₃₀ (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2005). Dangel *et al.* zeigten, dass die Einführung des induzierbaren Promotors *tcp*₈₃₀ in das Novobiocin-BGC und die Zugabe des Induktors

DISKUSSION

aTc zum Produktionsmedium, zu einer erhöhten Produktion des Antibiotikums im heterologen Wirt *S. coelicolor* M512 führt (Dangel *et al.*, 2010). Wenn man in Betracht zieht, dass S-646B und S-646M ebenfalls als LuxR-Transkriptionsrepressoren (Pompeani *et al.*, 2008) fungieren, könnte man in unserem Fall vermuteten, dass die Inaktivierung der jeweiligen Gene zur Expression des entsprechenden Genclusters *s-646* führen könnte. Dagegen sind SARP-Regulatoren besser bekannt als Transkriptionsaktivatoren (Wietzorrek and Bibb, 1997). Unter Berücksichtigung des Fehlens von bioaktiven Eponemycin-Derivaten aus den Kulturen des nativen Stamms scheinen die sogenannten S-646A-, B-2517A- und B-2517B-SARP-Transkriptionsaktivatoren in unserem Fall nicht aktiviert zu sein. Eine resultierende gleichzeitige aktivierende und hemmende Wirkung auf die Transkription des Biosynthesegenclusters (*s-646*), welches eine sehr niedrige Expressionsrate und die anschließende Produktion einer möglichen toxischen Verbindung induzieren könnte, die nur ein gewisses Bakterienwachstum mit sich bringt, konnte in unserem Fall nicht bestätigt werden. In dem heterologen Mutantenstamm *S. albus* J1074/*epnAB3* konnte ein erfolgreiches Wachstum von Exkonjuganten nachgewiesen werden, sowie die erfolgreiche Konjugation durch gDNA-Isolierung, PCR und Sequenzierung bestätigt wurde. Somit kann beispielsweise die Induzierung eines toxischen Produkts für den Organismus wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Daher wurde der Fokus zunächst auf zwei spezifische Vorgehensweisen gelegt, zum einen, die Manipulation der clusterbezogenen Transkriptionsregulatoren (B-2517A, B-2517B, S-646A, S-646B und S-646M) und zum anderen, der Einsatz des induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors vor das ausgewählte Gen *s-1022E* für eine mögliche Aktivierung der entsprechenden Biosynthesegencluster aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646.

Die Deletionen der clusterassoziierten regulatorischen Elemente von entweder B-2517A, B-2517B, S-646A, S-646B und S-646M alleine oder in Kombination im heterologen Stamm *S. albus* J1074, zeigten im Vergleich zu der heterologen Expression der natürlichen Gencluster, unter den gegebenen Wachstumsbedingungen, ebenfalls keinen Einfluss auf die Produktion einer neuen Eponemycin-Verbindungen. Dies deutet darauf hin, dass die Gencluster möglicherweise noch still sind. Zusammenfassend führte weder die Inaktivierung der clusterbezogenen SARP-Transkriptionsaktivatoren noch die der vermuteten clusterbezogenen LuxR-Transkriptionsrepressoren zu einer gewünschten Aktivierung der stillen *b-2517*- und *s-646*-Gencluster, was auf die Abwesenheit von

DISKUSSION

Epoxyketon-Derivaten aus den Kulturen des nativen Stamms basiert ist. Ein Grund könnte die fehlende Aktivierung durch die regulatorische Elemente sein. Rückblickend auf die Ergebnisse dieser Experimente könnte es sich bei den oben genannten LuxR-Regulatoren ebenfalls um Transkriptionsaktivatoren handeln, diese aber nicht aktiviert werden, um die Biosynthese eines neuen Epoxyketon-Proteasom-Inhibitors zu steuern.

Es bleibt daher weiterhin unschlüssig, ob die zuvor beobachtete Produktion neuer Massenpeaks in den drei BPCs der Kulturextrakten von *S. albus* J1074/epnAB01, *S. albus* J1074/epnAB02 und *S. albus* J1074/epnAB03 (Abbildung 2.4) im Zusammenhang mit der Aktivierung z.B. nur eines Teils der interessierenden Biosyntheseegencluster stehen, oder mit eventuellen Produktartefakten von zufällig aktivierten Genen, die sich an einer anderen Stelle im Genom des heterologen Wirts *S. albus* J1074 befinden. Studien zufolge besteht ein Erschwernis bei der Expression von „orphan“ Genclustern in *S. albus* J1074 darin, dass der Wirtstamm eine Vielzahl von eigenen endogenen Sekundärmetaboliten produziert, mit dem Ergebnis, dass oftmals eine rasche Identifikation des Produkts problematisch ist (Olano *et al.*, 2014). Eine Strategie zur Überwindung dieses Problems wurde in Zaburannyi *et al.* beschrieben. Das Genom von *S. albus* J1074 wurde auf ein Minimum an Sekundärmetaboliten-Biosynthese reduziert, was die gewünschte Produktion beeinträchtigen könnte. Ein dadurch bedingtes schnelles Wachstum und ein effizientes genetisches System machen ihn zu einem attraktiven Expressionswirt für kryptische Biosynthesewege. Ohne die Produktion von vielzähligen anderen Sekundärmetaboliten kann die Vorläufer-Versorgung von *S. albus* J1074 auf die Produktion gewünschter Verbindungen fokussiert werden (Zaburannyi *et al.*, 2014).

Eine mögliche Methode zur Überprüfung in welchem Umfang die clusterassoziierten regulatorischen Gene (B-2517A, B-2517B, S-646A, S-646B und S-646M) wirklich an einer Aktivierung oder Hemmung der Transkription der entsprechenden Gencluster (*b-2517* und *s-646*) beteiligt sind, könnte z.B. durch eine vollständige Transkriptom-Differenzial-Shotgun-Sequenzierung (dRNA-seq) des rekombinanten Wirtstamms durchgeführt werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes können potenzielle Transkriptionsstartstellen und Operons der Gencluster bestätigt werden. Bauer *et al.* verwendeten diese dRNA-seq-Transkriptionsmethode unter anderem für detaillierte Einblicke in die Transkription des FK506-Biosyntheseegenclusters in *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 (Bauer *et al.*, 2017).

DISKUSSION

Die Einführung des induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors vor das ausgewählte Gen *s-1022E* führte gleichfalls zu keiner Expression des mutmaßlichen stillen *s-1022*-Biosynthesegenclusters im heterologen Wirt *S. albus* J1074. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auch durch die Zugabe des Induktors aTc keine Produktion einer neuen Verbindung, die auf ein Epoxyketon-Derivat hinweist, beobachtet werden konnte. Studien zufolge, kann die Aktivität synthetischer bakterieller Promotoren variieren, wenn sie in unterschiedlichen genetischen Kontexten eingesetzt werden, d. h. vom genetischen Ort oder vom transkribierten Gen abhängen (Jensen and Hammer, 1998; Alper *et al.*, 2005; Hammer *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2011). Die Stärke von synthetischen Promotoren, die aus der -35- und -10-Region ihrer Eltern-Promotoren bestehen und somit die nativen stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Sequenzen nicht enthalten, variieren mutmaßlich in Abhängigkeit von benachbarten Sequenzen. Dies macht die Verwendung solcher minimalen Promotoren in verschiedenen genetischen Kontexten unvorhersehbar. Ob durch solche flankierenden DNA-Sequenzen die Aktivität des *tcp*₈₃₀-Promotors und die damit verbundene Genexpression, auch in unserem Fall, abgeschwächt wird, was wiederum das Fehlen einer Produktbildung erklären könnte, ist bisher nicht bekannt. In einer von Dr. Manuela Rösch durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass ein vom *tcp*₈₃₀-Promotor kontrolliertes *dhb*-Operon mit Zielstelle 1 als benachbarter Sequenz die Promotoraktivität nicht beeinflusst (siehe Dissertation Manuela Rösch, Uni Tübingen 2016). Weitere Studien belegten, dass beispielsweise der niedrige Produktionstiter der Novclobiocinsäure 106 nicht durch die "Kontextabhängigkeit" des *tcp*₈₃₀-Promotors im Kontext der Zielstelle 2 und 3 verursacht wurde und somit die geringe Produktion nicht auf regulatorische oder andere störende DNA-Elemente dieser synthetischen DNA-Sequenz zurückzuführen ist (siehe Dissertation Patrick Basitta, Uni Tübingen 2017). Wie in Davis *et al.* beschrieben wäre eine Möglichkeit die Promotoren von ihren Kontexteffekten auszuschließen, indem man eine Promotorkassette erzeugt, in denen benachbarte gelegene Sequenzen, die möglicherweise die Transkriptionsinitiierung und das Promotor-Entweichen beeinflussen könnten, enthalten sind (Mendoza-Vargas *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2011).

Die fehlende Expression der drei Gencluster (*b2517*, *s-1022* und *s-646*) in *S. albus* J1074 könnte wahrscheinlich auch auf das Fehlen bestimmter Signale zurückzuführen sein, die von speziellen Promotorregionen der jeweiligen Cluster erkannt werden. Alternativ könnte man die Insertion eines starken und konstitutiven Promotors, wie z.B. die Verwendung des Promotors des Erythromycin-Resistenzgens (*ermE**p) von

DISKUSSION

Saccharopolyspora erythraea, vor ein ausgewähltes Schlüsselgen der jeweiligen Cluster in Betracht ziehen, sowie eine Überexpression der clusterassoziierten positiven regulatorische Gene *s-646A*, *b-2517A* und *b-2517B*. Beispielsweise wurde durch die Insertion eines starken und konstitutiven Promotors (*ermE**p) vor ausgewählten Genen zweier Cluster in *S. albus* J1074 die Produktion des nicht-ribosomalen Peptids Indigoidin und zwei hybride Polyketid-nicht-ribosomale Peptide der Familie der polyzyklischen Tetramat-Macrolactame (6-*epi*-Alteramide A und B) aktiviert. Das 6-*epi*-Alteramid-Gencluster konnte zudem durch die Überexpression eines positiven regulatorischer Gens aus demselben Organismus, welches zur LuxR-Familie gehört, aktiviert werden (Olano *et al.*, 2014).

Die bioinformatische Analyse des *s-646*-Clusters zeigte, dass die Gene, die an einer möglichen Biosynthese eines neuen Eponemycin-Derivats beteiligt sein könnten (*s-646A* bis *s-646F* und *s-646G* bis *s-646M*), in entgegengesetzten Richtungen ausgerichtet sind. Da auf den ersten Blick keine Regulator-ähnliche DNA-Bindestelle zwischen den beiden Genen *s-646F* und *s-646G* gefunden werden konnte, kann eventuell davon ausgegangen werden, dass diese Gene nicht in ausreichenden Mengen exprimiert werden können. Ohne die Genexpression von z.B. *s-646F* kann die ACAD nicht synthetisiert werden und würde daher auch nicht als elementarer Baustein für die neue Epoxidverbindung zur Verfügung stehen. Ob homologe Wirtsproteine aus anderen Genclustern von *S. albus* J1074 die Funktionen von *S-646F* und/oder *S-646G* substituieren können, ist nicht bekannt. In diesem Fall kann angenommen werden, dass die Funktion von *S-646F* und/oder *S-646G* nicht ergänzt werden kann. Ein Einsatz einer bidirektionale Promotorkassette zwischen *s-646F* und *s-646G*, eine in stromabwärtiger und eine in stromaufwärtiger Richtung, könnte die Transkription von *s-646A* bis *s-646F* und *s-646G* bis *s-646M* möglicherweise induzieren. Solch eine Strategie wurde von Montiel *et al.* erfolgreich umgesetzt. Hier wurden z.B. mehrere synthetische bidirektionale Promotorkassetten verwendet, um aktive und stille Gencluster (Rebecamycin und Tetarimycin) zu modulieren (Montiel *et al.*, 2015). Dr. Franziska S. Wiker erzeugte ebenfalls eine solche synthetische bidirektionale Promotorkassette pAG05 während ihrer Dissertation.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Produktbildung könnte sein, dass die jeweiligen Gencluster entweder noch unvollständig sind und somit wichtige Gene für die Biosynthese einer neuen Epoxyketon-Verbindung fehlen oder besonders die Anordnung der einzelnen Gene eine ebenso entscheidenden Rolle spielen könnte. Die Bestimmung

DISKUSSION

der Clustergrenzen erfolgte zunächst aufgrund bioinformatischer Analysen. Wie anfangs beschrieben konnten durch eine BLAST-Sequenzhomologiesuche, unter Verwendung der ACAD (EpnF), andere Gene aus dem Sekundärstoffwechsel kolokalisiert werden. Die meisten dieser „orphan“ Biosynthesewege betreffen kleine hybride NRPS/PKS-Systeme und kommen in einer Vielzahl verschiedener Bakterienfamilien vor (Abbildung 7.11). Die einzelnen Gene der identifizierten Cluster (*b-2517*, *s-1022* und *s-646*) in den jeweiligen Stämmen unterscheiden sich jedoch in ihrer Anordnung. Die Gene kodieren entweder für einzelne NRPS/PKS-Module oder sogar nur für einzelne Domänen. Die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen freistehenden Domänen müsste dabei noch detaillierter untersucht werden. Diese Anordnung würde das Potenzial eines effektiven Modul- oder Domänen austauschs besitzen. Im Allgemeinen scheinen die beschriebenen Gencluster (*b-2517*, *s-1022* und *s-646*) in der *Streptomyces*-Spezies im Verlauf der Evolution allerdings nur geringfügig verändert worden zu sein. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Beibehaltung der spezifischen Gene während der natürlichen Selektion einen möglichen Funktionswert für den Organismus haben könnte.

Beispielsweise weist eine interessante Beobachtung, angesichts der bioinformatische Analyse der NRPS-Gene des entsprechenden *b-2517*-Cluster darauf hin, dass B-2517K anscheinend eine essentielle C-Domäne im NRPS-Modul fehlt. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Aufbau des Peptidrückgrats möglicherweise gestört sein könnte. Bei der *in silico*-Analyse der angrenzenden Regionen des *b-2517*-Cluster wurden keine weiteren entsprechenden Gene mit einer C-Domäne gefunden.

In den letzten Jahren konnten durch die Entwicklung fortschrittlicher Techniken neue nicht-ribosomale Peptid-Assemblierungslinien modifiziert werden. Die Modularität der Montagelinien für nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) unterstützt dabei Modul- oder Domänen austauschmethoden, um Änderungen in der Aminosäuresequenz von nichtribosomalen Peptiden zu erzielen (Winn *et al.*, 2016). Die ersten wichtigen Arbeiten auf diesem Gebiet wurden durch Cubist Pharmaceuticals über Daptomycin, einem cyclisches Lipopeptid-Antibiotikum, durchgeführt. Der Austausch von NRPS-Modulen zwischen Biosynthese-Genclustern von eng evolutionärer Herkunft führte zu neuen Derivaten, wenn auch in den meisten Fällen in geringerer Produktion als die nativen Verbindungen (Nguyen *et al.*, 2006). Bozhüyük *et al.* berichteten über eine neue Strategie für die Änderung von NRPSs, welche für die Optimierung der Peptidproduktion und die Identifizierung von bioaktiven Peptid-Derivaten geeignet sind. Hierbei werden die Linkerregionen zwischen definierten Austauschseinheiten (defined exchange units,

DISKUSSION

XUs) und der stromabwärtigen C-Domäne als wesentlich betrachtet und keine Module als Funktionseinheiten verwendet (Bozhuyuk *et al.*, 2018). Unter Verwendung dieser neuen Ansätze könnte man versuchen, durch den Austausch von bestimmten NRPS-Modulen- oder einzelnen Domänen in den drei jeweiligen Genclustern (*b-2715*, *s-1022* und *s-646*) bzw. durch die Ergänzung von bekannten funktionierenden NRPS-Modulen oder sogar PKS-Modulen aus den beiden verwandten Genclustern des Epoxomicins und/oder des Eponemycins, die Produktion neuer bioaktiver Epoxyketon-Derivate zu steuern.

Zusammenfassend gibt es noch einige Alternativmöglichkeiten für zusätzliche Untersuchungen zur Regulation, Aktivierung und Refaktorisierung der in *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 gefundenen homologen Gencluster und ihrer möglichen Entdeckung neuer bioaktiver Epoxyketon-Derivate. Betrachtet man die Literatur findet man eine Reihe an weiteren Strategien und verfügbaren Methoden, die zur Identifizierung von „orphan“ Biosynthesegenclustern und ihren entsprechenden Produkten verwendet werden können. Hierbei wird auf folgende Literatur verwiesen (Gross, 2007; Gross *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2011; Kersten *et al.*, 2011).

Zudem berichtete Castro-Falcon *et al.* über einen interessanten reaktivitätsgesteuerten Ansatz zur Entdeckung epoxidbasierter elektrophiler Naturstoffe. Dieses Verfahren liefert unter Verwendung halogener aromatischer Reagenzien Derivate, die UV-aktiv sind und dank eines isotopisch einzigartigen Chlor-Tags massenspektrometrisch auffällig sind. Durch eine spezifische Thiophenolsonde werden dann elektrophile Naturstoffe auf Epoxidbasis markiert (Triptolid, Epoxomicin, Eponemycin, Cyclomarin, Salinamid). Zum Beispiel konnte anhand dieser optimierten Methode der epoxidhaltige Naturstoff Tirandalydigin aus *Salinispora*-Extrakten, durch die Bildung eines chlorierten Addukts nachgewiesen und isoliert werden und so ein „orphan“ Gencluster mit seinem Genprodukt verknüpft werden (Castro-Falcon *et al.*, 2016).

DISKUSSION

Ein erster Ansatz, mögliche neue epoxidhaltiger Naturstoffe nachzuweisen und zu isolieren, um so die drei „orphan“ Gencluster (*b-2517*, *s-1022* und *s-646*) mit ihren Genprodukte in Verbindung zusetzen, wurden unter Verwendung der beschriebenen reaktivitätsgesteuerten Methode mit Hilfe von Ass.-Prof. Dr. Chambers C. Hughes vom Zentrum für Marine Biotechnologie und Biomedizin des Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego versucht durchzuführen. Erste Ergebnisse der Behandlung von Sporensuspensionen der jeweiligen Streptomyceten-Stämme (*S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646) mit der entsprechenden Thiophenolsonde ergab jedoch keine Bildung eines deutlichen chlorierten Addukts, welches sich von den epoxidhaltigen Naturstoffen Epoxomicin und Eponemycin ableiten könnte.

DISKUSSION

Phosphoramidon und Talopeptin gehören zur Klasse von stark wirksamen Metalloprotease-Hemmern. Insbesondere Phosphoramidon ist in klinischer Anwendung weit verbreitet. Ihre Struktur leitet sich von einem L-Leu-L-Trp-Dipeptidrückgrat ab, das über eine Phosphoramidatbrücke mit einem Desoxyzucker verbunden ist. Die Biosynthese der beiden Verbindungen war zu Beginn dieser Dissertation unbekannt. Mein zweiter Teil der Arbeit beschreibt die Identifizierung und Charakterisierung der Biosynthese von Phosphoramidat-Metalloprotease-Inhibitoren aus *Streptomyces mozunensis* MK-23. Die heterologe Expression des *tal*-Clusters in *Streptomyces* sp. MK730-62F2, ein nah verwandter Desoxyzuckerproduzent der dTDP-L-Rhamnose, führte zur Produktion des Metalloprotease-Inhibitors Phosphoramidon. Eine Reihe von Gendeletionen bildete die Grenzen des Clusters. Die Inaktivierung von *talC*, *talD* und *talE* führte zu einem offensichtlichen Produktionsrückgang von Phosphoramidon. Die Rolle des ATP-grasp-Enzyms TalD, als Dipeptidsynthetase, konnte durch chemische Komplementierung von Kulturen der $\Delta talD$ -Mutante mit einem synthetischen L-Leu-L-Trp-Dipeptid in der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin bestätigt werden. Durch *in vitro*-Experimente wurde gezeigt, dass TalE von *S. mozunensis* MK-23 eine Phosphoramidat-bildende Kinase ist. Das Enzym wurde unter Verwendung von synthetischem L-Leu-L-Trp-Dipeptid als Akzeptorsubstrat mit ATP biochemisch charakterisiert. Die Strukturaufklärung auf der Basis von 1D- und 2D-NMR-Analysen bestätigte den finalen Beweis, dass es sich bei dem katalytischen Produkt von TalE um ein Phosphoramidat handelt. Synthetische Vorläufer-Analoga aus verschiedenen Aminosäuren wurden durch TalE mit unterschiedliche hoher Umwandlungsrate phosphoryliert. Das Dipeptid-Rückgrat scheint für die Substraterkennung durch TalE in der Phosphoramidon- und Talopeptin-Biosynthese von entscheidender Bedeutung zu sein. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass TalC als eine Glycosyltransferase agiert, die die Desoxyzucker-Gruppe durch eine Phosphoester-Verknüpfung installiert. Der enzymatische Einbau der L-Rhamnoseeinheit zum Phosphoramidat von P-Leu-Trp stellt damit eine bisher nicht beschriebene Reaktion in der Biochemie von Naturstoffen dar. Die heterologe Co-Expression des *tal*-Gencluster mit dem Zuckerplasmid pRHAM führte zur Produktion von intaktem Phosphoramidon im Wirt *S. coelicolor* M512. Hingegen konnten keine möglichen Derivate des Phosphoramidons bzw. Talopeptins durch die Co-Expression weiterer Zuckerplasmide, die die Gene für die Biosynthese verschiedener Desoxyzucker beinhalten, im heterologen Wirt *S. coelicolor* M512 bewahrt werden. Möglicherweise könnte dies an einer hohen Substratspezifität der

Glycosyltransferase (TalC) für die dTDP-L-Rhamnose bzw. 6-Desoxy-L-Talose liegen. Insgesamt lieferten die *in vitro*- und *in silico*-Analysen des Talopeptin-Biosynthesegenclusters erste Einblicke in die Bildung der Metalloprotease-Inhibitoren Phosphoramidon und Talopeptin und legten eine Grundlage für detaillierte Untersuchungen der Biosynthesewege.

3.2 IDENTIFIZIERUNG DES TALOPEPTIN-BIOSYNTHESEGENCLUSTERS

Mit dem Ziel, die Biosynthesewege für die Assemblierung der Naturstoffe Phosphoramidon und Talopeptin in dieser Studie zu identifizieren, wurde das Genom des ursprünglichen Talopeptin-Produzenten *S. mozunensis* MK-23 sequenziert. Die anschließende antiSMASH-Analyse der kompletten Sequenz auf das Vorhandensein von NRPS-Genen blieb erfolglos. Eine erneute Untersuchung der Genomsequenz von *S. mozunensis* MK-23 durch die Verwendung von Cpz31, der Rhamnosyltransferase aus dem namhaften Caprazamycin-Gencluster (Kaysser *et al.*, 2009), als „Genome-Mining“-Sonde, ermöglichte uns die Identifizierung eines homologen Enzyms, TalC, mit 45% Sequenzidentität zu Cpz31. *TalC*, welches an der Installation des Desoxyzuckers im Talopeptin beteiligt ist, wird von Genen flankiert, die für ein mutmaßliches ATP-grasp-Enzym (TalD) und eine mutmaßliche Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthase/Pyruvat, Phosphatdikinase (PPDK) (TalE) kodieren. Bekanntlich katalysiert TalD die Bildung von Peptidbindungen (Fawaz *et al.*, 2011) und TalE katalysiert die ATP- und Phosphat (P_i)-abhängige Umwandlung von Pyruvat in Phosphoenolpyruvat (Evans and Wood, 1968) und erzeugt auf Basis eines katalytischen Histidinrests, ein Phosphohistidin-Intermediat mit einer hochenergetischen N–P-Bindung (Herzberg *et al.*, 1996). Neben dieser kleinen „operonähnlichen“ Struktur sind mutmaßliche Gene geclustert, die für Transport (*talB*) (Pao *et al.*, 1998)- und Regulationsfunktionen (*talA*) (Brown *et al.*, 2003) (siehe Ergebnisteil Abschnitt 2 und Diskussionsteil Abschnitt 3) kodieren. Basierend auf der Identifizierung und Annotation der oben genannten Biosynthesegene (*talA-talE*) in dieser Dissertation, schlagen wir das erste Gencluster für die Biosynthese von Phosphoramidon-Metalloprotease-Inhibitoren vor (Abbildung 2.6). Ein Drei-Reaktions-Biosyntheseweg zu Phosphoramidon und Talopeptin, der eine außerordentliche Biochemie einschließt, ist demnach denkbar und sieht wie folgt aus: Eine ATP-grasp Amidligase (TalD), eine Phosphoryltransferase (TalE) und eine

DISKUSSION

Desoxyzuckertransferase (TalC) wirken bei der Kondensation der zwei Aminosäuren L-Leucin und L-Tryptophan und der anschließenden Verknüpfung einer 6-Desoxyhexose mit dem resultierenden Dipeptid L-Leu-L-Trp über eine Phosphoramidatbrücke zusammen (Abbildung 3.2) (Baulig *et al.*, 2019).

Da im Allgemeinen die Manipulation natürlicher Produzentenstämme schwierig und zeitaufwendig sein kann, ist eine heterologe Expression von Biosynthesegenclustern in zugänglicheren und oftmals vollständig sequenzierten Wirtsstämmen wünschenswert. Um die heterologe Expression des Talopeptin-Biosynthesewegs zu erleichtern, musste das Cluster also in einen geeigneten *Streptomyces*-Stamm transferiert werden. Wie in unserem Fall, beruht die Bildung einer natürlichen Verbindung oftmals auf der Versorgung mit einem spezifischen Vorläufer, die von außerhalb der Grenzen des Genclusters kodierten Genen bereitgestellt werden, z.B. Desoxyzuckern (Ramos *et al.*, 2008). In der vorliegenden Dissertation, muss der potenzielle Wirtsstamm demnach entsprechende eigene Gene im Genom, für eine vollständige Biosynthese eines Desoxyzuckers besitzen, welche eng mit der 6-Desoxy-L-Talose verwandt ist. Da es uns nicht möglich war, einen anderen öffentlich erhältlichen *Streptomyces*-Stamm mit der Fähigkeit zur Produktion der 6-Desoxy-L-Talose zu gewinnen, wurde stattdessen ein Wirt mit einem strukturell verwandten 6-Desoxyzucker ausgewählt. Um die Identität des mutmaßlichen *tal*-Genclusters an der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin zu belegen, wurde der Biosyntheseweg auf ein integratives pCC1FOS-Derivat in den geeigneten Wirtsstamm *Streptomyces* sp. MK730-62F2 zur heterologen Expression transferiert. Es ist bekannt, dass dieser Stamm aktivierte L-Rhamnose für die endogene Produktion von Caprazamycinen liefert, und die entsprechenden Desoxyzucker-Biosynthesegene wurden kürzlich identifiziert (Kaysser *et al.*, 2009; Kaysser *et al.*, 2010). Zu unserer Zufriedenheit ergab die LC-MS-Analyse von Kulturextrakten die Herstellung der erwarteten Derivatverbindung Phosphoramidon in den heterologen Mutanten. Die Ergebnisse bestätigten die Produktion eines einzelnen neuen Peaks mit einer Masse, Retentionszeit und UV-Spektrum, die mit einem kommerziellen Standard von Phosphoramidon identisch sind (Abbildung 2.7 und 2.17), jedoch mit einer Verschiebung der Retentionszeit um 0,2 Minuten auf Talopeptin. Wir nehmen an, dass die unterschiedliche Stereochemie der Hydroxylgruppe an C4 der Zuckereinheit die Verschiebung der Retentionszeit von Talopeptin im Vergleich zu Phosphoramidon verursacht. *Streptomyces* sp. MK730-62F2/*tal*MB01 repräsentiert somit einen idealen Wirtsorganismus für die Expression des *tal*-Genclusters. Die Reinigung der

DISKUSSION

nachgewiesenen Verbindung und die anschließende HR-MS-Analyse identifizierte eine Masse (m/z 542,19152 [M-H]⁻) mit entsprechender Summenformel (C₂₃H₃₃N₃O₁₀P) (Abbildung 2.8), die mit der angenommenen Verbindung übereinstimmt. Dieser Befund bestätigte, dass wir ein Biosynthesegencluster für die Produktion von Phosphoramidon und Talopeptin gefunden haben, das vermutlich das minimale *talCDE*-Operon umfasst. Es scheint, dass die Desoxyzuckertransferase TalC in Bezug auf die Stereokonfiguration der Hydroxygruppe an C4 flexibel ist (Baulig *et al.*, 2019).

Die genaue Organisation und die Grenzen des *tal*-Clusters konnten bestimmt werden, indem einzelne Deletionen der Gene *talC*, *talD* und *talE* sowie die benachbarten Regionen *orf-7* bis *orf-1* und *orf+1* bis *orf+12* auf den Fosmiden erfolgreich durchgeführt wurden. Die LC-MS-Analyse von Kulturextrakten aus den Mutantenstämmen zeigte, dass die Biosynthese von Phosphoramidon durch die Deletionen der kolokalisierten Gene Δ *orf-7-orf-1* und Δ *orf+1-orf+12* nicht beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen Δ *talC*, Δ *talD* und Δ *talE* zu einem offensichtlichen Produktionsverlust (Abbildung 2.9). Dies lässt darauf schließen, dass *talA*, ein MerR-ähnliches regulatorisches Gen, und *talB*, das für einen mutmaßlichen MFS-Transporter kodiert, zusammen mit dem *talCDE*-Operon die Biosynthesegencluster für Phosphoramidon und Talopeptin bilden. Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung des *tal*-Genclusters an der Biosynthese von Talopeptin zu überprüfen, wäre die zeitaufwendige Manipulation des Wildtyp-Stammes *S. mozunensis* MK-23. Die Deletion der essentiellen Gene und der Vergleich des Stoffwechselprofils der erzeugten Mutante und des nativen Stamms könnte die genaue Aufklärung des Biosyntheswegs weiter unterstützen. In diesem Fall sollte die Produktion von Talopeptin eingestellt werden. Leider scheint *S. mozunensis* MK-23 für genetische Manipulationen nicht gut zugänglich zu sein. Die in Zusammenarbeit mit Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) durchgeführten ersten Versuche, die erzeugten Mutanten über Konjugation in den Wildtyp-Stamm *S. mozunensis* MK-23 einzuführen, erwiesen sich als schwierig und blieben ohne Erfolg.

Erstaunlicherweise konnten in Kulturen der Δ *talD*-Mutante, durch MS-Analysen, noch Spuren einer Phosphoramidon-Produktion nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte durch die Zufuhr eines L-Leu-L-Trp-Dipeptids aus Standard-Proteinabbauprozessen begründet werden. ATP-grasp-Enzyme wie TalD aktivieren Carbonsäuresubstrate als Acylphosphate unter ATP-Verbrauch für nachfolgende Kondensationsreaktionen (Fawaz *et al.*, 2011). Mitglieder der ATP-Familie finden sich in

DISKUSSION

verschiedenen Stoffwechselwegen, einschließlich der *de-novo*-Purin-Biosynthese, der Glukoneogenese und der Fettsäuresynthese, und sind daher von medizinischer Bedeutung (Fawaz *et al.*, 2011). Als diskrete Amidligasen haben sie aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bildung von Peptidbindungen in der Naturstoffbiosynthese zunehmend Aufmerksamkeit erhalten (Ogasawara and Dairi, 2017). Beispielsweise konnte die Bildung einer Peptidbindung durch ATP-grasp-Enzyme in der Biosynthese von Pheganomycin und Resorcinomycin gezeigt werden (Noike *et al.*, 2015; Ooya *et al.*, 2015). Auch wurde die Aktivität solcher ATP-grasp-Enzyme in der Biosynthese der Dapdiamide und der Rhizocytine nachgewiesen (Kino *et al.*, 2009; Dawlaty *et al.*, 2010). Das Phaseolotoxin-Gencluster enthält beispielsweise kein NRPS, sondern zwei Enzyme der ATP-Familie (PhtU und PhtQ), die als Aminosäureligasen fungieren könnten (siehe Dissertation R. F. Roush, Cambridge, MA, 2011). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass das Peptidrückgrat von Phosphoramidon und Talopeptin durch die Biochemie der ATP-grasp-Enzyme in Analogie zu anderen Protease-Inhibitoren für kleine Moleküle, z.B. die Ketomemicine aufgebaut ist, jedoch im Gegensatz zur Klasse der Hydroxamsäurehaltigen Metalloprotease-Inhibitoren, die von NRPS-Systemen abstammen (Reyna-Gonzalez *et al.*, 2016; Kawata *et al.*, 2017; Leipoldt *et al.*, 2017; Wolf *et al.*, 2017). LC-MS-Analysen bestätigten, dass durch chemische Komplementierung von Kulturen der $\Delta talD$ -Mutante mit einem synthetischen L-Leu-L-Trp-Vorläufer, die Produktion von Phosphoramidon in der Mutante fast vollständig wiederhergestellt wurde und somit die genaue Funktion von TalD, als Dipeptidsynthetase bei der Bildung von Phosphoramidon und Talopeptin in dieser Studie bekräftigt werden konnte (Baulig *et al.*, 2019). Der anfängliche Versuch das Biosynthesegen *talD* in einen Vektor für die Expression als N-terminales His8-markiertes Protein zu klonieren und in *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS einzuführen, blieb erfolglos. Der Transformationsansatz führte, auch nach wiederholten Versuchen, nicht zu einem erwarteten Kolonienwachstum des rekombinanten Wirtsstamms, was wiederum auf eine mögliche Toxizität des Enzyms TalD für das *E. coli*-Bakterium schließen könnte.

3.3 CHARAKTERISIERUNG VON TALE ALS EINE N–P-BINDUNG BILDENDE KINASE

In dieser Studie zeigen wir zum ersten Mal die Funktion eines Phosphoramidat-bildende Kinaseenzym (Tale) vom Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthase/Pyruvat, Phosphatdikinase-Typ. „Genome-Mining“-Ergebnisse zeigten, dass ein Gen (*talE*) mit der abgeleiteten Funktion einer mutmaßliche PEP-Synthase/PPDK direkt neben den Genen *talC* und *talD* geclustert im Genom des nativen Produzentenstamms *S. mozunensis* MK-23 lokalisiert ist. Gendeletionsexperimente bewiesen das Erfordernis von *talE* als PPDK für die Biosynthese von Phosphoramidon, da in Abwesenheit von *talE* keine Phosphoramidon-Produktion durch LC-MS-Analysen bestätigt werden konnte.

PPDKs sind lebenswichtige Enzyme im zellulären Energiestoffwechsel und katalysieren die reversible Umwandlung von ATP, anorganischem Phosphat (P_i) und Pyruvat in AMP, Pyrophosphat (PP_i) und Phosphoenolpyruvat (Abbildung 3.1) (Wood *et al.*, 1977; Lim *et al.*, 2007; Metcalf and van der Donk, 2009; Ciupka and Gohlke, 2017). In diversen Studien wurde belegt, dass diese dreistufige reversible Reaktion über Phosphoenzym- und Pyrophosphoenzym-Zwischenprodukte mit einem Histidinrest (z.B. His 455) verläuft, der als Phosphoträger zwischen den beiden Reaktionszentren des Enzyms dient (Spronk *et al.*, 1976; Goss *et al.*, 1980). Die in Pflanzen und Mikroorganismen bevorzugten unterschiedlichen Richtungen der katalytischen Reaktion unterstreichen, dass das Enzym eine reversible molekulare Maschine ist (Evans and Wood, 1968; Hatch and Slack, 1968). Ein weiteres Protein mit Sequenzhomologie zu PPDK ist das Enzym I des bakteriellen PEP: Zucker-Phosphotransferase-Systems (Pocalyko *et al.*, 1990). Auch hier hängt die Homologie mit der funktionellen Ähnlichkeit zusammen, da das Enzym I durch PEP an einem Histidinrest phosphoryliert wird (Herzberg *et al.*, 1996). Phosphohistidin-Intermediate können in verschiedenen Kinasen gefunden werden (Cheek *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass einige dieser Enzyme, wie z.B. Hpr und Nukleosiddiphosphatkinasen, die Phosphorylgruppe auf Histidinreste anderer Proteine übertragen, um deren enzymatische Aktivität zu regulieren (Attwood and Wieland, 2015; Fuhs and Hunter, 2017).

Eine Schlüsselfrage bei der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin war, ob Tale eine vergleichbare Reaktion unter Verwendung des terminalen Amins des L-Leu-L-Trp-Dipeptids als Akzeptorsubstrat anstelle eines proteinogenen Histidins katalysieren könnte.

DISKUSSION

Eine *in vitro*-Studie mit dem gereinigten His-TalE unter Verwendung von ATP und synthetischem Dipeptid L-Leu-L-Trp als Substrate zeigte eine Umwandlung von Edukt Leu-Trp zu Produkt P-Leu-Trp nach 2 Stunden Inkubationszeit. Das neue Produkt wurde durch LC-MS- und MS/MS-Analyse eindeutig als Phospho-L-Leucin-L-Trptophan (P-Leu-Trp) identifiziert (Abbildung 2.10). HR-MS-Messungen von P-Leu-Trp ergaben zudem eine Summenformel von $C_{17}H_{23}N_3O_6P$ (m/z 396,13400 $[M-H]^-$, $\Delta = +2,53$ ppm) (Abbildung 2.12) und somit ein Phosphoramidat als TalE-Produkt (Baulig *et al.*, 2019). Das Produkt P-Leu-Trp wurde zum Vergleich der spektralen Eigenschaften mit denen seiner Vorstufe Leu-Trp gereinigt und anschließend wurden beide Verbindungen einer Reihe von $^1H/^{13}C/^{15}N$ -basierten 1D- und 2D-NMR-Standardversuchen unterzogen (Abbildung 2.13, Spektren siehe Anhang Abbildung 7.3 bis Abbildung 7.7). Die Analyse aller erhaltenen Spektren bewahrheitete die Anwesenheit des Leu-Trp-Rückgrat im Leu-Trp-Dipeptid und P-Leu-Trp. Durch das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von P-Leu-Trp und des Leu-Trp-Dipeptids konnte bereits die Phosphorylierung am N-terminalen Leucinrest vom Leu-Trp-Dipeptid aufgezeigt werden (Tabelle 2.5). Die Interpretation eines 1H -entkoppelten ^{31}P -NMR-Spektrum bestätigte, dass P-Leu-Trp im Gegensatz zum Leu-Trp-Dipeptid eine Phosphorresonanz enthielt, deren Verschiebungswert (δ_P) -0,25 betrug und indikativ für eine Phosphoramidatgruppe war, und durch verschiedene in der Literatur beschriebene Beispiele gestützt werden kann (Bentrude and Tan, 1973; Stec *et al.*, 1976; Gonzalez-Pastor *et al.*, 1995; Moriguchi *et al.*, 2000) (Spektrum siehe Anhang Abbildung 7.8) (Baulig *et al.*, 2019). Endgültige Belege für die Existenz einer N–P-Bindung in P-Leu-Trp wurden im 1H - ^{31}P -HMBC-NMR-Spektrum von P-Leu-Trp beobachtet (Abbildung 2.13, Spektrum siehe Anhang Abbildung 7.9) (Baulig *et al.*, 2019). Die Ergebnisse bestätigen, dass TalE den zweiten Schritt in der Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin unter Verwendung des TalD-Produkts Leu-Trp und ATP als Substrate zur Bildung von P-Leu-Trp katalysiert.

Anfängliche Assays zur Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigten ähnliche Versuchsergebnisse, die für das Enzym Cj1418 beobachtet wurden, das an der O-Methylphosphoramidat-Modifikation der Kapselpolysaccharide in *Campylobacter jejuni* involviert ist. Cj1418 (PEP-Synthase/PPDKinase-Typ) katalysiert die Phosphorylierung des Amidstickstoffs von L-Glutamin (Taylor *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2018). Die Ergebnisse zeigten auf, dass TalE abhängig von geringen Mengen Magnesiumchlorid (5 mM) und Adenosintriphosphat (1 mM) ist und eine optimale Aktivität bei pH 7,5 zeigt. Die Herstellung der Verbindung P-Leu-Trp zeigt zudem eine lineare Abhängigkeit von

DISKUSSION

der Menge an aktivem TalE (bis zu 10 μ M). Für die Inkubationszeit wurde für TalE eine lineare Abhängigkeit zwischen 25 und 240 Minuten festgestellt (Abbildung 2.10 und 2.11). Zusammenfassend schließen wir daraus, dass die durch TalE erzeugte Phosphoramidat-Einheit eindeutig an den N-Terminus eines L-Leu-L-Trp-Dipeptidrückgrats, in der Biosynthese von Phosphoramidon aus *Streptomyces* sp. MK730-62F2 und Talopeptin aus *S. mozunensis* MK-23, bindet.

Gereinigtes TalE-Protein akzeptierte außerdem verschiedene synthetische Dipeptid-Strukturanaloga als Akzeptorsubstrat für die Erzeugung von P-Leu-Trp-Derivaten (P-X-X, Abbildung 2.15). Offensichtlich wurde das Vorläufer-Analog 1 aus den Aminosäuren Met-Trp von TalE mit 5-fach höherer Umwandlungsrate als z.B. das Vorläufer-Analog 3 aus Ala-Trp phosphoryliert. Ebenfalls wies die Verbindung 2 aus den beiden Aminosäuren Leucin und Leucin eine bessere Umsatzrate durch TalE auf. Im Gegensatz dazu wurde ein niedriger Umsatz bei den Dipeptidverbindungen 4 (Thr-Trp) und 5 (Leu-Tyr) dokumentiert (Abbildung 2.15). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass TalE auch strukturell ähnliche Verbindungen als Substrate, für die enzymkatalysierte Phosphorylierung eines Amins zur Erzeugung von P-X-X (Abbildung 2.15) verwenden kann, diese aber in unterschiedlicher Kapazität akzeptiert werden. Diese Befunde legen nahe, dass TalE in Bezug auf das Akzeptorsubstrat promiskuitiv ist, jedoch das Dipeptid-Rückgrat für die Substraterkennung durch TalE von entscheidender Bedeutung für dessen Umsatzrate scheint. In unserem Fall ist TalE eine spezifische Kinase, insbesondere für die Erzeugung des Zwischenprodukts Phospho-L-Leucin-L-Trptophan (P-Leu-Trp) in der Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Biosynthese zu sein (Abbildung 2.10).

Um die Inhibitionseffizienz des *in vitro*-rekonstituierten Produkts P-Leu-Trp und die der neu erzeugten TalE-Produkt-Analoga (siehe oben) zu testen, wäre die Durchführung von entsprechende Protease-Assays (wie z.B. ein ECE-Assay oder ein Assay für die *Pseudomonas*-Elastase) in Zukunft denkbar. In Anbetracht ihrer strukturellen Ähnlichkeit (fehlende Zuckereinheit in den jeweiligen TalE-Produkt-Analoga) mit den bereits getesteten Verbindungen Phosphoramidon und Talopeptin bzw. einer Reihe neuer Analoga von Phosphoramidon gegen das ECE und die *Pseudomonas*-Elastase, könnten ähnliche Funktionen (steigende oder verringerte Inhibition) vorab vermutet werden. Es wird angenommen, dass die Kernstruktur eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Aktivität spielt. Für einen umfassenden Überblick über die Ergebnisse bereits durchgeführter diverser Assay-Methodiken wird der interessierte Leser auf die folgende

DISKUSSION

Literatur verwiesen (Murao *et al.*, 1980; Poncz *et al.*, 1984; Keller *et al.*, 1996) (siehe auch Einleitungsteil Abschnitt 1.4).

Zusammenfassend stellt stellt TalE, nach unserem besten Wissen, das erste Enzym in der Biosynthese von Naturstoffen dar, das durch simple Phosphorylierung eines Amins ein niedermolekulares Phosphoramidat erzeugt. Wie bereits oben erwähnt haben vor Kurzem Raushel und Mitarbeiter über eine bisher nicht gekannte enzymkatalysierte Phosphorylierung eines Amids berichtet, um γ -Phospho-L-Glutamin zu erzeugen (Taylor *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2018). Cj1418 gehört zu einer Familie von Kinasen, die einen ungewöhnlichen Reaktionsmechanismus verwenden. Das entsprechende Enzym, Cj1418, ist an der Biosynthese der O-Methylphosphoramidat-Gruppen in *Campylobacter jejuni* beteiligt. Insbesondere zeigt Cj1418 konservierte Proteindomänen, die für PEP-Synthasen und PPDKs typisch sind, aber keine Signifikante Sequenzähnlichkeit zu TalE aufweisen (<20% auf AA-Ebene). Es scheint, dass sich Mitglieder dieser Familie von Kinaseenzymen separat in Bakterien entwickelt haben, um niedermolekulare Phosphoramidate im primären und sekundären Metabolismus zu synthetisieren.

Es ist verlockend zu spekulieren, dass vermutliche PPDK-Homologe (AgnD und PhtL), die in den BGCs für Agrocin 84 und Phaseolotoxin kodiert sind, eine analoge Rolle in den jeweiligen Stoffwechselwegen spielen könnten (Kim *et al.*, 2006; Aguilera *et al.*, 2007).

DISKUSSION

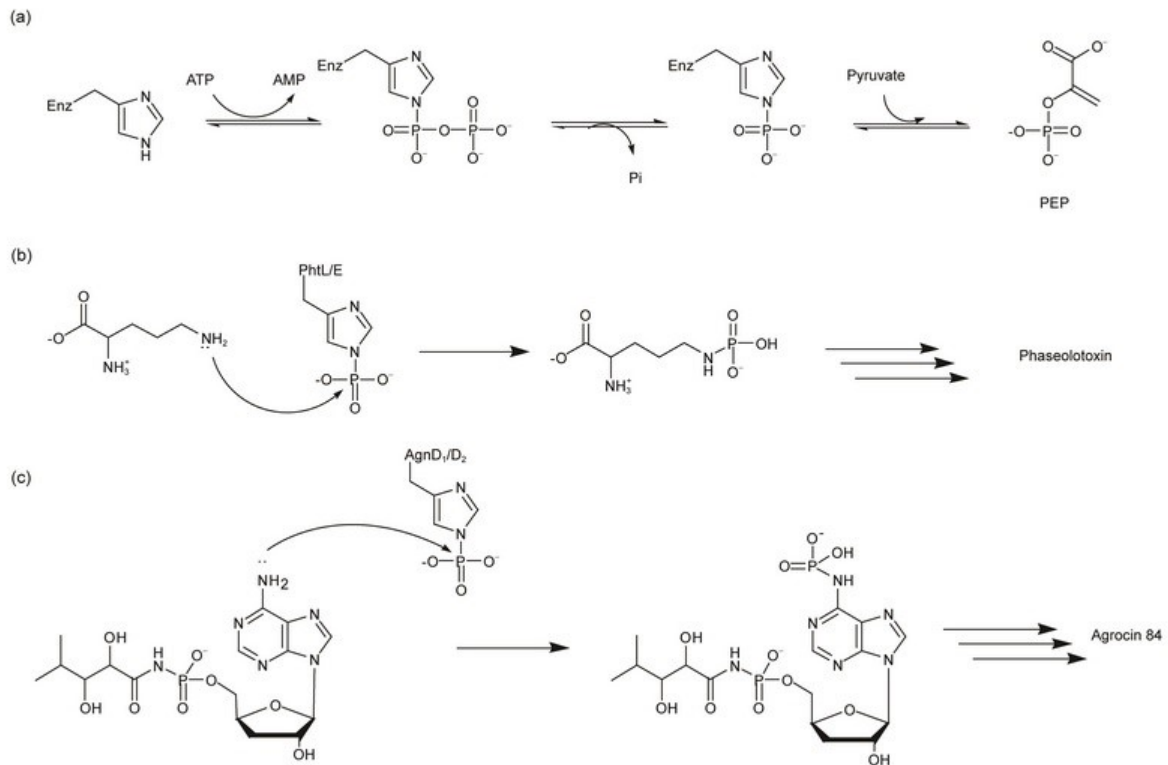


Abbildung 3.1 Vorgeschlagerter Biosyntheseweg für Phaseolotoxin- und Agrocin 84 N–P-Bindungen nach (Lim *et al.*, 2007; DENG and ZHAO, 2017), gedruckt mit Genehmigung von © 2007 American Chemical Society. (Siehe auch Dissertation R. F. Roush, Cambridge, MA, 2011). (a) Das durch PPDK katalysierte Reaktionsdiagramm. (b) Vorgeschlagerter Biosyntheseweg der Phaseolotoxin-N–P-Bindung. (c) Vorgeschlagerter Biosyntheseweg der Agrocin 84 N–P-Bindung.

Die Walsh-Gruppe der Harvard University hat die Hypothese aufgestellt, dass die Phaseolotoxin-N–P-Bindung durch nukleophilen Angriff der freien Aminogruppe von Ornithin auf die Phosphatgruppe, die an den Histidinrest von PhtL gebunden ist, gebildet wurde (Abbildung 3.1). In ähnlicher Weise kann angenommen werden, dass die Aminogruppe des 3'-dAMP-Purinrings, die die Phosphatgruppe des AgnD1- (oder AgnD2-) Histidinrests angreift, die zweite N–P-Bindung von Agrocin 84 einght. Dies ist eine neuartige Hypothese der Biosynthese der N–P-Bindungen in natürlich vorkommenden Phosphoramidaten, während die detaillierten enzymatischen Reaktionen weiter untersucht werden müssen (DENG and ZHAO, 2017), (siehe auch Dissertation R. F. Roush, Cambridge, MA, 2011).

Bisher wurde gezeigt, dass nur sehr wenige Enzyme die Bildung von N–P-Bindungen katalysieren. Es gibt jedoch zwei weitere Strategien: Kreatin- und Argininkinasen (Ennor *et al.*, 1955; Morrison *et al.*, 1957). Beispielsweise überträgt die Kreatinkinase eine N-Phosphoryl-Gruppe von Phospho-Kreatin auf ADP. Mit dieser enzymatischen Reaktion

wird ATP regeneriert. Das Enzym kommt vor allem in allen Muskelzellen und im Gehirn vor (Wallimann *et al.*, 1992). Alternativ können Enzyme, die mit tRNA-Synthetasen verwandt sind, auch verwendet werden, um Phosphoramidatbindungen über einen Mechanismus ähnlich der Adenylierung zu erzeugen (Roush *et al.*, 2008).

Wir gehen davon aus, dass Fortschritte in der Aufklärung und Charakterisierung von Biosynthesewegen, die N–P-Bindungen erzeugen, in den kommenden Jahren dazu führen, dass es mehr Einblicke in die genauen Mechanismen auch möglicher zusätzlicher Klassen von N–P-Bindung bildenden Enzymen geben wird, und man die Anwendung dieser Enzyme zukünftig sowohl als Werkzeuge in der Biokatalyse als auch in der synthetischen Biologie sehen wird, als auch die Bemühungen zur Entdeckung neuer Naturstoffe die diese strukturellen Merkmale enthalten (Waldman *et al.*, 2017).

3.4 UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER GLYCOSYLTRANSFERASE TALC IN DER PHOSPHORAMIDON-BIOSYNTHESE

Das mutmaßliche Glycosyltransferase-Gen *talC* ist gekoppelt mit den Genen *talA-talE*. Ein *in vitro*-Assay mit einem TalC-haltigen Proteinextrakt unter Verwendung von dTDP-L-Rhamnose und dem TalE-Assay Produkt P-Leu-Trp als Substrate zeigte einen einzelnen Produktpeak, nach 16-stündiger Inkubation, der Phosphoramidon in Bezug auf Retentionszeit, UV-Spektrum, Masse und LC-MS/MS-Fragmentierung gleichkommt (Abbildung 2.16, 2.17 und 2.18). Das Ergebnis impliziert, dass P-Leu-Trp als echtes Intermediat in der Biosynthese von Phosphoramidon etabliert ist. Ein im Anschluss durchgeführtes hochaufgelöstes Massenspektrum ($[M-H]^-$ Quasi-Molekülion m/z 542,19099, $\Delta = +0,17$ ppm) mit der Summenformel $C_{23}H_{33}N_3O_{10}P$ konnte zudem bestätigt werden (Abbildung 2.18). Diese Resultate verdeutlichen, dass die Glycosyltransferase TalC, P-Leu-Trp als Akzeptorsubstrat verwendet, um die Übertragung eines Desoxyzuckers auf die Phosphorylgruppe zu katalysieren (Baulig *et al.*, 2019). In dieser Hinsicht unterscheidet sich TalC von anderen bekannten Glycosyltransferasen, die an der Biosynthese von Naturstoffen beteiligt sind (Luzhetskyy *et al.*, 2005).

Zur vollständigen Aufklärung der Struktur könnte eine NMR-Spektroskopie des kompletten Substanzgemisches durchgeführt werden. Eine erste NMR-Analyse des

DISKUSSION

TalC-Assaygemisch war bisher nicht möglich, da die erhaltenen Mengen zu niedrig waren, und die Proben zudem kleinste Verunreinigungen enthielten. Die Reinigung des mutmaßlichen TalC-Assaygemisch müsste in einem quantitativen Maßstab in einem größeren Volumen durchgeführt werden und die Reinigung der Verbindung nochmals optimiert werden. Die allgemeine Kernstruktur von Phosphoramidon oder Talopeptin ist zwar keine Neuheit und zeigt aus der Literatur bekannte NMR-Daten (Umezawa *et al.*, 1972; Murao *et al.*, 1980) jedoch würden sie, in unserem Fall, den finalen Beweis einer *in vitro*-Rekonstitution unserer bisherigen Ergebnisse liefern, die einen beispiellosen Drei-Reaktions-Weg zu Phosphoramidon und Talopeptin aufzeigt.

Im Allgemeinen ist die Glykosylierung ein häufiges Thema in der Naturstoffbiosynthese, das die Zielspezifität und die pharmakologischen Eigenschaften einer bioaktiven Verbindung verändert (Elshahawi *et al.*, 2015). Insbesondere 6-Desoxyhexosen sind in bakteriellen Sekundärmetaboliten weit verbreitet. Die Substratpromiskuität der entsprechenden Glycosyltransferasen wurde ausgiebig genutzt, um die Struktur von bioaktiven kleinen Molekülen zu bestimmen (Gantt *et al.*, 2011). In den meisten Fällen bauen diese Enzyme eine direkte *O-glykosidische* Verbindung zum Aglykon auf, obwohl die Bildung von Thioglykoside, *N-Glykoside* und *C-Glykoside* ebenfalls bekannt ist (Durr *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2005; Oman *et al.*, 2011). Die Bindung von Zuckern in der Biosynthese von Naturstoffen über eine Phosphoester-Verknüpfung, ist, wie in unserem Fall gezeigt, jedoch sehr selten und wurde funktional nur für Moenomycine untersucht. Hier zeigten Walker und Mitarbeiter, dass MoeGT1 Galacturonsäure von UDP-GalUA auf einen Farnesyl-Phosphoglycerat-Vorläufer überträgt (Ostash *et al.*, 2009). Man könnte vermuten, dass TalC, zusammen mit den meisten Glycosyltransferasen (unter anderem Cpz31, die an der Naturstoffbiosynthese beteiligt sind), auch zur GT-1-Familie von Glycosyltransferasen gehört, wie sie vom CAZy-System klassifiziert wurden (Coutinho *et al.*, 2003). Die enzymatische Installation einer L-Rhamnoseeinheit zum Phosphoramidat von P-Leu-Trp bietet eine bislang unbeschriebene Reaktion in der Biochemie von Naturstoffen und fügt die Phosphoryltransferase TalE als beispiellosen Biokatalysator zur Familie der 6-Desoxyzuckertransferasen hinzu (Baulig *et al.*, 2019). Wie oben beschrieben wurden Glycosyltransferasen oftmals zur strukturellen Diversifizierung von glykosylierten Verbindungen genutzt (Blanco *et al.*, 2001; Luzhetskyy *et al.*, 2007; Olano *et al.*, 2008; Gaisser *et al.*, 2009), da sie oft eine hohe Flexibilität gegenüber dem Donor-Substrat aufweisen. Die heterologe Expression des Fosmids talMB01 in *Streptomyces fradiae* A0, welcher die Desoxyzucker D-Olivose und

DISKUSSION

L-Rhodinose produziert, führte nicht zur erhofften Identifizierung neuer Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Derivaten (siehe auch Masterarbeit von Marius Bader). Auch Versuche zur Co-Expression der Plasmide pLN2, pLNBIV, pLNRHO und pFL947, welche für die Biosynthese anderer Desoxyzucker verantwortlichen Gene enthalten, erzielte keine Herstellung neuer Phosphoramidon- bzw. Talopeptin-Derivaten in dem heterologen Wirt *S. coeliolor* M512/talMB01. Es könnte möglicherweise darüber spekuliert werden, dass TalC spezifischer für dTDP-L-Rhamnosin bzw. 6-Desoxy-L-Talosen ist als ähnliche Glycosyltransferasen, wie beispielsweise ElmGT aus *S. olivaceus* (Blanco *et al.*, 2001) oder StfG aus *S. steffisburgensis* (Olano *et al.*, 2008). Weitere detaillierte Untersuchungen müssen diese Annahme belegen. Auch über die Rhamnosyltransferase Cpz31 aus dem Caprazamycin-Gencluster wird spekuliert, dass sie spezifischer für die dTDP-L-Rhamnose ist als verwandte Glycosyltransferasen (Kaysser *et al.*, 2010). Beispielsweise könnte man zudem versuchen diverse Desoxyzucker für den TalC-Enzymassay zu verwenden und diese mit dem TalC-enthaltenden zellfreien Extrakt zu einem laufenden TalE-Assay hinzugegeben und diese Reaktion anschließend einer HPLC-, LC-MS/MS- und HR-MS-Analyse, sowie NMR oder Reinigung unterziehen.

Alternativ könnte man darüber diskutieren, ob TalC auch gegenüber einem neuen Zwischenprodukt-Derivat (P-X-X, Abbildung 2.15) flexibel ist, um so die Möglichkeit eröffnet, strukturell unterschiedliche Sekundärmetaboliten zu erzeugen. Erste *in vitro*-Assays mit dem TalC-haltigen Proteinextrakt unter Gebrauch von dTDP-L-Rhamnose und den TalE-Assay Produkt-Derivaten zeigten jedoch zu diesem Zeitpunkt der Dissertation keine eindeutigen Ergebnisse und müssten aufgrund zu geringer Konzentrationen der einzelnen Assay-Komponenten und zur Fortsetzung des Projekts in Zukunft wiederholt werden. Durch Fütterungsexperimente konnte gezeigt werden, dass z.B. die Glycosyltransferase ElmGT neben ihrem hohen Maß an Promiskuität gegenüber ihrem Zuckersubstrat, auch häufig alternative Akzeptorsubstrate tolerieren kann. Die Erzeugung von Glycosyltransferase mit veränderten Agycon-Erkennungselementen könnte somit zu einer Vielzahl neuer Naturstoffe mit erheblichem pharmazeutischen Wert führen (Luzhetskyy *et al.*, 2005).

3.5 EIN MODELL FÜR DEN BIOSYNTHESEWEG VON PHOSPHORAMIDON UND TALOPEPTIN

Die Sequenzanalyse des Talopeptin-Gencluster in Kombination mit den Analysedaten der heterologen Expression, Geninaktivierungsexperimenten, chemischen Komplementation, *in vitro*-Studien, sowie einzelner NMR-Daten isolierter Produkte, lieferte einen ersten Vorschlag für den Biosyntheseweg (Abbildung 3.2) zu den beiden Metalloprotease-Hemmern Phosphoramidon und Talopeptin. Basierend auf den Erkenntnissen des Ergebnis- und Diskussionsteils (siehe Abschnitt 2 und 3) ist ein Drei-Reaktions-Weg zu Phosphoramidon ((1), Abbildung 3.2) und Talopeptin, der eine außergewöhnliche Biochemie beinhaltet, vorstellbar (Abbildung 3.2). Nachfolgend wird die postulierte Biosynthese für den Naturstoff Phosphoramidon dargestellt und beschrieben. Talopeptin würde mit Ausnahme der Bildung der 6-Desoxy-L-Taloseeinheit analog erzeugt werden (Abbildung 3.2).

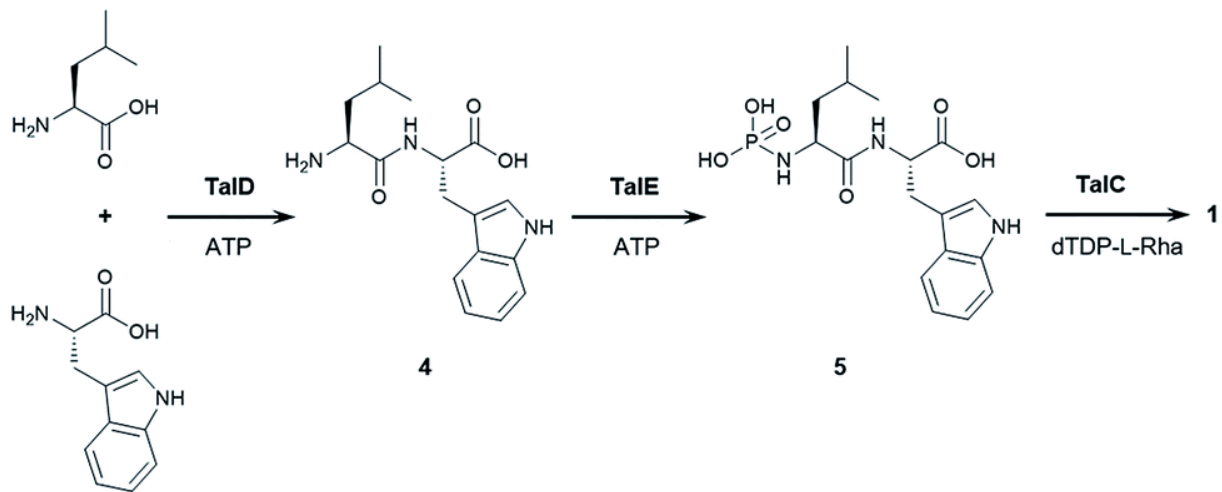


Abbildung 3.2 Vorgeschlagener Reaktionsweg für die Biosynthese von Phosphoramidon (1) (und Talopeptin) nach (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. Zwischenprodukte sind angegeben als L-Leu-L-Trp-Dipeptid (4) und P-Leu-Trp (5).

Überraschenderweise wird das Peptidgerüst der Naturstoffe nicht durch NRPS oder ribosomale Systeme, sondern durch die Aktivität einer ATP-grasp Amidligase aufgebaut. Von ATP-grasp-Enzymen ist bekannt, dass sie die Bildung von Peptidbindungen katalysieren können (Fawaz *et al.*, 2011).

DISKUSSION

Demnach bildet die ATP-grasp Amidligase TalD das Dipeptid aus L-Leu und L-Trp ((4), Abbildung 3.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das L-Leu-L-Trp-Dipeptid als Vorstufe für TalE dient, um ein N-terminales Phosphoramidat zu installieren, das P-Leu-Trp ((5), Abbildung 3.2) erzeugt. TalE katalysiert somit den zweiten Schritt in der Biosynthese von Phosphoramidon (1) (und Talopeptin). TalE zeigt eine Sequenzähnlichkeit zu PEP-Synthase/PPDK (Evans and Wood, 1968; Herzberg *et al.*, 1996), und ist folglich ein offensichtlicher Kandidat für solch eine enzymatische Reaktion (Taylor *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2018). Angesichts der Tatsache, dass die Glycosyltransferasen TalC eine Identität von 45% zu Cpz31, der Glycosyltransferasen aus dem Caprazamycin-Gencluster aufweist (Kaysser *et al.*, 2010), kann angenommen werden, dass der anschließende Transfer des Desoxyzuckers durch eine Desoxyzuckertransferase wie TalC zu Phosphoramidon ((1), Abbildung 3.2) (und Talopeptin) katalysiert wird. Das P-Leu-Trp wird als Akzeptorsubstrat verwendet, um die Desoxyzuckerübertragung auf die Phosphorylgruppe zu katalysieren. TalC wird somit der letzte Schritt in der Phosphoramidon ((1), Abbildung 3.2)- und Talopeptin-Biosynthese zugewiesen (Abbildung 3.2) (Baulig *et al.*, 2019) (siehe auch Ergebnissteil Abschnitt 2 und Diskussionsteil Abschnitt 3).

Mögliche Fütterungsstudien mit Isotopen-markierten Vorläufern könnten den Einbau der Enzym-Zwischenprodukte bzw. den Vorschlag der einzelnen Reaktionswege für die Biosynthese von Phosphoramidon und Talopeptin stützen. Beispielsweise konnten Taylor *et al.* die Bildung von phosphorylierten Enzym-Zwischenprodukten im gesamten Reaktionsgemisch durch Techniken des Positionsisotopenaustauschs, sowie des molekularen Isotopenaustauschs aufzeigen (Taylor *et al.*, 2018).

Zusammenfassend konnten durch die Identifizierung und Analyse des Talopeptin-Genclusters erste molekulare Grundlagen für den Vorschlag eines einzigartigen Metalloprotease-Inhibitor-Biosynthesewegs geliefert werden. Wie in dieser Studie unter Abschnitt 2 experimentell gezeigt und unter Abschnitt 3 diskutiert, ermöglicht das Verständnis der Biosynthesewege von Naturstoffen wie Phosphoramidon (und Talopeptin) in Kombination mit der erfolgreichen Etablierung eines heterologen Expressionssystems, Gendeletionsstudien, chemische Komplementation, sowie *in vitro*-Rekonstitutionen und ermittelten NMR-Daten, Einblicke in die detaillierte Biosynthese, sowie in Enzymmechanismen dieser Metalloprotease-Inhibitoren zu gewinnen und eröffnet weitere Perspektiven, die auf die Erzeugung neuer oder verbesserter biologisch aktiver Metalloprotease-Inhibitoren abzielen.

Durch eine vorläufige Suche in öffentlichen Genom-Datenbanken konnten eine Reihe homologer „orphan“ Biosynthesewege, die ein *talCDE*-ähnliches mutmaßliches Operon enthielten, in Genomen verschiedenster *Streptomyces*-Stämme beobachtet werden (Abbildung 7.10). In Anbetracht der Tatsache, dass die kodierten Phosphoryltransferasen, ATP-grasp-Enzyme und Glycosyltransferasen eine andere Substrattoleranz als TalE, TalD und TalC exprimieren, könnten die erkannten Gencluster die Synthese neuer Metalloprotease-Hemmer steuern. Die biochemische und physiologische Untersuchung dieser potenziellen Enzyme wäre eine spannende Herausforderung für die zukünftige Forschung. Darüber hinaus besitzen alle Enzyme ein Potenzial als flexible Biokatalysatoren für das *in vivo*-Engineering und *in vitro*-Engineering von bioaktiven kleinen Molekülen und sind faszinierende Themen für weitere funktionale Untersuchungen (Baulig *et al.*, 2019).

3.6 IDENTIFIZIERUNG DES GENCLUSTERS FÜR DIE 6-DESOXY-L-TALOSE-BIOSYNTHESE

Die Co-Expression von pRHAM, das alle für die Biosynthese von dTDP-L-Rhamnose erforderlichen Gene enthält (Rodriguez *et al.*, 2000), führte zur Produktion von intaktem Phosphoramidon in dem heterologen Produzentenstamm *S. coelicolor* M512, der das Fosmid talMB01 enthält (Abbildung 2.19). Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass beim heterologen Phosphoramidon-Produzenten die Gene für die Bildung der vollständigen Rhamnosyleinheit fehlen. Um eine heterologe Phosphoramidon- oder Talopeptin-Produktion zu gewährleisten, müssten die Gene, die die Bildung der entsprechenden Desoxyzuckereinheit steuern, auf dem Fosmid talMB01 kodiert sein. Gene für die Bildung einer 6-Desoxy-L-Talose konnten nicht auf Fosmid talMB01 identifiziert werden. Da ein potentielles Gen für eine Glycosyltransferase (*talC*) im Talopeptin-Gencluster kodiert ist, könnte man spekulieren, dass wenige Gene für die Biosynthese des Desoxyzuckers 6-Desoxy-L-Talose für eine erfolgreiche heterologe Talopeptin-Produktion fehlen. Vorherige Studien haben gezeigt, dass für die Bereitstellung des Desoxyzuckers bei der Caprazamycinbildung nur wenige Gene (*cpzDII*, *cpzDIII*, *cpzDIV* und *cpzDVI*) ausreichend und wesentlich sind und die Rhamnosyltransferase (Cpz31) anschließend die Bindung des Desoxyzuckers an das Caprazamycin-Aglycon katalysiert (Kaysser *et al.*, 2010).

DISKUSSION

In Bakterien sind Gene, die die Biosynthese eines bestimmten Sekundärmetaboliten steuern, im Allgemeinen kolokalisiert. Das Fosmid talMB01, welches das Talopeptin-Gencluster enthält, fehlen jedoch die Gene für die Biosynthese der Desoxyzuckereinheit. Das Fehlen von Genen für die Biosynthese von beispielsweise einer dTDP-L-Rhamnose innerhalb des entsprechenden Genclusters wurde bereits für einige rhamnosylierten Verbindungen beschrieben (Decker *et al.*, 1995; Waldron *et al.*, 2001; Gullón *et al.*, 2006; Luzhetskyy *et al.*, 2007). In den meisten Fällen wurden diese Gene an einer anderen Stelle im Genom identifiziert (Madduri *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2008). Auch die L-Rhamnosylgruppe der Caprazamycine wurde aus Enzymen synthetisiert, die in einem anderen Cluster im Genom von *Streptomyces* sp. MK730-62F2 kodiert sind (Kaysser *et al.*, 2010). Die Bildung der 6-Desoxy-L-Talose beinhaltet vier Enzyme, eine Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase (RmlA), eine dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase (RmlB), eine dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase (RmlC); und eine dTDP-6-Desoxy-L-Lyxose-4-Hexulose-3,5-Epimerase RmlD (Yoo *et al.*, 2011). Da diese Gene für die Talopeptin-Biosynthese benötigt werden, müssen sie sich an einer anderen Stelle im Genom des ursprünglichen Produzentenstamms *S. mozunensis* MK-23 befinden.

Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Dissertation verwendeten wir eine Sequenz des Enzyms dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase als "Template" zur Untersuchung der Genomsequenz von *S. mozunensis* MK-23 in der Annahme ein mögliches 6-Desoxy-L-Talose-Gencluster an einer anderen Stelle im Genom zu finden. Durch eine BLAST-Sequenzhomologiesuche gelang es uns eine Sequenz des Enzyms aus der genomischen DNA des Talopeptin-Produzenten zu identifizieren. Eine finale Überprüfung der Genomsequenz von *S. mozunensis* MK-23 ergab einen DNA-Abschnitt von 8,5 kb, der vermutlich an der Biosynthese der 6-Desoxy-L-Talose beteiligt ist. Die abgeleiteten Genprodukte zeigen Homologien mit den erforderlichen Enzymen für die Biosynthese der 6-Desoxy-L-Talose (Nakano *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Karki *et al.*, 2010). Gemäß den Genfunktionsvorhersagen (Tabelle 3.1) kodiert *talOI* in der entgegengesetzten Richtung mit *talOII* gekoppelt für eine mutmaßliche dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase, *talOII* für eine Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase, *talOIII* für eine dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase und *talOV* für eine NDP-Hexose-4-Ketoreduktase. Die abgeleiteten Genprodukte von *talOIV* und *orf-2* zeigen Homologien zu einer Glycosyltransferase. Da *orf-1* und *orf-3* für hypothetische Gene kodieren, und *orf+1*, für ein mögliches Acyltransferase-Gen, und diese keine

DISKUSSION

offensichtliche Rolle im Desoxyzucker-Metabolismus spielen, könnten man vorschlagen, dass das 6-Desoxy-L-Talose-Biosynthesegencluster von *talol* bis *taloV* reicht.

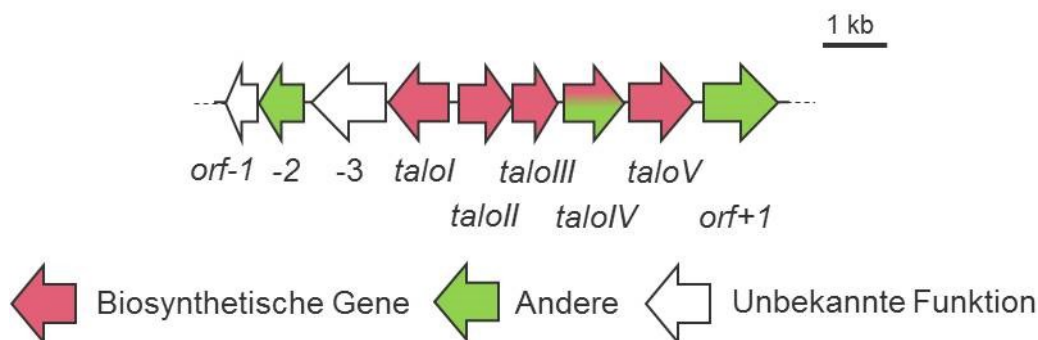


Abbildung 3.3 Organisation des 6-Desoxy-L-Talose-Genclusters *talol* zu *taloV* aus *S. mozunensis* MK-23. Rosa Pfeile zeigen Gene an, von denen angenommen wird, dass sie für die Biosynthese von 6-Desoxy-L-Talose essentiell sind. Grüne Pfeile zeigen Gene mit anderen Funktionen an, die vermutlich keine offensichtliche Rolle im Desoxyzucker-Metabolismus spielen. Weiße Pfeile zeigen Gene mit unbekannter Funktion an. Gene sind entsprechend ihrer biosynthetischen Zuordnung koloriert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Abgeleitete Funktionen von Genen innerhalb des 6-Desoxy-L-Talose-Genclusters.

Gen	Protein-Homolog	Identität/Ähnlichkeit ^[a]	Vorhergesagte Funktion
<i>orf-1</i>	IF39_RS0101350, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-6131	90/96	Hypotetisches Protein
<i>orf-2</i>	AA75_RS23520, <i>Kitasatospora</i> sp. MBT63	93/99	Glycosyltransferase
<i>orf-3</i>	IO30_RS0126695, <i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414	71/93	Hypotetisches Protein
<i>talol</i>	AA75_RS23530, <i>Kitasatospora</i> sp. MBT63	93/99	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase
<i>talolI</i>	IF39_RS0101330, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-6131	97/99	Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase
<i>talolIII</i>	RmlC, <i>Kitasatospora kifunensis</i> MJM341	78/89	dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase
<i>talolIV</i>	IF39_RS0101320, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-6131	93/99	Glycosyltransferase
<i>taloV</i>	BUE48_013440, <i>Thermomonospora</i> sp. CIF1	40/55	NDP-Hexose-4-Ketoreduktase
<i>orf+1</i>	IF39_RS0101310, <i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-6131	88/98	Acytransferase

[a] = Aminosäuresequenzhomologie [%] aus der Blastp-Analyse; dTDP = Desoxythymidylidiphosphat; *orf* = open reading frame (offener Leserahmen); NDP = Nukleosiddiphosphat; sp. = Spezies; *talo* = Talose; fettgedruckte Gene repräsentieren das vorgeschlagene 6-Desoxy-L-Talose-Cluster.

DISKUSSION

Die Biosynthese von 6-Desoxyhexosen wurde ausgiebig untersucht und erfolgt im Allgemeinen aus einer nukleotidylierten Hexose wie dTDP-D-Glucose (Thibodeaux *et al.*, 2007; Thibodeaux *et al.*, 2008). Der bestimmende Schritt im dTDP-6-Desoxyhexose-Weg ist die dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase (RmlB)-Reaktion. Verschiedene dTDP-6-Desoxyhexose-Strukturen werden durch enzymatische Modifikationen des Produkts dieser Reaktion erzeugt, welches die dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose ist (Thibodeaux *et al.*, 2007; Thibodeaux *et al.*, 2008). Der dTDP-6-Desoxyhexose-Weg kann durch die Biosynthese von dTDP-L-Rhamnose (dTDP-Rha) veranschaulicht werden, an der die Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase (RmlA), die dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase (RmlB), die dTDP-6-Desoxy-D-Xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase (RmlC) und RmlD beteiligt ist. RmlD ist die dTDP-6-Desoxy-L-Lyxose-4-Hexulose-4-Reduktase (4-KR) und erzeugt an der C4-Position eine äquatoriale Hydroxylgruppe (Abbildung 3.4). 6-Desoxy-L-Talose (6dTal) ist das C4-Epimer von L-Rhamnose (Rha). Es wurde vorgeschlagen, dass an der Biosynthese von dTDP-6dTal die 4-KR oder von dTDP-Rha die 4-Epimerase (WbiB) beteiligt ist (Abbildung 3.4).

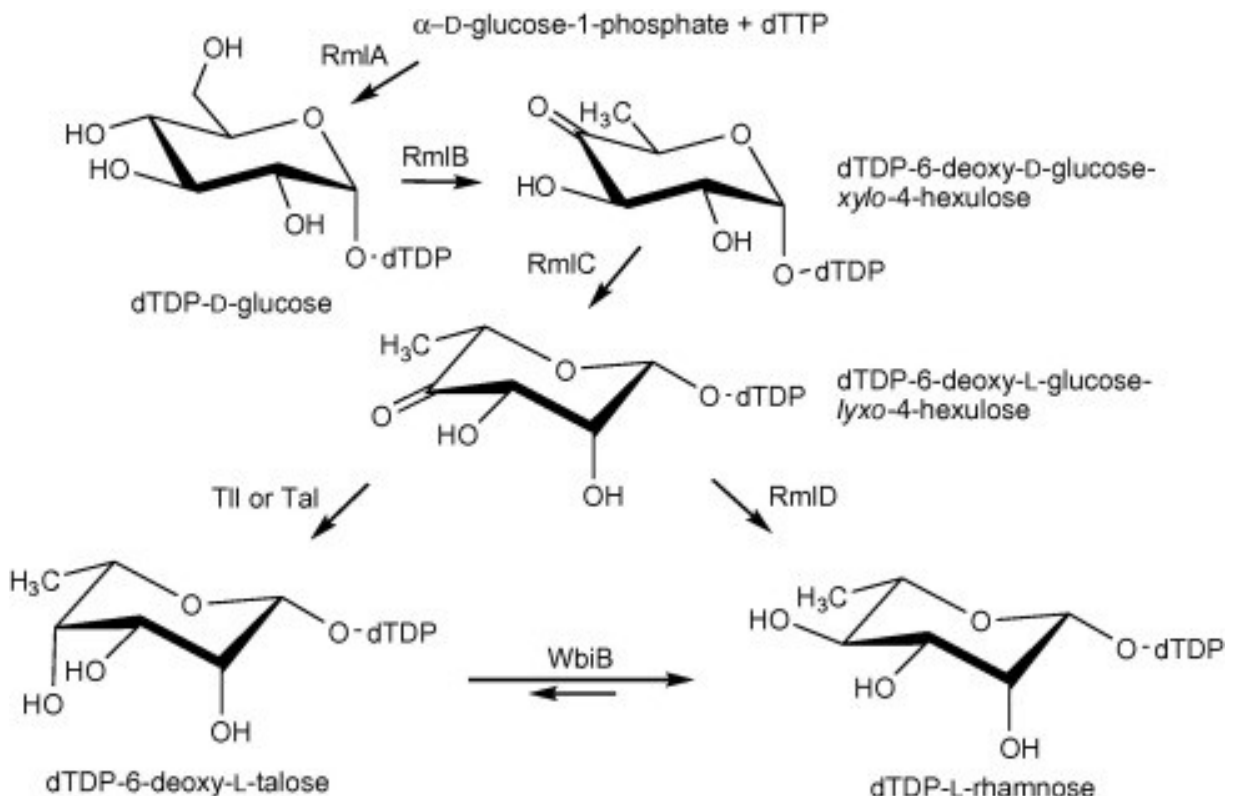


Abbildung 3.4 Biosyntheseweg von dTDP-Rha und dTDP-6dTal übernommen von (Yoo *et al.*, 2011). Eine detaillierte Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. Gedruckt mit Genehmigung von © 2011 Elsevier.

DISKUSSION

Die 4-KR, die die dTDP-6dTal synthetisiert, wurde zuerst in *Actinobacillus actinomycetecomitans* (TII) (Nakano *et al.*, 2000) und später in *Kitasatospora kifunensis* (Tal) charakterisiert (Karki *et al.*, 2010). TII und Tal unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur, obwohl ihre katalytischen Funktionen identisch sind (Yoo *et al.*, 2011). Man spekuliert, dass Tal und TII getrennte Evolutionsspuren eingeschlagen haben, die funktional konvergierten, was ein Beispiel für die genetische Vielfalt innerhalb des dTDP-6dTal-Biosynthesewegs bereitstellt (Karki *et al.*, 2010).

In unserem Fall kodiert *taloV* für eine NDP-Hexose-4-Ketoreduktase. Die dTDP-6dTal wird bekanntlich durch stereospezifische 4-Keto-Reduktionen von dTDP-6-Desoxy-L-Lyxose-4-Hexulose, vermittelt durch TII und Tal (4-KR), synthetisiert. *TaloV* würde demnach den letzten Schritt in der Biosynthese von dTDP-6dTal, in Analogie zu TII und Tal, katalysieren.

Die Glycosyltransferase *TalC* würde dann die 6-Desoxy-L-Talose auf P-Leu-Trp übertragen um Talopeptin zu erzeugen, wie durch *in vitro*-Studien gezeigt wurde (Baulig *et al.*, 2019).

Um den finalen Biosyntheseweg von Talopeptin zu untersuchen, könnte das 6-Desoxy-L-Talose-Gencluster unter Verwendung einer uns bereits bekannten Strategie, die auf der durch RED/ET-vermittelter Rekombination basiert, mit dem Talopeptin-Gencluster (*talMB01*) zusammengebaut werden und anschließend durch heterologe Expression des resultierenden Fosmids in den gut charakterisierten Wirt *S. coelicolor* M512 die Produktion von Talopeptin mittels LC-MS-Analysen bestätigen (Kaysser *et al.*, 2010). Ursprünglich wurde die Rekombination-Technologie für DNA-Manipulationen in *E. coli* etabliert (Zhang *et al.*, 1998; Datsenko and Wanner, 2000; Zhang *et al.*, 2000), und später an *Streptomyces* angepasst (Gust *et al.*, 2003). Bisher wurde Sie erfolgreich für die heterologe Expression (Eustaquio *et al.*, 2005) und kombinatorische Biosynthese (Eustaquio *et al.*, 2003) angewendet. Die in dieser Dissertation vorgeschlagene etablierte Methodik, die unter anderem durch (Kaysser *et al.*, 2010) verwendet wurde, könnte helfen, die heterologe Expression und Gentechnik von verstreuten Genclustern zu stärken.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

4.1.1 Medien für Bakterienkulturen

Die in dieser Studie verwendete Komponente Agar, Hefeextrakt und Trypton wurde von Bacto-Difco (Heidelberg) bezogen. Wenn nicht anderweitig beschrieben, wurden die zusätzlichen Medienbestandteile bei Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) gekauft. Die verwendeten Medien wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedien wurden die Nährmedien vor dem Autoklavieren mit 2% (w/v) Agar versetzt. Falls erforderlich, wurden hitzelabile Zusätze wie z.B. Antibiotika und andere Substanzen steril filtriert (0,22 µm Filter, VWR, Darmstadt) und erst zum Zeitpunkt der Verwendung in das sterile Medium gegeben. Die Medien wurden im Anschluss bei Raumtemperatur oder bei 4 °C gelagert.

Kultivierung von Escherichia coli

LB (Luria-Bertani)-Medium (Sambrook and Russel, 2001)

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Das LB-Medium wurde anschließend autoklaviert.

MATERIAL UND METHODEN

SOB (Super Optimal Broth)-Medium (Sambrook and Russel, 2001)

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Das SOB-Medium wurde anschließend autoklaviert. Im Anschluss wurden 10 mL einer sterilen Lösung von 1 M MgCl₂ dazugegeben.

TB (Terrific Broth)-Medium

Trypton	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerin	4 mL

Die Bestandteile wurden in etwa 900 mL Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g

wurden in 100 mL Wasser gelöst, autoklaviert und dem Medium vor Gebrauch hinzugefügt.

Kultivierung von Streptomyceten

TSB (Tryptic Soy Broth)-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Tryptic Soy Broth	30,0 g
-------------------	--------

Das TSB-Pulver wurde in 1 L Wasser gelöst und autoklaviert.

MATERIAL UND METHODEN

YEME (Yeast Extract – Malt Extract)-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Hefeextrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Malzextrakt	3,0 g
Glucose	10,0 g
Saccharose	340,0 g

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 5 mL einer sterilen Lösung von 1 M MgCl₂ dazugegeben. Zur Herstellung von Protoplasten von *S. coelicolor* M512 wurden 25 mL einer sterilen Lösung von 20% (w/v) Glycin zu 1 L YEME-Medium oder einer Mischung aus 500 mL YEME-Medium und 500 mL TSB-Medium gegeben.

MS (Mannitol-Sojamehl)-Agar (Kieser *et al.*, 2000)

Mannitol	20,0 g
Sojamehl (SOBO Naturkost, Köln)	20,0 g
Agar	20,0 g

Das Mannitol wurde in 1 L Leitungswasser gelöst. 2,0 g Agar und 2,0 g Sojamehl wurden in 300 mL Weithals-Erlenmeyerkolben portioniert und mit 100 mL der Mannitollösung versetzt. Der MS-Agar wurde dann zweimal für 15 Minuten bei 115 °C autoklaviert.

ISP-2 Agar (Hefe-Malzextrakt)

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	4,0 g
Agar	20,0 g

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 7,3 eingestellt. Der ISP-2 Agar wurde anschließend autoklaviert.

MATERIAL UND METHODEN

Eponemycin-Produktionsmedium (Sugawara *et al.*, 1990)

Sojabohnenmehl	15,0 g (Nikko Seiyu)
Pharmamedia	2,5 g (Traders Protein)
Glucose	15,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
CaCO ₃	1,5 g

Die Bestandteile wurden in 500 mL Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Das Eponemycin-Produktionsmedium wurde anschließend autoklaviert.

Talopeptin-Produktionsmedium (Murao *et al.*, 1980)

Glycerin	10,0 g
Pepton	40,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaCl	1,0 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,001 g
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,001 g
MnSO ₄ × 6 H ₂ O	0,001 g

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 7 eingestellt. Das Talopeptin-Produktionsmedium wurde anschließend autoklaviert.

MATERIAL UND METHODEN

Produktionsmedium (P-Medium)

Soytöne	10,0 g
Lösliche Stärke	10,0 g
D-Maltose	20,0 g
Spurenelementlösung	5 mL

Die Bestandteile wurden in etwa 900 mL Wasser gelöst und es wurde ein pH-Wert von 6,7 eingestellt. Mit Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt und anschließend wurde das P-Medium autoklaviert.

R5-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Saccharose	103,0 g
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	10,1 g
Glucose	10,0 g
TES-Puffer	5,7 g
Hefeextrakt	5,0 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
Casaminosäuren	0,1 g
Spurenelementlösung	2 mL

Die Bestandteile wurden in 1 L Wasser gelöst und autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20,0 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Direkt vor dem Gebrauch wurden folgenden sterilen Lösungen zugegeben:

KH ₂ PO ₄ (0.5%)	10 mL
CaCl ₂ × 2 H ₂ O (1 M)	20 mL
L-Proline (20% (w/v))	15 mL
NaOH (1 M)	7 mL

MATERIAL UND METHODEN

Spurenelementlösung

FeCl ₃ × 6 H ₂ O	200,0 mg
ZnCl ₂	40,0 mg
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	10,0 mg
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	10,0 mg
Na ₂ B ₄ O ₆ × 10 H ₂ O	10,0 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	10,0 mg

Die Bestandteile wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

2× YT-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Trypton	16,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g

Die Bestandteile wurden in 100 mL Wasser gelöst und autoklaviert.

4.1.2 Antibiotika

Antibiotika wurden in passenden Lösungsmitteln als Stammlösungen gelöst und bei -20 °C gehalten. Die wässrigen Lösungen wurden sterilisiert, indem sie durch einen 0,22 µm Filter geleitet wurden. Die Lösungen in Ethanol und DMSO waren autosteril. Zur Auswahl der Antibiotika wurden die erforderlichen Antibiotika zu den gekühlten Medien (RT bis 60 °C) in geeigneter Konzentration gegeben.

Tabelle 4.1 Antibiotikalösungen.

Antibiotikum	Resistenzgen	C _{Medium} [µg/mL]	C _{Stammlösung} [mg/mL]
Apramycin	<i>aac(3)IV</i>	50	50 (ddH ₂ O)
Carbenicillin	<i>bla</i>	50	50 (ddH ₂ O)
Chloramphenicol	<i>cat</i>	25	25 (Ethanol)
Kanamycin	<i>neo</i>	50	50 (ddH ₂ O)

MATERIAL UND METHODEN

Anhydrotetrazyklin	<i>tet</i>	1	1 (ddH ₂ O)
Thiostrepton	<i>tsr</i>	8	50 (DMSO)
Nalidixinsäure	-	25	25 (NaOH 0,3 M)

4.1.3 Puffer und Lösungen

Standard-Chemikalien für Puffer und Lösungen wurden bei Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) gekauft. Sofern nicht anderweitig angegeben wurden die Puffer und Lösungen mit bidestilliertem Wasser hergestellt, autoklaviert und anschließend bei RT oder 4 °C aufbewahrt.

Lösungen für die DNA-Isolierung

Tabelle 4.2 Lösungen für die DNA-Isolierung.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Hinweis
Sol I	Glucose	50 mM	pH = 8 einstellen
	Tris-HCl	25 mM	
	EDTA	10 mM	
	RNase A*	100 µg/mL	Direkt vor Gebrauch zugeben
	Lysozym*	5 mg/mL	Direkt vor Gebrauch zugeben (nur für DNA-Isolierung aus Streptomyceten)
Sol II	NaOH	0,2 M	Bei RT aufbewahren
	SDS	1% (w/v)	
Sol III	K(CH ₃ COO)	3 M	pH = 4,8 mit Eisessig einstellen

* Herstellerangaben: RNase A (Qiagen, Hilden), Lysozym aus Hühnereiweiß, mind. 10.000 Units/mg (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg).

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 4.3 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer/Lösung	Komponente	Endkonzentration	Hinweis
50× TAE	Tris-Base	2 M	pH = 8 mit Eisessig einstellen
	EDTA	50 mM	
	Eisessig	57,1 mL/L	
Ladepuffer	Glycerin	30% (w/v)	Bei 4 °C aufbewahren
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)	

MATERIAL UND METHODEN

Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 µg/mL	Mit 1× TAE-Puffer herstellen
----------------------------	----------------	---------	------------------------------

Puffer und Lösungen zur Herstellung von Protoplasten und zur Transformation von Streptomyces

Tabelle 4.4 Puffer und Lösungen zur Herstellung von Protoplasten und zur Transformation von *Streptomyces*.

Puffer	Komponenten	Menge	Hinweis
P-Puffer (Kieser et al., 2000)	Saccharose	103,0 g	Alle Bestandteile lösen, durch Autoklavieren sterilisieren, Aliquots von 50 mL bei -20 °C aufbewahren.
	K ₂ SO ₄	0,25 g	
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	2,02 g	
	Spurenelementlösung (siehe R5 Medium)	2 mL	
	ddH ₂ O	addiere auf 0,8 L	Nach dem Autoklavieren diese sterilen Lösungen hinzufügen.
	KH ₂ PO ₄ (0,5% (w/v))	10 mL	
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O (0,25 M)	100 mL	
TES 0,23 M, pH = 7,2	100 mL		
T-Puffer (Kieser et al., 2000)	PEG 1000	7,0 g in 21 mL P-puffer	PEG 1000 durch Autoklavieren sterilisieren, dann P-Puffer hinzufügen und 1 mL Aliquots bei -20 °C aufbewahren.
Saccharose 10,3% (w/v)	Saccharose	103,0 g/L	In ddH ₂ O lösen und autoklavieren.

Puffer und Lösungen für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und für die Coomassie-Färbung

Alle Puffer und Lösungen wurden gemäß der Bedienungsanleitung für die Protein-Gelelektrophorese von Bio-Rad (Bio-Rad, München, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 4.5 Puffer und Lösungen für die Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und für die Coomassie-Färbung.

Puffer/Lösung	Komponenten	Menge	Hinweis
Sammelgel 4%	Rotiphorese [®] Gel 30	1,35 mL	
	Tris-HCl 0,625 M, pH = 6,8	2 mL	

MATERIAL UND METHODEN

Sammelgel 4%	SDS 10% (w/v)	0,1 mL	APS und TEMED erst kurz vor dem Einfüllen des Gels hinzufügen.
	$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	6,44 mL	
	TEMED	10 μL	
	APS 10% (w/v)	100 μL	
Trenngel 12%	Rotiphorese [®] Gel 30	4 mL	(siehe oben)
	Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8	2,5 mL	
	SDS 10% (w/v)	0,1 mL	
	$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	3,35 mL	
	TEMED	10 μL	
	APS 10% (w/v)	100 μL	
Lämmli-Puffer	Tris-HCl 0,625 M, pH = 6,8	10 mL	Direkt vor Gebrauch zugeben
	SDS 10% (w/v)	20 mL	
	Glycerin	20 mL	
	Bromphenolblau	Spartelspitze	
	β -Mercaptoethanol	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$	
10× Laufpuffer	Tris-HCl	30,3 g	pH = 8,3 einstellen
	Glycin	144,0 g	
	SDS	1% (w/v)	
	HCl	x mL	
	$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	addiere auf 1 L	
Färbe- und Fixierlösung	Essigsäure	5% (v/v)	Direkt vor Gebrauch zugeben
	Ethanol	10% (v/v)	
	Coomassie Brilliant Blau G-250	1% (w/v)	
Bleichlösung	Essigsäure	5% (v/v)	
	Ethanol	10% (v/v)	

Puffer für die Proteinreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie

Die Puffer für die Proteinreinigung wurden mit destilliertem Wasser hergestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Falls erforderlich, wurden Lysozym und Imidazol unmittelbar vor der Verwendung zugegeben. Alle Lösungen wurden direkt vor Gebrauch filtriert (0,22 μm) und entgast.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4.6 Puffer für die Proteinreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie.

Komponenten	Lysepuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer	Hinweis
Tris-HCl 1 M, pH = 8	50 mM	50 mM	50 mM	
NaCl 5 M	500 mM	500 mM	500 mM	
Glycerin	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	
β-Mercaptoethanol	10 mM	10 mM	10 mM	Direkt vor Gebrauch zugeben
TWEEN 20	1% (v/v)	-	-	
Imidazol	20 mM	20 mM	250 mM	
ddH ₂ O	addiere auf 1 L	addiere auf 1 L	addiere auf 1 L	

* Für die Lyse von *E. coli*-Zellen wurden 0,5 mg/mL Lysozym zugegeben, für Streptomyceten 4 mg/mL.

4.2 PLASMIDE, BAKTERIENSTÄMME UND PRIMER

4.2.1 Vektoren, Plasmide und Fosmide

Tabelle 4.7 Vektoren, Plasmide und Fosmide.

Name	Beschreibung	Quelle
Vektor		
pCC1FOS™	<i>ori2, oriV, parA-C, lacZ, cos, redF, repE, loxP</i> ; Cm ^R	Epicentre®
pHis8	Allgemeiner Expressionsvektor für Proteinüberproduktion; pET-28a(+) (Merck, Darmstadt)-Derivat, das ein His8-Tag bereitstellt; Kan ^R	(Jez <i>et al.</i> , 2000)
Plasmid		
pMS80	<i>acc(3)IV-tcp₈₃₀, oriT</i> ; Apra ^R , Amp ^R	(Rodriguez-Garcia <i>et al.</i> , 2005)
pKD46	λ-RED (<i>exo, bet, gam</i>), <i>araC, bla, repA101^{ts}</i> ; Carb ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pIJ773	<i>aac(3)IV (Apra^R), oriT, FRT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pUB307	„Driver“-Plasmid für die triparentale Konjugation RP1, <i>tra, oriT</i> ; Kan ^R , Cm ^R	(Flett <i>et al.</i> , 1997)
pRHAM	pUK21-Derivat (Jeffrey and Joachim, 1991), enthält die Gene <i>oleS, oleE, oleL</i> und <i>oleU</i> aus <i>S. antibioticus</i> ATCC 1891 für die dTDP-L-Rhamnose-Biosynthese, <i>p_{ermE}</i> ; Thio ^R	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2000)

MATERIAL UND METHODEN

pAB01	1,1 kb PCR-Produkt, umfassend <i>talC</i> , flankiert von <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Restriktionsstellen in pHis8; Kan ^R	Eigene Herstellung
pAB02	2,1 kb PCR-Produkt, umfassend <i>talE</i> , flankiert von <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I-Restriktionsstellen in pHis8; Kan ^R	Eigene Herstellung
Fosmid		
6H7	pCC1FOS basiertes Fosmid, mit einem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>S. pyridomyceticus</i> NRRL B-2517, Cm ^R	Eigene Herstellung
6A2	pCC1FOS basiertes Fosmid, mit einem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-1022, Cm ^R	Eigene Herstellung
18F1	pCC1FOS basiertes Fosmid, mit einem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-646, Cm ^R	Eigene Herstellung
epnAB01	Von 6H7; <i>cat</i> -Resistenzgen wurde durch eine Integrationskassette (<i>int_neo</i>) (<i>Xba</i> I-Restriktionsfragment aus merLK01) ersetzt; <i>oriT</i> , <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31; Kan ^R	Eigene Herstellung, (Kaysser <i>et al.</i> , 2012)
epnAB02	Von 6A2; <i>cat</i> -Resistenzgen wurde durch eine Integrationskassette (<i>int_neo</i>) (<i>Xba</i> I-Restriktionsfragment aus merLK01) ersetzt; <i>oriT</i> , <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31; Kan ^R	Eigene Herstellung, (Kaysser <i>et al.</i> , 2012)
epnAB03	Von 18F1; <i>cat</i> -Resistenzgen wurde durch eine Integrationskassette (<i>int_neo</i>) (<i>Xba</i> I-Restriktionsfragment aus merLK01) ersetzt; <i>oriT</i> , <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31; Kan ^R	Eigene Herstellung, (Kaysser <i>et al.</i> , 2012)
epnAB04	Von epnAB01; <i>b-2517A–B</i> -Gene wurden durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB05	Von epnAB01; <i>b-2517B</i> -Gen wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB06	Von epnAB02; vor <i>s-1022E</i> -Gen wurde ein <i>tcp</i> ₈₃₀ -Promotor aus pMS80 eingebracht	Eigene Herstellung
epnAB07	Von epnAB03; <i>s-646A–B</i> -Gene wurden durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB08	Von epnAB03; <i>s-646B</i> -Gen wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB09	Von epnAB03; <i>s-646M</i> -Gen wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung

MATERIAL UND METHODEN

epnAB10	Von epnAB04; <i>b-2517A–B</i> -Gene wurden gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB11	Von epnAB05; <i>b-2517B</i> -Gen wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB12	Von epnAB07; <i>s-646A–B</i> -Gene wurden gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB13	Von epnAB08; <i>s-646B</i> -Gen wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
epnAB14	Von epnAB09; <i>s-646M</i> -Gen wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
8G9	pCC1FOS basiertes Fosmid, mit dem Talopeptin-Biosynthesegencluster aus <i>S. mozunensis</i> MK-23, Cm ^R	Marius Bader, (Baulig <i>et al.</i> , 2019)
talMB01	Von 8G9; <i>cat</i> -Resistenzgen wurde durch eine Integrationskassette (<i>int_neo</i>) (<i>Xba</i> I-Restriktionsfragment aus merLK01) ersetzt; <i>oriT</i> , <i>neo</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31; Kan ^R	Marius Bader, (Kaysser <i>et al.</i> , 2012; Baulig <i>et al.</i> , 2019)
talAB01	Von talMB01; <i>orf-7–1</i> wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB02	Von talMB01; <i>talC</i> wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB03	Von talMB01; <i>talD</i> wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB04	Von talMB01; <i>talE</i> wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB05	Von talMB01; <i>orf+1–12</i> wurde durch eine Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt; Apra ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB09	Von talAB01; <i>orf-7–1</i> wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB10	Von talAB02; <i>talC</i> wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB11	Von talAB03; <i>talD</i> wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB12	Von talAB04; <i>talE</i> wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung
talAB13	Von talAB05; <i>orf+1–12</i> wurde gelöscht (81 bp scar); Kan ^R	Eigene Herstellung

4.2.2 Bakterienstämme

Tabelle 4.8 Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> EPI300™	T1R Phage T1-resistenter <i>E. coli</i> [F– <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) (StrR) Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ– <i>rpsL nupG trfA tonA dhfr</i>]	Epicentre®
<i>E. coli</i> BW25113	Δ(<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ4787::rrnB-4;lacIP-4000(lac^Q)</i> λ [–] <i>rpoS369(Am) rph-1</i> Δ(<i>rhaDrhaB</i>)568 <i>hsdR514</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
<i>E. coli</i> ET12567	In der DNA-Methylierung dreimal defekter Stamm, (<i>dam</i> [–] , <i>dcm</i> [–] , <i>hsdM</i>); Tet ^R , Cm ^R	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
<i>E. coli</i> BT340 (= <i>E. coli</i> DH5α/pCP20)	FLP ⁺ , λ <i>ci857</i> ⁺ , λ P _R , rep ^{ts} ; Carb ^R , Cm ^R	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
<i>E. coli</i> Rosetta2 (DE3) pLysS	Wirt für die heterologe Expression von His8-markierten Proteinen (F [–] <i>ompT hsdS_B(r_B[–]m_B[–]) gal dcm</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7-Gen 1ind1 sam7 nin5</i>]) pLysSRARE); Cm ^R	Invitrogen®
<i>Streptomyces coelicolor</i> M512	<i>S. coelicolor</i> M145-Derivat: SCP1 [–] , SCP2 [–] , Δ <i>actII-ORF4, ΔredD</i>	(Floriano and Bibb, 1996)
<i>Streptomyces albus</i> J1074	<i>S. albus</i> G Derivat: Defekt in <i>SaIGI</i> -vermittelter Restriktion, Valin- und Isoleucin auxotroph	(Chater and Wilde, 1980; Zaburanyi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Streptomyces pyridomyceticus</i> B-2517	Wildtyp-Stamm	NRRL B-2517 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
<i>Streptomyces achromogenes</i> B-2120	Wildtyp-Stamm	NRRL B-2120 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

MATERIAL UND METHODEN

<i>Streptomyces</i> sp. S-1022	Wildtyp-Stamm	NRRL S-1022 (ARS Culture Collection)
<i>Streptomyces</i> sp. S-646	Wildtyp-Stamm	NRRL S-646 (ARS Culture Collection)
<i>Streptomyces mozunensis</i> MK-23	Talopeptin Produzent; Wildtyp-Stamm	NRRL 12054 (ARS Culture Collection)
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	Caprazamycin Produzent; Wildtyp-Stamm	FERM BP-7218 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))
<i>Streptomyces fradiae</i> A0	<i>urdGT1a⁻</i> , <i>urdGT1b⁻</i> , <i>urdGT1c⁻</i> ; Mutante des Urdamycin-Produzenten <i>S. fradiae</i> TÜ2171	(Trefzer <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. albus</i> J1074/epnAB01-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>S. pyridomyceticus</i> NRRL B-2517, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB02-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-1022, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB03-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster, homolog zu den Epoxyketon-BGCs, aus <i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-646, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB06-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster und einem <i>tcp₈₃₀</i> -Promotor aus pMS80 vor <i>s-1022E</i> -Gen, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB10-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster $\Delta b-2517A-B$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB11-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosynthesegencluster $\Delta b-2517B$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung

MATERIAL UND METHODEN

<i>S. albus</i> J1074/epnAB12-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosyntheseegencluster $\Delta s-646A-B$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB13-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosyntheseegencluster $\Delta s-646B$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. albus</i> J1074/epnAB14-(1),-(2) und -(3)	<i>S. albus</i> J1074 mit dem „orphan“ Biosyntheseegencluster $\Delta s-646M$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talMB01-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Marius Bader, (Baulig <i>et al.</i> , 2019)
<i>S. coelicolor</i> M512/talMB01-(1)/pRHAM-(1),-(2) und -(3)	<i>S. coelicolor</i> M512, co-exprimiert mit dem Talopeptin-Gencluster und pRHAM, drei unabhängige Mutanten; Thio ^R , Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>S. fradiae</i> A0/talMB01-(1),-(2) und -(3)	<i>S. fradiae</i> A0, mit dem Talopeptin-Gencluster, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Marius Bader, (Baulig <i>et al.</i> , 2019)
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talAB09-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster $\Delta orf-1-7$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talAB10-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster $\Delta talC$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talAB11-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster $\Delta talD$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talAB12-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster $\Delta talE$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung
<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2/talAB13-(1),-(2) und -(3)	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 mit dem Talopeptin-Gencluster $\Delta orf+1-12$, drei unabhängige Mutanten; Kan ^R	Eigene Herstellung

4.2.3 Primer

Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 4.9 PCR Primer für die konventionelle PCR, Colony-PCR und für die Verlängerung der Resistenzkassetten (RED/ET-vermittelte Rekombination) zum Teil übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019).

Primername	Primersequenz (5'-3')
b-2517MS_FP	CTTCCTCGCCGAGCTCCAGC
b-2517MS_RP	CTCGCCGGTGAGCAGGTAGC
s-1022US_FP	GCGATGCCATGGCGTCACGG
s-1022US_RP	CCTGCCCGAACGGCTCATCG
s-1022DS_FP	GCAGTTCACGCAACGGGCC
s-1022DS_RP	CCAGTGATCCGGACCGCGTC
s-646US_FP	CAGCAGTCTGCGGAGCTCGG
s-646US_RP	GATCGGCTGGCGGAAGTCGC
s-646DS_FP	CGTGCTCGGCTACTGCGTCG
s-646DS_RP	CGGCTCTGTCCGCGTATCG
Δb -2517A_FP ^a	TGTCCGCCGACACCGAGAGGAACAGGGGAGGGTCACGTGA TTCCGGGGATCCGTCGACC
Δb -2517B_RP ^a	CTTGATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCACCTGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC
Δb -2517B_FP ^a	GGGCGGTGGTCCGGCTCGGTGGGCAGCCCCGGCCTGGGTCA ATTCCGGGGATCCGTCGACC
Δb -2517B_RP ^a	CTTGATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCACCTGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC
s-1022 <i>vorE tcp</i> ₈₃₀ _FP ^a	GTCCGGATCACTGGTCGCATTCCGTGTCGTGGTTGCCAATC TAGACCTCCGACGTACGC
s-1022 <i>vorE tcp</i> ₈₃₀ _RP ^a	CCGCCGTACGGCCGTCTTTCCCTAGGTAAGGAACGCCACTT ATGAGCTCAGCCAATCG
Δs -646A_FP ^a	TGGTCACGGGTTTGATGCCGGGGGGCTTGGCCGTAICTCAAT TCCGGGGATCCGTCGACC
Δs -646B_RP ^a	CATACAGCGACCATCTGACAACGGAGAGTGAGGGCGATGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δs -646B_FP ^a	AACATGGTCACGCGCAGCAAGCGCCCCGTAACCTCCGCTAA TTCCGGGGATCCGTCGACC
Δs -646B_RP ^a	CATACAGCGACCATCTGACAACGGAGAGTGAGGGCGATGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δs -646M_FP ^a	ATTCCGGTTGTGGCCAGCCGCAGGCGATGACAGCGCTTGA TTCCGGGGATCCGTCGACC

MATERIAL UND METHODEN

Δs -646M_RP ^a	TTCGTAGGGCAGGTTTGGTTTTCGGGCACTCGCCGGGTCATG TAGGCTGGAGCTGCTTC
screen Δb -2517A_FP ^a	GCTCGGCGCTGTACGAGCTG
screen Δb -2517B_RP ^a	GGAAAGCGGGCAGTGAGCGC
screen Δb -2517B_FP ^a	GCTCGCTCGACCTGAGCGAC
screen Δb -2517B_RP ^a	GGAAAGCGGGCAGTGAGCGC
screen s-1022 vorE tcp ₈₃₀ _FP ^a	CGACGTCGTCTGGGGTCGATC
screen s-1022 vorE tcp ₈₃₀ _RP ^a	CCTTCGACACGCTTCGCGCC
screen Δs -646A_FP ^a	GAGGGCTTCGGCACCCACTG
screen Δs -646B_RP ^a	CAATCCGCCGCCGAAACCGG
screen Δs -646B_FP ^a	GAGAATGGCGCGTTGCCGCG
screen Δs -646B_RP ^a	CAATCCGCCGCCGAAACCGG
screen Δs -646M_FP ^a	CGTGACGGCTGATGAGGCGG
screen Δs -646M_RP ^a	CGGGGAGAGCGAGGTGAACG
talUS_FP	TCGATGCAACGCAGAGTTTC
talUS_RP	CTGTAGTCGGAGCAGGTGAG
talDS_FP	GCTGCCCTGTCGTACCTTTC
talDS_RP	GCTGGATGACGTGGGTCAAC
Δorf -1_FP ^a	TCCCGCCGAACGAGCCGGCACAGAGCCTGTCCGGCCCTA ATTCCGGGGATCCGTCGACC
Δorf -7_RP ^a	CGGACACGGGCGGAGGAGGCGGCCTCGCTGGCCGAGTCA TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δtal C_FP ^a	CTGATCCCCCCATCCCAGTAAACGAGGTTCTTCATGAT TCCGGGGATCCGTCGACC
Δtal C_RP ^a	CGCACCGTGTTTCGAGAACCGATGAGGCGGGCCGGCCTCAT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δtal D_FP ^a	CACGGGCCGAGTGAACCTTCTTCAGGAGAAAGCACGTTGATT CCGGGGATCCGTCGACC
Δtal D_RP ^a	GCATGAAGGAACCTCGTTTACTCGGGATGGGGGGGATCATGT AGGCTGGAGCTGCTTC
Δtal E_FP ^a	ATCGTGTACATGATGACGAATGGCTGAACTGTGCGCATGATT CCGGGGATCCGTCGACC
Δtal E_RP ^a	GCGATGTCGCACCCGGCTGGTGCCACTCAGCCGGTGTGCAT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
Δorf +1_FP ^a	GTAGGTCCCCGTACCGACACCGAAAGGACCCTCCCCGTGATT CCGGGGATCCGTCGACC
Δorf +12_RP ^a	CGGCGCGGCCTCCTCCCCGGCAGCTCGGAGCACGACATT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
screen Δorf -1_FP	CGCAGCGGGACGAGATGACC
screen Δorf -7_RP	CGGGTGTGCGGGTGAGACAG

MATERIAL UND METHODEN

screen Δ talC_FP	CCGGATCGCGCAACTGGCTC
screen Δ talC_RP	ACAGGAGCACGCCGGGTACG
screen Δ talD_FP	TCGCCCCGACGAGAGCTACGC
screen Δ talD_RP	TCTCGACCACCCGCCGCATC
screen Δ talE_FP	CGATGGCGTGATCCGTCGGG
screen Δ talE_RP	GCGGGAAGGCGTACTCCAGC
screen Δ orf+1_FP	GTCACCGGCAACACCGCAGG
screen Δ orf+12_RP	GGGTCGCACCATCGGGACTC
his_talE_FP ^b	CCGAATTCATGACCCGTTCCGGATCGC
his_talE_RP ^b	GGTGCTCGAGTCACCCGGCGGTGCGG
his_talC_FP ^b	GGCGGATCCATGCGTGTACTGTTCCG
his_talC_RP ^b	GTGCTCGAGTCAGCCGGTGATGGCGC

^a Kursive Buchstaben ermöglichen die homologe Rekombination mittels PCR-gerichteter Mutagenese.

^b Überlappende Regionen mit pHis8.

4.3 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

4.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Für Klonierungsexperimente wurden *E. coli*-Stämme über Nacht (16–18 h) bei 37 °C in flüssigem oder festem LB-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika kultiviert (Sambrook and Russel, 2001). Die Kultivierung in flüssigen Medien wurde unter Schütteln bei 200 rpm durchgeführt. Für die Proteinüberproduktion betrug die Inkubationstemperatur 20 °C. Für Rekombinationsexperimente mit *E. coli* BW25113-Stämmen betrug die Inkubationstemperatur 30 °C. Für die Herstellung von Permanent-Kulturen der *E. coli*-Stämme wurde 800 μ L Flüssigkultur mit 400 μ L 80% Glycerinlösung (v/v) gemischt und bei -80 °C gelagert.

4.3.2 Kultivierung von *Streptomyces*

Allgemeine Kultivierung

Streptomyces-Stämme wurden routinemässig in flüssigem TSB-Medium oder auf MS-Agar mit den entsprechenden Selektionsantibiotika kultiviert. Für die Flüssigkulturen wurden 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder (mit 50 mL TSB) verwendet. Die

TSB-Flüssigkulturen wurden mit Sporensuspension inokuliert und für 2 bis 3 Tage bei 28–30 °C und 180–200 rpm inkubiert. Zur Herstellung von Protoplasten wurde *Streptomyces* in 50% YEME-Medium und 50% TSB-Medium mit 0,5% (w/v) Glycin kultiviert. Für die Langzeitaufbewahrung von *Streptomyces*-Stämmen wurden Sporensuspensionen hergestellt.

Herstellung von Sporensuspensionen von Streptomyces

Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden die verwendeten *Streptomyces*-Stämme ca. 1 ½ Wochen auf MS-Agar oder ISP-2 Agar bei 30 °C kultiviert bis eine starke Sporulation einsetzte. Die Sporen wurden nach Zugabe von 2× 7,5 mL sterilem bidestilliertem Wasser mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens von der MS-Platte gelöst. Die resultierende Suspension wurden in ein 50 mL Falkontube überführt und durch einminütiges Vortexen gemischt. Zur Entfernung von Myzelresten wurde die Suspension über sterile Watte, welche in eine Einwegspritze gesteckt war, filtriert und die erhaltenen Sporen abzentrifugiert (2,100×g, 10 min, 4 °C). Im Anschluss wurden die Sporen in 0,5–2,0 mL 20% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Produktion von Sekundärmetaboliten

Kultivierung von S. albus J1074-Mutanten für die Produktion von putativen „Epoxyketon“-Derivaten

50 mL TSB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurde im 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder mit Sporensuspension angeimpft und für 2 bis 3 Tage bei 28 °C und 200 rpm kultiviert. 1 mL dieser TSB-Vorkultur wurde dann für die Inokulation des Produktionsmediums (50 mL R5-Medium im 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder) verwendet und für 7 Tage bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die jeweiligen Wildtyp-Stämme wurden unter den gleichen Bedingungen behandelt, mit Ausnahme des Produktionsmediums (Eponemycin-Produktionsmedium) und der Verwendung der Antibiotika. Zur Induktion des *tcp₈₃₀*-Promotors wurde 1 µg/mL Anhydrotetrazyklin (aTc) (Sigma-Aldrich) zugesetzt (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2005). In der Regel wurden 1–50 mL der Produktionskultur im Anschluss extrahiert und dann die möglichen neu gebildeten Sekundärstoffe mittels LC-MS versucht zu detektieren (siehe Abschnitt 4.7.3).

Kultivierung von S. mozunensis MK-23-Wildtyp für die Produktion von Talopeptin

50 mL Talopeptin-Produktionsmedium wurde, wie von (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, im 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder mit Sporensuspension angeimpft und für 2 bis 3 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde 1 mL dieser Vorkultur für die Inokulation der 50 mL Hauptkultur (Talopeptin-Produktionsmedium) verwendet und für weitere 3 Tage unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Kultivierung von Streptomyces sp. MK730-62F2-Mutanten für die Produktion von Phosphoramidon

50 mL TSB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurde, wie von (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, im 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder mit Sporensuspension angeimpft und für 2 bis 3 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Dann wurde 1 mL dieser TSB-Vorkultur für die Inokulation des Produktionsmediums (50 mL P-Medium im 300 mL Schikanekolben mit Edelstahlfeder) verwendet und für 7 Tage bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Der *Streptomyces sp. MK730-62F2*-Wildtyp wurde unter den gleichen Bedingungen behandelt, mit Ausnahme der Verwendung der Antibiotika. Für chemische Komplementationsexperimente wurde synthetisches L-Leu-L-Trp-Dipeptid (Sigma-Aldrich) nach 24–48-stündiger Kultivierung in einer Endkonzentration von 2,5–5 mM zugegeben.

4.4 MOLEKULAR- UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Standardmethoden für die DNA-Isolierung, -Übertragung und -Manipulation wurden auf Grundlage von (Sambrook and Russel, 2001) und (Kieser *et al.*, 2000) durchgeführt und modifiziert.

4.4.1 Aufreinigung, Konzentration und Quantifizierung von DNA

Zur Aufreinigung und Konzentrierung von DNA wurde eine Ethanol oder Isopropanol Fällung und Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.4). Für die Quantifizierung von DNA wurde das Nanodrop 1000 Spektrophotometer (PeqLab, Erlangen) verwendet und die Absorbanz bei 260 nm gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration erfolgte ebenfalls ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der

untersuchten DNA-Proben mit dem DNA-Marker (Generuler™ 1 kb DNA-Ladder, Thermo Scientific) auf Agarosegelen.

4.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten (Größenbereich von 0,2 bis 50 kb) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 0,7%–1,8% (w/v) Agarosegelen (mit 1× TAE-Puffer) durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die Gele im Ethidiumbromid-Färbebad für 15 bis 20 Minuten gefärbt und die DNA-Banden unter UV-Licht (312 nm) mit Hilfe des Eagle Eye II-Systems (Stratagene, Heidelberg) visualisiert. Für die Größenzuordnung wurde ein DNA-Marker (Generuler™ 1 kb DNA-Ladder, Thermo Scientific) verwendet. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des „peqGOLD Gel Extraction Kit“ (PeqLab, Erlangen) gemäß dem Protokoll des Herstellers gereinigt.

4.4.3 Manipulation von DNA mit Enzymen

DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers geschnitten (New England Biolabs, Frankfurt/Main). Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/Main) verwendet. Vektor und Insert wurden hierfür im Verhältnis 1:3 eingesetzt und die Reaktion (Gesamtvolumen 10 µL) wurde für 1 bis 2 Stunden bei RT oder über Nacht (16–18 h) bei 4 °C inkubiert.

4.4.4 Plasmid-/Fosmidisolierung aus *E. coli*

Unter Verwendung von alkalischer Lyse wurden rekombinante Plasmide/Fosmide aus *E. coli* isoliert. 5 mL LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. 4 mL dieser *E. coli*-Flüssigkultur wurden zentrifugiert (16,100×g, 1 min, 4 °C) und das erhaltene Pellet anschließend in 200 µL Sol I durch vortexen resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 400 µL Sol II zugegeben. Proteine und die genomische DNA wurden durch Zugabe von 300 µL Sol III gefällt. Das Gemisch wurde 1 bis 2 Minuten auf Eis inkubiert und der Niederschlag wurde durch erneute Zentrifugation (16,100×g, 30 min, 4 °C) pelletiert. Für die Konzentrierung wurde die im Überstand enthaltene Plasmid-/Fosmid-DNA mit dem gleichen Volumen 100%

Isopropanol gemischt und zentrifugiert (16,100×g, 30 min, 4 °C). Die gefällte DNA wurde mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen, bei 60 °C getrocknet und anschließend in 30–50 µL 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 8) gelöst.

4.4.5 Isolierung von gDNA aus *Streptomyces*

Die gDNA-Isolierung wurde auf Grundlagen von (Kieser *et al.*, 2000) durchgeführt. 2 mL einer 2 Tage alten TSB-Kultur wurden durch Zentrifugation (16,100×g, 1 min, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden mit 1 mL einer 0,3 M Saccharose-Lösung gewaschen und in 500 µL Lysozym-Lösung durch vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde 250 µL einer SDS-Lösung zugegeben und das Gemisch für 10 Minuten bei 60 °C inkubiert und anschließend 1 Minute lang kräftig gevortext. Dann wurden 250 µL Roti[®]-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und die Mischung für 15 Sekunden lang gevortext und bei 16,100×g für 10 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen gegossen und ein zweites Mal mit 250 µL Roti[®]-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert (1 min kräftig vortexen). Die wässrige Phase wurde abgenommen und die gDNA durch Zugabe von 0,1 des Volumens von einer NaOAc-Lösung und 0,8 des Volumens von Isopropanol und durch erneute Zentrifugation (16,1000×g, 30 min, 4 °C) ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen, bei 60 °C luftgetrocknet und in 50–150 µL Tris-HCl-Puffer (pH = 8) resuspendiert. Ein ähnliches Verfahren wurde zur Isolierung von hochmolekularer gDNA verwendet. Um mechanische Kräfte auf die DNA zu vermeiden, wurde das Mischen durch sanftes Invertieren statt Vortexen in allen Schritten durchgeführt. Die Zellen wurden aus einer 50 mL Kultur geerntet und mit einer 10 mL Lysozym-Lösung und 8 mL SDS-Lösung behandelt. Die Extraktion wurde mindestens fünfmal mit gleichen Volumen Roti[®]-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) durchgeführt, bis die wässrige Phase klar schien.

4.4.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurde mit einem iCycler[®] PCR-System (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Standard-Taq/Pfu-PCR

Tabelle 4.10 Pipettierschema für die Standrad-Taq/Pfu-PCR.

Komponente	Menge
Reaktionspuffer 10×	5 µL
Template-DNA	2 µL
Primer: je 50 pmol/µL	0,5 µL
dNTPs 2,5 mM	4 µL
Taq:Pfu-Polymerase 8:1	2 µL
DMSO	2,5 µL
ddH ₂ O	33,5 µL

Tabelle 4.11 PCR-Programm der Standrad-Taq/Pfu-PCR.

Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
94	120	1
94	45	30
50–70	45	
72	90	
72	300	1
4	∞	

Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 und pMS80

Für die Gewinnung der Apramycin-Resistenzkassetten aus pIJ773 und pMS80 wurden 10 µg der genannten Plasmid-DNAs unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme (*EcoRI/HindIII* und *PmeI/SpeI*) verdaut (siehe Abschnitt 4.4.3) (Gust *et al.*, 2003). Die ~1,4 kb und ~1,1 kb großen Resistenzkassetten wurde im Anschluss mit Hilfe eines Agarosegels isoliert und gereinigt (siehe Abschnitt 4.4.2). Die Verlängerung der Resistenzkassetten erfolgte mit überhängenden Primern (siehe Tabelle 4.9) unter den folgenden Konditionen.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4.12 Pipettierschema zur Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 und pMS80.

Komponente	Menge
Reaktionspuffer 10×	5 μL
Template-DNA	1 μL
Primer: je 100 pmol/ μL	0,5 μL
dNTPs 2,5 mM	4 μL
Taq:Pfu-Polymerase 8:1	1 μL
DMSO	2,5 μL
ddH_2O	35,5 μL

Tabelle 4.13 PCR-Programm zur Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 und pMS80.

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [s]	Zyklen
94	120	1
94	45	10
50	45	
72	90	
94	45	15
55	45	
72	90	
72	300	1
4	∞	

Colony-PCR mit E. coli-Zellen

Bei der Colony-PCR mit *E. coli*-Zellen wurde Zellmaterial anstelle von isolierter DNA als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt. Einzelklone wurden von einer LB-Agarplatte mit einem Zahnstocher gepickt und in 50 μL ddH_2O gelöst. 5 μL dieser Suspension wurden als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt (siehe Standard Taq/Pfu-PCR). Abweichend von diesem Protokoll wurde die Taq-Polymerase anstelle des Taq/Pfu-Polymerase-Mixes für die Amplifikation eingesetzt, sowie die Denaturierungszeit im PCR-Programm auf 5 Minuten erhöht.

4.4.7 Übertragung von DNA in *E. coli*

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden wurden von (Sambrook and Russel, 2001) modifiziert.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

50–100 mL LB-Medium wurden mit 1–3 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 30–37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss durch Zentrifugation geerntet (3,000×g, 5 min, 4 °C) und zweimal mit 30 mL einer eiskalten 10% (v/v) Glycerin-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in dem verbleibenden Rückfluss nach Verwerfen des Überstands resuspendiert und entweder sofort verwendet oder in 50–100 µL Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

Transformation von E. coli durch Elektroporation

1–4 µL (ca. 100 ng) DNA wurden mit 50–100 µL elektrokompetente Zellen gemischt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig in eine eiskalte Elektroporationsküvette (0,2 cm) überführt. Die Elektroporation wurde bei 2,5 kV mit Hilfe eines Elektroporationsgeräts (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die optimale Zeitkonstante beträgt 4,5 bis 5,0 Millisekunden. Die Küvette wurde nach der Elektroporation sofort auf Eis gestellt und es wurde 1 mL LB-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 30–37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen (nicht mehr als 200 µL) auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und für 16 bis 18 Stunden bei 30–37 °C inkubiert.

Hinweis: Um das Plasmid pKD46 in *E. coli* BW25113 aufrechtzuerhalten, müssen die Zellen bei 30 °C kultiviert werden, da pKD46 einen temperaturempfindlichen Replikationsursprung enthält. Ansonsten betrug die Kultivierungstemperatur 37 °C.

4.4.8 Übertragung von DNA in *Streptomyces*

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden leicht von (Kieser *et al.*, 2000) modifiziert. *PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation*

Herstellung von Protoplasten

20 µL Sporen wurden zu 50 mL TSB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika gegeben und für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert. 1 mL der TSB-Vorkultur wurde in ein Gemisch aus 25 mL YEME und 25 mL TSB-Medium mit 0,5% (v/v) Glycin inokuliert und für ca. 1 Woche kultiviert. Das Mycel wurde durch Zentrifugation (2,100×g, 10 min, 4 °C) geerntet und zweimal mit 15 mL einer 10,3% (w/v) Saccharose-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 8–10 mL sterilfiltriertem P-Puffer, der 4–6 mg/mL Lysozym enthielt, suspendiert und 15 bis 60 Minuten bei 30 °C unter leichtem Bewegen inkubiert. Protoplastenbildung wurde durch Mikroskopie identifiziert und die Reaktion wurde durch Inkubation auf Eis gestoppt. 8–10 mL eiskalter P-Puffer wurden zugegeben, mit den Protoplasten vorsichtig durch Pipettieren gemischt und durch sterile Watte filtriert. Nach der Zentrifugation (1,000×g, 8 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in 0,5–1 mL P-Puffer suspendiert. Die Protoplasten-Suspension kann sofort für die Transformation verwendet oder in 100–200 µL Aliquots bei -80 °C aufbewahrt werden. Um die Protoplasten für die Lagerung einzufrieren wurden die Reaktionsgefäße, in einem Plastikbecher, in Eis gelegt und über Nacht bei -80 °C aufbewahrt.

PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation

Die für die Protoplasten-Transformation verwendete DNA wurde aus *E. coli* ET 12567 isoliert, um das methylierungssensitive Restriktionssystem im Falle einer Transformation in *Streptomyces* zu umgehen. 100–200 µL frische Protoplasten wurden mit 1–20 µg DNA (in maximal 10–20 µL Tris-Puffer) versetzt. 400–500 µL T-Puffer wurden sofort zugegeben und vorsichtig durch Pipettieren gemischt und für 1 Minute bei RT inkubiert. Zunehmende Volumina der resultierenden Suspension (z.B. 10 µL, 100 µL, 200 µL, Rest) wurden auf vier R5-Agarplatten ausplattiert. Nach 16 bis 24 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Platten mit 1 mL ddH_2O , einschließlich der erforderlichen Antibiotika für die Selektion, überschichtet und für weitere 3 bis 7 Tage inkubiert. Einzelne Klone wurden mit einem sterilen Wattestäbchen gepickt, verdünnt und auf R5-Agarplatten mit den erforderlichen Antibiotika für die weitere Erzeugung einzelner Klone gestreift.

Intergenerische Triparentale Konjugation zur Einführung von DNA in Streptomyces

Für die Übertragung von modifizierten Fosmiden, die ausschließlich das *neo*-Resistenzgen (Kanamycin-Resistenz) zur Selektion aufweisen, wurde eine triparentale Konjugation durchgeführt. Eine Übertragung von Fosmiden mit *neo*-Resistenzgenen in *E. coli* ET12567/pUZ8002 (konventionelle, biparentale Konjugation) ist hier nicht möglich, da pUZ8002 ebenfalls ein *neo*-Resistenzgen aufweist. Da im Allgemeinen diverse *Streptomyces*-Stämme ein methylierungssensitives Restriktionssystem aufweisen, wurden für die Konjugationen der methylierungsdefiziente *E. coli* ET12567-Stamm verwendet.

Bei der triparentalen Konjugation wurden die rekombinanten Plasmide und Fosmide mit *oriT* zunächst in *E. coli* ET12567 überführt. Die transformierten Stämme wurden dann in 10 mL LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Parallel dazu wurden *E. coli* ET12567/pUB307-Zellen, welche die *tra*-Gene für die Mobilisierung von zirkulärer DNA enthalten, unter gleichen Bedingungen kultiviert. Beide Stämme wurden durch Zentrifugation geerntet (3,000×g, 5 min, 4 °C), zweimal mit 10 mL eiskalten LB-Medium gewaschen und anschließend jeweils in 1 mL LB-Medium resuspendiert. Parallel dazu wurden 50 µL *Streptomyces*-Sporen (10⁸) in 500 µL 2× YT-Medium zunächst für 10 Minuten bei 50 °C dann für 5 Minuten auf Eis und anschließend für ca. 2 Stunden bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Je 250 µL der *E. coli* ET12567-Suspensionen und 500 µL der *Streptomyces*-Suspension wurden gemischt, zentrifugiert (16,100×g, 2 min, 4 °C) und das Zellpellet wurde in ca. 200 µL Rückfluss resuspendiert. 100 µL dieser Suspension und weitere Verdünnungen in bidestilliertem Wasser (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) wurden dann auf MS-Agar-Platten mit 10 mM MgCl₂ ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Nach 16 bis 20 Stunden wurden die Konjugationsplatten mit 1 mL ddH₂O, welches 0,5 mg Nalidixinsäure zum Abtöten der *E. coli*-Zellen und ein weiteres Antibiotikum (1,25 mg Kanamycin oder 8 µg Thiostrepton) zur Selektion des konjugierten Fosmids enthielt, überschichtet. Die Inkubation wurde für 4 bis 10 Tage bei 30 °C fortgesetzt. Mindestens drei sporulierende Einzelklone wurden mit einem Wattestäbchen abgenommen, in bidestilliertem Wasser verdünnt und erneut auf MS-Agar mit den oben genannten Selektionsantibiotika ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Von den erhaltenen Einzelklonen wurden Sporensuspensionen für die Langzeitaufbewahrung hergestellt (siehe Abschnitt 4.3.2).

4.4.9 Aufbau und Screening von Genombibliotheken

Erstellen der Fosmid-Bibliotheken

Genomische DNA aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp NRRL S-1022, *Streptomyces* sp NRRL S-646, sowie aus *S. mozunensis* MK-23 wurde, wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben, isoliert. Für die Fosmid-Bibliotheksstrukturen wurden die gDNAs durch mehrfaches Pipettieren geschert, um ein etwa 40 kb Fragment zu erhalten. Diese Fragmente wurden mit Unterstützung von Studenten des Wahlpflichtpraktikums der Pharmazeutischen Biologie an der Universität Tübingen im WS 2015/2016 in den pCC1FOS-Vektor, gemäß den Anweisungen des Herstellers (CopyControl™ Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS™ Vector, Epicentre®), kloniert. Daraus resultierten Genom-Bibliotheken im Falle von *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517 mit 2640 Klonen, im Falle von *Streptomyces* sp. NRRL S-1022, mit etwa 1000 Klonen, im Falle von *Streptomyces* sp. NRRL S-646 mit 1024 Klonen und eine Genom-Bibliothek mit 1920 Klonen im Falle von *S. mozunensis* MK-23.

Überprüfen der Fosmidbibliotheken

Um die putativen „Epoxyketon“-Biosynthesegencluster aus *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 zu isolieren wurden die genomischen Bibliotheken mit den Primerpaaren b-2517MS_FP/RP, s-1022US_FP/RP und s-1022DS_FP/RP, sowie s-646US_FP/RP und s-646DS_FP/RP mittels PCR gescreent (siehe Tabelle 4.9 und Abschnitt 4.4.6).

Um das *tal*-Biosynthesegencluster zu isolieren wurde, wie in (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, die genomische Bibliothek von *S. mozunensis* MK-23 mit den Primerpaaren talUS_FP/RP und talDS_FP/RP in Zusammenarbeit mit Marius Bader (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) einem PCR-Screening unterzogen (siehe Tabelle 4.9 und Abschnitt 4.4.6).

Um das Screening-Verfahren zu erleichtern wurden die Klone zunächst einmal gepoolt. In der ersten Runde wurden Pools von 48 Klonen gescreent, gefolgt von einem Screening von Subpools von 8 Klonen und schließlich dem Test von einzelnen Kolonien. Anschließend wurde der Fosmid-Klon 6H7 (B-2517) der eine 32,901-bp-Insertion enthält, der Fosmid-Klon 6A2 (S-1022) der eine 40,749-bp-Insertion enthält, der Fosmid-Klon 18F1 (S-646) der eine 31,686-bp-Insertion enthält und der Fosmid-Klon 8G9 (MK-

23) identifiziert, der eine 39,446-bp-Insertion enthält. Durch eine Restriktionsanalyse und Endsequenzierung wurde bestätigt, dass die Fosmide 6H7, 6A2, 18F1 das jeweilige mutmaßliche „Epoxyketon“-Cluster enthalten und das Fosmid 8G9 das gesamte *tal*-Cluster enthält.

4.4.10 DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Die doppelsträngige Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden oder PCR-Produkten wurde durch das Didesoxynukleotid-Kettenabbruchverfahren auf einem automatischen LI-COR-Sequenzierer (Eurofins Genomics, Ebersberg) durchgeführt. Clone Manager Professional Suite Version 8 (Sci-Ed-Software) wurde für die Sequenzanalyse und Annotation verwendet. Datenbankvergleiche wurden in der GenBank-Datenbank unter Verwendung des BLAST-Programms durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997). Weitere *in silico*-Analysen wurden mit Hilfe von antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) (Medema *et al.*, 2011) und Artemis (Wellcome Trust Genome Campus; Cambridge, UK) durchgeführt.

4.4.11 Genomsequenzierung, Assemblierung und Annotation

Genomische DNA von *S. mozunensis* MK-23 wurde, wie von (Kieser *et al.*, 2000) beschrieben, isoliert und die DNA-Qualität wurde durch Gelelektrophorese bewertet. Die DNA-Menge wurde, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, durch ein fluoreszenzbasiertes Verfahren unter Verwendung des Quant-iT PicoGreen dsDNA-Kits (Invitrogen[®]) und des Tecan Infinite 200 Microplate Reader (Tecan Deutschland GmbH) geschätzt. Eine PCR-freie „Genom-Shotgun-Bibliothek“ (Nextera DNA Sample Prep Kit, Illumina) und eine zusätzliche 8K-Partnerpaar-Bibliothek (Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit, Illumina) wurde gemäß dem Herstellerprotokoll erstellt. Beide Sequenzierungsbibliotheken wurden auf einem Illumina MiSeq-System (2× 300 Basen) mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Kalinowski am Center for Biotechnology (CeBiTec) der Universität Bielefeld sequenziert. Bei der Sequenzierung und Verarbeitung der Rohdaten wurde eine „*de-novo*-Assembly“ mit der GS De Novo Assembler-Softwareversion 2.8 (Roche) mit Standardeinstellungen durchgeführt. Das *S. mozunensis* MK-23-„Draft-Genome“ von *S. mozunensis* besteht aus acht „Scaffolds“ mit einer Gesamtgröße von 8,744,153 bp und enthält 7708 Protein-kodierende Gene mit einem Gesamt-GC-Gehalt von 72,86%. Automatische Genvorhersagen und Annotation

kodierender Sequenzen auf dem „Draft-Genome“ von *S. mozunensis* MK-23 wurden in den Genom-Annotationssystemen Prokka v1.11 und GenDB 2.0. durchgeführt. Das „Draft-Genome“ wurde in NCBI/EMBL-EBI/DDJB hinterlegt und ist unter der Bioprojekt Nummer PRJEB30891 verfügbar.

4.5 BIOCHEMISCHE METHODEN

4.5.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:3 gemischt und 2 Minute bei 95 °C inkubiert. 4% und 12% Polyacrylamidgele wurden als Sammel- bzw. Trenngel verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit einer Arbeitsspannung von 100–160 V unter Verwendung der Mini-PROTEAN® II Elektrophoresezelle (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Proteinbanden wurden 1 bis 5 Minuten mit einer Fixierlösung fixiert, 15 bis 30 Minuten mit Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung gefärbt, mit Wasser gewaschen und 90 Minuten oder über Nacht mit Bleichmittellösung gebleicht. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde das Low Molecular Weight Calibration Kit für die SDS-Gelelektrophorese (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet.

4.5.2 Heterologe Überexpression und Reinigung von rekombinantem Protein aus *E. coli*

Die heterologe Überproduktion und Reinigung von 8× His-markierten Proteinen aus *E. coli* wurde unter Verwendung des Expressionsvektors pHis8 und *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS (Invitrogen®) als rekombinantem Wirtstamm durchgeführt.

Klonierung, Expression und Reinigung von talC/TalC und talE/TalE

talC und *talE* wurden, wie in (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, unter Verwendung der jeweiligen Primerpaare his_ talC_FP/RP und his_ talE_FP/RP aus der gDNA von *S. mozunensis* MK-23 amplifiziert (siehe Tabelle 4.9). Ein 1,2 kb und ein 2,1 kb PCR-Produkt wurden jeweils in den pHis8-Klonierungsvektor (Merck, Darmstadt) (Jez *et al.*,

2000) kloniert, wobei die *Bam*HI/*Xho*I- und *Eco*RI/*Xho*I-Restriktionsstellen verwendet wurden. Anschließend wurden die resultierenden Plasmid pAB01 und pAB02 durch Sequenzierung verifiziert. Einzelkolonien von *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS, die das entsprechende Plasmid enthielten, wurden jeweils in 5 mL LB-Medium inokuliert und bei 180 rpm und 37 °C über Nacht kultiviert. 100 mL TB-Medium (ergänzt mit den entsprechenden Antibiotika) wurden mit 5 mL jeder Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ungefähr 0,6 gezüchtet. Die Expression der rekombinanten Proteine wurden durch Zugabe einer Endkonzentration von 500 mM Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) induziert und die Kulturen wurden über Nacht bei 20 °C und 220 rpm weiter kultiviert. Nach weiteren 10 Stunden Kultivierung bei 20 °C wurden die Zellen geerntet und in 4 mL Lysepuffer (ergänzt mit 0,5 mg/mL Lysozym) suspendiert. Die Zellyse wurde durch Ultraschallbehandlung (Branson, Danbury, CT; Ultraschall-Desintegrator eingestellt auf: Ampere 30%, 1 °C, Puls 5 s/5 s Ruhezeit) für 10 Minuten bei 4 °C erreicht. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden durch Zentrifugation (55,000×g, 45 min, 4 °C) getrennt. Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde das lösliche Lysat einer Affinitätschromatographie unter Verwendung von Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agaroseharz (Qiagen, Hilden) unterzogen. Infolgedessen wurde das lösliche Lysat auf eine Ni-NTA-Agarose-Affinitätssäule geladen und zweimal mit 4 mL Waschpuffer gewaschen. Rekombinantes Protein wurde mit 2 mL Elutionspuffer von der Säule eluiert. Eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurde, wie unter Abschnitt 4.5.1 beschrieben, durchgeführt. Die endgültige Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm an einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer. Die zur Berechnung der Proteinkonzentration benötigten Extinktionskoeffizienten wurden anhand der AS-Sequenz des entsprechenden Proteins über das ProtParam-Tool des ExPASy Bioinformatics Resource Portals (Swiss Institute of Bioinformatics) ermittelt. Die Löslichkeit von His-TalE führte zu einer Ausbeute von 2,71 mg gereinigtem Protein pro Liter Kultur. Das Protein wurde bei -20 °C gelagert. His-TalC konnte, unter verschiedenen Bedingungen, nicht als lösliches Protein erhalten werden (siehe Anhang Abbildung 7.1 und 7.2).

4.5.3 Produktion von zellfreien Proteinextrakten

Die Produktion von TalC/TalE-haltigen, zellfreien Extrakten wurde, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, durch Inokulieren und Kultivieren von 10 µL Sporensuspension von *Streptomyces* sp. MK730-62F2 (Δ *talC*/ Δ *talE*-Mutanten) in 50 mL TSB-Medium, mit

geeigneten Antibiotika für 2 Tage bei 30 °C und 200 rpm erreicht. 1 mL der Vorkulturen wurde auf 100 mL Produktionsmedium (P-Medium) überführt und für 3 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Kulturen auf Eis gehalten, durch Zentrifugation (5,000×g, 10 min, 4 °C) geerntet und in 2,5 mL pro Gramm Zellen in Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5) ergänzt mit 1 mg/mL Lysozym suspendiert. Die Zellen wurden, wie unter Abschnitt 4.5.2 beschrieben, durch Ultraschall zerstört. Die zellfreien Proteinextrakte wurden bei -20 °C gelagert, bis sie für weitere Enzymtests verwendet wurden.

4.5.4 Enzymassay von TalE und TalC

Der Standard-TalE-Enzymassay enthielt 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5), 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP, 2,5 mM Dipeptid L-Leu-L-Trp und 10 µM TalE in insgesamt 50 µL Reaktionsvolumen. Der Assay wurde, wie von (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, 2 Stunden bei 30 °C durchgeführt und durch Zugabe von 100 µL Methanol gestoppt. Für den TalC-Enzymassay wurden 5 mM dTDP-L-Rhamnose (Carbosynth, Berkshire) und ein TalC-enthaltender zellfreier Extrakt (~100–200 µL) nach 2 Stunden zu einem laufenden TalE-Assay gegeben und weitere 16 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Die Reaktion wurde bei -20 °C aufbewahrt, bis sie einer HPLC-, LC-MS-, MS/MS- und HR-MS-Analyse, NMR oder Reinigung unterzogen wurde. Negative Kontrollen enthielten kein ATP, Enzym (TalE), dTDP-L-Rhamnose oder TalC (Proteinextrakt der $\Delta talC$ -Mutante).

Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit

Für die Reaktion mit dem Dipeptid L-Leu-L-Trp als Akzeptorsubstrat enthielt ein TalE-Assay von 500 µl, 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5), 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP, 2,5 mM Dipeptid L-Leu-L-Trp und 10 µM TalE. Die Umwandlung von Edukt Leu-Trp zu Produkt P-Leu-Trp wurde alle 5 bis 10 Minuten über 4 Stunden Inkubation bei einer Temperatur von 30 °C gemessen und durch Zugabe von 100 µL Methanol gestoppt.

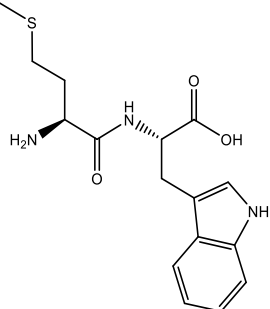
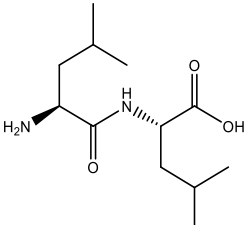
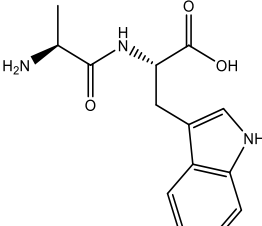
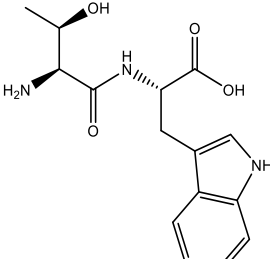
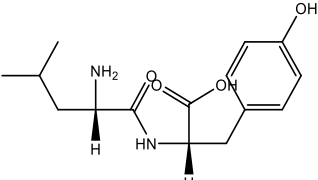
Phosphorylierung von synthetischen Vorläufer-Analoga

Verschiedene Analoga potenzieller Vorläufer für die Herstellung von Produkt-Derivaten des P-Leu-Trp wurden von Sigma-Aldrich (Haverhill, Suffolk, Großbritannien)

MATERIAL UND METHODEN

synthetisiert. Die unterschiedlichen Dipeptide wurden zum Testen als Substrate von TalE verwendet. Um die einfache Phosphorylierung eines Amins durch TalE zu untersuchen, wurden die Strukturanaloga 1 bis 5 in einer Endkonzentration von 2,5 mM zu dem Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5), 5 mM Mg²⁺, 1 mM ATP), der 10 µM TalE enthielt, gegeben. Die Assays wurden nach 2 Stunden durch Zugabe von 1 Volumen Methanol vor der LC-MS- und MS/MS-Analyse der Produktbildung gestoppt.

Tabelle 4.14 Synthetische Vorläufer-Analoga, synthetisiert von Sigma-Aldrich, Haverhill, Suffolk, Großbritannien.

 <p>Chemical structure of L-Met-L-Trp: A dipeptide consisting of L-methionine (left) and L-tryptophan (right) linked by a peptide bond. The methionine side chain is a 2-(methylsulfanyl)ethyl group.</p>	 <p>Chemical structure of L-Leu-L-Leu: A dipeptide consisting of L-leucine (left) and L-leucine (right) linked by a peptide bond. The leucine side chain is an isobutyl group.</p>
<p>Vorläufer-Analoga 1: L-Met-L-Trp Exakte Masse: 335,13</p>	<p>Vorläufer-Analoga 2: L-Leu-L-Leu Exakte Masse: 244,18</p>
 <p>Chemical structure of L-Ala-L-Trp: A dipeptide consisting of L-alanine (left) and L-tryptophan (right) linked by a peptide bond. The alanine side chain is a methyl group.</p>	 <p>Chemical structure of L-Thr-L-Trp: A dipeptide consisting of L-threonine (left) and L-tryptophan (right) linked by a peptide bond. The threonine side chain is a 1-hydroxyethyl group.</p>
<p>Vorläufer-Analoga 3: L-Ala-L-Trp Exakte Masse: 275,13</p>	<p>Vorläufer-Analoga 4: L-Thr-L-Trp Exakte Masse: 305,14</p>
 <p>Chemical structure of L-Leu-L-Tyr: A dipeptide consisting of L-leucine (left) and L-tyrosine (right) linked by a peptide bond. The tyrosine side chain is a 4-hydroxyphenylethyl group.</p>	
<p>Vorläufer-Analoga 5: L-Leu-L-Tyr Exakte Masse: 294,16</p>	

4.5.5 Biologische Aktivitätstests

Angelehnt an (Nett *et al.*, 2009) wurden, zusammen mit Dr. Nicole Staudt (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen), in einem Proteasom-Inhibitionstest Reihenverdünnungen jedes Inhibitors, (Zellkulturextrakte der Wildtypen *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646, sowie jeweils 2× der Mutantenstämmen *S. albus* J1074/epnAB10(1,2), *S. albus* J1074/epnAB11(1,2), *S. albus* J1074/epnAB12(1,2), *S. albus* J1074/epnAB13(1,2), *S. albus* J1074/epnAB14(1,2) und *S. albus* J1074/epnAB06(1,2)) in 100 µl DMSO gelöst, zu 0,5 nM *Saccharomyces cerevisiae* 20S-Proteasom (750 kDa; Enzo Life Sciences, Lörrach) in einen Assaypuffer (20 mM HEPES-Puffer, 0,5 mM EDTA, 0,035% (w/v) SDS (pH = 8,0)) gegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert. Die 96-Well-Platte wurde auf Eis gelegt und das Substrat Suc-LLVY-AMC (Bachem AG, Bubendorf, Schweiz) wurde bis zu einer Endkonzentration von 50 µM zugegeben. Die Assays (50 µL Gesamtvolumen) wurden jeweils in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Die Platten wurden im Dunkeln 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und dann erneut auf Eis gestellt. Die Proteasomaktivitäten wurden durch Ablesen der Fluoreszenz des gespaltenen Substrats bei 360 nm (Anregung) und 465 nm (Emission) bei 37 °C unter Verwendung des TECAN-Plattenlesegerät (infinite F200 Pro) gemessen und anschließend mit der Graphpad Prism 7[®] Software ein Balkendiagramm entworfen. Dabei wurden die gemessenen Fluoreszenzeinheiten der Substratkontrolle von denen der anderen Messungen subtrahiert, um eine Basislinie zu erhalten und eine lineare Steigung des Fluoreszenzanstiegs in den ersten 30 Minuten bestimmt. IC₅₀-Werte (Verbindungskonzentration, bei der 50% der maximalen relativen Aktivität inhibiert sind) wurden in unserem Fall bisher nicht weiter berechnet. Kontrollen enthielten DMSO + Proteasom + Substrat, Produktionsmedien (R5-Medium und Eponemycin-Medium), sowie *S. albus* J1074-Wildtyp ohne Inhibitor.

4.6 KONSTRUKTION VON *STREPTOMYCES*-MUTANTENSTÄMMEN

4.6.1 RED/ET-vermittelte Rekombination

Die RED/ET-vermittelte Rekombination wurde genutzt um *in vivo*, lineare DNA-Fragmente in ringförmige Zielvektoren zu integrieren (Gust *et al.*, 2003; Gust *et al.*, 2004). Die linearen DNA-Fragmente benötigten für die homologe Rekombination mindestens 39 bp lange, zur Zielregion des Vektors homologe Abschnitte. Diese Abschnitte wurden in der Regel in einer PCR-Reaktion mit überhängenden Primern nach Vorschrift von 4.4.6 eingeführt (Verlängerung der Resistenzkassette aus pIJ773 und pMS80).

Für die RED/ET-vermittelte Rekombination wurden *E. coli* BW25113/pKD46-Zellen mit epnAB01–03 (Zielvektoren) und talMB01 (Zielvektor) transformiert. Übernachtskulturen dieser *E. coli* BW25113-Stämme wurden in 10 mL SOB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika überführt. Zur Induktion der λ -RED-Gene wurden 100 μ L einer 1 M Arabinoselösung zugegeben (Endkonzentration 10 μ M) und die Zellen wurden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4,000×g, 10 min, 4 °C), zweimal mit 10 mL eiskaltem 10% (v/v) Glycerin gewaschen und in 100 μ L eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Etwa 100 ng des gewünschten linearen DNA-Fragments wurden durch Elektroporation nach Vorschrift von 4.4.7 in die kompetenten *E. coli* BW25113/pKD46 mit Zielvektor eingebracht. Positive Klone wurden mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C selektioniert. Da zu diesem Zeitpunkt Wildtyp-Fosmid und mutiertes Fosmid parallel in einer Zelle vorliegen wurde die isolierte Fosmid-DNA erneut in *E. coli* EPI300TM transformiert und reisoliert. Die erfolgreich durchgeführte Rekombination wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bewahrt.

4.6.2 Entfernen der Resistenzkassetten durch die Flippase

Bei den epnAB01-, epnAB03- und talMB01-Derivaten mit integrierter Resistenzkassette aus pIJ773 (epnAB04, epnAB05, epnAB07–09 und talAB01–05) wurden die von den FRT-Sequenzen eingeschlossenen Abschnitte nach der Rekombination durch eine Flippase entfernt (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Dazu wurde *E. coli* BT340 mit einem der oben genannten Derivate transformiert und für 2 Tage bei 30 °C auf LB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Einzelklone wurden gepickt,

durch einen Verdünnungsausstrich auf neuen LB-Selektionsplatten weiter vereinzelt und über Nacht (16–18 h) bei 42 °C inkubiert (temperaturabhängige Expression der Flippase). Bei Apramycin-sensitiven Klonen wurde das Entfernen der Resistenzkassette aus pIJ773 durch Restriktionsanalyse, PCR und Sequenzierung weiter bestätigt (siehe Tabelle 4.9).

4.6.3 Erzeugung einzelner Gendelektionen auf epnAB01 und epnAB03

Deletionsmutanten für die Gene *b-2517A–B*, *b-2517B*, *s-646A–B*, *s-646B* und *s-646M* wurden entsprechend der Erzeugung der Mutanten zum Nachweis der Clustergrenzen, wie in Abschnitt 4.6.1 und 4.6.2 beschrieben, erzeugt. Primerpaare $\Delta b-2517A-B_FP/ RP$, $\Delta b-2517B_FP/ RP$, $\Delta s-646A-B_FP/ RP$, $\Delta s-646B_FP/ RP$ und $\Delta s-646M_FP/ RP$ (siehe Tabelle 4.9) wurden verwendet, um die Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 zu amplifizieren. Die resultierenden Mutanten wurden als *S. albus* J1074/epnAB10(1–3), *S. albus* J1074/epnAB11(1–3), *S. albus* J1074/epnAB12(1–3), *S. albus* J1074/epnAB13(1–3) und *S. albus* J1074/epnAB14(1–3) bezeichnet.

4.6.4 Einbringen des induzierbaren *tcp*₈₃₀-Promotors in epnAB02

Die induzierbare *tcp*₈₃₀-Promotor-Resistenzkassette [*aac(3)/IV*] wurde aus dem pMS80-Plasmid (Rodriguez-Garcia *et al.*, 2005) mit dem Primerpaar *s-1022 vorE tcp*₈₃₀_FP/ RP (siehe Tabelle 4.9) zur Expression des *s-1022*-Genclusters amplifiziert. Die benötigte Resistenzkassette wurde über eine durch RED/ET-vermittelte Rekombination (Gust *et al.*, 2003) vor das *s-1022E*-Gen in epnAB02 inseriert (siehe Abschnitt 4.6.1). Die resultierenden Mutanten wurden als *S. albus* J1074/epnAB06(1–3) bezeichnet.

4.6.5 Geninaktivierung zur Bestimmung der Grenzen des Talopeptin-Genclusters in *S. mozunensis* MK-23

Für die Gendelektionsstudien wurde ein PCR-Targeting-System eingesetzt (Gust *et al.*, 2003). Eine Apramycin-Resistenzkassette [*aac(3)/IV*] wurde, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, aus dem Plasmid pIJ773 mit dem Primerpaar $\Delta orf-7-orf-1_FP/ RP$ zur Inaktivierung der Gene *orf-7–orf-1*, mit dem Primerpaar $\Delta talC_FP/ RP$ für die Inaktivierung von *talC*, mit dem Primerpaar $\Delta talD_FP/ RP$ für die Inaktivierung von *talD*,

mit dem Primerpaar $\Delta talE_FP/RP$ für die Inaktivierung von *talE* und mit dem Primerpaar $\Delta orf+1-orf12_FP/RP$ für die Inaktivierung der Gene *orf+1-orf+12* amplifiziert (siehe Tabelle 4.9). Die ORFs und Gene wurden jeweils in *E. coli* BW25113/pKD46/talMB01 transferiert. Die Gene *orf-7-orf-1*, *talC*, *talD*, *talE* und *orf+1-orf+12* wurden mit Hilfe von λ -RED-vermittelter Rekombination einzeln durch die Apramycin-Resistenzkassetten ersetzt (Datsenko and Wanner, 2000). Die resultierenden mutierten Fosmide talAB01, talAB02, talAB03, talAB04 und talAB05 wurden durch Restriktionsanalyse bestätigt. Um genau zugeschnittene *in frame*-Deletionen zu erzeugen, wurden die Resistenzkassetten in *E. coli* BT340 entfernt, wobei die flankierende FLP/FRT-Erkennungsstelle genutzt wurden (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Positive Fosmide wurden auf ihre Apramycin-Empfindlichkeit überprüft und durch Restriktionsanalyse, PCR und Sequenzierung von PCR-Produkten verifiziert (siehe Tabelle 4.9). Die Fosmide wurden wie unter Abschnitt 4.4.8 in *E. coli* ET12567 (MacNeil, 1988) übertragen und anschließend in *Streptomyces* sp. MK730-62F2 durch intergenerische triparentale Konjugation mit Hilfe von *E. coli* ET12567/pUB307 eingeführt. Von den resultierenden Mutantenstämmen *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB09(1–3), *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB10(1–3), *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB11(1–3), *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB12(1–3) und *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talAB13(1–3), wurden jeweils drei Klone pro Knockout weiter durch PCR verifiziert und durch LC-MS- und MS/MS analysiert.

4.6.6 Heterologe Expression der putativen „Epoxyketon“-Gencluster und des Talopeptin-Genclusters

Um eine stabile chromosomale Integration zu ermöglichen, wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen *cat* aus den Fosmiden 6H7, 6A2, 18F1 und 8G9, mittels λ -RED-vermittelter Rekombination, durch eine Integrationskassette (*int_neo*) ersetzt (Kaysser *et al.*, 2012). Die *int_neo*-Kassette enthält eine Bindungsstelle (*attP*), das Integrasegen (*int*) des Phagen Φ C31, ein Kanamycin-Resistenzgen (*neo*) und ein Transferursprung (*oriT*), um eine ortsspezifische Integration in die meisten *Streptomyces*-Chromosomen zu ermöglichen (Bierman *et al.*, 1992; Schorn *et al.*, 2014). Die Kassette wurde als ein *Xba*I-Restriktionsfragment aus merLK01, wie zuvor beschrieben wurde (Kaysser *et al.*, 2012), erhalten. Die resultierenden Fosmide epnAB01–03 und talMB01 wurden durch Restriktionsanalyse verifiziert und in *E. coli* ET12567 (MacNeil, 1988) transferiert. Die Einführung der Fosmide epnAB01–03 in *S. albus* J1074 und die Einführung des

Fosmids talMB01 in *Streptomyces* sp. MK730-62F2 wurde, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, durch intergenerische triparentale Konjugation mit Hilfe von *E. coli* ET12567/pUB307 erreicht (Flett *et al.*, 1997). Kanamycinresistente Exkonjuganten wurden ausgewählt, durch PCR bestätigt und als *S. albus* J1074/epnAB01(1–3), *S. albus* J1074/epnAB02(1–3), *S. albus* J1074/epnAB03(1–3) und *Streptomyces* sp. MK730-62F2/talMB01(1–3) gekennzeichnet. Die Kulturen wurden, wie unter den Abschnitten 4.7.2, 4.7.3 und 4.7.4 beschrieben, mittels LC-MS- und MS/MS-Analyse, sowie HR-MS untersucht.

4.6.7 Einführung von Zuckerplasmiden in *Streptomyces*-Mutantenstämme

Das Plasmid pRHAM (Rodriguez *et al.*, 2000), das alle erforderlichen Gene für die Biosynthese von dTDP-L-Rhamnose *oleS*, *oleE*, *oleL* und *oleU* aus *S. antibioticus* ATCC 1891 enthielt, wurde uns freundlicherweise von dem Biotechnologieunternehmen Entrechem (Oviedo, Spanien) zur Verfügung gestellt. pRHAM wurde in den nichtmethylierenden *E. coli* ET12567-Stamm (MacNeil, 1988) eingeführt und erneut isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde für die PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation mit *S. coelicolor* M512/talMB01 zur Herstellung intakter Phosphoramidone verwendet. Thiostrepton-Resistenzmutanten wurden ausgewählt und als *S. coelicolor* M512/talMB01/pRHAM(1–3) bezeichnet. Zudem wurden weiterer Zuckerplasmide (pLN2, pLNBIV, pLNRHO und pFL947 (Entrechem)), die für die Expression von Genen für die Biosynthese anderer Desoxyzucker verantwortlich sind, in den heterologen Wirt *S. coelicolor* M512/talMB01 eingeführt.

4.7 ANALYTISCHE METHODEN

4.7.1 Extraktion

S. pyridomyceticus NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 (Wildtypen und Mutanten) wurden in einem Produktionsmedium, wie unter Abschnitt 4.3.2 beschrieben, kultiviert. Dabei wurde 50 mL Zellkultur zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurden durch Zentrifugation getrennt (4,000×g, 10 min, 4 °C). Die obere organische Phase wurde abgenommen und das Ethylacetat unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer

verdampft. Die getrockneten Extrakte wurden entweder bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für die LC-MS- und MS/MS-Analyse in 1 mL MeOH (100%) gelöst.

S. mozunensis MK-23 und *Streptomyces* sp. MK730-62F2 oder Derivate davon wurden in einem Produktionsmedium, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, kultiviert. 50 mL Gesamtzellkultur wurden, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und anschließend einmal mit gleichen Volumen Butanol extrahiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (4,000×g, 10 min, 4 °C). Die organische Phase wurde isoliert und unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer eingedampft. Die resultierenden Rohextrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt oder direkt in 1 mL MeOH (100%) gelöst und dann einer LC-MS- und MS/MS-Analyse unterzogen.

4.7.2 HPLC-Analyse

Zur Isolierung von Produkt P-Leu-Trp wurde ein Enzymassay mit TalE, wie unter Abschnitt 4.5.4 beschrieben, auf ein Gesamtvolumen von 10 mL hochskaliert. Für die Messungen wurde, wie in (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, ein Agilent 1100 HPLC-System (Agilent 1100-Serie; Agilent Technology's) verwendet, das mit einer Umkehrphasen-HPLC-Säule (Phenomenex Kinetex 5 μ XB-C18 100 Å, 150×4,6 mm) ausgestattet war. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einer Flussrate von 1 mL/min und einem linearen Gradienten von t_0 = 10% Lösungsmittel B bis t_7 = 100% Lösungsmittel B. Lösungsmittel B entsprach Acetonitril mit 0,06% Ameisensäure und Lösungsmittel A Wasser mit 0,1% Ameisensäure. Für weitere Analysen wurde P-Leu-Trp nach 4,9 Minuten eluiert, gesammelt und unter vermindertem Druck getrocknet.

4.7.3 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse

Die LC-MS- und die LC-MS/MS-Messungen wurden von Andreas Kulik (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, Universität Tübingen) durchgeführt.

Die Auftrennung der Kulturextrakte von *S. pyridomyceticus* NRRL B-2517, *Streptomyces* sp. NRRL S-1022 und *Streptomyces* sp. NRRL S-646 (Wildtypen und Mutanten), sowie die Analyse der Kulturextrakte von *S. mozunensis* MK-23 und *Streptomyces* sp. MK730-62F2 (Wildtypen und Mutanten) erfolgte mit Hilfe einer HPLC-Säule (Nucleosil

100 C18, 3 μm , 100 \times 2 mm; Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch), gekoppelt mit einer 10 \times 2 mm Vorsäule bei einer Flussrate von 0,4 mL/min und einem linearen Gradienten von $t_0 = 0\%$ Lösungsmittel B (Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0,6% Ameisensäure; Lösungsmittel A: Wasser mit 0,1% Ameisensäure) bis $t_{15} = 100\%$ Lösungsmittel B. Die HPLC wurde an ein Massenspektrometer mit einer Elektrospray-Ionisationsschnittstelle (ESI) (LC/MSD-Ultra-Trap-System XCT 6330 der Agilent 1200 Serie; Agilent Technology's) gekoppelt. Die MS-Analyse wurde mittels ESI (positive und negative Ionisation) im Ultra Scan-Modus mit einer Kapillarspannung von 3,5 kV und einer Trocknungsgastemperatur von 350 °C durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde ein Phosphoramidon-SD (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Die Datenauswertung erfolgte in eigener Arbeit mit Hilfe der Agilent 6300 Series Ion Trap LC-MS Software 6.1.

Die Isolierung von P-Leu-Trp wurde, wie von (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, an einer Umkehrphasen-HPLC-Säule (Agilent Eclipse Plus C18, 3,5 μm , 2,1 \times 150 mm) durch Elution mit linearem Gradienten aus $t_0 = 0\%$ Lösungsmittel B (Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0,6% Ameisensäure; Lösungsmittel A: Wasser mit 0,1% Ameisensäure) bis $t_{15} = 100\%$ Lösungsmittel B und bei einer Flussrate von 0,4 mL/min durchgeführt. MS-Daten wurden im negativen und positiven Modus erfasst.

4.7.4 HR-MS-Analyse

Hochauflösende Massenspektrometrien wurden mit Hilfe von Dr. Dorothee Wistuba (Institut für Chemie, Universität Tübingen) auf einem HR-ESI-TOF-MS maXis 4G-Massenspektrometer (BRUKER DALTONIK GmbH, Bremen) aufgenommen. Die Erfassungsparameter für die negative Ionenpolarität waren eine Kapillarspannung von 4000–4500 V und ein Endplattenversatz von -500 V. Der Zerstäubendruck wurde auf 1,2 bar und der Trockengasfluss auf 6,0 L/min bei einer Trockenheittemperatur von 200 °C eingestellt. Die Kalibrierung des Systems wurde mit Natriumformiat als Referenz durchgeführt. Mit Hilfe der SmartFormula-Funktion von DataAnalysis 4.2 (BRUKER DALTONIK GmbH, Bremen) konnte die Molekülformeln aus monoisotopischen Massen berechnet werden.

4.7.5 NMR-Messung

Methoden zur NMR-Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Irina Helmle und Prof. Dr. Harald Groß (Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) entwickelt. 1D- und 2D-NMR-Spektren wurden, wie unter (Baulig *et al.*, 2019) beschrieben, mit einem Avance III HD 400 MHz NMR-Spektrometer (^1H , 400 MHz; ^{13}C , ^{15}N , 101 MHz; ^{31}P , 162 MHz) (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) aufgenommen. NMR-Spektren wurden in DMSO- d_6 bei 293 K gemessen und auf verbleibende Lösungsmittelsignale (DMSO- d_6 , $\delta_{\text{H}} = 2,50$ und $\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm) oder den vom Gerätehersteller (Bruker) zugewiesenen internen Offset für ^{15}N und ^{31}P bezogen. NMR-Lösungsmittel wurden von Sigma-Aldrich erhalten.

4.7.6 „MS Molecular Networking“

Zur Konstruktion molekularer Netzwerke wurden, mit Hilfe von Dr. Florian Zubeil (Institut für organische Chemie, Universität Tübingen), MS/MS-Spektren aus Extrakten von *S. albus* J1074 mit und ohne die jeweiligen putativen „Epoxyketon“-Gencluster und *S. albus* J1074/epnLK01 (Eponemycin-Gencluster) aufgezeichnet und unter Verwendung von MS-Cluster geclustert (Frank *et al.*, 2008). Cluster-Konsensus-Spektren wurden, wie von Watrous *et al.* beschrieben, weiter verarbeitet (Watrous *et al.*, 2012). Jedes Spektrum umfasste die 10 höchsten Kosinusausrichtungen in beiden Richtungen. Um das MS/MS-Netzwerk zu definieren, wurden paarweise Ausrichtungen mit Kosinus $\geq 0,55$ und ≥ 6 übereinstimmenden Peaks berücksichtigt. Benutzerdefinierte Skripte und die Attribute zum molekularen Netzwerk wurden, wie unter (Watrous *et al.*, 2012) beschrieben, hinzugefügt. Die MS-Netzwerke wurden mit Cytoscape 2.8.3 visualisiert (Smoot *et al.*, 2011).

5 LITERATURVERZEICHNIS

(1994). "Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992." European Journal of Biochemistry **223**(1): 1-5.

Adams, J. (2002). "Proteasome inhibitors as new anticancer drugs." Curr Opin Oncol **14**(6): 628-634.

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A. A., Dick, L. R., Grenier, L., Klunder, J. M., Ma, Y. T., Plamondon, L. and Stein, R. L. (1998). "Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids." Bioorg Med Chem Lett **8**(4): 333-338.

Aguilera, S., Lopez-Lopez, K., Nieto, Y., Garciduenas-Pina, R., Hernandez-Guzman, G., Hernandez-Flores, J. L., Murillo, J. and Alvarez-Morales, A. (2007). "Functional characterization of the gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin." J Bacteriol **189**(7): 2834-2843.

Aharonowitz, Y., Cohen, G. and Martin, J. F. (1992). "Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution." Annu Rev Microbiol **46**: 461-495.

Alduina, R., De Grazia, S., Dolce, L., Salerno, P., Sosio, M., Donadio, S. and Puglia, A. M. (2003). "Artificial chromosome libraries of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Planobispora rosea*." FEMS Microbiol Lett **218**(1): 181-186.

Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S. N., Sadiq, A. and Adnan, M. (2016). "Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan." Extremophiles **20**(4): 395-402.

Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E. and Stephanopoulos, G. (2005). "Tuning genetic control through promoter engineering." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(36): 12678-12683.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic acids research **25**(17): 3389-3402.

Anderson, B., Weigel, N., Kundig, W. and Roseman, S. (1971). "Sugar transport. 3. Purification and properties of a phosphocarrier protein (HPr) of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Escherichia coli*." J Biol Chem **246**(22): 7023-7033.

Arendt, C. S. and Hochstrasser, M. (1999). "Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly." The EMBO journal **18**(13): 3575-3585.

Argos, P. (1987). "A sensitive procedure to compare amino acid sequences." Journal of Molecular Biology **193**(2): 385-396.

Argyriou, A. A., Iconomou, G. and Kalofonos, H. P. (2008). "Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature." Blood **112**(5): 1593-1599.

LITERATURVERZEICHNIS

- Arias, C. A. and Murray, B. E. (2009).** "Antibiotic-resistant bugs in the 21st century--a clinical super-challenge." N Engl J Med **360**(5): 439-443.
- Arias, P., Fernandez-Moreno, M. A. and Malpartida, F. (1999).** "Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein." J Bacteriol **181**(22): 6958-6968.
- Asai, A., Hasegawa, A., Ochiai, K., Yamashita, Y. and Mizukami, T. (2000).** "Belactosin A, a novel antitumor antibiotic acting on cyclin/CDK mediated cell cycle regulation, produced by *Streptomyces* sp." J Antibiot (Tokyo) **53**(1): 81-83.
- Attwood, P. V. and Wieland, T. (2015).** "Nucleoside diphosphate kinase as protein histidine kinase." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **388**(2): 153-160.
- Badgujar, S. and Mahajan, R. (2010).** "Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review." Journal of Pharmacy Research **3**: 2048.
- Baltz, R. (2007).** "Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future." Microbe **2**: 125-131.
- Bandeira, N., Tsur, D., Frank, A. and Pevzner, P. A. (2007).** "Protein identification by spectral networks analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6140-6145.
- Baricos, W. H. and Shah, S. V. (1991).** "Proteolytic enzymes as mediators of glomerular injury." Kidney Int **40**(2): 161-173.
- Barrett, A. J. (1987).** "The cystatins: a new class of peptidase inhibitors." Trends in Biochemical Sciences **12**: 193-196.
- Barrett, A. J. (1994).** [1] Classification of peptidases. Methods in Enzymology, Academic Press. **244**: 1-15.
- Barrett, A. J. and McDonald, J. K. (1986).** "Nomenclature: protease, proteinase and peptidase." The Biochemical journal **237**(3): 935-935.
- Bauer, J. S., Fillinger, S., Forstner, K., Herbig, A., Jones, A. C., Flinspach, K., Sharma, C., Gross, H., Nieselt, K. and Apel, A. K. (2017).** "dRNA-seq transcriptional profiling of the FK506 biosynthetic gene cluster in *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 and general analysis of the transcriptome." RNA Biol **14**(11): 1617-1626.
- Baulig, A., Helmle, I., Bader, M., Wolf, F., Kulik, A., Al-Dilaimi, A., Wibberg, D., Kalinowski, J., Gross, H. and Kaysser, L. (2019).** "Biosynthetic reconstitution of deoxysugar phosphoramidate metalloprotease inhibitors using an N-P-bond-forming kinase." Chem Sci **10**(16): 4486-4490.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J. and Roelofs, J. (2010).** "Assembly, structure, and function of the 26S proteasome." Trends Cell Biol **20**(7): 391-401.
- Bentrude, W. G. and Tan, H.-W. (1973).** "Conformations of saturated cyclic phosphorus heterocycles. II. 5-tert-Butyl-2-amino-1,3,2-dioxaphosphorinanes. Apparent effects of phosphorus-nitrogen vicinal interactions on the conformational energy of amino groups on trivalent phosphorus and the influence of lone pair orientation on ³¹P NMR." Journal of the American Chemical Society **95**(14): 4666-4675.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bibb, M. J., Findlay, P. R. and Johnson, M. W. (1984).** "The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences." Gene **30**(1-3): 157-166.
- Bierbaum, G. and Sahl, H. G. (2009).** "Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering." Curr Pharm Biotechnol **10**(1): 2-18.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N. and Schoner, B. E. (1992).** "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." Gene **116**(1): 43-49.
- Blanco, G., Patallo, E. P., Brana, A. F., Trefzer, A., Bechthold, A., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J. A. (2001).** "Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin." Chem Biol **8**(3): 253-263.
- Bode, H. B., Bethe, B., Hofs, R. and Zeeck, A. (2002).** "Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity." Chembiochem **3**(7): 619-627.
- Bozhuyuk, K. A. J., Fleischhacker, F., Linck, A., Wesche, F., Tietze, A., Niesert, C. P. and Bode, H. B. (2018).** "De novo design and engineering of non-ribosomal peptide synthetases." Nat Chem **10**(3): 275-281.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. and Hobman, J. L. (2003).** "The MerR family of transcriptional regulators." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 145-163.
- Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P. and Kucherov, G. (2008).** "NORINE: a database of nonribosomal peptides." Nucleic acids research **36**(Database issue): D326-D331.
- Castro-Falcon, G., Hahn, D., Reimer, D. and Hughes, C. C. (2016).** "Thiol Probes To Detect Electrophilic Natural Products Based on Their Mechanism of Action." ACS Chem Biol **11**(8): 2328-2336.
- Challis, G. L., Ravel, J. and Townsend, C. A. (2000).** "Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains." Chem Biol **7**(3): 211-224.
- Chater, K. F. and Wilde, L. C. (1980).** "Streptomyces albus G mutants defective in the SalGI restriction-modification system." J Gen Microbiol **116**(2): 323-334.
- Cheek, S., Zhang, H. and Grishin, N. V. (2002).** "Sequence and structure classification of kinases." J Mol Biol **320**(4): 855-881.
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J. and Dou, Q. P. (2011).** "Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives." Curr Cancer Drug Targets **11**(3): 239-253.
- Chen, J. and Xie, J. (2011).** "Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators." J Cell Biochem **112**(10): 2694-2702.
- Chen, S., Huang, X., Zhou, X., Bai, L., He, J., Jeong, K. J., Lee, S. Y. and Deng, Z. (2003).** "Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex." Chem Biol **10**(11): 1065-1076.

Cherepanov, P. P. and Wackernagel, W. (1995). "Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant." Gene **158**(1): 9-14.

Chiang, Y. M., Chang, S. L., Oakley, B. R. and Wang, C. C. (2011). "Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms." Curr Opin Chem Biol **15**(1): 137-143.

Christeller, J. and Laing, W. (2005). "Plant serine proteinase inhibitors." Protein Pept Lett **12**(5): 439-447.

Christoffersen, R. E. (2006). "Antibiotics--an investment worth making?" Nat Biotechnol **24**(12): 1512-1514.

Ciupka, D. and Gohlke, H. (2017). "On the potential alternate binding change mechanism in a dimeric structure of Pyruvate Phosphate Dikinase." Scientific Reports **7**.

Clardy, J., Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2006). "New antibiotics from bacterial natural products." Nat Biotechnol **24**(12): 1541-1550.

Colman, P. M., Jansonius, J. N. and Matthews, B. W. (1972). "The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution." J Mol Biol **70**(3): 701-724.

Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. and Henrissat, B. (2003). "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." J Mol Biol **328**(2): 307-317.

Crimi, N., Polosa, R., Pulvirenti, G., Magri, S., Santonocito, G., Prosperini, G., Mastruzzo, C. and Mistretta, A. (1995). "Effect of an inhaled neutral endopeptidase inhibitor, phosphoramidon, on baseline airway calibre and bronchial responsiveness to bradykinin in asthma." Thorax **50**(5): 505-510.

Czesny, B., Goshu, S., Cook, J. L. and Williamson, K. C. (2009). "The proteasome inhibitor epoxomicin has potent Plasmodium falciparum gametocytocidal activity." Antimicrob Agents Chemother **53**(10): 4080-4085.

D. Voges, P. Zwickl, a. and Baumeister, W. (1999). "The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis." Annual Review of Biochemistry **68**(1): 1015-1068.

Dangel, V., Harle, J., Goerke, C., Wolz, C., Gust, B., Pernodet, J. L. and Heide, L. (2009). "Transcriptional regulation of the novobiocin biosynthetic gene cluster." Microbiology **155**(Pt 12): 4025-4035.

Dangel, V., Westrich, L., Smith, M. C., Heide, L. and Gust, B. (2010). "Use of an inducible promoter for antibiotic production in a heterologous host." Appl Microbiol Biotechnol **87**(1): 261-269.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.

Datta, I., Banerjee, M., Mukherjee, S. K. and Majumdar, S. K. (2001). "JU-2, a novel phosphorous-containing antifungal antibiotic from Streptomyces kanamyceticus M8." Indian J Exp Biol **39**(6): 604-606.

- Davis, J. H., Rubin, A. J. and Sauer, R. T. (2011).** "Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters." Nucleic acids research **39**(3): 1131-1141.
- Dawlaty, J., Zhang, X., Fischbach, M. A. and Clardy, J. (2010).** "Dapdiamides, tripeptide antibiotics formed by unconventional amide ligases." J Nat Prod **73**(3): 441-446.
- Decker, H., Rohr, J., Motamedi, H., Zahner, H. and Hutchinson, C. R. (1995).** "Identification of *Streptomyces olivaceus* Tu 2353 genes involved in the production of the polyketide elloramycin." Gene **166**(1): 121-126.
- Demain, A. L. (2014).** "Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery." J Ind Microbiol Biotechnol **41**(2): 185-201.
- Demo, S. D., Kirk, C. J., Aujay, M. A., Buchholz, T. J., Dajee, M., Ho, M. N., Jiang, J., Laidig, G. J., Lewis, E. R., Parlati, F., Shenk, K. D., Smyth, M. S., Sun, C. M., Vallone, M. K., Woo, T. M., Molineaux, C. J. and Bennett, M. K. (2007).** "Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome." Cancer Res **67**(13): 6383-6391.
- DENG, Q. and ZHAO, C. (2017).** "Progress of nitrogen-phosphorus bond biosynthesis study of naturally occurring phosphoramidates." Chinese Science Bulletin **62**(0023-074X): 3525.
- Donahue, M. G. and Johnston, J. N. (2006).** "Preparation of a protected phosphoramidon precursor via an H-Phosphonate coupling strategy." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **16**(21): 5602-5604.
- Drexler, H. C. A. (1997).** "Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(3): 855-860.
- Dunbar, K. L. and Mitchell, D. A. (2013).** "Revealing Nature's Synthetic Potential Through the Study of Ribosomal Natural Product Biosynthesis." ACS Chemical Biology **8**(3): 473-487.
- Durr, C., Hoffmeister, D., Wohler, S. E., Ichinose, K., Weber, M., Von Mulert, U., Thorson, J. S. and Bechthold, A. (2004).** "The glycosyltransferase UrdGT2 catalyzes both C- and O-glycosidic sugar transfers." Angew Chem Int Ed Engl **43**(22): 2962-2965.
- Eckman, E. A., Reed, D. K. and Eckman, C. B. (2001).** "Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme." J Biol Chem **276**(27): 24540-24548.
- Edlund, B., Rask, L., Olsson, P., Wålinder, O., Zetterqvist, Ö. and Engström, L. (1969).** "Preparation of Crystalline Nucleoside Diphosphate Kinase from Baker's Yeast and Identification of 1-[³²P]Phosphohistidine as the Main Phosphorylated Product of an Alkaline Hydrolysate of Enzyme Incubated with Adenosine [³²P]Triphosphate." European Journal of Biochemistry **9**(4): 451-455.
- Elofsson, M., Splittgerber, U., Myung, J., Mohan, R. and Crews, C. M. (1999).** "Towards subunit-specific proteasome inhibitors: synthesis and evaluation of peptide alpha',beta'-epoxyketones." Chem Biol **6**(11): 811-822.
- Elshahawi, S. I., Shaaban, K. A., Kharel, M. K. and Thorson, J. S. (2015).** "A comprehensive review of glycosylated bacterial natural products." Chem Soc Rev **44**(21): 7591-7697.

LITERATURVERZEICHNIS

- Enenkel, C., Lehmann, H., Kipper, J., Guckel, R., Hilt, W. and Wolf, D. H. (1994).** "PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity." FEBS Lett **341**(2-3): 193-196.
- Ennor, A. H., Rosenberg, H. and Armstrong, M. D. (1955).** "Specificity of creatine phosphokinase." Nature **175**(4446): 120.
- Eustaquio, A. S., Gust, B., Galm, U., Li, S. M., Chater, K. F. and Heide, L. (2005).** "Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters." Appl Environ Microbiol **71**(5): 2452-2459.
- Eustaquio, A. S., Gust, B., Luft, T., Li, S. M., Chater, K. F. and Heide, L. (2003).** "Clorobiocin biosynthesis in Streptomyces: identification of the halogenase and generation of structural analogs." Chem Biol **10**(3): 279-288.
- Evans, H. J. and Wood, H. G. (1968).** "The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **61**(4): 1448-1453.
- Evers, S. and Courvalin, P. (1996).** "Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in Enterococcus faecalis V583." J Bacteriol **178**(5): 1302-1309.
- Evnin, L. B., Vásquez, J. R. and Craik, C. S. (1990).** "Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(17): 6659-6663.
- Falconer, S. B. and Brown, E. D. (2009).** "New screens and targets in antibacterial drug discovery." Curr Opin Microbiol **12**(5): 497-504.
- Fan, C., Moews, P. C., Shi, Y., Walsh, C. T. and Knox, J. R. (1995).** "A common fold for peptide synthetases cleaving ATP to ADP: glutathione synthetase and D-alanine:d-alanine ligase of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1172-1176.
- Fan, C., Moews, P. C., Walsh, C. T. and Knox, J. R. (1994).** "Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 Å resolution." Science **266**(5184): 439-443.
- Fawaz, M. V., Topper, M. E. and Firestine, S. M. (2011).** "The ATP-grasp enzymes." Bioorg Chem **39**(5-6): 185-191.
- Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. (2003).** "Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora." Angew Chem Int Ed Engl **42**(3): 355-357.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. and Schreiber, S. L. (1995).** "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." Science **268**(5211): 726-731.
- Finking, R. and Marahiel, M. A. (2004).** "Biosynthesis of nonribosomal peptides1." Annu Rev Microbiol **58**: 453-488.
- Finley, D. (2009).** "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annu Rev Biochem **78**: 477-513.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2006).** "Biochemistry. Directing biosynthesis." Science **314**(5799): 603-605.
- Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2009).** "Antibiotics for emerging pathogens." Science **325**(5944): 1089-1093.
- Flett, F., Mersinias, V. and Smith, C. P. (1997).** "High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes." 155(2): 223-229.
- Floriano, B. and Bibb, M. (1996).** "*afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **21**(2): 385-396.
- Frank, A. M., Bandeira, N., Shen, Z., Tanner, S., Briggs, S. P., Smith, R. D. and Pevzner, P. A. (2008).** "Clustering millions of tandem mass spectra." J Proteome Res **7**(1): 113-122.
- Frankland-Searby, S. and Bhaumik, S. R. (2012).** "The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1825**(1): 64-76.
- Freel Meyers, C. L. and Borch, R. F. (2000).** "Activation mechanisms of nucleoside phosphoramidate prodrugs." J Med Chem **43**(22): 4319-4327.
- Freeman, M. F., Gurgui, C., Helf, M. J., Morinaka, B. I., Uria, A. R., Oldham, N. J., Sahl, H. G., Matsunaga, S. and Piel, J. (2012).** "Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides." Science **338**(6105): 387-390.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. and Fasiolo, F. (2003).** "Ribosome assembly in eukaryotes." Gene **313**: 17-42.
- Fuhs, S. R. and Hunter, T. (2017).** "pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification." Current Opinion in Cell Biology **45**: 8-16.
- Gaisser, S., Carletti, I., Schell, U., Graupner, P. R., Sparks, T. C., Martin, C. J. and Wilkinson, B. (2009).** "Glycosylation engineering of spinosyn analogues containing an L-olivose moiety." Org Biomol Chem **7**(8): 1705-1708.
- Galperin, M. Y. and Koonin, E. V. (1997).** "A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity." Protein Sci **6**(12): 2639-2643.
- Gantt, R. W., Peltier-Pain, P. and Thorson, J. S. (2011).** "Enzymatic methods for glyco(diversification/randomization) of drugs and small molecules." Nat Prod Rep **28**(11): 1811-1853.
- Gao, J. T., Ju, K. S., Yu, X. M., Velasquez, J. E., Mukherjee, S., Lee, J., Zhao, C. M., Evans, B. S., Doroghazi, J. R., Metcalf, W. W. and van der Donk, W. A. (2014).** "Use of a Phosphonate Methyltransferase in the Identification of the Fosfazinomycin Biosynthetic Gene Cluster." Angewandte Chemie-International Edition **53**(5): 1334-1337.
- Gao, X., Haynes, S. W., Ames, B. D., Wang, P., Vien, L. P., Walsh, C. T. and Tang, Y. (2012).** "Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain." Nat Chem Biol **8**(10): 823-830.

Gardner, R. C., Assinder, S. J., Christie, G., Mason, G. G., Markwell, R., Wadsworth, H., McLaughlin, M., King, R., Chabot-Fletcher, M. C., Breton, J. J., Allsop, D. and Rivett, A. J. (2000). "Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells." The Biochemical journal **346 Pt 2(Pt 2):** 447-454.

Genin, E., Reboud-Ravaux, M. and Vidal, J. (2010). "Proteasome inhibitors: recent advances and new perspectives in medicinal chemistry." Curr Top Med Chem **10(3):** 232-256.

Gersch, M., Kreuzer, J. and Sieber, S. A. (2012). "Electrophilic natural products and their biological targets." Nat Prod Rep **29(6):** 659-682.

Ghisla, S. and Thorpe, C. (2004). "Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview." Eur J Biochem **271(3):** 494-508.

Gill, K. A., Berrue, F., Arens, J. C., Carr, G. and Kerr, R. G. (2015). "Cystargolides, 20S Proteasome Inhibitors Isolated from *Kitasatospora cystarginea*." J Nat Prod **78(4):** 822-826.

Glenn, R. J., Pemberton, A. J., Royle, H. J., Spackman, R. W., Smith, E., Jennifer Rivett, A. and Steverding, D. (2004). "Trypanocidal effect of alpha',beta'-epoxyketones indicates that trypanosomes are particularly sensitive to inhibitors of proteasome trypsin-like activity." Int J Antimicrob Agents **24(3):** 286-289.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). "A Subcomplex of the Proteasome Regulatory Particle Required for Ubiquitin-Conjugate Degradation and Related to the COP9-Signalosome and eIF3." Cell **94(5):** 615-623.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). "The Regulatory Particle of the *Saccharomyces cerevisiae* Proteasome." Molecular and Cellular Biology **18(6):** 3149-3162.

Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2011). "Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters." Microbial Biotechnology **4(2):** 207-215.

Gomez-Escribano, J. P. and Bibb, M. J. (2014). "Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways." J Ind Microbiol Biotechnol **41(2):** 425-431.

Gonzalez-Pastor, J. E., San Millan, J. L., Castilla, M. A. and Moreno, F. (1995). "Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7." J Bacteriol **177(24):** 7131-7140.

Goss, N. H., Evans, C. T. and Wood, H. G. (1980). "Pyruvate phosphate dikinase: sequence of the histidyl peptide, the pyrophosphoryl and phosphoryl carrier." Biochemistry **19(25):** 5805-5809.

Goswami, A. and Van Lanen, S. G. (2015). "Enzymatic strategies and biocatalysts for amide bond formation: tricks of the trade outside of the ribosome." Mol Biosyst **11(2):** 338-353.

LITERATURVERZEICHNIS

- Grawert, M. A. and Groll, M. (2012).** "Exploiting nature's rich source of proteasome inhibitors as starting points in drug development." Chem Commun (Camb) **48**(10): 1364-1378.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997).** "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." Nature **386**(6624): 463-471.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H. and Huber, R. (1999).** "The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10976-10983.
- Groll, M., Kim, K. B., Kairies, N., Huber, R. and Crews, C. M. (2000).** "Crystal Structure of Epoxomicin:20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of α' , β' -Epoxyketone Proteasome Inhibitors." Journal of the American Chemical Society **122**(6): 1237-1238.
- Gross, H. (2007).** "Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects." Appl Microbiol Biotechnol **75**(2): 267-277.
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E. and Gerwick, W. H. (2007).** "The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters." Chem Biol **14**(1): 53-63.
- Gullón, S., Olano, C., Abdelfattah, M. S., Braña, A. F., Rohr, J., Méndez, C. and Salas, J. A. (2006).** "Isolation, characterization, and heterologous expression of the biosynthesis gene cluster for the antitumor anthracycline steffimycin." Applied and environmental microbiology **72**(6): 4172-4183.
- Gushima, H., Miya, T., Murata, K. and Kimura, A. (1983).** "Purification and characterization of glutathione synthetase from Escherichia coli B." J Appl Biochem **5**(3): 210-218.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. and Chater, K. F. (2003).** "PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(4): 1541-1546.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C. J. and Chater, K. F. (2004).** "Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces." Adv Appl Microbiol **54**: 107-128.
- Guthals, A., Watrous, J. D., Dorrestein, P. C. and Bandeira, N. (2012).** "The spectral networks paradigm in high throughput mass spectrometry." Mol Biosyst **8**(10): 2535-2544.
- Hammer, K., Mijakovic, I. and Jensen, P. R. (2006).** "Synthetic promoter libraries--tuning of gene expression." Trends Biotechnol **24**(2): 53-55.
- Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto, H., Konishi, M. and Oki, T. (1992).** "Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin." J Antibiot (Tokyo) **45**(11): 1746-1752.
- Hangauer, D. G., Monzingo, A. F. and Matthews, B. W. (1984).** "An interactive computer graphics study of thermolysin-catalyzed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides." Biochemistry **23**(24): 5730-5741.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hanson, L. R., Hafez, D., Svitak, A. L., Burns, R. B., Li, X., Frey, W. H., 2nd and Marr, R. A. (2011).** "Intranasal phosphoramidon increases beta-amyloid levels in wild-type and NEP/NEP2-deficient mice." J Mol Neurosci **43**(3): 424-427.
- Hartley, B. S. (1960).** "Proteolytic enzymes." Annu Rev Biochem **29**: 45-72.
- Harvey, A. L. (2007).** "Natural products as a screening resource." Curr Opin Chem Biol **11**(5): 480-484.
- Hass, G. M., Nau, H., Biemann, K., Grahn, D. T., Ericsson, L. H. and Neurath, H. (1975).** "Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." Biochemistry **14**(6): 1334-1342.
- Hatch, M. D. and Slack, C. R. (1968).** "A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis." Biochem J **106**(1): 141-146.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D. H. (1997).** "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." J Biol Chem **272**(40): 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D. H. (1993).** "PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chrymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins." J Biol Chem **268**(7): 5115-5120.
- Henras, A. K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mouglin, A. and Henry, Y. (2008).** "The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis." Cell Mol Life Sci **65**(15): 2334-2359.
- Herzberg, O., Chen, C. C., Kapadia, G., McGuire, M., Carroll, L. J., Noh, S. J. and Dunaway-Mariano, D. (1996).** "Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(7): 2652-2657.
- Hibbs, M. S., Hasty, K. A., Seyer, J. M., Kang, A. H. and Mainardi, C. L. (1985).** "Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase." J Biol Chem **260**(4): 2493-2500.
- Hiramatsu, R., Aikawa, J., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1989).** "Secretion by yeast of the zymogen form of Mucor rennin, an aspartic proteinase of Mucor pusillus, and its conversion to the mature form." J Biol Chem **264**(28): 16862-16866.
- Hobman, J. L., Wilkie, J. and Brown, N. L. (2005).** "A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators." Biometals **18**(4): 429-436.
- Holden, H. M., Tronrud, D. E., Monzingo, A. F., Weaver, L. H. and Matthews, B. W. (1987).** "Slow- and fast-binding inhibitors of thermolysin display different modes of binding: crystallographic analysis of extended phosphoramidate transition-state analogues." Biochemistry **26**(26): 8542-8553.
- Huijbers, M. M., Montersino, S., Westphal, A. H., Tischler, D. and van Berkel, W. J. (2014).** "Flavin dependent monooxygenases." Arch Biochem Biophys **544**: 2-17.

Ichikawa, S., Ohta, M., Morioka, H. and Murao, S. (1983). "Blockage of ovulation in the explanted hamster ovary by a collagenase inhibitor." J Reprod Fertil **68**(1): 17-19.

Ishida, K., Fritzsche, K. and Hertweck, C. (2007). "Geminal Tandem C-Methylation in the Discoid Resistomycin Pathway." Journal of the American Chemical Society **129**(42): 12648-12649.

Jaouadi, B., Zarai Jaouadi, N., Rekik, H., Naili, B., Beji, A., Dhouib, A. and Bejar, S. (2013). "Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase." Int J Biol Macromol **60**: 165-177.

Jeffrey, V. and Joachim, M. (1991). "New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins." Gene **100**: 189-194.

Jensen, P. R. and Hammer, K. (1998). "The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters." Appl Environ Microbiol **64**(1): 82-87.

Jez, J. M., Ferrer, J.-L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. and Noel, J. P. (2000). "Dissection of Malonyl-Coenzyme A Decarboxylation from Polyketide Formation in the Reaction Mechanism of a Plant Polyketide Synthase." Biochemistry **39**(5): 890-902.

Julian, D. J., Kershaw, C. J., Brown, N. L. and Hobman, J. L. (2009). "Transcriptional activation of MerR family promoters in *Cupriavidus metallidurans* CH34." Antonie Van Leeuwenhoek **96**(2): 149-159.

Kam, C. M., Nishino, N. and Powers, J. C. (1979). "Inhibition of thermolysin and carboxypeptidase A by phosphoramidates." Biochemistry **18**(14): 3032-3038.

Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T. and Pazdur, R. (2003). "Velcade®: U.S. FDA Approval for the Treatment of Multiple Myeloma Progressing on Prior Therapy." The Oncologist **8**(6): 508-513.

Karki, S., Yoo, H. G., Kwon, S. Y., Suh, J. W. and Kwon, H. J. (2010). "Cloning and in vitro characterization of dTDP-6-deoxy-L-talose biosynthetic genes from *Kitasatospora kifunensis* featuring the dTDP-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose reductase that synthesizes dTDP-6-deoxy-L-talose." Carbohydr Res **345**(13): 1958-1962.

Kasai, N., Fukuhara, K.-i. and Murao, S. (1982). "Purification and Some Properties of FMPI, a Novel Metallo-proteinase Inhibitor Produced by *Streptomyces rishiriensis* NK-122." Agricultural and Biological Chemistry **46**(12): 2979-2985.

Kasai, N., Fukuhara, K.-i., Oda, K. and Murao, S. (1983). "Inhibition of Angiotensin I Converting Enzyme and Carboxypeptidase A by FMPI, Talopeptin, and Their Derivatives." Agricultural and Biological Chemistry **47**(12): 2915-2916.

Kawata, J., Naoe, T., Ogasawara, Y. and Dairi, T. (2017). "Biosynthesis of the Carbonylmethylene Structure Found in the Ketomemycin Class of Pseudotriptides." Angewandte Chemie-International Edition **56**(8): 2026-2029.

Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S.-J., Loesgen, S., Ruby, J. G., Skewes-Cox, P., Jensen, P. R., Fenical, W. and Moore, B. S. (2012). "Merochlorins A–D, Cyclic Meroterpenoid Antibiotics Biosynthesized in Divergent Pathways with Vanadium-Dependent Chloroperoxidases." Journal of the American Chemical Society **134**(29): 11988-11991.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kaysser, L., Lutsch, L., Siebenberg, S., Wemakor, E., Kammerer, B. and Gust, B. (2009).** "Identification and manipulation of the caprazamycin gene cluster lead to new simplified liponucleoside antibiotics and give insights into the biosynthetic pathway." J Biol Chem **284**(22): 14987-14996.
- Kaysser, L., Wemakor, E., Siebenberg, S., Salas, J. A., Sohng, J. K., Kammerer, B. and Gust, B. (2010).** "Formation and attachment of the deoxysugar moiety and assembly of the gene cluster for caprazamycin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **76**(12): 4008-4018.
- Keller, L., Plaza, A., Dubiella, C., Groll, M., Kaiser, M. and Müller, R. (2015).** "Macyranones: Structure, Biosynthesis, and Binding Mode of an Unprecedented Epoxyketone that Targets the 20S Proteasome." Journal of the American Chemical Society **137**(25): 8121-8130.
- Keller, P. M., Lee, C. P., Fenwick, A. E., Atkinson, S. T., Elliott, J. D. and DeWolf, W. E., Jr. (1996).** "Endothelin-converting enzyme: substrate specificity and inhibition by novel analogs of phosphoramidon." Biochem Biophys Res Commun **223**(2): 372-378.
- Kersten, R. D., Yang, Y. L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S. J., Fenical, W., Fischbach, M. A., Moore, B. S. and Dorrestein, P. C. (2011).** "A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics." Nat Chem Biol **7**(11): 794-802.
- Kessler, E. and Spierer, A. (1984).** "Inhibition by phosphoramidon of *Pseudomonas aeruginosa* elastase injected intracorneally in rabbit eyes." Current Eye Research **3**(8): 1075-1078.
- Kester, W. R. and Matthews, B. W. (1977).** "Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the mechanism of catalysis." Biochemistry **16**(11): 2506-2516.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. (2000).** Practical Streptomyces Genetics. Norwich, UK, John Innes Foundation.
- Kim, J. G., Park, B. K., Kim, S. U., Choi, D., Nahm, B. H., Moon, J. S., Reader, J. S., Farrand, S. K. and Hwang, I. (2006).** "Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan horse antibiotic that controls crown gall." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8846-8851.
- Kim, K. B., Myung, J., Sin, N. and Crews, C. M. (1999).** "Proteasome inhibition by the natural products epoxomicin and dihydroeponemycin: insights into specificity and potency." Bioorg Med Chem Lett **9**(23): 3335-3340.
- Kino, K., Kotanaka, Y., Arai, T. and Yagasaki, M. (2009).** "A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide-antibiotic rhizocticin." Biosci Biotechnol Biochem **73**(4): 901-907.
- Kirshbom, P. M., Tsui, S. S., DiBernardo, L. R., Meliones, J. N., Schwinn, D. A., Ungerleider, R. M. and Gaynor, J. W. (1995).** "Blockade of endothelin-converting enzyme reduces pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass and circulatory arrest." Surgery **118**(2): 440-444; discussion 444-445.
- KITAGISHI, K. and HIROMI, K. (1983).** "Kinetics of Binding between Thermolysin and Streptomyces Metalloprotease Inhibitor, Talopeptin (MKI)." The Journal of Biochemistry **93**(1): 55-59.

LITERATURVERZEICHNIS

KITAGISHI, K. and HIROMI, K. (1983). "Studies on the Chemical Modification of Tryptophan Residues in Thermolysin and in Talopeptin (MKI) with N-Bromosuccinimide." The Journal of Biochemistry **94**(1): 129-135.

Kitagishi, K. and Hiromi, K. (1984). "Binding between thermolysin and its specific inhibitor, phosphoramidon." J Biochem **95**(2): 529-534.

Kitagishi, K. and Hiromi, K. (1984). "Inhibitory Spectrum of Talopeptin (MKI), a Specific Inhibitor of Thermolysin." Agricultural and Biological Chemistry **48**(5): 1287-1291.

Kitagishi, K. and Hiromi, K. (1986). "Binding between thermolysin and its specific inhibitor, N-phosphoryl-L-leucyl-L-tryptophan (PLT)." J Biochem **99**(1): 191-197.

Kitagishi, K., Hiromi, K., Oda, K. and Murao, S. (1983). "Equilibrium study on the binding between thermolysin and Streptomyces metalloprotease inhibitor, talopeptin (MKI)." J Biochem **93**(1): 47-53.

Koguchi, Y., Kohno, J., Suzuki, S., Nishio, M., Takahashi, K., Ohnuki, T. and Komatsubara, S. (2000). "TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from Streptomyces sp. TC 1084 and Saccharothrix sp. TC 1094. II. Physico-chemical properties and structure determination." J Antibiot (Tokyo) **53**(1): 63-65.

Koguchi, Y., Nishio, M., Suzuki, S., Takahashi, K., Ohnuki, T. and Komatsubara, S. (2000). "TMC-89A and B, new proteasome inhibitors from streptomyces sp. TC 1087." J Antibiot (Tokyo) **53**(9): 967-972.

Komiyama, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1975). "Inhibitory effects of phosphoramidon on neutral metalloendopeptidases and its application on affinity chromatography." Biochemical and Biophysical Research Communications **65**(1): 352-357.

Kouprina, N. and Larionov, V. (2008). "Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Nat Protoc **3**(3): 371-377.

Kraas, F. I., Giessen, T. W. and Marahiel, M. A. (2012). "Exploring the mechanism of lipid transfer during biosynthesis of the acidic lipopeptide antibiotic CDA." FEBS Lett **586**(3): 283-288.

Kramer, H. H., Schmidt, K., Leis, S., Schmelz, M., Sommer, C. and Birklein, F. (2005). "Inhibition of neutral endopeptidase (NEP) facilitates neurogenic inflammation." Exp Neurol **195**(1): 179-184.

Kressler, D., Hurt, E. and Bassler, J. (2010). "Driving ribosome assembly." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 673-683.

Krum, H. and Martin, J. (2007). Chapter 85 - Novel Drug Treatments for Hypertension. Comprehensive Hypertension. G. Y. H. Lip and J. E. Hall. Philadelphia, Mosby: 1049-1060.

Kuhn, D. J., Chen, Q., Voorhees, P. M., Strader, J. S., Shenk, K. D., Sun, C. M., Demo, S. D., Bennett, M. K., van Leeuwen, F. W., Chanan-Khan, A. A. and Orlowski, R. Z. (2007). "Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma." Blood **110**(9): 3281-3290.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kukkola, P. J., Savage, P., Sakane, Y., Berry, J. C., Bilci, N. A., Ghai, R. D. and Jeng, A. Y. (1995).** "Differential Structure-Activity Relationships of Phosphoramidon Analogues for Inhibition of Three Metalloproteases: Endothelin-Converting Enzyme, Neutral Endopeptidase, and Angiotensin-Converting Enzyme." Journal of Cardiovascular Pharmacology **26**: S65-68.
- Kumar, C. G. and Takagi, H. (1999).** "Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint." Biotechnol Adv **17**(7): 561-594.
- Kumar, K. and Waldmann, H. (2009).** "Synthesis of natural product inspired compound collections." Angew Chem Int Ed Engl **48**(18): 3224-3242.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lam, K. S. (2007).** "New aspects of natural products in drug discovery." Trends Microbiol **15**(6): 279-289.
- Leipoldt, F., Santos-Aberturas, J., Stegmann, D. P., Wolf, F., Kulik, A., Lacroix, R., Popadic, D., Keinhörster, D., Kirchner, N., Bekiesch, P., Gross, H., Truman, A. W. and Kaysser, L. (2017).** "Warhead biosynthesis and the origin of structural diversity in hydroxamate metalloproteinase inhibitors." Nat Commun **8**(1): 1965.
- Li, J. W. and Vederas, J. C. (2009).** "Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?" Science **325**(5937): 161-165.
- Lim, K., Read, R. J., Chen, C. C., Tempczyk, A., Wei, M., Ye, D., Wu, C., Dunaway-Mariano, D. and Herzberg, O. (2007).** "Swiveling domain mechanism in pyruvate phosphate dikinase." Biochemistry **46**(51): 14845-14853.
- Lin, G., Li, D., de Carvalho, L. P., Deng, H., Tao, H., Vogt, G., Wu, K., Schneider, J., Chidawanyika, T., Warren, J. D., Li, H. and Nathan, C. (2009).** "Inhibitors selective for mycobacterial versus human proteasomes." Nature **461**(7264): 621-626.
- Lindenthal, C., Weich, N., Chia, Y. S., Heussler, V. and Klinkert, M. Q. (2005).** "The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of Plasmodium parasites." Parasitology **131**(Pt 1): 37-44.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G. and Tan, H. (2013).** "Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomycetes." Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **77**(1): 112-143.
- Liu, H. W. and Thorson, J. S. (1994).** "Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria." Annu Rev Microbiol **48**: 223-256.
- Liu, J., Zhu, X. and Zhang, W. (2015).** "Identifying the Minimal Enzymes Required for Biosynthesis of Epoxyketone Proteasome Inhibitors." ChemBiochem **16**(18): 2585-2589.
- Love, M. P., Haynes, W. G., Gray, G. A., Webb, D. J. and McMurray, J. J. (1996).** "Vasodilator effects of endothelin-converting enzyme inhibition and endothelin ETA receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors." Circulation **94**(9): 2131-2137.

- Luzhetskyy, A., Mayer, A., Hoffmann, J., Pelzer, S., Holzenkamper, M., Schmitt, B., Wohler, S. E., Vente, A. and Bechthold, A. (2007).** "Cloning and heterologous expression of the aranciamycin biosynthetic gene cluster revealed a new flexible glycosyltransferase." Chembiochem **8**(6): 599-602.
- Luzhetskyy, A., Vente, A. and Bechthold, A. (2005).** "Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of biologically active natural products that contain oligosaccharides." Mol Biosyst **1**(2): 117-126.
- MacNeil, D. J. (1988).** "Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*." Journal of bacteriology **170**(12): 5607-5612.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. and MacNeil, T. (1992).** "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector." Gene **111**(1): 61-68.
- Madala, P. K., Tyndall, J. D., Nall, T. and Fairlie, D. P. (2010).** "Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites." Chem Rev **110**(6): Pr1-31.
- Madduri, K., Waldron, C. and Merlo, D. J. (2001).** "Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*." J Bacteriol **183**(19): 5632-5638.
- Manzetti, S., McCulloch, D., Herington, A. and van der Spoel, D. (2003).** "Modeling of enzyme-substrate complexes for the metalloproteases MMP-3, ADAM-9 and ADAM-10." Journal of computer-aided molecular design **17**: 551-565.
- Marahiel, M. A. (2009).** "Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis." J Pept Sci **15**(12): 799-807.
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka, V. and Baudys, M. (1989).** "Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family." FEBS Lett **251**(1-2): 94-98.
- Matsumura, Y., Ikegawa, R., Suzuki, Y., Takaoka, M., Uchida, T., Kido, H., Shinyama, H., Hayashi, K., Watanabe, M. and Morimoto, S. (1991).** "Phosphoramidon prevents cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in dogs: the relationship to endothelin-1 levels in the cerebrospinal fluid." Life Sci **49**(11): 841-848.
- Mattera, G. G., Eglezos, A., Renzetti, A. R. and Mizrahi, J. (1993).** "Comparison of the cardiovascular and neural activity of endothelin-1, -2, -3 and respective proendothelins: effects of phosphoramidon and thiorphan." British Journal of Pharmacology **110**(1): 331-337.
- Mattern, M., Eddins, M., Agarwal, S., Sterner, D., Kodrasov, M., Kumar, K., Wu, J. and Nicholson, B. (2014).** Proteasome Inhibitors Versus E3 Ligase Inhibitors for Cancer Therapy: 291-316.
- Matthews, B. W. (1988).** "Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases." Accounts of Chemical Research **21**(9): 333-340.
- McCormack, P. L. (2012).** "Carfilzomib: in relapsed, or relapsed and refractory, multiple myeloma." Drugs **72**(15): 2023-2032.

- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E. and Breitling, R. (2011).** "antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences." Nucleic acids research **39**(suppl 2): W339-W346.
- Medema, M. H., Paalvast, Y., Nguyen, D. D., Melnik, A., Dorrestein, P. C., Takano, E. and Breitling, R. (2014).** "Pep2Path: automated mass spectrometry-guided genome mining of peptidic natural products." PLoS Comput Biol **10**(9): e1003822.
- Mehellou, Y., Balzarini, J. and McGuigan, C. (2009).** "Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells." ChemMedChem **4**(11): 1779-1791.
- Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V. and Stangl, K. (2008).** "Proteasome inhibitors: poisons and remedies." Med Res Rev **28**(2): 309-327.
- Mendoza-Vargas, A., Olvera, L., Olvera, M., Grande, R., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Jimenez-Jacinto, V., Salgado, H., Juarez, K., Contreras-Moreira, B., Huerta, A. M., Collado-Vides, J. and Morett, E. (2009).** "Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*." PLoS One **4**(10): e7526.
- Menon, A. S. and Goldberg, A. L. (1987).** "Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP." J Biol Chem **262**(31): 14929-14934.
- Metcalf, W. W. and van der Donk, W. A. (2009).** "Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products." Annu Rev Biochem **78**: 65-94.
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashennnikov, I., Kolb, V., Khmel, I. and Severinov, K. (2006).** "Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C." J Biol Chem **281**(26): 18033-18042.
- Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A. C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O. and Giegerich, R. (2003).** "GenDB—an open source genome annotation system for prokaryote genomes." Nucleic acids research **31**(8): 2187-2195.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C. and Ross, R. P. (2011).** "New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods." Annu Rev Food Sci Technol **2**: 299-329.
- Montiel, D., Kang, H. S., Chang, F. Y., Charlop-Powers, Z. and Brady, S. F. (2015).** "Yeast homologous recombination-based promoter engineering for the activation of silent natural product biosynthetic gene clusters." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(29): 8953-8958.
- Moore, B. S., Eustáquio, A. S. and McGlinchey, R. P. (2008).** "Advances in and applications of proteasome inhibitors." Current opinion in chemical biology **12**(4): 434-440.
- Moriguchi, T., Yanagi, T., Kunimori, M., Wada, T. and Sekine, M. (2000).** "Synthesis and Properties of Aminoacylamido-AMP: Chemical Optimization for the Construction of an N-Acyl Phosphoramidate Linkage." The Journal of Organic Chemistry **65**(24): 8229-8238.
- Morihara, K. and Tsuzuki, H. (1970).** "Thermolysin: Kinetic Study with Oligopeptides." European Journal of Biochemistry **15**(2): 374-380.

LITERATURVERZEICHNIS

Morihara, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H. and Ebata, M. (1965). "PSEUDOMONAS AERUGINOSA ELASTASE. ISOLATION, CRYSTALLIZATION, AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION." J Biol Chem **240**: 3295-3304.

Morrison, J. F., Griffiths, D. E. and Ennor, A. H. (1957). "The purification and properties of arginine phosphokinase." The Biochemical journal **65**(1): 143-153.

Murao, S., Kasai, N., Kimura, Y., Oda, K. and Fukuhara, K.-i. (1982). "A New Metalloproteinase Inhibitor (FMPI) Produced by *Streptomyces rishiriensis* NK-122." Agricultural and Biological Chemistry **46**(3): 855-857.

Murao, S., Katsura, M., Fukuhara, K.-i. and Oda, K. (1980). "New metallo proteinase inhibitor (MK-I) produced by *Streptomyces mozunensis* MK-23." Agricultural and Biological Chemistry **44**(3): 701-703.

Murphy, L. J., Corder, R., Mallet, A. I. and Turner, A. J. (1994). "Generation by the phosphoramidon-sensitive peptidases, endopeptidase-24.11 and thermolysin, of endothelin-1 and c-terminal fragment from big endothelin-1." Br J Pharmacol **113**(1): 137-142.

Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." Biol Chem **378**(3-4): 151-160.

Nakano, Y., Suzuki, N., Yoshida, Y., Nezu, T., Yamashita, Y. and Koga, T. (2000). "Thymidine diphosphate-6-deoxy-L-lyxo-4-hexulose reductase synthesizing dTDP-6-deoxy-L-talose from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." J Biol Chem **275**(10): 6806-6812.

Nanteuil, G., Herve, Y., Duhault, J., Espinal, J., Boulanger, M. and Ravel, D. (1995). "Euglycaemic and biological activities of novel thiazolidine-2,4-dione derivatives." Arzneimittel-Forschung **45**: 1176-1181.

Nett, M., Gulder, T. A. M., Kale, A. J., Hughes, C. C. and Moore, B. S. (2009). "Function-oriented biosynthesis of beta-lactone proteasome inhibitors in *Salinispora tropica*." Journal of medicinal chemistry **52**(19): 6163-6167.

Newman, D. J. (2008). "Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?" J Med Chem **51**(9): 2589-2599.

Nguyen, K. T., Ritz, D., Gu, J. Q., Alexander, D., Chu, M., Miao, V., Brian, P. and Baltz, R. H. (2006). "Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(46): 17462-17467.

Nierhaus, K. H. (1980). "The assembly of the prokaryotic ribosome." Biosystems **12**(3): 273-282.

Noike, M., Matsui, T., Ooya, K., Sasaki, I., Ohtaki, S., Hamano, Y., Maruyama, C., Ishikawa, J., Satoh, Y., Ito, H., Morita, H. and Dairi, T. (2015). "A peptide ligase and the ribosome cooperate to synthesize the peptide peganomycin." Nat Chem Biol **11**(1): 71-76.

Novoa, M. A., Diaz-Guerra, L., San Millan, J. L. and Moreno, F. (1986). "Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity." J Bacteriol **168**(3): 1384-1391.

Ogasawara, Y. and Dairi, T. (2017). "Biosynthesis of Oligopeptides Using ATP-Grasp Enzymes." Chemistry-a European Journal **23**(45): 10714-10724.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ogita, T. and Knowles, J. R. (1988).** "On the intermediacy of carboxyphosphate in biotin-dependent carboxylations." Biochemistry **27**(21): 8028-8033.
- Olano, C., Abdelfattah, M. S., Gullon, S., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J. A. (2008).** "Glycosylated derivatives of steffimycin: insights into the role of the sugar moieties for the biological activity." ChemBiochem **9**(4): 624-633.
- Olano, C., Garcia, I., Gonzalez, A., Rodriguez, M., Rozas, D., Rubio, J., Sanchez-Hidalgo, M., Brana, A. F., Mendez, C. and Salas, J. A. (2014).** "Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* J1074." Microb Biotechnol **7**(3): 242-256.
- Oman, T. J., Boettcher, J. M., Wang, H., Okalibe, X. N. and van der Donk, W. A. (2011).** "Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide." Nat Chem Biol **7**(2): 78-80.
- Ooya, K., Ogasawara, Y., Noike, M. and Dairi, T. (2015).** "Identification and analysis of the resorcinomycin biosynthetic gene cluster." Biosci Biotechnol Biochem **79**(11): 1833-1837.
- Orlowski, M., Cardozo, C. and Michaud, C. (1993).** "Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids." Biochemistry **32**(6): 1563-1572.
- Orlowski, R. Z. and Kuhn, D. J. (2008).** "Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade." Clin Cancer Res **14**(6): 1649-1657.
- Ostash, B., Doud, E. H., Lin, C., Ostash, I., Perlstein, D. L., Fuse, S., Wolpert, M., Kahne, D. and Walker, S. (2009).** "Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway." Biochemistry **48**(37): 8830-8841.
- Owen, J. G., Charlop-Powers, Z., Smith, A. G., Ternei, M. A., Calle, P. Y., Reddy, B. V. B., Montiel, D. and Brady, S. F. (2015).** "Multiplexed metagenome mining using short DNA sequence tags facilitates targeted discovery of epoxyketone proteasome inhibitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(14): 4221-4226.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. and Saier, M. H., Jr. (1998).** "Major facilitator superfamily." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 1-34.
- Patel, K. V. and Schrey, M. P. (1995).** "Human breast cancer cells contain a phosphoramidon-sensitive metalloproteinase which can process exogenous big endothelin-1 to endothelin-1: a proposed mitogen for human breast fibroblasts." British journal of cancer **71**(3): 442-447.
- Pelaez, F. (2006).** "The historical delivery of antibiotics from microbial natural products--can history repeat?" Biochem Pharmacol **71**(7): 981-990.
- Pelmenschikov, V., Blomberg, M. R. and Siegbahn, P. E. (2002).** "A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin." J Biol Inorg Chem **7**(3): 284-298.
- Pereira, A. R., Kale, A. J., Fenley, A. T., Byrum, T., Debonsi, H. M., Gilson, M. K., Valeriote, F. A., Moore, B. S. and Gerwick, W. H. (2012).** "The carmaphycins: new proteasome inhibitors exhibiting an alpha,beta-epoxyketone warhead from a marine cyanobacterium." ChemBiochem **13**(6): 810-817.

LITERATURVERZEICHNIS

- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A. and Baumeister, W. (1993).** "Structural features of the 26 S proteasome complex." J Mol Biol **234**(4): 932-937.
- Pitzer, J. and Steiner, K. (2016).** "Amides in Nature and Biocatalysis." J Biotechnol **235**: 32-46.
- Pocalyko, D. J., Carroll, L. J., Martin, B. M., Babbitt, P. C. and Dunaway-Mariano, D. (1990).** "Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs." Biochemistry **29**(48): 10757-10765.
- Pollock, D. M., Shiosaki, K., Sullivan, G. M. and Opgenorth, T. J. (1992).** "Rhamnose moiety of phosphoramidon is not required for in vivo inhibition of endothelin converting enzyme." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 1146-1150.
- Pompeani, A. J., Irgon, J. J., Berger, M. F., Bulyk, M. L., Wingreen, N. S. and Bassler, B. L. (2008).** "The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters." Mol Microbiol **70**(1): 76-88.
- Poncz, L., Gerken, T. A., Dearborn, D. G., Grobelny, D. and Galardy, R. E. (1984).** "Inhibition of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* by N alpha-phosphoryl dipeptides and kinetics of spontaneous hydrolysis of the inhibitors." Biochemistry **23**(12): 2766-2772.
- Poust, S., Phelan, R. M., Deng, K., Katz, L., Petzold, C. J. and Keasling, J. D. (2015).** "Divergent mechanistic routes for the formation of gem-dimethyl groups in the biosynthesis of complex polyketides." Angew Chem Int Ed Engl **54**(8): 2370-2373.
- Procopio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L. and Araujo, J. M. (2012).** "Antibiotics produced by *Streptomyces*." Braz J Infect Dis **16**(5): 466-471.
- Ramos, A., Lombó, F., Braña, A. F., Rohr, J., Méndez, C. and Salas, J. A. (2008).** "Biosynthesis of elloramycin in *Streptomyces olivaceus* requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster." Microbiology **154**(3): 781-788.
- Rani, K., Rana, R. and Datt, S. (2012).** "Review on latest overview of proteases." International Journal of current life sciences **2**: 12-18.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998).** "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 597-635.
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W. and Huson, D. H. (2007).** "Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution." BMC Evolutionary Biology **7**(1): 78.
- Ravid, T. and Hochstrasser, M. (2008).** "Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 679-690.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1993).** "Evolutionary families of peptidases." The Biochemical journal **290** (Pt 1)(Pt 1): 205-218.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J. (2004).** "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D160-164.

- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A. and Ashraf, M. (2019).** "Microbial Proteases Applications." Frontiers in bioengineering and biotechnology **7**: 110-110.
- Reddick, R. E. and Kenyon, G. L. (1987).** "Syntheses and NMR studies of specifically labeled [2-¹⁵N]phosphocreatine, [2-¹⁵N]creatinine, and related ¹⁵N-labeled compounds." Journal of the American Chemical Society **109**(14): 4380-4387.
- Reen, F. J., Romano, S., Dobson, A. D. W. and O'Gara, F. (2015).** "The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms." Marine drugs **13**(8): 4754-4783.
- Reyna-Gonzalez, E., Schmid, B., Petras, D., Sussmuth, R. D. and Dittmann, E. (2016).** "Leader Peptide-Free In Vitro Reconstitution of Microviridin Biosynthesis Enables Design of Synthetic Protease-Targeted Libraries." Angew Chem Int Ed Engl **55**(32): 9398-9401.
- Richter, S., Wuest, M., Bergman, C. N., Krieger, S., Rogers, B. E. and Wuest, F. (2016).** "Metabolically Stabilized (68)Ga-NOTA-Bombesin for PET Imaging of Prostate Cancer and Influence of Protease Inhibitor Phosphoramidon." Mol Pharm **13**(4): 1347-1357.
- Rodnina, M. V. (2013).** "Biochemistry. Translocation in action." Science **340**(6140): 1534-1535.
- Rodnina, M. V. (2016).** "The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding." Protein Sci **25**(8): 1390-1406.
- Rodriguez-Garcia, A., Combes, P., Perez-Redondo, R., Smith, M. C. and Smith, M. C. (2005).** "Natural and synthetic tetracycline-inducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces*." Nucleic Acids Res **33**(9): e87.
- Rodriguez, L., Oelkers, C., Aguirrezabalaga, I., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J. A. (2000).** "Generation of hybrid elloramycin analogs by combinatorial biosynthesis using genes from anthracycline-type and macrolide biosynthetic pathways." J Mol Microbiol Biotechnol **2**(3): 271-276.
- Rose, M. E., Prescott, M. C., Wilby, A. H. and Galpin, I. J. (1984).** "Analysis of peptides with unusual structural features by fast atom bombardment mass spectrometry: Protease inhibitors." **11**(1): 10-23.
- Roush, R. F., Nolan, E. M., Lohr, F. and Walsh, C. T. (2008).** "Maturation of an *Escherichia coli* ribosomal peptide antibiotic by ATP-consuming N-P bond formation in microcin C7." J Am Chem Soc **130**(11): 3603-3609.
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998).** "Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome." The EMBO journal **17**(17): 4909-4919.
- Saidijam, M., Benedetti, G., Ren, Q., Xu, Z., Hoyle, C. J., Palmer, S. L., Ward, A., Bettaney, K. E., Szakonyi, G., Mueller, J., Morrison, S., Pos, M. K., Butaye, P., Walravens, K., Langton, K., Herbert, R. B., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., O'Reilly, J., Rutherford, N. G., Brown, M. H., Bill, R. M. and Henderson, P. J. (2006).** "Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily." Curr Drug Targets **7**(7): 793-811.

LITERATURVERZEICHNIS

- Salas, A. P., Zhu, L., Sanchez, C., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C. and Salas, J. A. (2005).** "Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase." Mol Microbiol **58**(1): 17-27.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001).** Molecular cloning. A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, S., Torcato, I. and Castanho, M. A. (2012).** "Biomedical applications of dipeptides and tripeptides." Biopolymers **98**(4): 288-293.
- Schechter, I. and Berger, A. (2012).** "On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967." Biochem Biophys Res Commun **425**(3): 497-502.
- Schenk, A., Xu, Z., Pfeiffer, C., Steinbeck, C. and Hertweck, C. (2007).** "Geminal Bismethylation Prevents Polyketide Oxidation and Dimerization in the Benastatin Pathway." Angewandte Chemie International Edition **46**(37): 7035-7038.
- Scherlach, K. and Hertweck, C. (2009).** "Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms." Org Biomol Chem **7**(9): 1753-1760.
- Schorn, M., Zettler, J., Noel, J. P., Dorrestein, P. C., Moore, B. S. and Kaysser, L. (2014).** "Genetic Basis for the Biosynthesis of the Pharmaceutically Important Class of Epoxyketone Proteasome Inhibitors." ACS Chemical Biology **9**(1): 301-309.
- Schrader, J., Henneberg, F., Mata, R. A., Tittmann, K., Schneider, T. R., Stark, H., Bourenkov, G. and Chari, A. (2016).** "The inhibition mechanism of human 20^S proteasomes enables next-generation inhibitor design." Science **353**(6299): 594-598.
- Seemann, T. (2014).** "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation." Bioinformatics: btu153.
- Shankar, P. R. (2014).** "Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance." Australasian Medical Journal **7**: 237.
- Shannon, J. D., Baramova, E. N., Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1989).** "Amino acid sequence of a Crotalus atrox venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin." J Biol Chem **264**(20): 11575-11583.
- Slusarczyk, M., Serpi, M. and Pertusati, F. (2018).** "Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity." Antiviral Chemistry and Chemotherapy **26**: 2040206618775243.
- Smanski, M. J., Zhou, H., Claesen, J., Shen, B., Fischbach, M. A. and Voigt, C. A. (2016).** "Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity." Nat Rev Microbiol **14**(3): 135-149.
- Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P. L. and Ideker, T. (2011).** "Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization." Bioinformatics **27**(3): 431-432.
- Spronk, A. M., Yoshida, H. and Wood, H. G. (1976).** "Isolation of 3-phosphohistidine from phosphorylated pyruvate, phosphate dikinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(12): 4415-4419.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. and Marahiel, M. A. (1999). "The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases." Chem Biol **6**(8): 493-505.

Stec, W. J., Okruszek, A., Lesiak, K., Uznanski, B. and Michalski, J. (1976). "New synthesis of S(Se)-alkyl phosphorothio(seleno)lates from the corresponding phosphoroanilidates. Stereospecific cleavage of the phosphorus-nitrogen bond in chiral phosphoroanilidates." The Journal of Organic Chemistry **41**(2): 227-233.

Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. and Brown, N. L. (2001). "CueR (YbbI) of Escherichia coli is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA." Mol Microbiol **39**(2): 502-511.

Suda, H., AOYAGI, T., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. (1973). "A thermolysin inhibitor produced by actinomycetes: phosphoramidon." The Journal of antibiotics **26**(10): 621-623.

Sugawara, K., Hatori, M., Nishiyama, Y., Tomita, K., Kamei, H., Konishi, M. and Oki, T. (1990). "Eponemycin, a new antibiotic active against B16 melanoma. I. Production, isolation, structure and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **43**(1): 8-18.

Sun, Q., Yang, Q., Gong, S., Fu, Q. and Xiao, Q. (2013). "Synthesis and enzymatic evaluation of phosphoramidon and its β anomer: Anomerization of α -l-rhamnose triacetate upon phosphorylation." Bioorganic & Medicinal Chemistry **21**(21): 6778-6787.

Sussmuth, R. D. and Mainz, A. (2017). "Nonribosomal Peptide Synthesis-Principles and Prospects." Angew Chem Int Ed Engl **56**(14): 3770-3821.

Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Nezu, T., Terada, Y., Yamashita, Y. and Koga, T. (2002). "Guanosine diphosphate-4-keto-6-deoxy-d-mannose reductase in the pathway for the synthesis of GDP-6-deoxy-d-talose in Actinobacillus actinomycetemcomitans." Eur J Biochem **269**(23): 5963-5971.

Tajima, M., Urabe, I., Yutani, K. and Okada, H. (1976). "Role of calcium ions in the thermostability of thermolysin and Bacillus subtilis var. amylosacchariticus neutral protease." Eur J Biochem **64**(1): 243-247.

Tallant, C., Marrero, A. and Gomis-Ruth, F. X. (2010). "Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains." Biochim Biophys Acta **1803**(1): 20-28.

Taylor, Z. W., Brown, H. A., Narindoshvili, T., Wenzel, C. Q., Szymanski, C. M., Holden, H. M. and Raushel, F. M. (2017). "Discovery of a Glutamine Kinase Required for the Biosynthesis of the O-Methyl Phosphoramidate Modifications Found in the Capsular Polysaccharides of Campylobacter jejuni." J Am Chem Soc **139**(28): 9463-9466.

Taylor, Z. W., Chamberlain, A. R. and Raushel, F. M. (2018). "Substrate Specificity and Chemical Mechanism for the Reaction Catalyzed by Glutamine Kinase." Biochemistry **57**(37): 5447-5455.

Tegge, G. (1984). "Godfrey, T., and J. Reichelt (Editors): Industrial Enzymology - The Application of Enzymes in Industry (Industrielle Enzymologie - Die Anwendung von Enzymen in der Industrie). Published in the UK by MacMillan Publ., Ltd., Basingstoke, Surrey 1983, in USA and Canada by the Nature Press, New York 3983. 582p., £ 40.00; US \$ 77.00." Starch - Stärke **36**(1): 34-34.

- Tello-Aburto, R., Hallada, L. P., Niroula, D. and Rogelj, S. (2015).** "Total synthesis and absolute stereochemistry of the proteasome inhibitors cystargolides A and B." Organic & Biomolecular Chemistry **13**(40): 10127-10130.
- Thibodeaux, C. J., Chang, W. C. and Liu, H. W. (2012).** "Enzymatic chemistry of cyclopropane, epoxide, and aziridine biosynthesis." Chem Rev **112**(3): 1681-1709.
- Thibodeaux, C. J., Melancon, C. E., 3rd and Liu, H. W. (2008).** "Natural-product sugar biosynthesis and enzymatic glycodiversification." Angew Chem Int Ed Engl **47**(51): 9814-9859.
- Thibodeaux, C. J., Melancon, C. E. and Liu, H. W. (2007).** "Unusual sugar biosynthesis and natural product glycodiversification." Nature **446**(7139): 1008-1016.
- Thoden, J. B., Firestine, S., Nixon, A., Benkovic, S. J. and Holden, H. M. (2000).** "Molecular structure of Escherichia coli PurT-encoded glycinamide ribonucleotide transformylase." Biochemistry **39**(30): 8791-8802.
- Tobias, S. C. and Borch, R. F. (2001).** "Synthesis and biological studies of novel nucleoside phosphoramidate prodrugs." J Med Chem **44**(25): 4475-4480.
- Trefzer, A., Hoffmeister, D., Künzel, E., Stockert, S., Weitnauer, G., Westrich, L., Rix, U., Fuchser, J., Bindseil, K. U., Rohr, J. and Bechthold, A. (2000).** "Function of glycosyltransferase genes involved in urdamycin A biosynthesis." Chemistry & Biology **7**(2): 133-142.
- Tronrud, D. E., Monzingo, A. F. and Matthews, B. W. (1986).** "Crystallographic structural analysis of phosphoramidates as inhibitors and transition-state analogs of thermolysin." Eur J Biochem **157**(2): 261-268.
- Tsura, D., Imajo, S., Morikawa, S.-y., Yoshimoto, T. and Ishiguro, M. (1993).** "Zinc Protease of Bacillus subtilis var. amylosacchariticus: Construction of a Three-Dimensional Model and Comparison with Thermolysin." The Journal of Biochemistry **113**(1): 101-105.
- Umezawa, S., Tatsuta, K., Izawa, O., Tsuchiya, T. and Umezawa, H. (1972).** "A new microbial metabolite phosphoramidon (isolation and structure)." Tetrahedron Letters **13**(1): 97-100.
- Vagner, J., Qu, H. and Hruby, V. J. (2008).** "Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery." Curr Opin Chem Biol **12**(3): 292-296.
- Valueva, T. A., Revina, T. A., Mosolov, V. V. and Mentele, R. (2000).** "Primary structure of potato kunitz-type serine proteinase inhibitor." Biol Chem **381**(12): 1215-1221.
- van den Burg, B. and Eijsink, V. (2013).** Chapter 111 - Thermolysin and Related Bacillus Metalloproteinases. Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition). N. D. Rawlings and G. Salvesen, Academic Press: 540-553.
- van der Heden van Noort, G. J., Verhagen, C. P., van der Horst, M. G., Overkleeft, H. S., van der Marel, G. A. and Filippov, D. V. (2008).** "A versatile one-pot procedure to phosphate monoesters and pyrophosphates using di(p-methoxybenzyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite." Org Lett **10**(20): 4461-4464.

LITERATURVERZEICHNIS

- van Wageningen, A. M., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. and Solenberg, P. J. (1998).** "Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic." Chem Biol **5**(3): 155-162.
- van Wezel, G. P. and McDowall, K. J. (2011).** "The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances." Nat Prod Rep **28**(7): 1311-1333.
- Vemulapalli, S., Chiu, P. J., Chintala, M. and Bernardino, V. (1993).** "Attenuation of ischemic acute renal failure by phosphoramidon in rats." Pharmacology **47**(3): 188-193.
- Venkatachalam, T. K., Goodman, P. A., Qazi, S., D'Cruz, O. and Uckun, F. M. (2004).** "Rational drug design of multifunctional phosphoramidate substituted nucleoside analogs." Curr Pharm Des **10**(15): 1713-1726.
- Verdoes, M., Florea, B. I., van der Marel, G. A. and Overkleeft, H. S. (2009).** "Chemical Tools To Study the Proteasome." European Journal of Organic Chemistry **2009**(20): 3301-3313.
- von Bubnoff, A. (2006).** "Seeking new antibiotics in nature's backyard." Cell **127**(5): 867-869.
- von Jagow, G. (1980).** "Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Von H. Bisswanger. Verlag Chemie, Weinheim 1979. XII, 239 S., geh. DM 48.00." Angewandte Chemie **92**(6): 500-501.
- Voorhees, P. M., Dees, E. C., O'Neil, B. and Orlowski, R. Z. (2003).** "The proteasome as a target for cancer therapy." Clin Cancer Res **9**(17): 6316-6325.
- Waldman, A. J., Ng, T. L., Wang, P. and Balskus, E. P. (2017).** "Heteroatom-Heteroatom Bond Formation in Natural Product Biosynthesis." Chemical Reviews **117**(8): 5784-5863.
- Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, P. R., Jr., Broughton, M. C., Turner, J., Madduri, K., Crawford, K. P., Merlo, D. J. and Baltz, R. H. (2001).** "Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*." Chem Biol **8**(5): 487-499.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. and Eppenberger, H. M. (1992).** "Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis." The Biochemical journal **281** (Pt 1)(Pt 1): 21-40.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., van der Voort, M., Pogliano, K., Gross, H., Raaijmakers, J. M., Moore, B. S., Laskin, J., Bandeira, N. and Dorrestein, P. C. (2012).** "Mass spectral molecular networking of living microbial colonies." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(26): E1743-1752.
- Weaver, L. H., Kester, W. R. and Matthews, B. W. (1977).** "A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substances." J Mol Biol **114**(1): 119-132.
- Whittaker, M. and Ayscough, A. (2001).** "Matrix metalloproteinases and their inhibitors-current status and future challenges." Celltransmissions **17**: 3-14.

- Wietzorrek, A. and Bibb, M. (1997).** "A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold." Mol Microbiol **25**(6): 1181-1184.
- Wilk, S. and Orlowski, M. (1983).** "Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex." J Neurochem **40**(3): 842-849.
- Williams, G. J., Gantt, R. W. and Thorson, J. S. (2008).** "The impact of enzyme engineering upon natural product glycodiversification." Curr Opin Chem Biol **12**(5): 556-564.
- Winn, M., Fyans, J. K., Zhuo, Y. and Micklefield, J. (2016).** "Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines." Nat Prod Rep **33**(2): 317-347.
- Wohlleben, W., Mast, Y., Stegmann, E. and Ziemert, N. (2016).** "Antibiotic drug discovery." Microb Biotechnol **9**(5): 541-548.
- Wolf, F., Bauer, J. S., Bendel, T. M., Kulik, A., Kalinowski, J., Gross, H. and Kaysser, L. (2017).** "Biosynthesis of the beta-Lactone Proteasome Inhibitors Belactosin and Cystargolide." Angew Chem Int Ed Engl **56**(23): 6665-6668.
- Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M. and Neumann, S. J. B. B. (2010).** "In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra." **11**(1): 148.
- Wood, H. G., O'Brien W, E. and Micheales, G. (1977).** "Properties of carboxytransphosphorylase; pyruvate, phosphate dikinase; pyrophosphate-phosphofruktokinase and pyrophosphate-acetate kinase and their roles in the metabolism of inorganic pyrophosphate." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **45**: 85-155.
- Wright, G. D. (2014).** "Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery." Can J Microbiol **60**(3): 147-154.
- Yamanaka, K., Reynolds, K. A., Kersten, R. D., Ryan, K. S., Gonzalez, D. J., Nizet, V., Dorrestein, P. C. and Moore, B. S. (2014).** "Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(5): 1957-1962.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988).** "Yanagisawa M, Kurihara M, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K & Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature (London) 332: 411-415." Nature **332**: 411-415.
- Yoo, H. G., Kwon, S. Y., Karki, S. and Kwon, H. J. (2011).** "A new route to dTDP-6-deoxy-l-talose and dTDP-L-rhamnose: dTDP-L-rhamnose 4-epimerase in Burkholderia thailandensis." Bioorg Med Chem Lett **21**(13): 3914-3917.
- Zabala, D., Cartwright, J. W., Roberts, D. M., Law, B. J., Song, L., Samborsky, M., Leadlay, P. F., Micklefield, J. and Challis, G. L. (2016).** "A Flavin-Dependent Decarboxylase-Dehydrogenase-Monooxygenase Assembles the Warhead of alpha,beta-Epoxyketone Proteasome Inhibitors." J Am Chem Soc **138**(13): 4342-4345.
- Zaburannyi, N., Rabyk, M., Ostash, B., Fedorenko, V. and Luzhetskyy, A. (2014).** "Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome." BMC Genomics **15**: 97.

Zerikly, M. and Challis, G. L. (2009). "Strategies for the discovery of new natural products by genome mining." Chembiochem **10**(4): 625-633.

Zettler, J., Xia, H., Burkard, N., Kulik, A., Grond, S., Heide, L. and Apel, A. K. (2014). "New aminocoumarins from the rare actinomycete *Catenulispora acidiphila* DSM 44928: identification, structure elucidation, and heterologous production." Chembiochem **15**(4): 612-621.

Zettler, J., Zubeil, F., Kulik, A., Grond, S. and Kaysser, L. (2016). "Epoxomicin and Eponemycin Biosynthesis Involves gem-Dimethylation and an Acyl-CoA Dehydrogenase-Like Enzyme." Chembiochem **17**(9): 792-798.

Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. and Stewart, A. F. (1998). "A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*." Nat Genet **20**(2): 123-128.

Zhang, Y., Muyrers, J. P., Testa, G. and Stewart, A. F. (2000). "DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*." Nat Biotechnol **18**(12): 1314-1317.

Ziemert, N., Alanjary, M. and Weber, T. (2016). "The evolution of genome mining in microbes - a review." Nat Prod Rep **33**(8): 988-1005.

6 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Leonard Kaysser für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die wissenschaftliche Betreuung meiner kompletten Promotion und für die vielen produktiven Ratschläge, Diskussionen und Ermutigungen, sowie den großen Freiraum und die Flexibilität bei der Gestaltung meiner Dissertation bedanken.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Groß für die hilfreichen Anregungen und durchdachten Ideen in allen analytischen Bereichen, sowie für seine Bereitschaft als zweiter Prüfer.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Bertolt Gust für seine stetige Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen im Laboralltag und seine Tätigkeit als dritter Prüfer.

Frau Apl.-Prof. Dr. Evi Stegmann danke ich für die Bereitschaft als Prüferin bei der mündlichen Disputation.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Andreas Kulik für die schnellen LC-MS- und LC-MS/MS-Messungen, sowie für seine ständige und kompetente Unterstützung bedanken. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Dorothee Wistuba für die HR-MS-Messungen bedanken.

Vielen Dank an Irina Helmle für ihre große Hilfsbereitschaft bei den Messungen und Auswertungen der gesamten NMR-Proben im Talopeptin-Projekt.

Meinem Masterstudenten Marius Bader danke ich für seine Mitarbeit und sein Engagement während seiner Masterarbeit im Talopeptin-Projekt. Ebenso möchte ich den Studenten aus dem Wahlpflichtfach der Pharmazeutischen Biologie im WS 2015/2016 für die Hilfe bei der Erstellung verschiedener Fosmid-Bibliotheken danken.

Ein Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jörn Kalinowski für die fachkundige Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung und bei der Hilfe der Genomassemblierung. Ebenfalls danken möchte ich dem Biotechnologieunternehmen Entrechem für die Bereitstellung verschiedener Zuckerplasmide (pRHAM, pLN2, pLNBIV, pLNRHO und pFL947).

Ein weiterer Dank geht an Dr. Florian Zubeil aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephanie Grond für den Versuch neue Eponemycin-Derivate durch „MS Molecular Networking“ zu identifizieren, sowie Ass.-Prof. Dr. Chambers C. Hughes für die

DANKSAGUNG

Durchführung eines reaktivitätsgesteuerten Ansatzes zur Entdeckung epoxidbasierter Naturstoffe. Danken möchte ich auch Dr. Nicole Staudt für die Durchführung der Proteasom-Inhibitor-Assays im ersten Teilprojekt meiner Arbeit.

Vielen lieben Dank an Lucy, Emmanuel, Corinna, Kerstin und unsere vielen HiWis für ihre erstklassige Organisation der Labore, nicht weniger für die wertvollen Diskussionen und Hilfestellungen und die willkommenen Ablenkungen während der Mittagspausen.

Ich möchte Alicia, Daniel U., Dennis, Felix, Franziska L., Theresa und Tommy aus unserem Labor N31 für die sehr nette und unterhaltsame Arbeitsatmosphäre danken.

Herzlicher Dank gilt allen meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Pharmazeutischen Biologie für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit im Labor, die wissenschaftliche Diskussionen und die schöne Zeit, die wir auch außerhalb des Laboralltags miteinander hatten: Prof. Dr. Lutz Heide, Andri, Anina, Anna, Aziz, Carolina, Cathrin, Christine, Daniel M., Franziska W., Ghazaleh, Hamada, Henrike, Judith B., Judith Z., Julia, Junjing, Lina, Manuela, Nhomsai, Nils, Niraj, Norbert, Patricia, Patrick, Paulina, Roger, Simon, Thomas B., Tobias, Tomke, Zeyin und alle bereits oben genannten.

All meinen Freunden, Bekannten und Verwandten danke ich für die vielen Ratschläge, aufmunternden Worte und schönen Momente in den letzten Jahren, die mir besonders dabei geholfen haben ein Gleichgewicht zwischen Arbeit und Freizeit zu halten, und mir dadurch diese Forschungsarbeit ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern und meiner Familie für ihre bedingungslose Liebe und unglaubliche Unterstützung in den vergangenen Jahren danken. Während Höhen und Tiefen meiner Promotion habt ihr mir stets den Rücken freigehalten und mich immer wieder motiviert. Ich danke euch von ganzem Herzen.

7 ANHANG

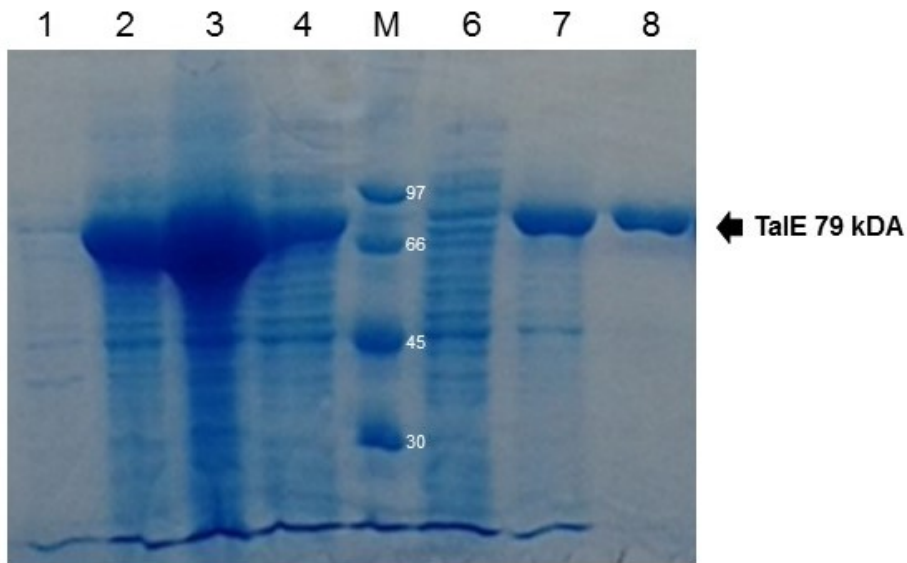


Abbildung 7.1 SDS-PAGE-Analyse der Expression und Reinigung von TalE übernommen von (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Marker (M): Proteingröße in kDa. Spur 1: Gesamtprotein vor der Induktion. Spur 2: Gesamtprotein nach IPTG-Induktion. Spur 3: Unlösliches Protein nach IPTG-Induktion. Spur 4: Lösliches Protein nach IPTG-Induktion. Spur 6: Durchfluss und Spur 7: Wäsche nach Ni-NTA-Agarose. Spur 8: 2,71 mg/L gereinigtes Protein von 79 kDa nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

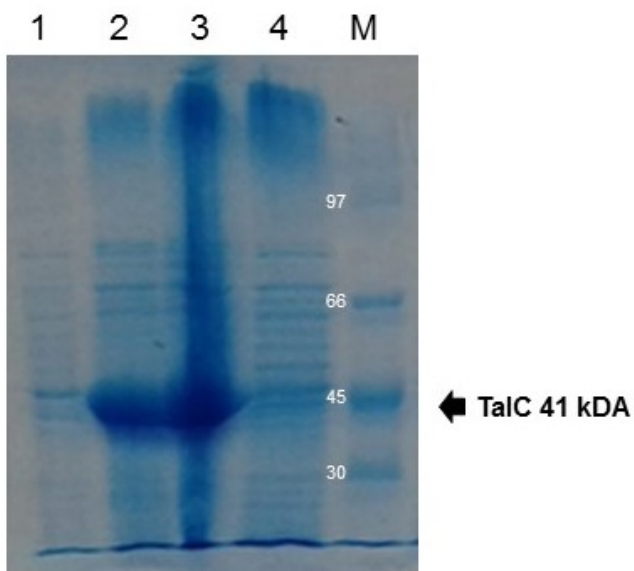


Abbildung 7.2 SDS-PAGE-Analyse der Expression von talC übernommen von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry. Marker (M): Proteingröße in kDa. Spur 1: Gesamtprotein vor der Induktion. Spur 2: Gesamtprotein nach IPTG-Induktion. Spur 3: Unlösliches Protein nach IPTG-Induktion. Spur 4: kein lösliches Protein nach IPTG-Induktion sichtbar.

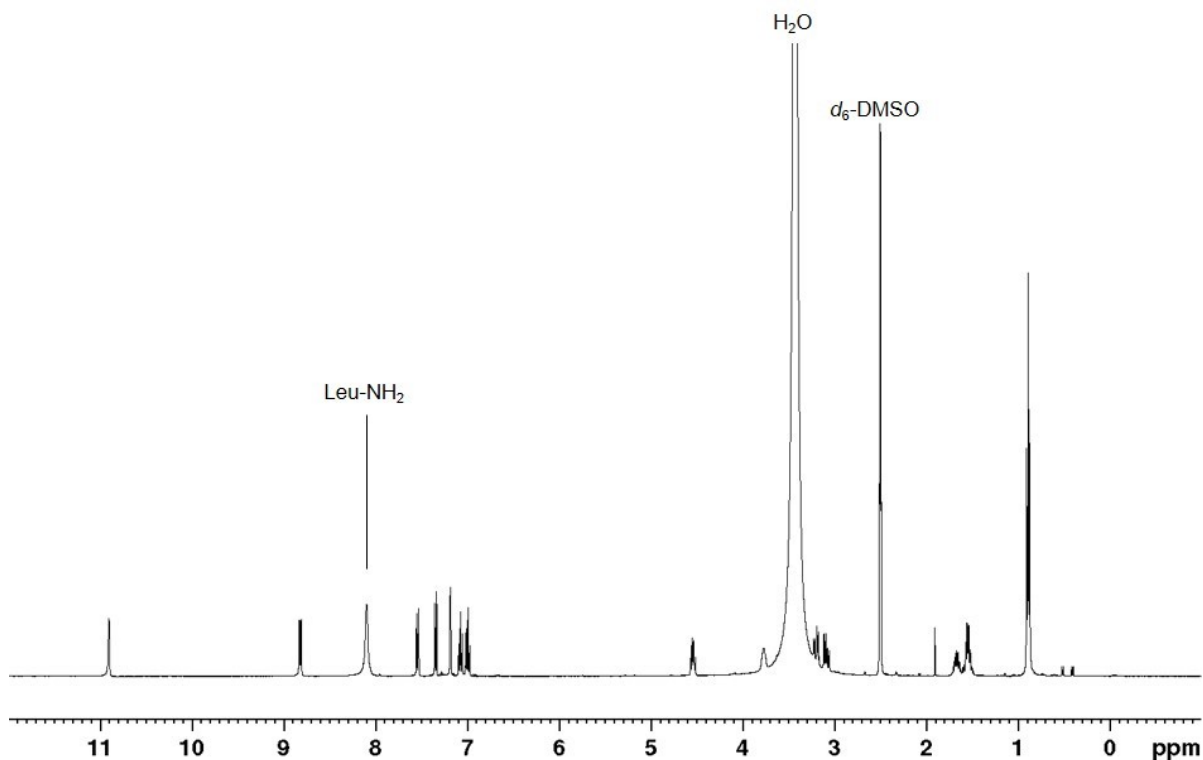


Abbildung 7.3 ^1H -NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6 + \text{H}_2\text{O}$ (400 MHz). Die Zugabe von H_2O ermöglichte den Nachweis von Leu- NH_2 , übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

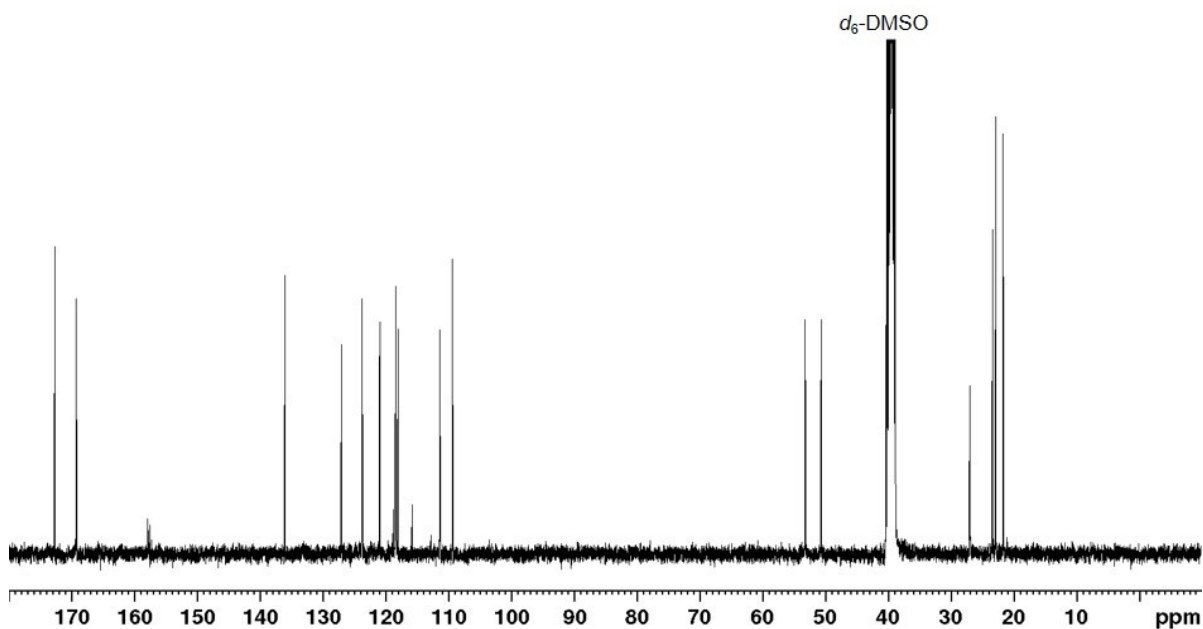


Abbildung 7.4 ^{13}C -NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6$ (101 MHz) übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

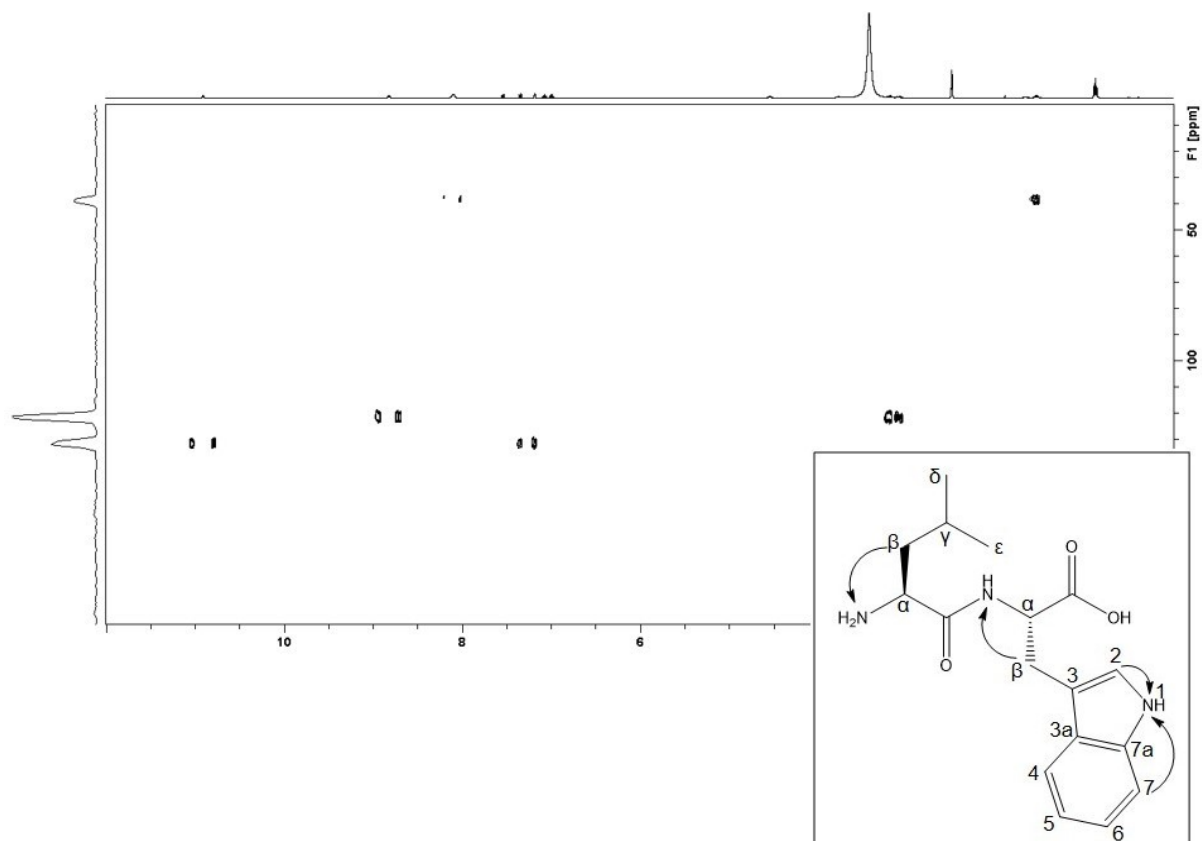


Abbildung 7.5 ^1H - ^{15}N -HMBC-NMR-Spektrum von Edukt Leu-Trp in $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz). Die ^1H - ^{15}N -HMBC-NMR-Korrelationen sind durch Pfeile in der Strukturformel dargestellt, übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

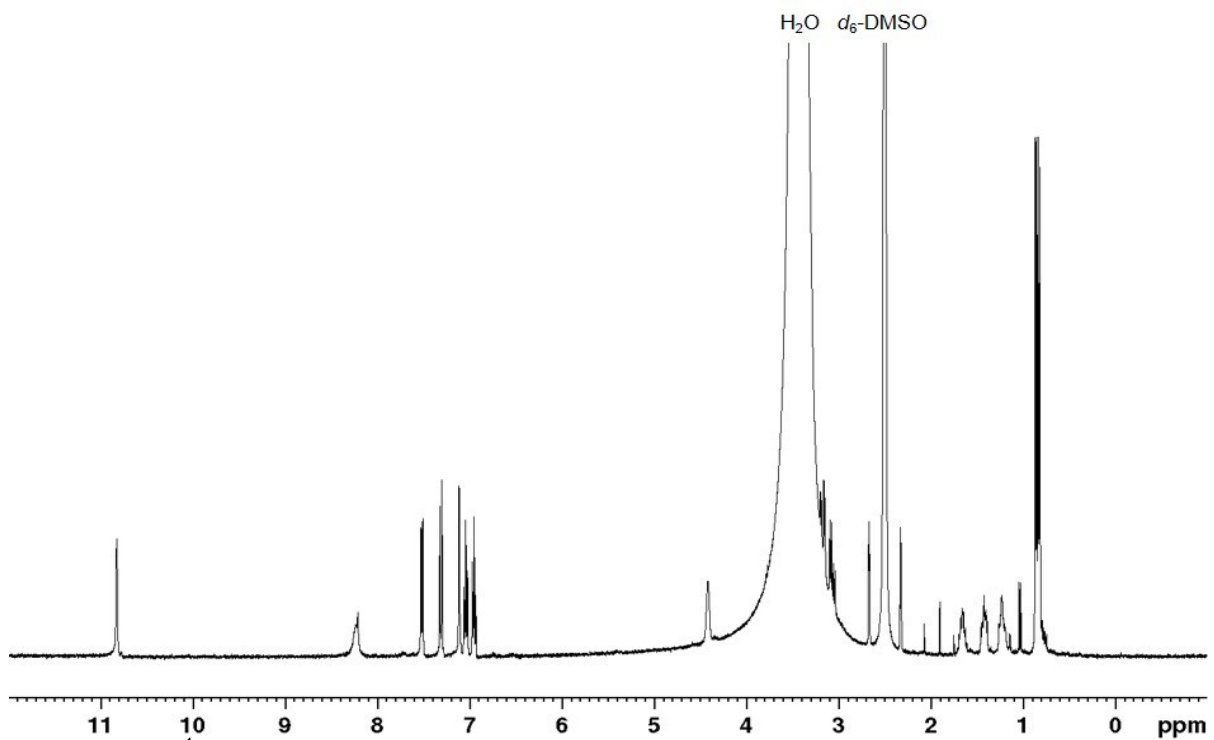


Abbildung 7.6 ^1H -NMR-Spektrum von P-Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz) übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

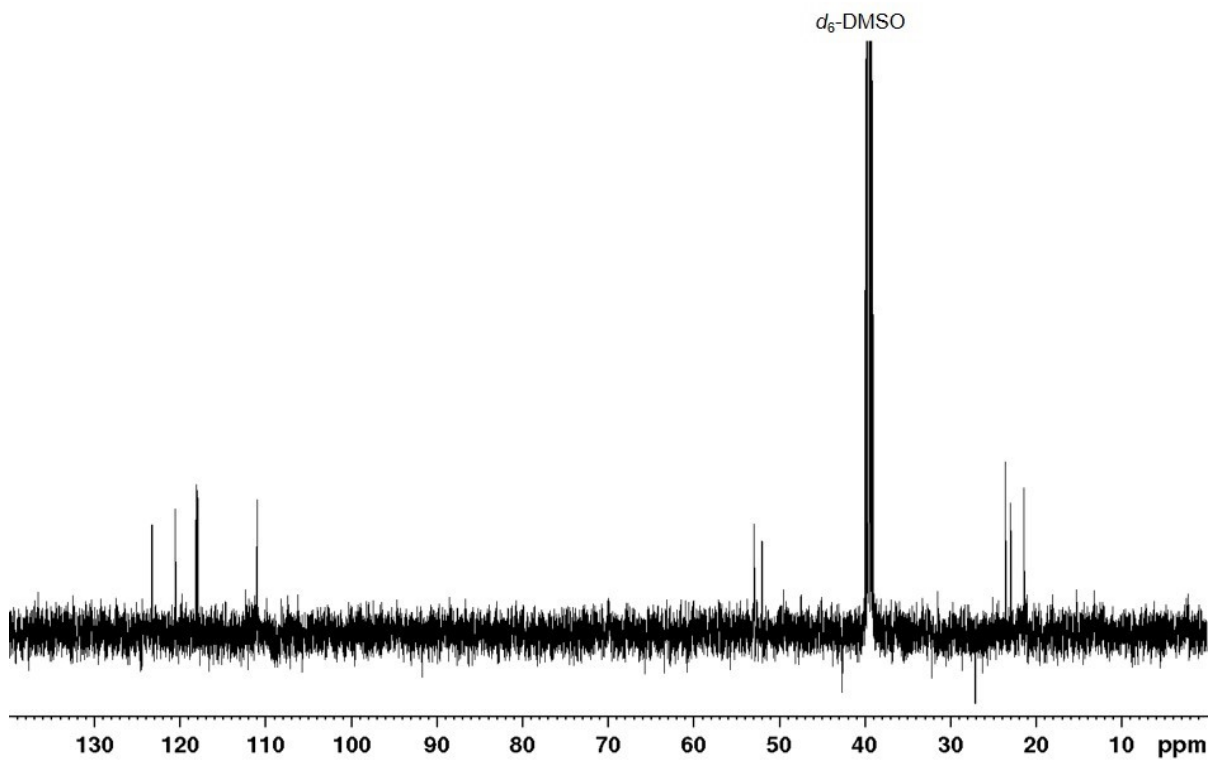


Abbildung 7.7 DEPT135-NMR-Spektrum von P-Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6$ (101 MHz) übernommen von (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

ANHANG

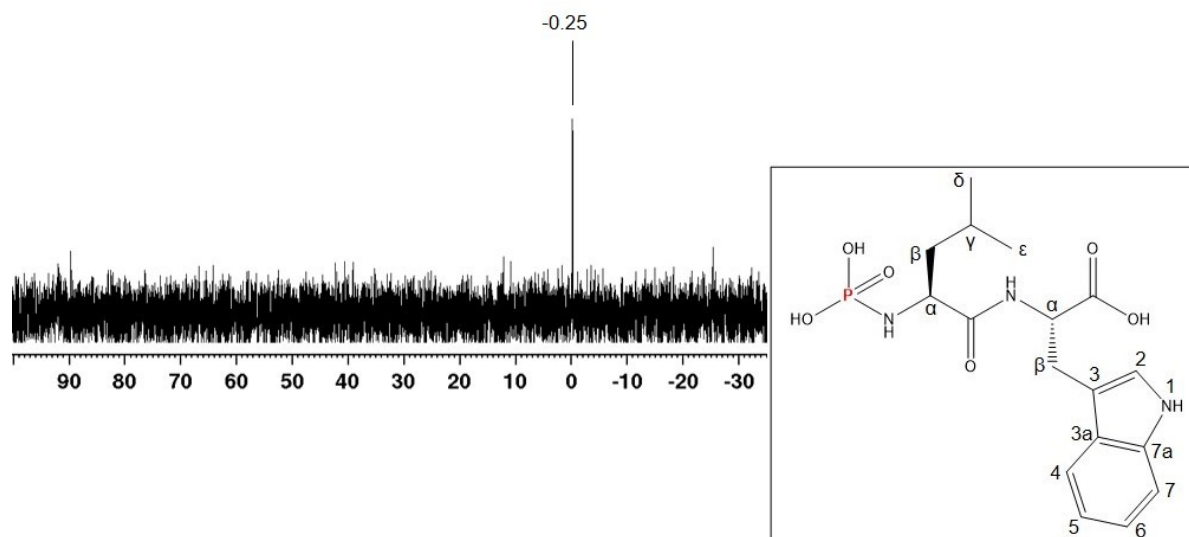


Abbildung 7.8 ^{31}P -NMR-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6$ (162 MHz). Das Phosphatatom ist rot markiert, übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019), gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

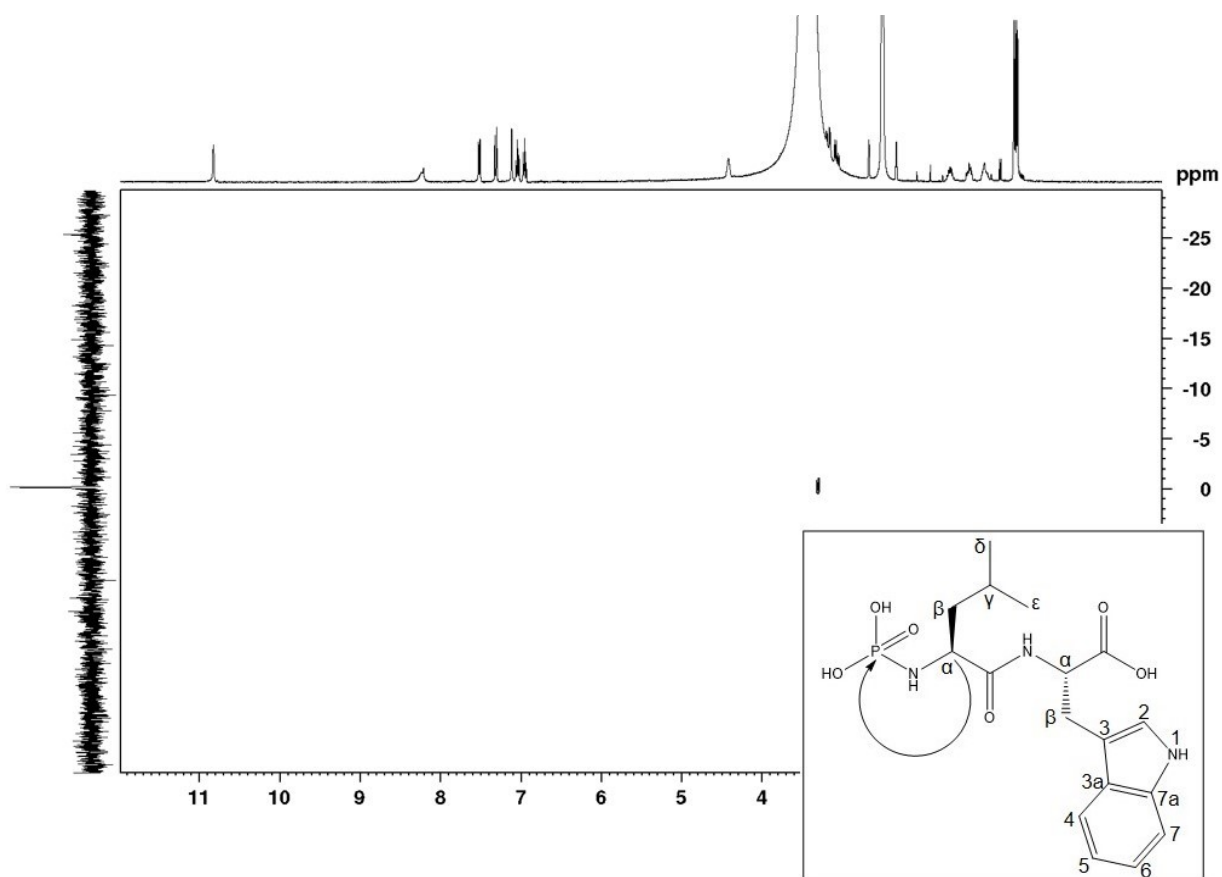


Abbildung 7.9 $^1\text{H-}^{31}\text{P}$ -HMBC-NMR-Spektrum von Produkt P-Leu-Trp in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz). Der Pfeil zeigt die $^1\text{H-}^{31}\text{P}$ -HMBC-NMR-Korrelation an, übernommen von (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

ANHANG

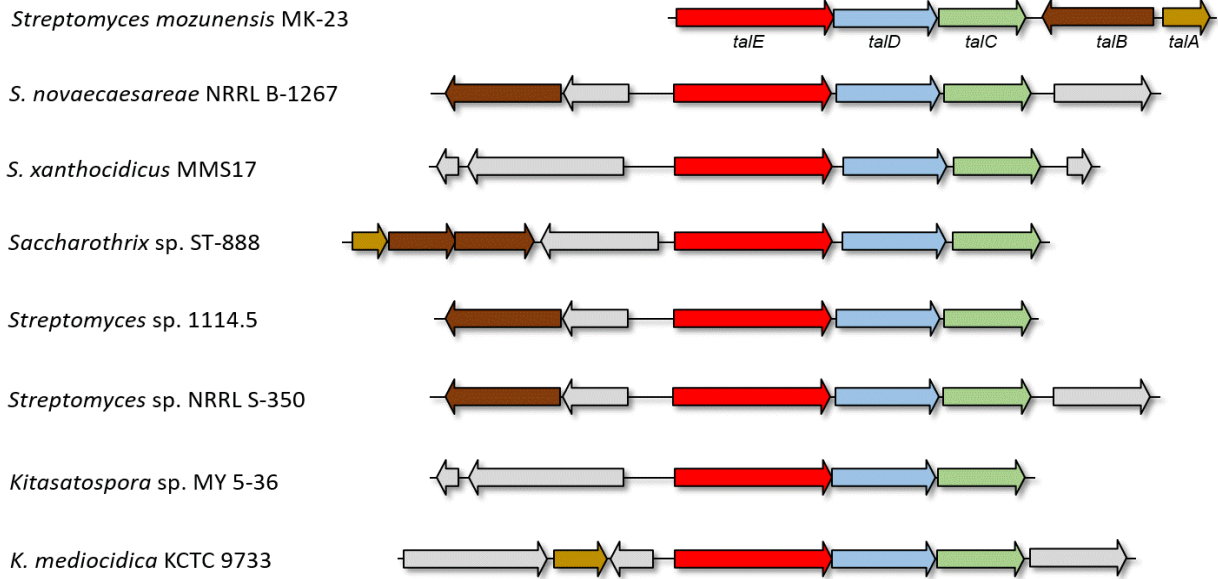


Abbildung 7.10 Homologe Phosphoramidat-Biosynthesewege. Ausgewählte „orphan“ Biosynthesewege, die ein *talCDE*-ähnliches mutmaßliches Operon enthalten, übernommen aus (Baulig *et al.*, 2019). Gedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

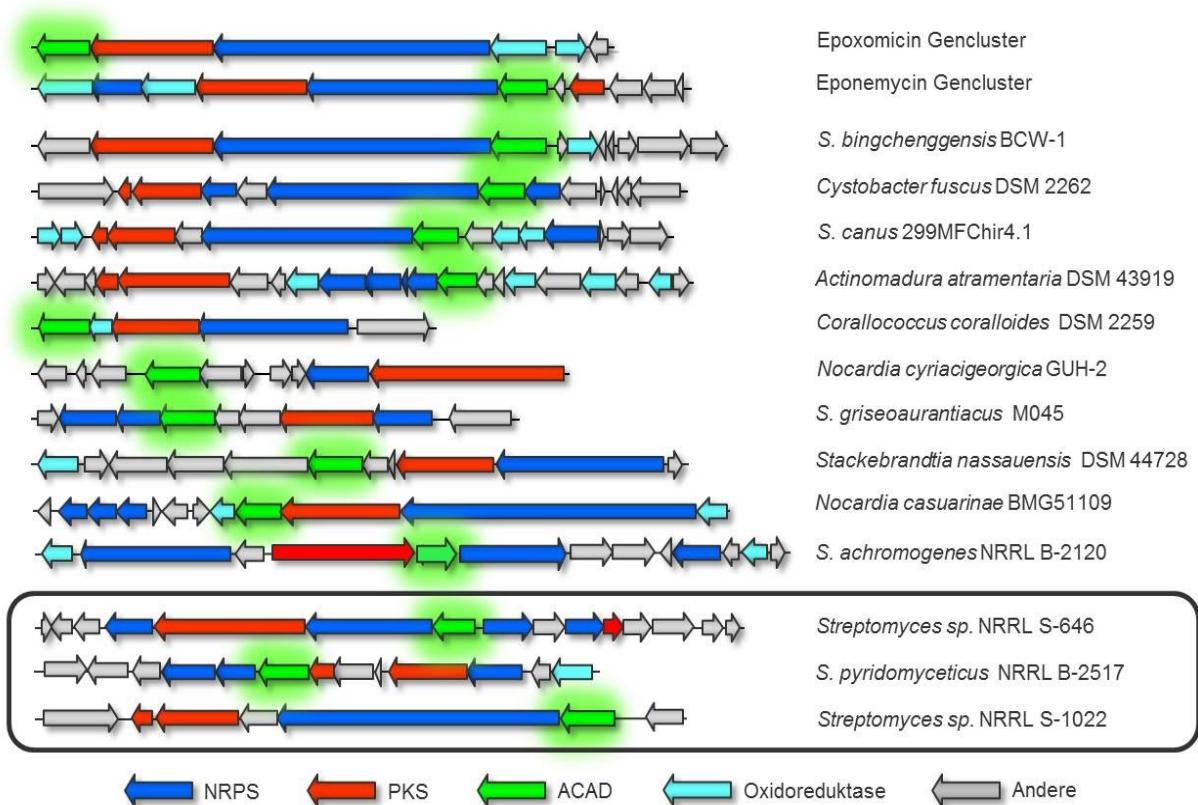


Abbildung 7.11 NRPS/PKS-Hybridgencluster aus verschiedenen Bakterien, die ein EpxF (ACAD)-Homolog enthalten aus (Schorn *et al.*, 2014), gedruckt mit Genehmigung von © 2014 American Chemical Society.