

Genomische und molekularbiologische  
Untersuchungen zum Biotransformationswirt  
*Saccharothrix espanaensis*

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

**TINA STROBEL**

aus Ettisweiler

Freiburg im Breisgau, Januar 2013





Dekan:	Prof. Dr. Andreas Bechthold
Vorsitzender des Promotionsausschusses:	Prof. Dr. Thorsten Koslowski
Referent:	Prof. Dr. Andreas Bechthold
Korreferentin:	Prof. Dr. Regine Süß
Datum der Promotion:	30. Januar 2013



**“Das Glück muss entlang der Straße gefunden werden,  
nicht am Ende des Wegs.”**

**- DAVID DUNN -**



---

## Wissenschaftliche Publikation

T. Strobel, A. Al-Dilaimi, J. Blom, A. Gessner, J. Kalinowski, M. Luzhetska, A. Pühler, R. Szczepanowski, A. Bechthold and C. Rückert (2012) **“Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229<sup>T</sup> and comparison to the other completely sequenced *Pseudonocardiaceae*”** BMC Genomics, 13, 465.

## Vorträge

**“News from Ses60310 - the flexible GT from *Saccharothrix espanaensis*”**

Drittes GenBioCom Verbundtreffen, Freudenstadt, 21. Mai 2012

**“Strategies to identify a highly flexible glycosyltransferase from *Saccharothrix espanaensis*”**

Doktorandenseminar, Freiburg, 17. April 2012

**“Identification of a highly flexible glycosyltransferase from *Saccharothrix espanaensis*”**

Zweites GenBioCom Verbundtreffen, Freudenstadt, 20. Juni 2011

**“Glycosyltransferases from *Saccharothrix espanaensis*”**

Erstes GenBioCom Verbundtreffen, Freudenstadt, 22. Oktober 2010

## Poster

T. Strobel, S. Samra, M. Berner and A. Bechthold **“Elucidating the biosynthetic pathway of the saccharomicins – New antibiotics from *Saccharothrix espanaensis*”** International Congress on Natural Products Research, New York, 28. Juli - 01. August 2012

T. Strobel, M. Luzhetska, A. Linnenbrink and A. Bechthold **“Glycosyltransferase Ses60310 from *Saccharothrix espanaensis* - Identification of a highly flexible enzyme”** Tag der Forschung der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Freiburg, 06. Juli 2012

T. Strobel, M. Luzhetska, A. Linnenbrink and A. Bechthold **“Identification of a highly flexible glycosyltransferase from *Saccharothrix espanaensis*”** Synthetic Biology of Antibiotic Production, Sant Feliu de Guixols, 02. - 07. Oktober 2011

---

T. Strobel, Y. Schmidt, M. Luzhetska, A. Linnenbrink und A. Bechthold **“Identification and characterization of Ses60310 – a highly flexible glycosyltransferase from *Saccharothrix espanaensis*”** VAAM Workshop “Biology of Bacteria Producing Natural Products”, Bonn, 28. - 30. September 2011

T. Strobel, M. Luzhetska, C. Rückert and A. Bechthold **“Taking advantage of the complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis*”** ProkaGENOMICS, Göttingen, 18. - 21. September 2011

T. Strobel, M. Luzhetska, A. Warkentin, V. P. Novikov and A. Bechthold **“Investigating a glycosylation factory - Biotransformation in *Saccharothrix espanaensis*”** VAAM Workshop “Biology of Bacteria Producing Natural Products”, Tübingen, 26. - 28. September 2010

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>17</b>
2.1	Die Geschichte der Genomsequenzierung.....	17
2.2	Sequenzierung von Bakteriengenomen .....	17
2.3	Naturstoffe aus Actinomyceten .....	20
2.4	Glycosylierte Naturstoffe .....	23
2.5	Der Actinomycet <i>Saccharothrix espanaensis</i> .....	24
2.5.1	<b><i>S. espanaensis</i> als Antibiotika-Produzent.....</b>	<b>25</b>
2.5.2	<b><i>S. espanaensis</i> als Biotransformationswirt .....</b>	<b>27</b>
2.6	Glycosyltransferasen .....	29
2.6.1	<b>Einteilung und Struktur .....</b>	<b>29</b>
2.6.2	<b>Glycosyltransferasen als Werkzeuge in der Biokatalyse .....</b>	<b>30</b>
2.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
3.1	<i>In silico</i> Untersuchungen zum Genom von <i>S. espanaensis</i> .....	33
3.1.1	<b>Sequenz-Analyse des Saccharomicin-Clusters.....</b>	<b>34</b>
3.1.2	<b>Identifizierung von Sekundärstoffclustern.....</b>	<b>37</b>
3.2	Untersuchungen zur Saccharomicin-Biosynthese .....	46
3.2.1	<b>Heterologe Expression von Kaffeesäure-Biosynthesegenen.....</b>	<b>46</b>
3.2.2	<b>Heterologe Expression des putativen Kaffeoyl-CoA-Ligasegens <i>sam7</i> .....</b>	<b>47</b>
3.2.3	<b>Identifizierung möglicher Taurin-Biosynthesegene .....</b>	<b>48</b>
3.2.4	<b>Plasmide zur Untersuchung der Biosynthese des Saccharomicin-Aglycons .....</b>	<b>49</b>
3.3	Biotransformationsexperimente mit <i>S. espanaensis</i> .....	49
3.3.1	<b>Biotransformation von Alizarin .....</b>	<b>50</b>
3.3.2	<b>Biotransformation von Aminoanthrachinonen in <i>S. espanaensis</i> .....</b>	<b>52</b>

3.4	Identifizierung des flexiblen Glycosyltransferasegens .....	53
3.4.1	<b>Genom-Analyse zur Identifizierung möglicher Kandidaten-Gene</b> .....	<b>53</b>
3.4.2	<b>Inaktivierung von Kandidaten-Genen</b> .....	<b>59</b>
3.4.3	<b>Heterologes Testsystem</b> .....	<b>63</b>
3.4.4	<b>Überprüfung der Aktivität von Ses60310 in <i>S. espanaensis</i></b> .....	<b>69</b>
3.5	SACE_2010 aus <i>S. erythraea</i> .....	75
3.5.1	<b>Biotransformation in <i>S. erythraea</i></b> .....	<b>75</b>
3.5.2	<b>Isolierung und Strukturanalyse von Sace_15</b> .....	<b>76</b>
3.5.3	<b>Fütterung von <i>S. albus</i> Rham x pUWL-A-sace_2010 mit Alizarin</b> .....	<b>76</b>
3.5.4	<b>Biotransformation von 1,4-Diaminoanthrachinon in <i>S. erythraea</i></b> .....	<b>77</b>
3.6	Biochemische Untersuchungen der GT Ses60310 .....	80
3.6.1	<b>Proteinpräparation von Ses60310</b> .....	<b>80</b>
3.6.2	<b><i>In vitro</i> Aktivitätsassays</b> .....	<b>82</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
4.1	<i>In silico</i> Untersuchungen zum Genom von <i>S. espanaensis</i> .....	87
4.1.1	<b>Vergleich der Genome aus der Familie der <i>Pseudonocardiaceae</i></b> .....	<b>87</b>
4.1.2	<b>Sekundärstoff-Cluster aus dem Genom von <i>S. espanaensis</i></b> .....	<b>88</b>
4.2	Saccharomicin-Biosynthese .....	90
4.2.1	<b>Biosynthese des Saccharomicin Aglycons</b> .....	<b>90</b>
4.2.2	<b>Der Ursprung des Taurins</b> .....	<b>92</b>
4.3	<i>S. espanaensis</i> als Biotransformationswirt .....	94
4.4	Identifizierung der flexiblen Glycosyltransferase aus <i>S. espanaensis</i> .....	95
4.4.1	<b>Glycosyltransferasen aus <i>S. espanaensis</i></b> .....	<b>95</b>
4.4.2	<b>Sequenzanalysen zur Identifizierung der gesuchten GT</b> .....	<b>97</b>
4.4.3	<b>Experimentelle Identifizierung der flexiblen GT aus <i>S. espanaensis</i></b> .....	<b>98</b>
4.5	Neue Biotransformationsprodukte im heterologen Testsystem .....	101
4.6	Neue Biotransformationsprodukte in <i>S. espanaensis</i> $\Delta$ 7665 .....	103
4.7	Sequenzanalyse von <i>ses60310</i> und der umliegenden Gene .....	104
4.8	Der Biotransformationswirt <i>S. erythraea</i> .....	106
4.9	Biochemische Untersuchungen der GT Ses60310 .....	108

---

<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>111</b>
5.1	Chemikalien und andere Verbrauchsmittel .....	111
5.1.1	<b>Medien- und Pufferbestandteile .....</b>	<b>111</b>
5.1.2	<b>Chemikalien für Glycosylierungsexperimente .....</b>	<b>112</b>
5.1.3	<b>Andere Chemikalien .....</b>	<b>112</b>
5.1.4	<b>Organische Lösungsmittel .....</b>	<b>113</b>
5.1.5	<b>Antibiotika .....</b>	<b>113</b>
5.1.6	<b>Enzyme und Kits.....</b>	<b>114</b>
5.1.7	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>114</b>
5.2	Puffer und Lösungen .....	115
5.2.1	<b>Lösungen zur DNA Isolierung.....</b>	<b>115</b>
5.2.2	<b>Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung aus Actinomyceten.....</b>	<b>115</b>
5.2.3	<b>Puffer und Lösungen zur DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>115</b>
5.2.4	<b>Antibiotika-Lösungen.....</b>	<b>116</b>
5.2.5	<b>Lösungen zur Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>-Zellen.....</b>	<b>117</b>
5.2.6	<b>Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion.....</b>	<b>117</b>
5.2.7	<b>Lösungen zur Herstellung von Dauerkulturen .....</b>	<b>117</b>
5.2.8	<b>Puffer zur Proteinisolierung aus <i>E. coli</i> .....</b>	<b>118</b>
5.2.9	<b>Puffer und Lösungen zur Durchführung einer SDS-PAGE.....</b>	<b>118</b>
5.2.10	<b>Stocklösungen zur Durchführung von <i>in vitro</i> Aktivitätsassays .....</b>	<b>120</b>
5.3	Nährmedien .....	120
5.3.1	<b>Nährmedium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>.....</b>	<b>121</b>
5.3.2	<b>Nährmedium zur Kultivierung von Actinomyceten.....</b>	<b>121</b>
5.3.3	<b>Nährmedium zur Intergenerischen Konjugation .....</b>	<b>121</b>
5.3.4	<b>Nährmedium für <i>in vivo</i> Glycosylierungsexperimente .....</b>	<b>121</b>
5.3.5	<b>Nährmedium zur Produktion von Kaffeesäure in <i>S. albus</i> .....</b>	<b>121</b>
5.4	Verwendete Plasmide und Vektoren .....	122
5.4.1	<b>In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide.....</b>	<b>122</b>
5.4.2	<b>In dieser Arbeit erstellte Plasmide .....</b>	<b>123</b>
5.5	Bakterienstämme .....	124
5.5.1	<b>In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i>-Stämme.....</b>	<b>124</b>
5.5.2	<b>In dieser Arbeit verwendete Actinomyceten-Stämme.....</b>	<b>125</b>
5.6	Software, Datenbanken und Internetservices .....	126
5.7	Methoden der Mikrobiologie.....	126
5.7.1	<b>Kultivierung und Herstellung von Dauerkulturen von <i>E. coli</i>.....</b>	<b>126</b>

---

5.7.2	<b>Kultivierung von Actinomyceten-Stämmen und Herstellung von Dauerkulturen</b> .....	127
5.7.3	<b>Transformation von <i>E. coli</i></b> .....	127
5.7.4	<b>Blau-Weiß-Selektion in <i>E. coli</i></b> .....	129
5.7.5	<b>Intergenerische Konjugation</b> .....	129
5.7.6	<b><i>In vivo</i> Glycosylierungsexperimente</b> .....	130
5.8	<b>Methoden der Molekularbiologie</b> .....	131
5.8.1	<b>Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i></b> .....	131
5.8.2	<b>Isolierung genomischer DNA aus Actinomyceten-Stämmen</b> .....	132
5.8.3	<b>DNA-Sequenzierung</b> .....	132
5.8.4	<b>DNA-Fällung und Konzentrierung</b> .....	132
5.8.5	<b>Restriktionsanalyse von DNA</b> .....	133
5.8.6	<b>Agarose-Gelelektrophorese</b> .....	133
5.8.7	<b>Ligation</b> .....	133
5.8.8	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b> .....	134
5.9	<b>Konstruktion von Plasmiden</b> .....	139
5.9.1	<b>Klonierung von Saccharomicin-Biosynthesegenen</b> .....	139
5.9.2	<b>Klonierung von pTOS-Rham</b> .....	141
5.9.3	<b>Klonierung von Glycosyltransferasegenen</b> .....	141
5.9.4	<b>Klonierung von Inaktivierungskonstrukten</b> .....	142
5.9.5	<b>Klonierung des Komplementierungskonstrukts pSET-7665</b> .....	144
5.9.6	<b>Klonierung von Plasmiden zur Proteinpräparation</b> .....	145
5.10	<b>Geninaktivierung in <i>S. espanaensis</i></b> .....	145
5.10.1	<b>Erstellung von Inaktivierungskonstrukten</b> .....	145
5.10.2	<b>Gewinnung und Nachweis einer Singlecrossover-Mutante</b> .....	146
5.10.3	<b>Gewinnung und Nachweis einer Doppelcrossover-Mutante</b> .....	146
5.11	<b>Proteinpräparation und Analytik</b> .....	147
5.11.1	<b>Heterologe Proteinsynthese in <i>E. coli</i></b> .....	147
5.11.2	<b>Zellaufschluss mittels French Pressure Cell Press</b> .....	148
5.11.3	<b>Proteinpräparation mit dem ÄKTA-FPLC-System</b> .....	148
5.11.4	<b>Proteinkonzentrierung</b> .....	150
5.11.5	<b>Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</b> .....	150
5.11.6	<b>SDS-PAGE</b> .....	151
5.11.7	<b><i>In vitro</i> Aktivitätsassays</b> .....	151
5.12	<b>Isolierung und Analytik von bakteriellen Sekundärstoffen</b> .....	153
5.12.1	<b>Extraktion glycosylierter Biotransformationsprodukte und Kaffeesäure</b> .....	153
5.12.2	<b>Festphasenextraktion</b> .....	154

5.12.3	<b>Präparative Dünnschichtchromatographie</b> .....	<b>154</b>
5.12.4	<b>Säulenchromatographie</b> .....	<b>155</b>
5.12.5	<b>Analytische HPLC/ESI-MS</b> .....	<b>155</b>
5.12.6	<b>Strukturaufklärung mittels NMR</b> .....	<b>158</b>
5.13	<i>In silico</i> Genom-Analyse .....	158
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>161</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>CLXXIX</b>
7.1	Abkürzungen .....	CLXXIX
7.2	Sekundärstoffcluster aus <i>S. espanaensis</i> .....	CLXXXV
7.3	Nichtribosomale Peptidsynthase Cluster .....	CLXXXVI
7.4	Polyketidsynthase Cluster .....	CLXXXVIII
7.5	NMR-Daten .....	CXC
7.5.1	<b>AliPro2</b> .....	<b>CXC</b>
7.5.2	<b>AliC1</b> .....	<b>CXCI</b>
7.5.3	<b>AliProN</b> .....	<b>CXCII</b>
7.5.4	<b>AliPro4</b> .....	<b>CXCIV</b>
7.5.5	<b>Sace_15</b> .....	<b>CXCV</b>
7.5.6	<b>U3-8</b> .....	<b>CXCVI</b>
7.5.7	<b>U3-21</b> .....	<b>CXCVII</b>
7.6	Plasmidkarten .....	CXCVIII
7.6.1	<b>pTESb-sam8+5</b> .....	<b>CXCVIII</b>
7.6.2	<b>pSET*sam7</b> .....	<b>CXCVIII</b>
7.6.3	<b>pTOS*sam7+5+8</b> .....	<b>CXCIX</b>
7.6.4	<b>pTOS*sam7+5+8+36</b> .....	<b>CXCIX</b>
7.6.5	<b>pTOS-Rham</b> .....	<b>CC</b>
7.6.6	<b>pUWL-A-698</b> .....	<b>CC</b>
7.6.7	<b>pUWL-A-7665</b> .....	<b>CCI</b>
7.6.8	<b>pUWL-A-7668</b> .....	<b>CCI</b>
7.6.9	<b>pUWL-A-sace_2010</b> .....	<b>CCII</b>
7.6.10	<b>pKCA6130</b> .....	<b>CCII</b>
7.6.11	<b>pKCA6266</b> .....	<b>CCIII</b>
7.6.12	<b>pKCA6449</b> .....	<b>CCIII</b>

---

<b>7.6.13</b>	<b>pKCA6609</b> .....	<b>CCIV</b>
<b>7.6.14</b>	<b>pKCA7665</b> .....	<b>CCIV</b>
<b>7.6.15</b>	<b>pSET-7665</b> .....	<b>CCV</b>
<b>7.6.16</b>	<b>pET28a-7665-N-his</b> .....	<b>CCV</b>
<b>7.6.17</b>	<b>pET28b-7665-C-his</b> .....	<b>CCVI</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>CCVII</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

*Saccharothrix espanaensis* (*S. espanaensis*) ist ein grampositives Bodenbakterium, das zur Familie der *Pseudonocardiaceae* gehört. Dieser Stamm produziert die beiden Antibiotika Saccharomicin A und B. Bei diesen Substanzen handelt es sich um die Vertreter einer neuen Wirkstoffklasse mit Aktivität gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente Enterokokken. Neben der Produktion von bioaktiven Naturstoffen ist *S. espanaensis* bekannt für seine Biotransformationsaktivität. Der Stamm nimmt dabei Xenobiotika auf, die dem Medium während der Kultivierung zugegeben werden. Diese Substanzen werden durch den Stamm mit Rhamnose konjugiert, bevor sie in glycosylierter Form wieder ins Kulturmedium abgegeben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genomsequenz von *S. espanaensis* untersucht. Das Genom ist zirkulär, 9.360.653 bp lang und codiert für 8.427 Proteine. Die Neuannotierung des Saccharomicin-Clusters hat zusammen mit der vollständigen Genomsequenz einen weiterführenden Einblick in die Saccharomicin-Biosynthese gewährt. Neben dem Saccharomicin-Cluster wurden in der Genomsequenz 25 zusätzliche Biosynthese-Gencluster identifiziert. Diese Cluster codieren für Enzyme, welche die Synthese von Naturstoffen katalysieren, die in *S. espanaensis* bisher nicht detektiert wurden. Bei den Produkten dieser Cluster handelt es sich um Terpene, ribosomale und nichtribosomale Peptide, Polyketide, Hybride aus nichtribosomalen Peptiden und Polyketiden, Melanin und ein Aminocyclitol-Derivat.

Die Biotransformationsaktivität von *S. espanaensis* wurde im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Die Strukturen der glycosylierten Alizarin-Derivate AliPro2 und AliC1 wurden aufgeklärt und es wurden Fütterungsexperimente mit Aminoanthrachinonen durchgeführt. Zur Klärung der Frage, welches Gen für die Glycosylierung von Xenobiotika in *S. espanaensis* verantwortlich ist, wurde die Genomsequenz auf Glycosyltransferasegene (GT-Gene) untersucht. Unter den insgesamt 106 GT-Genen wurde mit Hilfe von Sequenzanalysen, einem heterologen Testsystem und Geninaktivierungsexperimenten das Gen *ses60310* identifiziert. Es wurde nachgewiesen, dass dieses Gen für die flexible GT codiert, welche für die Glycosylierung der diversen Xenobiotika in *S. espanaensis* verantwortlich ist. Mit Hilfe des heterologen Testsystems wurde gezeigt, dass diese Glycosyltransferase (GT) neben aktivierter L-Rhamnose auch L-Olivose überträgt. Die Inaktivierung des Gens *ses60310* in *S. espanaensis* führte zu einer Mutante, die zugefütterte Substanzen nicht glycosylieren kann. Diese Inaktivierungsmutante zeigt aber trotzdem Biotransformationsaktivität. Einige der zugefütterten Xenobiotika wurden hydroxyliert, für Alizarin konnte zusätzlich eine Methylierung detektiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der Biotransformation in *S. espanaensis* um einen Mechanismus handelt, um Xenobiotika zu detoxifizieren oder zu eliminieren.

Die GT Ses60310 zeigt Sequenzähnlichkeit zur GT SACE\_2010 aus *Saccharopolyspora erythraea* (*S. erythraea*). Mit Hilfe des heterologen Testsystems wurde gezeigt, dass dieses Enzym die Testsubstanz Alizarin ebenfalls glycosyliert. Bei der Fütterung von *S. erythraea* mit 1,4-Diaminoanthrachinon (U3) wurde gezeigt, dass der Stamm Aminosubstituenten von Xenobiotika acetylieren und glycosylieren kann. Die GT SACE\_2010 ist jedoch nicht für die Konjugation von U3 mit Glucose verantwortlich. Der Biotransformationswirt *S. erythraea* besitzt demnach eine weitere GT, die für die Glucosylierung von Substanzen mit Aminosubstituenten zuständig ist.

Das Enzym Ses60310 wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert. Das Protein zeigt *in vitro* Glycosylierungsaktivität. Die Reaktion von Alizarin und dTDP-Rhamnose zu AliPro1 und dTDP wird durch Ses60310 katalysiert. Es wurde gezeigt, dass für diese Reaktion bei pH 8,8 und einer Inkubationstemperatur von 37 °C am meisten glycosyliertes Produkt entsteht. Weiterhin wurden für diese Reaktion die enzymkinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  bestimmt.

GTs, die Xenobiotika glycosylieren, zeichnen sich durch ihre hohe Akzeptor-Substratflexibilität aus. Bei Ses60310 und SACE\_2010 handelt es sich demnach um wertvolle Enzyme, die als Werkzeuge in der enzymatischen Katalyse eingesetzt werden können. Aus diesem Grund sind die GTs, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert wurden, ein enormer Gewinn für die „Freiburger Glycosyltransferase-Toolbox“.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die Geschichte der Genomsequenzierung

Im Jahr 1977 haben Sanger *et al.* mit der Nukleotidsequenz des Bakteriophagen  $\Phi$  X174 das erste Genom vollständig sequenziert <sup>[15]</sup>. Die Methode, die zur Sequenzierung dieses 5.386 Basenpaar (bp) großen Genoms führte, wurde in den folgenden Jahren weiterentwickelt, sodass 1993 das 186 kb große Genom des Pocken-Virus *Orthopoxvirus variola* vollautomatisiert sequenziert werden konnte <sup>[16]</sup>. Im Jahr 1995 wurde das erste Genom eines lebenden Organismus sequenziert <sup>[17]</sup>. Dabei handelte es sich um das Bakterium *Haemophilus influenzae* Rd. Die Sequenzierung der 1,8 Mb langen Nukleotidsequenz dauerte damals 13 Monate und kostete circa 50 US-Cent pro bp <sup>[18]</sup>.

Im Jahr 1990 wurde zur Sequenzierung des menschlichen Genoms das internationale Humangenomprojekt gegründet. Insgesamt 2.800 Wissenschaftler arbeiteten an der Verwirklichung dieses Projekts. Die Sequenzierung der 3,27 Gb wurde 2003 abgeschlossen und kostete insgesamt 2,7 Milliarden US-\$ <sup>[19]</sup>. Im Lauf der Jahre haben sich die Technologien zur Genomsequenzierung immer weiter verbessert, sodass es bald möglich sein soll, das menschliche Genom in wenigen Stunden für circa 1.000 US-\$ zu sequenzieren. Die X PRIZE Foundation hat für Januar 2013 einen Wettbewerb ins Leben gerufen. Ziel ist die Sequenzierung 100 menschlicher Genome innerhalb von 30 Tagen für weniger als 1.000 US-\$ pro Genom mit weniger als einem Fehler pro Mb. Das Team, welches dieses Ziel zuerst erreicht, gewinnt 10 Millionen US-\$ <sup>[20]</sup>.

### 2.2 Sequenzierung von Bakteriengenomen

Nach der vollständigen Sequenzierung von *Haemophilus influenzae* Rd folgten die Genome von Modellorganismen wie *Escherichia coli* (*E. coli*) <sup>[21]</sup> und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) <sup>[22]</sup>. Die Sequenzierung dieser Genome führte zur Identifizierung aller Gene, die zum Überleben dieser freilebenden Zellen nötig sind. Die Organisation der Gene und die Verteilung von codierenden und nichtcodierenden Bereichen konnte mit Hilfe der Genomsequenz aufgeklärt werden <sup>[23]</sup>. Zusätzlich wurden die genetischen Informationen, die für verschiedene Virulenzfaktoren codieren, identifiziert. Die Möglichkeit anhand der Genomsequenz die Ursache der Pathogenität eines Bakteriums zu erkennen und damit mögliche Angriffspunkte zur Bekämpfung dieser Keime zu identifizieren, hat in den folgenden Jahren zur Sequenzierung verschiedener Arten von Infektionserregern geführt <sup>[24-27]</sup>. Die neuesten Sequenziermethoden erlauben heutzutage klinisch relevante Serotypen innerhalb kürzester Zeit zu sequenzieren. Zwischen Mai und Juli 2011 war beispielsweise der Stamm *E. coli* O104:H4 für eine EHEC-Epidemie in Deutschland verantwortlich. Laut dem Robert-Koch-Institut wurden insgesamt 3842 Menschen infiziert von denen 53 starben <sup>[28]</sup>. Das Genom dieses Erregers wurde in einer Kooperation

---

von Forschern des chinesischen Beijing-Genomics-Institute und des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf drei Tage nach Erhalt der DNA sequenziert. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden im Internet veröffentlicht, sodass Bioinformatiker auf der ganzen Welt gemeinsam an der Analyse der Genomdaten arbeiten konnten. In weniger als einer Woche konnte gezeigt werden, dass der Erreger von einem enteroaggregativen *E. coli* abstammt, der Gene zur Produktion von Shigatoxin 2 und zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen erworben hat <sup>[29]</sup>. Verschiedene klinische Isolate dieses *E. coli*-Stamms waren somit die ersten Erregerstämme, deren Genome noch während einer laufenden Epidemie entschlüsselt werden konnten <sup>[29,30]</sup>.

Neben bakteriellen Krankheitserregern werden auch apathogene Bakterienstämme sequenziert. Beispielsweise besteht die Ordnung Actinomycetales mit wenigen Ausnahmen aus Arten, die nicht pathogen sind. Trotzdem sind die Genomsequenzen von einigen Vertretern dieser Ordnung von großem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. Actinomyceten sind grampositive Bakterien mit einer Genomsequenz, die einen hohen Gehalt der Basen Guanin und Cytosin aufweist. Einige Vertreter dieser Ordnung sind bekannte Naturstoffproduzenten. Von allen bekannten bioaktiven Stoffen, die von Mikroorganismen produziert werden, stammen 45 % aus Actinomyceten <sup>[31]</sup>. Die Gene, die für die Biosynthese dieser Sekundärstoffe codieren, liegen in sogenannten Clustern im Genom dicht beieinander <sup>[32,33]</sup>. Anhand der Genomsequenz von Actinomyceten kann somit auf die Anzahl der möglichen Sekundärstoffe geschlossen werden, die durch den jeweiligen Stamm produziert werden können. Die ersten Vertreter der apathogenen Actinomyceten, deren Genome vollständig sequenziert wurden, waren *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) <sup>[34]</sup> und *Streptomyces avermitilis* (*S. avermitilis*) <sup>[35]</sup>, die Modelorganismen der Gattung *Streptomyces*. Durch elektrophoretische Analysen war damals bereits bekannt, dass Streptomyceten lineare Genome besitzen <sup>[36]</sup>. Diese Beobachtung konnte mit Hilfe der erhaltenen Genomsequenzen bestätigt werden. Die linearen Genome werden ausgehend von einem Zentromer in der Mitte des Genoms bidirektional repliziert. Die Genomsequenz hat gezeigt, dass die Gene, die für das Überleben der Zelle essentiell sind, in der näheren Umgebung des Zentromers liegen. Nicht-essentielle Gene liegen weiter außen an den linearen Enden der Genome. Zu diesen nicht-essentiellen Genen gehören auch die Gencluster, die für die Biosynthese der bakteriellen Sekundärstoffe codieren. Neben den bekannten Sekundärstoff-Clustern konnten in den Genomen von *S. coelicolor* und *S. avermitilis* noch zusätzliche Cluster identifiziert werden, die für bis dahin nicht detektierte Sekundärstoffe codieren. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass das Potential zur Produktion von Sekundärstoffen in Streptomyceten nur zu circa 10 % ausgeschöpft wird und dass die Genomsequenz den Zugang zu einer Vielzahl neuer bioaktiver Naturstoffe eröffnet <sup>[34,35,37]</sup>.

Streptomyceten-Stämme lassen sich einfach aus Bodenproben isolieren und im Labor kultivieren. Aus diesem Grund stammen circa 75 % der bekannten bioaktiven Naturstoffe, die von Actinomyceten produziert werden, von Bakterien der Gattung *Streptomyces* <sup>[31]</sup>. Die seltenen Actinomyceten sind schwieriger kultivierbar, aber ebenfalls in der Lage hochpotente Sekundärstoffe zu produzieren. Die Familie

---

der *Pseudonocardiaceae* gehört zu den seltenen Actinomyceten und enthält wichtige Naturstoff-Produzenten wie zum Beispiel den Erythromycin-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338 (*S. erythraea*), den Vancomycin-Produzenten *Amycolatopsis orientalis* (*A. orientalis*) und den Rifamycin SV-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* U32 (*A. mediterranei*). Der erste Vertreter dieser Familie, dessen Genom vollständig sequenziert wurde, war *S. erythraea*<sup>[38]</sup>. Abgesehen davon, dass dieses Genom zirkulär aufgebaut ist, ist es denen der Streptomyceten sehr ähnlich. Die essentiellen Gene befinden sich ebenfalls in der Nähe ihres Replikationsursprungs. Nicht-essentielle Gene, wie Sekundärstoff-Cluster, liegen im unteren Teil des Genoms nahe dem Replikationsende. Durch die Sequenzierung des Genoms von *S. erythraea* konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm, neben dem Erythromycin-Cluster, 29 weitere Biosynthese-Cluster besitzt<sup>[38]</sup>.

Die Entwicklung von Sequenziermethoden der zweiten und dritten Generation führte dazu, dass auch Actinomyceten-Genome schnell und kostengünstig sequenziert werden können. Im November 2012 waren insgesamt 6 Stämme aus der Familie der *Pseudonocardiaceae* vollständig sequenziert. Die Zahl der öffentlich zugänglichen Shotgun-Sequenzen in den Datenbanken von NCBI oder dem Broad Institute war deutlich höher. Die Gründe für die Sequenzierung eines bestimmten Actinomyceten-Genoms sind unterschiedlich. Durch die Sequenzierung des Erythromycin- beziehungsweise des Rifamycin-Produzenten wurde erhofft, dass die Genomsequenzen einen tieferen Einblick in die zellulären Abläufe gewähren, die zur Produktion dieser Antibiotika führen<sup>[38,39]</sup>. Diese Erkenntnisse sollten anschließend genutzt werden, um die Produktivität der Stämme zu erhöhen. Die DNA-Sequenz anderer Actinomyceten-Genome soll ebenfalls zur Erhöhung der Ausbeute bekannter Sekundärmetabolite oder zur Identifizierung neuer Naturstoffe genutzt werden. Im Rahmen des GEBA-Projekts (**Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea**) werden Bakteriengenome aus taxonomischen Nischen zur Sequenzierung ausgewählt<sup>[40]</sup>. Aus der Familie der *Pseudonocardiaceae* wurde unter anderem *Actinosynnema mirum* DSM 43827 (*A. mirum*) sequenziert<sup>[41]</sup>. Die Genomsequenz dieses Stammes hat gezeigt, dass *A. mirum* 23 Sekundärstoff-Cluster besitzt, die möglicherweise für bioaktive Naturstoffe codieren. *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 (*S. viridis*) wurde ausgewählt, da die Zellwand dieses Bakteriums sich nach Gram<sup>[42]</sup> nicht anfärben lässt<sup>[43]</sup>. Das ist insofern ungewöhnlich, da dieser Stamm auf Grund der Sequenz seines 16S-rRNA-Gens taxonomisch zur Ordnung Actinomycetales gehört, obwohl Actinomyceten definitionsgemäß grampositive Bakterien sind<sup>[44]</sup>. *Thermobispora bispora* DSM 43833 (*T. bispora*) wurde sequenziert, da dieser Stamm zwei 16S-rRNA-Gene besitzt, wodurch die taxonomische Einordnung dieses Stammes erschwert war<sup>[45]</sup>. Der Stamm *Pseudonocardia dioxanivorans* CB 1190 (*P. dioxanivorans*) wurde sequenziert, da dieses Bakterium das Umweltgift Dioxan verstoffwechseln kann<sup>[46,47]</sup>. Die Genomsequenz sollte dazu verwendet werden mehr über die biodegradierenden Eigenschaften dieses Stammes zu erfahren<sup>[48]</sup>.

---

## 2.3 Naturstoffe aus Actinomyceten

Actinomyceten sind in der Lage bioaktive Naturstoffe zu produzieren. Bei diesen Naturstoffen handelt es sich unter anderem um potente Arzneistoffe wie die Antibiotika Erythromycin, Vancomycin und Daptomycin, die Immunsuppressiva Rapamycin und Tacrolimus und die Cytostatika Daunorubicin und Bleomycin<sup>[49]</sup>. Für die Synthese dieser Substanzen sind Gene des bakteriellen Sekundärstoffwechsels verantwortlich. Da diese Biosynthesegene im Genom geclustert vorliegen<sup>[32,33]</sup>, kann anhand der Genomsequenz die Anzahl der möglichen Sekundärstoffe bestimmt und erste Aussagen über die mögliche Struktur der entsprechenden Substanzen getroffen werden. Der Großteil der bakteriellen Sekundärstoffe entstammt der Polyketidsynthese, der Peptidsynthese, dem Terpenstoffwechsel oder einem Hybrid dieser Biosynthesewege.

Zur Synthese von Polyketiden konnten in Actinomyceten drei verschiedene Stoffwechselwege identifiziert werden, die alle zur Kondensation von Acyl-Coenzym A-Einheiten führen. Die Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ I sind multifunktionale Enzyme, die modular aufgebaut sind. Die Module, bestehend aus einer Ketosynthase-, einer Acyltransferase- und einer Acyl-Carrier-Protein-Domäne, katalysieren die Kettenverlängerung um je eine Ketid-Einheit (siehe Abbildung 2-1 I). Zusätzliche Domänen sind für die Modifizierung dieser Ketid-Einheiten verantwortlich. Ketoreduktasen reduzieren das Keton zum Alkohol, Dehydratasen führen unter Wasserabspaltung zur Ausbildung von Doppelbindungen und Enoylreduktasen reduzieren diese Doppelbindungen zu Einfachbindungen. Dieser Biosyntheseweg führt in Actinomyceten zu makrozyklischen Naturstoffen, wie beispielsweise Erythromycin oder Amphotericin B<sup>[4,50]</sup>. PKS vom Typ II bestehen aus drei Proteinen, die einen Multienzymkomplex ausbilden. Die Ketosynthase und das Acyl-Carrier-Protein verknüpfen iterativ Malonyl-Coenzym A-Einheiten zu einer Polyketidkette (siehe Abbildung 2-1 II). Das dritte Protein des Komplexes ist der sogenannte Kettenlängenfaktor (chain length factor). Diese Einheit bestimmt die Kettenlänge des Polyketids. Die Zyklisierung der Ketten führt zur Synthese von polyzyklischen Strukturen, die meist einen aromatischen Anteil besitzen. Aktinorhodin, das blau gefärbte Antibiotikum aus *S. coelicolor*, und das Zytostatikum Daunorubicin werden beispielsweise von PKS des Typs II synthetisiert<sup>[51,52]</sup>. PKS vom Typ III kommen in Actinomyceten nur selten vor. Sie unterscheiden sich von PKS Typ I und II darin, dass sie keine Acyl-Carrier-Proteine besitzen. Diese PKS sind Homodimere, die ebenfalls iterativ den Aufbau von Polyketiden katalysieren. Ein Beispiel für einen Naturstoff, der in Actinomyceten durch eine PKS vom Typ III synthetisiert wird, ist das rot gefärbte Flaviolin, ein Shuntprodukt der HPQ-Melanin-Synthese<sup>[53,54]</sup>. Trotz Unterschiede in der Struktur und im Mechanismus sind alle drei PKS-Typen für die fortlaufende Kondensation von Acyl-Coenzym A-Einheiten durch Decarboxylierung verantwortlich. Die erforderliche C-C-Bindung wird im Fall von PKS Typ I von der Ketosynthase-Domäne und im Fall von PKS Typ II und III von der Ketosynthase-Untereinheit katalysiert<sup>[55]</sup>.

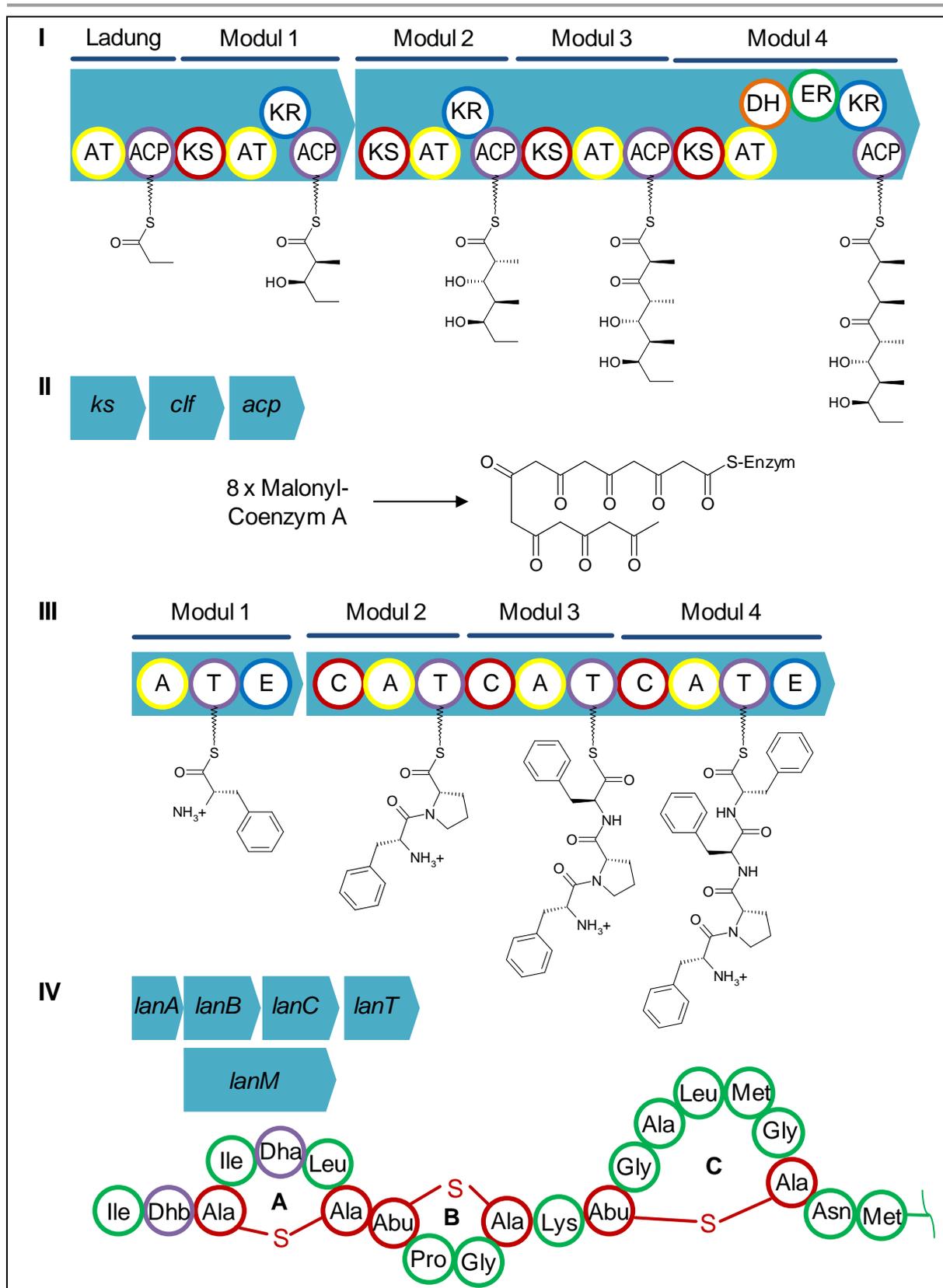


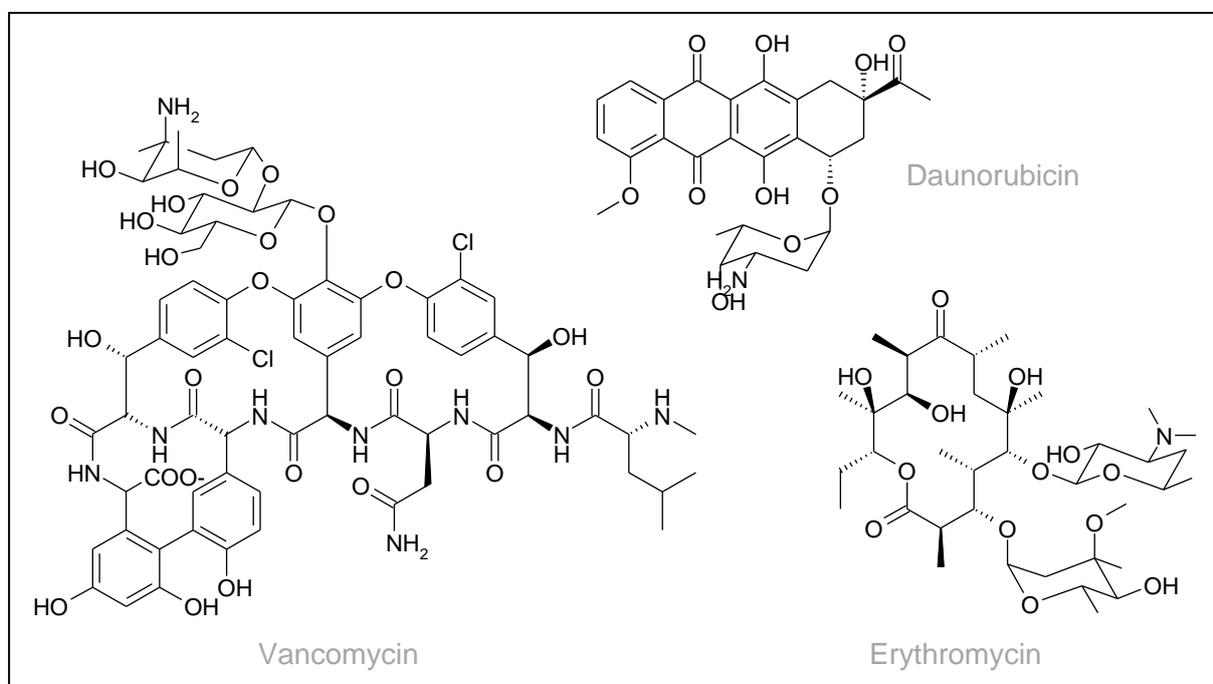
Abbildung 2-1 Schematische Darstellung verschiedener Sekundärstoff-Biosynthesewege in Actinomyceten. (I) Domänen der Typ I PKS, die durch die Gene *eryAI* und *eryAII* aus dem Erythromycin-Cluster codiert werden<sup>[14]</sup>. (II) Die Gene der minimalen PKS vom Typ II und ein Oktaketid als mögliches Produkt. (III) Domänen der NRPS, die durch die Gene *tycA* und *tycB* aus dem Tyrocidin-Cluster codiert werden<sup>[12]</sup>. (IV) Gene, die für die Biosynthese von Lantibiotika codieren. Als mögliches Produkt sind beispielhaft die Ringe A, B und C des Antibiotikums Nisin dargestellt<sup>[14]</sup>. A, Adenylierung; Ala-S-Ala, Lanthionin; Abu-S-Ala, *threo*- $\beta$ -Methylanthionin; ACP, Acyl-Carrier-Protein; AT, Acyltransferase; C, Kondensation; DH, Dehydratase; Dha, Dehydroalanin; Dhb, Dehydrobutyrin; E, Epimerase; ER, Enoylreduktase; KR, Ketoreduktase; KS, Ketosynthase; T, Thiolation.

Zusammen mit den Polyketiden bilden die peptidischen Sekundärstoffe die größte Gruppe an bioaktiven Naturstoffen aus Actinomyceten. Für die peptidischen Sekundärstoffe gibt es zwei verschiedene Biosynthesewege. Die meisten bioaktiven Polypeptide werden nichtribosomal gebildet. Für deren Synthese ist ein multifunktionelles Enzym verantwortlich, vergleichbar mit der PKS vom Typ I. Die Nichtribosomale Peptidsynthase (NRPS) ist modular aufgebaut (siehe Abbildung 2-1 III). Diese Module bestehen aus einer Kondensations- einer Adenylierungs- und einer Thiolations-Domäne und sind für den Einbau je einer Aminosäure verantwortlich. Die Adenylierungs-Domänen sind dabei nicht nur für den Einbau von proteinogenen Aminosäuren verantwortlich, sondern erkennen auch nichtproteinogene Aminosäuren. Zur Umwandlung von L-Aminosäuren in das D-Konformer enthalten einige Module zusätzlich eine Epimerisierungs-Domäne. In Actinomyceten werden beispielsweise die beiden Reserveantibiotika Vancomycin und Daptomycin durch NRPS gebildet<sup>[56,57]</sup>. Seltener werden peptidische Sekundärstoffe in Actinomyceten auch ribosomal gebildet. Die erste Naturstoff-Klasse, für welche die Synthese am Ribosom nachgewiesen wurde, waren die Lantibiotika. Die Gene, welche zur Synthese von Lantibiotika essentiell sind, und die Struktur eines möglichen Produkts sind in Abbildung 2-1 IV dargestellt. Für die Synthese eines Lantibiotikums, wie den Lebensmittelzusatzstoff E 234 Nisin, wird ein Strukturgen (*lanA*) benötigt. LanA wird ribosomal synthetisiert und besteht aus einer N-terminalen Leadersequenz und einem C-terminalen Propeptid. Das Propeptid wird posttranslational modifiziert. Dabei werden die Aminosäuren Serin und Threonin zu Dehydroalanin und Dehydrobutyrin dehydriert. Diese modifizierten Aminosäuren können anschließend mit Cysteinen zu Thioether-Brücken reagieren und makrozyklische Ringe ausbilden. Die Dehydrierung und Zyklisierung wird entweder durch die beiden Enzyme LanB und LanC katalysiert oder durch ein bifunktionelles LanM-Derivat. Das Lantibiotikum wird anschließend über einen Transporter (LanT) aus der Bakterienzelle geschleust. Dabei wird die Leadersequenz abgespalten<sup>[14,58]</sup>. Neben den Lantibiotika gibt es noch weitere Substanzen, die ribosomal synthetisiert werden. Sie unterscheiden sich durch die Art der posttranslationalen Modifizierung. Das Antibiotikum Thiostrepton enthält beispielsweise Thiazole, die durch einen nukleophilen Angriff von Cysteinen an Carbonylen entstehen<sup>[59]</sup>.

Terpene bilden eine weitere Gruppe an Sekundärstoffen, die in Actinomyceten weit verbreitet ist<sup>[60]</sup>. Diese Naturstoffe sind aus Isopren-Einheiten aufgebaut und bilden eine strukturell diverse Stoffklasse. Für die Biosynthese dieser Stoffe sind Terpen-Zyklasten verantwortlich. Geosmin, das für den charakteristischen Geruch vieler Actinomyceten verantwortlich ist und das diterpenoide Grundgerüst der Phenalinolactone werden durch Terpen-Zyklasten synthetisiert<sup>[61,62]</sup>. Einige Naturstoffe, wie das Aminocumarin-Antibiotikum Novobiocin, besitzen einzelne Isopren-Einheiten, die durch Prenyltransferasen übertragen werden<sup>[63]</sup>.

## 2.4 Glycosylierte Naturstoffe

Viele bioaktive Sekundärstoffe aus Actinomyceten liegen glycosyliert vor. Einige Substanzen, wie die Aminoglycosid-Antibiotika Kanamycin und Streptomycin und das Antidiabetikum Acarbose, sind nur aus Zuckern und Cyclohexan-Bausteinen aufgebaut. Die meisten glycosylierten Naturstoffe bestehen jedoch aus einem Aglycon eines anderen Sekundärstoff-Biosynthesewegs, das mit einem oder mehreren Zucker-Einheiten verknüpft ist. Das Cytostatikum Daunorubicin ist beispielsweise ein Polyketid vom Typ II, das mit dem Aminozucker Daunosamin verknüpft ist. Das Reserveantibiotikum Vancomycin besteht aus einem nichtribosomal gebildeten Polypeptid, das mit einem Disaccharid aus Glucose und dem Aminozucker Vancosamin, verknüpft ist. Das Antibiotikum Erythromycin besitzt ein Aglycon aus dem Polyketid-Stoffwechsel vom Typ I, welches mit dem neutralen Deoxyzucker Cladinose und dem Aminozucker Desosamin verbunden ist. Die Strukturformeln dieser glycosylierten Arzneistoffe sind in Abbildung 2-2 dargestellt.



**Abbildung 2-2** Strukturformeln glycosylierter Naturstoffe. Daunorubicin aus *Streptomyces peuceticus*, Vancomycin aus *A. orientalis* und Erythromycin aus *S. erythraea*.

Die Zuckerbausteine tragen zur Steigerung der Hydrophilie von Naturstoffen bei und sind für die Löslichkeit dieser Stoffe verantwortlich. Im Fall von Erythromycin sind die Zuckerbausteine für die *in vivo* Aktivität essentiell <sup>[64]</sup>. Das Vancomycin-Aglycon zeigt *in vitro* antibiotische Aktivität, *in vivo* ist diese Aktivität jedoch signifikant reduziert <sup>[65]</sup>. Die Zuckersubstituenten beeinflussen nicht nur die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Wirkstoffe sondern sind oft maßgeblich für die Interaktion dieser Substanzen mit dem Targetmolekül <sup>[64]</sup>. Mit Hilfe von NMR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zuckersubstituenten für die Ausbildung der bioaktiven Konformation des Vancomycins verantwortlich sind <sup>[66]</sup>. Der Zucker-Baustein des Daunorubicins ist für dessen Wirkung essentiell, da es die Interkalation des Wirkstoffs in den DNA-Strang ermöglicht. <sup>[64]</sup>. Der Einfluss der Zuckersubsti-

tuenten auf die Aktivität von Naturstoffen lässt sich auch anhand eines Vergleichs der Glycopeptid-Antibiotika Vancomycin und Balhimycin zeigen. Die beiden Substanzen besitzen dasselbe Aglycon, sie unterscheiden sich jedoch in den Zuckersubstituenten <sup>[67]</sup>. Das Balhimycin zeigt verglichen mit Vancomycin eine stärkere antibiotische Aktivität gegen anaerobe Bakterien <sup>[68]</sup>.

Zuckersubstituenten spielen für die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Wirkstoffen eine bedeutende Rolle. Dies hat dazu geführt, dass zur Entwicklung neuer therapeutisch wirksamer Substanzen das Glycosylierungsmuster vorhandener Stoffe verändert wird. Mit Hilfe der kombinatorischen Biosynthese konnten *in vivo* neue glycosylierte Sekundärmetabolite produziert werden <sup>[69-71]</sup>. *In vitro* wurde mit Hilfe der Glycorandomisierung ebenfalls eine Vielzahl neuer glycosylierter Substanzen erhalten <sup>[72,73]</sup>. Durch die kombinatorische Biosynthese konnten beispielsweise Daunorubicin-Derivate generiert werden, die andere Zuckersubstituenten tragen <sup>[74,75]</sup>. Zhu *et al.* zeigten, dass Daunorubicin-Analoga mit 2,6-Desoxyzucker-Baustein die beste cytotoxische Aktivität besitzen <sup>[76]</sup>. Die Änderung des Glycosylierungsmusters hat zu Derivaten geführt, die vom P-Glycoprotein nicht aus der Zelle transportiert werden können. Diese Derivate wirken demnach auch bei Tumoren die gegen Daunorubicin resistent sind <sup>[77]</sup>. Die für die Anthracycline typische Nebenwirkung der Cardiotoxizität konnte durch die Entwicklung des Daunorubicin-Derivats Epirubicin deutlich reduziert werden <sup>[74]</sup>. Durch die Modifizierung der Zuckersubstituenten kann somit die Aktivität einer Wirksubstanz optimiert werden, Resistenzen werden umgangen und mögliche Nebenwirkungen gesenkt.

## 2.5 Der Actinomycet *Saccharothrix espanaensis*

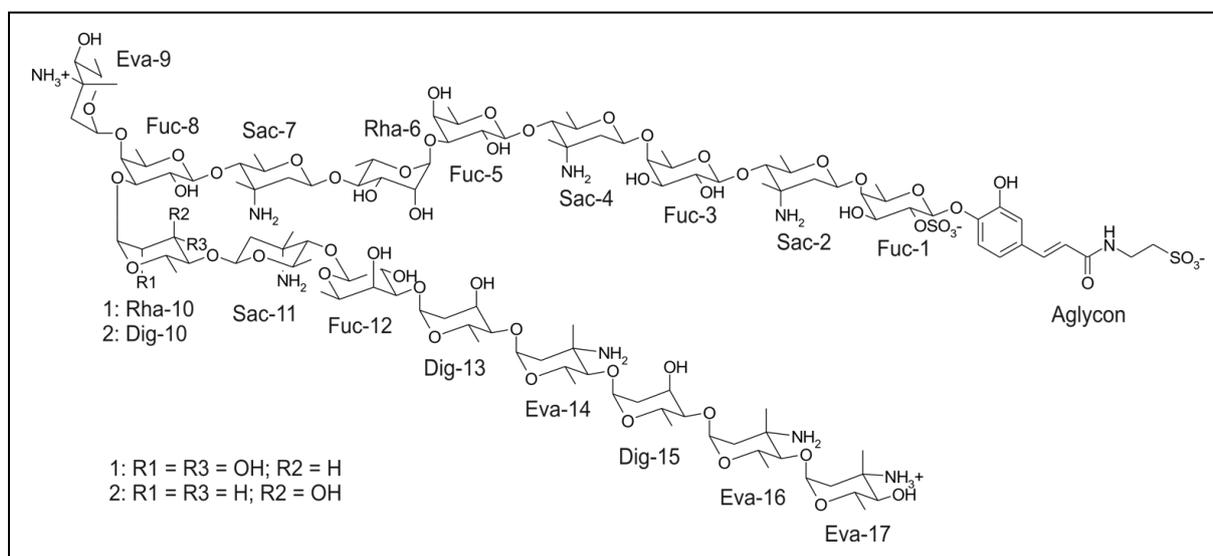
*Saccharothrix* ist eine Bakterien-Art, die zur Familie der *Pseudonocardiaceae* gehört. Die Gattung *Saccharothrix espanaensis* (*S. espanaensis*) wurde aus einer Bodenprobe aus Puerto Llano in Spanien isoliert und im Jahr 1989 von Labeda und Lechevalier erstmals beschrieben <sup>[78]</sup>. Der Stamm produziert gelbbraunes Substrat- und Luftmycel, bildet aber keine Sporen. Die Morphologie von *S. espanaensis* ist in Abbildung 2-3 gezeigt.



**Abbildung 2-3** Fotos verschiedener *S. espanaensis*-Kulturen. **A:** *S. espanaensis*-Einzelkolonien auf TSB-Festmedium. **B:** Konfluenten Rasen von *S. espanaensis* auf R2YE-Festmedium <sup>[2]</sup>. **C:** Rasen und Einzelkolonien von *S. espanaensis* auf R2YE-Festmedium.

### 2.5.1 *S. espanaensis* als Antibiotika-Produzent

Bei der ersten Beschreibung von *S. espanaensis* wurde gezeigt, dass dieser Stamm eine Substanz mit antibiotischer Aktivität produziert, die LL-C19004 genannt wurde<sup>[78]</sup>. Kong *et al.* zeigten, dass es sich bei LL-C19004 um einen Komplex handelt, aus welchem die Saccharomicine A und B isoliert wurden. Bei einer Kultivierung von *S. espanaensis* in einem 820 L-Fermenter wurden 1,25 g LL-C19004 erhalten. Daraus wurden umgerechnet 200 mg Saccharomicin A und 220 mg Saccharomicin B isoliert<sup>[10]</sup>. Die Saccharomicine besitzen eine einzigartige Struktur. Sie sind aus einem *N*-(*m,p*-Dihydroxycinnamoyl)-taurin-Aglycon und einer aus 17 Zuckern bestehenden Zuckerkette aufgebaut. Unter allen bisher bekannten bioaktiven Substanzen bestehen die Saccharomicine somit aus der größten Anzahl an Monosaccharid-Einheiten. Die Strukturformeln von Saccharomicin A und B sind in Abbildung 2-4 dargestellt.



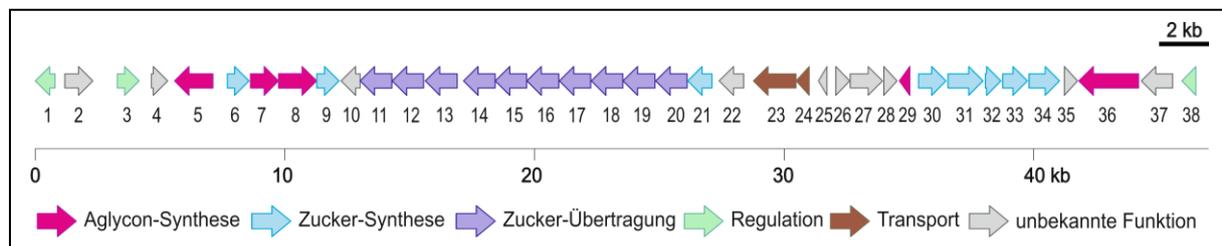
**Abbildung 2-4** Strukturformeln von Saccharomicin A (1) und B (2). Die absolute Konfiguration von Fucose und Saccharosamin wurde experimentell ermittelt<sup>[9-11]</sup>. Die übrigen Monosaccharid-Einheiten sind willkürlich in der Konfiguration dargestellt, die in der Natur am häufigsten vorkommt<sup>[10]</sup>. Fuc, D-Fucose; Sac, D-Saccharosamin; Rha, L-Rhamnose; Eva, L-4-*epi*-Vancosamin; Dig, L-Digitoxose.

Bei den 17 Monosacchariden der Saccharomicine handelt es sich um die Desoxyhexosen Fucose, Saccharosamin, Rhamnose, 4-*epi*-Vancosamin und Digitoxose. Die beiden Saccharomicine unterscheiden sich nur in einem Monosaccharid. Saccharomicin A besitzt an zehnter Stelle in der Zuckerkette  $\alpha$ -Digitoxose, in Saccharomicin B findet sich an dieser Stelle  $\alpha$ -Rhamnose. Es wurde gezeigt, dass die Fucose-Einheiten D-konfiguriert sind<sup>[9,11]</sup> und dass die Saccharosamine die gleiche Konfiguration aufweisen wie die Fucose-Bausteine<sup>[9,10]</sup>. Die absolute Konfiguration der übrigen Zucker-Einheiten wurde bisher nicht bestimmt. Kong *et al.* zeigten, dass die beiden 4-*epi*-Vancosamine an den Enden der verzweigten Zuckerkette protoniert vorliegen. Die Sulfonsäuregruppe des Aglycons und die Sulfatgruppe der ersten Fucose der Zuckerkette liegen deprotoniert vor. Es wird deshalb angenommen, dass die Saccharomicine, als vierfach geladene Zwitterionen, zwei makromolekulare Schleifen ausbilden<sup>[10]</sup>. Diese Konformation könnte möglicherweise mit der bakteriellen Zellmembran interagieren und somit zur Lyse der Zellen führen. Die Theorie zum molekularen Wirkmechanismus der Sac-

charomicine wird durch die Beobachtungen von Singh *et al.* unterstützt. Sie zeigten die unspezifische Hemmung von DNA-, RNA- und Proteinsynthese in *B. subtilis*-Zellen, die mit Saccharomicin A behandelt wurden. Außerdem deutete die mikroskopische Untersuchung von Bakterienzellen, die mit diesem Antibiotikum behandelt wurden, ebenfalls auf eine Lyse der Zellen hin <sup>[79]</sup>.

Die Saccharomicine bilden eine neue Klasse potenter Antibiotika, die keine Ähnlichkeit zu bisher bekannten Antibiotika aufweisen <sup>[10]</sup>. Die Substanzen sind gegen mehrfach resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme und Vancomycin-resistente Enterokokken antibiotisch aktiv <sup>[10]</sup>. Das Maus-Modell hat ebenfalls gezeigt, dass die Saccharomicine eine mit Vancomycin vergleichbare *in vivo* Aktivität gegen pathogene Keime besitzen. Für die systemische Anwendung dieser Substanzen in der Klinik ist das therapeutische Fenster der Saccharomicine jedoch zu eng. Auf Grund der hohen Wasserlöslichkeit und der fehlenden Kreuzresistenzen zu bekannten Antibiotika, könnten die Saccharomicine aber topisch eingesetzt werden <sup>[79]</sup>.

Die ersten molekularbiologischen Experimente mit *S. espanaensis* wurden von M. Berner durchgeführt. Zwar konnte er die Produktion der Saccharomicine nicht reproduzieren, es gelang ihm jedoch das Saccharomicin-Cluster (sam-Cluster) zu identifizieren <sup>[80]</sup>. Ein circa 47 kb großes Cluster, welches aus 38 Genen besteht, wurde durch Sequenzierung auf zwei Cosmiden lokalisiert. Die Organisation des sam-Clusters ist in Abbildung 2-5 dargestellt.



**Abbildung 2-5 Saccharomicin-Cluster aus *S. espanaensis*. Die Einteilung der Gene in funktionelle Einheiten erfolgte anhand der neusten Annotation des Clusters und allen weiterführenden Sequenzanalysen (siehe 3.1.1 und 4.2.2).**

Das sam-Cluster besitzt 10 Gene, die für Glycosyltransferasen codieren. Damit enthält das sam-Cluster die meisten Glycosyltransferasegene (GT-Gene), die bisher in einem Sekundärstoff-Cluster identifiziert wurden. Der Nachweis, dass es sich bei diesem Gencluster tatsächlich um das sam-Cluster handelt, konnte durch die heterologe Expression der Gene *sam8* und *sam5* erbracht werden. Durch die Expression dieses Tyrosin-Ammonia-Lyasegens und dieses 4-Coumarat-3-Hydroxylasegens im heterologen Wirt *Streptomyces fradiae* XKS (*S. fradiae* XKS) wurde eine Mutante generiert, die in der Lage war, Kaffeesäure zu produzieren. Berner *et al.* konnten damit nachweisen, dass diese Gene für Enzyme codieren, die für die Synthese der Hälfte des Saccharomicin-Aglycons verantwortlich sind <sup>[7]</sup>. Die Analyse des Clusters hat gezeigt, dass Gene fehlen, deren Produkte für die Synthese der Saccharomicine benötigt werden. Es konnte beispielsweise kein Gen identifiziert werden, das für eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase codiert. Die Dehydrierung von aktivierter Glucose ist ein essentieller Teil der Synthese aller fünf Desoxyzucker. Es wurde bereits von mehreren Sekundärstoff-Clustern

---

berichtet, die zur Synthese von Desoxyzuckern eine dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase verwenden, welche von einem Gen codiert wird, das außerhalb des betrachteten Clusters liegt <sup>[57,81]</sup>. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die Gene, die zur Synthese der Saccharomicine im sam-Cluster fehlen, von Genen codiert werden, die außerhalb des sam-Clusters liegen <sup>[80]</sup>.

### 2.5.2 *S. espanaensis* als Biotransformationswirt

Der Actinomycet *S. espanaensis* ist nicht nur der Produzent einer neuen Antibiotika-Klasse, sondern besitzt außerdem Biotransformationsaktivität. A. Luzhetskyy zeigte, dass *S. espanaensis* Anthrachinone wie Alizarin oder Emodin biotransformieren kann <sup>[82]</sup>. A. Linnenbrink hat diese Biotransformationsaktivität näher untersucht. Dabei konnte er nachweisen, dass es sich bei den Biotransformationsprodukten um Derivate der zugefütterten Substanzen handelt, die *O*-glycosidisch mit Rhamnose verknüpft sind <sup>[3]</sup>. Die Strukturformeln aller bisher bekannten Biotransformationsprodukte aus *S. espanaensis*, die mittels NMR bestätigt wurden, sind in Abbildung 2-6 dargestellt. Durch die Fütterung verschiedener Xenobiotika und die Strukturaufklärung der erhaltenen Produkte wurde die Biotransformationsaktivität des Stammes näher untersucht. Bei der Fütterung mit Emodin wurde unter anderem das Biotransformationsprodukt EmoPro3 erhalten. Diese Substanz zeigt eine zweifache Rhamnosylierung <sup>[3]</sup>. Obwohl das Xenobiotikum 1-Amino-4-chloranthrachinon keine Hydroxylgruppe besitzt, die für die *O*-glycosidische Verknüpfung mit Rhamnose in *S. espanaensis* verwendet werden kann, biotransformierte der Stamm diese Substanz. Das erhaltene Biotransformationsprodukt Ant14Pro1 besitzt eine Hydroxylgruppe, über welche die Substanz ebenfalls mit Rhamnose verknüpft ist. Der Stamm *S. espanaensis* zeigt demnach neben der Rhamnosylierungs- auch Hydroxylierungsaktivität <sup>[3]</sup>. Zur Untersuchung des Substratspektrums der Biotransformation wurden neben Anthrachinonen weitere Substanzen verschiedener Substanzklassen gefüttert. Das Flavonoid Quercetin zeigte eine nahezu vollständige Umsetzung zu dem einfach rhamnosylierten Derivat QuercPro1 <sup>[3]</sup>. Die Fütterung von Novobiocinsäure, dem Aglycon des antibiotisch aktiven Novobiocins, resultierte in der Produktion zweier hydroxylierter und eines rhamnosylierten Derivats. Die antibiotische Aktivität des rhamnosylierten Derivats NovPro5 wurde mit der von Novobiocin und dessen Aglycon Novobiocinsäure verglichen. Die Novobiocinsäure zeigt eine deutlich geringere antibiotische Aktivität gegen *B. subtilis* als Novobiocin. Y. Schmidt zeigte, dass das rhamnosylierte NovPro5 keine antibiotische Aktivität besitzt <sup>[83]</sup>. Durch die Glycosylierung in *S. espanaensis* wurde das Antibiotikum demnach vollständig inaktiviert.

Die Glycosylierungsaktivität von *S. espanaensis* ist außergewöhnlich. Die beobachtete Glycosylierung diverser Xenobiotika wurde bisher für keinen anderen Actinomyceten beschrieben. Für diese Glycosylierungsaktivität in *S. espanaensis* ist mindestens eine GT verantwortlich.

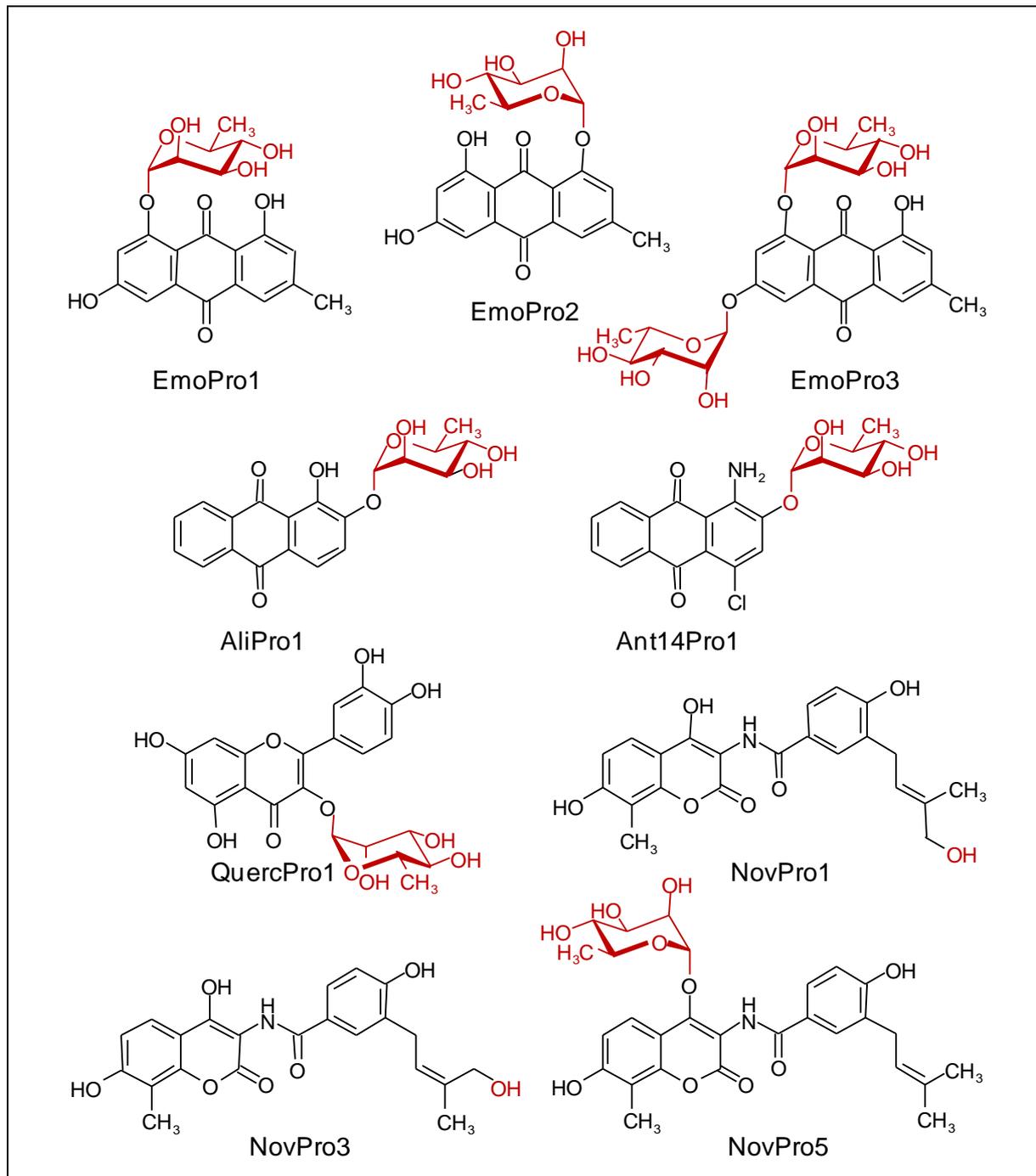


Abbildung 2-6 Strukturformeln aller bisher bekannten Biotransformationsprodukte aus *S. espanaensis*, die mittels NMR-Spektroskopie bestätigt sind <sup>[3]</sup>. Die Strukturelemente, die durch die Biotransformationsreaktion ins Molekül eingebracht wurden, sind rot dargestellt.

---

## 2.6 Glycosyltransferasen

### 2.6.1 Einteilung und Struktur

GTs sind Enzyme, die Zucker in aktivierter Form auf Akzeptor-Substrate übertragen. Bei den Zucker-Donatoren handelt es sich bei sogenannten Leloir-Glycosyltransferasen um Nucleosid-Phosphat-Zucker, meist Nucleosid-Diphosphat-Zucker (NDP-Zucker) <sup>[84]</sup>. Nicht Leloir-GTs übertragen auch Zucker, die direkt mit Phosphat aktiviert sind. Die Akzeptor-Substrate von GTs sind meist andere Zucker. GTs akzeptieren darüber hinaus Lipide, Proteine, Nucleinsäuren, Antibiotika oder andere niedermolekulare Substanzen. Der Zucker wird meist auf den nukleophilen Sauerstoff einer Hydroxylgruppe des Akzeptors übertragen. Seltener werden die Zucker mit N-, S- und C-Nucleophilen verknüpft <sup>[85]</sup>.

Die verschiedenen Substanzen, die von GTs als Substrat akzeptiert werden, verdeutlichen, dass GTs in der Zelle an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt sind. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass GTs nur eine geringe Sequenzhomologie besitzen <sup>[86]</sup>. Trotz dieser geringen Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenzen gibt es für GTs nur vier mögliche Formen der Proteinfaltung. Für die Nucleotid-Zucker-abhängigen GTs wurden bisher die beiden Strukturen GT-A und GT-B beobachtet <sup>[87,88]</sup>. Bei den Nicht Leloir-GTs kommen zusätzlich die Strukturformen GT-C und GT-D vor <sup>[89,90]</sup>. Auf Grund der großen Vielfalt an GTs haben Campbell *et al.* erstmals eine sequenzbasierte Klassifizierung von Hexosetransferasen in Familien vorgenommen <sup>[91]</sup>. Die entwickelte CAZy-Datenbank wird seitdem stets aktualisiert und beinhaltet in der Zwischenzeit über 100.000 GTs, welche in 94 Familien eingeteilt werden <sup>[92,93]</sup>. Die GTs einer Familie haben nicht nur ähnliche Aminosäure-Sequenzen, sondern besitzen auch dieselbe Proteinfaltung und den gleichen molekularen Mechanismus. Man unterscheidet zwischen GTs, die die Konformation am anomeren C-Atom des Zuckers beibehalten oder diese umkehren <sup>[94]</sup>.

Alle bisher bekannten GTs des bakteriellen Sekundärmetabolismus gehören zur CAZy-Familie 1. Bei den Sekundärstoff-GTs handelt es sich demnach stets um NDP-Hexosetransferasen, die die Konformation am anomeren C-Atom des Zuckers während der Reaktion umkehren. Strukturell gehören sie zur Gruppe der GTs mit GT-B-Faltung. Diese Struktur wurde erstmals für die  $\beta$ -Glucosyltransferase aus dem Bakteriophagen T4 gezeigt <sup>[95]</sup>. GTs mit dieser Faltung bestehen aus zwei Domänen mit  $\beta/\alpha/\beta$ -Rossmann-Faltung, die durch eine zentrale Kluft getrennt sind <sup>[95]</sup>. Die Rossmann-Faltung der C-terminalen Domäne dient der Stabilisierung des Nucleosid-Diphosphats am Zucker-Donor während der Reaktion. Das Akzeptor-Substrat wird N-terminal gebunden. In der Kluft zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum <sup>[85]</sup>.

---

## 2.6.2 Glycosyltransferasen als Werkzeuge in der Biokatalyse

Zur Glycosylierung von Zielsubstanzen werden GTs eingesetzt. Die enzymatisch katalysierte Reaktion besitzt gegenüber der chemischen Synthese einige Vorteile. Die Enzyme katalysieren regio- und stereoselektive Glycosylierungen. In der chemischen Synthese müssten dafür Schutzgruppen eingeführt und anschließend wieder entfernt werden. Dies führt zu aufwendigen Synthesen mit schlechten Ausbeuten des gewünschten glycosylierten Produkts <sup>[96,97]</sup>. Außerdem können im Rahmen der enzymatischen Glycosylierung die Nukleotid-Zucker *in situ* regeneriert werden <sup>[96]</sup>. Der Nachteil der enzymatischen Katalyse ist, dass sich GTs durch eine hohe Substratspezifität auszeichnen. GTs übertragen üblicherweise einen einzigen Zucker auf ein bestimmtes Akzeptor-Substrat. Der Einsatz dieser Enzyme beschränkt sich demnach auf die Katalyse von wenigen naturidentischen Reaktionen. Abweichend davon wurden circa 20 GTs beschrieben, die in der Wahl ihrer Substrate flexibel sind. Härle und Bechthold geben eine Auflistung dieser Enzyme. Diese GTs können entweder verschiedene Zucker übertragen oder sind in der Wahl ihrer Akzeptor-Substrate flexibel <sup>[98]</sup>. Eine Auswahl spezifischer und substratflexibler GTs sind in der „Freiburger Glycosyltransferase-Toolbox“ zusammengestellt <sup>[99]</sup>. Diese GTs stehen als Werkzeug für die enzymatische Glycosylierung zur Verfügung.

Die GT ElmGT aus dem Elloramycin-Cluster von *Streptomyces olivaceus* besitzt Donor-Substratflexibilität. Sie wird eingesetzt, um verschiedene Zucker auf das Elloramycin-Aglycon 8-Demethyltetracenomycin C zu übertragen <sup>[100-102]</sup>. Auch für GtfE aus dem Vancomycin-Cluster und CalG1 aus dem Calicheamycin-Cluster ist der Einsatz zur Synthese neuer glycosylierter Derivate beschrieben <sup>[103,104]</sup>. Han *et al.* synthetisierten Daunorubicin-Derivate, die mit verschiedenen Zuckern substituiert sind <sup>[74]</sup>. Dabei verwendeten sie die GT AknS aus dem Aclacinomycin A-Cluster von *Streptomyces galilaeus* <sup>[105]</sup>. Diese GT ist in der Lage unterschiedliche Anthracyclin-Aglyca zu glycosylieren. Die GT DesVII aus dem Pikromycin-Cluster von *Streptomyces venezuelae* katalysiert die Glycosylierung von 12-, 14- und 16-gliedrigen Makroliden <sup>[106]</sup>. Das Substratspektrum von AknS und DesVII beschränkt sich jedoch auf artverwandte Akzeptor-Substrate. Für die GT OleD aus *Streptomyces antibioticus* wurde eine außergewöhnlich hohe Akzeptor-Substrat-Flexibilität gezeigt <sup>[107-110]</sup>. Dieses Enzym wird zur Glycosylierung einer Reihe von Substraten wie Makroliden, Cumarinen oder Flavonoiden eingesetzt <sup>[107,108,111]</sup>. Die GT OleD ist damit das Enzym mit dem größten bisher bekannten Akzeptor-Substratspektrum.

Steht für die Glycosylierung eines Akzeptor-Substrats kein Enzym zur Verfügung, das die gewünschte Reaktion katalysiert, kann durch gezieltes Protein-Engineering ein entsprechendes Enzym generiert werden. Hoffmeister *et al.* zeigten, dass durch den Austausch weniger Aminosäuren der GT UrdGT1b aus dem Urdamycin-Cluster von *Streptomyces fradiae* Tü2717 Derivate mit völlig neuem Substratspektrum generiert werden können. Truman *et al.* stellten chimäre GTs her, indem sie die C- und N-terminalen Domänen von Glycopeptid-GTs tauschten. Diese Enzyme konnten nun den durch die C-terminale Domäne festgelegte Zucker auf das durch die N-terminale Domäne erkannte Polypeptid

---

übertragen <sup>[112]</sup>. Neben dem Substratspektrum von GTs kann auch die Art der Bindungsknüpfung durch Protein-Engineering verändert werden. Durch die gezielte Mutation einzelner Aminosäuren konnte aus der O-GT LanGT2 des Landomycin-Cluster von *Streptomyces cyanogenus* S-136 ein Enzym generiert werden, welches Olivose C-glycosidisch verknüpft <sup>[113]</sup>.

Das Protein-Engineering ist zwar eine zukunftsweisende Technologie, sie steht jedoch an ihren Anfängen. Die Synthese von GTs, die Reaktionen nach Wahl katalysieren, ist noch nicht möglich. Aus diesem Grund ist die Identifizierung neuer GTs mit breitem Substratspektrum derzeit ein vielversprechender Ansatz zur Gewinnung glycosylierter Substanzen. Neue GTs sind ausschlaggebend für den weiteren Erfolg der „Freiburger Glycosyltransferase-Toolbox“.

## 2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Genomsequenz von *S. espanaensis* untersucht werden. Anhand der Sequenz sollten Gencluster, die für die Biosynthese von Sekundärstoffen codieren, identifiziert werden. Damit sollte das vollständige Potential von *S. espanaensis* als Naturstoff-Produzent aufgedeckt werden. Außerdem sollte durch die Analyse des vollständigen Genoms tiefere Einblicke in die Saccharomicin-Biosynthese erhalten werden.

Des Weiteren sollte die Biotransformationsaktivität von *S. espanaensis* charakterisiert werden. Durch die Fütterung von Xenobiotika und die Strukturaufklärung der erhaltenen Produkte sollte das Substratspektrum charakterisiert werden. Außerdem sollte die Genomsequenz von *S. espanaensis* auf Gene untersucht werden, die möglicherweise für Glycosyltransferasen codieren. Unter diesen Genen sollte mit Hilfe von Sequenzanalysen und molekularbiologischen Methoden das Gen identifiziert werden, welches für die GT mit breitem Substratspektrum codiert. Die verantwortliche GT sollte anschließend mit bekannten GTs verglichen werden. Weiterhin sollte die GT gereinigt und im *in vitro*-Experiment charakterisiert werden. Die neu beschriebenen GTs könnten zur erfolgreichen Erweiterung der „Freiburger Glycosyltransferase-Toolbox“ dienen.



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 *In silico* Untersuchungen zum Genom von *S. espanaensis*

*S. espanaensis* produziert die antibiotisch wirksamen Heptadecaglycoside Saccharomicin A und Saccharomicin B <sup>[10]</sup>. Der Stamm gehört zur Familie der *Pseudonocardiaceae*. Bekannte Vertreter dieser Familie sind unter anderem der Erythromycin-Produzent *S. erythraea* und der Rifamycin SV-Produzent *A. mediterranei*. Die Sequenzierung der Genome von *S. erythraea* und *A. mediterranei* hat gezeigt, dass diese Stämme neben den Clustern für Erythromycin und Rifamycin weitere zum Teil unbekannte Sekundärstoffcluster besitzen <sup>[38,39]</sup>.

Die Sequenzierung von *S. espanaensis* erfolgte in Kooperation mit Christian Rückert und Jörn Kalinowski von CeBiTec an der Universität Bielefeld (siehe 5.8.3). Das Chromosom ist zirkulär und besteht aus 9.360.653 bp. Weitere Daten zum Genom von *S. espanaensis* sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Das Genom-Annotationsprogramm GenDB (siehe Tabelle 5-30) hat insgesamt 8.427 Sequenzen vorhergesagt, die möglicherweise für Proteine codieren (coding DNA sequence, CDS). Für 4.297 (51 %) der annotierten CDS konnte ebenfalls automatisch eine Funktion zugeordnet werden. Die Einteilung der CDS in eggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups) <sup>[114]</sup> ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Zusätzlich zur automatischen Annotierung wurde eine manuelle Annotierung vorgenommen. Dabei wurde für insgesamt 1284 CDS (15,2 %) die Positionierung der Startcodons überprüft und gegebenenfalls geändert. Außerdem wurde den CDS auf Grund von Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Genprodukten eine mögliche Funktion zugeordnet. Für diese manuelle Annotierung wurden Gene ausgewählt, die entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit von Interesse waren. Es handelte sich dabei um Gene aus Sekundärstoff-Clustern, um GT-Gene und um die Gene, die jeweils in der unmittelbaren Nähe dieser Gene liegen.

**Tabelle 3-1 Allgemeine Daten zum Genom von *S. espanaensis*.**

Größe des Genoms	9.360.653 bp
Genomstruktur	zirkulär
GC-Gehalt	72,19 %
CDS	8.427
Codierungsdichte	90,02 %
rRNA Operons	4
tRNA	80
Extrachromosomale Replikons	keine

Tabelle 3-2 Anzahl der Gene, die mit einer eggNOG Kategorie verknüpft sind.

Code	Anzahl	%	Beschreibung
A	1	0,01	RNA Prozessierung und Modifikation
B	0	0,00	Chromatinstruktur und Dynamik
C	308	3,66	Energieproduktion und Umsetzung
D	21	0,25	Kontrolle des Zellzyklus, der Zellteilung, der Aufteilung der Chromosomen
E	376	4,46	Transport und Metabolismus von Aminosäuren
F	86	1,02	Transport und Metabolismus von Nukleotiden
G	213	2,53	Transport und Metabolismus von Kohlenhydraten
H	163	1,93	Transport und Metabolismus von Co-Enzymen
I	167	1,98	Transport und Metabolismus von Lipiden
J	166	1,97	Translation
K	475	5,64	Transkription
L	180	2,14	Replikation
M	161	1,91	Biosynthese von Zellwand, Zellmembran und Hülle
N	0	0,00	Zellbeweglichkeit
O	142	1,69	Posttranslationale Modifikation, Sekretion und vesikulärer Transport
P	242	2,87	Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen
Q	171	2,03	Biosynthese, Transport und Abbau von Sekundärstoffen
R	449	5,33	Nur allgemeine Funktionsvorhersage
S	737	8,75	Unbekannte Funktion
T	190	2,26	Signalweitergabe Mechanismus
U	27	0,32	Intrazellulärer Transport, Sekretion und vesikulärer Transport
V	112	1,33	Abwehrmechanismus
W	0	0,00	Extrazelluläre Strukturen
Y	0	0,00	Kernstruktur
Z	0	0,00	Cytoskelett
-	4037	47,92	Kein Treffer in eggNOG

### 3.1.1 Sequenz-Analyse des Saccharomicin-Clusters

Mit Hilfe einer Cosmid-Bibliothek konnte M. Berner einen Sequenzbereich im Genom von *S. espanaensis* identifizieren, der mit großer Wahrscheinlichkeit für die Enzyme der Saccharomicin-Biosynthese codiert<sup>[80]</sup>. Im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. espanaensis* wurde auch dieses sam-Cluster erneut annotiert. Das sam-Cluster befindet sich im unteren Teil des zirkulären Chromosoms, in der Nähe des Replikationsendes. Es besteht aus 38 Genen und umfasst circa 47.000 bp. Alle 38 Genprodukte des Clusters wurden manuell geblastet<sup>[115]</sup> und die Länge der offenen Leser-

## ERGEBNISSE

ahmen (open reading frame, ORF) an die Länge der in der Datenbank hinterlegten Proteine angepasst [115]. Dabei wurde verglichen zur Annotation von M. Berner das Startcodon von acht Genen upstream und von vier Genen downstream verschoben. Durch die größere Anzahl an Proteinen, die in der Datenbank zum Vergleich zur Verfügung standen, wurde auch die funktionelle Annotation der Genprodukte weiter verfeinert. Tabelle 3-3 zeigt die neu annotierten Gene des sam-Clusters mit der möglichen Funktion der Genprodukte und dem nächsten verwandten Protein.

**Tabelle 3-3 Beschreibung der Gene aus dem sam-Cluster. 1: Anzahl der Aminosäuren; 2: Anteil identischer Aminosäuren/Anteil ähnlicher Aminosäuren in %; 3: GenBank Accession Nummer des ähnlichen Proteins.**

Gen	1	mögliche Funktion des Genprodukts	Proteinsequenz ähnlich zu (Name des Proteins [Organismus])	2	3
<i>sam1</i>	267	transkriptionaler Regulator	Psed_2412 [ <i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190]	67/78	AEA24616
<i>sam2</i>	377	Protein mit extrazellulären Sequenzwiederholungen	Geob_2007 [ <i>Geobacter</i> sp. FRC-32]	33/48	YP_002537464
<i>sam3</i>	293	transkriptionaler Regulator	SSBG_00020 [ <i>Streptomyces</i> sp. SPB74]	44/54	ZP_06825724
<i>sam4</i>	219	positiver Regulator mit Ähnlichkeit zu NovE	FRAAL4627 [ <i>Frankia alni</i> ACN14a]	54/69	YP_714812
<i>sam5</i>	512	4-Coumarat 3-Hydroxylase	Funktion experimentell nachgewiesen <sup>[80]</sup>		ABC88666
<i>sam6</i>	290	Glucose-1-phosphat Nucleotidyltransferase	sa14 [ <i>Streptomyces aureofaciens</i> ]	67/82	ACK77763
<i>sam7</i>	374	Acetyl-Coenzym A Synthetase	Ndas_4723 <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111	47/58	YP_003682615
<i>sam8</i>	510	Tyrosin-Ammonia-Lyase	Funktion experimentell nachgewiesen <sup>[80]</sup>		ABC88669
<i>sam9</i>	299	putative S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase	GQ274953.1 ORF10 [ <i>Streptomyces platensis</i> subsp. <i>rosaceus</i> ]	45/60	ACY01395
<i>sam10</i>	256	hypothetisches Protein, NodH ähnlich	MED193_14177 [ <i>Roseobacter</i> sp. MED193]	30/43	ZP_01055406
<i>sam11</i>	424	Glycosyltransferase	desVII [ <i>Streptomyces venezuelae</i> ]	45/58	AAC68677
<i>sam12</i>	422	Glycosyltransferase	oleG2 [ <i>Streptomyces antibioticus</i> ]	46/61	CAA05642
<i>sam13</i>	425	Glycosyltransferase	Ndas_4716 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	46/61	YP_003682608
<i>sam14</i>	420	Glycosyltransferase	Ndas_4707 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	44/56	YP_003682599
<i>sam15</i>	419	Glycosyltransferase	Ndas_4716 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	50/63	YP_003682608
<i>sam16</i>	424	Glycosyltransferase	Ndas_4716 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	46/60	YP_003682608
<i>sam17</i>	420	Glycosyltransferase	Ndas_4716 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	48/60	YP_003682608
<i>sam18</i>	420	Glycosyltransferase	Ndas_4727 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	50/61	YP_003682619

Fortsetzung von Tabelle 3-3 Beschreibung der Gene aus dem sam-Cluster. 1: Anzahl der Aminosäuren; 2: Anteil identischer Aminosäuren/Anteil ähnlicher Aminosäuren in %; 3: GenBank Accession Nummer des ähnlichen Proteins.

Gen	1	mögliche Funktion des Genprodukts	Proteinsequenz ähnlich zu (Name des Proteins [Organismus])	2	3
sam19	427	Glycosyltransferase	Ndas_4716 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	47/61	YP_003682608
sam20	422	Glycosyltransferase	desVII [ <i>Streptomyces venezuelae</i> ]	45/61	AAC68677
sam21	326	NDP-4-Keto-6-desoxyhexose 4-Ketoreduktase	jadV [ <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712]	52/66	AAL14256
sam22	330	Aldo/Keto-Reduktase	Tcur_2669 [ <i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183]	51/65	YP_003300259
sam23	569	Protein, das membranflankierende Domänen besitzt	Xcel_2081 [ <i>Xylanimonas cellulositytica</i> DSM 15894]	42/55	YP_003326657
sam24	176	Protein, das membranflankierende Domänen besitzt	Snas_5070 [ <i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728]	52/63	YP_003513799
sam25	114	hypothetisches Protein	Ndas_4706 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	51/64	YP_003682598
sam26	188	hypothetisches Protein	Ndas_4738 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	40/57	YP_003682630
sam27	430	L-Threonin-Synthase	thrC1 [ <i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1]	54/67	ADI04248
sam28	177	hypothetisches Protein	Ndas_4730 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	38/57	YP_003682622
sam29	140	Aspartate-1-Decarboxylase	Franean1_0199 [ <i>Frankia</i> sp. EAN1pec]	58/78	YP_001504572
sam30	369	Glutamine--Scyllo-Inositol-Transaminase	Ndas_4709 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	75/85	YP_003682601
sam31	468	NDP-hexose-2,3-Dehydratase	ChlC3 [ <i>Streptomyces antibioticus</i> ]	58/70	AAZ77682
sam32	207	dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-Epimerase	SBI_06869 [ <i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1]	60/74	ADI09989
sam33	331	NDP-Hexose 3-Ketoreduktase	KijD10 [ <i>Actinomadura kijaniata</i> ]	56/71	ACB46498
sam34	409	NDP-Hexose-C-3-Methyltransferase	dvaC [ <i>Amycolatopsis balhimycina</i> ]	74/83	CAC48364
sam35	175	Adenylylsulfat-Kinase	SghaA1_010100008098 [ <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672]	67/78	ZP_04685125
sam36	798	Penicillinamidase	Rpic_4199 [ <i>Ralstonia pickettii</i> 12J]	51/65	YP_001892723
sam37	419	hypothetisches Protein	Ndas_1063 [ <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111]	60/70	YP_003679011
sam38	189	RNA Polymerase Sigmafaktor	SACE_6625 [ <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338]	66/75	YP_001108716

### 3.1.2 Identifizierung von Sekundärstoffclustern

Bevor die Genomsequenz zur Verfügung stand, waren außer den Saccharomicinen keine weiteren Sekundärstoffe bekannt, die von *S. espanaensis* produziert werden. Mit Hilfe der antiSMASH Software <sup>[116]</sup> konnten im Genom 30 zusätzliche Sekundärstoffcluster identifiziert werden. Nach der manuellen Analyse der Software-Ergebnisse (siehe 5.13) wurde die Zahl auf 25 korrigiert. Neben dem sam-Cluster gibt es also 25 weitere Cluster, die möglicherweise Sekundärstoffe produzieren können. Die Lage aller Cluster ist im Anhang unter 7.2 aufgelistet.

#### 3.1.2.1 Putative Terpencluster

Die Genom-Sequenzanalyse ergab, dass *S. espanaensis* sieben Cluster besitzt, die wahrscheinlich für die Biosynthese von Naturstoffen aus dem Terpenstoffwechsel codieren. Die für deren Synthese benötigten C5-Bausteine stammen aus dem Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) <sup>[117]</sup>. Es wurde für jedes Enzym des MEP-Wegs mindestens ein entsprechendes Gen im Genom von *S. espanaensis* identifiziert (siehe Tabelle 3-4).

**Tabelle 3-4 Beschreibung der Enzyme aus dem MEP-Weg. 1: Name des Proteins; 2: Funktion des Proteins; 3: entsprechendes Genprodukt aus *S. espanaensis*; 4: Name des Proteins mit größter Ähnlichkeit [Organismus bei Erstnennung]; 5: Anteil identischer Aminosäuren/Anteil ähnlicher Aminosäuren in %.**

1	2	3	4	5
DXS	Desoxyxylulosephosphat-Synthase	Ses18140	Amir_1524	83/92
		Ses60810	Amir_5020 [ <i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827]	69/79
IspC	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktase	Ses70640	Amir_5890	78/85
IspD	Cytidindiphosphat-Methylerythritol-Synthase	Ses04060	Amir_0363	84/90
IspE	Cytidyl-Methyl-Kinase	Ses07050	Amir_0649	86/92
IspF	Methyl-Erythritol-Cyclo-Diphosphat-Synthase	Ses04050	Amir_0362	80/88
IspG	Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase	Ses70620	Amir_5888	95/98
		Ses60820	Strvi_2023 [ <i>Streptomyces violaceusniger</i> Tü 4113]	80/88
LytB	IPP/DMAPP-Synthase	Ses08140	Amir_0729	91/96
		Ses60800	Amir_5019	81/88
		Ses33480	Snas_1999 [ <i>Stackebrandtia nassauensis</i> DSM 44728]	38/50

Bakterielle Naturstoffe aus dem Terpenstoffwechsel sind zum Beispiel carotinoide Pigmente und diverse Duftstoffe. Diese Substanzen dienen dem UV-Schutz oder verleihen den Actinomyceten ihren charakteristischen Geruch <sup>[118,119]</sup>. Die sieben Terpencluster (tcp1-tcp7) sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Im Genom von *S. espanaensis* gibt es vier Gencluster, die wahrscheinlich Carotinoide produzieren (tcp2, tcp3, tcp5 und tcp7). Zusätzlich gibt es je ein Cluster, das möglicherweise für die Produktion des erdig riechenden Sesquiterpens Geosmin (tcp1) und des modrig riechenden Monoterpens 2-Methylisoborneol (tcp6) codiert. Allerdings wird für die Produktion von 2-Methylisoborneol (2-MIB) neben der Terpen-Zyklase aus tcp6 eine Geranylpyrophosphat-2-Methyltransferase (GPP MT) benötigt. Um ein Gen zu finden, dass für ein solches Protein codiert, wurde die charakterisierte GPP MT aus *Streptomyces lasaliensis* <sup>[118]</sup> gegen alle CDS von *S. espanaensis* geblastet. Das dabei identifizierte Genprodukt Ses41360 teilt 54 % identische und 70 % ähnliche Aminosäuren mit der GPP MT aus *Streptomyces lasaliensis*. Ob das Gen *ses41360* tatsächlich an der Synthese von 2-MIB beteiligt ist, ist fragwürdig, da es circa 2,1 Mb vom tcp6 Cluster entfernt liegt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es sich bei dem Produkt von tcp6 um nicht-methyliertes Isoborneol handelt. Allerdings ist das Substrat der 2-MIB Synthese üblicherweise das bereits methylierte 2-Methyl-Geranylpyrophosphat <sup>[118]</sup>. Zusätzlich zu den Pigmenten und Duftstoffen gibt es auch Antibiotika, die dem Terpenstoffwechsel entstammen. *S. espanaensis* besitzt eine Terpen-Zyklase (tcp4), die Ähnlichkeit zu einer Zyklase aufweist, die für die Produktion von Pentalenen verantwortlich ist. Pentalenen ist eine Vorstufe der Antibiotika aus der Familie der Pentalenolaktone <sup>[120]</sup>.

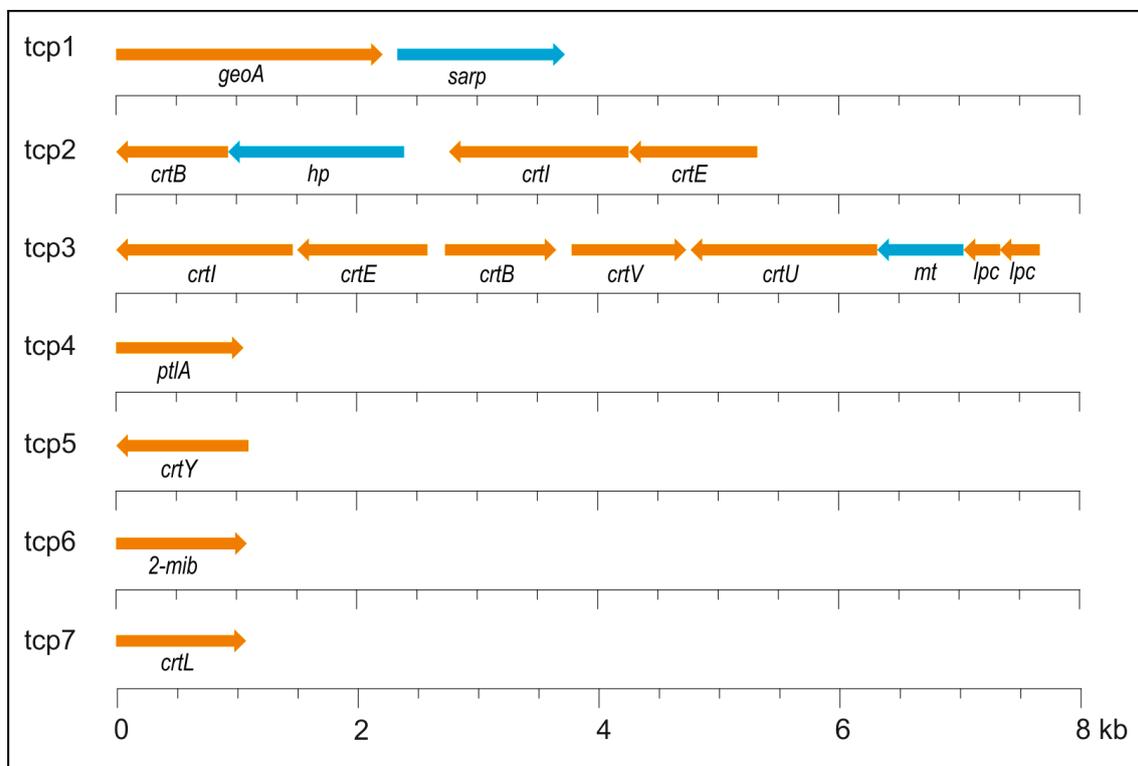


Abbildung 3-1 Terpencluster aus dem Genom von *S. espanaensis*.

Gene, die für Terpen-Synthasen codieren sind orange dargestellt, alle anderen Gene blau.

*2-mib*, 2-Methylisoborneol Terpen-Synthase; *crt*,  $\beta$ -Carotin Terpen-Synthasen; *geoA*, Geosmin-Synthase; *hp*, hypothetisches Protein; *lpc*, Lycopren-Zyklase; *mt*, Methyltransferase; *ptIA*, Pentalenen-Synthase; *sarp*, Regulator typisch für Streptomyceten.

### 3.1.2.2 Cluster der Nichtribosomalen Peptidsynthese

Im Genom von *S. espanaensis* sind fünf Cluster vorhanden, die für Nichtribosomale Peptidsynthasen (NRPS) codieren (Cluster 1, 2, 3, 7 und 12). Die fünf NRPS-Cluster sind in Abbildung 3-2 dargestellt. Bekannte Sekundärstoffe, die durch NRPS in Actinomyceten gebildet werden, sind zum Beispiel das Reserveantibiotikum Vancomycin, das Cytostatikum Bleomycin und das eisenbindende Siderophor Griseobactin<sup>[57,121,122]</sup>. Proteine, die solche Polypeptide produzieren, bestehen üblicherweise aus verschiedenen Modulen, die wiederum aus Kondensations-, Adenylierungs-, und Thiolationsdomänen bestehen. Das Cluster 1 stellt eine Ausnahme dar. Dieses Cluster besteht aus einer Reihe von Genen, die jeweils nur für eine einzige NRPS-Domäne codieren. Somit besteht dieses Cluster möglicherweise aus einer Urform an *nrps* Genen. Diese Gene, die jeweils aus einer Kondensations-, einer Adenylierungs- beziehungsweise einer Thiolationsdomäne bestehen, könnten Vorläufer der üblichen *nrps* Gene sein, die aus einer Reihe von verschiedenen Domänen bestehen. Die Module aller *nrps* Gene und die Spezifitäten ihrer Adenylierungsdomänen ist im Anhang unter 7.3 aufgelistet.

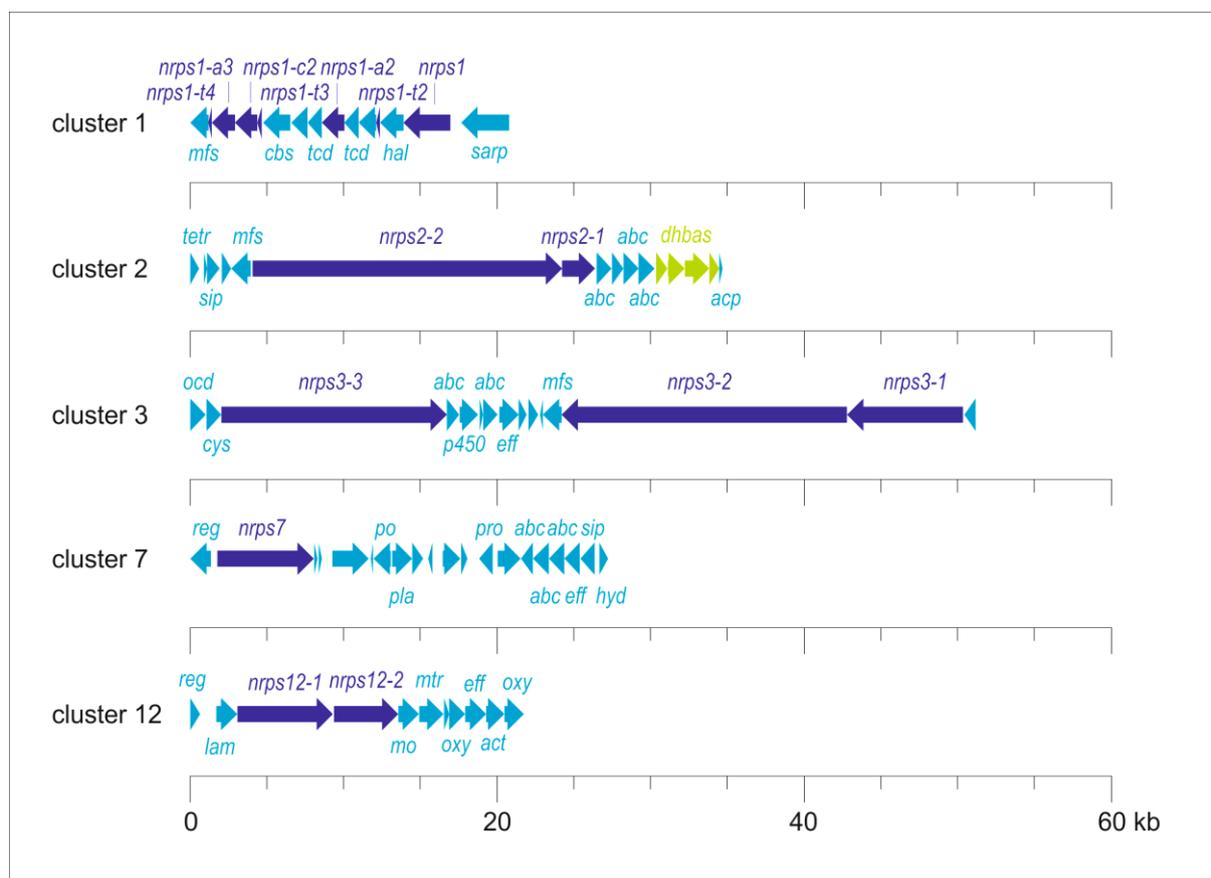


Abbildung 3-2 Cluster der Nichtribosomalen Peptidsynthese aus dem Genom von *S. espanaensis*.

Gene, die für NRPS codieren sind dunkelblau dargestellt. Grün dargestellt sind die Gene, die für die Synthese von aktivierter 2,3-Dihydroxybenzoesäure codieren (*dhbas*). Alle übrigen Gene der Cluster sind hellblau. *abc*, ABC-Transporter; *acp*, Acyl-Carrier-Protein; *act*, Acyl-CoA Transferase; *cbs*, Carbamoyltransferase; *cys*, Cystein Synthase; *eff*, Efflux Protein; *hal*, Histidin Ammonia-Lyase; *hyd*, Hydrolase; *lam*, Lysin 2,3-Aminomutase; *mfs*, Transporter aus der *mfs*-Familie; *mo*, Monooxygenase; *mtr*, Methionyl-tRNA Synthetase; *ocd*, Ornithin Cyclodeaminase; *oxy*, Oxidoreduktase; *p450*, Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase; *po*, Peroxydase; *pro*, Protease; *reg*, Regulator Protein; *sarp*, Regulator typisch für Streptomyceten; *sip*, mit Siderophoren interagierendes Protein; *tcd*, Dioxygenase für den Taurinabbau; *tetr*, Tetracyclin Repressor Protein.

---

Ein anderer bemerkenswerter DNA-Abschnitt, der für NRPS codiert, ist Cluster 2. Dieses Cluster enthält zwei Gene, die für eine NRPS mit sechs Modulen codieren und alle Gene, die für die Synthese von 2,3-Dihydroxybenzoesäure benötigt werden. Diese Struktur ist in Actinomyceten ein typischer Baustein für die Biosynthese von Siderophoren des Catechol-Typs<sup>[122]</sup>. Das Gen *ses26900*, das für ein mit Siderophoren interagierendes Protein codiert, und die drei Gene, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu Eisen-Siderophor ABC-Transportern codieren (*ses26950*, *ses26970* und *ses26980*), unterstützen ebenfalls die Vermutung, dass das Produkt, das von Cluster 2 gebildet wird, für die Eisenaufnahme in *S. espanaensis* verantwortlich ist.

Auch das NRPS-Cluster 7 enthält ein mit Siderophoren interagierendes Protein (*ses45760*) und drei Gene, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Eisen-Siderophor ABC-Transportern aufweisen (*ses45720*, *ses45730* und *ses45740*). Aus diesem Grund liegt die Annahme nahe, dass auch Cluster 7 für die Produktion eines Siderophors verantwortlich ist. Allerdings zeigt die NRPS (*Ses45580*) eine hohe Ähnlichkeit zu TioY aus dem Thiocoralin-Cluster aus *Micromonospora* sp. ML1<sup>[123]</sup>. TioY ist nicht verantwortlich für die Synthese des Peptidgerüsts von Thiocoralin, obwohl die Inaktivierung des Gens die Produktion dieses Cytostatikums hemmt. Es wurde postuliert, dass *tioY* ein kleines Peptid produziert, dass an einer Quorum Sensing Regulation beteiligt sein könnte<sup>[123]</sup>. Cluster 7 könnte also auch für ein solches Regulator-Protein codieren, das möglicherweise für die Regulation des nahe gelegenen Clusters 8 verantwortlich ist.

### 3.1.2.3 Polyketidsynthese-Cluster

Neben den Clustern, die Nichtribosomale Peptide synthetisieren können, gibt es drei Cluster, die Polyketide vom Typ I codieren (Cluster 4,9 und 11). Diese Naturstoffe werden durch die Kondensation von Malonyl-CoA-Bausteinen unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung synthetisiert. Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ I besitzen einen modularen Aufbau und sind in anderen Actinomyceten-Stämmen zum Beispiel für die Produktion des Antibiotikums Erythromycin und des Immunsuppressivums Tacrolimus verantwortlich<sup>[124,125]</sup>. Die PKS-Cluster sind die längsten Cluster im Genom von *S. espanaensis* und bestehen aus 50 bis 86 kb. Die PKS-Cluster sind in Abbildung 3-3 dargestellt, der Aufbau der PKS-Module ist im Anhang unter 7.4 gelistet.

Cluster 11 besitzt drei Gene, die Ähnlichkeiten zu *moeA4*, *moeB4* und *moeC4* (*ses48510*, *ses48520* und *ses48530*) aus dem Moenomycin A-Cluster aus *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 aufweisen<sup>[126]</sup>. Diese Gene sind verantwortlich für die Produktion des Chromophors C<sub>5</sub>N (2-Amino-3-hydroxy cyclopent-2-en-1-on). Somit besitzt die Substanz, die von Cluster 11 produziert wird, wahrscheinlich ebenfalls das in Abbildung 3-4 dargestellte C<sub>5</sub>N-Chromophor.

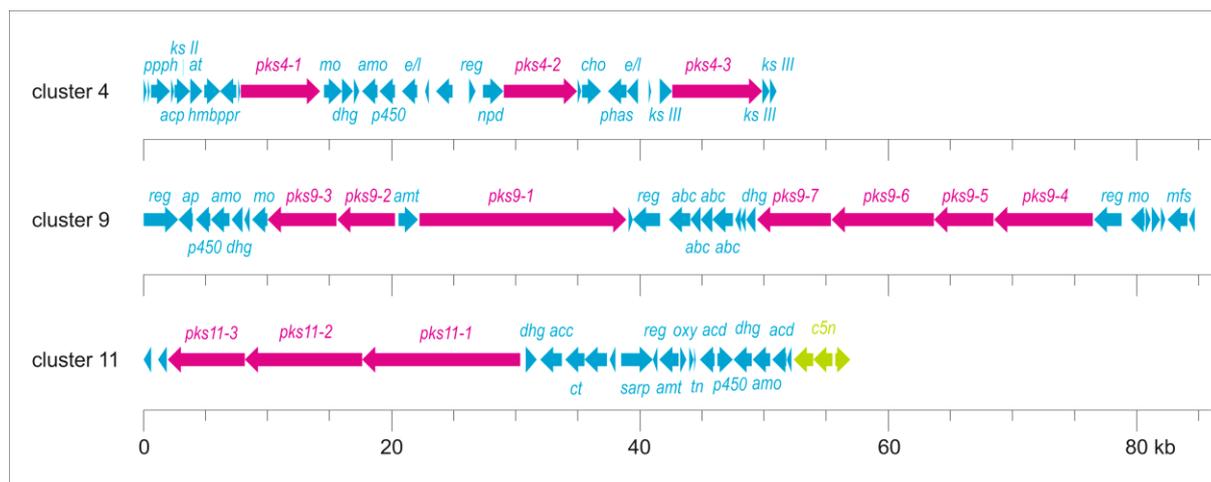


Abbildung 3-3 Cluster der Polyketidsynthese vom Typ I aus dem Genom von *S. espanaensis*.

Gene, die für PKS codieren sind pink dargestellt. Grün dargestellt sind die Gene für die Synthese des Chromophors 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-on (c5n). Alle übrigen Gene der Cluster sind hellblau.

*abc*, ABC-Transporter; *acc*, Acyl-CoA Carboxylase; *acd*, Acyl-CoA Dehydrogenase; *acp*, Acyl-Carrier-Protein; *amo*, Aminoxydase; *amt*, Aminotransferase; *ap*, Aminopeptidase; *at*, Acyltransferase; *cho*, Cholesterol Oxidase; *ct*, Carboxyltransferase; *dhg*, Dehydrogenase; *e/l*, Esterase/Lipase; *hmbppr*, 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat Reduktase; *ksII*, FabF ähnliches Protein; *ksIII*, FabH ähnliches Protein; *mfs*, Transporter aus der *mfs*-Familie; *mo*, Monooxygenase; *npd*, 2-Nitropropan Dioxygenase; *oxy*, Oxidoreduktase; *p450*, Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase; *phas*, Polyhydroxyalkansäure Synthase; *ppph*, 2-Polyprenylphenol-6-Hydroxylase; *reg*, Regulator Protein; *sarp*, Regulator typisch für Streptomyceten; *tn*, Transposase.

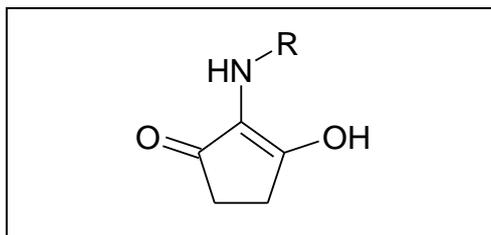


Abbildung 3-4 Struktur des Chromophors 2-Amino-3-hydroxy cyclopent-2-en-1-on.

### 3.1.2.4 Hybrid-Cluster

Zusätzlich zu reinen NRPS- oder PKS-Clustern gibt es sechs Cluster, die beide Arten dieser Sekundärstoff-Synthasen besitzen (Cluster 5, 6, 8, 10, 13 und 14). Zum Beispiel produziert Cluster 5 sehr wahrscheinlich ein Nichtribosomales Peptid, mit einem Polyketid-Anteil. Außerdem besitzt dieses Cluster vier Gene (*ses35400*, *ses35410*, *ses35420*, *ses35440*) ähnlich zu *ozmG*, *ozmE*, *ozmD*, und *ozmB* aus dem Oxazolomycin Cluster von *Streptomyces albus* JA3453<sup>[127]</sup>. Diese Gene sind beteiligt an der Biosynthese eines Methoxymalonyl-ACP. Die Tatsache, dass in Cluster 5 ein Methyltransferasegen mit Ähnlichkeit zu *omzF* fehlt, deutet darauf hin, dass das Polypeptid statt einer  $\alpha$ -Methoxycarbonyl-Einheit eine  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl-Gruppe enthält. Alle NRPS/PKS-Hybrid-Cluster sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

Cluster 6 codiert für ein weiteres NRPS/PKS-Hybrid. Dieses Cluster besitzt eine Endiin-PKS mit allen Genen, die zur Ausbildung des Endiin-Rings notwendig sind (siehe Abbildung 3-5 braun umrandet). Diese Gene sind ähnlich zu denen aus dem Maduropeptin-Cluster in *Actinomadura madurae* ATCC 39144<sup>[128]</sup>. Somit ist Cluster 6 ein putatives Endiin-Cluster. Zusätzlich besitzt es eine PKS, die

wahrscheinlich 6-Methylsalicylsäure produziert. Dieser Baustein ist oft Teil von Antibiotika des Endiin-Typs wie auch in Maduropeptin. Die chemische Struktur von Maduropeptin ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Der NRPS-Teil von Cluster 6 ist möglicherweise für die Verbindung der beiden Polyketidbausteine mit einer Aminosäure verantwortlich.

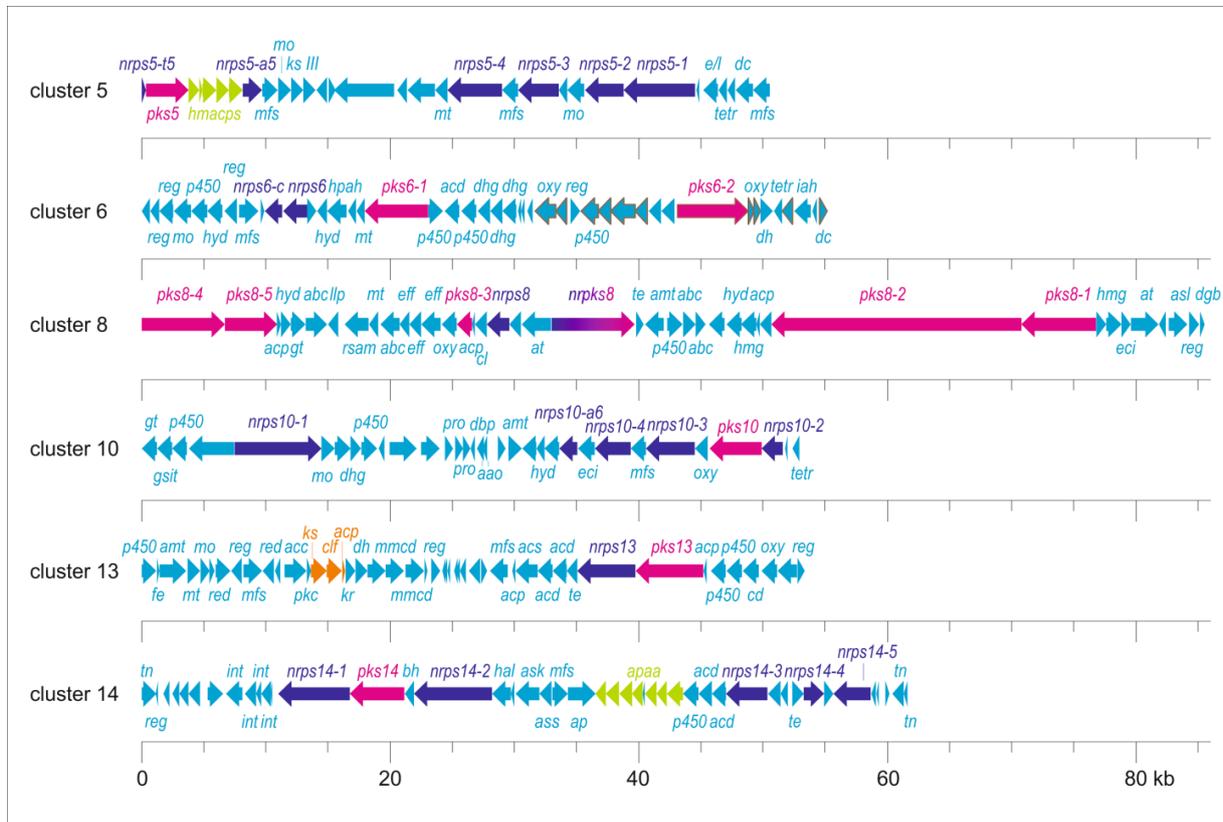


Abbildung 3-5 Cluster der NRPS/PKS-Hybride aus dem Genom von *S. espanaensis*.

Gene, die für PKS vom Typ I codieren sind pink, PKS Typ II Gene sind orange dargestellt. Gene, die für NRPS codieren sind dunkelblau dargestellt. Grün dargestellt sind die Gene für die Synthese von Hydroxymalonyl-ACP (*hmaccps*) und von der Aziridino [1,2a] pyrrolidinyl Aminosäure (*apaa*). Alle übrigen Gene der Cluster sind hellblau. Die Gene, die in Cluster 6 an der Bildung des Endiin-Rings beteiligt sind, sind braun umrandet.

*aa*, Aminosäure Oxidase; *abc*, ABC-Transporter; *acc*, Acyl-CoA Carboxylase; *acd*, Acyl-CoA Dehydrogenase; *acp*, Acyl-Carrier-Protein; *acs*, Acetyl-CoA Synthetase; *amt*, Aminotransferase; *ap*, Aminopeptidase; *asl*, AMP abhängige Synthetase und Ligase; *ask*, Adenylylsulfat Kinase; *ass*, Sulfat Adenylyltransferase; *at*, Acyltransferase; *bh*, beta-Hydroxylase; *cd*, Cystein Desulfurase; *cl*, Chlorierendes Protein; *clf*, Kettenlängen-Faktor; *dbp*, DNA bindendes Protein; *dc*, Decarboxylase; *dgb*, Glyoxalase/Bleomycin Resistenzprotein/Dioxygenase; *dhg*, Dehydrogenase; *e/l*, Esterase/Lipase; *eci*, Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase; *eff*, Efflux Protein; *fe*, Ferredoxin Protein; *gsit*, Glutamin-Scyllo-Inositol Transaminase; *gt*, Glycosyltransferase; *hal*, Histidin Ammonia-Lyase; *hmg*, Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase; *hpah*, 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase; *hyd*, Hydrolase; *iah*, Indolacetamid Hydrolase; *int*, Integrase; *ks*, Ketosynthase; *ksIII*, FabH ähnliches Protein; *lip*, Lipolytisches Protein; *mfs*, Transporter aus der *mfs*-Familie; *mmcd*, Methylmalonyl-CoA Decarboxylase; *mo*, Monooxygenase; *mt*, Methyltransferase; *oxy*, Oxidoreduktase; *p450*, Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase; *pkc*, Polyketid Cyclase; *pro*, Protease; *red*, Reduktase; *reg*, Regulator Protein; *rsam*, Radical SAM Protein; *tetr*, Tetracyclin Repressor Protein; *tn*, Transposase.

Das NRPS/PKS-Hybrid-Cluster 8 weist eine hohe Homologie zu einem uncharakterisierten Cluster aus *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029 auf [GenBank:CP002162]. Beide Cluster unterscheiden sich nur in sechs zusätzlichen Genen am linken Rand des *S. espanaensis*-Clusters. Ein charakterisiertes Cluster mit hoher Sequenzhomologie zu beiden Clustern wurde in *Streptomyces atroolivaceus* S-140 gefunden. Dieses Cluster produziert das in Abbildung 3-6 dargestellte Leinamycin, welches

durch eine PKS mit separat arbeitender Acyltransferase (*trans*-AT) gebildet wird <sup>[129]</sup>. Insgesamt 16 CDS aus Cluster 8 zeigen sehr hohe Homologien zum Gencluster dieses Cytostatikums. Die PKS-Gene beider Cluster bestehen aus ähnlichen Modulen und das *S. espanaensis*-Cluster besitzt ebenfalls eine *trans*-AT. In beiden Clustern findet sich auch ein gleichartiges NRPS/PKS-Hybrid-Gen. Allerdings fehlen in Cluster 8 aus *S. espanaensis* entsprechende Gene zur Produktion eines separat arbeitenden Proteins mit Adenylierungsdomäne und ein Peptidyl-Carrier-Protein ähnlich denen im Leinamycin-Cluster. Das gleiche gilt für die modifizierenden Enzyme: es fehlen homologe Gene zu *lnmB*, *lnmD* und *lnmW* in Cluster 8, aber Gene mit Ähnlichkeiten zu *lnmA*, *lnmF* und *lnmZ* sind vorhanden. Außerdem enthält Cluster 8 zusätzliche Gene, die für modifizierende Enzyme wie eine Glycosyltransferase (*ses45900*) und eine Methyltransferase (*ses45940*) codieren. Darüber hinaus enthält Cluster 8 auch ein Gen, das für ein chlorübertragendes Enzym codiert. Das Produkt dieses Gens zeigt Ähnlichkeit zu SyrB2. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Übertragung von Chlor auf Threonin während der Syringomycin E-Biosynthese in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D <sup>[130]</sup>. Cluster 8 produziert also sehr wahrscheinlich eine Substanz, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Leinamycin aufweist.

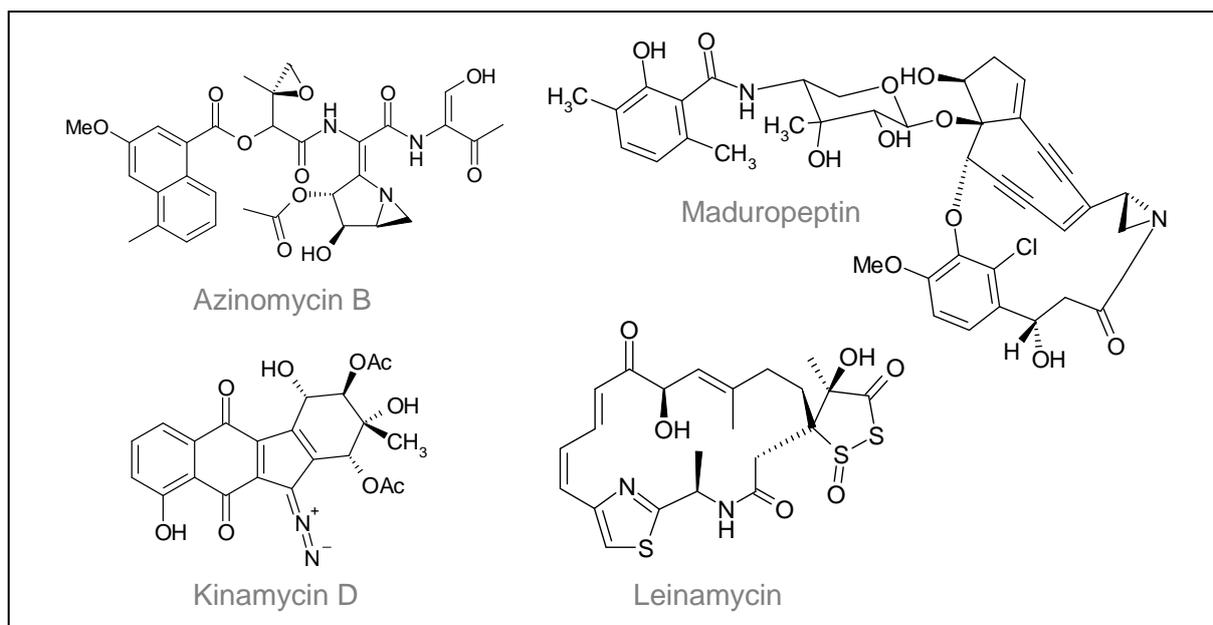


Abbildung 3-6 Strukturformeln von Azinomycin B aus *Streptomyces sahachiroi*, Kinamycin D aus *Streptomyces murayamaensis*, Leinamycin aus *Streptomyces atroolivaceus* S-140 und Maduropeptin aus *Actinomadura madurae* ATCC 39144.

Cluster 13 ist nicht nur ein Hybrid aus NRPS und PKS vom Typ I, sondern enthält auch Gene, die für PKS vom Typ II codieren. Der Teil des Clusters, der für die PKS-Gene vom Typ II codiert, zeigt große Ähnlichkeit zum Kinamycin-Gencluster aus *Streptomyces murayamaensis* [GenBank: AH012623.1]. Die Struktur von Kinamycin ist in Abbildung 3-6 gezeigt <sup>[131]</sup>. Alle Strukturgene des Kinamycin-Clusters sind in Cluster 13 vorhanden. Zusätzlich enthält das *S. espanaensis*-Cluster weitere Gene, die für modifizierende Enzyme wie zum Beispiel eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase (*ses54730*), eine Aminotransferase (*ses54750*) und eine Methyltransferase (*ses54760*)

---

codieren. Die NRPS und PKS vom Typ I dieses Clusters könnten an der Modifikation des PKS II-Grundgerüsts mitwirken und somit ebenfalls zur Produktion eines Kinamycin-Derivats beitragen.

Ein weiteres Hybrid, Cluster 14, zeigt Ähnlichkeiten zum Azinomycin B-Biosynthesegen-Cluster aus *Streptomyces sahachiroi*. Azinomycin B ist ein Zytostatikum bestehend aus einem Carboxynaphthalin aus dem Polyketidstoffwechsel, das mit einem Nichtribosomalen Peptid verknüpft ist <sup>[132]</sup>. Die chemische Struktur von Azinomycin B ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Der Peptidteil dieses Moleküls ist aus seltenen Bausteinen wie  $\alpha$ -Ketovalin und einer Aziridino-[1,2a]-pyrrolidinyl-Aminosäure zusammengesetzt <sup>[132]</sup>. Cluster 14 beinhaltet *ses56840*, dessen Genprodukt Ähnlichkeiten zu AziC1 aufweist, das die Reaktion von Valin zu  $\alpha$ -Ketovalin katalysiert. Außerdem sind abgesehen von einem Gen, dessen Produkt homolog zu Azi8 ist, alle Gene vorhanden, die wahrscheinlich für die Produktion der Aziridino-[1,2a]-pyrrolidinyl-Aminosäure verantwortlich sind (*aziC2-aziC7* und *aziC9-aziC10*; *ses56710*, *ses56680*, *ses56700*, *ses56740*, *ses56730*, *ses56750*, *ses56760*, und *ses56690*). Zusätzlich besitzt das Cluster homologe Gene zu *aziD2* und *aziD3* (*ses56770* und *ses56780*), die für weitere Modifikationen an der Grundstruktur verantwortlich sind. Allerdings unterscheiden sich die PKS-Module aus dem Azinomycin B-Cluster von denen, die in Cluster 14 identifiziert wurden. Der aus dem Polyketidstoffwechsel stammende Strukturteil unterscheidet sich also vom Carboxynaphthalin, aus dem Azinomycin B. Eine weitere hervorzuhebende Feststellung ist, dass Cluster 14 von Transposase- und Integrase-Genen umgeben ist. Das deutet darauf hin, dass das Cluster über horizontalen Gentransfer ins Genom von *S. espanaensis* gelangt ist.

### 3.1.2.5 Weitere Sekundärstoff-Cluster

Zusätzlich zu den Sekundärstoff-Clustern, welche die weit verbreiteten NRPS, PKS und Terpen-Synthesen beinhalten, besitzt das Genom von *S. espanaensis* seltener Cluster-Arten. Zum Beispiel enthält es ein putatives Aminocyclitol-Cluster. Der bekannteste Vertreter der Aminocyclitole ist das Antidiabetikum Acarbose. Die Gene des Aminocyclitol-Clusters aus *S. espanaensis* bilden eine Operon-Struktur. Ein sehr ähnliches, aber ebenfalls uncharakterisiertes Operon befindet sich im Genom von *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 [GenBank:ABJH000000000]. Teile beider Cluster zeigen Ähnlichkeiten zu dem Cluster des Trehalase-Inhibitors Salbostain aus *Streptomyces albus* ATCC 21838 <sup>[133]</sup>. Alle weiteren Cluster aus dem Genom von *S. espanaensis* sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

Weiterhin besitzt das Genom von *S. espanaensis* zwei Lantibiotika Cluster (*lan1* und *lan2*). Lantibiotika sind ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide, mit Quervernetzungen der Aminosäuren über Thioether <sup>[14]</sup>. Für die Synthese eines Lantibiotikums wird ein Strukturgen (*lanA*) benötigt. *LanA* wird ribosomal synthetisiert und besteht aus einer N-terminalen Leadersequenz und einem C-terminalen Propeptid. Eine posttranslationale Zyklisierung von Aminosäuren des Propeptids wird von *LanC* katalysiert, nachdem die entsprechende Aminosäure von *LanB* dehydriert wurde. In

einigen Lantibiotika-Clustern wird die Dehydrierung und anschließende Zyklisierung der Aminosäuren von einem einzigen Enzym (LanM) katalysiert.

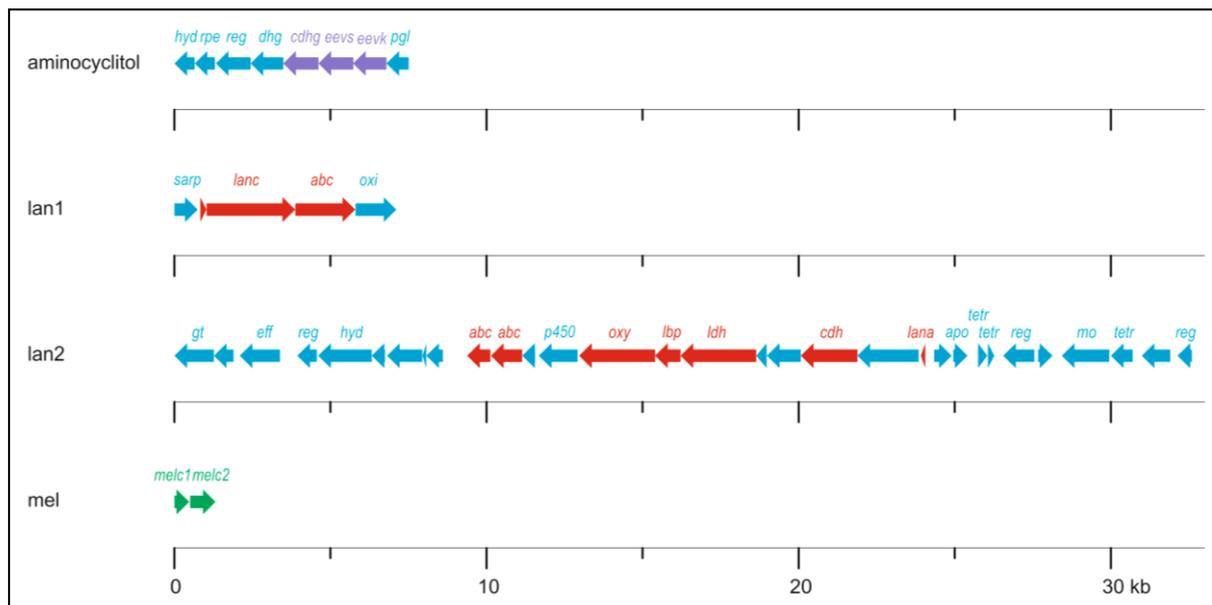


Abbildung 3-7 Weitere Cluster aus dem Genom von *S. espanaensis*.

Gene, die wahrscheinlich an der Synthese von Aminocyclitol beteiligt sind, sind lila dargestellt. Gene, die möglicherweise an der Produktion von Lantibiotika mitwirken, sind rot dargestellt. Grün dargestellt sind die Gene für die Synthese von Melanin. Alle übrigen Gene der Cluster sind hellblau.

*abc*, ABC Transporter; *apo*, Apoprotein; *cdh*, Cyclodehydratase; *cdhg*, Cyclitol Dehydrogenase; *dhg*, Dehydrogenase; *eevk*, 2-Epi-5-epi-valiolon-7-kinase; *eevs*, 2-Epi-5-epi-valiolon Synthase; *eff*, Efflux Protein; *gt*, Glycosyltransferase; *hyd*, Hydrolase; *lana*, lanA ähnliches Protein; *lanc*, LanC ähnliches Protein; *lbp*, Lantibiotika Biosyntheseprotein; *ldh*, Lantibiotika Dehydrogenase; *melc1*, Tyrosinase Co-Faktor; *melc2*, Tyrosinase; *mo*, Monooxygenase; *oxi*, Oxidase; *oxy*, Oxidoreduktase; *p450*, Cytochrom P450; *pgl*, 6-Phosphogluconolactonase; *reg*, Regulator Protein; *rpe*, Ribulosephosphat-3-epimerase; *sarp*, Regulator typisch für Streptomyceten; *tetr*, Tetracyclin Repressor Protein.

Das Lantibiotikum wird anschließend über einen Transporter (LanT) aus der Bakterienzelle geschleust. Dabei wird auch die Leadersequenz abgespalten. Das lan1-Cluster aus *S. espanaensis* besteht aus einer Reihe von Genen mit Ähnlichkeit zu Genen aus *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728 [GenBank:CP001778]. Das lan1-Cluster besitzt das Gen *ses41320*, das nur aus 192 bp besteht. Auf Grund der Größe ist es möglich, dass dieses Gen für ein LanA Strukturprotein codiert. Eine Ähnlichkeit zu bekannten LanA-Proteinen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Das Genprodukt von *ses41330* zeigt Sequenzähnlichkeit zu LanC und LanM. Ein Gen, dessen Produkt Ähnlichkeiten zu LanB aufweist, wurde nicht entdeckt. Die C-terminalen Domänen von LanM-Proteinen zeigen üblicherweise Ähnlichkeiten zu LanC. Dieser Teil des Enzyms ist für die Zyklisierung der Aminosäuren verantwortlich. Der N-Terminus von LanM-Proteinen zeigt keine Ähnlichkeit zur Dehydratase LanB. *Ses41330* besitzt eine Zyklisierungsdomäne. Es konnte aber keine Domäne zur Dehydrierung identifiziert werden. Insgesamt ist die Sequenzähnlichkeit von *Ses41330* zu LanC höher als zu LanM. Ob das Enzym *Ses41330* sowohl die Zyklisierung als auch die Dehydrierung von Aminosäuren katalysiert, kann nur durch experimentelle Untersuchungen abschließend geklärt werden. Besitzt *Ses41330* keine Dehydratase-Domäne handelt es sich bei lan1 um ein unvollständiges Lantibiotika-Cluster. Es ist also fraglich, ob das Cluster lan1 tatsächlich zu Produktion eines Lantibiotikum führt, oder ob es sich um ein defektes Cluster handelt.

Das lan2-Cluster besitzt das Gen *ses54200*, dessen Produkt Ähnlichkeiten zum Strukturprotein LanA aus dem Thiomuracin-Biosynthese-Gencluster aus *Nonomuraea* sp. Bp3714-39 <sup>[134]</sup> aufweist. Außerdem besteht das Cluster aus Genen, die möglicherweise an der Dehydrierung (*ses54130*, *ses54140* und *ses54150*) und an der Zyklisierung von Aminosäuren beteiligt sind. Aus diesem Grund wird angenommen, dass es sich bei dem Cluster lan2 um ein funktionsfähiges Lantibiotika-Cluster handelt. Eine weitere Besonderheit des lan2-Clusters ist das Gen *ses54220*. Das Produkt dieses Gens ähnelt dem Apoprotein aus dem Neocarzinostatin-Cluster, einem Endiin-Chromoprotein aus *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 <sup>[135]</sup>. Das Neocarzinostatin-Apoprotein dient dem Transport des sehr instabilen Neocarzinostatin-Chromophors. Nur die Kombination von Chromophor und Apoprotein ist zytostatisch aktiv <sup>[136]</sup>. Das Apoprotein aus dem lan2-Cluster könnte zur Stabilisierung des Lantibiotikums dienen. Allerdings wurde ein Apoprotein bisher noch nie in Kombination mit einem Lantibiotikum entdeckt.

Das Genom von *S. espanaensis* besitzt schließlich noch ein Melanin-Cluster (*mel*) <sup>[137]</sup>. Sowohl ein Tyrosinasegen (*ses45030*) als auch ein Gen, das für den Tyrosinase Co-Faktor codiert (*ses45020*), sind in diesem Cluster vorhanden. Das bedeutet, dass *S. espanaensis*, der üblicherweise einen gelblichen Phänotyp aufweist, auch dazu in der Lage ist ein schwarzes Pigment zu produzieren.

## 3.2 Untersuchungen zur Saccharomicin-Biosynthese

Die Saccharomicine A und B sind aus einem *N*-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-taurin Aglycon und einer aus 17 Zuckern bestehenden Seitenkette aufgebaut <sup>[10]</sup>. M. Berner konnte einen Teil der Biosynthese des Aglycons aufklären: Durch die heterologe Expression von *sam8*, einem Tyrosin-Ammoniak-Lyasegen, in *S. fradiae* XKS konnte er die Produktion von *p*-Cumarsäure nachweisen. Die Koexpression von *sam8* mit *sam5*, einem 4-Cumarat-3-Hydroxylasegen, führte zur Produktion von Kaffeesäure <sup>[80]</sup>. Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit rekonstruiert werden. Außerdem sollten zusätzliche Experimente, die zur weiteren Aufklärung der Biosynthese des Saccharomicin-Aglycons beitragen, durchgeführt werden.

### 3.2.1 Heterologe Expression von Kaffeesäure-Biosynthesegenen

Zur Rekonstruktion der von M. Berner gezeigten Kaffeesäure-Synthese wurden die Gene *sam8* und *sam5* in den Vektor pTESb kloniert (siehe 5.9.1.1). Das erhaltene Plasmid pTESb-sam8+5 sollte verwendet werden, um die Gene mittels Konjugation in einen heterologen Wirt einzubringen. Die Gene sollten in das Wirtsgenom integrieren und dort über den ermEp1-Promotor abgelesen werden. Das Plasmid wurde in den von M. Berner verwendeten Wirt *S. fradiae* XKS und in *Streptomyces albus* J1074 (*S. albus*) eingebracht. Die Mutanten *S. fradiae* XKS x pTESb-sam8+5 und *S. albus* x pTESb-sam8+5 wurden kultiviert (siehe 5.7.2) und auf Kaffeesäure-Produktion untersucht (siehe 5.12.1. und 5.12.5.1). Obwohl die Gene *sam8* und *sam5* jeweils im Genom mittels PCR nachgewiesen wurden, konnte die Kaffeesäure-Produktion für keine der beiden Mutanten gezeigt werden.

In Zusammenarbeit mit N. Gehring wurden im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Gene *sam8* und *sam5* in die Vektoren pTAJA und pUWL-A kloniert<sup>[138]</sup>. Die resultierenden Plasmide pTAJA-*sam8+5* und pUWL-*sam8+5* wurden in *S. albus* konjugiert. Beide Gene konnten in den Genomen der erhaltenen Exkonjuganden *S. albus* x pTAJA-*sam8+5* und *S. albus* x pUWL-A-*sam8+5* mittels PCR nachgewiesen werden. Die beiden Mutanten wurden kultiviert und auf Kaffeesäure-Produktion untersucht. Für die Mutante *S. albus* x pTAJA-*sam8+5* konnte keine Kaffeesäure-Produktion nachgewiesen werden. Der Rohextrakt der Kultivierung von *S. albus* x pUWL-A-*sam8+5* zeigte im Vergleich zum Rohextrakt der Kultivierung des Wildtyps einen Peak bei 10,4 min, dessen UV-Absorptions- und Massenspektren denen der Kaffeesäure-Referenzsubstanz entsprechen (siehe Abbildung 3-8). Zusätzlich findet sich im Rohextrakt von *S. albus* x pUWL-A-*sam8+5* bei 11,6 min ein zusätzlicher Peak. Im Massenspektrum dieses Peaks konnten negativ geladene Fragmentationen einer Masse von 135 u und 179 u detektiert werden. Diese Fragmentationen sind für Kaffeesäure typisch und deuten darauf hin, dass auch ein Kaffeesäure-Derivat gebildet wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass Kaffeesäure unter Verwendung des Multicopy-Plasmids pUWL-A-*sam8+5* im heterologen Wirt *S. albus* produziert werden konnte.

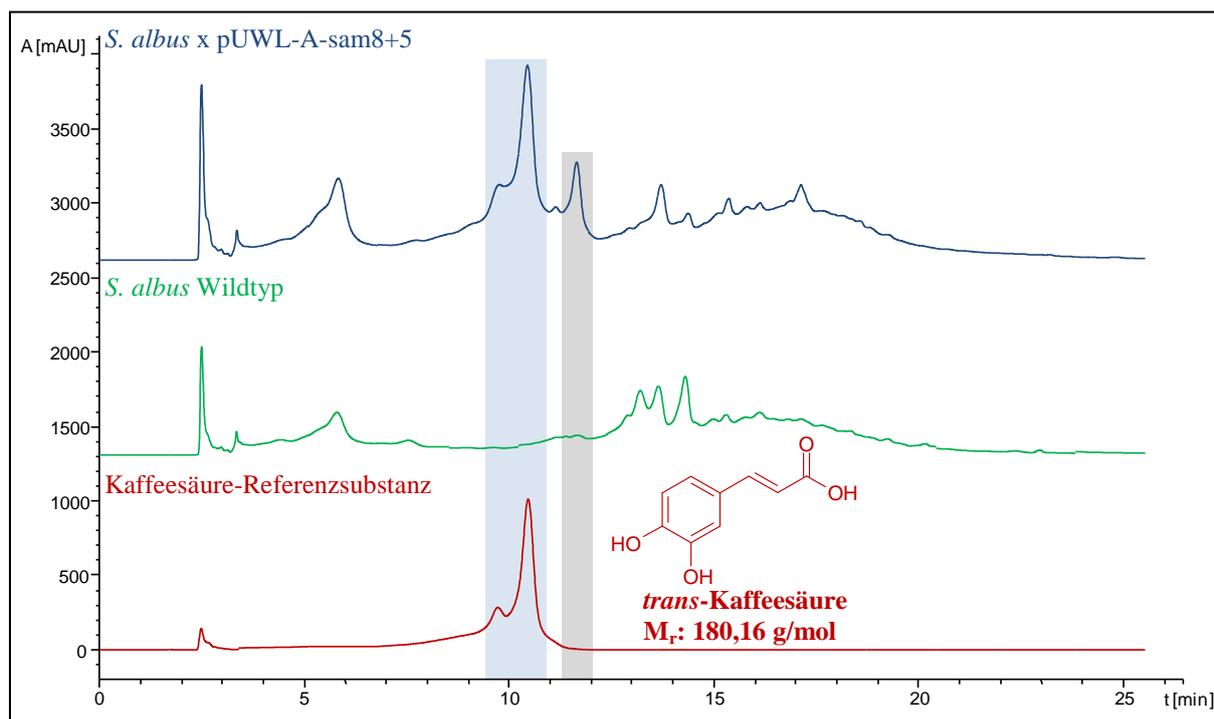


Abbildung 3-8 HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 310$  nm) der Ethylacetat-Extrakte der Kulturen von *S. albus* x pUWL-A-*sam8+5* (blau) und *S. albus* Wildtyp (grün). Rot dargestellt ist das Chromatogramm der Kaffeesäure Referenzsubstanz. Hellblau hinterlegt ist ein Peak bei 10,4 min, der Kaffeesäure entspricht. Hellgrau hinterlegt ist ein neuer Peak, der einem möglichen Kaffeesäure-Derivat entspricht. Die Strukturformel von *trans*-Kaffeesäure ist abgebildet.

### 3.2.2 Heterologe Expression des putativen Kaffeoyle-CoA-Ligasegens *sam7*

Zur Untersuchung der Funktion der putativen Kaffeoyle-CoA-Ligase aus dem *sam*-Cluster sollte das Gen *sam7* in dem heterologen Wirt *S. albus* exprimiert werden. Die erhaltene Mutante sollte mit Kaffeesäure supplementiert, mehrere Tage kultiviert und anschließend extrahiert werden (siehe 5.12.1). Der erhaltene Extrakt sollte auf das Vorhandensein von Kaffeoyle-CoA untersucht werden.

Dafür wurde das Gen *sam7* in den Vektor pTAJA kloniert (siehe 5.9.1.2). Das resultierende Plasmid pSET\*sam7 wurde in *S. albus* konjugiert. Das Gen *sam7* konnte in den erhaltenen *S. albus* x pSET\*sam7-Exkonjuganden mittels PCR nachgewiesen werden. Die Mutante wurde unter Zugabe von 25 mg/mL Kaffeesäure in HA-Medium kultiviert. Das Metabolitenspektrum der Kultur wurde jeweils an vier aufeinanderfolgenden Tagen untersucht, beginnend 24 h nach Start der Kultivierung. Dafür wurde die Kultur mit Ethylacetat extrahiert (siehe 5.12.1) und der erhaltene Rohextrakt mittels HPLC/ESI-MS untersucht (siehe 5.12.5.1). In den erhaltenen Chromatogrammen konnte ein Peak identifiziert werden, der auf Grund von Retentionszeit, UV- und Massenspektrum Kaffeesäure zugeordnet werden konnte. Es wurde kein neuer Peak detektiert, dessen Massenspektrum einen Peak mit 929 g/mol zeigt. Damit wurde kein Kaffeoyl-CoA detektiert.

### 3.2.3 Identifizierung möglicher Taurin-Biosynthesegene

Das Saccharomicin-Aglycon besteht aus Kaffeesäure und Taurin, die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind. Die Biosynthese von Taurin konnte in Bakterien noch nicht gezeigt werden [139]. In Eukaryonten erfolgt die Synthese von Taurin entweder durch die Oxidation von Cystein durch die Cysteindioxygenase (CDO) unter Cysteinsulfinat-Bildung, das durch eine Cysteinsulfinat-Decarboxylase (CSAD) decarboxyliert wird, oder aus Cysteamin durch eine Oxidation mittels einer 2-Aminoethanthiol-Dioxygenase (ADO). Beide Biosynthesewege bilden Hypotaurin, welches zu Taurin oxidiert wird [6].

Zur Identifizierung möglicher Taurin-Biosynthesegene wurden die Sequenzen bekannter Enzyme aus anderen Organismen mit den Genprodukten aller CDS aus dem Genom von *S. espanaensis* verglichen. Diese BLASTp-Analyse wurde mit Enzymen durchgeführt deren Funktionen experimentell bestätigt sind. Zur Identifizierung der CDO wurde SCO3035 aus *Streptomyces coelicolor* verwendet [139]. Die CSAD und die ADO wurden mit den entsprechenden Enzymen aus der Wanderratte gesucht (GenBank: ACF07922 und NP\_001101096) [6]. Das Ergebnis der BLASTp-Analysen ist in Tabelle 3-5 dargestellt.

**Tabelle 3-5 Ergebnis der BLASTp-Analysen zur Identifizierung von Taurin-Biosynthesegenen. 1: Gesuchtes Protein; 2: Name des experimentell charakterisierten Vergleichsproteins; 3: Genprodukt aus *S. espanaensis* mit Ähnlichkeit zu 2; 4: Anteil identischer Aminosäuren/Anteil ähnlicher Aminosäuren von 2 und 3 in %; 5: Name des Proteins mit größter Ähnlichkeit zu 3; 6: Anteil identischer Aminosäuren/Anteil ähnlicher Aminosäuren von 3 und 5 in %.**

1	2	3	4	5	6
CDO	SCO3035	Ses71790	45/59	Amir_5989	75/85
		Ses72720	39/52	Amir_6068	69/77
CSAD	ACF07922	Ses32170	28/45	Sros_1440	74/81
		Ses68200	29/43	Amir_5685	71/83
		Ses23400	27/42	BRAS3809_930013	60/71
ADO	NP_001101096	---	---	---	---

Die BLASTp-Analyse hat ergeben, dass das Genom von *S. espanaensis* zwei Gene besitzt, die möglicherweise für eine CDO codieren. Der Vergleich mit der CSAD zeigte, dass es in *S. espanaensis* drei Genprodukte gibt, die Ähnlichkeiten aufweisen. Diese Enzyme zeigen allerdings weit höhere Ähnlichkeiten zu anderen Aminosäure-Decarboxylasen. Es wurden keine Gene identifiziert, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zur ADO aufweisen.

### 3.2.4 Plasmide zur Untersuchung der Biosynthese des Saccharomicin-Aglycons

Zur weiteren Aufklärung der Biosynthese des Saccharomicin-Aglycons wurde das Plasmid pTOS\*sam7+5+8 kloniert (siehe 5.9.1.3). Dieses Plasmid kann verwendet werden, um die Gene, die für eine Tyrosin-Ammoniak-Lyase, eine 4-Cumarat-3-Hydroxylase und eine putative Kaffeoyl-CoA-Ligase codieren, in Actinomyceten zu exprimieren. Dieses Plasmid kann in weiterführenden Experimenten verwendet werden, um zu überprüfen, ob diese drei Enzyme für die Produktion von Kaffeoyl-CoA verantwortlich sind.

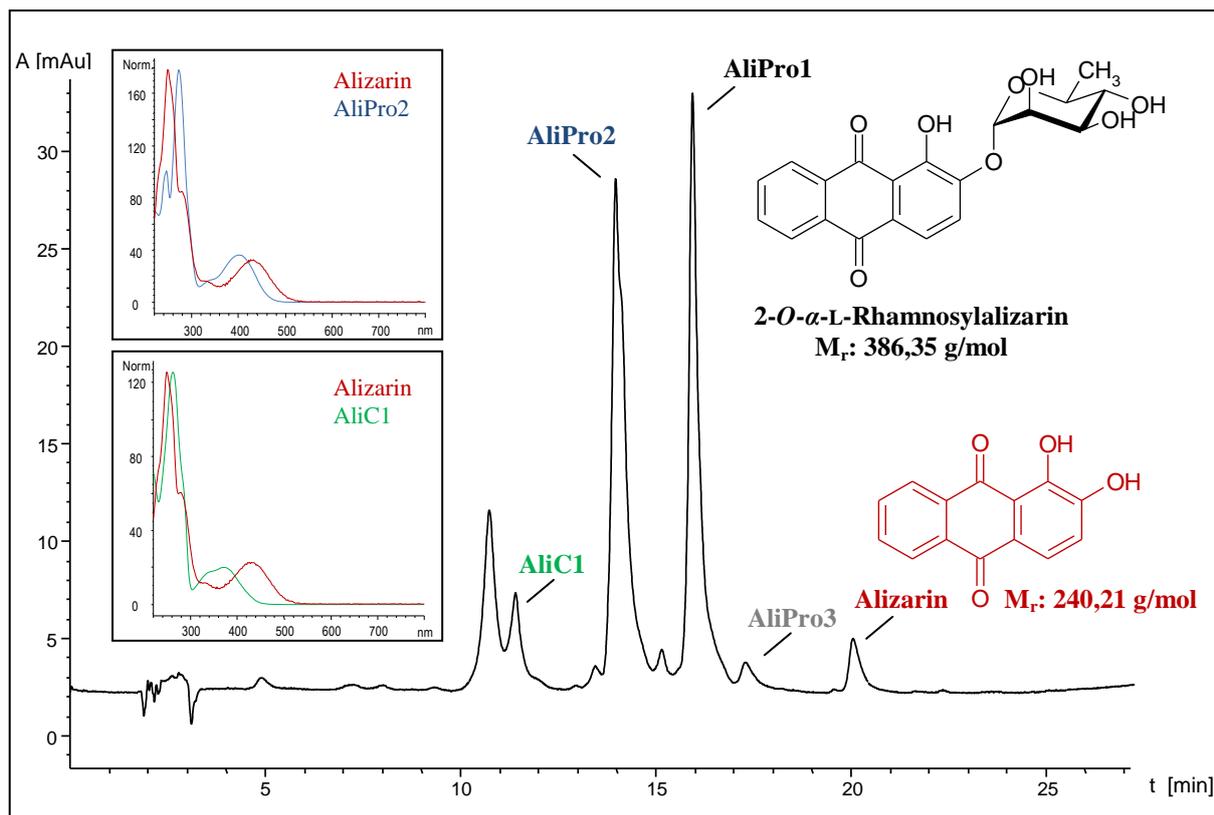
Außerdem wurde das Plasmid pTOS\*sam7+5+8+36 kloniert (siehe 5.9.1.4). Dieses Plasmid enthält neben den drei Genen *sam7*, *sam5* und *sam8* noch das Gen *sam36*. Dieses Gen codiert für ein Enzym mit Ähnlichkeit zu der Penicillinamidase SacazDRAFT\_02075 aus *Saccharomonospora azurea* NA-128. Der BLASTp-Vergleich beider Enzyme ergibt 57 % identische und 70 % ähnliche Aminosäuren. Penicillinamidasen spalten die Amidbindung in Penicillinen. Die Rückreaktion, also die Knüpfung einer Amidbindung, wird bei der Synthese des Saccharomicin-Aglycons benötigt. Das erstellte Plasmid pTOS\*sam7+5+8+36 kann in weiterführenden Experimenten dazu verwendet werden, um zu überprüfen, ob *sam36* für ein Enzym codiert, dass die aktivierte Kaffeesäure mit Taurin unter Ausbildung einer Amidbindung verknüpft.

## 3.3 Biotransformationsexperimente mit *S. espanaensis*

Wird der Actinomycet *S. espanaensis* in Flüssigmedium unter Zugabe von Xenobiotika wie Alizarin oder Emodin kultiviert, werden in den Kulturextrakten per HPLC/ESI-MS neue Substanzen detektiert<sup>[82]</sup>. Diese neuen Stoffe zeigen ein UV-Absorptionsspektrum mit Ähnlichkeit zu der zugefütterten Substanz und im Massenspektrum ist ein Massenzuwachs zu erkennen. Das führte zur Annahme, dass *S. espanaensis* Biotransformationsaktivität besitzt. Bei der Biotransformation nimmt *S. espanaensis* die zugegebenen Substanzen auf, derivatisiert sie und setzt sie frei<sup>[82]</sup>. A. Linnenbrink zeigte, dass es sich bei den Biotransformationsprodukten um verschiedene hydroxylierte und rhamnosylierte Derivate handelt<sup>[3]</sup>. Die Fütterung von strukturell verschiedenen Xenobiotika, wie zum Beispiel Quercetin oder Novobiocinsäure, führte ebenfalls zur Bildung von rhamnosylierten Derivaten. Damit konnte gezeigt werden, dass der Stamm *S. espanaensis* eine GT mit geringer Substratspezifität besitzt<sup>[3]</sup>.

### 3.3.1 Biotransformation von Alizarin

Für Biotransformationsexperimente in *S. espanaensis* und verschiedenen Mutanten wurde Alizarin stets als Testsubstanz verwendet. Alizarin ist käuflich zu erwerben, günstig und wird von *S. espanaensis* sehr gut umgesetzt. Abbildung 3-9 zeigt das HPLC/ESI-MS-Diagramm des Rohextrakts einer Kultur von *S. espanaensis*, die mit Alizarin gefüttert wurde. Das Hauptprodukt der Biotransformationsreaktion ist AliPro1. Die Struktur dieser Substanz konnte von A. Linnenbrink mittels NMR-Analyse bestimmt werden. Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin<sup>[3]</sup>.



**Abbildung 3-9** HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 430$  nm) des Ethylacetat-Extrakts einer Kultur von *S. espanaensis* nach Zufütterung von Alizarin und UV-Absorptionsspektren von Alizarin (rot), AliPro2 (blau) und AliC1 (grün). Die Strukturformeln von Alizarin und AliPro1 sind abgebildet.

Neben AliPro1 wurden weitere Biotransformationsprodukte gebildet. Bei einer Retentionszeit (RT) von 14,0 min wurde die Substanz AliPro2 detektiert. Das UV-Absorptionsspektrum dieser Substanz ist ähnlich dem von Alizarin. Im Massenspektrum von AliPro2, das im positiven Modus gemessen wurde, liegt das höchste Signal bei  $m/z = 571$   $[M+Na]^+$ . Im negativen Modus findet man Signale mit  $m/z = 547$   $[M-H]^-$  und  $m/z = 583$   $[M+Cl]^-$ . Das Signal mit höchster Intensität im negativen Modus entspricht einem Fragmentation mit  $m/z = 401$   $[M-Rham-H]^-$ . Der Massengewinn von 308 u (16 u + 146 u + 146 u) deutet auf eine Hydroxylierung und eine zweifache Rhamnosylierung hin.

Eine weitere Substanz mit einem UV-Absorptionsspektrum ähnlich dem Spektrum von Alizarin wurde bei einer RT von 11,4 min detektiert. In den Massenspektren der Substanz AliC1 liegen die Signale mit größter Intensität bei  $m/z = 555$   $[M+Na]^+$  und  $m/z = 567$   $[M+Cl]^-$ . Im negativen Modus konnten außer-

dem die Fragmentionen  $m/z = 385$  [M-OH-Rham-H]<sup>-</sup> und  $m/z = 401$  [M-Rham-H]<sup>-</sup> detektiert werden. Der Massengewinn von 292 u (146 u + 146 u) deutet auf eine zweifache Rhamnosylierung hin.

Bei einer RT von 17,3 min findet sich noch eine Substanz, die ein mit dem von Alizarin vergleichbares UV-Absorptionsspektrum aufweist. AliPro3 zeigt im Massenspektrum, das im negativen Modus gemessen wurde, ein Signal mit höchster Intensität bei  $m/z = 255$  [M-H]<sup>-</sup>. Der Massengewinn von 16 u deutet auf eine Hydroxylierung hin.

### 3.3.1.1 Isolierung von AliPro2 und AliC1

Aus zwei Litern Kultur von *S. espanaensis*, gefüttert mit insgesamt 100 mg Alizarin, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) und eine Sephadex LH-20 Säule (siehe 5.12.4) gereinigt. Auf diese Weise konnten 3,4 mg AliPro2 und 4,6 mg AliC1 jeweils als orange-rotes Pulver gewonnen werden.

### 3.3.1.2 Strukturanalyse von AliPro2

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in DMSO- $d_6$  gelöst und vermessen. Die Auswertung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und TOCSY-1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY) führten zur Aufklärung der Struktur von AliPro2 (siehe Abbildung 3-10). Es handelt sich dabei um 2,3-Di-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosylanthragallol. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.1 zusammengefasst.

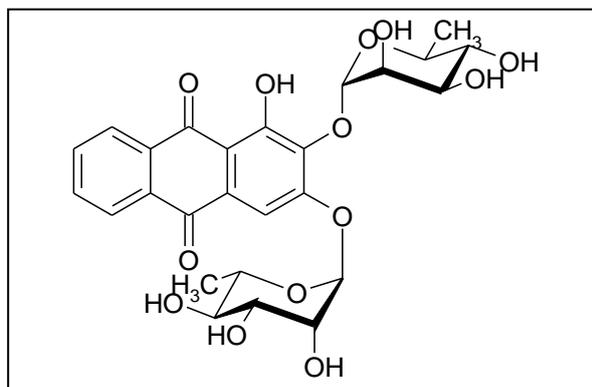


Abbildung 3-10 Strukturformel von AliPro2, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2,3-Di-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosylanthragallol ( $M_r$ : 548,49 g/mol).

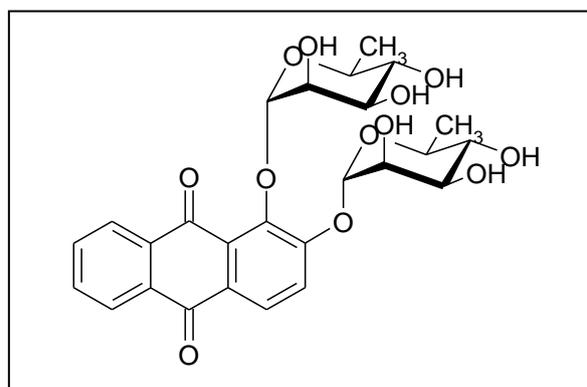


Abbildung 3-11 Strukturformel von AliC1, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 1,2-Di-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosylalizarin ( $M_r$ : 532,49 g/mol).

### 3.3.1.3 Strukturanalyse von AliC1

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in DMSO- $d_6$  gelöst und vermessen. Die Auswertung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY) führten zur Aufklärung der Struktur von AliProC1 (siehe Abbildung 3-11). Es handelt sich dabei um 1,2-

Di-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosylizarin. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.2 zusammengefasst.

### 3.3.2 Biotransformation von Aminoanthrachinonen in *S. espanaensis*

Zur Untersuchung des Substratspektrums der GT, die in *S. espanaensis* an der Biotransformationsreaktion beteiligt ist, wurden weitere Fütterungen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob nicht nur Hydroxylgruppen sondern auch Aminogruppen als Nukleophil akzeptiert werden. Dafür wurden die drei Substanzen 1,4-Diaminoanthrachinon (U3), 1-Amino-2-methylantrachinon (U7) und 2-Aminoanthrachinon (U8) verwendet. Abbildung 3-12 zeigt die HPLC/ESI-MS-Diagramme der Rohextrakte der verschiedenen Fütterungen.

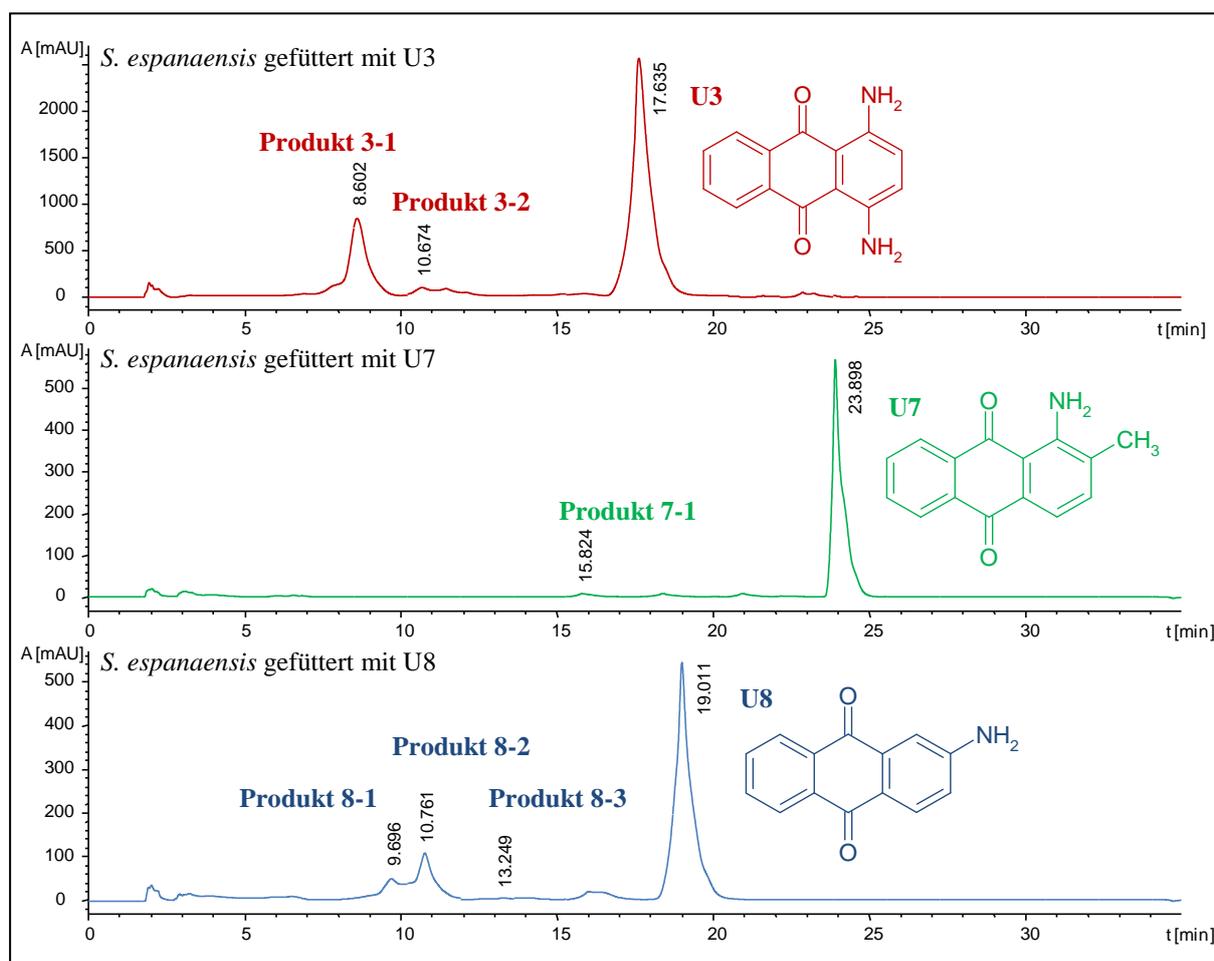


Abbildung 3-12 HPLC/ESI-MS-Diagramme der Ethylacetat-Extrakte von *S. espanaensis*-Kulturen nach Zufütterung von 1,4-Diaminoanthrachinon (U3) in rot ( $\lambda = 550$  nm), 1-Amino-2-methylantrachinon (U7) in grün ( $\lambda = 430$  nm) und 2-Aminoanthrachinon (U8) in blau ( $\lambda = 430$  nm). Die Strukturformeln von U3, U7 und U8 sind abgebildet. Alle Peaks, deren UV-Absorptionsspektren dem des zugefütterten Aminoanthrachinons ähneln, sind mit Produkt markiert.

Alle drei Aminoanthrachinone wurden von *S. espanaensis* biotransformiert. Es wurden in den HPLC/ESI-MS-Diagrammen für alle drei Substanzen neue Peaks detektiert, deren UV-Absorptionsspektren dem zugefütterten Aminoanthrachinon ähneln. Durch die Analyse der Massenspektren wurde deutlich, dass es sich bei den Hauptprodukten (Produkt 3-1, Produkt 8-1 und Produkt 8-2) mit großer Wahrscheinlichkeit um hydroxylierte und *O*-rhamnosylierte Derivate handelt (siehe Tabelle 3-6). In

allen drei Fällen wurden zusätzlich Peaks detektiert, deren Massen potentiell *N*-rhamnosylierten Derivaten entsprechen (Produkt 3-2, Produkt 7-1 und Produkt 8-3; siehe Tabelle 3-6). Diese potentiell *N*-rhamnosylierten Derivate wurden allerdings in so geringer Menge produziert, dass eine Reinigung und anschließende Strukturaufklärung dieser Substanzen praktisch unmöglich ist.

**Tabelle 3-6 Auswertung der Massenspektren der bei der Fütterung von *S. espanaensis* mit Aminoanthrachinonen erhaltenen Produkte. Auf Grund der detektierten Masse wurde jedem Produkt eine mögliche Molekülstruktur zugeordnet.**

Produkt	RT	Massenpeak	molare Masse	mögliche Molekülstruktur
<b>Fütterung von <i>S. espanaensis</i> mit U3</b>				
U3	17,7	239 [M+H] <sup>+</sup>	238 g/mol	
Produkt 3-1	8,6 min	435 [M+Cl] <sup>-</sup>	400 g/mol	U3 hydroxyliert und rhamnosyliert
Produkt 3-2	10,7 min	420 [M+Cl] <sup>-</sup>	384 g/mol	U3 <i>N</i> -rhamnosyliert
<b>Fütterung von <i>S. espanaensis</i> mit U7</b>				
U7	24,1 min	238 [M+H] <sup>+</sup>	237 g/mol	
Produkt 7-1	15,8 min	418 [M+Cl] <sup>-</sup>	383 g/mol	U7 <i>N</i> -rhamnosyliert
<b>Fütterung von <i>S. espanaensis</i> mit U8</b>				
U8	19,0 min	224 [M+H] <sup>+</sup>	223 g/mol	
Produkt 8-1	9,7 min	420 [M+Cl]	385 g/mol	U8 hydroxyliert und rhamnosyliert
Produkt 8-2	10,8 min	420 [M+Cl]	385 g/mol	U8 hydroxyliert und rhamnosyliert
Produkt 8-3	13,2 min	404 [M+Cl]	369 g/mol	U8 <i>N</i> -rhamnosyliert

### 3.4 Identifizierung des flexiblen Glycosyltransferasegens

Der Actinomycet *S. espanaensis* besitzt Biotransformationsaktivität. Für die beobachtete Derivatisierung ist unter anderem eine GT verantwortlich, die Rhamnose auf verschiedene Substrate überträgt. GTs haben üblicherweise ein sehr enges Substratspektrum. Sie übertragen meist einen bestimmten Zucker auf ein bestimmtes Akzeptor-Substrat. Diese GT aus *S. espanaensis* besitzt eine geringe Akzeptor-Substratspezifität. Um dieses Enzym näher charakterisieren zu können und um schließlich den Grund für die hohe Flexibilität zu ermitteln, sollte das Gen identifiziert werden, welches für diese außergewöhnliche GT codiert.

#### 3.4.1 Genom-Analyse zur Identifizierung möglicher Kandidaten-Gene

Zur Identifizierung des Gens, welches für die flexible GT codiert, wurde das Genom von *S. espanaensis* auf GT-Gene untersucht. Mit Hilfe von BLASTp-Analysen konnten insgesamt 106 potentielle GT-Gene identifiziert werden. Tabelle 3-7 zeigt alle 106 Gene. Die mögliche Funktion der entsprechenden Enzyme wurde durch die Zugehörigkeit zu den COG (cluster of orthologous groups) abgeleitet. Zusätzlich wurden die Gene den Familien nach CAZy zugeordnet. Die GT-Datenbank von CAZy beinhaltet NDP-Hexose-Transferasen und teilt sie auf Grund von Sequenzhomologien in 94 verschiedene Fami-

lien ein <sup>[92]</sup>. Alle Proteine aus der GT-Datenbank von CAZy wurden gegen die Proteine aus dem Genom von *S. espanaensis* geblastet. Zeigte eine GT Homologien zu GTs aus einer bestimmten Familie wurde diese GT dieser Familie zugeordnet (siehe Tabelle 3-7). War keine eindeutige Zuordnung möglich oder handelt es sich nicht um eine NDP-Hexose-Transferase, ist in Tabelle 3-7 keine Familienzugehörigkeit angegeben.

**Tabelle 3-7 GT-Gene aus dem Genom von *S. espanaensis*. Die mögliche Funktion des Proteins ist über die EC Nummer (enzyme commission numbers) und COG Funktion angegeben. Die GTs wurden in die Familien nach CAZy eingeteilt.**

Gen ID	Name	EC Nummer	COG Funktion	CAZy Familie
<i>ses00250</i>	ftsI	2.4.1.129	Peptidoglycan GT / Zellteilungsprotein FtsI / Penicillin-bindendes Protein 2	---
<i>ses00670</i>	gtuS4-1		Glycosyltransferase	4
<i>ses00700</i>	gtuS4-2		Glycosyltransferase	4
<i>ses01590</i>	gtuS2-1	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses01620</i>	gtuS2-2	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses01660</i>	gtuS2-3		Glycosyltransferase	2
<i>ses01700</i>	gtuS2-4	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2
<i>ses02750</i>	gtuS51-1	2.4.2.-	Glycosyltransferase / Membrancarboxypeptidase (Penicillin-bindendes Protein)	51
<i>ses03480</i>	hpt	2.4.2.8	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses04110</i>	otsA	2.4.1.15	Trehalose-6-phosphat Synthase	20
<i>ses04130</i>			in die Membran integriertes Protein	87
<i>ses06920</i>	gtuS39-1	2.4.1.-	Dolichylphosphat-Mannose--Protein O-Mannosyltransferase	39
<i>ses08290</i>		2.4.1.-	Mannosyltransferase	87
<i>ses08760</i>	glgA	2.4.1.21	Glycogensynthase	4
<i>ses09910</i>			Glycosyltransferase	unklassifiziert
<i>ses10330</i>	gtuS2-5	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses10720</i>	gtuS2-6	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses11290</i>	gtuS1-2	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses11600</i>	pncB	2.4.2.11	Nikotinatphosphoribosyltransferase	---
<i>ses15380</i>	gtuS2-7	2.4.1.-	GT möglicherweise beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses16050</i>	cobT	2.4.2.21	Nikotinat-Nukleotid--Dimethylbenzimidazol Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses16220</i>	trpB	2.4.2.18	Anthranilat Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses16340</i>	gtuS4-3	2.4.1.-	Glycosyltransferase	4
<i>ses22060</i>	gtuS2-23	2.4.1.-	GT möglicherweise beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses24690</i>	gtuS-1		4-Amino-4-desoxy-L-arabinose Transferase und verwandte GT aus der PMT Familie	---
<i>ses25110</i>	gtuS-2		4-Amino-4-desoxy-L-arabinose Transferase und verwandte GTs aus der PMT Familie	---
<i>ses25120</i>	gtuS2-8	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2

## ERGEBNISSE

Fortsetzung von Tabelle 3-6 GT-Gene aus dem Genom von *S. espanaensis*. Die mögliche Funktion des Proteins ist über die EC Nummer (enzyme commission numbers) und COG Funktion angegeben. Die GTs wurden in die Familien nach CAZy eingeteilt.

Gen ID	Name	EC Nummer	COG Funktion	CAZy Familie
<i>ses25130</i>	gtuS-3		4-Amino-4-desoxy-L-arabinose Transferase und verwandte GTs aus der PMT Familie	unklassifiziert
<i>ses25240</i>	GT		GT beteiligt an der Lipopolysaccharid Synthese	---
<i>ses25370</i>	gtuS-4		Glycosyltransferase	---
<i>ses25390</i>	gtuS2-9	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses25460</i>			Teichonsäure Biosynthese Protein	26
<i>ses25470</i>	gtuS2-10		Glycosyltransferase	2/4
<i>ses29580</i>	gtuS4-4		Glycosyltransferase	4
<i>ses30330</i>	pimA	2.4.1.57	Phosphatidylinositol $\alpha$ -Mannosyltransferase	4
<i>ses33990</i>	hisG	2.4.2.17	ATP Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses35910</i>	gtuS2-11	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2
<i>ses38330</i>	gtuS2-12	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses41110</i>	gtuS2-13	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses41250</i>			Glycosyltransferase	4
<i>ses43080</i>	gtuS2-14	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses43790</i>	udp	2.4.2.3	Uridin-Phosphorylase	---
<i>ses44490</i>	gtuS1-3	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses44520</i>	gtuS1-4	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses45900</i>	gtuS1-5	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses47640</i>	gtuS1-6	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses48230</i>	gtuS4-5		Glycosyltransferase	---
<i>ses49200</i>	gtuS1-7	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses50220</i>	gtuS4-6		Glycosyltransferase	---
<i>ses50500</i>	gtuS2-15	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses50510</i>	gtuS9-1		ADP-Heptose: LPS Heptosyltransferase	9
<i>ses50570</i>	gtuS4-7		Glycosyltransferase	4
<i>ses50580</i>	gtuS4-8		Glycosyltransferase	unklassifiziert
<i>ses50590</i>	gtuS9-2		ADP-Heptose: LPS Heptosyltransferase	9
<i>ses50630</i>	gtuS2-16	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2
<i>ses50750</i>	gtuS4-9		Glycosyltransferase	4
<i>ses54000</i>	gtuS1-8	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58720</i>	sam11	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58730</i>	sam12	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58740</i>	sam13	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58750</i>	sam14	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58760</i>	sam15	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58770</i>	sam16	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1

Fortsetzung von Tabelle 3-6 GT-Gene aus dem Genom von *S. espanaensis*. Die mögliche Funktion des Proteins ist über die EC Nummer (enzyme commission numbers) und COG Funktion angegeben. Die GTs wurden in die Familien nach CAZy eingeteilt.

Gen ID	Name	EC Nummer	COG Funktion	CAZy Familie
<i>ses58780</i>	sam17	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58790</i>	sam18	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58800</i>	sam19	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses58810</i>	sam20	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses59470</i>	gtuS4-10		Glycosyltransferase	---
<i>ses59490</i>	GT		Polysaccharid Biosynthese Protein / Membranprotein beteiligt am Export des O-Antigens und Teichonsäure	---
<i>ses59500</i>	gtuS4-11		Glycosyltransferase	4
<i>ses59510</i>	gtuS4-12		Glycosyltransferase	---
<i>ses59540</i>	gtuS2-17	2.4.1.-	GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	2
<i>ses60310</i>	gtuS1-9	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses60350</i>	gtuS1-10	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses60920</i>	gtuS2-18		GT beteiligt an der Zellwand-Biosynthese	81
<i>ses61840</i>	GT4	2.4.1.25	4- $\alpha$ -Glucanotransferase	---
<i>ses61920</i>	gtuS51-2	2.4.2.-	Membrancarboxypeptidase (Penicillin-bindendes Protein)	51
<i>ses62050</i>	ftsI	2.4.1.129	Peptidoglycan GT / Zellteilungsprotein FtsI / Penicillin-bindendes Protein 2	---
<i>ses62370</i>	gtuS4-13		Glycosyltransferase	4
<i>ses63200</i>	pyrR	2.4.2.9	Pyrimidin Operon dämpfendes Protein / Uracil Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses66670</i>			GT, möglicherweise in die Zellmembran integriert	87
<i>ses68280</i>	gtuS1-1	2.4.1.-	GT, verwandt mit UDP-Glucuronosyltransferasen	1
<i>ses68680</i>	nadC	2.4.2.19	Nikotinat-Nucleotid-Pyrophosphorylase	---
<i>ses69080</i>	murG	2.4.1.227	UDP-N-Acetylglucosamin: LPS N-Acetylglucosamin Transferase	28
<i>ses69180</i>	ftsI	2.4.1.129	Peptidoglycan GT / Zellteilungsprotein FtsI / Penicillin-bindendes Protein 2	---
<i>ses72610</i>	gtuS4-14		Glycosyltransferase	4
<i>ses72750</i>	glgP	2.4.1.1	$\alpha$ -Glucan Phosphorylase	35
<i>ses73590</i>	gtuS-5		UDP-N-Acetylmuramyl Pentapeptid Phosphotransferase / UDP-N-Acetylglucosamin-1-phosphat Transferase	---
<i>ses75990</i>			Amidophosphoribosyltransferase	---
<i>ses76210</i>	gtuS2-19	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2
<i>ses76290</i>	gtuS2-20	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2
<i>ses76310</i>	gtuS4-15		Glycosyltransferase	4
<i>ses76330</i>	gtuS4-16		Glycosyltransferase	4
<i>ses76340</i>	gtuS2-21	2.4.1.-	Glycosyltransferase	2

Fortsetzung von Tabelle 3-6 GT-Gene aus dem Genom von *S. espanaensis*. Die mögliche Funktion des Proteins ist über die EC Nummer (enzyme commission numbers) und COG Funktion angegeben. Die GTs wurden in die Familien nach CAZy eingeteilt.

Gen ID	Name	EC Nummer	COG Funktion	CAZy Familie
<i>ses76360</i>	gtuS2-22		Membrancarboxypeptidase (Penicillin-bindendes Protein)	2/4
<i>ses76370</i>	gtuS4-17		Glycosyltransferase	4
<i>ses76990</i>	deoD	2.4.2.1	Purin-Nukleosid Phosphorylase	---
<i>ses77120</i>	upp	2.4.2.9	Uracil Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses77380</i>	deoA	2.4.2.4	Thymidin Phosphorylase	---
<i>ses79020</i>	gtuS4-18		Glycosyltransferase	4
<i>ses80370</i>	gtuS4-19		Glycosyltransferase	4
<i>ses80380</i>	gtuS4-20	2.4.1.-	Glycosyltransferase	4
<i>ses81180</i>	gtuS4-21		Glycosyltransferase	4
<i>ses82300</i>	purF	2.4.2.14	Glutamin Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase	---
<i>ses83250</i>	pyrE	2.4.2.10	Orotat Phosphoribosyltransferase	---
<i>ses84500</i>	gtuS51-3		Membrancarboxypeptidase (Penicillin-bindendes Protein)	51

Die CAZy-Familie 1 enthält die sogenannten UDP-Glucuronosyltransferase-ähnlichen GTs. In dieser Familie sind alle GTs zu finden, die im bakteriellen Sekundärstoffwechsel an der Glycosylierung von niedermolekularen Substanzen beteiligt sind. Da der gesuchten flexiblen GT eine ähnliche Funktion zugeschrieben wurde, ist sie sehr wahrscheinlich in dieser Familie zu finden. Im Genom von *S. espanaensis* finden sich 20 GT-Gene, die für GTs der CAZy-Familie 1 codieren. Damit reduzierte sich die Zahl der möglichen Kandidaten-Gene auf 20 (siehe Tabelle 3-7). Unter den 20 GT-Genen, die für GTs der CAZy-Familie 1 codieren, finden sich alle zehn GT-Gene des sam-Clusters. Es ist unwahrscheinlich, dass eine GT aus dem sam-Cluster für die Biotransformationsaktivität von *S. espanaensis* verantwortlich ist. Da sie jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnten, wurden sie trotzdem den folgenden Sequenzanalysen unterzogen.

Die 20 GTs der CAZy-Familie 1 wurden auf Sequenzhomologien zu ElmGT untersucht. ElmGT ist die GT aus dem Elloramycin-Cluster von *Streptomyces olivaceus* Tü2353<sup>[140]</sup>. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung des Elloramycin-Aglycons mit L-Rhamnose. Das Elloramycin-Aglycon besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu den Substraten, die von der gesuchten GT üblicherweise akzeptiert werden (siehe Abbildung 3-13). Weiterhin wurden die GTs aus Familie 1 auf Sequenzhomologien zu OleD verglichen. OleD ist eine GT aus *Streptomyces antibioticus*<sup>[107]</sup>, die in die Bakterienzelle aufgenommene Makrolide glycosyliert und damit inaktiviert (siehe Abbildung 3-14). Dieses Enzym besitzt zu diesem Zweck eine gewisse Akzeptor-Substrat-Flexibilität. Da für die gesuchte GT aus *S. espana-*

*ensis* ebenfalls eine Flexibilität beobachtet werden konnte, wurde angenommen, dass die gesuchte GT Homologien zu OleD aufweist.

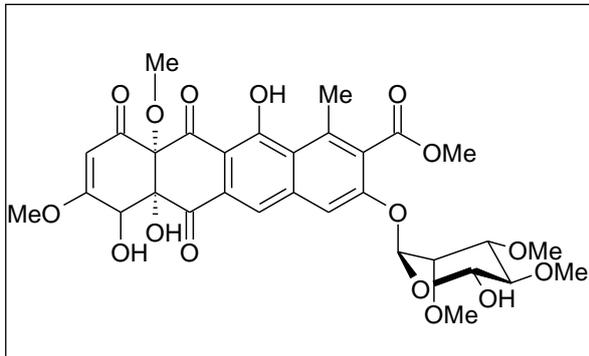


Abbildung 3-13 Strukturformel von Elloramycin aus *Streptomyces olivaceus* Tü2353.

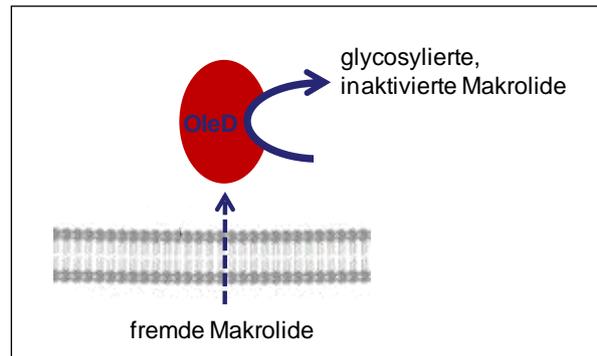


Abbildung 3-14 Putativer unspezifischer Resistenzmechanismus von OleD in *Streptomyces antibioticus*.

Die Ergebnisse der BLASTp-Analysen sind in Abbildung 3-15 dargestellt. Die BLASTp-Analyse zeigt, dass die GTs aus CAZy-Familie 1 nur eine sehr geringe Ähnlichkeit zu ElmGT und OleD besitzen. Drei GTs zeigen keine Ähnlichkeit zu OleD (Ses44490, Ses54000 und Ses68280), eine davon (Ses44490) zeigt auch keine Ähnlichkeit zu ElmGT. Die übrigen GTs zeigen einen relativen Score von 4 bis 14 %. Die GT Ses47640 zeigt den höchsten relativen Score von 24 % beim Vergleich mit OleD.

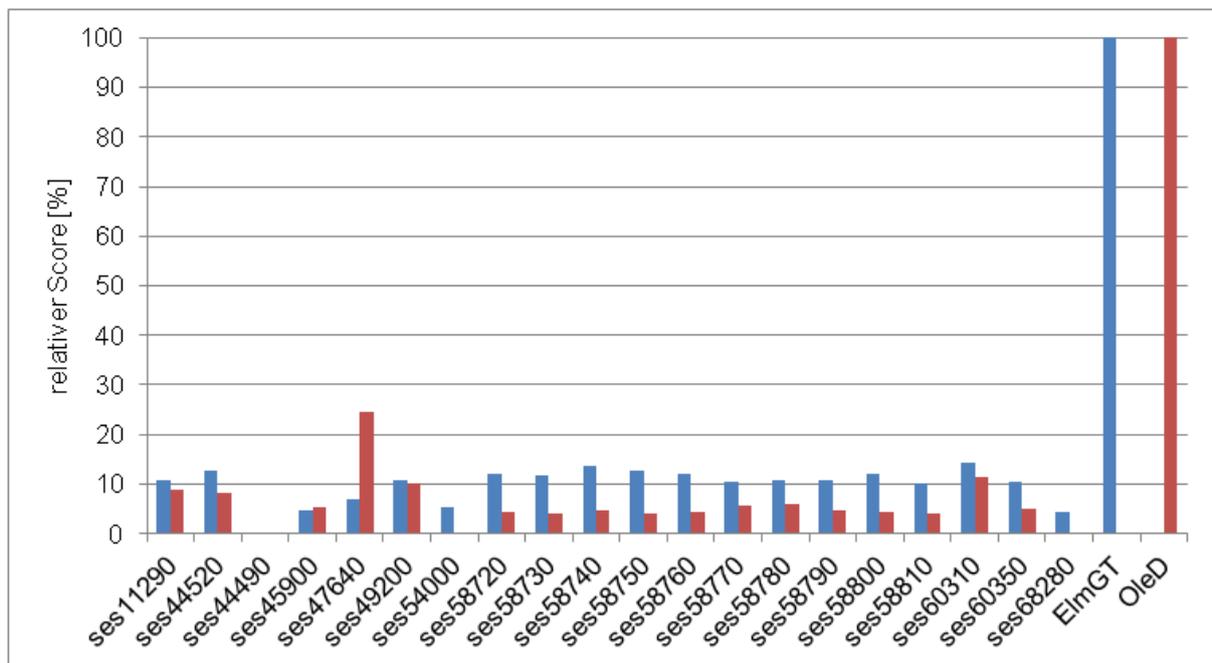


Abbildung 3-15 Diagramm der BLASTp-Analyse von ElmGT und OleD gegen die GTs der CAZy-Familie 1 aus *S. espanaensis*. Gezeigt ist der relative Score. Der Score von ElmGT gegen ElmGT beziehungsweise OleD gegen OleD wurde auf 100 % festgelegt. Die Scores von ElmGT beziehungsweise OleD gegen die GTs aus Familie 1 wurden ins Verhältnis dazu gesetzt.

### 3.4.2 Inaktivierung von Kandidaten-Genen

Zur Identifizierung der gesuchten flexiblen GT sollten Geninaktivierungsexperimente im Genom von *S. espanaensis* durchgeführt werden. Mögliche Kandidaten-Gene sollten inaktiviert werden. Die erhaltenen Mutanten sollten anschließend mit der Testsubstanz Alizarin gefüttert werden. Zeigt die Mutante keine Biotransformationsaktivität handelt es sich bei dem inaktivierten Gen höchstwahrscheinlich um das gesuchte Gen, das für die GT mit geringer Substratspezifität codiert. Zeigt die Mutante weiterhin die glycosylierten Biotransformationsprodukte, handelt es sich bei dem inaktivierten nicht um das gesuchte Gen. Für diese Experimente sollten zuerst die sieben Gene *ses11290*, *ses44520*, *ses45900*, *ses47640*, *ses49200*, *ses60310* und *ses60350* herangezogen werden. Die Untersuchung der GTs aus dem sam-Cluster und Ses44490, Ses54000 und Ses68280, die keine Sequenzähnlichkeit zu OleD aufweisen, wurde nicht verfolgt.

#### 3.4.2.1 Inaktivierung von *ses44520*

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses44520*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „6130“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT Ses44520 zeigt am meisten Ähnlichkeit zu AMED\_8701 einer uncharakterisierten GT aus *A. mediterranei* <sup>[39]</sup>. Beide GTs teilen 73 % identische und 78 % ähnliche Aminosäuren. Die nächste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu Ses44520 ist CalG1 aus dem Calicheamycin-Cluster von *Micromonospora echinospora* <sup>[141]</sup>. Die beiden GTs teilen 47 % identische und 54 % ähnliche Aminosäuren. Im Genom von *S. espanaensis* findet sich in der näheren Umgebung um *ses44520* ein weiteres GT-Gen (*ses44490*). Es wurden keine Gene identifiziert, die auf ein Sekundärstoff-Cluster hinweisen.

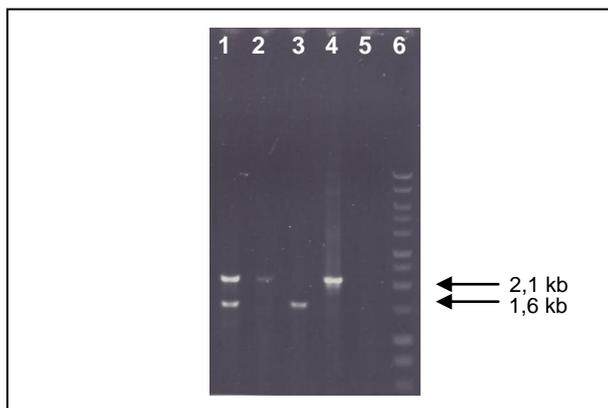


Abbildung 3-16 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses44520* mit verschiedenen Templates.

- 1: Chromosomale DNA der *S. espanaensis* x pKCA6130 Singlecrossover-Mutante.  
Trägt das native und das mutierte Gen *ses44520* (1,6 und 2,1 kb).
- 2: Chromosomale DNA der *S. espanaensis* Δ6130 Doppelcrossover-Mutante.  
Trägt das mutierte Gen *ses44520* (2,1 kb).
- 3: Chromosomale DNA des *S. espanaensis* Wildtyps. Trägt das native Gen *ses44520* (1,6 kb).
- 4: Plasmid DNA von pKCA6130. Trägt das mutierte Gen *ses44520* (2,1 kb).
- 5: H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle
- 6: Längenstandard der Firma Promega (LP)

Zur Inaktivierung des Gens *ses44520* im Genom von *S. espanaensis* wurde eine Spectinomycin-resistenz-Kassette über einen Doppelcrossover in das Gen eingebracht. Die Durchführung der Inakti-

vierung ist unter 5.10 beschrieben. Abbildung 3-16 zeigt die Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses44520* zum Nachweis des erfolgreichen Erhalts der Singlecrossover-Mutante *S. espanaensis* x pKCΔ6130 und der Doppelcrossover-Mutante *S. espanaensis* Δ6130.

Mit der Mutante *S. espanaensis* Δ6130 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-20 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. espanaensis* Δ6130 konnte Alizarin wie gewohnt glycosylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei *ses44520* nicht um das gesuchte Gen handelt, dass für die Glycosyltransferase mit geringer Substratspezifität codiert.

### 3.4.2.2 Inaktivierung von *ses45900*

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses45900*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „6266“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses45900* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu Amir\_2497 einer uncharakterisierten GT aus *Actinosynnema mirum* DSM 43827<sup>[41]</sup>. Beide GTs teilen 70 % identische und 78 % ähnliche Aminosäuren. Das Gen *ses45900* liegt im NRPS/PKS-Hybrid-Cluster 8, das möglicherweise ein Leinamycin-Derivat produziert.

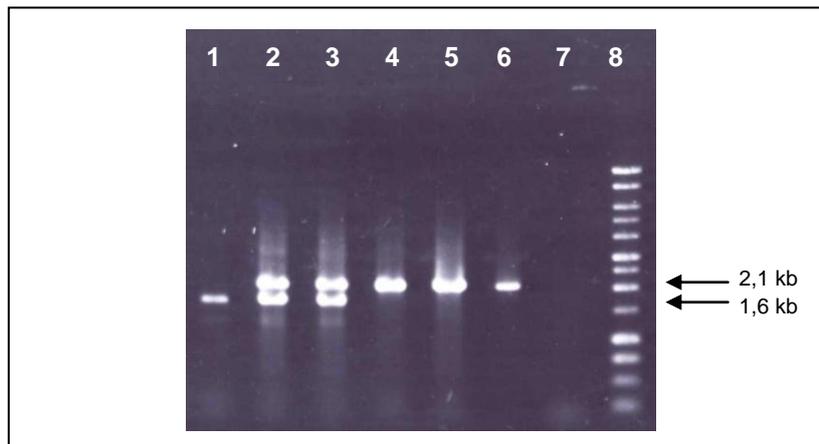


Abbildung 3-17 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses45900* mit verschiedenen Templates.

- 1: Chromosomale DNA des *S. espanaensis* Wildtyps. Trägt das native Gen *ses45900* (1,6 kb).
- 2-3: *S. espanaensis* x pKCΔ6266 Singlecrossover-Mutante.  
Trägt das native und das mutierte Gen *ses45900* (1,6 und 2,1 kb).
- 4-5: *S. espanaensis* Δ6266 Doppelcrossover-Mutante. Trägt das mutierte Gen *ses45900* (2,1 kb).
- 6: Plasmid DNA von pKCΔ6266. Trägt das mutierte Gen *ses45900* (2,1 kb)
- 7: H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle
- 8: LP

Zur Inaktivierung des Gens *ses45900* im Genom von *S. espanaensis* wurde eine Spectinomycin-resistenz-Kassette über einen Doppelcrossover in das Gen eingebracht. Die Durchführung der Inaktivierung ist unter 5.10 beschrieben. Abbildung 3-17 zeigt die Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses45900* zum Nachweis des erfolgreichen Erhalts der Singlecrossover-Mutante *S. espanaensis* x pKCΔ6266 und der Doppelcrossover-Mutante *S. espanaensis* Δ6266.

Mit der Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6266$  wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungs-experiment durchgeführt. Auch hier wurde Alizarin als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-20 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6266$  konnte Alizarin wie gewohnt glycosylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei *ses45900* nicht um das gesuchte Gen handelt, dass für die Glycosyltransferase mit geringer Substratspezifität codiert.

### 3.4.2.3 Inaktivierung von *ses47640*

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses47640*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „*6449*“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses47640* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu LipGtf der GT aus dem  $\alpha$ -Lipomycin-Cluster von *Streptomyces aureofaciens* <sup>[142]</sup>. Beide GTs teilen 42 % identische und 54 % ähnliche Aminosäuren. Das Gen *ses47640* liegt im Genom von *S. espanaensis* in der Nähe des PKS Clusters 9 und dem NRPS/PKS-Hybrid-Clusters 10. Die GT *Ses47640* zeigte im BLASTp-Vergleich mit OleD den höchsten relativen Score von 24 %.

Zur Inaktivierung des Gens *ses47640* im Genom von *S. espanaensis* wurde eine Spectinomycin-resistenz-Kassette über einen Doppelcrossover in das Gen eingebracht. Die Durchführung der Inaktivierung ist unter 5.10 beschrieben. Abbildung 3-18 zeigt die Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses47640* zum Nachweis des erfolgreichen Erhalts der Singlecrossover-Mutante *S. espanaensis* x pKCA6449 und der Doppelcrossover-Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6449$ .

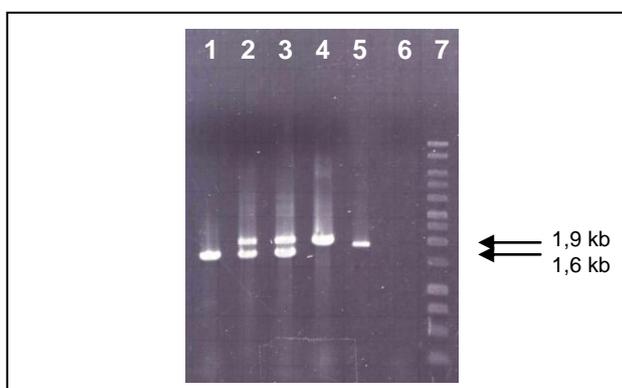


Abbildung 3-18 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses47640* mit verschiedenen Templates.

- 1: Chromosomale DNA des *S. espanaensis* Wildtyps. Trägt das native Gen *ses47640* (1,6 kb).
- 2-3: Kolonie PCR von *S. espanaensis* x pKCA6449 Singlecrossover-Mutanten.  
Sie tragen das native und das mutierte Gen *ses47640* (1,6 und 1,9 kb).
- 4: Kolonie PCR von *S. espanaensis*  $\Delta 6449$  Doppelcrossover-Mutante. Trägt das mutierte Gen *ses47640* (1,9 kb).
- 5: Plasmid DNA von pKCA6449. Trägt das mutierte Gen *ses47640* (1,9 kb)
- 6: H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle
- 7: LP

Mit der Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6449$  wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungs-experiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-20 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6449$  konnte Alizarin wie gewohnt

glycosylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei *ses47640* nicht um das gesuchte Gen handelt, dass für die Glycosyltransferase mit geringer Substratspezifität codiert.

### 3.4.2.4 Inaktivierung von *ses49200*

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses49200*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „6609“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses49200* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu SACE\_2010 einer uncharakterisierten GT aus *S. erythraea* [38]. Beide GTs teilen 49 % identische und 64 % ähnliche Aminosäuren. Die nächste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu *Ses49200* ist CalG1 aus dem Calicheamycin-Cluster von *Microspora echinospora* [141]. Diese beiden GTs teilen 47 % identische und 63 % ähnliche Aminosäuren. Im Genom von *S. espanaensis* finden sich in der näheren Umgebung um *ses49200* keine Gene die auf Sekundärstoff-Cluster hinweisen.

Zur Inaktivierung des Gens *ses49200* im Genom von *S. espanaensis* wurde eine Spectinomycin-resistenz-Kassette über einen Doppelcrossover in das Gen eingebracht. Die Durchführung der Inaktivierung ist unter 5.10 beschrieben. Abbildung 3-19 zeigt die Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses49200* zum Nachweis des erfolgreichen Erhalts der Singlecrossover-Mutante *S. espanaensis* x pKCA6609 und der Doppelcrossover-Mutante *S. espanaensis* Δ6609.

Mit der Mutante *S. espanaensis* Δ6609 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-20 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. espanaensis* Δ6609 konnte Alizarin wie gewohnt glycosylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei *ses49200* nicht um das gesuchte Gen handelt, dass für die Glycosyltransferase mit geringer Substratspezifität codiert.

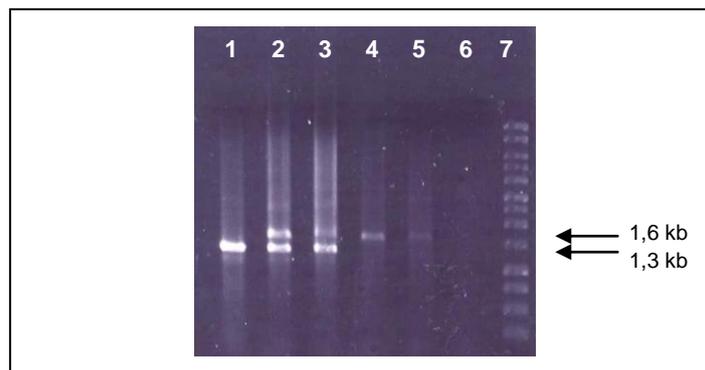
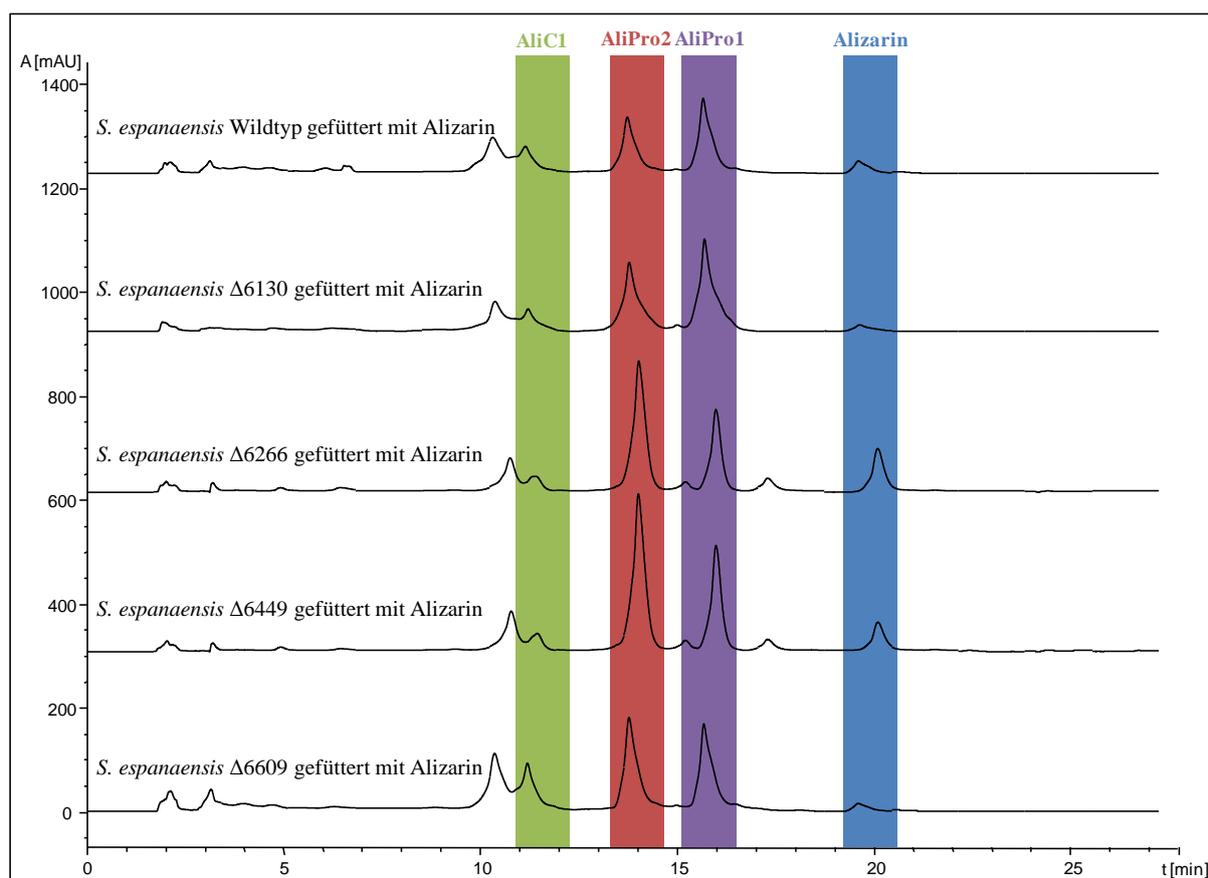


Abbildung 3-19 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses49200* mit verschiedenen Templates.

- 1: Kolonie-PCR von *S. espanaensis* Wildtyp. Trägt das native Gen *ses49200* (1,3 kb).
- 2-3: Kolonie-PCR von *S. espanaensis* x pKCA6609 Singlecrossover-Mutanten.  
Tragen das native und das mutierte Gen *ses49200* (1,3 und 1,6 kb).
- 4-5: Kolonie-PCR von *S. espanaensis* Δ6609 Doppelcrossover-Mutanten. Tragen das mutierte Gen *ses49200* (1,3 kb).
- 6: H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle
- 7: LP



**Abbildung 3-20** HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430$  nm) der Ethylacetat-Extrakte von *S. espanaensis* Wildtyp-, *S. espanaensis*  $\Delta 6130$ -, *S. espanaensis*  $\Delta 6266$ -, *S. espanaensis*  $\Delta 6449$ - und *S. espanaensis*  $\Delta 6609$ -Kulturen nach Zufütterung von Alizarin. Alle fünf Chromatogramme zeigen einen Peak für das zugeführte Alizarin (blau), und für die Biotransformationsprodukte AliPro1 (lila), AliPro2 (rot) und AliC1 (grün). Damit wurde gezeigt, dass die Kandidaten-Gene *ses44520*, *ses45900*, *ses47640* und *ses49200* nicht für die gesuchte GT mit geringer Substratspezifität codieren.

### 3.4.3 Heterologes Testsystem

Durch Geninaktivierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die GT-Gene *ses44520*, *ses45900*, *ses47640* und *ses49200* nicht für die gesuchte GT mit geringer Substratspezifität codieren. Die Methode das gesuchte Gen mittels Geninaktivierung zu identifizieren, hatte sich jedoch als zeitaufwendig erwiesen. Aus diesem Grund sollte ein heterologes Testsystem zur schnelleren Untersuchung der übrigen Kandidaten-Gene *ses11290*, *ses60310* und *ses60350* entwickelt werden.

Als heterologer Wirt wurde *S. albus* verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch sein schnelles Wachstum und seine einfache Konjugierbarkeit aus. Salas *et al.* haben bereits mehrfach Glycosyltransferasen in diesem Stamm erfolgreich charakterisiert <sup>[5,13,100]</sup>. Der für die Glycosylierung notwendige aktivierte Desoxyzucker dTDP-Rhamnose wird von *S. albus* nicht produziert, deshalb sollte die Mutante *S. albus* Rham hergestellt werden. In diese Mutante sind die dTDP-Rhamnose Biosynthesegene unter der Kontrolle des ermE\*-Promotors ins Genom integriert. Diese Mutante wurde anschließend für die Untersuchung der verbliebenen Kandidaten-Gene, die möglicherweise für die gesuchte GT codieren, verwendet. Dafür musste nur der entsprechende codierende Bereich in das Expressionsplasmid pUWL-A kloniert und in *S. albus* Rham konjugiert werden. Durch Fütterung der erhaltenen

Exkonjuganden und HPLC/ESI-MS-Analyse des Ethylacetat-Extrakts wurde anschließend untersucht, ob der entsprechende codierende Bereich an der Glycosylierung von Alizarin beteiligt ist.

### 3.4.3.1 Erstellung von *S. albus* Rham

Zur Erstellung der Mutante *S. albus* Rham wurden die dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene ins Genom von *S. albus* eingebracht. Um diese Gene dauerhaft und stabil zu integrieren wurde die markerfreie Integration gewählt<sup>[143]</sup>.

Die Gene *oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU* codieren für Enzyme, die die Biosynthese von dTDP-Rhamnose katalysieren<sup>[144]</sup>. Bei *oleS* handelt es sich um eine dTDP-D-Glucosesynthase, bei *oleE* um eine dTDP-Glucose-4,6-dehydratase, bei *oleL* um eine dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose-3,5-epimerase und bei *oleU* um eine dTDP-4-Ketohexulosereduktase. Diese vier Gene wurden bereits von Salas *et al.* unter der Kontrolle des ermE\*-Promotors im Plasmid pRHAM zur Untersuchung der Glycosyltransferase ElmGT verwendet<sup>[5]</sup>. Das Plasmid pRHAM wurde von J. A. Salas freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die vier Gene *oleS*, *oleE*, *oleL* und *oleU* wurden zusammen mit dem ermE\*-Promotor in das Plasmid pTOS kloniert (siehe 5.9.2).

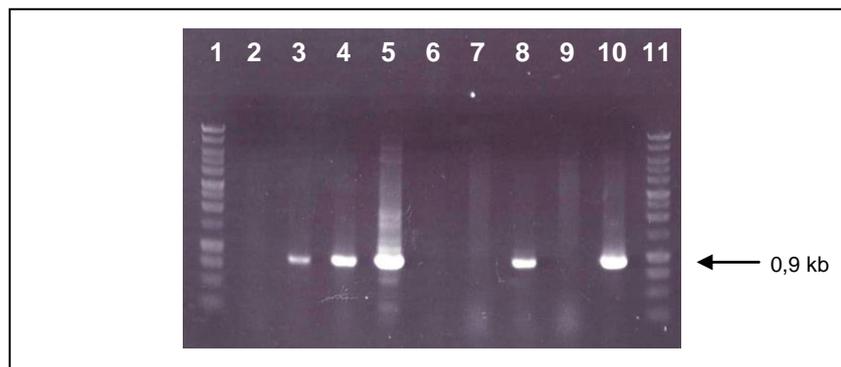


Abbildung 3-21 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung von *aac(3)IV* (0,9 kb) und *oleU* (0,9 kb) zum Nachweis der markerfreien Integration der dTDP-Rhamnose Biosynthesegene ins Genom von *S. albus*

1: LP

2: Amplifizierung von *oleU* mit chromosomaler DNA von *S. albus* als Template. Das Gen ist nicht detektierbar.

3: Amplifizierung von *oleU* mit chromosomaler DNA von *S. albus* x pTOS-Rham als Template.

Das Gen ist detektierbar.

4: Amplifizierung von *oleU* mit chromosomaler DNA von *S. albus* Rham als Template. Das Gen ist detektierbar.

5: Amplifizierung von *oleU* mit pTOS-Rham als Template als Positivkontrolle. Das Gen ist detektierbar.

6: Amplifizierung von *oleU* ohne DNA Template als Negativkontrolle. Das Gen ist nicht detektierbar.

7: Amplifizierung von *aac(3)IV* mit chromosomaler DNA von *S. albus* als Template. Das Gen ist nicht detektierbar.

8: Amplifizierung von *aac(3)IV* mit chromosomaler DNA von *S. albus* x pTOS-Rham als Template.

Das Gen ist detektierbar.

9: Amplifizierung von *aac(3)IV* mit chromosomaler DNA von *S. albus* Rham als Template.

Das Gen ist nicht detektierbar.

10: Amplifizierung von *aac(3)IV* mit pTOS-Rham als Template als Positivkontrolle. Das Gen ist detektierbar.

11: LP

Mittels Konjugation wurde das resultierende Plasmid pTOS-Rham in *S. albus* eingebracht. Da das Plasmid auf dem Integrationssystem des VWB-Phagen basiert<sup>[145]</sup>, wurde bei den erhaltenen apramycinresistenten Exkonjuganden *S. albus* x pTOS-Rham das gesamte Plasmid ins Genom integriert. Das Apramycinresistenzgen (*aac(3)IV*) und das Integrasegen (*int*) wurden anschließend aus dem Genom entfernt, um eine markerfreie und dauerhaft stabile Integration der dTDP-Rhamnose-

Biosynthesegene zu erhalten. Dafür besitzt das Plasmid pTOS zwei rox-sites, die als Erkennungssequenz für die *Dre*-Rekombinase dienen. Durch Konjugation des Plasmids pUWL-Dre in die *S. albus* x pTOS-Rham-Mutante wurde in diesen Zellen die *Dre*-Rekombinase exprimiert. Diese erkennt die rox-sites und schneidet den von ihnen flankierten DNA-Abschnitt des Plasmids aus dem Genom. Damit wurden *aac(3)IV* und *int* aus dem Genom entfernt. Zurück bleiben eine rekombinante rox-site und die dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene *oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU* unter der Kontrolle des ermE\*-Promotors. Mittels PCR konnte nachgewiesen werden, dass vor der Expression des *dre*-Rekombinasegens sowohl *aac(3)IV* als auch das dTDP-Rhamnose Biosynthesegen *oleU* im Genom vorhanden waren. Nach der Expression des *dre*-Rekombinasegens konnte mittels PCR nur das Gen *oleU* nachgewiesen werden, *aac(3)IV* war nicht mehr amplifizierbar (siehe Abbildung 3-21).

### 3.4.3.2 Expression des Glycosyltransferasegens *ses11290* in *S. albus* Rham

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses11290*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „698“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses11290* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu Kfla\_3873 einer uncharakterisierten GT aus *Kribella flavida* DSM 17836 <sup>[146]</sup>. Beide GTs teilen 49 % identische und 62 % ähnliche Aminosäuren. Die nächste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu *Ses11290* ist CalG1 aus dem Calicheamycin-Cluster von *Micromonospora echinospora* <sup>[141]</sup>. Diese beiden GTs teilen 32 % identische und 46 % ähnliche Aminosäuren. Das Gen *ses11290* liegt im Genom von *S. espanaensis* in der Nähe des potentiellen Geosmin-Clusters *tcp1*.

Das GT-Gen *ses11290* wurde in den replikativen Vektor pUWL-A kloniert (siehe 5.9.3.1). Das resultierende Plasmid pUWL-A-698 wurde in *S. albus* Rham konjugiert. Mit der erhaltenen Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-698 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-22 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-698 war nicht in der Lage Alizarin zu glycosylieren. Damit konnte nicht gezeigt werden, dass das Gen *ses11290* für eine Glycosyltransferase codiert, die an der Biotransformationsreaktion in *S. espanaensis* beteiligt ist.

### 3.4.3.3 Expression des Glycosyltransferasegens *ses60350* in *S. albus* Rham

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses60350*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „7668“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses60350* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu MLP\_36120 einer uncharakterisierten GT aus *Micro-lunatus phosphorus* NM-1 <sup>[147]</sup>. Beide GTs teilen 45 % identische und 59 % ähnliche Aminosäuren. Die nächste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu *Ses60350* ist NovM aus dem Novobiocin-Cluster von *Streptomyces caeruleus* <sup>[63]</sup>. Diese beiden GTs teilen 34 % identische und 45 % ähnliche Aminosäuren. Im Genom von *S. espanaensis* findet sich in der näheren Umgebung um *ses60350* ein weiteres GT-Gen (*ses60310*). Es wurden keine Gene identifiziert, die auf ein Sekundärstoff-Cluster hinweisen.

Das GT-Gen *ses60350* wurde in den replikativen Vektor pUWL-A kloniert (siehe 5.9.3.3). Das resultierende Plasmid pUWL-A-7668 wurde in *S. albus* Rham konjugiert. Mit der erhaltenen Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-7668 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-22 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. Die Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-7668 war nicht in der Lage Alizarin zu glycosylieren. Damit konnte nicht gezeigt werden, dass das Gen *ses60350* für eine Glycosyltransferase codiert, die an der Biotransformationsreaktion in *S. espanaensis* beteiligt ist.

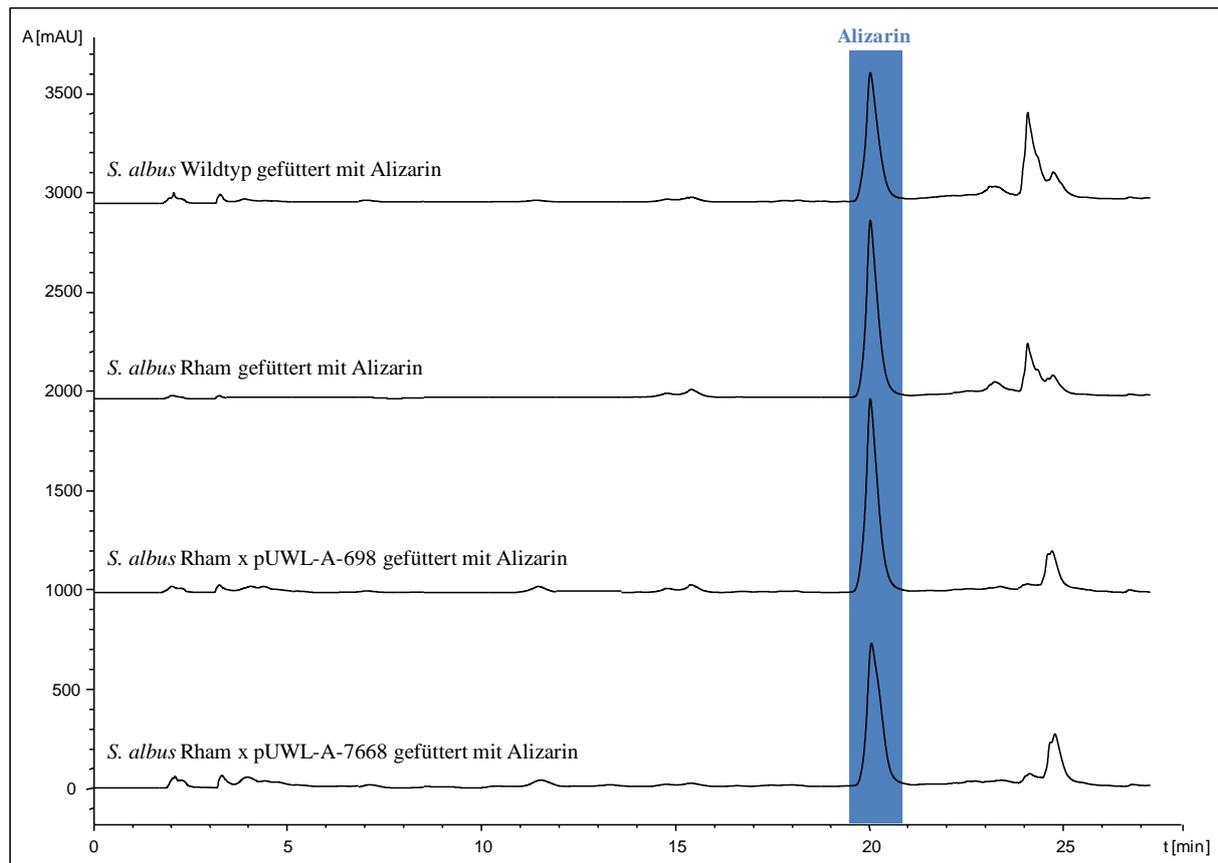


Abbildung 3-22 HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ) der Ethylacetat-Extrakte von *S. albus* Wildtyp-, *S. albus* Rham-, *S. albus* Rham x pUWL-A-698- und *S. albus* Rham x pUWL-A-7668-Kulturen nach Zufütterung von Alizarin. Alle vier Chromatogramme zeigen einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau). Glycosylierte Biotransformationsprodukte wurden nicht detektiert. Damit wurde gezeigt, dass der Stamm *S. albus* keine GT besitzt, die Alizarin glycosylieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass die Expression der Gene *ses11290* und *ses60350* ebenfalls nicht zu glycosyliertem Alizarin führt.

#### 3.4.3.4 Expression des Glycosyltransferasegens *ses60310* in *S. albus* Rham

Das GT-Gen mit der Bezeichnung „*ses60310*“ wurde in den ersten Annotationen des Genoms mit „7665“ benannt. Beide Begriffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit synonym verwendet. Die GT *Ses60310* zeigt am meisten Ähnlichkeit zu SACE\_2010 einer uncharakterisierten GT aus *S. erythraea* <sup>[38]</sup>. Beide GTs teilen 55 % identische und 67 % ähnliche Aminosäuren. Die nächste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu *Ses60310* ist CalG1 aus dem Calicheamycin-Cluster von *Micromonospora echinospora* <sup>[141]</sup>. Diese beiden GTs teilen 48 % identische und 64 % ähnliche Aminosäu-

ren. Im Genom von *S. espanaensis* findet sich in der näheren Umgebung um *ses60310* ein weiteres GT-Gen (*ses60350*). Es wurden keine Gene identifiziert, die auf ein Sekundärstoff-Cluster hinweisen.

Das GT-Gen *ses60310* wurde in den replikativen Vektor pUWL-A kloniert (siehe 5.9.3.2). Das resultierende Plasmid pUWL-A-7665 wurde in *S. albus* Rham konjugiert. Mit der erhaltenen Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-23 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. In dem HPLC/ESI-MS-Diagramm ist zu sehen, dass neben der zugefütterten Substanz Alizarin weitere Substanzen im erhaltenen Rohextrakt vorhanden waren. Eine dieser Substanzen ist das 2-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin AliPro1. Das bedeutet, dass die Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 in der Lage ist zugefüttertes Alizarin zu glycosylieren. Die Glycosyltransferase *ses60310* ist damit höchstwahrscheinlich auch an der Biotransformationsreaktion in *S. espanaensis* beteiligt. Neben AliPro1 wurden weitere Biotransformationsprodukte gebildet. Bei einer RT von 18,6 min wurde die Substanz AliProN detektiert. Das UV-Absorptionsspektrum dieser Substanz ist ähnlich dem von Alizarin. Im Massenspektrum von AliProN, das im negativen Modus gemessen wurde, liegt das höchste Signal bei  $m/z = 369$  [M-H]<sup>-</sup>. Der Massengewinn von 130 u deutet auf eine Glycosylierung mit einem Didesoxyzucker hin.

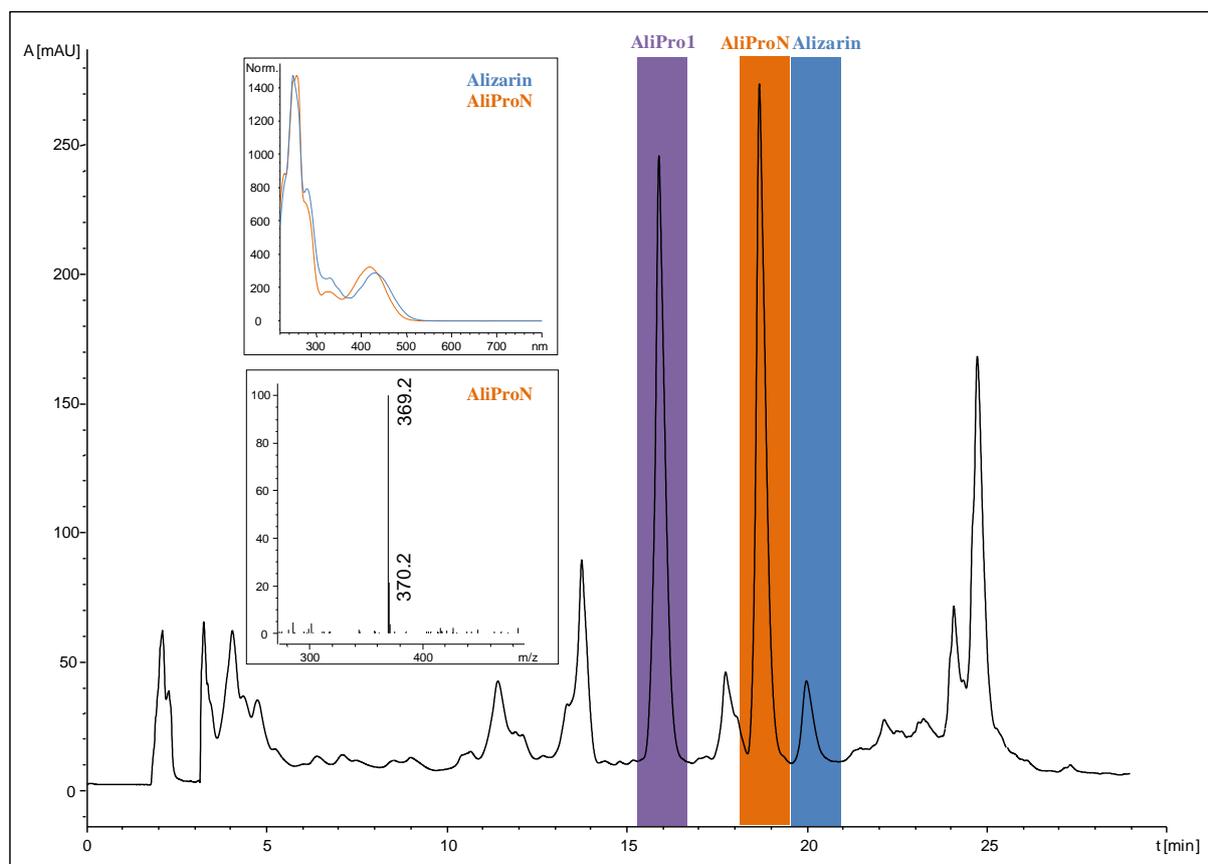


Abbildung 3-23 HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 430$  nm) des Ethylacetat-Extrakts einer *S. albus* Rham x pUWL-A-7665-Kultur nach Zufütterung von Alizarin. Das Chromatogramm zeigt einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau). Außerdem konnte AliPro1 (lila) und einen neuen Peak bei 18,7 min (orange) detektiert werden. Das entsprechende Biotransformationsprodukt wurde AliProN bezeichnet. Die UV-Absorptionsspektren von Alizarin und AliProN und das im negativen Modus gemessene Massenspektrum von AliProN sind gezeigt.

### 3.4.3.5 Isolierung und Strukturanalyse von AliProN

Aus 1,5 Litern Kultur von *S. albus* Rham x pUWL-A-7665, gefüttert mit insgesamt 75 mg Alizarin, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) gereinigt. Auf diese Weise konnten 10,1 mg AliProN als orange-rotes Pulver gewonnen werden.

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde im Rahmen ihrer Dissertation von E. Brötz an der Universität Siegen durchgeführt<sup>[148]</sup>. Die Probe wurde in DMSO-d<sub>6</sub> gelöst und vermessen. Die Auswertung der <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und TOCSY-1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente (<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMBC, HSQC, ROESY, TOCSY) führten zur Aufklärung der Struktur von AliProN (siehe Abbildung 3-24). Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Olivosylalizarin. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.3 zusammengefasst.

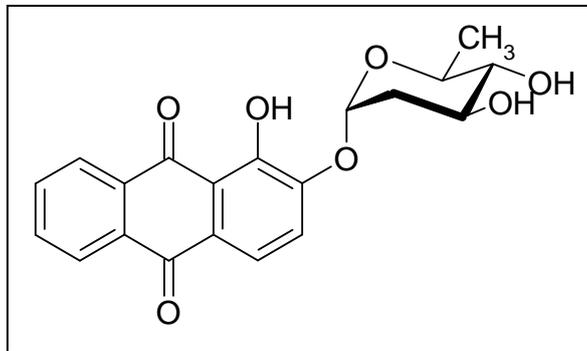


Abbildung 3-24 Strukturformel von AliProN, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Olivosylalizarin (M<sub>r</sub>: 370,35 g/mol).

### 3.4.3.6 Ursprung der L-Olivose

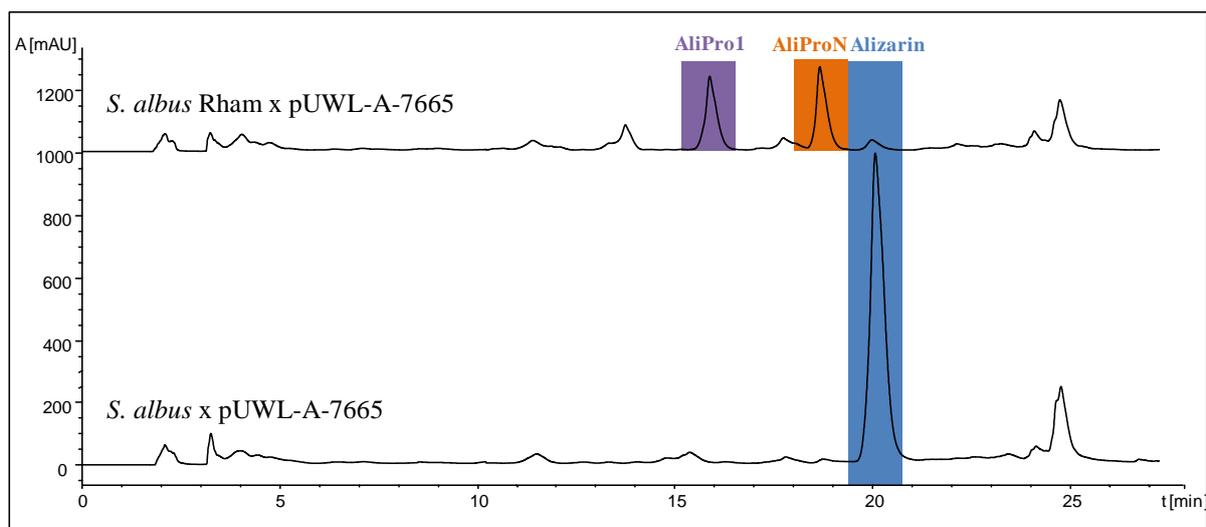


Abbildung 3-25 HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430$  nm) der Ethylacetat-Extrakte von *S. albus* Rham x pUWL-A-7665- und *S. albus* x pUWL-A-7665-Kulturen nach Zufütterung von Alizarin. Die Chromatogramme zeigen beide einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau). Die Biotransformationsprodukte AliPro1 (lila) und AliProN (orange), die im Rohextrakt der Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 detektiert werden, sind im Extrakt von *S. albus* x pUWL-A-7665 nicht vorhanden.

Es sollte überprüft werden, ob es sich bei der aktivierten L-Olivose, die für die Synthese von AliProN in *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 benötigt wird, um einen Zucker handelt, der von *S. albus* produziert wird, oder ob dieser Zucker durch eine nachträgliche Modifikation aus aktivierter L-Rhamnose entsteht. Dafür wurde das Plasmid pUWL-A-7665 in *S. albus* konjugiert. Die Mutante *S. albus* x pUWL-A-7665 wurde mit Alizarin gefüttert und der Kulturextrakt mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Abbildung 3-25 zeigt, dass die Mutante *S. albus* x pUWL-A-7665 weder ein rhamnosyliertes noch ein olivosyliertes Biotransformationsprodukt synthetisieren kann. Auf Grund der Tatsache, dass trotz der Expression von *ses60310* kein AliProN gebildet wurde, konnte gezeigt werden, dass die aktivierte L-Olivose nicht von *S. albus* produziert wird.

### 3.4.4 Überprüfung der Aktivität von Ses60310 in *S. espanaensis*

Durch die Expression des Plasmids pUWL-A-7665 in *S. albus* Rham und die anschließende Fütterung der erhaltenen Mutante mit Alizarin konnte mit dem Nachweis von AliPro1 gezeigt werden, dass die GT Ses60310 an der unspezifischen Glycosylierung von exogenen Substraten in *S. espanaensis* beteiligt ist (siehe 3.4.3.4). Um zu bestätigen, dass es sich bei Ses60310 um die einzige GT handelt, die für diese Glycosylierung verantwortlich ist, musste das Gen *ses60310* in *S. espanaensis* inaktiviert werden. Zeigt die Inaktivierungsmutante keine Glycosylierungsaktivität, ist zweifelsfrei nachgewiesen, dass nur Ses60310 für diese Reaktion verantwortlich ist.

#### 3.4.4.1 Inaktivierung von *ses60310*

Zur Inaktivierung des Gens *ses60310* im Genom von *S. espanaensis* mittels homologer Rekombination wurde das Inaktivierungskonstrukt pKCA7665 erstellt (siehe 5.9.4.5). Die Durchführung der Inaktivierung ist unter 5.10 beschrieben. Abbildung 3-26 zeigt die Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses60310* zum Nachweis des erfolgreichen Erhalts der Singlecrossover-Mutante *S. espanaensis* x pKCA7665 und der Doppelcrossover-Mutante *S. espanaensis*  $\Delta$ 7665.

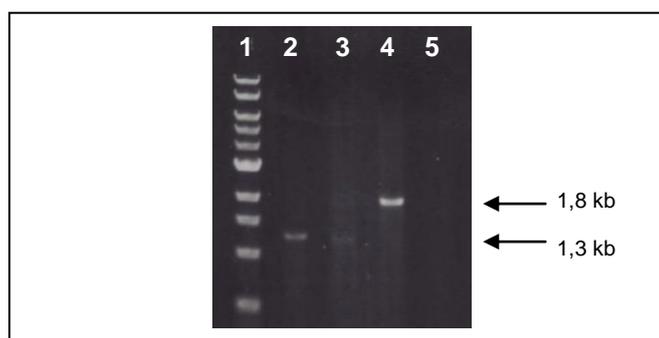


Abbildung 3-26 Agarose-Gelelektrophorese der Amplifizierung des nativen und des mutierten Gens *ses60310* mit verschiedenen Templates:

1: Längenstandard der Firma NEB (LN)

2: Chromosomale DNA des *S. espanaensis* Wildtyps. Trägt das native Gen *ses60310* (1,3 kb).

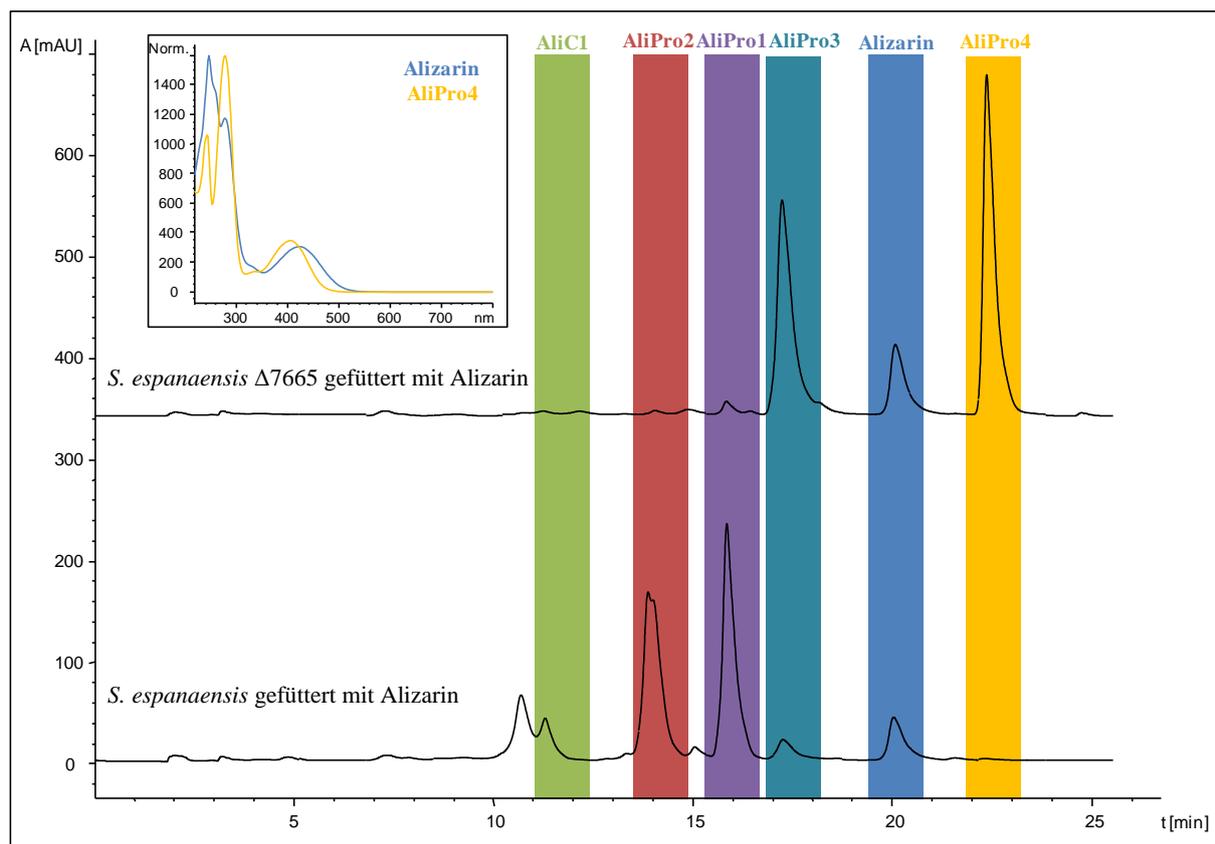
3: *S. espanaensis* x pKCA7665 Singlecrossover-Mutante.

Trägt das native und das mutierte Gen *ses60310* (1,3 und 1,8 kb).

4: *S. espanaensis*  $\Delta$ 7665 Doppelcrossover-Mutante. Trägt das mutierte Gen *ses60310* (1,8 kb).

5: H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle

Mit der Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungs-experiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Die in Abbildung 3-27 dargestellten Chromatogramme zeigen, dass im Rohextrakt der *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ -Mutante nicht die gleichen Biotransformationsprodukte enthalten sind wie im Rohextrakt des Wildtyps. Die charakteristischen Peaks bei einer RT von 13,9 min und 15,8 min, die im Wildtyp-Chromatogramm den glycosylierten Biotransformationsprodukten AliPro1 und AliPro2 entsprechen, sind im Chromatogramm der *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ -Mutante deutlich kleiner. Der Rohextrakt der Mutante zeigt stattdessen einen deutlich größeren Peak bei 17,2 min. Im Rohextrakt der Mutante ist also mehr von dem hydroxylierten Derivat AliPro3 vorhanden. Zusätzlich besitzt das Chromatogramm der Mutante bei einer RT von 22,3 min einen Peak, der im Chromatogramm des Wildtyps nicht detektierbar ist. Dabei handelt es sich um die Substanz AliPro4. Im Massenspektrum von AliPro4, das im positiven Modus gemessen wurde, findet sich ein Signal bei  $m/z = 271$   $[M+H]^+$ . Im negativen Modus liegt das Signal mit höchster Intensität bei  $m/z = 269$   $[M-H]^-$ . Der Massengewinn von 30 u (16 u + 14 u) deutet auf eine Hydroxylierung und eine Methylierung hin.



**Abbildung 3-27** HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430$  nm) der Ethylacetat-Extrakte von *S. espanaensis* Wildtyp- und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ -Kulturen nach Zufütterung von Alizarin. Die Chromatogramme zeigen beide einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau). Die glycosylierten Biotransformationsprodukte AliPro1 (lila), AliPro2 (rot) und AliC1 (grün), die im Rohextrakt des Wildtyps detektiert werden, sind im Extrakt von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  nur in Spuren vorhanden. Im Rohextrakt von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  ist verglichen mit dem Wildtyp mehr hydroxyliertes Produkt AliPro3 (petrol) detektierbar. Zusätzlich zeigt das Chromatogramm der Mutante einen weiteren Peak bei 22,3 min, der bei der Fütterung des Wildtyps nicht produziert wird. Das entsprechende Biotransformationsprodukt wurde AliPro4 bezeichnet. Die UV-Absorptionsspektren von Alizarin und AliPro4 sind gezeigt.

### 3.4.4.2 Komplementierung von *S. espanaensis* $\Delta 7665$ mit *ses60310*

Die Fütterung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit Alizarin hat gezeigt, dass diese Mutante den Großteil ihrer Rhamnosylierungsaktivität verloren hat. Um nachzuweisen, dass die Inaktivierung von *ses60310* zu dieser Veränderung der Biotransformationsaktivität geführt hat und nicht beispielsweise auf eine spontane Mutation zurückzuführen ist, sollte die *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit dem Gen *ses60310* komplementiert werden. Führt die Expression des GT-Gens *ses60310* in der Mutante wieder zur Biotransformationsaktivität des Wildtyps, ist nachgewiesen, dass es sich bei *ses60310* um das für die Biotransformationsaktivität verantwortliche Gen handelt.

Zur Expression von *ses60310* in *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  wurde das Plasmid pSET-7665 kloniert (siehe 5.9.5) und anschließend in *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  konjugiert. Mit der Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Die in Abbildung 3-28 dargestellten Chromatogramme zeigen, dass im Rohextrakt der *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665-Mutante die gleichen Biotransformationsprodukte enthalten sind wie im Rohextrakt des Wildtyps. Die charakteristischen Peaks bei einer RT von 13,9 min und 16,8 min, die den glycosylierten Biotransformationsprodukten AliPro2 und AliPro1 entsprechen, sind in beiden Chromatogrammen vorhanden.

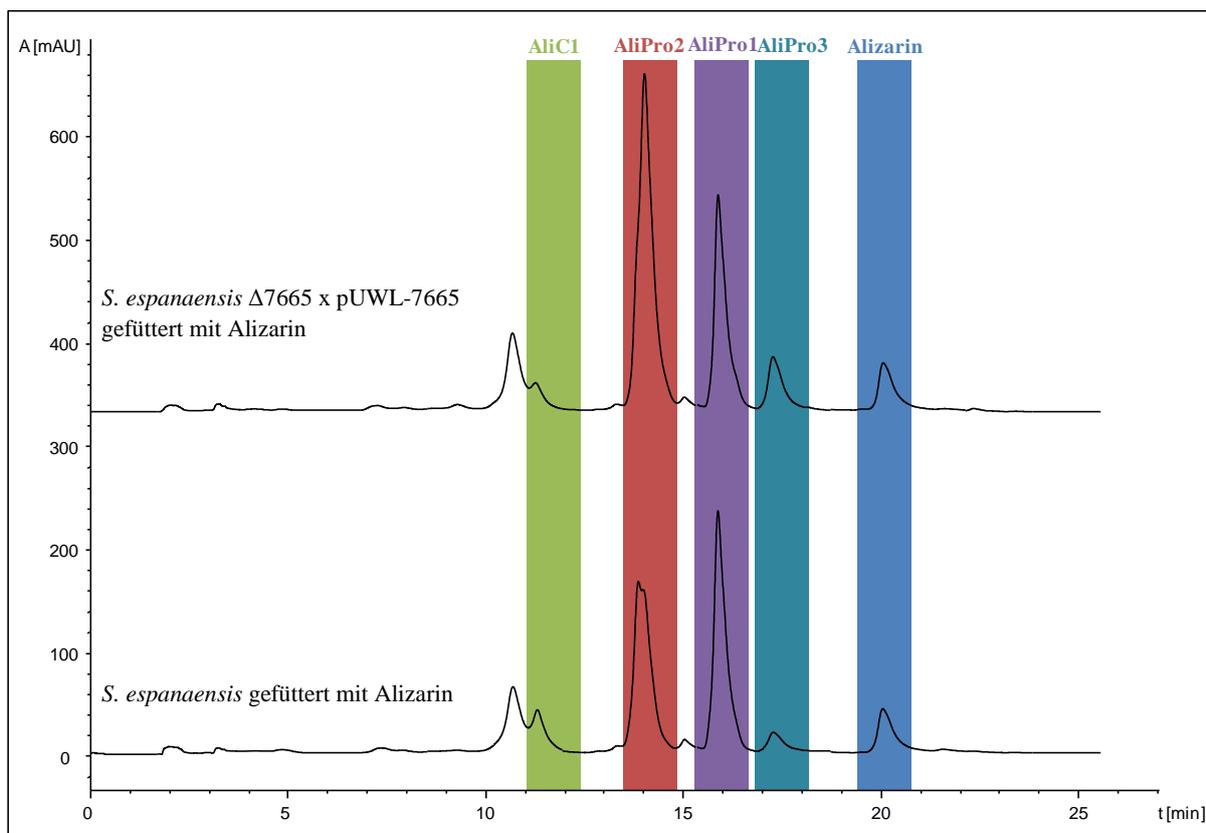


Abbildung 3-28 HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430$  nm) der Ethylacetat-Extrakte von *S. espanaensis* Wildtyp- und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665-Kulturen nach Zufütterung von Alizarin. Die Chromatogramme zeigen beide einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau) und die Biotransformationsprodukte AliPro1 (lila), AliPro2 (rot) und AliC1 (grün) und AliPro3 (petrol). Durch die Komplementierung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit pSET-7665 konnte die Glycosylierungsaktivität der Mutante wieder hergestellt werden.

### 3.4.4.3 Isolierung und Strukturanalyse von AliPro4

Aus 1,4 Litern Kultur von *S. albus* Rham x pUWL-A-7665, gefüttert mit insgesamt 70 mg Alizarin, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) gereinigt. Auf diese Weise konnten 3,9 mg AliPro4 als orange-rotes Pulver gewonnen werden.

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in DMSO- $d_6$  gelöst und vermessen. Die Auswertung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY und  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC) führten zur Aufklärung der Struktur von AliPro4 (siehe Abbildung 3-29). Es handelt sich dabei um 2-*O*-Methylanthrakollol. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.4 zusammengefasst.

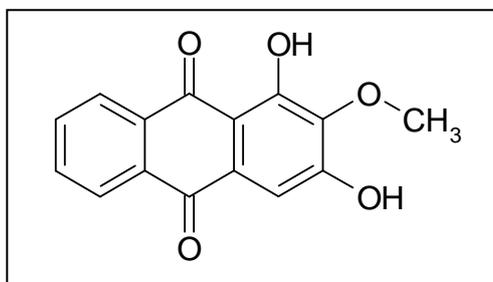
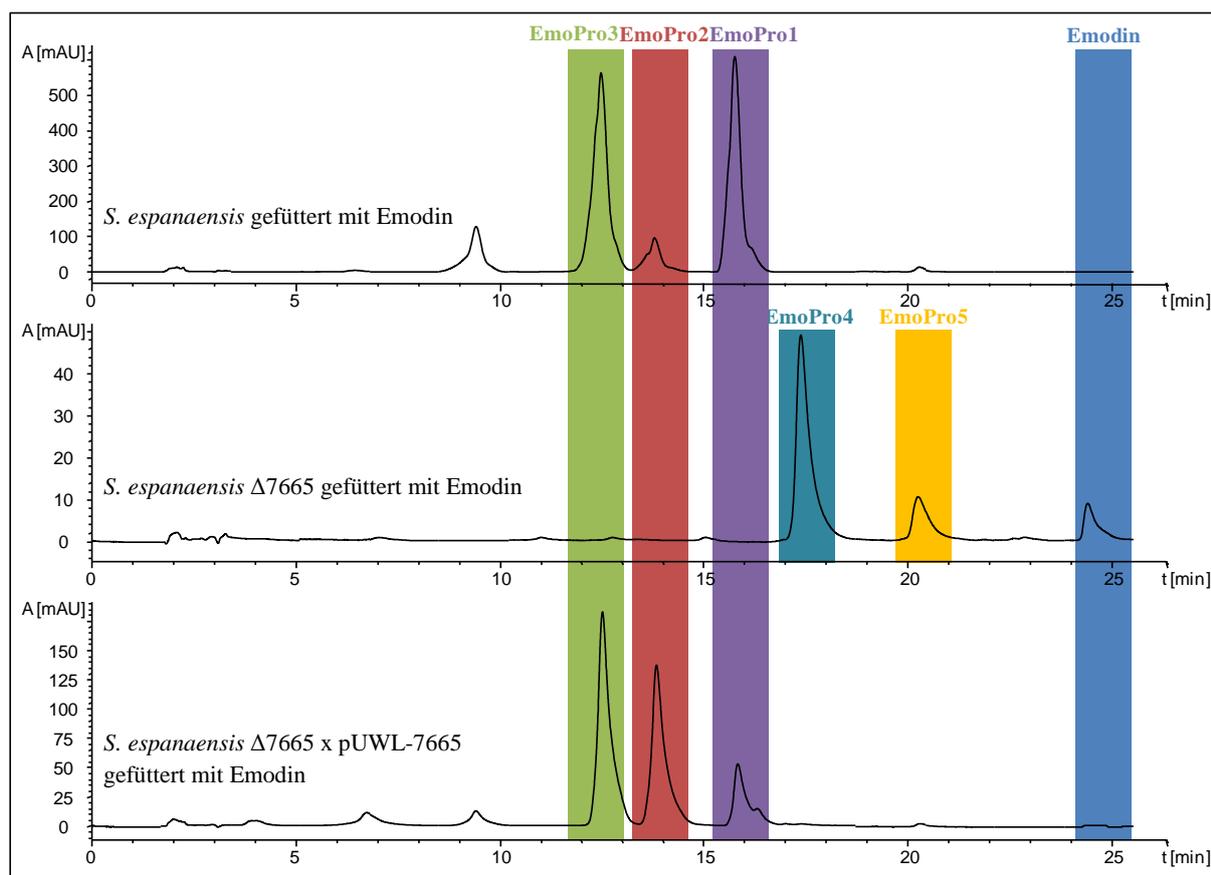


Abbildung 3-29 Strukturformel von AliPro4, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2-*O*-Methylanthrakollol ( $M_r$ : 270,24 g/mol).

### 3.4.4.4 Flexibilität von Ses60310

Durch die Fütterung der Mutanten *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 mit Alizarin, konnte gezeigt werden, dass die GT Ses60310 für die Glycosylierung von Alizarin verantwortlich ist. Um nachzuweisen, dass Ses60310 die gesuchte flexible GT aus *S. espanaensis* ist, wurden zusätzlich Emodin, Novobiocinsäure und Quercetin als Akzeptor-Substrate gefüttert.

Abbildung 3-30 zeigt exemplarisch die Fütterung des *S. espanaensis* Wildtyp, *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 mit Emodin. Es ist zu erkennen, dass die Inaktivierungsmutante die glycosylierten Biotransformationsprodukte EmoPro1, EmoPro2 und EmoPro3<sup>[3]</sup> nicht synthetisierte. Stattdessen wurden mit EmoPro4 und EmoPro5 zwei neue Substanzen detektiert. Die Massenspektren dieser Substanzen zeigen jeweils nur einen Peak bei  $m/z = 285$  [M-H]<sup>-</sup>. Der Massengewinn von 16 u deutet darauf hin, dass es sich jeweils um ein hydroxyliertes Derivat handelt. Das Chromatogramm der Komplementierungsmutante zeigt, dass dieser Extrakt die glycosylierten Produkte EmoPro1, EmoPro2 und EmoPro3 enthält. Damit wurde gezeigt, dass durch die Inaktivierung von *ses60310* im Genom von *S. espanaensis* der Stamm nicht mehr dazu in der Lage ist Emodin zu glycosylieren. Durch die Komplementierung der Mutante mit pSET-7665 konnte die Biotransformationsaktivität wieder hergestellt werden (siehe Abbildung 3-30).



**Abbildung 3-30** HPLC/ESI-MS-Diagramme ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ) der Ethylacetat-Extrakte von *S. espanaensis* Wildtyp-, *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ - und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665-Kulturen nach Zufütterung von Emodin. Das zugefüttete Emodin (blau) ist nur in der Inaktivierungsmutante detektierbar. Im Wildtyp und der Komplementierungsmutante scheint Emodin vollständig verstoffwechselt. Die glycosylierten Biotransformationsprodukte EmoPro1 (lila), EmoPro2 (rot) und EmoPro3 (grün), die im Rohextrakt des Wildtyps detektiert werden, sind im Extrakt von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  nicht vorhanden. Diese Mutante zeigt Peaks für die hydroxylierten Produkte EmoPro4 (petrol) und EmoPro5 (gelb). Die Mutante besitzt keine Glycosylierungsaktivität. Im Chromatogramm der Komplementierung sind die glycosylierten Produkte EmoPro1, EmoPro2 und EmoPro3 detektierbar. Durch die Komplementierung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit pSET-7665 konnte die Glycosylierungsaktivität der Inaktivierungsmutante wieder hergestellt werden.

Bei der Fütterung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit Novobiocinsäure wurden nur die hydroxylierten Biotransformationsprodukte NovPro1 und NovPro3 detektiert. Das glycosylierte NovPro5 war nicht nachweisbar. Die Komplementierung der Inaktivierungsmutante mit *ses60310* führte jedoch nicht zu einer nachweisbaren Produktion von NovPro5. Dieses Experiment wird zukünftig wiederholt werden müssen. Für die Fütterung der Inaktivierungsmutante mit Quercetin wurde ähnlich der Fütterung mit Alizarin eine kleine Menge glycosyliertes QuercPro1<sup>[3]</sup> detektiert. Die Komplementierung führte anschließend wieder zur gewohnten vollständigen Umsetzung von Quercetin zu QuercPro1.

Durch die Fütterung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  und *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 mit verschiedenen Akzeptor-Substraten konnte gezeigt werden, dass die GT *Ses60310* für die Produktion der glycosylierten Biotransformationsprodukte in *S. espanaensis* verantwortlich ist. Das bedeutet, dass es sich bei *ses60310* um das gesuchte Gen handelt, das für die GT mit geringer Substratspezifität codiert.

### 3.4.4.5 Sequenzanalyse des Genomabschnitts um das GT-Gen *ses60310*

Das GT-Gen *ses60310* codiert für die GT, die für die Biotransformation von Xenobiotika in *S. espanaensis* verantwortlich ist. Um mehr über dieses Gen herauszufinden, wurde eine Sequenzanalyse von *ses60310* und des umliegenden Genom-Abschnitts durchgeführt.

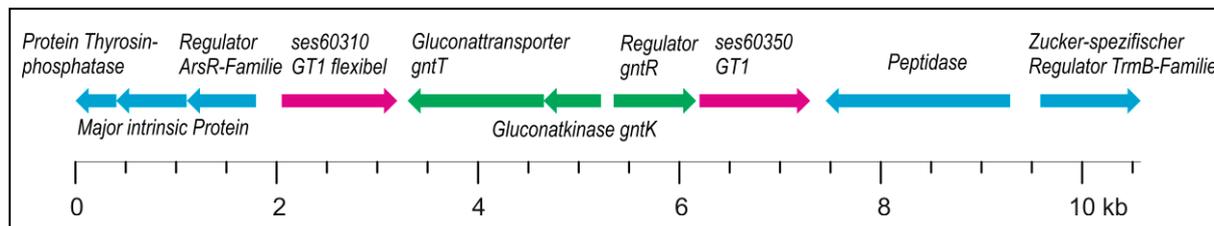


Abbildung 3-31 Genom Abschnitt von *S. espanaensis*, auf dem das GT-Gen *ses60310* liegt. GT-Gene sind pink dargestellt. Die Gene des GntI-Wegs sind grün, die übrigen Gene sind blau dargestellt.

Wie in Abbildung 3-31 zu erkennen ist, liegt vier Gene upstream von *ses60310* mit *ses60350* ein weiteres GT-Gen der CAZy-Familie 1. Zwischen den beiden GT-Genen liegen die GntI-Gene des Hauptsystems des Gluconat-Metabolismus<sup>[149,150]</sup>. Das Genprodukt von *gntT* ist verantwortlich für die spezifische Aufnahme von Gluconat in die Zelle und *gntK* codiert für eine Gluconatkinase, die das Gluconat aktiviert. Das Genprodukt von *gntR* reguliert diesen Gluconat-Metabolismus. Das Produkt des GntI-Metabolismus, 6-Phosphogluconat, wird in der Zelle anschließend dem Pentosephosphat-Weg zugeführt<sup>[151]</sup>, oder es wird im Entner-Doudoroff-Weg unter Energiegewinnung zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat abgebaut<sup>[152]</sup>. Zusätzlich findet sich in der Nähe von *ses60310* ein Zucker-spezifisches Regulatorgen der TrmB-Familie. Dieses Gen codiert für ein Protein, das die Expression von Transportergenen Zucker-abhängig reguliert. Die entsprechenden Transporter sind wiederum für die Aufnahme von Zuckern wie Trehalose, Maltose oder Maltodextrin in die Zelle verantwortlich<sup>[153]</sup>.

Zur Identifizierung von GTs, die Ähnlichkeiten zu *Ses60310* aufweisen, wurde die Proteinsequenz gegen die NCBI-Datenbank geblastet. Das Ergebnis dieser BLASTp-Analyse ist in Tabelle 3-8 aufgelistet. *Ses60310* zeigt Ähnlichkeiten zu *Ses49200* aus *S. espanaensis* und der uncharakterisierten GT *SACE\_2010* aus *S. erythraea*. Die erste charakterisierte GT mit Ähnlichkeit zu *Ses60310* ist *CalG1* aus dem Calicheamicin-Cluster von *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis*.

Tabelle 3-8 GTs mit Ähnlichkeit zu *Ses60310* aus *S. espanaensis*.

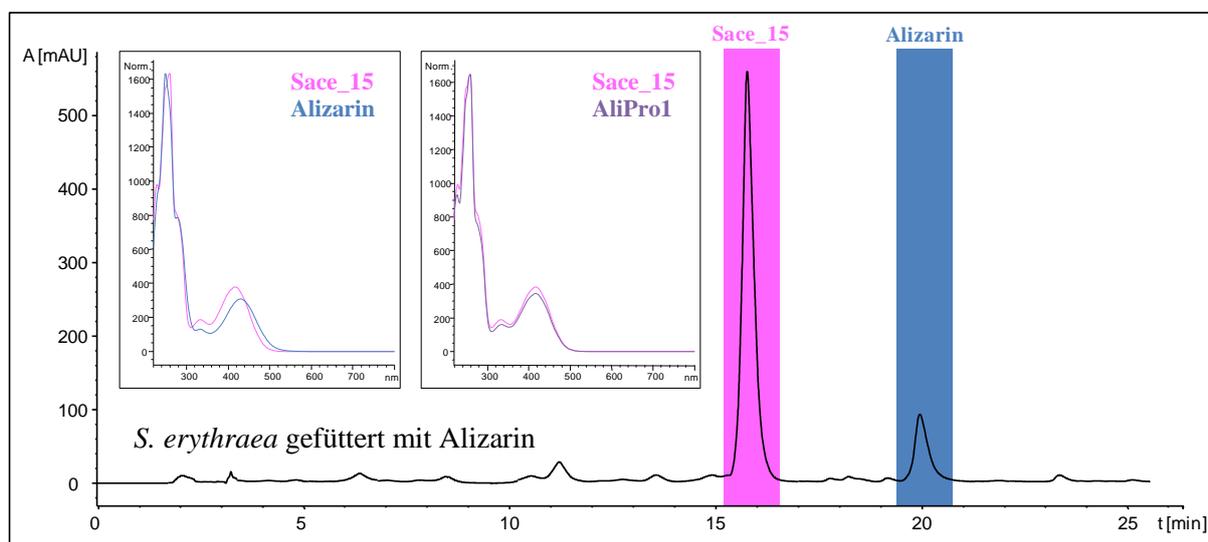
GT	Organismus	Anteil identischer / ähnlicher Aminosäuren in %	Referenz
Ses49200	<i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229	59/70	[154]
SACE_2010	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL23338	55/67	[38]
CalG1	<i>Micromonospora echinospora</i> ssp. <i>calichensis</i>	48/64	[141]

### 3.5 SACE\_2010 aus *S. erythraea*

Die GT Ses60310 ist in *S. espanaensis* für die Glycosylierung verschiedener exogener Substrate verantwortlich. Bisher sind GTs mit solch breitem Akzeptor-Substratspektrum sehr selten. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob es noch weitere GTs mit gleicher oder ähnlicher Funktion gibt. Die GT SACE\_2010 aus *S. erythraea* zeigt im BLASTp-Vergleich eine sehr große Ähnlichkeit zu Ses60310. Beide GTs teilen 55 % identische und 67 % ähnliche Aminosäuren. Auf Grund der Ähnlichkeit der Proteinsequenz der beiden GTs sollte die Glycosylierungsaktivität von *S. erythraea* und der GT SACE\_2010 untersucht werden.

#### 3.5.1 Biotransformation in *S. erythraea*

Der Bakterienstamm *S. erythraea* wurde von Prof. Dr. M. A. Marahiel von der Universität Marburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mit diesem Stamm wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Das in Abbildung 3-32 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass im Rohextrakt von *S. erythraea* gefüttert mit Alizarin bei einer RT von 15,8 min das Biotransformationsprodukt Sace\_15 enthalten ist. Hydroxylierte Derivate wurden nicht detektiert. Das UV-Absorptionsspektrum von Sace\_15 ähnelt dem von Alizarin und ist identisch zu dem von AliPro1. Im Massenspektrum von Sace\_15, das im negativen Modus gemessen wurde, liegt das höchste Signal bei  $m/z = 385$   $[M-H]^-$ . Zusätzlich wurde ein weiteres Signal mit  $m/z = 421$   $[M+Cl]^-$  detektiert. Der Massengewinn von 146 u deutet auf eine Glycosylierung mit einem Desoxyzucker hin.



**Abbildung 3-32 HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 430$  nm) des Ethylacetat-Extrakts einer *S. erythraea*-Kultur nach Zufütterung von Alizarin. Das Chromatogramm zeigt einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau) und ein Biotransformationsprodukt Sace\_15 (pink). Die UV-Absorptionsspektren von Sace\_15, Alizarin und AliPro1 (lila) sind gezeigt.**

Retentionszeit, UV-Absorptionsspektrum und Massenspektrum von Sace\_15 deuten darauf hin, dass es sich bei dieser Substanz um das aus der Fütterung von *S. espanaensis* bekannte AliPro1 handelt.

Um zu zeigen, welcher Desoxyzucker im Fall von Sace\_15 mit Alizarin verknüpft wurde oder ob es sich um AliPro1 handelt, wurde die Substanz gereinigt und mittels NMR analysiert.

### 3.5.2 Isolierung und Strukturanalyse von Sace\_15

Aus 900 mL Kultur von *S. erythraea*, gefüttert mit insgesamt 45 mg Alizarin, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) und eine Sephadex LH-20 Säule (siehe 5.12.4) gereinigt. Auf diese Weise konnten 2,5 mg Sace\_15 als orange-rotes Pulver gewonnen werden.

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in CD<sub>3</sub>OD gelöst und vermessen. Die Auswertung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente (<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMBC, ROESY) führten zur Aufklärung der Struktur von Sace\_15 (siehe Abbildung 3-33). Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin. Sace\_15 und AliPro1 sind dementsprechend dieselbe Substanz. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.5 zusammengefasst.

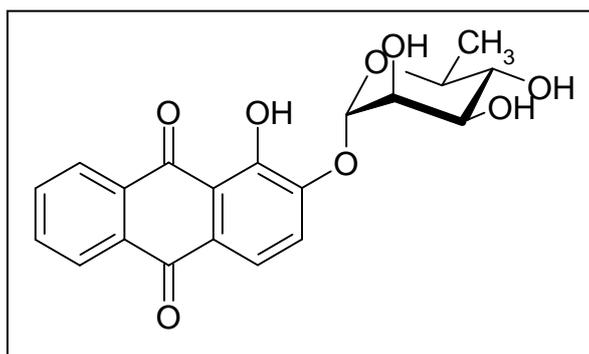


Abbildung 3-33 Strukturformel von Sace\_15, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin (M.: 386,35 g/mol).

### 3.5.3 Fütterung von *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 mit Alizarin

Der Actinomycet *S. erythraea* zeigt ebenso wie *S. espanaensis* Biotransformationsaktivität. Beide Stämme exprimieren eine GT, die in der Lage ist zugefüttertes Alizarin zu rhamnosylieren. In *S. espanaensis* ist die GT Ses60310 für diese Reaktion verantwortlich. In *S. erythraea* ist die GT SACE\_2010 vorhanden, deren Proteinsequenz eine relativ große Ähnlichkeit zu Ses60310 aufweist. Um zu überprüfen, ob diese GT für die Glycosylierungsaktivität von *S. erythraea* verantwortlich ist, sollte das Gen *sace\_2010* im heterologen Testsystem *S. albus* Rham exprimiert werden.

Dafür wurde das Gen *sace\_2010* in den Vektor pUWL-A kloniert (siehe 5.9.3.4). Das resultierende Plasmid pUWL-A-sace\_2010 wurde in *S. albus* Rham konjugiert. Mit der erhaltenen Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 wurde wie unter 5.7.6 beschrieben ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment durchgeführt. Alizarin wurde als Testsubstanz verwendet. Abbildung 3-34 zeigt das Ergebnis des Fütterungsexperiments. In dem HPLC/ESI-MS-Diagramm ist zu sehen, dass neben der

zugefütterten Substanz Alizarin das rhamnosylierte AliPro1 und das olivosylierte AliProN im erhaltenen Rohextrakt vorhanden waren. Die GT SACE\_2010 kann das dem Stamm *S. albus* Rham zugefütterte Alizarin glycosylieren. Damit konnte gezeigt werden, dass die GT SACE\_2010 auch an der Glycosylierung von Alizarin in *S. erythraea* beteiligt ist.

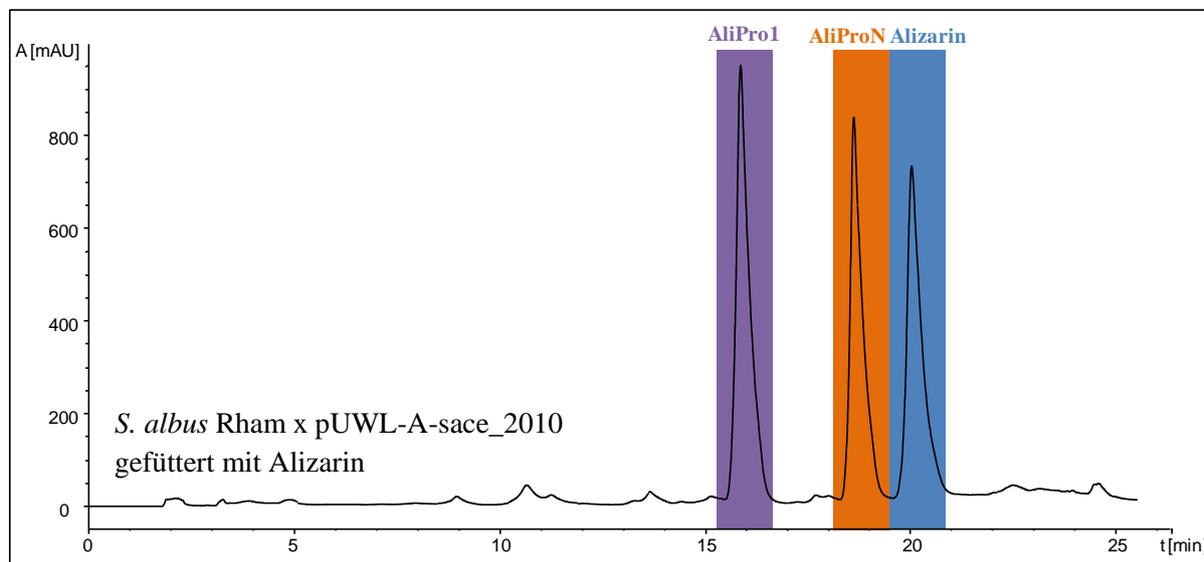


Abbildung 3-34 HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 430 \text{ nm}$ ) des Ethylacetat-Extrakts einer *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010-Kultur nach Zufütterung von Alizarin. Das Chromatogramm zeigt einen Peak für das zugefütterte Alizarin (blau) und die glycosylierten Biotransformationsprodukte AliPro1 (lila) und AliProN (orange).

### 3.5.4 Biotransformation von 1,4-Diaminoanthrachinon in *S. erythraea*

Der Actinomycet *S. erythraea* zeigt Biotransformationsaktivität. Er kann zugefüttertes Alizarin glycosylieren. Anders als *S. espanaensis* besitzt dieser Stamm aber keine Hydroxylierungsaktivität. Aus diesem Grund soll dieser Stamm zur Glycosylierung von Aminoanthrachinonen verwendet werden. Durch die fehlende Hydroxylierungsaktivität würde dieser Stamm nicht wie bei der Fütterung in *S. espanaensis* zu hydroxylierten und *O*-glycosylierten Derivaten sondern eventuell zu *N*-glycosylierten Derivaten führen.

*S. erythraea* wurde für ein *in vivo* Glycosylierungsexperiment verwendet (siehe 5.7.6). Als Testsubstanz wurde U3 verwendet. Das in Abbildung 3-35 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass im Rohextrakt von *S. erythraea*, gefüttert mit U3, die beiden Biotransformationsprodukte U3-8 und U3-21 enthalten waren. Das UV-Absorptionsspektrum von U3-8 ähnelt dem von U3. Im Massenspektrum von U3-8, das im negativen Modus gemessen wurde, liegt das höchste Signal bei  $m/z = 435 [M+Cl]^-$ . Im positiven Modus wurden Signale mit  $m/z = 401 [M+H]^+$  und  $m/z = 423 [M+Na]^+$  detektiert. Der Massengewinn von 162 u deutet auf eine Hydroxylierung und Glycosylierung mit einem Desoxyzucker (16 u + 146 u) oder eine Glycosylierung mit einem Monosaccharid mit vier Hydroxylgruppen (162 u) hin. Das UV-Absorptionsspektrum von U3-21 unterscheidet sich deutlich von dem von U3. Im Massenspektrum von U3-21, das im negativen Modus gemessen wurde, liegt das höchste Signal bei  $m/z = 279 [M-H]^-$ . Im positiven Modus wurden Signale mit  $m/z = 281 [M+H]^+$  und  $m/z = 303 [M+Na]^+$

detektiert. Außerdem wurde ein Signal mit  $m/z = 239$   $[U3+H]^+$  detektiert. Dieses Fragmentation lässt darauf schließen, dass es sich bei U3-21 trotz abweichendem UV-Absorptionsspektrum um ein Derivat von U3 handelt. Der Massengewinn von 42 u deutet weder auf eine Glycosylierung noch auf eine Hydroxylierung hin.

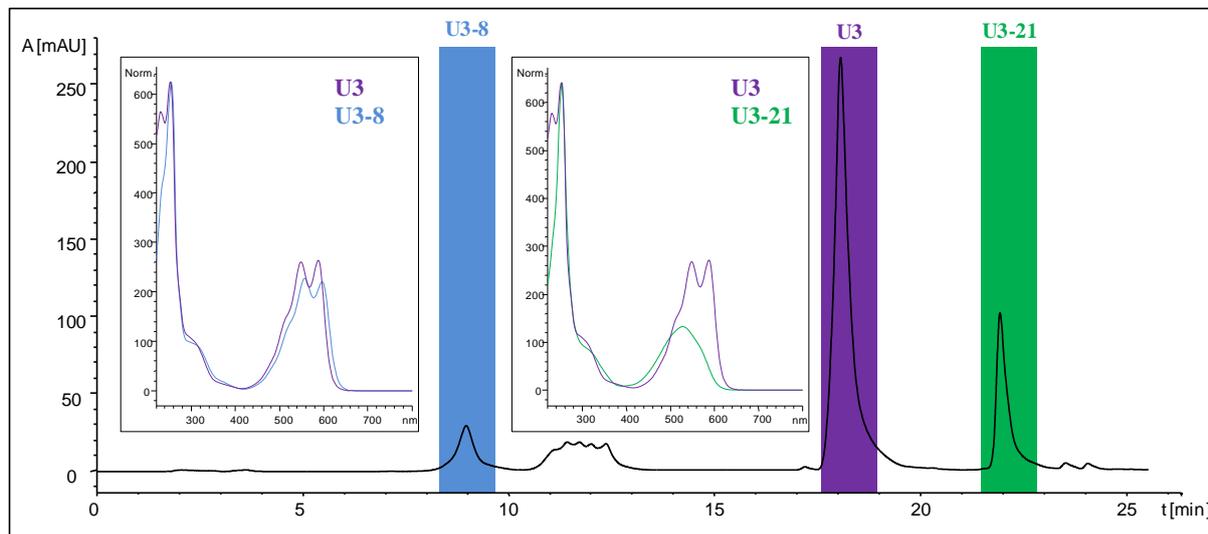


Abbildung 3-35 HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 550$  nm) des Ethylacetat-Extrakts einer *S. erythraea*-Kultur nach Zufütterung von U3. Das Chromatogramm zeigt einen Peak für das zugefütterte U3 (violett) und die beiden Biotransformationsprodukte U3-8 (blau) und U3-21 (grün). Die UV-Absorptionsspektren von U3, U3-8 und U3-21 sind gezeigt.

### 3.5.4.1 Isolierung und Strukturanalyse von U3-8

Aus 1,4 L Kultur von *S. erythraea*, gefüttert mit insgesamt 70 mg U3, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) und eine Sephadex LH-20 Säule (siehe 5.12.4) gereinigt. Auf diese Weise konnten 0,7 mg U3-8 als violettes Pulver gewonnen werden.

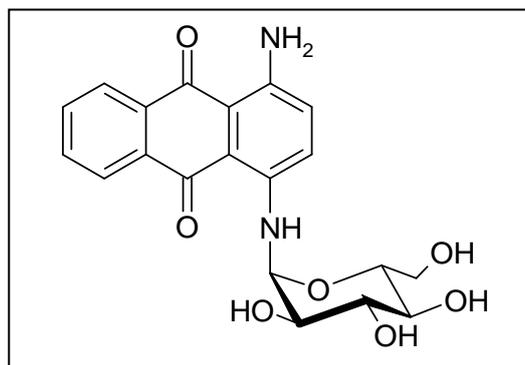


Abbildung 3-36 Strukturformel von U3-8, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 1-N- $\alpha$ -Glucosyldiaminoanthrachinon ( $M_r$ : 400,38 g/mol).

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in  $DMSO-d_6$  gelöst und vermessen. Die Auswertung der  $^1H$ -,  $^{13}C$ - und TOCSY-1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente ( $^1H/^1H$ -COSY,  $^1H/^{13}C$ -HMBC, ROE-

SY) führten zur Aufklärung der Struktur von U3-8 (siehe Abbildung 3-36). Es handelt sich dabei um 1-*N*- $\alpha$ -Glucosyldiaminoanthrachinon. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.6 zusammengefasst.

### 3.5.4.2 Isolierung und Strukturanalyse von U3-21

Aus 1,4 L Kultur von *S. erythraea*, gefüttert mit insgesamt 70 mg U3, wurden die gebildeten Biotransformationsprodukte extrahiert (siehe 5.12.1). Der erhaltene Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion fraktioniert (siehe 5.12.2) und über präparative Dünnschichtchromatographie (siehe 5.12.3) gereinigt. Auf diese Weise konnten 3,3 mg U3-21 als violette Pulver gewonnen werden.

Die Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie wurde von Dr. T. Paululat an der Universität Siegen durchgeführt. Die Probe wurde in DMSO- $d_6$  gelöst und vermessen. Die Auswertung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-NMR-Experimente und der 2D-NMR-Experimente ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY) führten zur Aufklärung der Struktur von U3-21 (siehe Abbildung 3-37). Es handelt sich dabei um 1-*N*-Acetyldiaminoanthrachinon. Die den Spektren entnommenen Daten sind im Anhang unter 7.5.7 zusammengefasst.

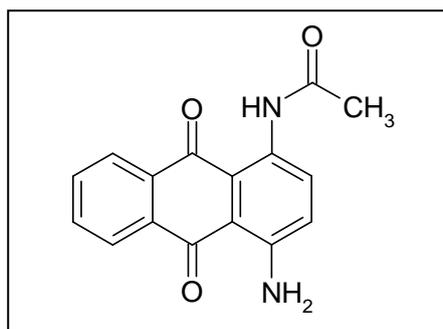


Abbildung 3-37 Strukturformel von U3-21, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 1-*N*-Acetyldiaminoanthrachinon ( $M_r$ : 280,28 g/mol).

### 3.5.4.3 Fütterung von *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 mit U3

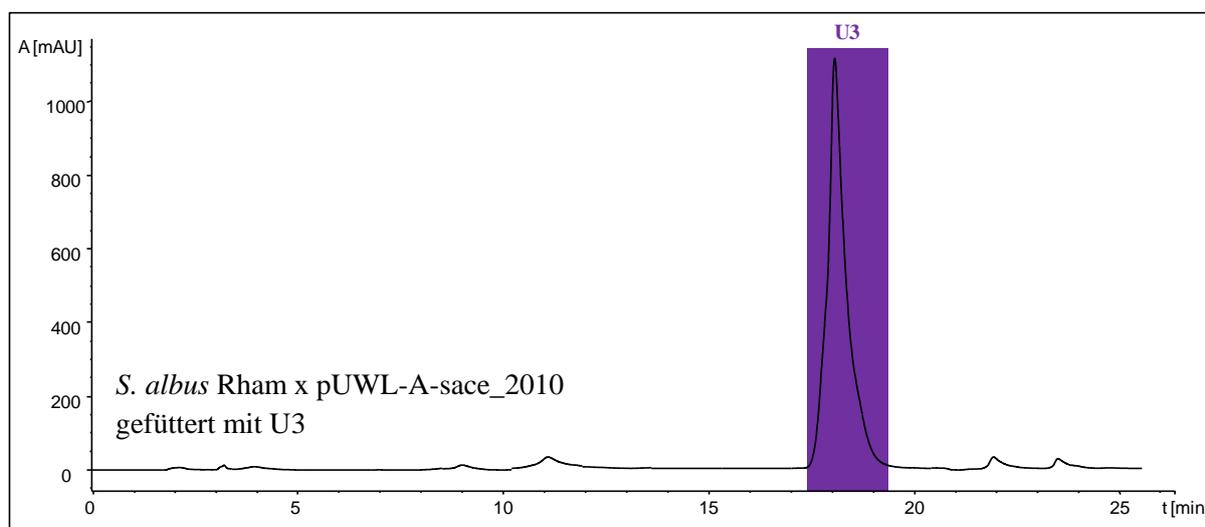


Abbildung 3-38 HPLC/ESI-MS-Diagramm ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) des Ethylacetat-Extrakts einer *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010-Kultur nach Zufütterung von U3. Das Chromatogramm zeigt einen Peak für das zugefütterte U3 (violett). Weitere Biotransformationsprodukte wurden nicht detektiert.

---

Mit Hilfe der Fütterung von *S. erythraea* mit U3 konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm eine GT besitzt, die Glucose *N*-glycosidisch mit U3 verknüpfen kann. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser GT um SACE\_2010 handelt, wurde die Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 mit U3 gefüttert. Das in Abbildung 3-38 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass im erhaltenen Rohextrakt nur das zugefütterte U3 enthalten ist. Es konnte kein glycosyliertes U3 detektiert werden.

### 3.6 Biochemische Untersuchungen der GT Ses60310

#### 3.6.1 Proteinpräparation von Ses60310

Die Glycosyltransferase Ses60310 sollte biochemisch charakterisiert werden. Dafür sollte das GT-Gen *ses60310* in *E. coli* exprimiert und das Protein anschließend gereinigt werden. Zur Reinigung des Proteins mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag wurde das Gen *ses60310* in den Vektor pET(28)a kloniert (siehe 5.9.6.1). Zur Reinigung mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag wurde das Gen *ses60310* in den Vektor pET(28)b kloniert (siehe 5.9.6.2).

Frau Y. Schmidt versuchte im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter Verwendung dieser und anderer Expressionskonstrukte das Protein Ses60310 zu reinigen<sup>[83]</sup>. Alle von ihr getesteten Bedingungen zur Proteinreinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie führten dabei stets zu aggregiertem Protein.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Synthese des Zielproteins Ses60310 (43,28 kDa), wie unter 5.11.1 beschrieben, im Stamm *E. coli* BL21 Codon Plus RP x pL1SL2 mit dem Expressionskonstrukt pET28a-7665-N-his-TEV. Die Zellen wurden lysiert (siehe 5.11.2) und das Protein unter Verwendung des ÄKTA-FPLC-Systems zuerst über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und anschließend mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (siehe 5.11.3). Die verwendeten Reinigungspuffer (siehe 5.2.8) enthielten alle das starke Reduktionsmittel *Tris*-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP). Abbildung 3-39 zeigt das Elutionschromatogramm der Reinigung von Ses60310. Bei einer Imidazol-konzentration von 75 mM und einem Elutionsvolumen von 104 bis 116 mL eluiert die Hauptfraktion des Proteins. Das Protein zeigt jetzt bereits keine Verunreinigungen mehr. Um die aggregierten von nicht-aggregierten Proteinfractionen zu trennen, wurde im Anschluss eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Abbildung 3-40 zeigt das Elutionschromatogramm der Gelpermeationschromatographie. Bei einem Elutionsvolumen von 44 bis 52 mL wurde der Peak des Ausschlussvolumens detektiert. Im Ausschlussvolumen eluiert das aggregierte Protein. Bei einem Volumen von 78 bis 83 mL eluiert das nicht-aggregierte Protein Ses60310. Dieses Protein wurde gesammelt, vereint und konzentriert. Abbildung 3-40 zeigt das Gelbild einer SDS-PAGE (siehe 5.11.6) des reinen nicht-aggregierten Proteins. Aus einem Liter Kultur konnten so im Schnitt 1-2 mg Ses60310 produziert werden.

## ERGEBNISSE

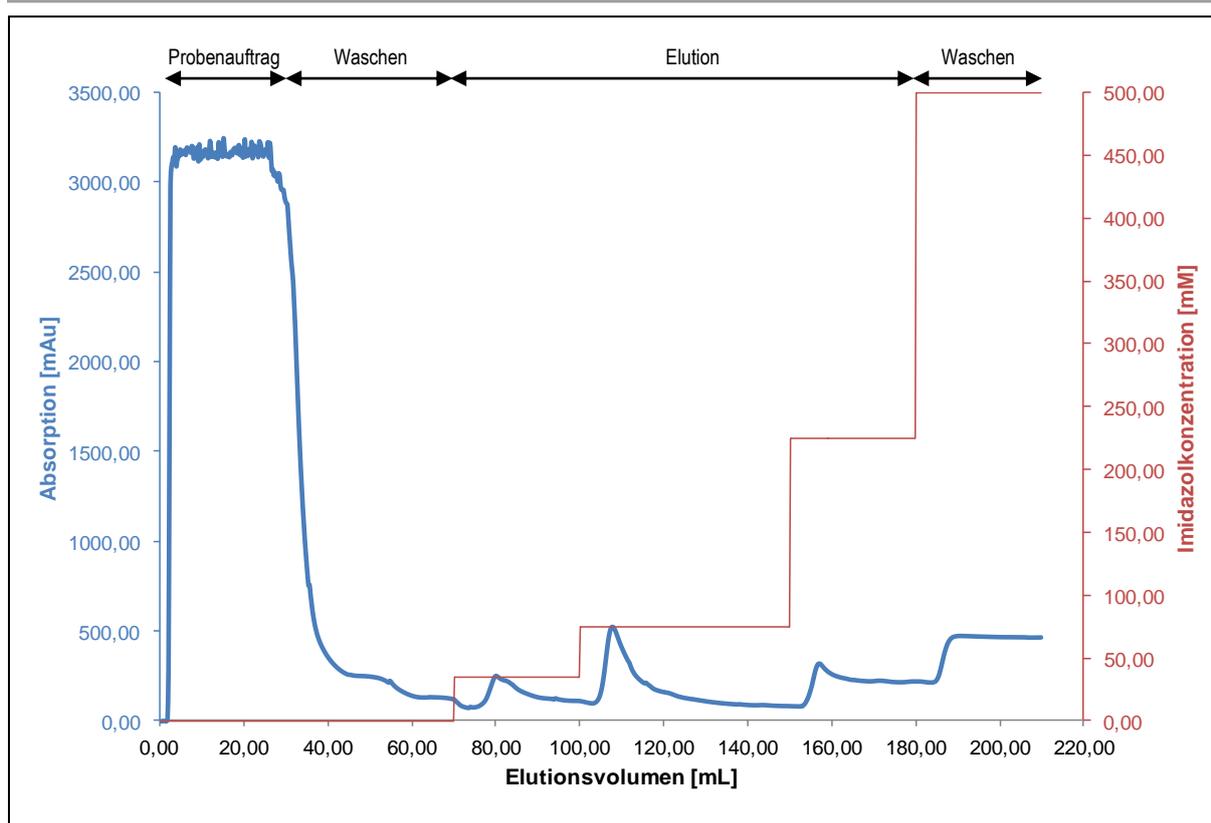


Abbildung 3-39 Elutionschromatogramm der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Ses60310. Es sind die gemessene Absorption (blau) und die verwendete Imidazolkonzentration (rot) gezeigt. Bei einer Imidazolkonzentration von 75 mM eluiert die Hauptfraktion des Proteins Ses60310.

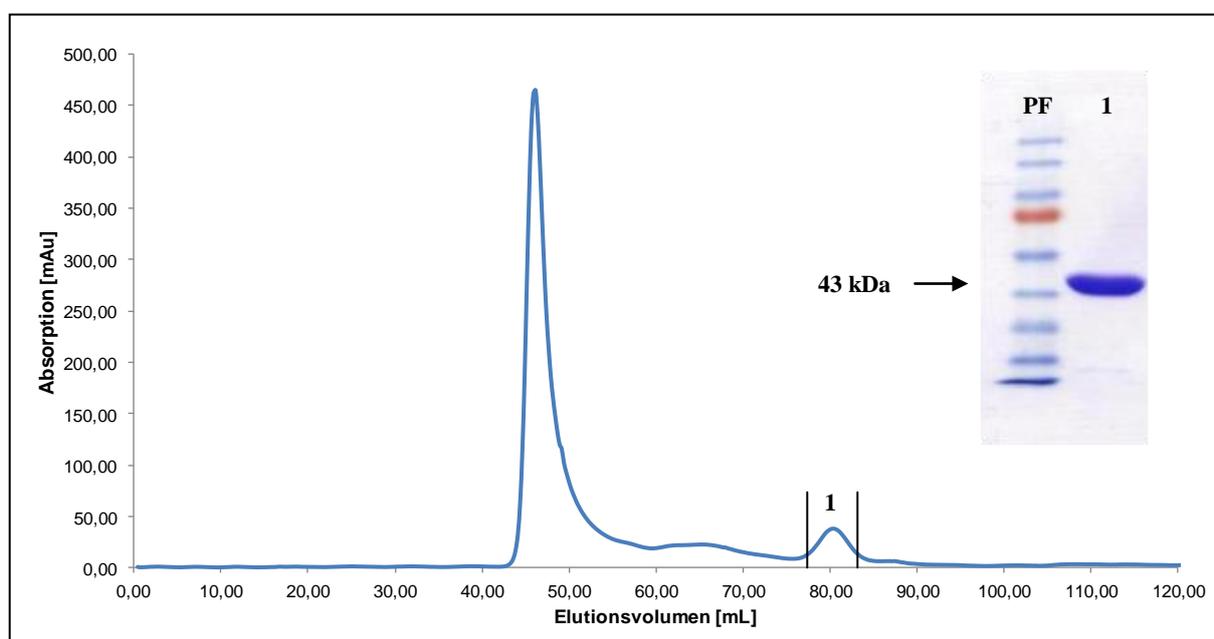


Abbildung 3-40 Elutionschromatogramm der Gelpermeationschromatographie zur Reinigung von Ses60310. Bei einem Elutionsvolumen von 78-83 mL eluiert das reine, unaggregierte Protein Ses60310. Es ist das Gelbild einer SDS-PAGE des gereinigten und konzentrierten Proteins Ses60310 (1) gezeigt.

### 3.6.2 *In vitro* Aktivitätsassays

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der Proteinaktivität wurden mit dem gereinigten Protein Ses60310 Aktivitätsassays durchgeführt. Als Akzeptor-Substrat wurde Alizarin, als Zuckerdonor dTDP-Rhamnose eingesetzt. Das Enzym Ses60310 soll die Reaktion zu AliPro1 und dTDP katalysieren. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 3-41 dargestellt.

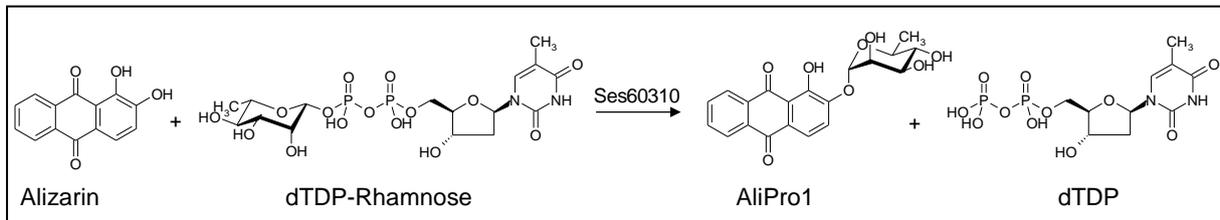


Abbildung 3-41 Reaktionsgleichung des durchgeführten Aktivitätsassays von Ses60310 mit Alizarin als Akzeptor-Substrat. Die Strukturformeln aller eingesetzten und erhaltenen Substanzen sind dargestellt.

Zur Bestimmung des pH-Optimums dieser Reaktion wurde der Aktivitätsassay mit anschließender Bestimmung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/ESI-MS durchgeführt (siehe 5.11.7.1). Für den Assay wurde nur Protein aus einer Produktionscharge verwendet. Zur Einstellung der verschiedenen pH-Werte wurde TRIS-Puffer mit pH-Werten von pH 6 bis pH 9,5 verwendet. Der Assay wurde eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Alle Werte wurden viermal bestimmt. Die Auswertung der HPLC/ESI-MS-Daten ist in Abbildung 3-42 zusammengefasst. Bei einem pH-Wert von pH 8,8 wurde am meisten AliPro1 gebildet.

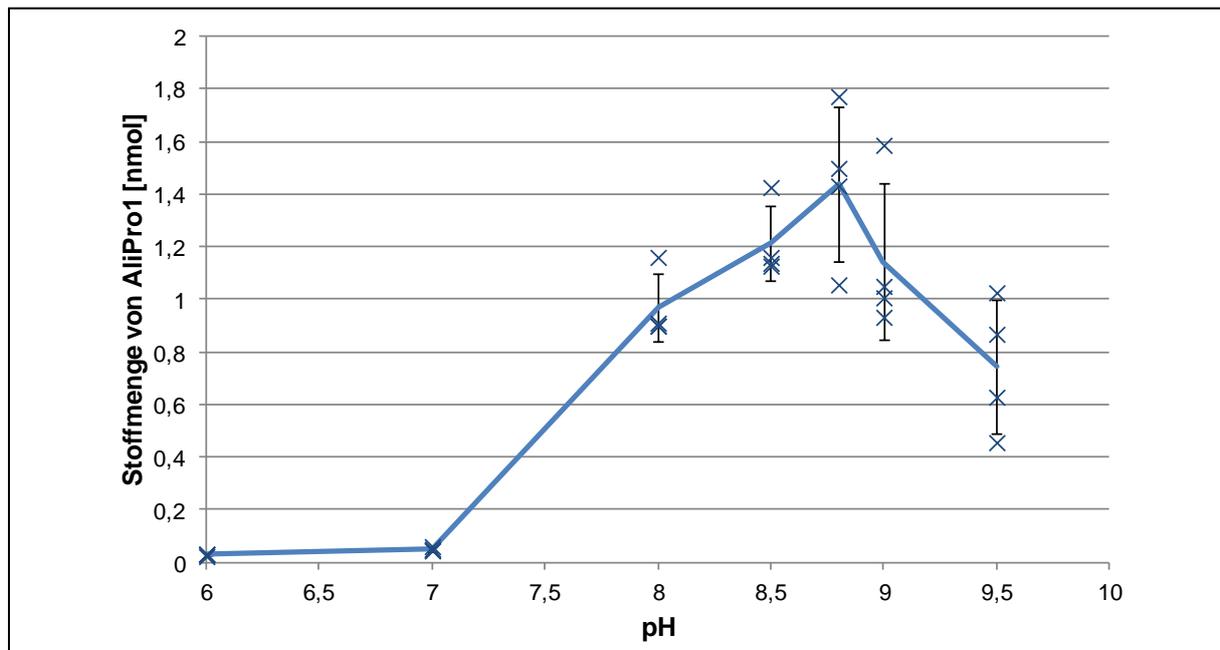
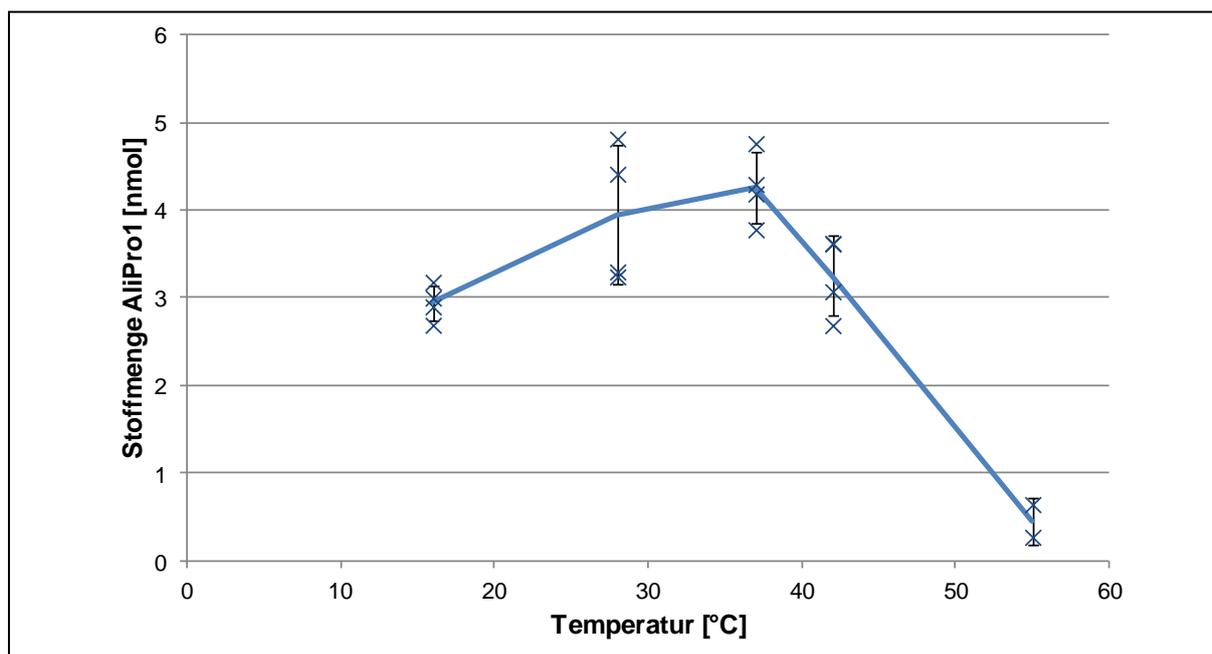


Abbildung 3-42 Abhängigkeit der Produktion von AliPro1 im *in vitro* Aktivitätsassay vom pH-Wert. Die Mengen an produziertem AliPro1, die für die einzelnen Messungen erhalten wurden, sind mit blauen Kreuzen dargestellt. Die blaue Linie zeigt den Mittelwert, die schwarzen Balken die Standardabweichung. Das meiste AliPro1 wird bei einem pH-Wert von 8,8 gebildet.

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums dieser Reaktion wurde der Aktivitätsassay mit anschließender Bestimmung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/ESI-MS durchgeführt (siehe 5.11.7.1). Für den Assay wurde nur das Protein aus einer Produktionscharge verwendet. Zur Einstellung des pH-Werts wurde TRIS-Puffer mit pH 8,8 verwendet. Die Reaktion wurde eine Stunde bei 16, 28, 37, 42 und 55 °C inkubiert. Die Werte bei 16-37 °C wurden viermal, die Werte bei 42 °C dreimal und bei 55 °C zweimal bestimmt. Die Auswertung der HPLC/ESI-MS-Daten ist in Abbildung 3-43 zusammengefasst. Bei einer Temperatur von 37 °C wurde durchschnittlich am meisten AliPro1 gebildet. Dies bedeutet, dass bei dieser Temperatur das Verhältnis von Molekülbewegung zu Proteininstabilität für diese Reaktion am günstigsten ist und somit am meisten AliPro1 gebildet wird.



**Abbildung 3-43** Abhängigkeit der Produktion von AliPro1 im *in vitro* Aktivitätsassay von der Temperatur. Die Mengen an produziertem AliPro1, die für die einzelnen Messungen erhalten wurden, sind mit blauen Kreuzen dargestellt. Die blaue Linie zeigt den Mittelwert, die schwarzen Balken die Standardabweichung. Das meiste AliPro1 wird bei einer Temperatur von 37 °C gebildet.

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der betrachteten Enzymreaktion wurde die photometrische Bestimmung der Aktivität durchgeführt (siehe 5.11.7.2). Dabei wurde die Menge an erhaltenem AliPro1 bestimmt. Die Änderung der Produktmenge innerhalb der ersten Minute ergab die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion. Dieser Wert wurde für verschiedene Substratkonzentrationen je dreimal bestimmt. Innerhalb der ersten Minute war das Donor-Substrat dTDP-Rhamnose im Überschuss vorhanden, sodass die Menge an gebildetem AliPro1 allein von der Akzeptor-Substratkonzentration und der Enzymaktivität abhängig war. Basierend auf der Annahme, dass sich reversibel ein Enzym-Substrat-Komplex bildet, der dann in Enzym und Produkt zerfällt, lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung <sup>[155]</sup> zur Beschreibung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit verwenden (siehe Gleichung 1). Die erhaltenen Werte wurden in ein Michaelis-Menten-Diagramm eingetragen (siehe Abbildung 3-45). Außerdem wurden die gemessenen Werte doppelt reziprok in ein sogenanntes Lineweaver-Burk-Diagramm <sup>[156]</sup> eingetragen (siehe Abbildung 3-44). In diesem Diagramm konnte über

den Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit der X-Achse  $K_m$  und über den Schnittpunkt der Y-Achse  $v_{max}$  bestimmt werden. Diese Werte wurden zusätzlich in das Michaelis-Menten-Diagramm eingetragen. Beide Diagramme zeigen somit, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion bei  $v_{max} = 0,00156 \text{ s}^{-1}$  und die Michaelis-Menten-Konstante bei  $K_m = 0,03081 \text{ mM}$  liegt.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot c(S)}{K_m + c(S)}$$

Gleichung 1

$c(S)$	Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion
$v_0$	Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der entsprechenden Substratkonzentration
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, die bei Substratsättigung erreicht wird
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante; bei dieser Substratkonzentration läuft die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit ab. Oft ist die Michaelis-Menten-Konstante ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

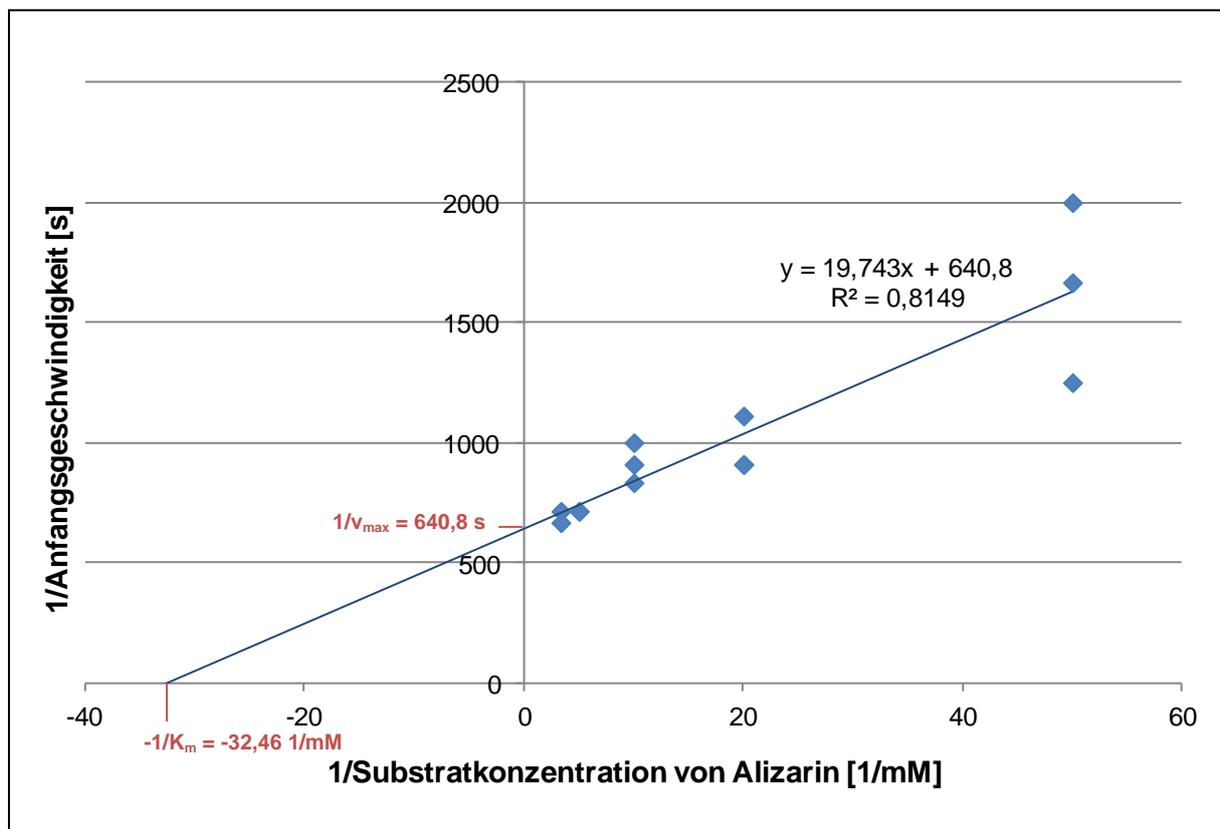


Abbildung 3-44 Lineweaver-Burk-Diagramm der Ses60310 vermittelten Reaktion von Alizarin und dTDP-Rhamnose zu AliPro1 und dTDP. Doppelt reziprok aufgetragen sind die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion, die mit Hilfe des photometrischen Assays bestimmt wurden, gegen die eingesetzte Substratkonzentration von Alizarin (blaue Punkte). Die blaue Linie zeigt die berechnete Ausgleichsgerade. Weiterhin sind die Werte, die für  $1/v_{max}$  und  $-1/K_m$  abgelesen wurden, angegeben (rot).

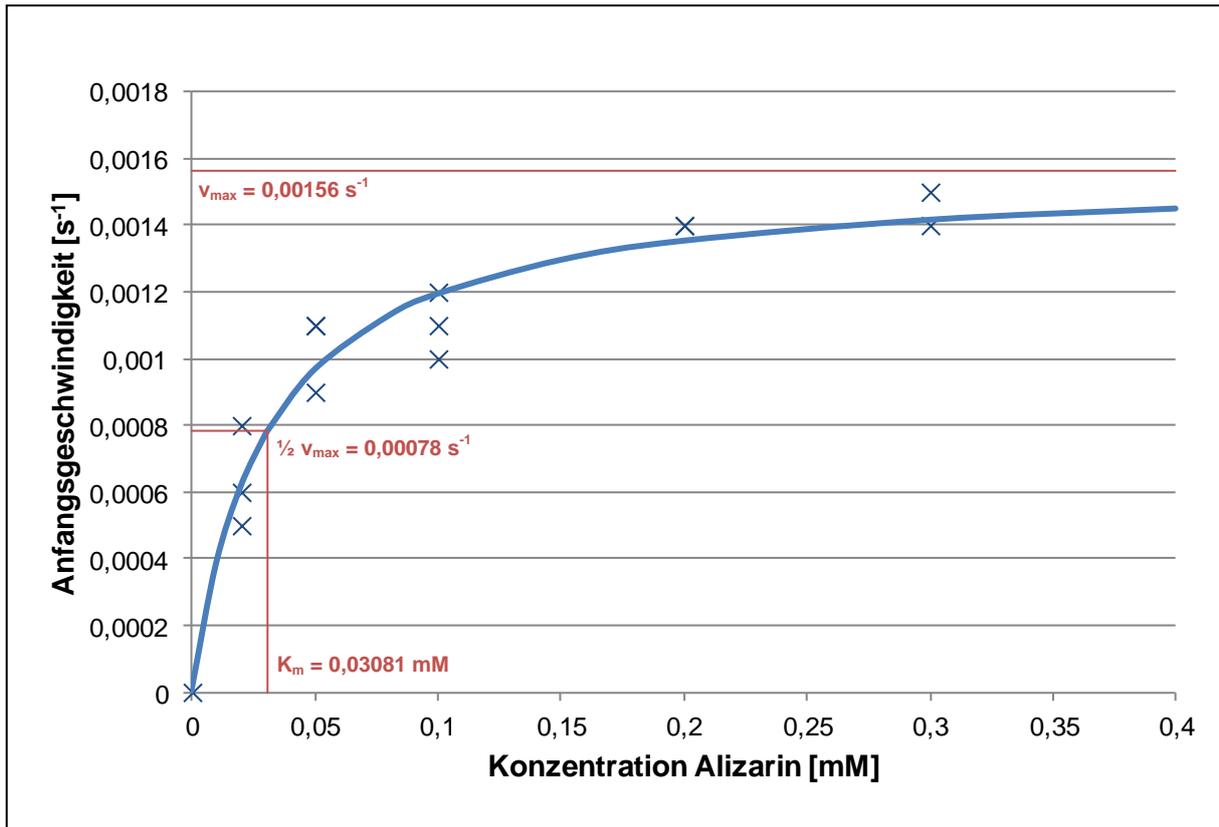


Abbildung 3-45 Michaelis-Menten-Diagramm der Ses60310 vermittelten Reaktion von Alizarin und dTDP-Rhamnose zu AliPro1 und dTDP. Aufgetragen sind die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion, die mit Hilfe des photometrischen Assays bestimmt wurden, gegen die eingesetzte Substratkonzentration von Alizarin (blaue Kreuze). Die blaue Linie zeigt die Michaelis-Menten-Kurve, basierend auf den Werten von  $v_{max}$  und  $K_m$ , die im Lineweaver-Burk-Diagramm abgelesen wurden. Die Werte für  $v_{max}$ ,  $\frac{1}{2} v_{max}$  und  $K_m$  sind in rot angegeben und eingezeichnet.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 *In silico* Untersuchungen zum Genom von *S. espanaensis*

#### 4.1.1 Vergleich der Genome aus der Familie der *Pseudonocardiaceae*

Die Gattung *Saccharothrix* gehört zur Familie der *Pseudonocardiaceae*. *S. espanaensis* ist der erste Vertreter dieser Gattung, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. Der Vergleich des Genoms von *S. espanaensis* mit den anderen bis Oktober 2012 vollständig sequenzierten Genomen aus der Familie der *Pseudonocardiaceae* ist in Tabelle 4-1 gezeigt. Die Stämme *T. bispora* und *S. viridis* wachsen beide bei erhöhten Temperaturen und wurden aus nährstoffreichen Umgebungen wie Mist und Kompost beziehungsweise Torf isoliert <sup>[157,158]</sup>. Sie besitzen ein vergleichsweise kleines Genom von circa 4,2 Mb. Die anderen sequenzierten *Pseudonocardiaceae* *A. mirum*, *A. mediterranei*, *P. dioxanivorans*, *S. erythraea* und *S. espanaensis* wachsen bei moderaten Temperaturen und stammen aus dem Erdboden. Sie besitzen alle ein deutlich größeres Genom.

**Tabelle 4-1 Kennzahlen der Genome von *S. espanaensis* und den anderen bis Oktober 2012 vollständig sequenzierten Stämmen der Familie *Pseudonocardiaceae*.**

Spezies	Größe des Chromosoms [bp]	G+C Gehalt [%]	CDS	rRNA Operons	tRNAs	Plasmide	Referenz
<i>A. mediterranei</i> U 32	10.236.715	71,3	9.228	4	52	0	[39]
<i>A. mirum</i> DSM 43827	8.248.144	73,71	7.100	5	74	0	[41]
<i>P. dioxanivorans</i> CB 1190	7.096.571	73,31	6.495	3	47	3	[48]
<i>S. erythraea</i> NRRL 2338	8.212.805	71,29	7.198	4	50	0	[38]
<i>S. espanaensis</i> DSM 44229	9.360.653	72,19	8.427	4	80	0	[154]
<i>S. viridis</i> DSM 43017	4.308.349	67,32	3.906	3	64	0	[43]
<i>T. bispora</i> DSM 43833	4.189.976	72,43	3.596	3	63	0	[45]

Tabelle 4-2 zeigt die Art und Anzahl der Sekundärstoff-Cluster aller vollständig sequenzierten Bakteriengenome der Familie *Pseudonocardiaceae*. Der Stamm *P. dioxanivorans* wurde in, mit Dioxan verseuchtem, Industrieschlamm entdeckt <sup>[46,47]</sup>. Dieses Bakterium zeigt anhaltendes Wachstum in einer Kultur mit 1,4-Dioxan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle <sup>[47]</sup>. Im Genom dieses biodegradierenden Stammes *P. dioxanivorans* sind genau wie in den kleinen Genomen von *T. bispora* und *S. viridis* weniger als zehn Sekundärstoff Cluster vorhanden. In den Genomen der aus dem Erdboden stammenden Antibiotika-Produzenten *A. mirum*, *S. erythraea* und *A. mediterranei* finden sich mehr als

20 Sekundärstoff-Cluster. Mit den insgesamt 26 Sekundärstoffclustern (siehe 3.1.2) besitzt *S. espanaensis* demnach ebenso viele Sekundärstoff-Cluster wie die anderen Antibiotika-produzierenden Bodenbakterien aus der Familie der *Pseudonocardiaceae*.

**Tabelle 4-2 Vergleich von Art und Anzahl der Sekundärstoffcluster aus *S. espanaensis* mit den aus den anderen bis Oktober 2012 vollständig sequenzierten Stämmen der Familie *Pseudonocardiaceae*.**

Spezies	Terpene	PKS	NRPS	Hybrid	Andere	Gesamt
<i>A. mirum</i> DSM 43827	4	10	3	5	1	23
<i>A. mediterranei</i> U32	4	6	7	4	4	25
<i>P. dioxanivorans</i> CB1190	2	0	1	0	2	5
<i>S. erythraea</i> NRRL 2338	10	11	4	2	3	30
<i>S. espanaensis</i> DSM 44229	7	3	5	6	5	26
<i>S. viridis</i> DSM 43017	2	2	2	0	2	8
<i>T. bispora</i> DSM 43833	1	1	0	0	3	5

#### 4.1.2 Sekundärstoff-Cluster aus dem Genom von *S. espanaensis*

Die Anzahl der vollständig sequenzierten Genome hat in den letzten Jahren durch die Einführung neuester Sequenziermethoden stetig zugenommen. Die Zunahme der zugänglichen Genomsequenzen bedingt auch einen Anstieg der neu entdeckten Sekundärstoff-Cluster. Die Sequenzierung des Genoms von *S. espanaensis* führte zur Identifizierung von insgesamt 26 Sekundärstoff-Clustern (siehe 3.1.2). Die Produkte des sam-Clusters, die Saccharomicine A und B, sind die einzigen Sekundärstoffe, die von *S. espanaensis* nachweislich produziert werden<sup>[10,80]</sup>. Bisher wurden keine weiteren Sekundärstoffe aus *S. espanaensis* detektiert. Dadurch, dass alle Cluster vollständig sequenziert vorliegen, kann das Potenzial von *S. espanaensis* zur Produktion von neuen Sekundärstoffen nun einfacher ausgeschöpft werden<sup>[159]</sup>. Ein Hauptgrund dafür ist die Tatsache, dass die Clusterdaten einen Anhaltspunkt geben, nach welcher Art von Naturstoff gezielt gesucht werden muss. Mit Cluster 2 und Cluster 7 wurden zum Beispiel zwei mögliche Siderophor-Cluster entdeckt (siehe 3.1.2.2). Bei Siderophoren handelt es sich um eisenbindende Substanzen, die unter Eisenmangelbedingungen gebildet werden und für die Eisenaufnahme in die Bakterienzelle verantwortlich sind. Challis und Kreutzer *et al.* beschreiben die gezielte Identifizierung von neuen Siderophoren durch die Kultivierung der Bakterienstämme in Eisenmangelmedien<sup>[160,161]</sup>. Die für das Produkt von Cluster 2 vorausgesagte Catechol-Struktur kann UV-metrisch detektiert werden und könnte somit zur gezielten Identifizierung des Sekundärstoffs, der von Cluster 2 produziert wird, führen.

Die Produktion von bakteriellen Sekundärstoffen ist allgemein sehr stark von Kultivierungsbedingungen und -zeitpunkt abhängig. Liu *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass bei der Co-Kultivierung von *Streptomyces roseosporus* (*S. roseosporus*) mit *Staphylococcus aureus* beziehungsweise *Staphylococcus epidermidis* 36 bis 48 h nach Kultivierungsbeginn Arylomycin A2 produziert wird. Nach

---

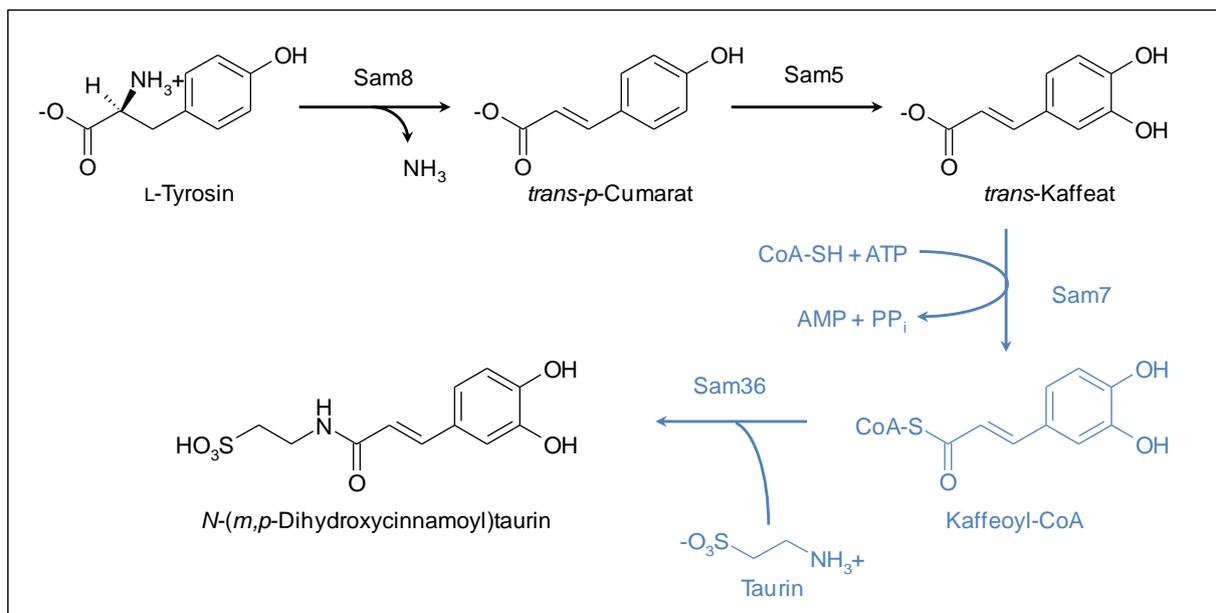
48 h ist dieses Antibiotikum nicht mehr detektierbar. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die ausschließliche Produktion des Antibiotikums Daptomycin<sup>[162]</sup>. Diesen Zusammenhang konnten die Autoren mit einer neuentwickelten Technologie, der bildgebenden Massenspektroskopie (imaging mass spectrometry, IMS), herstellen<sup>[163-165]</sup>. Die Kombination von IMS mit einer Genomanalyse, die auf der Identifizierung von kurzen Sequenzen basiert (short sequence tagging, SST) führte zur Identifizierung des Arylomycin A2-Clusters in *S. roseosporus*<sup>[162]</sup>. Diese Technologien könnten auch zur Identifizierung von Sekundärstoffen und den dazugehörigen Clustern in *S. espanaensis* verwendet werden. Durch die Kultivierung von *S. espanaensis* auf verschiedenen Medien oder durch Co-Kultivierung mit anderen Bakterienarten könnte die Produktion neuer Metabolite angeregt werden. Mit Hilfe des IMS könnte ein zeitlicher Verlauf der Produktion verschiedenster Ionen detektiert werden. Bestimmte Fragmentationen könnten Hinweise auf Struktureinheiten wie zum Beispiel einzelne Aminosäuren geben, die dann mittels SST zur Identifizierung des entsprechenden Clusters führen können.

In einigen Fällen wird es nicht möglich sein, nur durch die Variierung von Kultivierungsbedingungen den Trigger zur Aktivierung eines bestimmten Clusters zu finden. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung der Produkte, die durch diese Sekundärstoffcluster produziert werden, ist die Expression von clusterspezifischen Regulatoren. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Expression der clusterspezifischen positiven SARP-Regulatoren zur vermehrten Produktion des entsprechenden Sekundärstoffs führt<sup>[166-169]</sup>. Im Genom von *S. espanaensis* sind vier Sekundärstoffcluster vorhanden, die ein Gen enthalten, welches möglicherweise für ein SARP codiert (tcp1, Cluster 1, Cluster 11 und lan1). Durch die Expression dieser Gene könnte eine direkte Aktivierung der Sekundärstoffproduktion angeregt werden. In Cluster 9 findet sich ebenfalls ein Gen, das wahrscheinlich für einen clusterspezifischen positiven Regulator codiert. Das Produkt dieses Gens zeigt Ähnlichkeit zu einem LuxR-Regulator. Laureti *et al.* konnten zeigen, dass ein Cluster, das bei der Kultivierung unter Laborbedingungen nicht transkribiert wurde, durch die Expression eines clusterspezifischen LuxR-Regulators geweckt werden konnte. Diese Expression führte zur Entdeckung der Stabomycine A-D, die vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Cytostatika darstellen<sup>[170]</sup>. Ein weiterer Regulator, der in den Clustern von *S. espanaensis* vertreten ist, gehört zur Familie der tetR-Regulatoren. Diese Regulatoren können sowohl einen induzierenden<sup>[171]</sup> als auch einen inhibierenden<sup>[172,173]</sup> Effekt auf die Produktion von Sekundärstoffen in Actinomyceten haben. Aus diesem Grund könnte entweder die Überexpression oder die Inaktivierung des *tetR*-Gens aus Cluster 2, Cluster 5, Cluster 6, Cluster 10 oder lan2 zur Synthese der entsprechenden Sekundärstoffe führen.

## 4.2 Saccharomicin-Biosynthese

### 4.2.1 Biosynthese des Saccharomicin Aglycons

Die Saccharomicine A und B sind aus einem *N*-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-taurin-Aglycon und einer Seitenkette, bestehend aus 17 Zuckermolekülen, aufgebaut <sup>[10]</sup>. M. Berner hat für die Synthese des Aglycons einen Biosyntheseweg postuliert <sup>[7]</sup>. Abbildung 4-1 zeigt den putativen Syntheseweg ausgehend von L-Tyrosin über Cumarat und Kaffeat zu Kaffeoyl-CoA, welches zusammen mit Taurin zum vollständigen Aglycon reagieren soll. M. Berner konnte zeigen, dass die Reaktion von L-Tyrosin zu Cumarat vom Genprodukt von *sam8*, einer Tyrosin-Ammonia-Lyase, katalysiert wird. Für die Folgereaktion zu Kaffeat ist das Genprodukt von *sam5*, eine 4-Coumarat 3-Hydroxylase, verantwortlich <sup>[7]</sup>. Auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte heterologe Expression der Gene *sam8* und *sam5* mit Hilfe des replikativen Vektors pUWL-A in *S. albus* führte zur Produktion von Kaffeesäure (siehe 3.2.1). Dadurch konnten die ersten beiden Biosyntheseschritte von Tyrosin zu Kaffeat erneut bestätigt werden.



**Abbildung 4-1** Putativer Biosynthese-Weg des Saccharomicin-Aglycons *N*-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-taurin <sup>[7]</sup>. Die Ausgangssubstanz L-Tyrosin, das fertige Aglycon sowie die experimentell bestätigten Intermediate sind schwarz dargestellt. Die postulierten Intermediate und die für deren Synthese möglicherweise verantwortlichen Enzyme sind blau dargestellt.

M. Berner hat weiterhin postuliert, dass zur Synthese des Saccharomicin-Aglycons Kaffeat mit Coenzym A aktiviert wird. Für diese Aktivierung ist wahrscheinlich das Gen *sam7* verantwortlich, das für eine Acetyl-Coenzym A-Synthetase codiert. Bei der von M. Berner und A. Chargé durchgeführten Expression von *sam7* zusammen mit *sam8* und *sam5* im heterologen Wirt *S. fradiae* XKS konnte kein Kaffeoyl-CoA detektiert werden. Auch bei der Expression von *sam7* in *S. fradiae* XKS und der anschließenden Kultivierung unter Zugabe von Kaffeesäure konnte das gewünschte Intermediat nicht nachgewiesen werden <sup>[80]</sup>. Da durch diese *in vivo* Experimente die postulierte Funktion von Sam7 nicht geklärt werden konnte, sollte die Acetyl-Coenzym A-Synthetase anschließend in *E. coli* syntheti-

---

siert und gereinigt werden, um sie in einem *in vitro* Aktivitätsassay einsetzen zu können. Dieses Vorhaben scheiterte jedoch daran, dass nur eine minimale Ausbeute des Zielproteins erhalten wurde<sup>[80]</sup>. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte erneute Annotation des *sam*-Clusters hat dazu geführt, dass die Genstarts von insgesamt acht Genen upstream und von vier Genen downstream verschoben wurden (siehe 3.1.1). Unter den Genen, deren Startcodon upstream verschoben wurden, befindet sich *sam7*. Nach der neuen Annotation besteht das Genprodukt von *sam7* aus 374 Aminosäuren, die Annotation von M. Berner hatte lediglich 363 Aminosäuren vorhergesagt. Das bedeutet, dass die Experimente von M. Berner nach dem heutigen Kenntnisstand mit einem zu kurzen Gen *sam7* durchgeführt wurden. Bei den Experimenten im heterologen Wirt *S. fradiae* XKS wurde durch das falsche Startcodon und die fehlende Ribosomenbindestelle sehr wahrscheinlich gar kein Genprodukt von *sam7* gebildet. Für die Expression in *E. coli* wurde ein Plasmidkonstrukt verwendet, welches eine Ribosomenbindestelle besitzt. Über das falsche Startcodon wurde jedoch nur eine sehr geringe Menge eines verkürzten Proteins gebildet. Die von M. Berner durchgeführten Versuche zur Acetyl-Coenzym A-Synthetase Sam7 konnten auf Grund des verkürzten Gens *sam7* nicht funktionieren und sollten mit einem vollständigen Gen *sam7* erneut durchgeführt werden.

Das vollständige Gen *sam7* wurde mit Hilfe des Plasmids pSET\*sam7 in *S. albus* exprimiert und die erhaltene Mutante anschließend unter Zugabe von Kaffeesäure kultiviert. Wie unter 3.2.2 beschrieben ist, konnte jedoch kein Kaffeoyl-CoA detektiert werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass das Gen *sam7* durch die Verwendung des integrativen Vektors pTAJA in einen Bereich des Genoms von *S. albus* integriert wurde, der nur sehr schwach transkribiert wird. N. Gehring konnte zeigen, dass die Expression der Gene *sam8* und *sam5* mit Hilfe des integrativen Vektors pTAJA, der nur einmal pro Zelle vorhanden ist, nicht zur Produktion von Kaffeesäure in *S. albus* führte<sup>[138]</sup>. Durch die Expression dieser Gene mit Hilfe des replikativen Vektors pUWL-A konnte die Produktion von Kaffeesäure nachgewiesen werden (siehe 3.2.1). Die Expression von *sam7* mit Hilfe des Vektors pUWL-A, der in der Zelle mit einer hohen Kopienzahl vorhanden ist, könnte also auch zur gewünschten Aktivierung von Kaffeesäure mit Coenzym A führen. Führen diese Experimente nicht zur Detektion von Kaffeoyl-CoA, könnte das möglicherweise auch daran liegen, dass die Expression von *sam7* im heterologen Wirt nur zur Produktion von einer geringen Menge Kaffeoyl-CoA führt oder das gebildete Kaffeoyl-CoA weiter metabolisiert wird. In diesem Fall würde sich anbieten, die Acetyl-Coenzym A-Synthetase in *E. coli* zu synthetisieren, zu reinigen und in einem *in vitro* Aktivitätsassay zu verwenden.

Für den letzten Schritt der Synthese des Saccharomicin-Aglycons wurde postuliert, dass die aktivierte Kaffeesäure unter Ausbildung einer Peptidbindung mit Taurin verknüpft wird. Im *sam*-Cluster findet sich allerdings kein Gen, das für eine Peptidyl-Transferase codiert. Das Genprodukt von *sam36* zeigt Ähnlichkeiten zur Penicillinamidase SacazDRAFT\_02075 aus *Saccharomonospora azurea* NA-128 (siehe 3.2.4). Penicillinamidasen spalten die Amidbindung in Penicillinen. Die Rückreaktion, also die

Knüpfung einer Amidbindung, wird für die Synthese der Saccharomicine benötigt. Da Enzyme oft sowohl Hin- als auch Rückreaktion katalysieren können, handelt es sich bei Sam36 um das Genprodukt aus dem sam-Cluster, dass am wahrscheinlichsten für diese Reaktion verantwortlich ist.

#### 4.2.2 Der Ursprung des Taurins

Das Saccharomicin-Aglycon besteht aus Kaffeesäure und Taurin, die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind. Taurin ist eine Aminosulfonsäure, deren Biosynthese in Bakterien bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte <sup>[139]</sup>. Abbildung 4-2 zeigt die beiden Biosynthesewege, die in Eucaryonten ausgehend von L-Cystein zur Synthese von Taurin führen <sup>[6]</sup>.

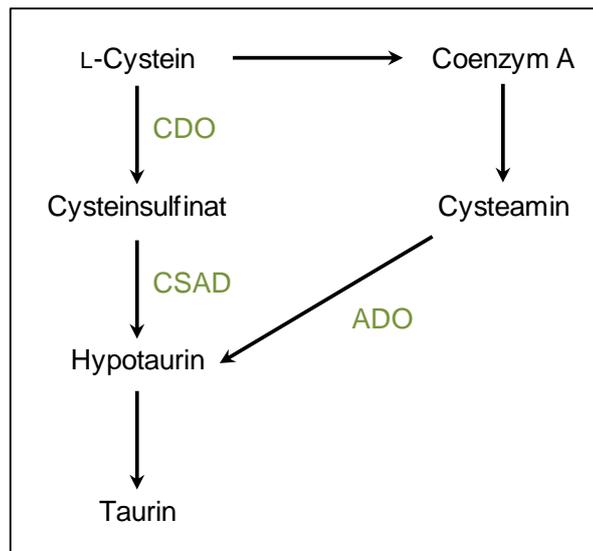


Abbildung 4-2 Biosynthese von Taurin in Eucaryonten <sup>[6]</sup>. CDO, Cysteindioxygenase; CSAD, Cysteinsulfinat-Decarboxylase; ADO, 2-Aminoethanethiol-Dioxygenase.

Die BLASTp-Ergebnisse unter 3.2.3 zeigen, dass im Genom von *S. espanaensis* die Genprodukte von *ses71790* und *ses72720* Ähnlichkeiten zu charakterisierten (SCO3035) und uncharakterisierten (Amir5989 und Amir6068) CDOs zeigen. Die Oxidation von Cystein zu Cysteinsulfinat wurde in Bakterien bereits beschrieben <sup>[139]</sup>. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass *Ses71790* und *Ses72720* in *S. espanaensis* auch für diese Reaktion verantwortlich sind. Eine CSAD konnte in Bakterien noch nicht nachgewiesen werden <sup>[139]</sup>. Die BLASTp-Analyse mit einer CSAD aus der Wanderratte zeigt, dass *S. espanaensis* CDS besitzt, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu diesem Enzym aufweisen (*ses32170*, *ses68200* und *ses23400*). Allerdings zeigen diese Genprodukte noch größere Ähnlichkeiten zu anderen Aminosäure-Decarboxylasen. Damit ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass eines dieser Enzyme für die Decarboxylierung von Cysteinsulfinat in *S. espanaensis* verantwortlich ist. Im Genom von *S. espanaensis* konnte jedoch kein Gen identifiziert werden, das für ein Enzym mit Ähnlichkeit zu einer ADO codiert. Obwohl kein Gen identifiziert werden konnte, das für eine CSAD codiert, ist durch die fehlende ADO wahrscheinlicher, dass das Taurin über Cysteinsulfinat und nicht über Cysteamin gebildet wird. Abbildung 4-3 zeigt den Biosyntheseweg des Taurins über Cysteinsulfinat mit den entsprechenden Enzymen, wie er in *S. espanaensis* ablaufen könnte.

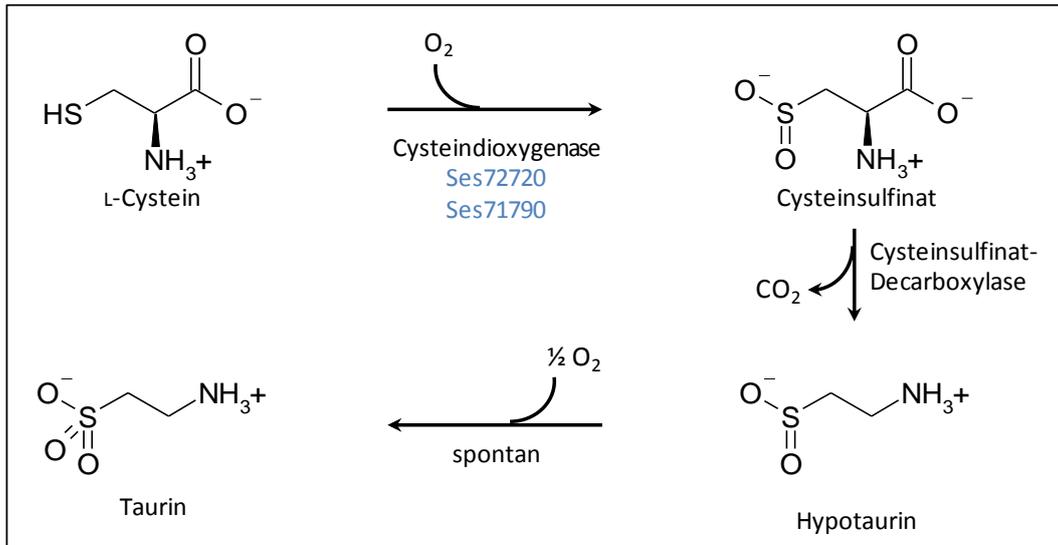


Abbildung 4-3 Putativer Biosyntheseweg des Taurins in *S. espanaensis*. Die putativen Cysteindioxygenasen aus *S. espanaensis* sind blau dargestellt.

Bei der Annotation des *sam*-Clusters ist das Gen *sam29* aufgefallen. Das Genprodukt von *sam29* zeigt Ähnlichkeiten zu Aspartat-Decarboxylasen (siehe 3.1.1). Bei der Decarboxylierung von Aspartat entsteht  $\beta$ -Alanin. In der Struktur der Saccharomicine ist aber keine  $\beta$ -Alanin-Einheit enthalten. Wie in Abbildung 4-4 dargestellt, unterscheiden sich die Strukturen von Aspartat und  $\beta$ -Alanin von Cysteinsulfinat und Hypotaurin nur im Kohlenstoffatom der Säuregruppe und im Schwefelatom der Sulfonsäure. Das Genprodukt von *sam29* zeigt zwar keine Ähnlichkeit zu CSADs aus Eucaryonten, auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der Substrate könnte Sam29 aber für die Decarboxylierung von Cysteinsulfinat statt von Aspartat verantwortlich sein. Sam29 wäre damit das erste Enzym, das in Bakterien zur Decarboxylierung von Cysteinsulfinat und damit zur Produktion von Taurin führt.

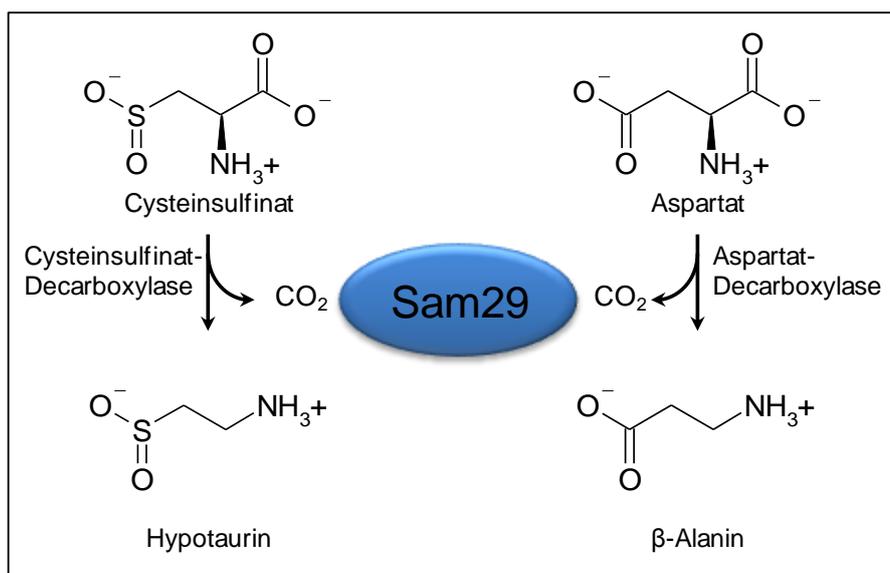


Abbildung 4-4 Vergleich der Strukturformeln von Cysteinsulfinat und Aspartat vor und nach der Decarboxylierung. Sam29 zeigt Ähnlichkeiten zu Aspartat-Decarboxylasen, könnte aber auch für die Decarboxylierung von Cysteinsulfinat verantwortlich sein.

---

### 4.3 *S. espanaensis* als Biotransformationswirt

Der Actinomycet *S. espanaensis* besitzt Biotransformationsaktivität <sup>[82]</sup>. Der Stamm kann zugefütterte Xenobiotika aufnehmen und verknüpft diese *O*-glycosidisch mit Rhamnose. Die Fütterung der Testsubstanz Alizarin führte zur Produktion der Hauptprodukte AliPro1, AliC1 und AliPro2. AliPro1 ist an der Hydroxylgruppe in Position 2 rhamnosyliert <sup>[3]</sup>. AliC1 ist an beiden OH-Gruppen mit Rhamnose verknüpft (siehe 3.3.1.3) und AliPro2 ist zusätzlich zur Rhamnosylierung an Position 2 und an Position 3 hydroxyliert und rhamnosyliert (siehe 3.3.1.2). A. Linnenbrink konnte durch die Fütterung von Emodin zeigen, dass der Stamm ebenfalls in der Lage ist, Xenobiotika mehrfach zu glycosylieren. Die Fütterung von 1-Amino-4-chloroanthrachinon und Novobiocinsäure hatte auch die Hydroxylierungsaktivität des Stamms bereits gezeigt <sup>[3]</sup>. *S. espanaensis* biotransformiert Stoffe aus verschiedensten Substanzgruppen wie Anthrachinone, Aminocumarine und Flavonoide. Da es sich bei den getesteten Substanzen um zufällig gewählte Xenobiotika handelt, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei der Biotransformation in *S. espanaensis* um eine Metabolisierung exogener Substanzen handelt <sup>[3]</sup>. Die Substanzen werden nach der Aufnahme in die Zelle teilweise funktionalisiert. Das bedeutet Substanzen wie 1-Amino-4-chloroanthrachinon, die keine OH-Gruppen besitzen, werden durch den Stamm hydroxyliert. Alle Substanzen, die freie OH-Gruppen besitzen, werden direkt mit L-Rhamnose verknüpft. Durch diese Konjugation könnte dem Stamm anschließend der aktive Auswärtstransport der nun deutlich hydrophileren Substanzen ermöglicht werden.

Zur Charakterisierung des Substratspektrums der Biotransformationsreaktion in *S. espanaensis* wurden Aminoanthrachinone gefüttert (siehe 3.3.2). Dabei sollte untersucht werden, ob der Stamm in der Lage ist *N*-glycosylierte Produkte zu generieren. Die Auswertung der HPLC/ESI-MS-Daten der Biotransformationsreaktionen zeigte die Massen von *N*-glycosylierten Produkten aller drei getesteten Aminoanthrachinone. Die Ausbeute dieser Produkte war jedoch sehr gering, so dass eine Reinigung und Strukturaufklärung dieser Produkte nicht möglich war. Bei den Hauptprodukten, die bei der Fütterung von *S. espanaensis* mit U3 und U8 detektiert wurden, handelt es sich den Massenspektren zufolge um hydroxylierte und *O*-rhamnosylierte Derivate. Damit war es nicht möglich zu beweisen, dass der Biotransformationswirt *S. espanaensis* in der Lage ist, *N*-glycosylierte Produkte zu generieren. Da der Stamm die Fähigkeit besitzt die Aminoanthrachinone mit OH-Gruppen zu funktionalisieren, wird die Bildung von *O*-Glycosiden der Bildung von *N*-Glycosiden vorgezogen. Um zu zeigen, dass auch die Bildung *N*-glycosylierter Biotransformationsprodukte möglich ist, müsste die für die Funktionalisierung verantwortliche Oxygenase im Genom von *S. espanaensis* inaktiviert werden. Ohne die Funktionalisierung könnte mehr *N*-glycosyliertes Produkt entstehen. Eine weitere Möglichkeit, um nachzuweisen, dass *N*-glycosylierte Biotransformationsprodukte generiert werden können, wäre die verantwortliche GT zu reinigen und im *in vitro* Experiment zur Glycosylierung von Aminoanthrachinonen einzusetzen.

#### 4.4 Identifizierung der flexiblen Glycosyltransferase aus *S. espanaensis*

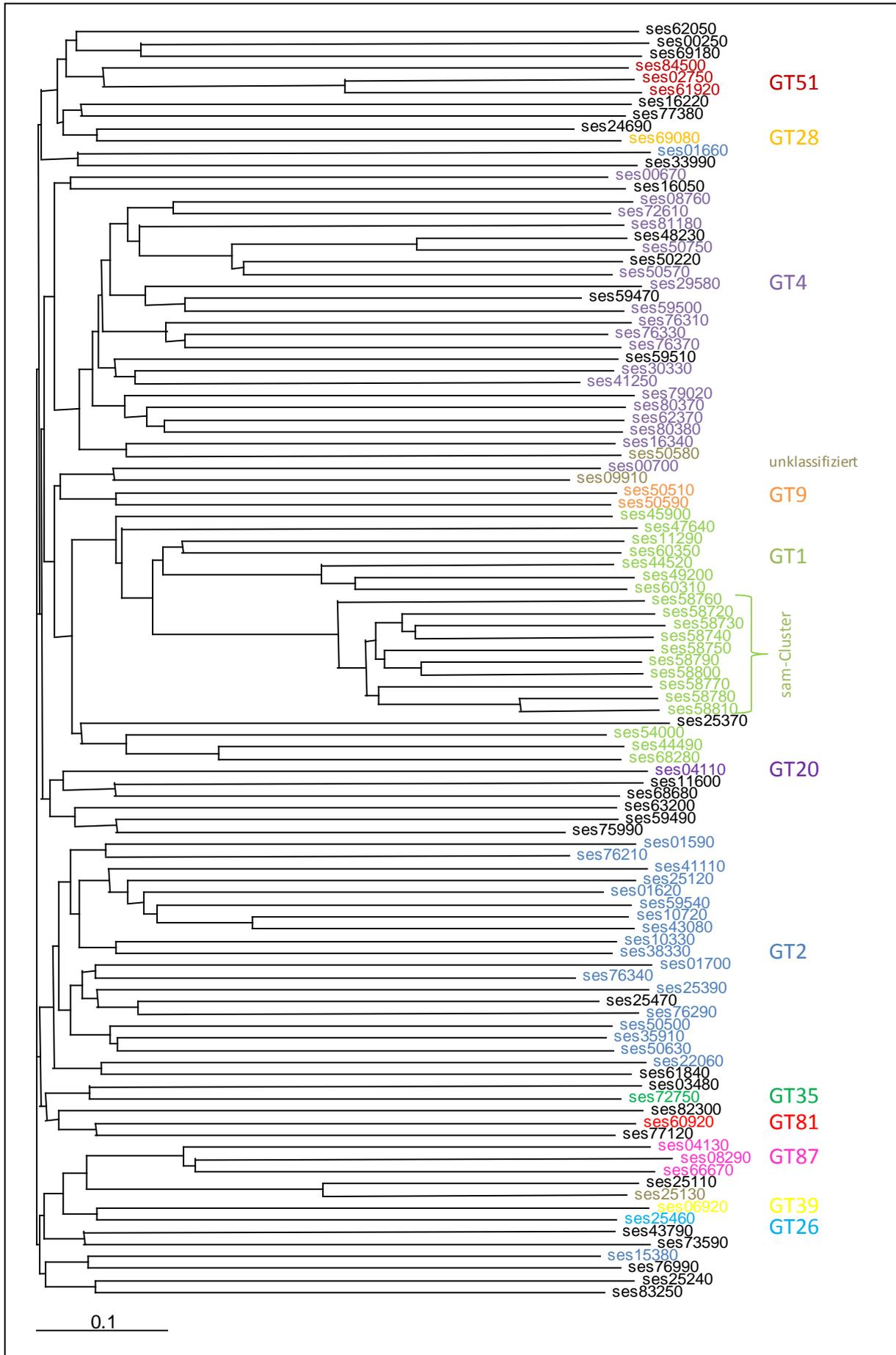
Der Actinomycet *S. espanaensis* biotransformiert zugefütterte Xenobiotika. Für die Synthese der verschiedenen glycosylierten Konjugate ist wahrscheinlich eine GT verantwortlich, die eine sehr hohe Akzeptor-Substratflexibilität aufweist. Diese Eigenschaft ist für GTs sehr selten und macht dieses Enzym zu einem vielversprechenden Forschungsobjekt. Eine flexible GT könnte zur Glycosylierung verschiedener Substrate im Rahmen der kombinatorischen Biosynthese eingesetzt werden. Weiterhin könnte sie als Werkzeug der enzymatischen Katalyse zur Glycosylierung von synthetischen Molekülen angewendet werden. Außerdem könnte die Struktur dieses Enzyms als Model für weitere flexible GTs dienen. Die Voraussetzung, um diese GT auf diesen Gebieten einsetzen zu können, ist die Identifizierung des Gens im Genom von *S. espanaensis*, das für diese GT mit geringer Substratspezifität codiert.

##### 4.4.1 Glycosyltransferasen aus *S. espanaensis*

Im Genom von *S. espanaensis* konnten 106 Gene identifiziert werden, die wahrscheinlich für GTs codieren (siehe 3.4.1). Abbildung 4-5 zeigt die evolutionären Beziehungen dieser 106 GTs zueinander in einem Phylogenetischen Baum. 76 GTs konnten einer Familie nach CAZy zugeordnet werden. Dies bedeutet, dass es sich bei diesen GTs um NDP-Hexose-Transferasen handelt. Unter den übrigen 30 GTs befinden sich zum Beispiel Ribose-Transferasen oder Enzyme, die einen Phosphat-aktivierten Zucker übertragen. Von den insgesamt 106 GTs konnten mit Hilfe der durchgeführten Sequenzanalyse 32 Enzymen keine nähere Funktion zugeordnet werden. Weitere 54 GTs sind vermutlich am Primärstoffwechsel der Zelle beteiligt. Sie sind beispielsweise verantwortlich für den Aufbau der Zellwand oder beteiligt am Aufbau der DNA. Die übrigen 20 GTs gehören zur CAZy-Familie 1. Diese Familie beinhaltet alle bekannten Sekundärstoff-GTs. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass diese GTs auch in *S. espanaensis* am bakteriellen Sekundärstoffwechsel beteiligt sind. Diese Theorie wird dadurch untermauert, dass zehn dieser GT-Gene Teil des sam-Clusters sind (*ses58720-ses58810*), zwei weitere sind Teil von Cluster 8 beziehungsweise dem lan2-Cluster (*ses45900* und *ses54000*) und weitere zwei liegen in der unmittelbaren Nähe von *tcp1* und Cluster 9 (*ses11290* und *47640*).

**Tabelle 4-3 Anzahl der GT-Gene der CAZy-Familie 1 aus *S. espanaensis* und den anderen bis Oktober 2012 vollständig sequenzierten Stämmen der Familie *Pseudonocardiaceae* <sup>[92]</sup>.**

Species	GT-Gene aus Familie 1	Bemerkung
<i>A. mirum</i> DSM 43827	10	2 Gene liegen geclustert vor
<i>A. mediterranei</i> U32	21	9 Gene liegen geclustert vor
<i>P. dioxanivorans</i> CB1190	4	---
<i>S. erythraea</i> NRRL 2338	14	2 Gene sind Teil des Erythromycin-Clusters
<i>S. espanaensis</i> DSM 44229	20	10 Gene sind Teil des sam-Clusters
<i>S. viridis</i> DSM 43017	2	---
<i>T. bispora</i> DSM 43833	---	---



---

**Abbildung 4-5 Phylogenetischer Baum der 106 GTs aus *S. espanaensis*. Der Baum wurde durch Bootstrapping<sup>[1]</sup> und den Neighbour-joining<sup>[8]</sup> Algorithmus mit dem Programm Clustal X2 generiert. Die GT-Gene, die keiner Familie nach CAZy zugeordnet sind, sind schwarz dargestellt. Die Zugehörigkeit der GT-Gene zu den verschiedenen GT-Familien nach CAZy ist farbig dargestellt. Die Gene des sam-Clusters sind markiert.**

Tabelle 4-3 zeigt die GT-Gene der CAZy-Familie 1 aller vollständig sequenzierten Stämme, die zur Familie der *Pseudonocardiaceae* gehören. In den Genomen von *P. dioxanivorans*, *S. viridis* und *T. bispora* sind wenige bis gar keine GT-Gene der CAZy-Familie 1 vorhanden. Diese Beobachtung scheint logisch, da diese Genome auch weniger Sekundärstoff-Cluster besitzen als die übrigen vollständig sequenzierten *Pseudonocardiaceae*. *S. espanaensis* und *A. mediterranei* besitzen mit 20 und 21 die meisten GT-Gene der Familie 1. Im Genom von *S. espanaensis* befindet sich das sam-Cluster, das allein 10 GT-Gene beinhaltet. Auch im Genom von *A. mediterranei* ist ein bisher uncharakterisiertes Cluster enthalten, das 9 GT-Gene besitzt. Abzüglich der GT-Gene dieser beiden außergewöhnlich GT-Gen-reichen Cluster besitzen die Stämme *A. mirum*, *A. mediterranei*, *S. erythraea* und *S. espanaensis* eine vergleichbare Menge von 10 bis 14 GT-Genen der CAZy-Familie 1.

#### 4.4.2 Sequenzanalysen zur Identifizierung der gesuchten GT

Die gesuchte GT aus *S. espanaensis* überträgt Rhamnose auf ein exogenes Substrat. Dieser Vorgang ist für das Überleben der Bakterienzelle sehr wahrscheinlich nicht essentiell. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass es sich bei dem gesuchten Enzym um eine GT aus dem Sekundärstoffwechsel von *S. espanaensis* handelt. Für den bakteriellen Sekundärstoffwechsel werden die GTs aus der CAZy-Familie 1 verantwortlich gemacht. Somit enthält das Genom von *S. espanaensis* 20 Gene, von denen zumindest eines mit hoher Wahrscheinlichkeit für die gesuchte GT codiert (siehe 3.4.1).

Unter den 20 GT-Genen, die für GTs der CAZy-Familie 1 codieren, finden sich alle zehn Gene des sam-Clusters. Die gesuchte GT überträgt stets L-Rhamnose auf verschiedene Akzeptor-Substrate. Saccharomicin A besitzt zwei, Saccharomicin B eine Rhamnose-Einheit pro Molekül<sup>[10]</sup>. Diese Rhamnose-Bausteine sind Teil der Zuckerkette. Die GT der Saccharomicin-Biosynthese überträgt Rhamnose auf Fucose, also ebenfalls einen Zucker. Die Akzeptor-Substrate der gesuchten GT sind aber niedermolekulare Substanzen. Aus diesem Grund ist es unwahrscheinlich, dass eine GT aus dem sam-Cluster für die Biotransformationsaktivität von *S. espanaensis* verantwortlich ist. Da sie jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnten, wurden sie ebenfalls den weiteren Sequenzanalysen unterzogen.

Die 20 GTs der CAZy-Familie 1 wurden auf Sequenzhomologien zu ElmGT und OleD untersucht (siehe 3.4.1). ElmGT wurde gewählt, da dieses Enzym L-Rhamnose auf das Elloramycin-Aglycon überträgt. Dieses Aglycon besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu den Substanzen, die von der gesuchten GT üblicherweise als Substrat akzeptiert werden. Für OleD aus *Streptomyces antibioticus* konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym verschiedene Akzeptor-Substrate akzeptiert<sup>[107-110]</sup>. Durch die BLASTp-Analyse mit OleD sollte gezielt nach flexiblen GTs gesucht werden. Es wurde erwartet, dass

---

das gesuchte Enzym, verglichen mit den übrigen GTs der Familie 1, wenigstens zu einer dieser beiden GTs eine deutlich größere Ähnlichkeit aufweist. Drei der überprüften GTs aus *S. espanaensis* zeigen keine Ähnlichkeit zu OleD (Ses44490, Ses54000 und Ses68280), eine davon (Ses44490) zeigt auch keine Ähnlichkeit zu ElmGT. Die übrigen 17 GTs zeigen eine relative Ähnlichkeit zu ElmGT von unter 15 %. Ses47640 zeigt den höchsten relativen Score für den Vergleich mit OleD. In *Streptomyces antibioticus* ist OleD für die Glycosylierung von exogenen Makroliden verantwortlich. Das GT-Gen *ses47640* liegt ganz in der Nähe des Typ I PKS-Clusters 9. Da dieses Cluster wahrscheinlich auch für die Produktion eines Makrolids verantwortlich ist, haben diese beiden GTs vermutlich ähnliche Substrate. Die größere Sequenz-Ähnlichkeit von Ses47640 zu OleD liegt also möglicherweise nicht an der Flexibilität der Enzyme, sondern ist wahrscheinlich auf die strukturelle Ähnlichkeit der Substrate zurückzuführen.

Die durchgeführte Sequenzanalyse konnte die Gruppe der Gene, die möglicherweise für die gesuchte GT mit geringer Substratspezifität codieren, nicht weiter eingrenzen. Die gesuchte GT zeigt keine größere Sequenz-Ähnlichkeit zu ElmGT und OleD, obwohl auf Grund der vergleichbaren Eigenschaften dieser Enzyme eine erhöhte Ähnlichkeit erwartet wurde. Das bedeutet, dass die gesuchte GT möglicherweise noch weitere Eigenschaften hat, die bei dieser Suche nicht berücksichtigt wurden. Auf Grund von fehlenden Informationen, die eine weitere Suche auf Sequenzbasis ermöglicht hätten, musste die Suche der flexiblen GT experimentell weitergeführt werden. Die 20 GT-Gene der CAZY-Familie 1 kamen theoretisch noch immer alle in Frage. Die drei GTs ohne Ähnlichkeit zu OleD (Ses44490, Ses54000 und Ses68280) und die GTs aus dem sam-Cluster wurden für weniger wahrscheinlich erachtet, sodass die anderen 7 GT zuerst für die experimentelle Überprüfung gewählt wurden.

### **4.4.3 Experimentelle Identifizierung der flexiblen GT aus *S. espanaensis***

#### **4.4.3.1 Inaktivierung von *ses44520*, *ses45900*, *ses47640* und *ses49200***

Zur Identifizierung des Gens, das in *S. espanaensis* für die GT mit geringer Substratspezifität codiert, wurden Geninaktivierungsexperimente durchgeführt. Die GT-Gene *ses44520*, *ses45900*, *ses47640* und *ses49200* wurden durch eine Insertionsmutagenese mit Hilfe eines Doppelcrossovers inaktiviert. Dabei wurden die Mutanten *S. espanaensis*  $\Delta 6130$ , *S. espanaensis*  $\Delta 6266$ , *S. espanaensis*  $\Delta 6449$  und *S. espanaensis*  $\Delta 6609$  generiert (siehe 3.4.2.1, 3.4.2.2, 3.4.2.3 und 3.4.2.4). Diese Mutanten zeigten nach der Fütterung mit Alizarin im Chromatogramm der HPLC/ESI-MS-Analyse des Rohextrakts dieselben Biotransformationsprodukte wie die Fütterung des *S. espanaensis* Wildtyps.

Die Inaktivierung der in Frage kommenden Zielgene und die anschließende Fütterung der entstandenen Mutanten ist ein sehr aussagekräftiges Verfahren zur Identifizierung der gesuchten GT. Wäre die erhaltene Mutante nicht mehr in der Lage die zugefütterte Testsubstanz Alizarin zu glycosylieren, wäre eindeutig nachgewiesen, dass nur dieses Gen für die gesuchte GT codiert. Da die erhaltenen Mu-

---

tanten Alizarin wie gewohnt glycosylierten, konnte gezeigt werden, dass diese GT-Gene nicht für die gesuchte GT codieren. Der Nachteil dieses Verfahrens ist der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand auf Grund der relativ schwierigen genetischen Zugänglichkeit von *S. espanaensis*. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der übrigen in Frage kommenden Zielgene ein heterologes Testsystem entwickelt.

#### **4.4.3.2 Identifizierung der gesuchten GT mit Hilfe eines Heterologen Testsystems**

Das Gen, das im Genom von *S. espanaensis* für die GT mit geringer Substratspezifität codiert, sollte experimentell ermittelt werden. Der bisherige Ansatz, das gesuchte Gen mittels Geninaktivierung zu identifizieren, hatte sich als sehr zeitaufwendig erwiesen. Aus diesem Grund wurde ein heterologes Testsystem zur schnelleren Untersuchung der in Frage kommenden Gene entwickelt. Als heterologer Wirt wurde *S. albus* verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch sein schnelles Wachstum und seine einfache Konjugierbarkeit aus. Salas *et al.* haben bereits mehrfach GTs in diesem Stamm erfolgreich charakterisiert <sup>[5,13,100]</sup>. Da der für die Glycosylierung notwendige aktivierte Desoxyzucker dTDP-Rhamnose von *S. albus* nicht produziert wird, wurde die Mutante *S. albus* Rham erstellt. In diese Mutante wurden die dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene unter der Kontrolle des ermE\*-Promotors ins Genom integriert (siehe 3.4.3.1). Bei der Fütterung dieser Mutante mit Alizarin wurden keine glycosylierten Biotransformationsprodukte detektiert. Damit wurde gezeigt, dass der Stamm *S. albus* Rham selbst keine GT besitzt, die Alizarin glycosylieren kann. Diese Mutante konnte also für die Untersuchung von *ses11290*, *ses60310* und *ses60350*, die möglicherweise für die gesuchte GT codieren, verwendet werden.

Die Gene *ses11290*, *ses60310* und *ses60350* wurden in *S. albus* Rham exprimiert (siehe 3.4.3.2, 3.4.3.3 und 3.4.3.4). Die Mutanten *S. albus* Rham x pUWL-A-698, *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 und *S. albus* Rham x pUWL-A-7668 wurden mit der Testsubstanz Alizarin gefüttert. Die Chromatogramme der HPLC/ESI-MS-Analysen der Rohextrakte zeigen, dass für die Fütterung von *S. albus* Rham x pUWL-A-698 und *S. albus* Rham x pUWL-A-7668 keine Biotransformationsprodukte erhalten wurden. Für die Fütterung von *S. albus* Rham x pUWL-A-7665 wurden glycosylierte Produkte detektiert. Damit konnte nachgewiesen werden, dass das heterologe Testsystem funktioniert und dass die GT *Ses60310* Alizarin glycosylieren kann. Da das System funktioniert, die Expression von *ses11290* und *ses60350* aber zu Mutanten führt, die Alizarin nicht glycosylieren können, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Gene auch in *S. espanaensis* nicht für die Biotransformationsreaktion verantwortlich sind. Die Beobachtungen, die mit dem heterologen Testsystem gemacht wurden, sind auf *S. espanaensis* nicht direkt übertragbar, da es sich in beiden Stämmen um zwei verschiedene molekularbiologische Umgebungen handelt. Um zu beweisen, dass ausschließlich die GT *Ses60310* in *S. espanaensis* für die Biotransformationsreaktion verantwortlich ist, musste die Funktion des Genprodukts von *ses60310* in *S. espanaensis* mittels Geninaktivierung und anschließender Fütterung der erhaltenen Mutante überprüft werden.

#### **4.4.3.3 Inaktivierung von *ses60310* in *S. espanaensis* und Komplementierung**

Zum Nachweis, dass die GT *Ses60310* für die Biotransformationsreaktion verantwortlich ist, wurde das Gen *ses60310* in *S. espanaensis* inaktiviert. Durch eine Insertionsmutagenese mit Hilfe eines Doppelcrossovers wurde die Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  generiert (siehe 3.4.4.1). Die Fütterung dieser Mutante mit Alizarin zeigte im Vergleich zur Fütterung des Wildtyps im HPLC/ESI-MS-Diagramm ein verändertes Biotransformationsprofil (siehe Abbildung 3-27). Die glycosylierten Produkte AliPro1 und AliPro2 wurden von der Mutante nur noch in sehr geringen Mengen gebildet, AliC1 war nicht mehr detektierbar. Die Komplementierung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit pSET-7665 zeigte im Fütterungsexperiment eine Biotransformationsaktivität vergleichbar zu der des Wildtyps (siehe Abbildung 3-28). Die im Vergleich zur Fütterung des Wildtyps deutlich geringere detektierte Menge an glycosylierten Alizarinderivaten im Rohextrakt von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  gefüttert mit Alizarin lässt darauf schließen, dass es sich bei dem inaktivierten GT-Gen *ses60310* um das Gen handelt, dessen Genprodukt für die Glycosylierung von Alizarin verantwortlich ist. Die minimale Aktivität, die zur Produktion einer geringen Menge an glycosylierten Produkten führt, stammt wahrscheinlich von einer anderen viel weniger produktiven GT. Die Hauptaktivität geht aber eindeutig von *Ses60310* aus. Da die Komplementierung der *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ -Inaktivierungsmutante mit dem GT-Gen *ses60310* zur Wiederherstellung der Biotransformationsaktivität der Mutante führte, ist eindeutig nachgewiesen, dass es sich bei dem Gen *ses60310* um das für die bei der Inaktivierung beobachtete Aktivitätsänderung verantwortliche GT-Gen handelt. Polare Effekte, die bei der Inaktivierung des Gens *ses60310* durch Insertion eines Spectinomycinresistenzgens und einem *oriT* entstehen könnten, konnten als mögliche Ursache für den Verlust der Biotransformationsaktivität der *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ -Mutante ausgeschlossen werden. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die GT *Ses60310* für die beobachtete Biotransformation von Alizarin in *S. espanaensis* verantwortlich ist.

#### **4.4.3.4 Nachweis der Flexibilität von *Ses60310***

Durch die Fütterung der Inaktivierungsmutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  und der Komplementierungsmutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 mit Alizarin, konnte gezeigt werden, dass die GT *Ses60310* für die Glycosylierung der Testsubstanz verantwortlich ist. Um zu zeigen, dass es sich bei *Ses60310* um die gesuchte GT mit geringer Substratspezifität handelt, wurden die verschiedenen Substrate, die von *S. espanaensis* üblicherweise biotransformiert werden, ebenfalls diesen Mutanten gefüttert (siehe 3.4.4.4). Bei dem Fütterungsexperiment von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit Emodin und Novobiocinsäure wurden keine glycosylierten Biotransformationsprodukte detektiert. Bei der Fütterung dieser Mutante mit Quercetin wurde ähnlich der Fütterung mit Alizarin auch nur eine kleine Menge an glycosyliertem Quercetin erhalten. Die Synthese dieses glycosylierten Produkts ist wahrscheinlich auch auf eine andere GT mit deutlich weniger Aktivität zurückzuführen. Die Fütterung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  x pSET-7665 mit Emodin und Quercetin führte zur Synthese der Biotransformationsprodukte, die auch für die Fütterung des *S. espanaensis* Wildtyps erhalten werden. Für die Fütterung der Komplementierungsmutante mit Novobiocinsäure wurden keine glycosylierten Biotransformationsprodukte erhalten.

---

Es ist möglich, dass es sich dabei um eine einmalige Beobachtung handelt. Diese Fütterung konnte jedoch nicht wiederholt werden, da keine Novobiocinsäure mehr vorhanden war. Die Substanz sollte also zukünftig neu synthetisiert und erneut gefüttert werden. Die übrigen Ergebnisse zeigen alle, dass das Gen *ses60310* für die gesuchte flexible GT aus *S. espanaensis* codiert.

#### 4.5 Neue Biotransformationsprodukte im heterologen Testsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Gen *ses60310* für eine GT codiert, die für die Biotransformation exogener Substrate in *S. espanaensis* verantwortlich ist (siehe 3.4.4.1, 3.4.4.2 und 3.4.4.4). Die Expression dieses GT-Gens im heterologen Testsystem *S. albus* Rham hatte zu einer Mutante geführt, die die gefütterte Testsubstanz Alizarin glycosylierte (siehe 3.4.3). Neben dem Hauptprodukt AliPro1, das aus der Fütterung des *S. espanaensis*-Wildtyps bereits bekannt war, wurde ein neues glycosyliertes Produkt detektiert. Bei diesem neuen Produkt handelt es sich um das 2-*O*- $\alpha$ -L-Olivosylalizarin AliProN (siehe 3.4.3.5). Damit konnte gezeigt werden, dass die GT Ses60310 aus *S. espanaensis* nicht nur den Desoxyzucker L-Rhamnose, sondern auch den Didesoxyzucker L-Olivose übertragen kann. Dies bedeutet, dass die GT nicht nur in der Wahl des Akzeptor-Substrats flexibel ist, sondern auch verschiedene Zuckerdonatoren akzeptiert. Unter den Sekundärstoff-GTs gibt es Vertreter wie ElmGT<sup>[100,174,175]</sup> und GtfE,<sup>[103]</sup> die viele verschiedene Zucker übertragen können. Diese Flexibilität ist aber nicht die Regel. Für die GT NovM des Novobiocin-Cluster aus *Streptomyces caeruleus* (früher *Streptomyces spheroides*) konnte eine hohe Zuckerdonator-Spezifität gezeigt werden<sup>[100,176]</sup>. Die beiden Zucker, die von Ses60310 akzeptiert werden, unterscheiden sich nur minimal. L-Rhamnose besitzt an C2 eine OH-Gruppe, die in L-Olivose nicht vorhanden ist. Auf Grund dieser großen Ähnlichkeit kann keine Aussage über den Grad der Zuckerdonator-Flexibilität von Ses60310 getroffen werden. Es wäre möglich, dass die GT nur diese beiden sehr ähnlichen Zucker übertragen kann. Um zu zeigen, dass es sich um eine GT mit geringer Zuckerdonator-Spezifität handelt, müssen weitere Experimente durchgeführt werden bei denen dem Enzym verschiedene Zuckerdonatoren zur Verfügung gestellt werden, wie Zucker der D-Reihe, Amino- oder Ketozucker.

Für das heterologe Testsystem wurden nur die dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene ins Genom von *S. albus* integriert. Die aktivierte L-Olivose, die zur Synthese von AliProN benötigt wird, wurde aber ebenfalls von *S. albus* Rham produziert. Um zu untersuchen, ob der *S. albus* Wildtyp aktivierte Olivose synthetisieren kann, wurde das GT-Gen *ses60310* in *S. albus* exprimiert. Die erhaltene Mutante zeigte im Fütterungsexperiment mit Alizarin keine Biotransformationsprodukte (siehe 3.4.3.6). Das bedeutet, dass kein aktivierter Zucker zur Verfügung stand, der im Fütterungsexperiment übertragen werden konnte. Damit wurde gezeigt, dass der Wildtyp selbst die dTDP-L-Olivose nicht vollständig synthetisieren kann. An der Synthese der aktivierten Olivose in *S. albus* Rham sind demnach auch die Gene der dTDP-Rhamnose-Biosynthese beteiligt. Für das heterologe Testsystem wurden die dTDP-L-Rhamnose-Biosynthesegene *oleS*, *oleE*, *oleL* und *oleU* in das Genom von *S. albus* integriert. Rodriguez *et al.* haben gezeigt, dass die Expression dieser Gene in *S. albus* zur Synthese von dTDP-Rhamnose

führt<sup>[5]</sup>. Ursprünglich stammen diese Gene jedoch aus dem Oleandomycin-Cluster von *Streptomyces antibioticus* ATCC11891. Zusammen mit dem 2,3-Dehydratasegen *oleV*, dem 3-Ketoreduktasegen *oleW* und dem Methyltransferasegen *oleY* sind sie dort für die Synthese von einer aktivierten 3-*O*-Methylolivose namens Oleandrose verantwortlich<sup>[13]</sup>. Abbildung 4-6 zeigt den Biosyntheseweg von Glucose-1-phosphat zu dTDP-L-Rhamnose und dTDP-L-Olivose. Für die Synthese von dTDP-Olivose sind im Genom von *S. albus* wahrscheinlich zwei Gene vorhanden, die für Enzyme mit Homologie zu *OleV* und *OleW* codieren. In der Shotgun-Sequenz<sup>[177]</sup> von *S. albus* konnte das Gen *sshg\_05325* identifiziert werden, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu *OleV* aufweist. Beide Enzyme teilen 46 % identische und 61 % ähnliche Aminosäuren. Ein Gen, dessen Produkt Ähnlichkeit zu *OleW* aufweist, wurde nicht identifiziert. Bis zur vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. albus* bleibt also unklar, ob dieser Stamm ein Enzym mit Homologie zu *OleW* besitzt. Fest steht jedoch, dass der Stamm Enzyme besitzt, die die Funktion einer 2,3-Dehydratase und einer 3-Ketoreduktase übernehmen können.

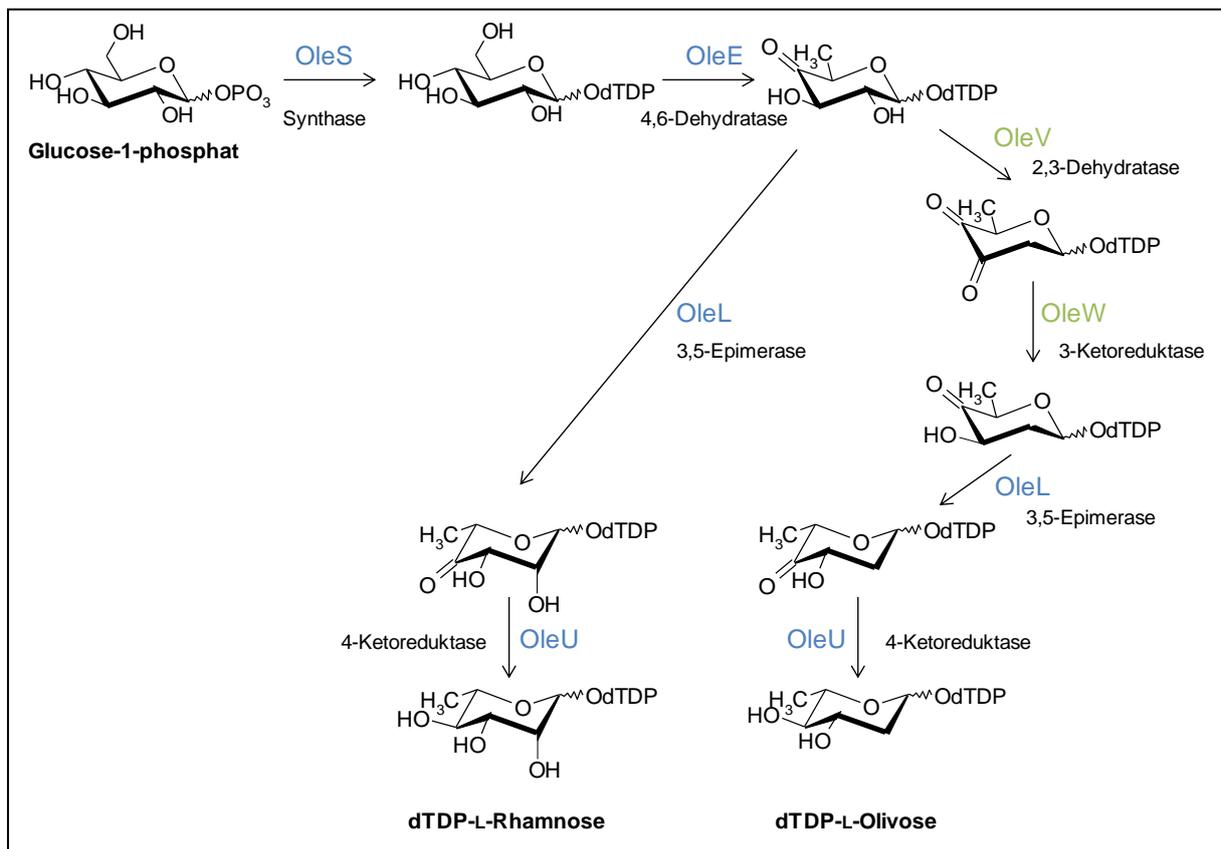


Abbildung 4-6 Biosyntheseweg von Glucose-1-phosphat zu dTDP-L-Rhamnose und dTDP-L-Olivose nach<sup>[5]</sup> und<sup>[13]</sup>. Die Enzyme, die an der Synthese beider Produkte beteiligt sind, sind blau dargestellt. Die Enzyme, die nur an der Synthese von dTDP-L-Olivose beteiligt sind, sind grün dargestellt.

Die Tatsache, dass die Mutante *S. albus* Rham dTDP-L-Rhamnose und dTDP-L-Olivose gleichzeitig produzieren kann, zeigt, dass die Gene, die für die 2,3-Dehydratase und die 3-Ketoreduktase codieren, weniger transkribiert und/oder deren mRNA weniger translatiert werden als die Gene, die zur Synthese von dTDP-L-Rhamnose ins Genom integriert wurden. *S. albus* Rham produziert mit Hilfe der En-

zyme OleS und OleE einen Überschuss an dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose, der durch die vorhandene Menge an 2,3-Dehydratase und 3-Ketoreduktase vermutlich nicht vollständig zu dTDP-4-Keto-2,6-desoxyglucose umgewandelt werden kann. Die Menge an gebildetem OleL reicht aus, um die dTDP-4-Keto-2,6-desoxyglucose und die überschüssige dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose zu epimerisieren. Die beiden Produkte werden von OleU reduziert, sodass sowohl dTDP-L-Olivose als auch dTDP-L-Rhamnose gebildet wird. Um im heterologen Testsystem nur dTDP-L-Rhamnose zu produzieren, müssten zusätzlich zur Expression der Rhamnose-Biosynthesegene *oleS*, *oleE*, *oleL* und *oleU* die Gene, die für die 2,3-Dehydratase und die 3-Ketoreduktase codieren, im Genom von *S. albus* inaktiviert werden. Erst dann würden die Expression von *ses60310* und die anschließende Xenobiotika-Fütterung nur zu rhamnosylierten Derivaten führen. Sollen mehr olivosylierte Biotransformationsprodukte erhalten werden, müssen Gene, die für die 2,3-Dehydratase und die 3-Ketoreduktase codieren, überexprimiert werden.

#### 4.6 Neue Biotransformationsprodukte in *S. espanaensis* $\Delta 7665$

Die flexible GT Ses60310 ist an der Biotransformation von Xenobiotika in *S. espanaensis* beteiligt. Durch die Inaktivierung des GT-Gens *ses60310* im Genom von *S. espanaensis* entstand die Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$ . Diese Mutante zeigte im Fütterungsexperiment mit Alizarin nur eine sehr geringe Menge an glycosylierten Biotransformationsprodukten (siehe 3.4.4.1). Die Testsubstanz wurde aber trotz der fehlenden GT biotransformiert. Im Fütterungsexperiment zeigt *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  deutlich mehr hydroxyliertes Alizarin als der Wildtyp. *S. espanaensis* funktionalisiert Alizarin zwar ebenfalls mit einer OH-Gruppe, dieses Anthragallol wird aber durch die GT Ses60310 nahezu vollständig zu AliPro2 umgesetzt. Durch die fehlende GT wird deshalb für die Fütterung der Inaktivierungsmutante mehr hydroxyliertes Derivat detektiert als für die des Wildtyps. Für die Fütterung von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit Alizarin wurde noch ein weiteres Biotransformationsprodukt erhalten, das bei der Fütterung des Wildtyps nie detektiert wurde. Dabei handelt es sich um das 2-O-Methylanthragallol AliPro4 (siehe 3.4.4.3). Das Alizarin wurde hydroxyliert und da die erhaltene Substanz durch das Fehlen der GT Ses60310 in der Inaktivierungsmutante nicht glycosyliert werden konnte, wurde sie methyliert.

A. Linnenbrink hat die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der Biotransformation in *S. espanaensis* um die Metabolisierung von Xenobiotika handelt, die anschließend zur Eliminierung dieser potentiell schädlichen Fremdstoffe führt <sup>[3]</sup>. Die beobachtete Hydroxylierung hatte er dem Phase-I-Metabolismus zugeschrieben. Durch diese Reaktion werden in lipophile Fremdstoffmoleküle funktionale Gruppen eingeführt, die die Wasserlöslichkeit des Moleküls steigern und es gegebenenfalls für Phase-II-Reaktionen aktivieren. Die Glycosylierung der Xenobiotika stellt seiner Ansicht nach einen Teil des Phase-II-Metabolismus in *S. espanaensis* dar. Das Fremdstoffmolekül wird dabei mit einem polaren Zucker konjugiert. Durch diese Verknüpfung steigt die Wasserlöslichkeit des Xenobiotikums erheblich an, sodass die Substanz aus der Zelle transportiert werden kann. Diese Theorie wird durch die

---

Entdeckung eines methylierten Alizarin-Derivats unterstützt: Nachdem die Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  keine Möglichkeit besitzt, das gefütterte Alizarin zu glycosylieren, wird die Substanz methyliert. Am humanen Phase-II-Metabolismus sind neben einer Glucuronosyltransferase auch Methyltransferasen, wie beispielsweise die Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT), beteiligt <sup>[178]</sup>. Bei der beobachteten Methylierung handelt es sich also ebenfalls um eine Phase-II-Reaktion, die dazu beiträgt, dass das Alizarin entweder in eine für die Zelle unschädliche Form transformiert wird, oder um dessen Export zu erleichtern. Da methylierte Produkte im Fütterungsexperiment des *S. espanaensis* Wildtyp nicht detektiert wurden, handelt es sich bei der Glycosylierung scheinbar um den bevorzugten Metabolisierungsvorgang. Der Phase-I-Metabolit Anthragallol wird demnach nur methyliert, wenn eine Glycosylierung nicht möglich ist. Für die Fütterungsexperimente von *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  mit anderen Xenobiotika wurden keine methylierten Biotransformationsprodukte detektiert. Diese Xenobiotika und deren Phase-I-Metabolite sind für die Bakterienzelle möglicherweise weniger toxisch. Brown und Brown konnten in *Salmonella thyphimurium* nachweisen, dass Anthragallol direkte Frameshift-Mutationen induzieren kann <sup>[179]</sup>. Auf Grund der planaren Struktur und den drei benachbarten Hydroxylgruppen könnte Anthragallol in die DNA des Bakteriums interkalieren und so zu Mutationen führen. Eine Detoxifikation des Phase-I-Metabolits von Alizarin könnte demnach für *S. espanaensis* essentiell sein.

#### 4.7 Sequenzanalyse von *ses60310* und der umliegenden Gene

Die GT *Ses60310* ist für die Biotransformation von exogenen Substanzen in *S. espanaensis* verantwortlich. Zur Identifizierung des Gens, das für diese GT codiert, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt, die die Gruppe der in Frage kommenden Gene eingrenzen sollte. Es hat sich herausgestellt, dass es sich bei der gesuchten GT wie erwartet um eine GT der CAZy-Familie 1 handelt. Außerdem wurde die Hypothese bestätigt, dass das gesuchte GT-Gen nicht Teil des *sam*-Clusters ist. Das GT-Gen *ses60310* liegt im Genom von *S. espanaensis* mehr als 110 kb von jedem anderen Cluster entfernt.

Vier Gene upstream von *ses60310* liegt mit *ses60350* ein weiteres GT-Gen der CAZy-Familie 1 (siehe 3.4.4.5). Im heterologen Testsystem hat die Expression dieses Gens nicht zu einer Mutante geführt, die Alizarin glycosylieren konnte (siehe 3.4.3.3). Trotz der Nähe zu *ses60310* ist es deshalb unwahrscheinlich, dass *ses60350* an der Biotransformation von Xenobiotika in *S. espanaensis* beteiligt ist. Die Gene, die im Genom von *S. espanaensis* in der direkten Umgebung von *ses60310* liegen, sind vermehrt am Zucker-Metabolismus der Zelle beteiligt. Diese Gene codieren für Enzyme des GntI-Metabolismus und einen Zucker-abhängigen Regulator (siehe 3.4.4.5). Es gibt jedoch keinen Hinweis darauf, dass diese Enzyme an der Biotransformationsreaktion in *S. espanaensis* beteiligt sind oder diese in irgendeiner Weise beeinflussen können. Das einzige Gen, das möglicherweise einen Einfluss auf die Transkription von *ses60310* hat, ist das Gen *ses60300*. Dieses Gen liegt direkt vor dem Gen *ses60310* und wird in die entgegengesetzte Richtung transkribiert. Das Genprodukt von *ses60300* zeigt Ähnlichkeiten zu Regulatoren der ArsR-Familie. Diese Regulatoren-Familie stammt vom Regulator

---

des Arsen-Resistenz-Operons aus *E. coli* ab <sup>[180]</sup>. Vertreter dieser Familie regulieren Metall-abhängig die Transkription von Genen, die in der Zelle zur Aufnahme, Abgabe oder Entgiftung von Metallen führen. Es wäre möglich, dass das Genprodukt von *ses60300* entsprechend für die Xenobiotika-abhängige Transkription des GT-Gens *ses60310* verantwortlich ist. Dass die Gene nicht in einem Operon liegen, sondern in entgegengesetzter Richtung transkribiert werden, sollte darauf keinen Einfluss haben. Kim *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivierung der Transkription des Regulatorgens *antR* in *Pseudomonas aeruginosa* zur Aktivierung der Transkription des entgegengesetzt gerichteten Gens *antA* führt <sup>[181]</sup>.

Die BLASTp-Analyse von *Ses60310* hat ergeben, dass diese GT die größte Ähnlichkeit zu *Ses49200*, einer anderen GT aus *S. espanaensis* aufweist (siehe 3.4.4.5). Die Fütterung der Mutante *S. espanaensis*  $\Delta 6609$ , bei der das GT-Gen *ses49200* inaktiviert wurde, zeigte keinen Unterschied zur Fütterung des *S. espanaensis* Wildtyps (siehe 3.4.2.4). Damit konnte keine Beteiligung von *Ses49200* an der Biotransformationsaktivität in *S. espanaensis* gezeigt werden. Es wäre aber möglich, dass dieses Gen für eine deutlich weniger aktive Variante dieser Xenobiotika-metabolisierenden GT codiert. Die Inaktivierung hätte dann im Fütterungsexperiment zu einem nicht detektierbaren Aktivitätsverlust geführt, da die GT *Ses60310* für die Hauptaktivität verantwortlich ist. Für den Fall, dass die GT *Ses49200* tatsächlich eine weniger aktive Variante von *Ses60310* ist, katalysiert diese GT möglicherweise auch die in *S. espanaensis*  $\Delta 7665$  detektierte Produktion der geringen Menge an glycosylierten Biotransformationsprodukten (3.4.4.1). Um diesen Zusammenhang nachzuweisen, müsste eine *S. espanaensis*-Doppelmutante generiert werden, in der die beiden GT-Gene *ses60310* und *ses49200* inaktiviert sind. Diese Mutante dürfte dann im Fütterungsexperiment überhaupt keine glycosylierten Biotransformationsprodukte mehr zeigen. Es besteht aber ebenfalls die Möglichkeit, dass die GT *Ses49200* nicht in die Biotransformationsreaktion eingreifen kann, weil das Gen *ses49200* nicht transkribiert wird. Um das herauszufinden sollte eine Transkriptionsanalyse von *ses49200* durchgeführt werden.

Die uncharakterisierte GT *SACE\_2010* aus *S. erythraea* zeigt die zweitgrößte Ähnlichkeit zu *Ses60310* und ist damit die GT mit größter Ähnlichkeit aus einem anderen Organismus. Unter den GTs, deren native Funktion aufgeklärt ist, besitzt *CalG1* aus dem Calicheamicin-Cluster von *Micromonospora echinospora* ssp. *chalichensis* die größte Ähnlichkeit zu *Ses60310*. Bei Calicheamicin handelt es sich um ein Cytostatikum mit Endiin-Struktur <sup>[141]</sup>. Im Genom von *S. espanaensis* konnte mit dem NRPS/PKS-Hybrid-Cluster 6 ebenfalls ein potentielles Endiin-Cluster identifiziert werden (siehe 3.1.2.4). Es ist also möglich, dass die GT *Ses60310* für die Glycosylierung von Endiinen vorgesehen ist. Da die GT nicht mit den Endiin-Biosynthesegenen geclustert vorliegt, ist sie vermutlich nicht direkt für die Synthese des Endiins verantwortlich. Vergleichbar mit *OleD* aus *Streptomyces antibioticus* könnte die GT für die Metabolisierung externer Endiine verantwortlich sein. *OleD* liegt ebenfalls außerhalb des Oleandomycin-Clusters, ist aber für die Inaktivierung von externen Makroliden in *Streptomyces antibioticus* verantwortlich <sup>[107]</sup>.

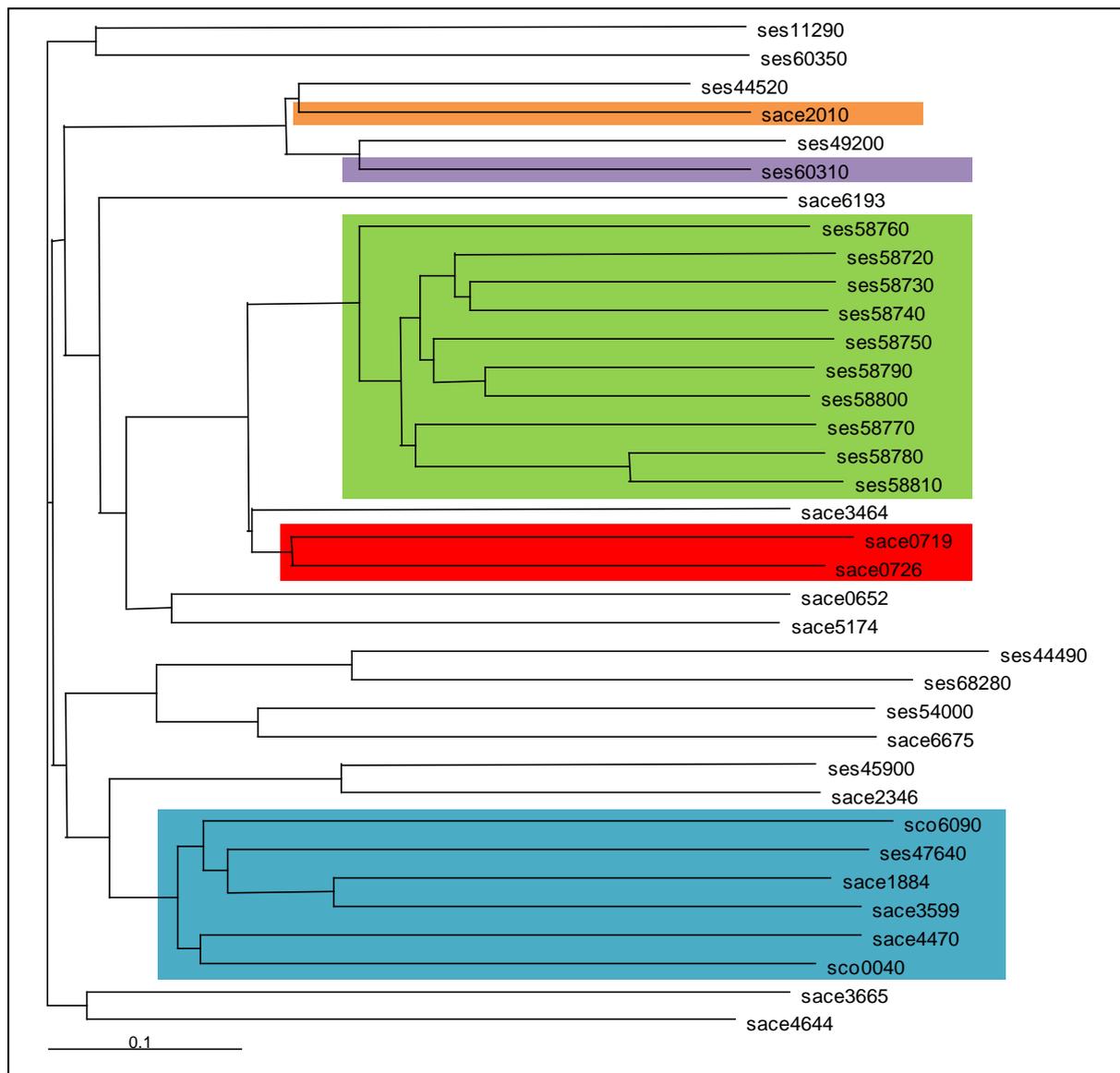
---

#### 4.8 Der Biotransformationswirt *S. erythraea*

Die in *S. espanaensis* beobachtete Biotransformationsreaktion wurde bisher in keinem anderen Bakterienstamm beschrieben. Da SACE\_2010 aus *S. erythraea* unter den sequenzierten GTs aus anderen Actinomyceten-Stämmen die größte Sequenz-Ähnlichkeit zu Ses60310 aufweist, wurde überprüft, ob diese GT auch eine ähnliche Funktion übernehmen kann. Die Fütterung von *S. erythraea* mit Alizarin hat ergeben, dass dieser Stamm ebenfalls in der Lage ist, diese Testsubstanz zu glycosylieren (siehe 3.5.1). Bei dem erhaltenen Produkt Sace\_15 handelt es sich um 2-O- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin (siehe 3.5.2). Sace\_15 entspricht also dem für die Fütterung von *S. espanaensis* erhaltenen Produkt AliPro1. Damit konnte gezeigt werden, dass der Stamm *S. erythraea* ebenfalls Biotransformationsaktivität besitzt und L-Rhamnose auf das Xenobiotikum Alizarin übertragen kann. Als Nachweis, dass es sich bei der GT SACE\_2010 um das Enzym handelt, das für die beobachtete Glycosylierung verantwortlich ist, wurde das GT-Gen *sace\_2010* im heterologen Testsystem exprimiert. Die erhaltene Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 zeigte im Fütterungsexperiment mit Alizarin die Produkte AliPro1 und AliProN (siehe 3.5.3). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die GT SACE\_2010 genau wie Ses60310 L-Rhamnose und L-Olivose auf Alizarin übertragen kann. Dieses Enzym ist demnach an der Biotransformation in *S. erythraea* beteiligt.

Der Actinomycet *S. erythraea* zeigt trotz der nachgewiesenen Aktivität der GT SACE\_2010 nicht das gleiche Spektrum an Biotransformationsprodukten wie *S. espanaensis*. Die Fütterung von *S. erythraea* mit Alizarin hat gezeigt, dass diese Substanz zwar glycosyliert werden kann, es wurden jedoch keine hydroxylierten Produkte detektiert (siehe 3.5.2). Dieser Stamm besitzt demnach keine Oxygenase, die Alizarin zusätzlich funktionalisiert. In *S. espanaensis* konnten für die Fütterung von Aminoanthrachinonen *N*-glycosylierte Biotransformationsprodukte nur in einer so geringen Menge erhalten werden, die für eine Strukturaufklärung nicht ausreichend war (siehe 3.3.2). Die Aminoanthrachinone wurden stattdessen hydroxyliert und anschließend *O*-glycosidisch mit Rhamnose verknüpft. Da diese Konkurrenzreaktion auf Grund der fehlenden Hydroxylierungsaktivität in *S. erythraea* nicht zu erwarten ist, wurde dieser Stamm zur Synthese von *N*-glycosylierten Aminoanthrachinon-Derivaten eingesetzt. Für die Fütterung von *S. erythraea* mit U3 wurden zwei verschiedene Biotransformationsprodukte erhalten (siehe 3.5.4). Bei dem Produkt U3-21 handelt es sich um 1-*N*-Acetyldiaminoanthrachinon (siehe 3.5.4.2) bei U3-8 um 1-*N*- $\alpha$ -Glucosyldiaminoanthrachinon (siehe 3.5.4.1). Mit der Acetylierung zeigt *S. erythraea* eine weitere Variante der Xenobiotika-Metabolisierung. Das gewünschte *N*-Glycosid wurde mit U3-8 zwar erhalten, es handelt sich jedoch um ein *N*-glucosyliertes statt um das erwartete *N*-rhamnosylierte Biotransformationsprodukt. Mit der Mutante *S. albus* Rham x pUWL-A-sace\_2010 wurde überprüft, ob die GT SACE\_2010 auch für die Glycosylierung von U3 verantwortlich ist. Im Fütterungsexperiment dieser Mutante konnte kein glycosyliertes U3 detektiert werden. Dies bedeutet, dass die GT SACE\_2010 L-Rhamnose nicht auf U3 übertragen kann. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die GT SACE\_2010 die Substanz U3 nur mit Glucose konjugieren

kann. Zum Nachweis dieser Theorie könnte ein neues Testsystem generiert werden, welches dTDP-D-Glucose statt dTDP-L-Rhamnose als Zucker-Donator zur Verfügung stellt. Das Gen *oleS*, das für eine dTDP-D-Glucosynthase codiert, könnte in das Genom von *S. albus* integriert werden. Die Expression von *sace\_2010* in diesem neuen Testsystem *S. albus* Gluc könnte zu einer Mutante führen, die im Fütterungsexperiment D-Glucose auf U3 überträgt.



**Abbildung 4-7** Phylogenetischer Baum der GTs aus CAZy-Familie 1 von *S. espanaensis*, *S. erythraea* und *S. coelicolor*. Der Baum wurde durch Bootstrapping<sup>[1]</sup> und den Neighbour-joining<sup>[8]</sup> Algorithmus mit dem Programm Clustal X2 generiert. Farblich markiert sind die GTs aus dem sam-Cluster von *S. espanaensis* (grün), die Gene aus dem Erythromycin-Cluster von *S. erythraea* (rot), die flexible GT Ses60310 aus *S. espanaensis* (lila), die GT SACE\_2010 aus *S. erythraea* (orange) und die GTs die möglicherweise Glucose auf exogene Substrate übertragen (blau).

Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass SACE\_2010 nicht an der Übertragung von Glucose auf U3 beteiligt ist. Im *S. erythraea* könnte eine weitere GT für die Glucosylierung von exogenen Substraten verantwortlich sein. A. Linnenbrink hat gezeigt, dass die Fütterung von *S. coelicolor* mit Emodin zur Produktion eines Metaboliten führte, der wahrscheinlich mit einer Hexopyranose wie Glucose konjugiert wurde<sup>[3]</sup>. Ausgehend von der Annahme, dass für die Glucosylierungen in *S. erythraea* und *S. coelicolor* ähnliche GTs aus der CAZy-Familie 1 verantwortlich sind, ließen sich die entsprechen-

den Gene einfach identifizieren. Im Genom von *S. coelicolor* sind mit *sco0040* und *sco6090* nur zwei Gene vorhanden, die für GTs der CAZy-Familie 1 codieren. Wie in Abbildung 4-7 zu erkennen ist, zeigen ihre Genprodukte Ähnlichkeiten zu SACE\_1884, SACE\_3599 und SACE\_4470. Unter den zwei GT-Kandidaten aus *S. coelicolor* und den drei GT-Kandidaten aus *S. erythraea* können die verantwortlichen GTs mit Hilfe des oben erwähnten heterologen Testsystems *S. albus* Gluc ermittelt werden.

#### 4.9 Biochemische Untersuchungen der GT Ses60310

Im Rahmen ihrer Diplomarbeit hat Y. Schmidt versucht die GT Ses60310 zu reinigen. Dabei wurde stets lösliches, aber aggregiertes Protein erhalten<sup>[83]</sup>. Die Synthese von Proteinen aus Actinomyceten in *E. coli* gestaltet sich oft schwierig, da die Proteine in einem heterologen Wirt oft nicht korrekt gefaltet werden können. Betancor *et al.* haben deshalb ein Expressionssystem entwickelt, das Chaperone aus Streptomyceten produziert<sup>[182]</sup>. Die Chaperone GroES, GroEL1 und GroEL2 aus *S. coelicolor* sollen zur korrekten Faltung der artfremden Proteine führen. Dieses System hatte zur erfolgreichen Produktion der 6-Desoxyerythronolid-Synthase 3 (DEBS 3) in löslicher Form geführt. DEBS 3 ist eine PKS aus dem Erythromycin-Cluster von *S. erythraea* und ist 332 kDa groß. Auch für die Synthese der GT EryCIII und ihrem Hilfsprotein EryCII wurde dieses System bereits erfolgreich eingesetzt<sup>[183]</sup>. Im Fall von Ses60310 hat die Verwendung dieses Expressionssystems in Kombination mit dem Reduktionsmittel TCEP zum Erhalt von löslichem, unaggregiertem Protein geführt (siehe 3.6.1). Y. Schmidt hatte für ihre Reinigungsversuche das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) eingesetzt. Es konnte jedoch keine Verringerung der Proteinaggregation festgestellt werden<sup>[83]</sup>. TCEP ist ein stabileres und stärkeres Reduktionsmittel als DTT. Dieses Reduktionsmittel kann unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen auch starke Disulfidbrücken-Bindungen spalten<sup>[184-186]</sup>. Durch TCEP können die drei Thiole der Cystein-Seitenketten im Protein Ses60310 während der Reinigung nicht zu Disulfidbrücken oxidieren. Ob TCEP allein für die Gewinnung von unaggregiertem Ses60310 verantwortlich ist, oder ob die Anwesenheit der Streptomyceten-Chaperone während der Proteinsynthese ebenfalls eine Rolle spielt, wurde nicht untersucht. Die Reinigung, so wie sie hier durchgeführt wurde, hat erstmals zu Gewinnung von reinem, unaggregiertem Ses60310 geführt.

Das gereinigte Protein Ses60310 wurde für erste *in vitro* Aktivitätsassays verwendet (siehe 3.6.2). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym Alizarin und dTDP-Rhamnose zu AliPro1 und dTDP umsetzen kann. Die Menge an produziertem AliPro1 wurde abhängig von pH und Temperatur bestimmt. Die Einzelwerte für einen bestimmten pH- oder Temperatur-Wert variieren trotz gleicher Reaktionsbedingungen. Eine mögliche Ursache dafür, könnte die schlechte Wasserlöslichkeit des Akzeptor-Substrats Alizarin sein. Bei der Alizarin-Stocklösung handelt es sich um eine Suspension. Diese wurde vor jeder Verwendung stets frisch aufgeschüttelt, dabei können aber Varianzen in der eingesetzten Menge an Alizarin nicht ausgeschlossen werden. Um solche Schwankungen auszugleichen, wären mehr Einzelmessungen nötig gewesen. Es konnte jedoch lediglich eine begrenzte Zahl an Messungen

durchgeführt werden, da die Assays jeweils nur mit einer Proteincharge durchgeführt werden konnten. Verschiedene Proteinchargen lieferten zwar relativ zueinander ähnliche, aber bezogen auf die Stoffmenge des produzierten AliPro1 sehr unterschiedliche Werte. Es wird vermutet, dass die Proteinqualität für diese Schwankungen verantwortlich ist. So ist es wahrscheinlich, dass das Protein Ses60310 nicht dauerhaft stabil bleibt. Möglicherweise aggregiert das Protein nach der Reinigung erneut.

Trotz der relativ ungenauen Messweise konnte das pH- und Temperatur-Optimum der betrachteten Reaktion bestimmt werden. Bei pH 8,8 konnte innerhalb einer Stunde am meisten Alizarin zu AliPro1 umgesetzt werden. Das heißt nicht, dass Ses60310 bei diesem pH-Wert sein pH-Optimum besitzt. Vielmehr bedeutet es, dass bei pH 8,8 das Verhältnis von Proteinaktivität zu Substratlöslichkeit für diese Reaktion am günstigsten ist. Bei einer Temperatur von 37 °C war die Menge an produziertem AliPro1 am größten. Bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C wurde verglichen zu 37 °C weniger AliPro1 synthetisiert. Das bedeutet, dass das Temperatur-Optimum der Reaktion in einem Bereich um 37 °C liegt. Bei höheren Temperaturen wird weniger AliPro1 produziert, was auf eine beginnende Denaturierung von Ses60310 zurückzuführen ist.

Zur weiteren Charakterisierung von Ses60310 wurden die enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_m$  bestimmt. Die Parameter sind Teil der Michaelis-Menten-Theorie. Die Maximalgeschwindigkeit der durch das Enzym katalysierten Reaktion wird durch  $v_{\max}$  beschrieben.  $K_m$  gibt die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Je kleiner  $K_m$  ist, desto höher ist die Affinität von Enzym und Substrat zueinander. Die Michaelis-Menten-Gleichung findet Anwendung für Reaktionen, bei denen nur ein Substrat umgesetzt wird oder sich die Konzentration des zweiten Substrats während der Reaktion nicht merklich ändert. GTs besitzen mit dem aktivierten Zucker und dem Aglycon jedoch zwei Substrate. Beide Substrate müssen zuerst an das Enzym binden, bevor die Reaktion stattfindet und die Produkte freigesetzt werden können. Die von einer GT katalysierte Reaktion läuft also nach einem sogenannten „sequenziellen bi-bi“-Mechanismus ab<sup>[187]</sup>. Trotzdem wird die Michaelis-Menten-Gleichung auch für GTs angewandt, wenn eines der Substrate im Überschuss an der Reaktion beteiligt ist<sup>[188]</sup>. Dann handelt es sich um eine „Pseudo-Einsubstrat-Reaktion“. Diese Näherung spiegelt nicht die Gleichgewichtsreaktion des Proteins wieder und die ermittelten Parameter gelten auch nur für den Fall, dass ein Substrat im Überschuss vorliegt. Zur Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt. Die Konzentration des Zucker-Donators dTDP-Rhamnose wurde konstant gehalten, die Konzentration von Alizarin wurde variiert. Auf Grund der Tatsache, dass die dTDP-Rhamnose nicht kommerziell erhältlich ist, wurde sie nicht im Überschuss, sondern nur stöchiometrisch eingesetzt. Da die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Reaktion gemessen wurde, wurde angenommen, dass ausreichend viel dTDP-Rhamnose für die Messung zu Verfügung stand. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wurde mit Hilfe eines photometrischen Assays bestimmt. Die Menge des gebildeten AliPro1 wurde nicht direkt sondern indirekt über die Umsetzung des freigesetzten dTDP gemessen<sup>[189]</sup>. Durch die Gesamtproteinmenge einer

---

Charge begrenzt konnten für die Messung der Anfangsgeschwindigkeit der betrachteten Enzymreaktion ebenfalls nur wenige Einzelmessungen durchgeführt werden.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung und dem Lineweaver-Burk-Diagramm wurde für diese Reaktion eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $v_{\max} = 0,0936 \text{ min}^{-1}$  und eine Michaelis-Menten-Konstante von  $K_m = 30,81 \text{ }\mu\text{M}$  erhalten. Für die Bestimmung dieser enzymkinetischen Parameter spielt jedoch die Enzymqualität ebenfalls eine bedeutende Rolle. Die erhaltenen Werte sind aus den oben genannten Gründen nur Näherungen. Die Werte gelten nur für die untersuchte Proteincharge mit allen beschriebenen Vereinfachungen.

Yang *et al.* hat die enzymkinetischen Parameter der Reaktion von Oleandomycin mit UDP-Glucose bestimmt, die sowohl durch die spezifische GT OleI als auch durch die flexible GT OleD katalysiert werden kann. Für OleI wurde  $K_m (\text{Oleandomycin}) = 4,8 \pm 0,5 \text{ }\mu\text{M}$  und  $v_{\max} = 0,00093 \text{ min}^{-1}$  für OleD  $K_m (\text{Oleandomycin}) = 32 \pm 8 \text{ }\mu\text{M}$  und  $v_{\max} = 0.00095 \pm 0.00022 \text{ min}^{-1}$  erhalten <sup>[190]</sup>. Diese Werte wurden durch eine massenspektroskopische Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion generiert. Diese Methode führt zu präzisen und robusten Ergebnissen <sup>[191]</sup>. Außerdem wurde für die Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  nicht die Michaelis-Menten-Theorie für eine Einsubstrat-Reaktion, sondern die King-Altman-Theorie für Multisubstrat-Reaktionen zu Grunde gelegt <sup>[106,111]</sup>. Die  $K_m$ -Werte zeigen, dass OleI und Oleandomycin eine höhere Affinität zueinander besitzen als OleD und Oleandomycin. Das lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Oleandomycin um das natürliche Substrat von OleI handelt. OleD ist eine flexible GT, die viele verschiedene Makrolide glycosylieren kann. Aus diesem Grund ist die Affinität von Oleandomycin und OleD kleiner. Bei Ses60310 handelt es sich ebenfalls um eine flexible GT, wodurch erklärt wird, dass der ermittelte Näherungswert für  $K_m$  von Ses60310 und Alizarin dem von OleD und Oleandomycin sehr ähnlich ist. Der Wert für die Maximalgeschwindigkeit ist für die Reaktion von Ses60310 viel größer als die Werte für die Reaktionen von OleI und OleD. Das muss nicht bedeuten, dass dieses Enzym schneller arbeitet, sondern könnte mit der eingesetzten Menge an dTDP-Rhamnose zusammenhängen.

Die enzymatischen Parameter, die für die von Ses60310 katalysierte Rhamnosylierung von Alizarin erhalten wurden, können zukünftig unter Berücksichtigung der Enzymqualität mit Hilfe modernster Technologien genauer bestimmt werden. Die hier erhaltenen Werte geben vorerst nur Anhaltspunkte über die kinetischen Eigenschaften von Ses60310.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Chemikalien und andere Verbrauchsmittel

#### 5.1.1 Medien- und Pufferbestandteile

**Tabelle 5-1** Verwendete Medien- und Pufferbestandteile und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, D
CaCl <sub>2</sub>	Roth
CaCO <sub>3</sub>	Roth
CASO Bouillon	Roth
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Glucose	Roth
Glycin	Roth
HCl	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Lab Lemco Fleischextrakt	Oxoid Ltd., Basingstoke, GB
LB-Trockenpulver	Roth
Malzextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg, D
D-Mannitol	Roth
MgCl <sub>2</sub> Hexahydrat	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Phosphoenolpyruvat (PEP), Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Seelze, D
Saccharose	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Sojamehl, vollfett	W. Schoenenberger GmbH & Co KG, Magstadt, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-HCl (TCEP)	Roth
TRIS-HCl	Roth

### 5.1.2 Chemikalien für Glycosylierungsexperimente

Tabelle 5-2 Niedermolekulare Substanzen, die für Glycosylierungsexperimente eingesetzt wurden und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle.

Bezeichnung (Abkürzung)	Hersteller / Bezugsquelle
Alizarin	Fluka, Taufkirchen, D
Emodin	Roth
Novobiocinsäure	Dr. A. Linnenbrink <sup>[3]</sup>
Quercetin Dihydrat	Roth
1,4-Dihydroxyanthrachinon (U2)	Prof. Dr. V. Novikov, Lemberg, UA
1,4-Diaminoanthrachinon (U3)	Prof. Dr. V. Novikov
1-Amino-2-methylantrachinon (U7)	Prof. Dr. V. Novikov
2-Aminoanthrachinon (U8)	Prof. Dr. V. Novikov

### 5.1.3 Andere Chemikalien

Tabelle 5-3 Andere verwendete Chemikalien und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller
1 kb-DNA-Leiter	Promega, Mannheim, D – NEB, Ipswich, GB
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Blue/Orange 6X Loading Dye	Promega
Brilliant Blue R-250	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	Roth
dNTP-Mix	Peqlab, Erlangen, D
dTDP-Rhamnose	J. Rohr, University of Kentucky, USA
Ethidiumbromid	Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Methylenblau	Merck, Darmstadt, D
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), Dinatriumsalz	Roth
<i>Pfu</i> -Puffer, 10x	Im Institut selbst hergestellt
Rotiphorese Gel 30 %	Roth
<i>Taq</i> -Puffer, 10x	Im Institut selbst hergestellt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth

Fortsetzung von Tabelle 5-3 Andere verwendete Chemikalien und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-glucuronsäure (X-Gluc)	X-Gluc Direct, UK
Xylencyanol	Merck

#### 5.1.4 Organische Lösungsmittel

Tabelle 5-4 Verwendete organische Lösungsmittel und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller
Chloroform	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol	Roth
Ethylacetat	Roth
Glycerol	Roth
Isopropanol	Roth

#### 5.1.5 Antibiotika

Tabelle 5-5 Verwendete Antibiotika und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich
Apramycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, D
Carbenicillin, Dinatriumsalz	Roth
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Fosfomycin, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich
Hygromycin B	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat	AppliChem

### 5.1.6 Enzyme und Kits

**Tabelle 5-6** Verwendete Enzyme und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung des Enzyms	Hersteller / Bezugsquelle
Bovines Serum Albumin (BSA)	Promega - NEB
DNA-Restriktionsendonukleasen	Promega - NEB
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roth
<i>Pfu</i> -Polymerase	Im Institut selbst hergestellt durch P. Schneider
Proteinase K	Promega
Pyruvatkinase (PK) und Laktat Dehydrogenase (LDH)	Sigma-Aldrich
RNase A	Qiagen, Hilden, D
T4-DNA-Ligase	Promega
<i>Taq</i> -Polymerase	Im Institut selbst hergestellt durch P. Schneider

**Tabelle 5-7** Verwendete Kits und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung des Kits	Hersteller / Bezugsquelle
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena, Jena, D
PureYield™ Plasmid Midiprep System Kit	Promega
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche AG, Basel, CH
Wizard® Plus SV Minipreps Kit	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System Kit	Promega

### 5.1.7 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5-8** Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller beziehungsweise Bezugsquelle. Herkunftsort und Land sind bei Erstnennung angegeben.

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
Amicon® Ultra-15	Merck Millipore, Billerica, USA
DC-Fertigplatten Adamant UV <sub>254</sub>	Macherey-Nagel, Düren, D
Oasis® HLB 20 35 cc (6g)	Waters, Eschborn, D
Rotilabo®-Petrischalen, Durchmesser 10 mm	Roth
Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,45 µm, PVDF	Roth
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0,2 µm, PVDF	Roth

## 5.2 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit bidestilliertem Wasser ( $H_2O_{\text{bidest.}}$ ) hergestellt. Zur pH-Wert Einstellung wurden NaOH (1 M) oder HCl (1 M) verwendet. In der Regel wurden die Lösungen autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Ausnahmen sind in den entsprechenden Tabellen unter Anmerkung vermerkt.

### 5.2.1 Lösungen zur DNA Isolierung

#### 5.2.1.1 Puffer zur Plasmidisolierung aus *E. coli*

Tabelle 5-9 Puffer zur Plasmidisolierung aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
P1	TRIS-HCl	30 mM auf pH 8,0 einstellen, RNase A vor Gebrauch zugeben und bei 4 °C aufbewahren
	EDTA	3 mM
	RNase A	100 µg/mL
P2	NaOH	200 mM NaOH- und SDS-Lösung getrennt ansetzen
	SDS	1 % (m/V) und 1:1 mischen; nicht autoklavieren!
P3	Kaliumacetat	3 M mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen und bei 4 °C aufbewahren

### 5.2.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung aus Actinomyceten

Tabelle 5-10 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung aus Actinomyceten.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
SET-Puffer	TRIS-HCl	20 mM auf pH 8,0 einstellen
	EDTA	25 mM
	NaCl	75 mM
Lysozym-Lösung	Lysozym	50 mg/mL -
Proteinase K-Lösung	Proteinase K	20 mg/mL -
SDS-Lösung	SDS	10 % (m/V) nicht autoklavieren
NaCl-Lösung	NaCl	5 M -

### 5.2.3 Puffer und Lösungen zur DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 5-11 Puffer und Lösungen zur DNA-Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
1 x TAE-Puffer	TRIS	40 mM mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen;
	EDTA	1 mM nicht autoklavieren

Fortsetzung von Tabelle 5-11 Puffer und Lösungen zur DNA-Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Bestandteile		Anmerkung
Agarose-Lösung	Agarose	0,7 % (m/V)	in 1 x TAE-Puffer durch aufkochen lösen und bei 60 °C lagern
Ladepuffer 1	Blue/Orange 6X Loading Dye		-
Ladepuffer 2	Gel Loading Dye, Blue 6X		-
Ladepuffer 3	Xylencyanol	0,25 % (m/V)	in TE-Puffer pH 7,6 lösen; zur Detektion von Banden < 6,0 kb
	Saccharose	40 % (m/V)	
Ladepuffer 4	Bromphenolblau	0,25 % (m/V)	in TE-Puffer pH 7,6 lösen; zur Detektion von Banden > 6,0 kb
	Saccharose	40 % (m/V)	
Längenstandard 1 (LP)	1 kb-Leiter Promega	0,1 µg/µL	enthält DNA-Fragmente einer Länge von 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 0,75 kb, 0,5 kb und 0,25 kb
		1 x	
Längenstandard 2 (LN)	1 kb-Leiter NEB	0,5 µg/µL	enthält DNA-Fragmente einer Länge von 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb und 0,5 kb
		1 x	
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 µg/mL	vor Licht schützen

### 5.2.4 Antibiotika-Lösungen

Von den Antibiotika wurden Stocklösungen hergestellt, die bei -20 °C gelagert wurden. Wässrige Lösungen wurden durch einen Rotilabo® Spritzenfilter steril mit einem maximalen Porendurchmesser von 0,22 µm filtriert.

Tabelle 5-12 Verwendete Antibiotikallösungen, deren Lösungsmittel und verwendete Standardkonzentrationen.

Bezeichnung	[Abk.]	Lösungsmittel	Konzentration der Stocklösung	Übliche Endkonzentration im Medium
Ampicillin	[Amp]	H <sub>2</sub> O	50 mg/mL	50 µg/mL
Apramycin	[Apra]	H <sub>2</sub> O	100 mg/mL	100 µg/mL
Carbenicillin	[Carb]	H <sub>2</sub> O	50 mg/mL	50 µg/mL
Chloramphenicol	[Cam]	Ethanol	30 mg/mL	30 µg/mL
Fosfomycin	[Phos]	H <sub>2</sub> O	200 mg/mL	400 µg/mL
Hygromycin	[Hyg]	H <sub>2</sub> O	50 mg/mL	100 µg/mL
Kanamycin	[Kana]	H <sub>2</sub> O	30 mg/mL	30 µg/mL
Spectinomycin	[Spec]	H <sub>2</sub> O	100 mg/mL	100 µg/mL

## 5.2.5 Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Tabelle 5-13 Verwendete Lösungen zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	MgCl <sub>2</sub>	0,1 M bei 4 °C lagern
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub>	0,1 M bei 4 °C lagern
CaCl <sub>2</sub> -Glycerol-Lösung	CaCl <sub>2</sub> Glycerol	0,1 M bei 4 °C lagern 15 % (m/V)
Glycerol-Lösung	Glycerol	10 % (m/V) bei 4 °C lagern

## 5.2.6 Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion

Tabelle 5-14 Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion in *E. coli*.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
IPTG-Lösung	IPTG	2 mM zur Keimreduktion Lösung filtrieren; 20 µL pro Agarplatte verwenden; bei -20 °C lichtgeschützt lagern
X-Gal-Lösung	X-Gal	100 g/L in DMF lösen; autosteril; 20 µL pro Agarplatte verwenden; bei -20 °C lichtgeschützt lagern

Tabelle 5-15 Lösung für die Blau-Weiß-Selektion in *S. esanaensis*.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
X-Gluc-Lösung	X-Gluc	100 mM in DMF lösen; autosteril; bei -20 °C lichtgeschützt lagern

## 5.2.7 Lösungen zur Herstellung von Dauerkulturen

Tabelle 5-16 Lösung zur Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
Glycerol-Lösung	Glycerol	15 % (m/V) -

Tabelle 5-17 Lösung zur Herstellung von Actinomyceten-Dauerkulturen.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
Saccharose-Lösung	Saccharose	25 % (m/V) -

### 5.2.8 Puffer zur Proteinisolierung aus *E. coli*

Tabelle 5-18 Puffer für die Reinigung von Ses60310 mittels präparativer Affinitätschromatographie und Gelfiltration.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
Puffer A	TRIS-HCl	40 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	TCEP	1 mM
	Glycerol	10 % ( <i>m/V</i> )
	Imidazol	0 mM
Puffer B	TRIS-HCl	40 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	TCEP	1 mM
	Glycerol	10 % ( <i>m/V</i> )
	Imidazol	500 mM
Gelfiltrations-Puffer	TRIS-HCl	40 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	TCEP	1 mM
	Glycerol	10 % ( <i>m/V</i> )

### 5.2.9 Puffer und Lösungen zur Durchführung einer SDS-PAGE

Tabelle 5-19 Puffer und Lösungen zur Durchführung einer SDS-PAGE.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
Trenngel 12 %	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,68 mL
	TRIS-HCl-Lösung (1,5 M; pH 8,8)	2 mL
	SDS 10 % ( <i>m/V</i> )	80 µL
	Rotiphorese Gel 30 % ( <i>m/V</i> )	3,2 mL
	APS 10 % ( <i>m/V</i> )	40 µL
	TEMED	4 µL

Die Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge zusammengenommen, mischen und sofort verwenden. Die Lösung ist ausreichend für zwei Gele. Mit Isopropanol überschichten und circa 30 min auspolarisieren lassen.

Fortsetzung von Tabelle 5-19 Puffer und Lösungen zur Durchführung einer SDS-PAGE.

Bezeichnung	Bestandteile		Anmerkung
Sammelgel 4 %	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,66 mL	Die Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge zusammengenommen, mischen und sofort verwenden. Zuvor Isopropanol entfernen und anschließend Kamm einsetzen. Die Lösung ist ausreichend für zwei Gele. Circa 30 min auspolarisieren lassen.
	TRIS-HCl-Lösung (0,5 M; pH 6,8)	1,5 mL	
	SDS 10 % (m/V)	60 µL	
	Rotiphorese Gel 30 % (m/V)	0,798 mL	
	APS 10 % (m/V)	30 µL	
	TEMED	6 µL	
10 x SDS-PAGE	SDS	10 g	pH 8,3; vor der Durchführung der Elektrophorese um den Faktor 10 verdünnen
Laufpuffer	TRIS-HCl	30,3 g	
	Glycin	144,2 g	
	Wasser	ad 1 L	
2 x SDS-PAGE	TRIS-HCl-Lösung (0,5 M; pH 6,8)	1,8 mL	mit der Probe 1:1 mischen und in die Probentaschen geben
Ladepuffer	Glycerol	2,0 g	
	SDS 10 % (m/V)	2,0 mL	
	Bromphenolblau 1 % (m/V)	0,2 mL	
	DTT	0,154 g	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10 mL	
Coomassieblau-Färbelösung	Brilliant Blue R-250	2,5 g	-
	Ethanol	450 mL	
	Eisessig	100 mL	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 L	
Entfärbelösung	Ethanol	450 mL	-
	Eisessig	100 mL	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 L	
Proteinstandard 1 (PR)	Roti <sup>®</sup> -Mark Standard		pro Gel 8 µL auftragen
	Myosin, Rind	212 kDa	
	β-Galactosidase, rek. <i>E. coli</i>	118 kDa	
	Serumalbumin, Rind, glycosyliert	66 kDa	
	Ovalbumin, glycosyliert	43 kDa	
	Carboanhydrase	29 kDa	
	Trypsin-Inhibitor, Soja	20 kDa	
	Lysozym, Huhn	14 kDa	

Fortsetzung von Tabelle 5-19 Puffer und Lösungen zur Durchführung einer SDS-PAGE.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
Proteinstandard 2 (PF)	PageRuler™ Prestained Protein Marker; enthält Proteine eine Länge von 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa (rot), 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa und 10 kDa (grün)	pro Gel 8 µL auftragen

### 5.2.10 Stocklösungen zur Durchführung von *in vitro* Aktivitätsassays

Tabelle 5-20 Stocklösungen zur Durchführung von *in vitro* Aktivitätsassays.

Bezeichnung	Konzentration der Stocklösung	Anmerkung
Enzym Ses60310	variabel	frisch aufgereinigt
Alizarin	2 mM	in wässriger Suspension, vor Gebrauch frisch aufschütteln
TRIS-Puffer	0,5 M	eingestellt auf verschiedene pH-Werte (3 / 6 / 6,5 / 7 / 7,5 / 8 / 8,5 / 8,8 / 9 / 9,5)
BSA	10 mg/mL	
MgCl <sub>2</sub>	1 M	
dTDP-Rhamnose	10 mM	
TCEP	100 mM	
interner Standard 1,4-Dihydroxyathrachinon	2 mM	in methanolischer Suspension, vor Gebrauch frisch aufschütteln
PEP	70 mM	
NADH	15 mM	
PK und LDH	917 units/mL 913 units/mL	

### 5.3 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedien wurde Agar-Agar mit einer Endkonzentration von 21 g/L verwendet. Antibiotika und andere hitzeempfindliche Substanzen wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

### 5.3.1 Nährmedium zur Kultivierung von *E. coli*

Tabelle 5-21 Nährmedium zur Kultivierung von *E. coli*.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
LB <sup>[192]</sup>	LB-Trockenpulver	20 g/L in Leitungswasser lösen; pH 7,3 einstellen

### 5.3.2 Nährmedium zur Kultivierung von Actinomyceten

Tabelle 5-22 Nährmedium zur Kultivierung von Actinomyceten.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
TSB <sup>[2]</sup>	Casson Bouillon	30 g/L in Leitungswasser lösen; pH 7,2 einstellen

### 5.3.3 Nährmedium zur Intergenerischen Konjugation

Tabelle 5-23 Nährmedium zur intergenerischen Konjugation.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
MS <sup>[193]</sup>	Sojamehl, vollfett	20 g/L in Leitungswasser lösen; pH 7,2 einstellen
	D-Mannitol	20 g/L

### 5.3.4 Nährmedium für *in vivo* Glycosylierungsexperimente

Tabelle 5-24 Nährmedium für *in vivo* Glycosylierungsexperimente.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
NL111 <sup>[62]</sup>	Lab Lemco Fleischextrakt	20 g/L in Leitungswasser lösen; pH 7,5 einstellen
	Malzextrakt	100 g/L
	CaCO <sub>3</sub>	10 g/L

### 5.3.5 Nährmedium zur Produktion von Kaffeesäure in *S. albus*

Tabelle 5-25 Nährmedium zur Produktion von Kaffeesäure in *S. albus*.

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung
HA <sup>[194]</sup>	Hefeextrakt	4 g/L in Leitungswasser lösen; pH 7,2 einstellen
	Malzextrakt	10 g/L
	Glucose	4 g/L

## 5.4 Verwendete Plasmide und Vektoren

### 5.4.1 In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide

Tabelle 5-26 In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide.

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Resistenzgen	Referenz
cos17	Cosmid, trägt die Gene <i>sam9</i> bis <i>sam38</i> des Saccharomicin Clusters	<i>aac(3)IV</i>	[80]
cos35	Cosmid, trägt die Gene <i>sam1</i> bis <i>sam8</i> des Saccharomicin Clusters	<i>aac(3)IV</i>	[80]
fos5a8	Fosmid, trägt die Gene <i>ses60310</i> und <i>ses60350</i>	<i>cat</i>	[154]
pET-28a(+)	Expressionsplasmid zur Produktion von Proteinen mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag	<i>aphII</i>	Novagen®
pET28a-7665-N-his-TEV	Expressionsplasmid zur Produktion von Ses60310 mit N-terminalem His <sub>6</sub> -tag und TEV-Schnittstelle	<i>aphII</i>	[83]
pET28btev-x12	Expressionsplasmid zur Produktion von AviX12 mit C-terminalem His <sub>6</sub> -tag	<i>aphII</i>	Wunsch-Palasis unpubliziert
pGEM®-T Easy	Klonierungsvektor, zur Klonierung von DNA mit 5'-Adenin Überhängen	<i>bla</i>	Promega
pKC1132	Suizidplasmid	<i>aac(3)IV</i>	[195]
pKCXY02	Suizidplasmid, trägt das Markergen <i>gusA</i>	<i>aac(3)IV</i>	[196]
pL1SL2	Expressionsplasmid, codiert für die Streptomyceten Chaperone GroEL1, GroEL2 und GroES	<i>bla</i>	[182,183]
pLERE-Spec-oriT	Klonierungsvektor, trägt <i>aadA</i> und <i>oriT</i> flankiert von zwei <i>loxRE</i> Erkennungssequenzen	<i>aadA, bla</i>	Kobylyanskyy, unpubliziert
pLITMUS 28i	Klonierungsvektor	<i>bla</i>	NEB
pMB9	Expressionsplasmid mit <i>sam8</i> und <i>sam5</i> unter Kontrolle von ermE up, ohne <i>oriT</i>	<i>tsr</i>	[80]
pRham	Expressionsplasmid, trägt die Gene <i>oleL</i> , <i>oleS</i> , <i>oleE</i> und <i>oleU</i> unter Kontrolle von ermE*	<i>bla, tsr</i>	[5]
pSET152	integrativer Vektor (ΦC31)	<i>aac(3)IV</i>	[195]
pSET-1cerm	integrativer Vektor (ΦC31) mit <i>urdGT1c</i> unter Kontrolle von ermE up	<i>aac(3)IV</i>	[197]
pTAJA	integrativer Vektor (ΦC31) mit ermE*	<i>aac(3)IV</i>	Heitzler, unpubliziert

Fortsetzung von Tabelle 5-26 In dieser Arbeit verwendete Vektoren und Plasmide.

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Resistenzgen	Referenz
pTAJA-sam8+5	integrativer Vektor ( $\Phi$ C31) mit <i>sam8</i> und <i>sam5</i> unter Kontrolle von ermE*	<i>aac(3)IV</i>	[138]
pTESb	Vektor zur markerfreien Genintegration ( $\Phi$ C31), mit ermEp1	<i>aac(3)IV</i>	Siegl, unpubliziert
pTOS	Vektor zur markerfreien Genintegration (vwb)	<i>aac(3)IV</i>	[143]
pUC931	Klonierungsvektor		[198]
pUWL-A	replikatives Multicopy-Plasmid mit ermE up	<i>aac(3)IV, bla</i>	[199]
pUWL-Dre	Expressionsplasmid, trägt das <i>Dre</i> -Rekombinasegen	<i>bla, tsr</i>	[143]
pUWL-A-sam8+5	Expressionsplasmid, trägt <i>sam8</i> und <i>sam5</i>	<i>aac(3)IV</i>	[138]
pUZ8002	Fertilitätsplasmid zur Konjugation von Plasmiden mit <i>oriT</i>	<i>aphII, tcr</i>	[195,200]

#### 5.4.2 In dieser Arbeit erstellte Plasmide

Tabelle 5-27 In dieser Arbeit erstellte Plasmide.

Vektor/Plasmid	Ursprungsvektor	Beschreibung
pET28a-7665-N-his	pET-28a(+)	trägt das GT-Gen <i>ses60310</i> mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag
pET28b-7665-C-his	pET-28b(+)	trägt das GT-Gen <i>ses60310</i> mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag
pK $\Delta$ 6130	pKC1132	Plasmid zur Inaktivierung von <i>ses44520</i> in <i>S. espanaensis</i>
pK $\Delta$ 6266	pKC1132	Plasmid zur Inaktivierung von <i>ses45900</i> in <i>S. espanaensis</i>
pK $\Delta$ 6449	pKC1132	Plasmid zur Inaktivierung von <i>ses47640</i> in <i>S. espanaensis</i>
pK $\Delta$ 6609	pKC1132	Plasmid zur Inaktivierung von <i>ses49200</i> in <i>S. espanaensis</i>
pK $\Delta$ 7665	pKCXY02	Plasmid zur Inaktivierung von <i>ses60310</i> in <i>S. espanaensis</i>
pLit28-sam5	pLITMUS 28i	trägt das 4-Cumarat-3-Hydroxylase-Gen <i>sam5</i>
pLit28-sam8	pLITMUS 28i	trägt das Tyrosin-Ammoniak-Lyase-Gen <i>sam8</i>
pSET*sam7	pTAJA	trägt das Gen <i>sam7</i> zur heterologen Expression des Acetyl-CoA-Ligasegens
pSET*sam7+5	pTAJA	trägt die Gene <i>sam7</i> und <i>sam5</i>

Fortsetzung von Tabelle 5-27 In dieser Arbeit erstellte Plasmide.

Vektor/Plasmid	Ursprungsvektor	Beschreibung
pSET-7665	pSET-1cerm	trägt das GT-Gen <i>ses60310</i> zur Komplementierung von <i>S. espanaensis</i> $\Delta$ <i>ses60310</i>
pTESb-sam8+5	pTESb	trägt die Gene <i>sam8</i> und <i>sam5</i> zur heterologen Produktion von Kaffeesäure
pTOS*sam7+5	pTOS	trägt die Gene <i>sam7</i> und <i>sam5</i>
pTOS*sam7+5+8	pTOS*sam7+5	trägt die Gene <i>sam7</i> , <i>sam5</i> und <i>sam8</i> zur heterologen Produktion von aktivierter Kaffeesäure
pTOS*sam7+5+8+36	pTOS*sam7+5+8	trägt die Gene <i>sam7</i> , <i>sam5</i> , <i>sam8</i> und <i>sam36</i>
pTOS-Rham	pTOS	trägt die Gene <i>oleL</i> , <i>oleS</i> , <i>oleE</i> und <i>oleU</i> zur heterologen Produktion von dTDP-Rhamnose
pUC931-sam8+5	pUC931	trägt die Gene <i>sam8</i> und <i>sam5</i> für Klonierungsexperimente
pUWL-A-698	pUWL-A	trägt das GT-Gen <i>ses11290</i> zur heterologen Expression
pUWL-A-7665	pUWL-A	trägt das GT-Gen <i>ses60310</i> zur heterologen Expression
pUWL-A-7668	pUWL-A	trägt das GT-Gen <i>ses60340</i> zur heterologen Expression
pUWL-A-sace_2010	pUWL-A	trägt das GT-Gen <i>sace_2010</i> zur heterologen Expression

## 5.5 Bakterienstämme

### 5.5.1 In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Tabelle 5-28 Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Verwendung	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Klonierung	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk<sup>-</sup></i> , <i>mk<sup>+</sup></i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen <sup>TM</sup>
<i>E. coli</i> ET12567 x pUZ8002	Konjugation	F <sup>-</sup> , <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> , <i>hsdR</i> , <i>zij-202::Tn10</i> , <i>recF143</i> , <i>galK2</i> , <i>GalT22</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>xyl-5</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>rpsL136</i> , <i>HisG4</i> , <i>tsx-78</i> , <i>mtl-1</i> , <i>glnV44</i>	[201]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Klonierung	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene

Fortsetzung von Tabelle 5-28 Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Verwendung	Genotyp	Referenz
NEB Turbo <i>E. coli</i>	Klonierung	F <sup>-</sup> <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ <i>lacZM15</i> / <i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>glnV gal R(zgb-210::Tn10)</i> Tet <sup>S</sup> <i>endA1 thi-1</i> $\Delta$ ( <i>hsdS-mcrB</i> )5	New England Biolabs
<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus RP x pL1SL2	Proteinsynthese	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal endA</i> Hte [ <i>argU proL Cam</i> <sup>r</sup> ]	[182,183]

## 5.5.2 In dieser Arbeit verwendete Actinomyceten-Stämme

Tabelle 5-29 Verwendete Actinomyceten-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	Wild-Typ, produziert Erythromycin	[202]
<i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229	Wild-Typ, produziert Saccharomicin A und B, besitzt <i>in vivo</i> Rhamnosylierungsaktivität	[78]
<i>Saccharothrix espanaensis</i> $\Delta$ 6130	Mutante von <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229; <i>ses44520</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung des Gens <i>ses44520</i> )	diese Arbeit
<i>Saccharothrix espanaensis</i> $\Delta$ 6266	Mutante von <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229; <i>ses45900</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung des Gens <i>ses45900</i> )	diese Arbeit
<i>Saccharothrix espanaensis</i> $\Delta$ 6449	Mutante von <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229; <i>ses47640</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung des Gens <i>ses47640</i> )	diese Arbeit
<i>Saccharothrix espanaensis</i> $\Delta$ 6609	Mutante von <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229; <i>ses49200</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung des Gens <i>ses49200</i> )	diese Arbeit
<i>Saccharothrix espanaensis</i> $\Delta$ 7665	Mutante von <i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229; <i>ses60310</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung des Gens <i>ses60310</i> )	diese Arbeit
<i>Streptomyces albus</i> J1074	Wirt zur heterologen Expression	[203]
<i>Streptomyces albus</i> Rham	Wirt zur heterologen Expression, produziert dTDP-Rhamnose	diese Arbeit
<i>Streptomyces fradiae</i> XKS	Mutante von <i>Streptomyces fradiae</i> Tü2717; <i>urdB</i> <sup>-</sup> und <i>urdC</i> <sup>-</sup> (Inaktivierung der minimalen PKS im Urdamycin-Gencluster)	[204]

## 5.6 Software, Datenbanken und Internetservices

Tabelle 5-30 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software, Datenbanken und Internetservices.

Bezeichnung	Hersteller / Anbieter
antiSMASH <sup>[116]</sup>	<a href="http://antismash.secondarymetabolites.org/">http://antismash.secondarymetabolites.org/</a>
BLAST <sup>[115]</sup>	National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, USA <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi</a>
CAZY <sup>[92]</sup>	AFMB - CNRS - Université d'Aix-Marseille, F <a href="http://www.cazy.org/">http://www.cazy.org/</a>
ChemStation Rev. A 09. 03	Agilent, Waldbronn
Clone Manager 7	Scientific and Educational Software, Cary, USA
Clustal X 2.0 <sup>[205]</sup>	Conway Institute UCD Dublin, IRL <a href="http://www.clustal.org/clustal2/">http://www.clustal.org/clustal2/</a>
ExpASy <sup>[206]</sup>	Swiss Institute of Bioinformatics <a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
GenDB <sup>[207]</sup>	Center for Biotechnology (CeBiTec), Universität Bielefeld <a href="http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb_info/index.html">http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb_info/index.html</a>
NRPSpredictor2 <sup>[208]</sup>	<a href="http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/Controller?cmd=SubmitJob">http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de/Controller?cmd=SubmitJob</a>
PKS/NRPS Analysis <sup>[209]</sup>	University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA <a href="http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/">http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/</a>
SBSPKS <sup>[210]</sup>	Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases <a href="http://www.nii.ac.in/~pkfdb/sbspks/master.html">http://www.nii.ac.in/~pkfdb/sbspks/master.html</a>
SWIFT II	GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK
TreeView <sup>[211]</sup>	Roderic D. M. Page, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, GB <a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>

## 5.7 Methoden der Mikrobiologie

### 5.7.1 Kultivierung und Herstellung von Dauerkulturen von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* wurde eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher oder einer auto-klavierten Pipettenspitze gepickt und in flüssiges LB-Medium (siehe Tabelle 5-21) eingebracht. Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 10 mL wurden in einem Reagenzglas mit Aluminiumkappe angezogen, für Volumina bis 100 mL wurden 300-mL-Erlenmeyerkolben mit einer Schikane verwen-

---

det. Bei der Anzucht auf einer LB-Agarplatte wurde die gepickte Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher auf dieser ausgestrichen. Dem Medium wurden Selektionsantibiotika in entsprechender Konzentration zugesetzt (siehe Tabelle 5-12). Die Inkubation der Kulturen erfolgte für 14-16 h bei 37 °C. Hierbei wurde für Flüssigkulturen ein Schüttelturm (180 rpm) verwendet, während die Kultivierung auf Festmedium in einem Brutschrank durchgeführt wurde.

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde der gewünschte Stamm über Nacht in 100 mL LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Selektionsantibiotika angezogen. Diese Kultur wurde abzentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und die Zellen in 10 mL 15 %ige Glycerol-Lösung (siehe Tabelle 5-16) suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **5.7.2 Kultivierung von Actinomyceten-Stämmen und Herstellung von Dauerkulturen**

Zur Standardkultivierung der in Tabelle 5-29 angegebenen Actinomyceten-Stämmen und ihrer Mutanten wurde TSB-Medium verwendet (siehe Tabelle 5-22). Dabei wurden 50 mL TSB-Medium in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen mit 200 µL einer Saccharose-Dauerkultur oder einem 1 cm<sup>2</sup>-großen, dichtbewachsenem Agarstück inokuliert. Die Anzucht erfolgte über 1-2 Tage unter Zugabe der entsprechenden Selektionsantibiotika und Fosfomycin (siehe Tabelle 5-12) bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C in einem Schüttelturm mit einer Umdrehungszahl von 180 rpm.

Die Produktion von Kaffeesäure wurde in 100 mL HA-Medium (siehe Tabelle 5-25) in einem 300-mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und einer Metallspirale durchgeführt.

Die Kultivierung der Stämme auf Festmedium erfolgte auf einer TSB-Agarplatte, die die entsprechenden Selektionsantibiotika enthielt. Hierfür wurde eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, ausgestrichen und im Brutschrank bei 28 °C für 3-5 Tage inkubiert.

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurden 50 mL einer frischgewachsenen Bakterienkultur verwendet. Diese wurde abzentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und die Zellen mit 30 mL einer Saccharose-Lösung (25 % *m/V*) gewaschen (siehe Tabelle 5-17) bevor sie in 15 mL Saccharose-Lösung suspendiert wurden. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **5.7.3 Transformation von *E. coli***

#### **5.7.3.1 *CaCl*<sub>2</sub>-vermittelte Transformation**

Zur Transformation von *E. coli* DH5α, *E. coli* XL1-Blue, NEB Turbo *E. coli* und *E. coli* BL21 Codon Plus RP x pL1SL2 mit Ligationsansätzen oder Plasmid-DNA wurde die *CaCl*<sub>2</sub>-vermittelte Hitzeschocktransformation verwendet.

### **Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen**

Die Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen von *E. coli* DH5α, *E. coli* XL1-Blue, NEB Turbo *E. coli* und *E. coli* BL21 Codon Plus RP x pL1SL2 erfolgte in Anlehnung an die von Sambrook *et al.* beschriebene Methode <sup>[192]</sup>. Die Herstellung der Lösungen, die zum Waschen und zur Lagerung der Zellen verwendet werden, sind in Tabelle 5-13 beschrieben.

100 mL LB-Medium (siehe Tabelle 5-21) mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 5-12) wurde mit einer *E. coli*-Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelturm angezogen. Mit 2 mL dieser Vorkultur wurden 100 mL LB-Medium beimpft, welches bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 unter den angegebenen Bedingungen inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden alle folgenden Schritte unter sterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt: Das Zellpellet wurde in 30 mL einer eisgekühlten MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3.000 rpm, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet vorsichtig in 30 mL einer eisgekühlten CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen vorsichtig in 5 mL eisgekühlter CaCl<sub>2</sub>-Glycerol-Lösung resuspendiert und in Aliquots von 150 µL direkt zur Transformation weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

### **Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock**

Pro Transformationsansatz wurden 150 µL CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen mit der zu transferierenden DNA-Lösung (circa 50 ng DNA) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer Hitzeschockbehandlung von 90 s bei 42 °C unterworfen und unmittelbar darauf 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Regenerierung wurde 1 mL LB-Medium (siehe Tabelle 5-21) zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

#### **5.7.3.2 Transformation durch Elektroporation**

*E. coli* ET12567 x pUZ8002-Zellen wurden durch Elektroporation mit Plasmid-DNA transformiert.

### **Herstellung elektrokompeter Zellen**

Die Herstellung elektrokompeter Zellen von *E. coli* ET12567 x pUZ8002 erfolgte in Anlehnung an die von Sambrook *et al.* beschriebene Methode <sup>[192]</sup>. Die Herstellung der Lösung, die zum Waschen und zur Lagerung der Zellen verwendet wird, ist in Tabelle 5-13 beschrieben.

Mit 2 mL einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes wurden 100 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum beimpft (vergleiche 5.7.3.1). Diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 angezogen und abzentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4 °C). Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt: Das Zellpellet wurde zweimal mit 30 mL Glycerol-Lösung vorsichtig gewaschen und erneut abzentrifugiert (3.000 rpm, 10 min, 4 °C). Das

---

Pellet wurde im Anschluss in 5 mL Glycerol-Lösung suspendiert und in 150 µL Aliquots aufgeteilt, die bei -80 °C gelagert oder direkt zur Transformation weiterverwendet wurden.

### **Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation**

Die zu transferierende DNA-Lösung wurde mit 150 µL elektrokompeter Zellen gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm gegeben. Die Transformation erfolgte bei 25 µF, 1,8 kV und 200 Ω mit dem *E. coli* Pulser™ der Firma BioRad. Nach dem Puls von 4-5 ms wurde innerhalb der nächsten 10 s 1 mL LB-Medium (siehe Tabelle 5-21) hinzugefügt, die Zellen vorsichtig suspendiert und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

### **5.7.4 Blau-Weiß-Selektion in *E. coli***

Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion in *E. coli* kann der Erfolg von Klonierungsexperimenten anhand der Kolonie-Färbung festgestellt werden. Dabei werden Klonierungsvektoren verwendet, die ein *lacZ*-Gen zur Komplementierung der β-Galactosidase enthalten. Wird *E. coli* DH5α, *E. coli* XL1-Blue oder der NEB Turbo *E. coli* mit einem Vektor transformiert, bei dem ein Insert in dieses *lacZ*-Gen kloniert wurde, kann mit Hilfe einer Farbreaktion festgestellt werden, ob das Bakterium ein religiertes oder rekombiniertes Plasmid aufgenommen hatte.

Für die Durchführung einer Blau-Weiß-Selektion wurde die LB-Agarplatte, die bereits entsprechende Selektionsantibiotika enthielt, zusätzlich mit 20 µL IPTG-Lösung und 20 µL X-Gal-Lösung (siehe Tabelle 5-14) überschichtet. Nachdem die Transformation, wie unter 5.7.3.1 beschrieben, durchgeführt worden war, wurde der gesamte Transformationsansatz auf der überschichteten LB-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C 14-16 h inkubiert.

### **5.7.5 Intergenerische Konjugation**

Um Plasmid-DNA in *S. espanaensis* oder *S. albus* einzubringen, wurde die intergenerische Konjugation, abgewandelt nach Kieser *et al.*, verwendet <sup>[2]</sup>. Dabei wurde die DNA ausgehend von einem *E. coli* Donorstamm auf den Actinomyceten als Rezipienten übertragen. Basis dieser Methode ist das Konjugationssystem des *E. coli*-Plasmids RP4, das eine stark relaxierte Rezipientenspezifität aufweist. So ermöglichen die Mobilisierungsfaktoren dieses Plasmids den Transfer von Plasmiden, die den RP4 origin of Transfer (*oriT*) enthalten, auch in artfremde Organismen <sup>[212]</sup>. Um Restriktionsbarrieren zu unterlaufen wurde als Donor der methylierungsdefiziente Stamm *E. coli* ET 12567 verwendet (siehe Tabelle 5-28), der das RP4-Derivat pUZ8002 (siehe Tabelle 5-26) enthält.

#### **5.7.5.1 Vorbereitung des Donorstammes**

CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* ET12567 × pUZ8002-Zellen wurden mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Die Selektion auf Transformanden erfolgte mit Kanamycin (30 µg/mL) auf Anwesenheit von pUZ8002 (siehe Tabelle 5-26), und mit einem weiteren Selektionsantibiotikums auf die Anwesenheit

---

des zu mobilisierenden Plasmids (siehe Tabelle 5-26 beziehungsweise Tabelle 5-27). Um einen dichten *E. coli*-Bewuchs auf einer Agarplatte zu erhalten, wurden die Transformanden großflächig ausgestrichen und unter Selektionsdruck über Nacht bei 37 °C inkubiert. Waren diese Platten noch nicht ausreichend dicht bewachsen, wurde mit Hilfe einer Impföse so viel Zellmaterial wie möglich abgenommen, auf einer neuen LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und nochmals über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von dieser dicht bewachsenen Platte wurde mit einer Impföse die Hälfte der *E. coli* Biomasse abgenommen und mit dem Rezipienten vermischt.

#### **5.7.5.2 Vorbereitung des Rezipienten**

50 mL TSB-Flüssigkultur wurde mit 400 µL einer *S. espanaensis*- beziehungsweise *S. albus*-Dauerkultur beimpft und 16 h bei 28 °C im Schüttelturm bei 180 rpm inkubiert. Pro Konjugationsansatz wurde je 1 mL Kultur abzentrifugiert (7.000 rpm, 3 min), mit 1 mL frischem TSB-Flüssigmedium gewaschen und erneut abzentrifugiert (7.000 rpm, 3 min). Dem erhaltenen Pellet wurden 700 µL TSB-Medium zugegeben.

#### **5.7.5.3 Konjugation**

Zur Konjugation wurde der Rezipient mit dem Donorstamm sorgfältig gemischt. Dieses Gemenge wurde auf eine MS-Platte (siehe Tabelle 5-23) aufgebracht und flächig ausgestrichen. Nach 8 h Inkubation bei 28 °C wurde die Platte mit 400 µg/mL Fosfomycin und einem weiteren, für das zu übertragende Plasmid spezifischen Selektionsantibiotikum überschichtet. Dazu wurden entsprechende Volumina der Antibiotika-Stocklösungen (siehe Tabelle 5-12) in 1 mL H<sub>2</sub>O gelöst und durch Schwenken auf der Platte verteilt. Die getrocknete Platte wurde bei 28 °C inkubiert. In der Regel wurden Exkonjuganten von *S. espanaensis* nach 6-7 Tagen, für *S. albus* nach 3-4 Tagen erhalten. Die Exkonjuganten wurden gepickt und auf antibiotikahaltige TSB-Platten überführt.

#### **5.7.6 In vivo Glycosylierungsexperimente**

Zur Durchführung von *in vivo* Glycosylierungsexperimenten im analytischen Maßstab wurde vom gewünschten Bakterienstamm *S. espanaensis*, *S. erythraea*, *S. albus* oder einer Mutante eine Vorkultur hergestellt (siehe 5.7.2). 2 mL dieser Kultur wurde verwendet um 100 mL NL111-Medium (siehe Tabelle 5-24) in einem 300-mL-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und einer Metallspirale zu beimpfen. Dem Medium wurde bei Bedarf entsprechende Selektionsantibiotika zugegeben (siehe Tabelle 5-12). Nach 24 h Inkubation bei 28 °C in einem Schüttelturm mit einer Umdrehungszahl von 180 rpm wurden 20 µL einer Testlösung zugegeben. Die Testsubstanzen (siehe Tabelle 5-2) lagen als 25 mg/mL-Stammlösungen in DMSO vor. Während der weiteren Kultivierung bei 28 °C im Schüttelturm wurde diese Zugabe jeweils im Abstand von 12 h viermal wiederholt. Im Anschluss an die letzte Zugabe wurde die Kultur weitere drei Tage kultiviert, bevor sie auf Glycosylierungsprodukte untersucht wurde.

Im präparativen Maßstab wurden mehrere einzelne Kolben mit derselben Bakterienkultur beimpft. Den Hauptkulturen wurden fünfmal jeweils 40 µL Testlösung zugegeben. Der Zeitpunkt der Zugaben und die weitere Kultivierung erfolgten analog dem analytischen Maßstab.

## 5.8 Methoden der Molekularbiologie

### 5.8.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Je nach gewünschtem Reinheitsgrad und benötigter Konzentration der DNA wurden verschiedene Methoden für die DNA-Isolierung angewendet. Die isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 5.8.1.1 Plasmidminipräparation

Die Plasmidisolierung im Mini-Maßstab beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und wurde abgewandelt nach einem Protokoll von Sambrook *et al.* durchgeführt <sup>[192]</sup>. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 5-9 aufgeführt.

*E. coli*-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in 2 mL LB-Medium (siehe Tabelle 5-21) mit dem entsprechenden Antibiotikum inkubiert. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (14.000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in jeweils 200 µL Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µL Puffer P2 zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Puffer P3 wurde die Mischung invertiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA gefällt (siehe 5.8.4) und in 30 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Die mit Hilfe dieser Methode isolierte DNA wurde für Restriktionsanalysen und Klonierungsexperimente verwendet.

#### 5.8.1.2 Plasmidmaxipräparation

Größere Plasmidmengen mit einem höheren Reinheitsgrad wurden durch Aufreinigung der Plasmid-DNA mit Hilfe des PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Midiprep System Kits (siehe Tabelle 5-7) erhalten. Die DNA-Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers Promega. Die erhaltene DNA wurde in 600 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde für Klonierungsexperimente und als Stocklösung verwendet.

#### 5.8.1.3 Plasmidisolierung zur Sequenzierung

Für Auftragssequenzierungen wurde die Plasmid-DNA in kleinem Maßstab mit hohem Reinheitsgrad isoliert. Hierfür wurde das Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System oder das innuPREP Plasmid Mini Kit (siehe Tabelle 5-7) verwendet. Die Isolierung erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller. Die gewonnene DNA wurde in 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen.

---

## 5.8.2 Isolierung genomischer DNA aus Actinomyceten-Stämmen

Die Isolierung von genomischer DNA aus *S. espanaensis*, *S. erythraea*, *S. albus* und deren Mutanten erfolgte nach einem Protokoll von Kieser *et al.* <sup>[2]</sup> Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 5-10 aufgeführt.

30 mL einer frischen Bakterienkultur (siehe 5.7.2) wurden 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 mL SET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µL Lysozym-Lösung 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 140 µL Proteinase K-Lösung zugegeben und gemischt. Nach der Zugabe von 600 µL SDS-Lösung wurde vorsichtig invertiert und bei 55 °C inkubiert bis eine klare Lösung erhalten wurde. Anschließend wurde die entstandene Lösung mit 2 mL NaCl-Lösung und 5 mL Chloroform versetzt, 20 min durch ständiges Invertieren gemischt und abzentrifugiert (5.000 rpm, 15 min, 20 °C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Für den Fall, dass nach der Zentrifugation keine Phasentrennung erfolgt war, wurde die Mischphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Protokoll ab der Zugabe von Chloroform wiederholt. Zur gesamten wässrigen Phase wurden 0,6 Volumenteile (VT) Isopropanol gegeben. Eine Pasteurpipette wurde an der Flamme eines Bunsenbrenners zu einem Häkchen geschmolzen. Mit der Hilfe dieses Häkchens konnte die ausgefallene genomische DNA aus dem Reaktionsgefäß gefischt werden. Die DNA wurde in ein 2 mL-Eppendorfgefäß überführt, mit Ethanol (70 % (V/V)) gewaschen, getrocknet und in 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Die Qualität und Konzentration der genomischen DNA wurde elektrophoretisch in einem 0,7 %igen Agarosegel bestimmt (siehe 5.8.6). Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

## 5.8.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde bei der 4base lab GmbH in Reutlingen in Auftrag gegeben. Ausgehend von mindestens 300 ng Plasmid-DNA wurden mit Hilfe von vektorspezifischen Standardprimern oder genspezifischen Primern automatisch prozessierte Sequenzdaten erhalten.

Die Sequenzierung des Genoms von *S. espanaensis* wurde von den GenBioCom Projektpartnern Jörn Kalinowski und Christian Rückert von CeBiTec an der Universität Bielefeld durchgeführt <sup>[154]</sup>. Zweimal 10 µg DNA wurden verwendet um eine 3k Paired End und eine Whole Genome Shotgun Library für die Pyrosequenzierung an einem Genome Sequencer FLX von Roche herzustellen. Insgesamt 1.536.941 Shotgun Reads (404.849.780 bp) wurden zu 352 Contigs in fünf Scaffolds zusammengefügt. Die verbliebenen Lücken wurden durch das Sequenzieren einer Fosmid-Bibliothek und 69 gezielt klonierten PCR-Produkten geschlossen.

## 5.8.4 DNA-Fällung und Konzentrierung

Um eine Konzentrierung von in Lösung befindlicher DNA zu erreichen, wurde eine Fällung mit Isopropanol durchgeführt <sup>[192]</sup>. Dabei wird gleichzeitig eine Befreiung von niedermolekularen Verunreinigungen erreicht. Hierzu wurde die DNA-haltige Lösung durch Zugabe von 0,8-1,0 VT eiskalter Isop-

ropanol (-20 °C) gefällt. Die gefällte DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) pelletiert und mit 200 µL eiskaltem Ethanol (70 % (V/V)) gewaschen. Um störende Reste von Ethanol zuverlässig zu entfernen, wurde das Pellet für 5 min im Wärmeschrank bei 65 °C getrocknet und anschließend im gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (10-100 µL) gelöst.

### 5.8.5 Restriktionsanalyse von DNA

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde gemäß der vom Hersteller angegebenen enzyspezifischen Inkubationstemperatur und mit dem jeweils mitgelieferten Puffer über einen Zeitraum von 1,5 h durchgeführt. Im analytischen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µL 1 µL Enzym eingesetzt. Bei einem präparativen Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 70 µL 3 µL je Restriktionsendonuklease eingesetzt. Der Enzymanteil betrug maximal 10 % des Gesamtvolumens, um eine Inhibierung der Reaktion durch das im Lagerungspuffer des Enzyms enthaltene Glycerin zu vermeiden. Falls erforderlich wurden die Restriktionsenzyme anschließend, entweder durch alkoholische Fällung (siehe 5.8.4) oder mit Hilfe des Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System Kits (siehe Tabelle 5-7) entfernt.

### 5.8.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Herstellung von Agarosegelen und die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wurde nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* durchgeführt<sup>[192]</sup>. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 5-11 aufgeführt.

Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gemischt und in eine Tasche im Agarosegel pipettiert. Die Trennung der DNA erfolgte bei 80-100 V in 1x TAE-Puffer bei Raumtemperatur. Zur Größenabschätzung wurde eine 1 kb-DNA-Leiter von Promega oder NEB verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel in einem wässrigen Ethidiumbromidbad 10-30 min gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden mit einem UV-Transilluminator (Pharmacia) und einer CCD-Kamera (Eagle Eye, Stratagene) dokumentiert.

Für präparative Gele wurden die Taschen des Gels durch das Zusammenkleben der Kamm-Zinken mit Tesafilm vergrößert. Die Trennung der DNA erfolgte bei maximal 80 V. Das Gel wurde anschließend höchstens 10 min in der Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und die gefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. War eine Elution der DNA aus der Agarosematrix nötig, wurde hierfür das Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-up System Kit (siehe Tabelle 5-7) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die isolierte DNA wurde in 30-100 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 5.8.7 Ligation

Für DNA-Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase verwendet (siehe Tabelle 5-6), welche, in Gegenwart von ATP, die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA katalysiert. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µL in ATP-

haltigem Puffer mit 3 units T4-Ligase. Bei Insert / Vektor-Ligationen wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligationen wurden entweder 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert oder bei 4 °C über Nacht. Bei Insert / Vektor-Ligationen, bei denen glatte DNA-Enden miteinander verknüpft werden sollten oder bei denen der Vektor mit nur einem Enzym geschnitten wurde, wurde der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert. Dafür wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit verwendet (siehe Tabelle 5-7). Die Ligationsansätze wurden bei -20 °C eingefroren oder direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (siehe 5.7.3).

### 5.8.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) wurde zur Amplifizierung eines gewünschten DNA-Abschnitts verwendet <sup>[213]</sup>. Die dafür verwendeten Primer wurden von eurofins MWG Operon bezogen. Für jedes zu amplifizierende DNA-Fragment erfolgte eine Anpassung des angegebenen Basis-Temperaturprogramms (siehe Tabelle 5-31). Die Annealingtemperatur (X) wurde an die Schmelztemperaturen der Primer angepasst. Dafür wurde meist eine Gradienten-PCR durchgeführt, bei der in verschiedenen Reaktionsansätzen verschiedene Annealingtemperaturen ausprobiert wurden. Für folgende Amplifikationen wurde die Annealingtemperatur verwendet, bei der die höchste Ausbeute an gewünschtem Produkt mit dem geringsten Anteil an Verunreinigungen synthetisiert wurde. Außerdem wurde die Elongationsdauer (Y) an die Länge des zu amplifizierenden PCR-Produkts und die verwendete Polymerase angepasst. Für analytische Amplifikationen von DNA-Abschnitten wurde *Taq*-Polymerase verwendet. Dieses Enzym synthetisiert circa 1000 bp pro min. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die zur Klonierung verwendet werden sollten, wurde die *Pfu*-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase besitzt eine Korrekturlesefunktion auf Grund ihrer 3' → 5' Exonukleaseaktivität, sie ist deshalb weniger schnell und synthetisiert nur 500 bp pro min. Die Zusammensetzung eines Standardansatzes für PCR-Reaktionen ist in Tabelle 5-32 aufgeführt.

Tabelle 5-31 PCR-Standard-Programm.

PCR Schritt	Dauer	Temperatur	Cyclenzahl
Initiation	2:00 min	94 °C	1
Denaturierung	0:30 min	94 °C	
Annealing	0:30 min	X °C	25
Elongation	Y min	72 °C	
Termination	10:00 min	72 °C	1

Tabelle 5-32 PCR-Standard-Reaktionsansatz.

Komponente	Volumen	Stoffmenge/Enzymmenge
DNA-Matrize	1 $\mu\text{L}$	
<i>Pfu</i> -Puffer, 10x bzw. <i>Taq</i> -Puffer, 10x	10 $\mu\text{L}$	
forward-Primer, 10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$	20 pmol
reverse-Primer, 10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$	20 pmol
DMSO	10 $\mu\text{L}$	
dNTP-Mix, 10 mM	2 $\mu\text{L}$	je Nukleotid 20 nmol
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 99 $\mu\text{L}$	
<i>Pfu</i> -Polymerase bzw. <i>Taq</i> -Polymerase	1 $\mu\text{L}$	circa 5 units circa 5 units

### 5.8.8.1 Stepdown-PCR

Eine Abweichung vom Standard-PCR-Programm wurde notwendig, wenn keine getestete Annealingtemperatur zur Synthese des gewünschten DNA-Abschnitts geführt hatte. In diesem Fall wurde eine Stepdown-PCR durchgeführt. Bei einer Stepdown-PCR wurde ausgehend von einer hohen Annealingtemperatur, diese in jedem Zyklus um 1 °C abgesenkt. Nach zehn Zyklen wurden weitere 20 Zyklen angehängt, bei denen die bis dahin niedrigste Annealingtemperatur verwendet wurde. Dieses Verfahren soll die Ausbeute an gewünschten PCR-Produkten erhöhen.

### 5.8.8.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein Verfahren um einzelne Bakterienklone auf das Vorhandensein bestimmter DNA-Abschnitte zu untersuchen, ohne zuerst DNA zu isolieren.

#### PCR mit *E. coli*-Kolonien als Template

Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, als Sicherung der Kolonie auf eine frische LB-Agarplatte überstrichen und samt Zahnstocher in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß mit 50  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> überführt. Das Eppendorfgefäß wurde bei geöffnetem Deckel 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der Zahnstocher entfernt, das Gefäß verschlossen und auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 1 min) und 1  $\mu\text{L}$  des Überstands als Template für die PCR verwendet.

#### PCR mit Actinomyceten-Kolonien als Template

Ein Teil einer einzelnen Actinomyceten-Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und samt Zahnstocher in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß mit 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> überführt. Das Eppendorfgefäß wurde bei geöffnetem Deckel 7 min bei 95 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde der

Zahnstocher entfernt, das Gefäß verschlossen und auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 1 min) und 10 µL des Überstands als Template für die PCR verwendet.

*S. albus* und dessen Mutanten eignen sich nicht für eine Kolonie-PCR. Für diesen Stamm muss genomische DNA als Template für eine PCR eingesetzt werden.

### 5.8.8.3 In dieser Arbeit verwendete Primer

In Tabelle 5-33 sind alle Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, nach Projekten geordnet aufgeführt. Tabelle 5-34 zeigt die exakten PCR-Bedingungen. Die Spezifischen PCR-Bedingungen für die Primer zum Nachweis einer Single- und einer Doppelcrossover-Mutante sind in Tabelle 5-35 aufgelistet.

Tabelle 5-33 Verwendete Primer. Die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
<b>Primer zur Klonierung und zum Nachweis von Saccharomicin-Biosynthesegenen</b>		
PALf-Eco <sup>[80]</sup>	CCGCTGGGA <u>ATTCT</u> GCGGCACGG	EcoRI
PALr-Xba <sup>[80]</sup>	GCCCTCGT <u>TCTAGAC</u> CCCGTGCGG	XbaI
3MO-f-Xba-Hind <sup>[80]</sup>	CCGCGT <u>TCTAGACCAAGCTT</u> CACCTCAGC	XbaI, HindIII
3MO-r2-Eco <sup>[80]</sup>	GCGCGGA <u>ATTCAT</u> CGGGTGCC	EcoRI
sam7-EV-f	TATAG <u>ATATCAGA</u> ACTCCGAGTACGGCCGGTACC	EcoRV
sam7-EI-r	TATAG <u>AATTCGTTCC</u> ACGACCTGCGTCACCTTGT	EcoRI
Sam36-f	TATAG <u>CGGCCGCCT</u> ATTCGTATTCCACATCGCCTGG	NotI
Sam36-r	TATAG <u>CGGCCGCCG</u> CGCTACTTCGGCAGCAG	NotI
<b>Primer zum Nachweis der markerfreien Intergration der dTDP-Rhamnose Biosynthesegene</b>		
aac(3)IV-f <sup>[214]</sup>	ACGTACCA <u>AAGCTT</u> GGTTCATGTGCAGCTCCATCAGC	HindIII
aac(3)IV-r <sup>[214]</sup>	ACGTACG <u>AATTCATG</u> AGCTCAGCCAATCGACTGG	EcoRI
oleU-f	CCCATGAGATGGCTGATCAC	---
oleU-r	GCACGCCTCGTTTCATGCTG	---
<b>Primer zur heterologen Expression von <i>ses11290</i>, <i>ses60310</i>, <i>ses60350</i> und <i>sace_2010</i></b>		
698-f	GTCCCACA <u>AAGCTT</u> GCGGCTACCTCCAG	HindIII
698-r	GGCGACCG <u>AATTC</u> TCCCGTCCACTCG	EcoRI
7665-f	GAATGCCG <u>GAAATTCAT</u> CGGGTGTCG	EcoRI
7665-r	GCGTCCC <u>GGATCC</u> GTCGAACACCTC	BamHI
7668-f	CGCAGGCACCGAG <u>AATTC</u> GGGCAGC	EcoRI
7668-r	GTTCGGGCGCTAGCC <u>GGATCC</u> GAAAC	BamHI
Sace_2010-f	ATATA <u>AAGCTT</u> CCACGCGCAGTGACGAATC	HindIII
Sace_2010-r	ATATG <u>AATTCG</u> ACGCGGCCCGCACG	EcoRI

Fortsetzung von Tabelle 5-33 Verwendete Primer. Die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses44520</i></b>		
6130-EcoRIXbaI-f	GCGAAGGCGGA <u>ATTC</u> GGCCTGAGGCCGGGACCTG	EcoRI
6130-EcoRIXbaI-r	GCCGACTCTAGAGAGACTGGCGAAGAGCACGCGC	XbaI
6130-HindIIIXbaI-f	GACGAGTCTAGACGCGCCCTGCCGGACCTCGCCTAG	XbaI
6130-HindIIIXbaI-r	CGCTGCCGGAGGA <u>AAGCTT</u> TTCGAAGGCGTGAAGC	HindIII
6130-dx-f	GTTCCGGTGGTGGACATCCGTT	---
6130-dx-r	CGGCTAGCTTCGGTACAGCTCTC	---
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses45900</i></b>		
6265+6266-HX-f	CGCGGCA <u>AAGCTT</u> CCCCACCTCTCGTGCCGG	HindIII
6265+6266-HX-r	GACCAGTCTAGACACGACGAAGAGGAACCTGCTCAC	XbaI
6265+6266-MX-f	CCACCTTCTAGAGCTGGCGGCGCGGTCGCCCGTCCG	XbaI
6265+6266-MX-r	GCGCACTATTAAGTACCAATTGTGAGGTATTATCCC	MunI
6266-xx-f	ACGTGGTCGGCAACTCCTTC	---
6266-xx-r	ACGGAICTGTCATCGTGTT	---
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses47640</i></b>		
6449-HindIIIXbaI-f	GCGCGTCCGGGA <u>AAGCTT</u> GGTCAG	HindIII
6449-HindIIIXbaI-r	CACGAATCTAGACCAGGTGGGGGACATACCGCGTG	XbaI
6449-EcoRIXbaI-f	CGCGGGTCTAGAGAGGAACAGGATGTGTGCGGGC	XbaI
6449-EcoRIXbaI-r	CCGGACGAATTCTGCGGTTACGTTGTCGTGCCAGGC	EcoRI
6449-xx-f	CGGCCATCGATTCTAGATCACGCGGTATG	XbaI
6449-xx-r	GCGGCCACAGCTGCAGGTCGTT	PstI
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses49200</i></b>		
6609-MunIXbaI-f	CCAACAGATGATACAACATGTCTCAATTGAGACGCTG	MunI
6609-MunIXbaI-r	CACGACTCTAGACGCCTGCTGCCCCACTACGCGTG	XbaI
6609-HindIIIXbaI-f	CGAATCGACGTCTAGATGGTCGCAACGG	XbaI
6609-HindIIIXbaI-r	GCCCCGAAGCTTGACGACCACCATCGGCTCGTT	HindIII
6609xx-f	TCGGGTTTCACGCGTAGTCG	---
6609xx-r	CTGACCGTCACGTCCGTGAT	---
<b>Primer zur Inaktivierung <i>ses60310</i></b>		
7665-PX-f	GACCGTCTGACTGCAGCCGGCAGAAC	PstI
7665-PX-r	CGGATGCCGTGCCTCTAGACCGC	XbaI
7665-EX-f	GAGGCGGTGCTCTAGAACGGGCTGG	XbaI
7665-EX-r	GGTCTCCACGAGGCCGAATTCTCTC	EcoRI

Fortsetzung von Tabelle 5-33 Verwendete Primer. Die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
<b>Primer zur Synthese von Ses60310 mit His<sub>6</sub>-tag</b>		
7665-N-his-f	TATAG <u>CTAGCAT</u> GGGTACGATCGAGCCG	NheI
7665-N-his-r	TATA <u>AAGCTT</u> CAGGAGCCGCGGAACAG	HindIII
7665-C-his-f	TATAC <u>CCATGG</u> GTTACGATCGAGCCGGTGAAG	NcoI
7665-C-his-r	AATT <u>CTCGAG</u> CAAGCGGGCGTACTCGGACAG	XhoI

Tabelle 5-34 Spezifische PCR-Bedingungen.

Primerpaar	Polymerase	Annealingtemperatur	Elongationszeit	zur Amplifizierung von (erwartete Fragmentlänge)
<b>Primer zur Klonierung und zum Nachweis von Saccharomicin-Biosynthesegenen</b>				
PALf-Eco / -Xba <sup>[80]</sup>	<i>Pfu</i>	62 °C	3:00 min	<i>sam8</i> (1,5 kb)
3MO-f-Xba-Hind / -Eco <sup>[80]</sup>	<i>Pfu</i>	62 °C	3:00 min	<i>sam5</i> (1,7 kb)
sam7-EV-f / -r	<i>Pfu</i>	68,6 °C	2:30 min	<i>sam7</i> (1,3 kb)
sam36-f / -r	<i>Pfu</i>	68,6 °C	5:00 min	<i>sam36</i> (2,5 kb)
<b>Primer zum Nachweis der markerfreien Intergration der dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene</b>				
aac(3)IV-f / -r <sup>[214]</sup>	<i>Pfu</i>	60,0 °C	2:00 min	<i>aac(3)IV</i> (0,9 kb)
oleU-f / -r	<i>Pfu</i>	58,3 °C	2:00 min	<i>oleU</i> (0,9 kb)
<b>Primer zur heterologen Expression von <i>ses11290</i>, <i>ses60310</i>, <i>ses60350</i> und <i>sace_2010</i></b>				
698-f / -r	<i>Pfu</i>	56,5 °C	3:30 min	<i>ses11290</i> (1,9 kb)
7665-f / -r	<i>Pfu</i>	56,5 °C	3:30 min	<i>ses60310</i> (1,3 kb)
7668-f / -r	<i>Taq</i>	56,5 °C	1:15 min	<i>ses60350</i> (1,2 kb)
Sace_2010-f / -r	<i>Pfu</i>	46,6 °C	2:30 min	<i>sace_2010</i> (1,3 kb)
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses44520</i></b>				
6130-EcoRIXbaI-f / -r	<i>Pfu</i>	64,5 °C	5:00 min	6130-EX (2,8 kb)
6130-HindIIIXbaI-f / -r	<i>Pfu</i>	64,5 °C	5:00 min	6130-HX (2,8 kb)
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses45900</i></b>				
6265+6266-HindIIIXba-f / -r	<i>Pfu</i>	57,3 °C	5:00 min	6266-HX (2,6 kb)
6265+6266-MunIXba-f / -MX-r	<i>Taq</i>	62,7 °C	5:00 min	6266-MX (2,8 kb)
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses47640</i></b>				
6449-HindIIIXbaI-f / -r	<i>Pfu</i>	70,0 °C	5:00 min	6449-HX (2,8 kb)
6449-EcoRIXbaI-f / -r	<i>Pfu</i>	60,9 °C	5:00 min	6449-EX (2,5 kb)

Fortsetzung von Tabelle 5-34 Spezifische PCR-Bedingungen.

Primerpaar	Polymerase	Annealing-temperatur	Elongationszeit	zur Amplifizierung von (erwartete Fragmentlänge)
<b>Primer zur Inaktivierung von <i>ses49200</i></b>				
6609–MunIXbaI-f / -r	<i>Taq</i>	51,8 °C	2:00 min	6609-MX (2,1 kb)
6609–HindIIIxbaI-f / -r	<i>Pfu</i>	70,0 °C	5:00 min	6609-HX (2,5 kb)
<b>Primer zur Inaktivierung <i>ses60310</i></b>				
7665-PX-f / -r	<i>Pfu</i>	58,3 °C	5:10 min	7665-PX (2,6 kb)
7665-EX-f / -r	<i>Pfu</i>	58,3 °C	4:50 min	7665-EX (2,4 kb)
<b>Primer zur Synthese von <i>Ses60310</i> mit His<sub>6</sub>-tag</b>				
7665-N-his-f / -r	<i>Pfu</i>	58,3 °C	2:30 min	<i>ses60310</i> (1,2 kb)
7665-C-his-f / -r	<i>Pfu</i>	58,3 °C	2:30 min	<i>ses60310</i> (1,2 kb)

## 5.9 Konstruktion von Plasmiden

Alle Vektoren und Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit als Basis zur Klonierung neuer Plasmide verwendet wurden, sind in Tabelle 5-26 aufgelistet. Die neu synthetisierten Plasmide sind in Tabelle 5-27 zusammengefasst. Die Plasmidkarten der neu klonierten Plasmide sind im Anhang unter 7.6 zu finden. Alle Primer, die zur Amplifikation von zu klonierenden Genen verwendet wurden sind in Tabelle 5-33, die PCR Bedingungen in Tabelle 5-34 aufgeführt. Alle neu klonierten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit überprüft. Enthielten die Plasmide DNA-Abschnitte die mittels PCR amplifiziert wurden, wurden diese Bereiche zusätzlich mittels Sequenzierung überprüft.

### 5.9.1 Klonierung von Saccharomicin-Biosynthesegenen

#### 5.9.1.1 *pTESb-sam8+5*

Die Gene *sam8* und *sam5* aus dem Saccharomicin-Cluster wurden in den integrativen Vektor *pTESb* kloniert. Dieser Vektor kann verwendet werden um die beiden Gene unter der Kontrolle des *ermEp1*-Promotors markerfrei in ein Actinomycetengenom zu integrieren<sup>[143]</sup>.

Hierfür wurden die Gene *sam5* und *sam8* über *HindIII* und *XbaI* aus dem Plasmid *pMB9* ausgeschnitten und in den *HindIII*- und *XbaI*-geöffneten Vektor *pUC931* subkloniert. Die beiden Gene wurden aus dem resultierenden Plasmid *pUC931-sam8+5* anschließend über *NheI* und *EcoRV* erneut ausgeschnitten und in den *XbaI*- und *EcoRV*-geöffneten Vektor *pTESb* kloniert.

#### 5.9.1.2 *pSET\*sam7*

Das Gen *sam7* soll in Actinomyceten überexprimiert werden. Zu diesem Zweck sollte das Gen unter der Kontrolle des *ermE\**-Promotors in den integrativen Vektor *pTAJA* kloniert werden.

Das Gen *sam7* wurde mit Hilfe der Primer *sam7-EV-f* und *sam7-EV-r* amplifiziert. Als Template diente *cos35*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine *EcoRI*- und eine *EcoRV*-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es anschließend in den ebenfalls mit *EcoRI*- und *EcoRV*-geöffneten Vektor *pTAJA* kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um *pSET\*sam7*.

### **5.9.1.3 *pTOS\*sam7+5+8***

Die Gene *sam8*, *sam5* und *sam7* aus dem Saccharomicin-Cluster sollen in Actinomyceten überexprimiert werden. Dafür sollten alle drei Gene unter der Kontrolle des *ermE\**-Promotors in das markerfreie Expressionssystem *pTOS* kloniert werden.

Zuerst wurden die Gene *sam5* und *sam8* einzeln subkloniert. Über *EcoRI* und *HindIII* wurde *sam5* aus dem Plasmid *pTESb-sam5+8* ausgeschnitten und in den ebenfalls *EcoRI*- und *HindII*-geöffneten Vektor *pLITMUS 28i* kloniert. Das resultierende Plasmid ist *pLit28-sam5*. Das Gen *sam8* wurde über *EcoRI* aus *pTESb-sam5+8* ausgeschnitten und in den *EcoRI*-geöffneten Vektor *pLITMUS 28i* kloniert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus konnte das Plasmid *pLit28-sam8* von *pLit28-sam8-inv* unterschieden werden.

Anschließend wurde das Gen *sam5* über *StuI* und *SnaBI* aus dem Vektor *pLit28-sam5* ausgeschnitten und in den *BsaBI*-geöffneten Vektor *pSET\*sam7* kloniert. Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem gewünschten Plasmid *pSET\*sam7+5* und *pSET\*sam7+5-inv*, bei dem das Gen *sam5* gegen die Richtung des Promotor kloniert wurde, unterschieden werden. Im Anschluss daran wurden die beiden Gene *sam7* und *sam5* zusammen mit dem *ermE\**-Promotor über *PvuII* aus diesem Plasmid ausgeschnitten und in den *SnaBI*-geöffneten Vektor *pTOS* kloniert. Mittels Restriktionsverdau konnte ermittelt werden, ob es sich bei dem erhaltenen Plasmid um das gewünschte *pTOS\*sam7+5* oder um *pTOS\*sam7+5-inv* handelt. Zuletzt wurde das Gen *sam8* über *XbaI* und *SpeI* aus dem Vektor *pLit28-sam8* ausgeschnitten und in das *SpeI*-geöffnete Plasmid *pTOS\*sam7+5* kloniert. Erneut konnte mit Hilfe eines Restriktionsverdaus zwischen dem gewünschten Plasmid *pTOS\*sam7+5+8* und *pTOS\*sam7+5+8-inv*, bei dem das Gen *sam8* gegen die Richtung des Promotor kloniert wurde, unterschieden werden.

### **5.9.1.4 *pTOS\*sam7+5+8+36***

Das Gen *sam36* soll zusammen mit *sam7*, *sam5* und *sam8* in Actinomyceten überexprimiert werden. Dafür sollten alle vier Gene unter der Kontrolle des *ermE\**-Promotors in das markerfreie Expressionssystem *pTOS* kloniert werden.

Das Gen *sam36* wurde mit Hilfe der Primer *sam36-f* und *sam36-r* amplifiziert. Als Template diente *cos17*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich zwei *NotI*-Schnittstellen eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es anschließend in den ebenfalls mit *No-*

---

tI-geöffneten Vektor pTOS\*sam7+5+8 kloniert werden. Mit Hilfe eines Restriktionsverdau konnte zwischen dem gewünschten Plasmid pTOS\*sam7+5+8+36 und pTOS\*sam7+5+8+36-inv, bei dem das Gen *sam36* gegen die Richtung des Promotor kloniert wurde, unterschieden werden.

## 5.9.2 Klonierung von pTOS-Rham

Die dTDP-Rhamnose-Biosynthesegene *oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU* sollen markerfrei ins Genom von *S. albus* integriert werden. Dafür wurde das Plasmid pTOS-Rham konstruiert.

Aus dem Plasmid pRHAM wurde über HindIII eine Kasette bestehend aus *oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU* unter der Kontrolle des ermE\*-Promotors ausgeschnitten und in den HindIII-geöffneten Vektor pTOS kloniert. Mittels eines Restriktionsverdau konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pTOS-Rham und pTOS-Rham-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

## 5.9.3 Klonierung von Glycosyltransferasegenen

### 5.9.3.1 pUWL-A-698

Zur heterologen Expression von *ses11290* in *S. albus* Rham wurde das Expressionskonstrukt pUWL-A-698 kloniert. Dafür wurde das Gen *ses11290* mit Hilfe der Primer 698-f und 698-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine HindIII- und eine EcoRI-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es in den ebenfalls mit HindIII- und EcoRI-geöffneten Vektor pUWL-A kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pUWL-A-698.

### 5.9.3.2 pUWL-A-7665

Zur heterologen Expression von *ses60310* in *S. albus* Rham wurde das Expressionskonstrukt pUWL-A-7665 kloniert. Dafür wurde das Gen *ses60310* mit Hilfe der Primer 7665-f und 7665-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine EcoRI- und eine BamHI-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es in den ebenfalls mit EcoRI- und BamHI-geöffneten Vektor pUWL-A kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pUWL-A-7665.

### 5.9.3.3 pUWL-A-7668

Zur heterologen Expression von *ses60350* in *S. albus* Rham wurde das Expressionskonstrukt pUWL-A-7668 kloniert. Dafür wurde das Gen *ses60350* mit Hilfe der Primer 7668-f und 7668-r amplifiziert. Als Template diente das Fosmid fos5a8. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine EcoRI- und eine BamHI-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es in den ebenfalls mit EcoRI- und BamHI-geöffneten Vektor pUWL-A kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pUWL-A-7668.

#### **5.9.3.4 pUWL-A-sace\_2010**

Zur heterologen Expression von *sace\_2010* in *S. albus* Rham wurde das Expressionskonstrukt pUWL-A-sace\_2010 kloniert. Dafür wurde das Gen *sace\_2010* mit Hilfe der Primer *sace\_2010-f* und *sace\_2010-r* amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. erythraea*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine EcoRI- und eine HindIII-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es anschließend in den ebenfalls mit EcoRI- und HindIII-geöffneten Vektor pUWL-A kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pUWL-A-sace\_2010.

### **5.9.4 Klonierung von Inaktivierungskonstrukten**

#### **5.9.4.1 pKCA6130**

Zur Erstellung des Inaktivierungskonstrukts wurden zwei DNA-Abschnitte amplifiziert. Der Abschnitt 6130-HX ist homolog zum DNA-Bereich upstream, der Abschnitt 6130-EX ist homolog zum DNA Bereich downstream von *ses44520*. 6130-HX wurde unter Verwendung der Primer 6130-HindIII<sub>XbaI</sub>-f und 6130-HindIII<sub>XbaI</sub>-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine XbaI- und eine HindIII-Schnittstelle eingebracht. 6130-EX wurde unter Verwendung der Primer 6130-EcoRI<sub>XbaI</sub>-f und 6130-EcoRI<sub>XbaI</sub>-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine EcoRI- und eine XbaI-Schnittstelle eingebracht.

6130-HX wurde mit HindIII und XbaI verdaut und in den ebenfalls mit HindIII- und XbaI-geöffneten Vektor pKC1132 kloniert. Das resultierende Plasmid pKC1132+6130-HX wurde mit XbaI und EcoRI geöffnet und mit dem XbaI- und EcoRI-verdauten PCR-Produkt 6130-EX ligiert. Durch Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem dabei erhaltenen Plasmid um pKC1132+6130-HX-EX handelt. Anschließend wurde aus dem Plasmid pLERE-Spec-oriT über XbaI und SpeI ein 1,5 kb großes DNA-Stück, bestehend aus loxLE-loxLE-loxRE-*aadA*-oriT-loxRE ausgeschnitten und in den XbaI-geöffneten Vektor pKC1132+6130-HX-EX kloniert. Mittels eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pKCA6130 und pKCA6130-Spec-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

#### **5.9.4.2 pKCA6266**

Zur Erstellung des Inaktivierungskonstrukts wurden zwei DNA-Abschnitte amplifiziert. Der Abschnitt 6266-HX ist homolog zum DNA-Bereich upstream, der Abschnitt 6266-MX ist homolog zum DNA Bereich downstream von *ses45900*. 6266-HX wurde unter Verwendung der Primer 6265+6266-HindIII<sub>XbaI</sub>-f und 6265+6266-HindIII<sub>XbaI</sub>-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine XbaI- und eine HindIII-Schnittstelle eingebracht. 6266-MX wurde unter Verwendung der Primer 6265+6266-MunIXbaI-f und 6265+6266-MX-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis* und die

PCR wurde ohne die übliche Zugabe von DMSO durchgeführt (siehe Tabelle 5-32). Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine *MunI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle eingebracht.

6266-HX wurde mit *HindIII* und *XbaI* verdaut und in den ebenfalls mit *HindIII*- und *XbaI*-geöffneten Vektor pKC1132 kloniert, dabei entstand pKC1132+6266-HX. 6266-MX wurde unverdaut in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy subkloniert. Anschließend wurde 6266-MX über *EcoRI* und *XbaI* erneut ausgeschnitten und in den *EcoRI*- und *XbaI*-geöffneten Vektor pKC1132+6266-HX kloniert. Durch Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem dabei erhaltenen Plasmid um pKC1132+6266-HX-MX handelt. Anschließend wurde aus dem Plasmid pLERE-Spec-oriT über *XbaI* und *SpeI* ein 1,5 kb großes DNA-Stück, bestehend aus *loxLE-loxLE-loxRE-aadA-oriT-loxRE* ausgeschnitten und in den *XbaI*-geöffneten Vektor pKC1132+6266-HX-MX kloniert. Mittels eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pKCΔ6266 und pKCΔ6266-Spec-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

#### 5.9.4.3 pKCΔ6449

Zur Erstellung des Inaktivierungskonstrukts wurden zwei DNA-Abschnitte amplifiziert. Der Abschnitt 6449-HX ist homolog zum DNA-Bereich downstream, der Abschnitt 6449-EX ist homolog zum DNA Bereich upstream von *ses47640*. 6449-HX wurde unter Verwendung der Primer 6449–*HindIII*XbaI-f und 6449–*HindIII*XbaI-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine *XbaI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle eingebracht. 6449-EX wurde unter Verwendung der Primer 6449–*EcoRI*XbaI-f und 6449–*EcoRI*XbaI-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine *EcoRI*- und eine *XbaI*-Schnittstelle eingebracht.

6449-HX wurde mit *HindIII* und *XbaI* verdaut und in den ebenfalls mit *HindIII*- und *XbaI*-geöffneten Vektor pKC1132 kloniert. Das resultierende Plasmid pKC1132+6449-HX wurde mit *XbaI* und *EcoRI* geöffnet und mit dem *XbaI*- und *EcoRI*-verdauten PCR-Produkt 6449-EX ligiert. Durch Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem dabei erhaltenen Plasmid um pKC1132+6449-HX-EX handelt. Anschließend wurde aus dem Plasmid pLERE-Spec-oriT über *XbaI* und *SpeI* ein 1,5 kb großes DNA-Stück, bestehend aus *loxLE-loxLE-loxRE-aadA-oriT-loxRE* ausgeschnitten und in den *XbaI*-geöffneten Vektor pKC1132+6449-HX-EX kloniert. Mittels eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pKCΔ6449 und pKCΔ6449-Spec-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

#### 5.9.4.4 pKCΔ6609

Zur Erstellung des Inaktivierungskonstrukts wurden zwei DNA-Abschnitte amplifiziert. Der Abschnitt 6609-HX ist homolog zum DNA-Bereich upstream, der Abschnitt 6609-MX ist homolog zum DNA Bereich downstream von *ses49200*. 6609-HX wurde unter Verwendung der Primer 6609–*HindIII*XbaI-f und 6609–*HindIII*XbaI-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von

*S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine XbaI- und eine HindIII-Schnittstelle eingebracht. 6609-MX wurde unter Verwendung der Primer 6609-MunIXbaI-f und 6609-MunIXbaI-r amplifiziert. Als Template diente genomische DNA von *S. espanaensis*. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine MunI- und eine XbaI-Schnittstelle eingebracht.

6609-HX wurde mit HindIII und XbaI verdaut und in den ebenfalls mit HindIII- und XbaI-geöffneten Vektor pKC1132 kloniert. Das resultierende Plasmid pKC1132+6609-HX wurde mit XbaI und EcoRI geöffnet und mit dem XbaI- und MunI-verdauten PCR-Produkt 6609-MX ligiert. Durch Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem dabei erhaltenen Plasmid um pKC1132+6609-HX-MX handelt. Anschließend wurde aus dem Plasmid pLERE-Spec-oriT über XbaI und SpeI ein 1,5 kb großes DNA-Stück, bestehend aus loxLE-loxLE-loxRE-*aadA*-oriT-loxRE ausgeschnitten und in den XbaI-geöffneten Vektor pKC1132+6609-HX-MX kloniert. Mittels eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pKCΔ6609 und pKCΔ6609-Spec-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

#### **5.9.4.5 pKCΔ7665**

Zur Erstellung des Inaktivierungskonstrukts wurden zwei DNA-Abschnitte amplifiziert. Der Abschnitt 7665-EX ist homolog zum DNA-Bereich downstream, der Abschnitt 7665-PX ist homolog zum DNA Bereich upstream von *ses60310*. 7665-EX wurde unter Verwendung der Primer 7665-EX-f und 7665-EX-r amplifiziert. Als Template diente fos5a8. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine XbaI- und eine EcoRI-Schnittstelle eingebracht. 7665-PX wurde unter Verwendung der Primer 7665-PX-f und 7665-PX-r amplifiziert. Als Template diente fos5a8. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine PstI- und eine XbaI-Schnittstelle eingebracht.

7665-EX wurde mit EcoRI und XbaI verdaut und in den ebenfalls mit EcoRI- und XbaI-geöffneten Vektor pKCXY02 kloniert. Das resultierende Plasmid pKCXY02+7665-EX wurde mit XbaI und PstI geöffnet und mit dem XbaI- und PstI-verdauten PCR-Produkt 7665-PX ligiert. Durch Sequenzierung, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem dabei erhaltenen Plasmid um pKCXY02+7665-EX-PX handelt. Anschließend wurde aus dem Plasmid pLERE-Spec-oriT über XbaI und SpeI ein 1,5 kb großes DNA-Stück, bestehend aus loxLE-loxLE-loxRE-*aadA*-oriT-loxRE ausgeschnitten und in den XbaI-geöffneten Vektor pKCXY02+7665-EX-PX kloniert. Mittels eines Restriktionsverdaus konnte zwischen dem resultierenden Plasmid pKCΔ7665 und pKCΔ7665-Spec-inv, bei dem das Insert in der umgekehrten Richtung ligiert wurde, unterschieden werden.

### **5.9.5 Klonierung des Komplementierungskonstrukts pSET-7665**

Für die Komplementierung der Inaktivierungsmutante *S. espanaensis* Δ*ses60310* soll das GT-Gen *ses60310* unter der Kontrolle des ermE up-Promotors in einen integrativen Vektor kloniert werden. Dafür wurde das Gen *ses60310* über KpnI und BamHI aus dem Plasmid pUWL-A-7665 ausgeschnit-

ten und in den KpnI und BglII geöffneten Vektor pSET-1cerm kloniert. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pSET-7665.

## 5.9.6 Klonierung von Plasmiden zur Proteinpräparation

### 5.9.6.1 pET28a-7665-N-his

Zur Expression des GT-Gens *ses60310* zusammen mit einem N-His<sub>6</sub>-tag und einer Thrombin Schnittstelle in *E. coli* wurde das Expressionskonstrukt pET28a-7665-N-his erstellt. Dafür wurde das Gen *ses60310* mit Hilfe der Primer 7665-N-his-f und 7665-N-his-r amplifiziert. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine NheI- und eine HindIII-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es anschließend in den ebenfalls mit NheI- und HindIII-geöffneten Vektor pET28a(+) kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pET28a-7665-N-his.

### 5.9.6.2 pET28b-7665-C-his

Zur Expression des GT-Gens *ses60310* zusammen mit einem C-His<sub>6</sub>-tag wurde das Expressionskonstrukt pET28b-7665-C-his erstellt. Dafür wurde das Gen *ses60310* mit Hilfe der Primer 7665-C-his-f und 7665-C-his-r amplifiziert. Als Template diente pUWL-A-7665. Über die Primer wurden in das PCR-Produkt künstlich eine NcoI- und eine XhoI-Schnittstelle eingebracht. Nach dem Restriktionsverdau dieses PCR-Fragments konnte es anschließend in den mit NcoI- und SalI-geöffneten Vektor pET28btev-x12 kloniert werden. Bei dem resultierenden Plasmid handelt es sich um pET28a-7665-C-his.

## 5.10 Geninaktivierung in *S. espanaensis*

Die Inaktivierung spezifischer Gene im Genom von *S. espanaensis* wurde angelehnt an eine von Kieser *et al.* beschriebene Methode durchgeführt. Dabei wird das Zielgen durch die Insertion von Fremd-DNA inaktiviert. Mit Hilfe eines Doppelcrossovers kann das native Gen durch das mutierte Gen ersetzt werden <sup>[2]</sup>.

### 5.10.1 Erstellung von Inaktivierungskonstrukten

Zur Erstellung der Inaktivierungskonstrukte wurden jeweils zwei 2 bis 2,8 kb lange Rekombinationsabschnitte amplifiziert. Der eine Abschnitt, homolog zum DNA-Bereich upstream des Zielgens, trug einen Teil des Genstarts. Der andere DNA-Abschnitt war homolog zur DNA downstream und trug einen Teil vom Ende des Gens. Beide homologen Bereiche wurden so in ein Suizidplasmid kloniert, dass Start und Ende des Gens direkt aneinander ligiert wurden. Zwischen die homologen Bereiche wurde anschließend eine Kassetten bestehend aus einem Spectinomycinresistenzgen und einem *oriT*, flankiert von zwei *loxP*-sites, kloniert. Durch diese Insertion war der größte Teil in der Mitte des Zielgens mutiert. Die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Inaktivierungskonstrukte ist unter 5.9.4 beschrieben.

### 5.10.2 Gewinnung und Nachweis einer Singlecrossover-Mutante

Die Inaktivierungskonstrukte wurden mittels Konjugation in *S. espanaensis* eingebracht. Dabei wurde auf das Apramycinresistenzgen im Vektoranteil der Inaktivierungskonstrukte selektiert. Es wurden nur dann apramycinresistente Exkonjuganden erhalten, wenn eine Rekombination von einem der beiden homologen Bereiche des Plasmids mit dem Genom von *S. espanaensis* erfolgt war.

Zum Nachweis, dass es sich bei den erhaltenen apramycinresistenten Exkonjuganden um Singlecrossover-Mutanten handelt, wurde eine PCR durchgeführt. Es wurden Primer abgeleitet die kurz vor dem Start und kurz nach dem Ende des Zielgens binden. Singlecrossover-Mutanten tragen sowohl das native als auch das mutierte Gen im Genom. Auf Grund der Insertion des Spectinomycinresistenzgens ist das mutierte Gen deutlich größer als das native Gen. Deshalb zeigt diese PCR für eine Singlecrossover-Mutante je zwei unterschiedlich lange Fragmente für das native und das mutierte Gen. Die PCR-Bedingungen und die erwarteten Fragmentlängen für den Nachweis des erfolgreichen Erhalts der im Rahmen dieser Arbeit generierten Singlecrossover-Mutanten sind in Tabelle 5-35 aufgelistet.

**Tabelle 5-35 PCR-Bedingungen zum Nachweis von Single- und Doppelcrossover-Mutanten. Aufgelistet sind die verwendeten Primer und die Abweichungen von den Standard-PCR-Bedingungen (siehe Tabelle 5-31 und Tabelle 5-32). Es ist angegeben, welche Fragmentlängen für ein natives und für ein mutiertes Gen erhalten wurden.**

Zielgen	Primer-paar	verwendete Polymerase	Annealing-temperatur	Elongationszeit	Länge natives Gen	Länge mutiertes Gen
<i>ses44520</i>	6130-dx-f 6130-dx-r	<i>Pfu</i>	55,2 °C	4 min	1,6 kb	2,1 kb
<i>ses45900</i>	6266-xx-f 6266-xx-r	<i>Taq</i>	62,0 °C	2 min	1,6 kb	2,1 kb
<i>ses47640</i>	6449-xx-f 6449-xx-r	<i>Taq</i>	56,5 °C	2 min	1,6 kb	1,9 kb
<i>ses49200</i>	6609-xx-f 6609-xx-r	<i>Pfu</i>	61,0 °C	3 min	1,3 kb	1,6 kb
<i>ses60310</i>	7665-f 7665-r	<i>Pfu</i>	56,5 °C	3:30 min	1,3 kb	1,8 kb

### 5.10.3 Gewinnung und Nachweis einer Doppelcrossover-Mutante

Zum Erhalt einer Doppelcrossover-Mutante wurde eine Singlecrossover-Mutante mehrfach passagiert. Dazu wurde eine einzelne Kolonie in 50 mL spectinomycinhaltiges TSB-Flüssigmedium gegeben und 24 h bei 28°C im Schüttelturm bei 180 rpm inkubiert. Von dieser ersten Passage wurde 1 mL in frisches Medium überimpft und erneut inkubiert. Nach 10 bis 12 solcher Passagen wurde mit der Flüssigkultur eine Verdünnung in TSB-Medium hergestellt (1:10 bis 1:10<sup>7</sup>) und ausplattiert. Von den Platten, auf denen Einzelkolonien gewachsen waren (meistens ab der 1:10<sup>5</sup> Verdünnung), wurden 250 bis

350 Klone auf Verlust der Apramycinresistenz durch das zweite Crossover-Ereignis getestet. Dies gelang durch Überimpfen der Klone auf apramycin- und spectinomycinhaltiges TSB-Festmedium. Eine Rastervorlage, welche auf die Platten angelegt wurde, erlaubte später die Zuordnung identischer Klone. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation der Selektionsplatten konnten apramycinsensitive und spectinomycinresistente Klone identifiziert werden.

Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist im Fall der Inaktivierung von *ses60310* angewendet worden. Das verwendete Inaktivierungsplasmid pKCXY02 trägt das Markergen *gusA*<sup>[215]</sup>. Dieses Gen codiert für eine  $\beta$ -Glucuronidase, die das Substrat X-Gluc in einen blauen Indigofarbstoff umwandeln kann. Nach der zehnten Passage einer Singlecrossover-Mutante wurden ebenfalls Einzelklone generiert. Diese wurden dann mit 20  $\mu$ L X-Gluc Lösung (siehe Tabelle 5-15) überschichtet. Nach 24 h Inkubation bei 28 °C im Wärmeschrank konnten Kolonien, die das *gusA* Gen im Genom tragen anhand ihres blauen Phänotyps identifiziert werden. Bei diesen blauen Kolonien handelt es sich um Singlecrossover-Mutanten. Die gewünschten Doppelcrossover-Mutanten haben das *gusA* Gen verloren und haben den ursprünglichen Phänotyp. Die Blaufärbung der Singlecrossover-Mutanten ist jedoch zum Teil nur schwach zu erkennen. Deshalb wurde um richtige von falschen Doppelcrossover-Mutanten zu unterscheiden ebenfalls eine Selektion auf antibiotikahaltigen Platten durchgeführt. Aufgrund der Vorauswahl durch die Koloniefärbung mussten jedoch deutlich weniger Kolonien gepickt werden (circa 20) um eine apramycinsensitive und spectinomycinresistente Doppelcrossover-Mutante zu erhalten.

Mittels PCR wurde nachgewiesen, dass es sich bei den erhaltenen apramycinsensitiven und spectinomycinresistenten Klonen um Doppelcrossover-Mutanten handelt. Die PCR wurde analog zum Nachweis der Singlecrossover-Mutanten durchgeführt (siehe Tabelle 5-35). Für die gewünschten Doppelcrossover-Mutanten wurde nur das längere, dem mutierten Gen entsprechende Fragment erhalten.

## 5.11 Proteinpräparation und Analytik

### 5.11.1 Heterologe Proteinsynthese in *E. coli*

Die Synthese des Zielproteins Ses60310 erfolgte im Stamm *E. coli* BL21 Codon Plus RP x pL1SL2 (siehe Tabelle 5-28) mit dem Expressionskonstrukt pET28a-7665-N-his-TEV (siehe Tabelle 5-26). Es wurde eine Vorkultur in 10 mL LB-Medium mit Kanamycin (30  $\mu$ g/mL), Chloramphenicol (50  $\mu$ g/mL), Ampicillin (50  $\mu$ g/mL) und Glucose (0,2 % (*m/V*)) mit einem Teil einer Dauerkultur (siehe 5.7.1) angeimpft. Nach der Kultivierung für 16 h bei 37 °C im Schüttelturm wurden je 2 mL zum Beimpfen einer Hauptkultur verwendet. Für die Hauptkultur wurden je 100 mL LB-Medium mit Kanamycin (30  $\mu$ g/mL), Chloramphenicol (50  $\mu$ g/mL), Ampicillin (50  $\mu$ g/mL) und Glucose (0,2 % (*m/V*)) in einem 300-mL-Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 bei 28 °C im Schüttelturm bei 180 rpm inkubiert. Nach der Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 bis 0,5 mM wurde für 20 h bei 20 °C im Schüttelturm weiterinkubiert. Anschlie-

ßend wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert

### 5.11.2 Zellaufschluss mittels French Pressure Cell Press

Das verwendete Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 30-50 mL Puffer A resuspendiert (siehe Tabelle 5-18). Die Zellen wurden in einer eisgekühlten French-Press-Zelle (40 K) mit einem Volumen von 35 mL dreimal bei einem Druck von 800-1000 psi aufgeschlossen. Nach Zugabe von 10 µL DNase und einer Inkubation für 20 min auf Eis wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch zweimalige Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, 30 min) abgetrennt.

### 5.11.3 Proteinpräparation mit dem ÄKTA-FPLC-System

Alle chromatographischen Aufreinigungen im präparativen Maßstab wurden an einem ÄKTA-FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie)-System von GE Healthcare bei 4 °C durchgeführt. Dieses System ermöglicht eine Automatisierung und Vereinfachung der Proteinaufreinigung. Als mobile Phase dienen dabei Puffer und Lösungen, die dem System über Schläuche aus einem Reservoir zugeführt werden. Ein konstanter Fluss der mobilen Phase wird von den eingesetzten Pumpen gewährleistet. Als stationäre Phase dienen je nach gewünschter Aufreinigung verschiedene Säulen, mit denen Proteine anhand ihrer Größe, Affinität, Ladung oder Hydrophobizität aufgetrennt werden können. Der Unterschied zur HPLC liegt darin, dass hier nur mit einem Druck bis maximal 3 bis 4 MPa gearbeitet werden kann.

#### 5.11.3.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Das Lysat wurde nach der Zentrifugation in einen Superloop gefüllt und damit auf eine HisTrap FF-Säule geladen, die vorher mit Puffer A (siehe Tabelle 5-18) equilibriert wurde. Zur Elution wurde der entsprechende Puffer B (siehe Tabelle 5-18) verwendet. Die einzelnen Imidazolkonzentrationen wurden von der ÄKTA-FPLC je nach Bedarf aus den beiden Puffern zusammengemischt. Tabelle 5-36 gibt die Säulenparameter und weitere Beschreibungen der Methode wieder.

**Tabelle 5-36 Säulenparameter und Methodenbeschreibung der Affinitätschromatographie.**

Säule	HisTrap FF 5 ml
Säulenmaterial/ Partikelgröße Ø	Ni Sepharose (Agarose) 6 Fast Flow/90 µm
Säulenvolumen	5 mL
Equilibrierung	30 mL Puffer A, Flussrate 2 mL/min
Probeninjektion	30-40 mL, Flussrate 0,5 mL/min
Waschen 1	30 mL Puffer A, Flussrate 1,5 mL/min

**Fortsetzung von Tabelle 5-36 Säulenparameter und Methodenbeschreibung der Affinitätschromatographie.**

Elution	30 mL 7 % Puffer B (35 mM), Flussrate 1-2 mL/min 50 mL 15 % Puffer B (75 mM), Flussrate 1-2 mL/min 30 mL 45 % Puffer B (225 mM), Flussrate 1-2 mL/min
Waschen 2	30 mL 100 % Puffer B (500 mM), Flussrate 2 mL/min 30 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , Flussrate 2 mL/min 30 mL Ethanol (20 % (V/V), Flussrate 2 mL/min
Fraktionsvolumen	2 mL
Wellenlänge der Absorptionsmessung	280 nm

### 5.11.3.2 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie, auch Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie genannt, handelt es sich um ein flüssigchromatographisches Verfahren, bei der die Trennung der Substanzen aufgrund ihrer Molekülgröße erfolgt. Die Reinigung des Proteins durch die Gelpermeationschromatographie wurde im präparativen Maßstab am ÄKTA-FPLC-System durchgeführt. Dazu wurden die proteinhaltigen Fraktionen der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie zunächst vereinigt, konzentriert und auf die mit Gelfiltrations-Puffer (siehe Tabelle 5-18) equilibrierte Säule aufgetragen. In Tabelle 5-37 sind die entsprechenden Parameter und die weitere Beschreibungen der Methode zu finden.

**Tabelle 5-37 Säulenparameter und Methodenbeschreibung der Gelfiltration.**

Säule	HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade
Säulenmaterial/ Partikelgröße Ø	Agarose/Dextran/34 µm
Säulenvolumen	120-124 mL
Equilibrierung	120 mL Gelfiltrations-Puffer, Flussrate 0,3 bis 1 mL/min
Probeninjektion	maximal 1,2 mL konzentrierte Proteinlösung, Flussrate 0,4 mL/min
Elution	120 mL Gelfiltrations-Puffer, Flussrate 0,4 bis 1 mL/min
Waschen	120 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , Flussrate 0,3 bis 1 mL/min 120 mL Ethanol (20 % (V/V), Flussrate 0,3 bis 1 mL/min
Fraktionsvolumen	2 mL
Wellenlänge der Absorptionsmessung	280 nm

### 5.11.4 Proteinkonzentrierung

Die Konzentrierung von Proteinlösungen nach der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und der Gel-permeationschromatographie erfolgte durch Ultrafiltration bei 4 °C. Hierzu wurden Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 Konzentratoren (siehe Tabelle 5-8) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet. Die Konzentratoren wurden bei 5.000 rpm zentrifugiert, die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem zu zentrifugierenden Volumen, der Proteinkonzentration und dem Zustand des Konzentrators.

### 5.11.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die Methode nach Edelhoch verwendet<sup>[216]</sup>. Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann unter Zuhilfenahme des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration berechnet werden (Gleichung 2), sofern der molare dekadische Extinktionskoeffizient des Proteins bekannt ist<sup>[217]</sup>. Durch Addition der Extinktionskoeffizienten aller Tryptophan-, Tyrosin- und Cysteinreste, die zur Absorption bei 280 nm beitragen, kann für den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ein theoretischer Wert bestimmt werden (Gleichung 3). Die Werte, die für das Protein Ses60310 verwendet wurden, sind in Tabelle 5-38 aufgelistet.

$$c \left[ \frac{mg}{mL} \right] = \frac{A_{280} * M_r \left[ \frac{g}{mol} \right]}{\epsilon \left[ \frac{L}{mol * cm} \right] * d [cm]} \quad \text{Gleichung 2}$$

A<sub>280</sub>            Absorption bei λ = 280 nm

M<sub>r</sub>              Molekülmasse des Proteins

d                Schichtdicke der Küvette

$$\epsilon_{280} = n_{Trp} * 5500 + n_{Tyr} * 1490 + n_{Cys-S-S-Cys} * 125 \left[ \frac{L}{mol * cm} \right] \quad \text{Gleichung 3}$$

n<sub>Trp/Tyr</sub>        Anzahl der jeweiligen Aminosäuren im Protein

n<sub>Cys-S-S-Cys</sub>    Anzahl der Disulfidbrücken

ε<sub>280</sub>            molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm

**Tabelle 5-38 Eingesetzte Parameter zur Konzentrationsbestimmung von Ses60310.**

Molekülmasse von Ses60310 mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag und TEV-Schnittstelle	43286,3 g/mol
Schichtdicke der Küvette	1 cm
n <sub>Trp</sub>	3
n <sub>Tyr</sub>	7
n <sub>Cys-S-S-Cys</sub>	0
ε <sub>280</sub>	26.930 L/mol*cm

### 5.11.6 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse verwendet <sup>[218]</sup>. Es wurden 4 %ige Sammelgele und 12 %ige Trenngele verwendet (siehe Tabelle 5-19). Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SDS-Ladepuffer (siehe Tabelle 5-19) versetzt und für 5 min bei 98 °C oder Raumtemperatur inkubiert. 10-20 µL der Proben wurden auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA/Gel durchgeführt und abgebrochen, nachdem die Bromphenolblau-Bande die untere Gelkante erreicht hatte. Gefärbt wurden die Gele in heißer Coomassieblau-Färbelösung (siehe Tabelle 5-19) für 60 min. Nach der Entfärbung (siehe Tabelle 5-19) wurden die Gele eingescannt und zur Konservierung in einem Trockengestell zwischen zwei Einmachfolien getrocknet.

### 5.11.7 *In vitro* Aktivitätsassays

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der Proteinaktivität wurden Aktivitätsassays durchgeführt. Alizarin wurde dabei als Substrat, dTDP-Rhamnose als Zuckerdonor eingesetzt. Das Enzym Ses60310 soll die Reaktion zu 2- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin (AliPro1) und dTDP katalysieren. Die verwendeten Stocklösungen sind in Tabelle 5-20 beschrieben. Der Erfolg und der Verlauf der Reaktion wurden entweder durch eine HPLC/ESI-MS-Analyse, oder photometrisch ermittelt.

#### 5.11.7.1 Bestimmung der Reaktionsprodukte mittels HPLC/ESI-MS

Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde ein Aktivitätsassay mit anschließender HPLC/ESI-MS-Analytik durchgeführt. Die Zusammensetzung des Assays ist in Tabelle 5-39 aufgelistet. Nach 1 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µL Ethylacetat gestoppt. Anschließend wurde als interner Standard 10 µL einer methanolischen Suspension von U2 zugegeben. Die Ethylacetat-Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der Reaktionsansatz wurde erneut mit 200 µL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mittels Speedvac bis zur Trockne eingedampft und in 200-300 µL Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde filtriert und mit der Methode tina3 an der HPLC/ESI-MS analysiert (siehe 5.12.5.2).

**Tabelle 5-39 Zusammensetzung des Aktivitätsassays zur Bestimmung mittels HPLC/ESI-MS.**

Bestandteil	eingesetzte Menge Stocklösung	Endkonzentration
Enzym	variabel	5 µM
Alizarin	10 µL	0,2 mM
TRIS-Puffer	5 µL	0,025 mM
BSA	5 µL	0,5 mg/mL
MgCl <sub>2</sub>	0,25 µL	2,5 mM
dTDP-Rhamnose	2 µL	0,2 mM
TCEP	1 µL	1 mM
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 µL	

Die Menge an produziertem AliPro1 wurde mit Hilfe des internen Standards bestimmt. Als Standard wurde U2 gewählt, da das UV-Spektrum von U2 dem von Alizarin und AliPro1 ähnelt, die Retentionszeiten von U2, Alizarin und AliPro1 sich jedoch eindeutig unterscheiden. Aus diesem Grund kann durch den Vergleich der Peakflächen auf die Stoffmenge des gebildeten Produkts geschlossen werden. Durch den Bezug auf den internen Standard können Fehler, die bei der Extraktion und Probenaufbereitung aufgetreten sind, eliminiert werden. Gleichung 4 zeigt die Berechnung der Stoffmenge von AliPro1 aus den Peakflächen.

$$n(\text{AliPro1}) = \frac{A(\text{AliPro1}) \cdot n(\text{U6})}{A(\text{U6}) \cdot f} \quad \text{Gleichung 4}$$

n(AliPro1)	Stoffmenge an erhaltenem AliPro1 in der analysierten Probe
A(AliPro1)	Peakfläche von AliPro1
n(U6)	Stoffmenge an eingespritztem U6
A(U6)	Peakfläche von U6
f	Korrekturfaktor

Der Korrekturfaktor f ist substanzspezifisch und wird experimentell ermittelt. Er soll unterschiedliches Verhalten der beiden verglichenen Substanzen ausgleichen, wie zum Beispiel Unterschiede in der Absorption oder der Extrahierbarkeit. Zur Bestimmung von f wird eine definierte Menge zu analysierende Substanz mit internem Standard gemischt, aufbereitet und analysiert. Anhand der erhaltenen Peakflächen kann f berechnet werden. Da die Substanz AliPro1 nicht kommerziell erhältlich ist und deshalb nicht in ausreichender Menge zu Verfügung stand, wurde der f-Wert statt mit AliPro1 mit Alizarin bestimmt. Damit ist der verwendete f-Wert nur eine Näherung, da sich die Substanzen Alizarin und AliPro1 zwar ähnlich, aber nicht vollkommen identisch verhalten. Tabelle 5-40 zeigt die f-Werte für Alizarin und U6, die bei verschiedenen pH-Werten jeweils dreifach bestimmt wurden.

**Tabelle 5-40 f-Werte von Alizarin und U6 bei verschiedenen pH-Werten.**

pH	f-Wert (1)	f-Wert (2)	f-Wert (3)	f-Wert Ø
6,0	1,553	1,347	1,546	1,482
7,0	1,355	1,478	1,329	1,387
8,0	1,517	1,893	1,502	1,637
8,5	1,604	1,633	1,467	1,568
8,8	1,086	1,203	1,302	1,197
9,0	1,663	1,587	---	1,625
9,5	2,049	1,918	1,761	1,909

### 5.11.7.2 Photometrische Bestimmung des Reaktionsverlaufs

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der betrachteten Enzymreaktion wurde die von Y. Schmidt vorgeschlagene photometrische Bestimmung der Aktivität durchgeführt <sup>[83]</sup>. Dabei wird angelehnt an Gosselin *et al.* die Menge an freigesetztem dTDP bestimmt <sup>[189]</sup>. Das dTDP soll mit PEP durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat und dTTP umgesetzt werden. Das Pyruvat kann anschließend zusammen mit NADH durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat und NAD<sup>+</sup> reagieren. NADH besitzt ein Absorptionsmaximum bei 340 nm, die oxidierte Form NAD<sup>+</sup> absorbiert bei dieser Wellenlänge nicht. Damit kann die Abnahme von NADH photometrisch bestimmt werden. Diese Abnahme entspricht der Zunahme an freigesetztem dTDP und damit der Bildung von AliPro1.

Die Zusammensetzung des photometrischen Assays ist in Tabelle 5-41 aufgelistet. Der Reaktionsansatz wurde ohne das Enzym Ses60310 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Damit soll gewährleistet werden, dass das in der dTDP-Rhamnose-Lösung möglicherweise vorhandenes dTDP abreagieren kann. Nach der Zugabe des Enzyms wurde die Absorption für 3 min am Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer gemessen und mit Hilfe des Programms SWIFT II aufgezeichnet.

**Tabelle 5-41 Zusammensetzung des photometrischen Aktivitätsassays.**

Bestandteil	eingesetzte Menge Stocklösung	Endkonzentration
Enzym	variabel	5 µM
Alizarin	10 µL	0,2 mM
TRIS-Puffer	5 µL	0,025 mM
BSA	5 µL	0,5 mg/mL
MgCl <sub>2</sub>	0,25 µL	2,5 mM
dTDP-Rhamnose	2 µL	0,2 mM
TCEP	1 µL	1 mM
PEP	1 µL	0,7 mM
NADH	1 µL	0,15 mM
PK und LDH	4 µL	je 3,6 units
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 100 µL	

## 5.12 Isolierung und Analytik von bakteriellen Sekundärstoffen

### 5.12.1 Extraktion glycosylierter Biotransformationsprodukte und Kaffeesäure

Zur Extraktion der Biotransformationsprodukte aus *in vivo* Glycosylierungsexperimenten wurde die Bakterienkultur auf pH 7 eingestellt, zur Extraktion von Kaffeesäure auf pH 3,2. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und der Überstand ein- bis zweimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Mycel wurde mit 40 mL Ethylacetat versetzt und mindestens

10 min lang regelmäßig geschüttelt. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden mit wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und über einen Cellulosefilter filtriert. Die organische Phase wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockne eingeengt. Die Analyse des Rohextrakts erfolgte in methanolischer Lösung über HPLC/ESI-MS (siehe 5.12.5).

### 5.12.2 Festphasenextraktion

Zur Fraktionierung eines Rohextrakts und damit zur Aufkonzentrierung eines gewünschten Biotransformationsprodukts wurde eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde die Oasis<sup>®</sup> HLB 20 35 cc (6g) verwendet (siehe Tabelle 5-8). Die Säule wurde zuerst mit absteigender Konzentration Methanol konditioniert, bis eine Konzentration von 30 % (V/V) Methanol erreicht worden war. Anschließend wurde die Säule mit dem Rohextrakt, der in 10 mL 30 %igem Methanol (V/V) gelöst worden war, beladen. Da sich der Gesamtextrakt nicht vollständig in 30 %igem Methanol (V/V) löste, wurde der ungelöste Teil abzentrifugiert (5.000 rpm, 5 min) und nur der gelöste Teil des Rohextrakts auf die Säule aufgetragen. Danach wurden die unterschiedlichen Fraktionen des Rohextraktes mit 100 mL eines aufsteigenden Methanol-Gradienten von der Säule eluiert, wobei die Methanolkonzentration bei jedem Elutionsschritt um 10 % erhöht wurde. Jede Fraktion wurde einzeln aufgefangen. Bevor mit einem neuen Elutionsschritt begonnen wurde, wurde der verbliebene, ungelöste Rohextrakt in 10 mL des neuen Eluenten aufgenommen und durch Behandlung im Ultraschallbad gelöst. Ungelöste Teile wurden unter den oben genannten Bedingungen erneut abzentrifugiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden bis zur Trockene eingeengt und mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Tabelle 5-42 zeigt die gereinigten Biotransformationsprodukte, das Ausgangsmaterial und die Fraktion mit der die gewünschte Substanz eluiert wurde.

**Tabelle 5-42 Biotransformationsprodukte, die mittels SPE aufkonzentriert wurden. Das Ausgangsmaterial und die Elutionsfraktion sind angegeben.**

Biotransformations- produkt	Ausgangsmaterial Rohextrakt von	SPE-Fraktion
AliProN	<i>S. albus</i> Rham x pUWL-A-7665 gefüttert mit Alizarin	80-90 %
AliPro2	<i>S. espanaensis</i> gefüttert mit Alizarin	60 %
AliPro4	<i>S. espanaensis</i> Δ 7665 gefüttert mit Alizarin	100 %
AliC1	<i>S. espanaensis</i> gefüttert mit Alizarin	60-70 %
U3-21	<i>S. erythraea</i> gefüttert mit U3	100 %
U3-8	<i>S. erythraea</i> gefüttert mit U3	60 %
Sace_15	<i>S. erythraea</i> gefüttert mit Alizarin	60-70 %

### 5.12.3 Präparative Dünnschichtchromatographie

Nach der Vorreinigung mittels SPE wurde für die weitere Reinigung der Biotransformationsprodukte die präparative Dünnschichtchromatographie (DC) gewählt. Dazu wurde der in Methanol gelöste Ex-

trakt auf eine DC-Fertigplatte Adamant UV<sub>254</sub> (Kieselgel 60, siehe Tabelle 5-8) aufgetragen. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (9:1 (V/V), 0,1 % Essigsäure) oder Acetonitril und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (85:10 (V/V), 0,1 % Essigsäure) verwendet. Die Platte mit aufgetragenem Rohextrakt wurde über eine Auftrennstrecke von 12 cm in einer DC-Kammer entwickelt. Die gewünschte Bande wurde mit Hilfe eines Skalpell aus der DC-Platte ausgekratzt und mit Methanol extrahiert. Die Methanol-Extraktion wurde solange wiederholt bis keine Färbung des Methanols mehr zu erkennen war. Der methanolische Extrakt wurde über einen 0,4 µm-Filter filtriert und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockne eingengt. Die Analyse des erhaltenen Extrakts erfolgte in methanolischer Lösung über HPLC/ESI-MS (siehe 5.12.5.2). Die gereinigten Biotransformationsprodukte, das verwendete Fließmittel und die zugehörigen R<sub>F</sub>-Werte sind in Tabelle 5-43 aufgelistet.

**Tabelle 5-43 Biotransformationsprodukte, die mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt wurden. Die verwendeten Fließmittel und R<sub>F</sub>-Werte sind angegeben.**

Biotransformationsprodukt	Fließmittel	R <sub>F</sub> -Wert
AliProN	Dichlormethan / Methanol	0,42
AliPro2	Acetonitril / Wasser	0,18
AliPro4	Dichlormethan / Methanol	0,70
AliC1	Acetonitril / Wasser	0,39
U3-21	Dichlormethan / Methanol	0,33
U3-8	Acetonitril / Wasser	0,72
Sace_15	Acetonitril / Wasser	0,17

#### 5.12.4 Säulenchromatographie

Die abschließende Reinigung der mit SPE und DC vorgereinigten Biotransformationsprodukte AliPro2, AliC1, U3-8 und Sace\_15 erfolgte mit Hilfe der Säulenchromatographie. Als Sorbens wurde Sephadex LH 20 und als Elutionsmittel Methanol verwendet. Nach einem zwölfstündigen Quellvorgang des Sorbens in Methanol wurde die Säule befüllt. Der aufzureinigende Extrakt wurde im Elutionsmittel gelöst und möglichst konzentriert auf die Säule aufgetragen. Die erhaltenen Fraktionen wurden gesammelt, mittels HPLC/ESI-MS auf vorhandene Sekundärstoffe überprüft und wenn möglich vereint.

#### 5.12.5 Analytische HPLC/ESI-MS

Zur Analyse von bakteriellen Sekundärstoffen mittels HPLC/ESI-MS wurde das Agilent 1100 System verwendet. Die Auftrennung von Kaffeesäure erfolgte über ein Säulensystem bestehend aus einer Vorsäule XBridge<sup>TM</sup> C18 (20 mm × 4,6 mm; Partikelgröße: 3,5 µm) und einer Xbridge<sup>TM</sup> C18-Säule (100 mm × 4,6 mm; Partikelgröße: 3,5 µm) als Hauptsäule. Die glycosylierten Biotransformationsprodukte wurden über eine Zorbax Eclipse XDB-C8 Säule (150 mm ×

4,6 mm; Partikelgröße: 5 µm) mit einer Zorbax XDB-C8 Vorsäule (12,5 mm × 4,6 mm; Partikelgröße: 5 µm) aufgetrennt. Als Detektoren kamen ein Diodenarray-Detektor (DAD) und ein Quadrupol Massendetektor (MSD) zum Einsatz. Die Ionisierung der Analyten erfolgte mit einer ESI-Quelle (electrospray ionization). Die Parameter der Ionisationsquelle sind in Tabelle 5-44 gelistet. Die zur Analyse von glycosylierten Biotransformationsprodukten und Kaffeesäure verwendeten Gradienten und weitere Einstellungen sind in der Methode sam1 und tina3 beschrieben. Die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software LC/MSD ChemStation Rev. A. 09.03.

**Tabelle 5-44 Parameter der ESI-Ionisationsquelle.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Drying gas flow	12 L/min
Drying gas temperature	350 °C
Nebulizer pressure	50 psig
Capillary voltage (Vcap positive)	3.000 V
Capillary voltage (Vcap negative)	3.000 V

#### **5.12.5.1 Methode sam1**

Die Methode sam1 wurde zur Analyse von Kaffeesäure und deren Derivate verwendet. Tabelle 5-45 zeigt die spezielle Parameter der Methode, Tabelle 5-46 zeigt den verwendeten Gradienten.

**Tabelle 5-45 Spezielle Parameter der Methode sam1.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Fluss	0,5 mL/min
Temperatur des Säulenofens	28 °C
Laufmittel A	Acetonitril mit 0,5 % Essigsäure
Laufmittel B	H <sub>2</sub> O mit 0,5 % Essigsäure
MSD Scan	100-500 Da; MSD(+), MSD(-) Modus

**Tabelle 5-46 HPLC/ESI-MS-Gradient sam1 zur Analyse von Kaffeesäure und deren Derivate.**

<b>Zeit [Zeit]</b>	<b>Laufmittel A [%]</b>	<b>Laufmittel B [%]</b>
0	10	90
3	10	90
9	30	70
12	50	50
18	95	5

Fortsetzung von Tabelle 5-46 HPLC/ESI-MS-Gradient sam1 zur Analyse von Kaffeesäure und deren Derivate.

Zeit [Zeit]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
20	95	5
22	10	90
32	10	90

Detektion: 345 nm (Ref. 600 nm), 310 nm (Ref. 500), 279 nm (Ref. 500 nm), 250 nm (Ref. 400 nm)

### 5.12.5.2 Methode tina3

Die Methode tina3 wurde zur Analyse von glycosylierten Biotransformationsprodukten verwendet. Tabelle 5-47 zeigt die spezielle Parameter der Methode, Tabelle 5-48 zeigt den verwendeten Gradienten.

Tabelle 5-47 Spezielle Parameter der Methode tina3.

Parameter	Einstellung
Fluss	0,7 mL/min
Temperatur des Säulenofens	30 °C
Laufmittel A	Acetonitril
Laufmittel B	H <sub>2</sub> O mit 0,5 % Essigsäure
MSD Scan	100-1100 Da; MSD(+), MSD(-) Modus

Tabelle 5-48 HPLC/ESI-MS-Gradient tina3 zur Analyse von glycosylierten Biotransformationsprodukten.

Zeit [Zeit]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	20	80
9	33	67
16	50	50
20	70	30
24	95	5
29	95	5
30	20	80
35	20	80

Detektion: 254 nm (Ref. 360 nm), 480 nm (Ref. 800), 360 nm (Ref. 580 nm), 430 nm (Ref. 600 nm); 550 nm (Ref. 700 nm)

### 5.12.6 Strukturaufklärung mittels NMR

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe durch NMR-Spektroskopie (**nuclear magnetic resonance**). Die Strukturaufklärung der gebildeten Biotransformationsprodukte erfolgte durch unsere Kooperationspartner Elke Brötz und Dr. Thomas Paululat an der Universität Siegen. Durch Aufnahmen von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren konnten die entsprechenden Atome detektiert werden und über Kopplungen zwischen den verschiedenen Atomgruppen deren Position im Molekülgerüst bestimmt werden. Alle Spektren wurden auf einer Varian VNMR-S 600-Apparatur aufgenommen. Neben 1D-NMR-Experimenten wurden auch folgende 2D-NMR-Experimente durchgeführt:  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY (**correlation spectroscopy**), TOCSY (**total correlation spectroscopy**),  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMBC (**heteronuclear multiple bond correlation**), HSQC (**heteronuclear single quantum coherence**) H2BC (**heteronuclear 2-bond correlation**) und ROESY (**rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy**). Alle NMR-Experimente, die zur Strukturaufklärung der unterschiedlichen Biotransformationsprodukte durchgeführt wurden, sind in Tabelle 5-49 aufgeführt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das verwendete Lösungsmittel bezogen.

**Tabelle 5-49** Durchgeführte NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Biotransformationsprodukten.

<b>Biotransforma- tionsprodukt</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>NMR-Experimente</b>
<b>AliProN</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , 1D-/2D-TOCSY, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, HSQC, ROESY
<b>AliPro2</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , 1D-TOCSY, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY
<b>AliPro4</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC
<b>AliC1</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY
<b>U3_21</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMBC, H2BC
<b>U3_8</b>	DMSO-d <sub>6</sub>	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , 1D-TOCSY, $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY
<b>Sace_15</b>	CD <sub>3</sub> OD	$^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC, ROESY

### 5.13 *In silico* Genom-Analyse

Die zur *in silico* Genom-Analyse verwendete Software und Internetservices sind in Tabelle 5-30 aufgelistet. Zur Identifizierung von Sekundärstoff-Clustern wurden die Bakteriengenome mittels BLAST-Suche <sup>[115]</sup> auf Ähnlichkeiten zu bekannten Naturstoffclustern untersucht. Die manuellen Untersuchungen wurden mit antiSMASH <sup>[116]</sup> unterstützt. Ein DNA-Abschnitt mit mehreren Genen wurde als Cluster identifiziert, wenn zumindest eines dieser Gene für eine Sekundärstoffsynthese codiert. Folglich wurde ein DNA-Abschnitt, der nur eine einzige Domäne einer Sekundärstoffsynthese besitzt, wie zum Beispiel eine Adenylierungs-Domäne, nicht als Cluster eingestuft. Die Grenzen der Cluster wurden definiert als das letzte Gen upstream und downstream einer Sekundärstoffsynthese mit Homologie zu

einem Gen, das für einen Regulator, einen Transporter oder ein modifizierendes Enzym codiert. Für den Fall, dass dieses Gen Teil eines putativen Operons ist, wurde das ganze Operon in das Cluster integriert. Der Aufbau der Module von PKS vom Typ I oder von NRPS wurde mit Hilfe der Internetservices PKS/NRPS Analysis <sup>[209]</sup> und SBSPKS <sup>[210]</sup> bestimmt. Die Spezifitäten von Adenylierungs-Domänen wurden mit Hilfe des NRPSpredictor2 <sup>[208]</sup> untersucht.

Die vollständige Genomsequenz von *S. espanaensis* ist in der EMBL Datenbank [EMBL:HE804045] <sup>[154]</sup> hinterlegt. Die Vorsilbe der Genbezeichnungen „BN6\_“, die vom ENA (European Nucleotide Archive) vergeben wurde, wurde in dieser Arbeit durch „Ses“ ersetzt.



---

## 6 LITERATUR

- [1] B. Efron (1979) Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann.Statist.*, 7, 1-26.
- [2] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Charter and D. A. Hopwood (2000) *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- [3] A. Linnenbrink (2009) Gewinnung glycosylierter Naturstoffe durch Biotransformation in *Saccharothrix espanaensis* sowie funktionelle Charakterisierung dreier Polyketidbiosynthesecluster aus dem Mensacarcinproduzenten *Streptomyces* sp. Gö C4/4. Dissertation Universität Freiburg.
- [4] J. Cortes, K. E. Wiesmann, G. A. Roberts, M. J. Brown, J. Staunton and P. F. Leadlay (1995) Repositioning of a domain in a modular polyketide synthase to promote specific chain cleavage. *Science*, 268, 1487-1489.
- [5] L. Rodriguez, C. Oelkers, I. Aguirrezabalaga, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez and J. A. Salas (2000) Generation of hybrid elloramycin analogs by combinatorial biosynthesis using genes from anthracycline-type and macrolide biosynthetic pathways. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.*, 2, 271-276.
- [6] I. Ueki and M. H. Stipanuk (2009) 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue have a high capacity for taurine synthesis by the cysteine dioxygenase/cysteinesulfinate decarboxylase and cysteamine dioxygenase pathways. *J.Nutr.*, 139, 207-214.
- [7] M. Berner, D. Krug, C. Bihlmaier, A. Vente, R. Muller and A. Bechthold (2006) Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J.Bacteriol.*, 188, 2666-2673.
- [8] N. Saitou and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*, 4, 406-425.
- [9] B. R. Balthaser and F. E. McDonald (2009) Bronsted acid-promoted glycosylations of disaccharide glycal substructures of the saccharomicins. *Org.Lett.*, 11, 4850-4853.
- [10] F. Kong, N. Zhao, M. M. Siegel, K. Janota, J. S. Ashcroft, F. E. Koehn, D. B. Borders and G. T. Carter (1998) Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics effective against multidrug-resistant bacteria. *J.Am.Chem.Soc.*, 120, 13301-13311.
- [11] J. M. Pletcher and F. E. McDonald (2005) Synthesis of the saccharomicin fucose-aglycon conjugate and determination of absolute configuration. *Org.Lett.*, 7, 4749-4752.
- [12] B. Villiers and F. Hollfelder (2011) Directed evolution of a gatekeeper domain in nonribosomal peptide synthesis. *Chem.Biol.*, 18, 1290-1299.
- [13] I. Aguirrezabalaga, C. Olano, N. Allende, L. Rodriguez, A. F. Brana, C. Mendez and J. A. Salas (2000) Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, 1266-1275.

- 
- [14] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie and W. A. van der Donk (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem.Rev.*, 105, 633-684.
- [15] F. Sanger, G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe and M. Smith (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 687-695.
- [16] R. F. Massung, J. J. Esposito, L. I. Liu, J. Qi, T. R. Utterback, J. C. Knight, L. Aubin, T. E. Yuran, J. M. Parsons, V. N. Loparev and . (1993) Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature*, 366, 748-751.
- [17] R. D. Fleischmann, M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick and . (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
- [18] G. M. Garrity, L. M. Thompson, D. W. Ussery, N. Paskin, D. Baker, P. Desmeth, D. E. Schindel and P. S. Ong (2009) Studies on monitoring and tracking genetic resources: an executive summary. *Stand.Genomic.Sci.*, 1, 78-86.
- [19] J. D. McPherson, M. Marra, L. Hillier, R. H. Waterston, A. Chinwalla, J. Wallis, M. Sekhon, K. Wylie, E. R. Mardis, R. K. Wilson, R. Fulton, T. A. Kucaba, C. Wagner-McPherson, W. B. Barbazuk, S. G. Gregory, S. J. Humphray, L. French, R. S. Evans, G. Bethel, A. Whittaker, J. L. Holden, O. T. McCann, A. Dunham, C. Soderlund, C. E. Scott, D. R. Bentley, G. Schuler, H. C. Chen, W. Jang, E. D. Green, J. R. Idol, V. V. Maduro, K. T. Montgomery, E. Lee, A. Miller, S. Emerling, Kucherlapati, R. Gibbs, S. Scherer, J. H. Gorrell, E. Sodergren, K. Clerc-Blankenburg, P. Tabor, S. Naylor, D. Garcia, P. J. de Jong, J. J. Catanese, N. Nowak, K. Osoegawa, S. Qin, L. Rowen, A. Madan, M. Dors, L. Hood, B. Trask, C. Friedman, H. Massa, V. G. Cheung, I. R. Kirsch, T. Reid, R. Yonescu, J. Weissenbach, T. Bruls, R. Heilig, E. Branscomb, A. Olsen, N. Doggett, J. F. Cheng, T. Hawkins, R. M. Myers, J. Shang, L. Ramirez, J. Schmutz, O. Velasquez, K. Dixon, N. E. Stone, D. R. Cox, D. Haussler, W. J. Kent, T. Furey, S. Rogic, S. Kennedy, S. Jones, A. Rosenthal, G. Wen, M. Schilhabel, G. Gloeckner, G. Nyakatura, R. Siebert, B. Schlegelberger, J. Korenberg, X. N. Chen, A. Fujiyama, M. Hattori, A. Toyoda, T. Yada, H. S. Park, Y. Sakaki, N. Shimizu, S. Asakawa, K. Kawasaki, T. Sasaki, A. Shintani, A. Shimizu, K. Shibuya, J. Kudoh, S. Minoshima, J. Ramser, P. Seranski, C. Hoff, A. Poustka, R. Reinhardt and H. Lehrach (2001) A physical map of the human genome. *Nature*, 409, 934-941.
- [20] L. Kedes and G. Campany (2011) The new date, new format, new goals and new sponsor of the Archon Genomics X PRIZE competition. *Nat.Genet.*, 43, 1055-1058.
- [21] F. R. Blattner, G. Plunkett, III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453-1462.
- [22] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin and . (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- [23] C. M. Tang, D. W. Hood and E. R. Moxon (1998) Microbial genome sequencing and pathogenesis. *Curr.Opin.Microbiol.*, 1, 12-16.
- [24] A. M. Cerdeno-Tarraga, A. Efstratiou, L. G. Dover, M. T. Holden, M. Pallen, S. D. Bentley, G. S. Besra, C. Churcher, K. D. James, Z. A. De, T. Chillingworth, A. Cronin, L. Dowd, T.
-

- 
- Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. M. Rutherford, N. R. Thomson, L. Unwin, S. Whitehead, B. G. Barrell and J. Parkhill (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.*, 31, 6516-6523.
- [25] S. T. Cole, K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward and B. G. Barrell (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409, 1007-1011.
- [26] J. F. Heidelberg, J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter and C. M. Fraser (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406, 477-483.
- [27] J. Parkhill, G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead and B. G. Barrell (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413, 848-852.
- [28] Robert-Koch-Institut (2011) Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Robert-Koch-Institut Berlin.
- [29] H. Rohde, J. Qin, Y. Cui, D. Li, N. J. Loman, M. Hentschke, W. Chen, F. Pu, Y. Peng, J. Li, F. Xi, S. Li, Y. Li, Z. Zhang, X. Yang, M. Zhao, P. Wang, Y. Guan, Z. Cen, X. Zhao, M. Christner, R. Kobbe, S. Loos, J. Oh, L. Yang, A. Danchin, G. F. Gao, Y. Song, Y. Li, H. Yang, J. Wang, J. Xu, M. J. Pallen, J. Wang, M. Aepfelbacher and R. Yang (2011) Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N.Engl.J.Med.*, 365, 718-724.
- [30] A. Mellmann, D. Harmsen, C. A. Cummings, E. B. Zentz, S. R. Leopold, A. Rico, K. Prior, R. Szczepanowski, Y. Ji, W. Zhang, S. F. McLaughlin, J. K. Henkhaus, B. Leopold, M. Bielaszewska, R. Prager, P. M. Brzoska, R. L. Moore, S. Guenther, J. M. Rothberg and H. Karch (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS.One.*, 6, e22751.
- [31] S. Donadio, P. Monciardini, R. Alduina, P. Mazza, C. Chiocchini, L. Cavaletti, M. Sosio and A. M. Puglia (2002) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J.Biotechnol.*, 99, 187-198.
- [32] H. B. Bode and R. Muller (2005) The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, 44, 6828-6846.
- [33] J. F. Martin (1992) Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J.Ind.Microbiol.*, 9, 73-90.
-

- 
- [34] S. D. Bentley, K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill and D. A. Hopwood (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417, 141-147.
- [35] H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat.Biotechnol.*, 21, 526-531.
- [36] Y. S. Lin, H. M. Kieser, D. A. Hopwood and C. W. Chen (1993) The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol.Microbiol.*, 10, 923-933.
- [37] C. T. Walsh and M. A. Fischbach (2010) Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J.Am.Chem.Soc.*, 132, 2469-2493.
- [38] M. Oliynyk, M. Samborsky, J. B. Lester, T. Mironenko, N. Scott, S. Dickens, S. F. Haydock and P. F. Leadlay (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat.Biotechnol.*, 25, 447-453.
- [39] W. Zhao, Y. Zhong, H. Yuan, J. Wang, H. Zheng, Y. Wang, X. Cen, F. Xu, J. Bai, X. Han, G. Lu, Y. Zhu, Z. Shao, H. Yan, C. Li, N. Peng, Z. Zhang, Y. Zhang, W. Lin, Y. Fan, Z. Qin, Y. Hu, B. Zhu, S. Wang, X. Ding and G. P. Zhao (2010) Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism. *Cell Res.*, 20, 1096-1108.
- [40] D. Wu, P. Hugenholtz, K. Mavromatis, R. Pukall, E. Dalin, N. N. Ivanova, V. Kunin, L. Goodwin, M. Wu, B. J. Tindall, S. D. Hooper, A. Pati, A. Lykidis, S. Spring, I. J. Anderson, P. D'haeseleer, A. Zemla, M. Singer, A. Lapidus, M. Nolan, A. Copeland, C. Han, F. Chen, J. F. Cheng, S. Lucas, C. Kerfeld, E. Lang, S. Gronow, P. Chain, D. Bruce, E. M. Rubin, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk and J. A. Eisen (2009) A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of Bacteria and Archaea. *Nature*, 462, 1056-1060.
- [41] M. Land, A. Lapidus, S. Mayilraj, F. Chen, A. Copeland, T. Glavina del Rio, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J.-F. Cheng, O. Chertkov, D. Bruce, L. Goodwin, S. Pitluck, M. Rohde, M. Göker, A. Pati, N. Ivanova, K. Mavromatis, A. Chen, K. Palaniappan, L. Hauser, Y.-J. Chang, C. C. Jeffries, T. Brettin, J. C. Detter, C. Han, P. Chain, B. J. Tindall, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. Kyrpides and H.-P. Klenk (2009) Complete genome sequence of *Actinosynnema mirum* type strain (101T) . *Standards in Genomic Science*, 1, 46-53.
- [42] R. B. Moyes, J. Reynolds and D. P. Breakwell (2009) Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr.Protoc.Microbiol.*, Appendix 3, Appendix.
- [43] A. Pati, M. Sikorski, M. Nolan, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina del Rio, S. Lucas, F. Chen, H. Tice, S. Pitluck, J.-F. Cheng, O. Chertkov, T. Brettin, C. Han, J. C. Detter, C. Kuske, D. Bruce, L. Goodwin, P. Chain, P. D'haeseleer, A. Chen, K. Palaniappan, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, M. Rohde, B. J. Tindall, M. Göker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. Kyrpides and H.-P. Klenk (2009) Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101T). *Standards in Genomic Science*, 1, 141-149.
- [44] E. Stackebrandt and C. R. Woese (1981) Towards a Phylogeny of the Actinomycetes and Related Organisms. *Current Microbiology*, 5, 197-202.
-

- 
- [45] K. Liolios, M. Sikorski, M. Jando, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina del Rio, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J.-F. Cheng, C. Han, T. Woyke, L. Goodwin, S. Pitluck, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, O. Chertkov, C. Kuske, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y.-J. Chang, C. C. Jeffries, J. C. Detter, T. Brettin, M. Rohde, M. Göker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, H.-P. Klenk and N. Kyrpides (2010) Complete genome sequence of *Thermobispora bispora* type strain (R51T). *Standards in Genomic Science*, 2, 318-326.
- [46] S. Mahendra and L. varez-Cohen (2005) *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 55, 593-598.
- [47] R. E. Parales, J. E. Adamus, N. White and H. D. May (1994) Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Appl.Environ.Microbiol.*, 60, 4527-4530.
- [48] C. M. Sales, S. Mahendra, A. Grostern, R. E. Parales, L. A. Goodwin, T. Woyke, M. Nolan, A. Lapidus, O. Chertkov, G. Ovchinnikova, A. Sczyrba and L. varez-Cohen (2011) Genome sequence of the 1,4-dioxane-degrading *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190. *J.Bacteriol.*, 193, 4549-4550.
- [49] A. L. Demain (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 52, 455-463.
- [50] P. Caffrey, S. Lynch, E. Flood, S. Finnan and M. Oliynyk (2001) Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem.Biol.*, 8, 713-723.
- [51] W. Bao, P. J. Sheldon and C. R. Hutchinson (1999) Purification and properties of the *Streptomyces peucetius* DpsC beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase III that specifies the propionate-starter unit for type II polyketide biosynthesis. *Biochemistry*, 38, 9752-9757.
- [52] D. A. Hopwood (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chem.Rev.*, 97, 2465-2498.
- [53] N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka and S. Horinouchi (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400, 897-899.
- [54] N. Funa, M. Funabashi, Y. Ohnishi and S. Horinouchi (2005) Biosynthesis of hexahydroxyperylenequinone melanin via oxidative aryl coupling by cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *J.Bacteriol.*, 187, 8149-8155.
- [55] B. Shen (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 7, 285-295.
- [56] V. Miao, M. F. Coeffet-Legal, P. Brian, R. Brost, J. Penn, A. Whiting, S. Martin, R. Ford, I. Parr, M. Bouchard, C. J. Silva, S. K. Wrigley and R. H. Baltz (2005) Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, 151, 1507-1523.
- [57] A. M. van Wageningen, P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. Jones and P. J. Solenberg (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem.Biol.*, 5, 155-162.
- [58] A. B. Tabor (2011) The challenge of the lantibiotics: synthetic approaches to thioether-bridged peptides. *Org.Biomol.Chem.*, 9, 7606-7628.
-

- 
- [59] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu and W. Liu (2009) Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications. *Chem.Biol.*, 16, 141-147.
- [60] C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall and J. S. Dickschat (2012) Terpenoids are widespread in actinomycetes: a correlation of secondary metabolism and genome data. *Chembiochem.*, 13, 202-214.
- [61] D. E. Cane and R. M. Watt (2003) Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100, 1547-1551.
- [62] C. Dürr, H. J. Schnell, A. Luzhetskyy, R. Murillo, M. Weber, K. Welzel, A. Vente and A. Bechthold (2006) Biosynthesis of the terpene phenalinolactone in *Streptomyces* sp. Tü6071: analysis of the gene cluster and generation of derivatives. *Chem.Biol.*, 13, 365-377.
- [63] M. Steffensky, A. Muhlenweg, Z. X. Wang, S. M. Li and L. Heide (2000) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, 1214-1222.
- [64] A. C. Weymouth-Wilson (1997) The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat.Prod.Rep.*, 14, 99-110.
- [65] R. Nagarajan (1993) Structure-activity relationships of vancomycin-type glycopeptide antibiotics. *J.Antibiot.(Tokyo)*, 46, 1181-1195.
- [66] S. G. Grdadolnik, P. Pristovsek and D. F. Mierke (1998) Vancomycin: conformational consequences of the sugar substituent. *J.Med.Chem.*, 41, 2090-2099.
- [67] S. Pelzer, R. Sussmuth, D. Heckmann, J. Recktenwald, P. Huber, G. Jung and W. Wohlleben (1999) Identification and analysis of the balhimycin biosynthetic gene cluster and its use for manipulating glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, 1565-1573.
- [68] S. R. Nadkarni, M. V. Patel, S. Chatterjee, E. K. Vijayakumar, K. R. Desikan, J. Blumbach, B. N. Ganguli and M. Limbert (1994) Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *J.Antibiot.(Tokyo)*, 47, 334-341.
- [69] A. R. Han, P. B. Shinde, J. W. Park, J. Cho, S. R. Lee, Y. H. Ban, Y. J. Yoo, E. J. Kim, E. Kim, S. R. Park, B. G. Kim, D. G. Lee and Y. J. Yoon (2012) Engineered biosynthesis of glycosylated derivatives of narbomycin and evaluation of their antibacterial activities. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 93, 1147-1156.
- [70] A. Luzhetskyy, J. Hoffmann, S. Pelzer, S. E. Wohlert, A. Vente and A. Bechthold (2008) Aranciamycin analogs generated by combinatorial biosynthesis show improved antitumor activity. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 80, 15-19.
- [71] L. E. Nunez, S. E. Nybo, J. Gonzalez-Sabin, M. Perez, N. Menendez, A. F. Brana, K. A. Shaaban, M. He, F. Moris, J. A. Salas, J. Rohr and C. Mendez (2012) A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J.Med.Chem.*, 55, 5813-5825.
- [72] B. R. Griffith, J. M. Langenhan and J. S. Thorson (2005) 'Sweetening' natural products via glycorandomization. *Curr.Opin.Biotechnol.*, 16, 622-630.
-

- 
- [73] J. Yang, D. Hoffmeister, L. Liu, X. Fu and J. S. Thorson (2004) Natural product glycorandomization. *Bioorg.Med.Chem.*, 12, 1577-1584.
- [74] A. R. Han, J. W. Park, M. K. Lee, Y. H. Ban, Y. J. Yoo, E. J. Kim, E. Kim, B. G. Kim, J. K. Sohng and Y. J. Yoon (2011) Development of a *Streptomyces venezuelae*-based combinatorial biosynthetic system for the production of glycosylated derivatives of doxorubicin and its biosynthetic intermediates. *Appl.Environ.Microbiol.*, 77, 4912-4923.
- [75] K. Madduri, J. Kennedy, G. Rivola, A. Inventi-Solari, S. Filippini, G. Zanuso, A. L. Colombo, K. M. Gewain, J. L. Occi, D. J. MacNeil and C. R. Hutchinson (1998) Production of the anti-tumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peuceetius*. *Nat.Biotechnol.*, 16, 69-74.
- [76] L. Zhu, X. Cao, W. Chen, G. Zhang, D. Sun and P. G. Wang (2005) Syntheses and biological activities of daunorubicin analogs with uncommon sugars. *Bioorg.Med.Chem.*, 13, 6381-6387.
- [77] R. F. Battisti, Y. Zhong, L. Fang, S. Gibbs, J. Shen, J. Nadas, G. Zhang and D. Sun (2007) Modifying the sugar moieties of daunorubicin overcomes P-gp-mediated multidrug resistance. *Mol.Pharm.*, 4, 140-153.
- [78] D. P. Labeda and M. P. Lechevalier (1989) Amendment of the Genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984 and Descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 39, 420-423.
- [79] M. P. Singh, P. J. Petersen, W. J. Weiss, F. Kong and M. Greenstein (2000) Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, 2154-2159.
- [80] M. Berner (2006) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese der Oligosaccharid-Antibiotika Saccharomicin A und B in *Saccharothrix espanaensis*. Dissertation Universität Freiburg.
- [81] R. G. Summers, S. Donadio, M. J. Staver, E. Wendt-Pienkowski, C. R. Hutchinson and L. Katz (1997) Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology*, 143 ( Pt 10), 3251-3262.
- [82] A. Luzhetskyy (2005) Unpubliziert.
- [83] Y.-I. Schmidt (2011) Biochemische Charakterisierung der Glykosyltransferase Ses60310 aus *Saccharothrix espanaensis*. Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [84] L. F. Leloir (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science*, 172, 1299-1303.
- [85] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies and S. G. Withers (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu.Rev.Biochem.*, 77, 521-555.
- [86] Y. Hu and S. Walker (2002) Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem.Biol.*, 9, 1287-1296.
- [87] Y. Bourne and B. Henrissat (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 11, 593-600.
- [88] U. M. Ünlügil and J. M. Rini (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 10, 510-517.
-

- 
- [89] N. Kikuchi, Y. D. Kwon, M. Gotoh and H. Narimatsu (2003) Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 310, 574-579.
- [90] J. Liu and A. Mushegian (2003) Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.*, 12, 1418-1431.
- [91] J. A. Campbell, G. J. Davies, V. Bulone and B. Henrissat (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.J.*, 326 ( Pt 3), 929-939.
- [92] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37, D233-D238.
- [93] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies and B. Henrissat (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J.Mol.Biol.*, 328, 307-317.
- [94] M. L. Sinnott (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem.Rev.*, 90, 1171-1202.
- [95] A. Vrielink, W. Ruger, H. P. Driessen and P. S. Freemont (1994) Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J.*, 13, 3413-3422.
- [96] G.-J. Boons (1996) Tetrahedron Report Number 388: Strategies in Oligosaccharide Synthesis. *Tetrahedron*, 52, 1095-1121.
- [97] K. Suzuki (2010) Lessons from total synthesis of hybrid natural products. *Chem.Rec.*, 10, 291-307.
- [98] J. Härle and A. Bechthold (2009) Chapter 12. The power of glycosyltransferases to generate bioactive natural compounds. *Methods Enzymol.*, 458, 309-333.
- [99] A. Erb, H. Weiss, J. Harle and A. Bechthold (2009) A bacterial glycosyltransferase gene toolbox: generation and applications. *Phytochemistry*, 70, 1812-1821.
- [100] G. Blanco, E. P. Patallo, A. F. Brana, A. Trefzer, A. Bechthold, J. Rohr, C. Mendez and J. A. Salas (2001) Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. *Chem.Biol.*, 8, 253-263.
- [101] F. Lombo, M. Gibson, L. Greenwell, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas and C. Mendez (2004) Engineering biosynthetic pathways for deoxysugars: branched-chain sugar pathways and derivatives from the antitumor tetracenomycin. *Chem.Biol.*, 11, 1709-1718.
- [102] S. E. Nybo, K. A. Shabaan, M. K. Kharel, H. Sutardjo, J. A. Salas, C. Mendez and J. Rohr (2012) Ketoolivosyl-tetracenomycin C: a new ketosugar bearing tetracenomycin reveals new insight into the substrate flexibility of glycosyltransferase ElmGT. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 22, 2247-2250.
- [103] H. C. Losey, J. Jiang, J. B. Biggins, M. Oberthur, X. Y. Ye, S. D. Dong, D. Kahne, J. S. Thorson and C. T. Walsh (2002) Incorporation of glucose analogs by GtfE and GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway to generate variant glycopeptides. *Chem.Biol.*, 9, 1305-1314.
-

- 
- [104] C. Zhang, B. R. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I. K. Lee, L. Li and J. S. Thorson (2006) Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Science*, 313, 1291-1294.
- [105] C. Leimkuhler, M. Fridman, T. Lupoli, S. Walker, C. T. Walsh and D. Kahne (2007) Characterization of rhodosaminyl transfer by the AknS/AknT glycosylation complex and its use in reconstituting the biosynthetic pathway of aclacinomycin A. *J.Am.Chem.Soc.*, 129, 10546-10550.
- [106] S. A. Borisova, L. Zhao, C. E. Melancon III, C. L. Kao and H. W. Liu (2004) Characterization of the glycosyltransferase activity of desVII: analysis of and implications for the biosynthesis of macrolide antibiotics. *J.Am.Chem.Soc.*, 126, 6534-6535.
- [107] D. N. Bolam, S. Roberts, M. R. Proctor, J. P. Turkenburg, E. J. Dodson, C. Martinez-Fleites, M. Yang, B. G. Davis, G. J. Davies and H. J. Gilbert (2007) The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, 5336-5341.
- [108] S. H. Choi, M. Ryu, Y. J. Yoon, D. M. Kim and E. Y. Lee (2012) Glycosylation of various flavonoids by recombinant oleandomycin glycosyltransferase from *Streptomyces antibioticus* in batch and repeated batch modes. *Biotechnol.Lett.*, 34, 499-505.
- [109] L. M. Quiros, R. J. Carbajo and J. A. Salas (2000) Inversion of the anomeric configuration of the transferred sugar during inactivation of the macrolide antibiotic oleandomycin catalyzed by a macrolide glycosyltransferase. *FEBS Lett.*, 476, 186-189.
- [110] L. M. Quiros, R. J. Carbajo, A. F. Brana and J. A. Salas (2000) Glycosylation of macrolide antibiotics. Purification and kinetic studies of a macrolide glycosyltransferase from *Streptomyces antibioticus*. *J.Biol.Chem.*, 275, 11713-11720.
- [111] M. Yang, M. Brazier, R. Edwards and B. G. Davis (2005) High-throughput mass-spectrometry monitoring for multisubstrate enzymes: determining the kinetic parameters and catalytic activities of glycosyltransferases. *Chembiochem.*, 6, 346-357.
- [112] A. W. Truman, M. V. Dias, S. Wu, T. L. Blundell, F. Huang and J. B. Spencer (2009) Chimeric glycosyltransferases for the generation of hybrid glycopeptides. *Chem.Biol.*, 16, 676-685.
- [113] J. Härle, S. Gunther, B. Lauinger, M. Weber, B. Kammerer, D. L. Zechel, A. Luzhetskyy and A. Bechthold (2011) Rational design of an aryl-C-glycoside catalyst from a natural product O-glycosyltransferase. *Chem.Biol.*, 18, 520-530.
- [114] S. Powell, D. Szklarczyk, K. Trachana, A. Roth, M. Kuhn, J. Muller, R. Arnold, T. Rattei, I. Letunic, T. Doerks, L. J. Jensen, M. C. von and P. Bork (2012) eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges. *Nucleic Acids Res.*, 40, D284-D289.
- [115] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, 215, 403-410.
- [116] M. H. Medema, K. Blin, P. Cimermancic, J. de, V, P. Zakrzewski, M. A. Fischbach, T. Weber, E. Takano and R. Breitling (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.*, 39, W339-W346.

- 
- [117] F. Rohdich, S. Hecht, K. Gartner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher and W. Eisenreich (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 1158-1163.
- [118] M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa and H. Ikeda (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105, 7422-7427.
- [119] H. S. Lee, Y. Ohnishi and S. Horinouchi (2001) A sigmaB-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.*, 3, 95-101.
- [120] D. E. Cane, T. Rossi, A. M. Tillman and J. P. Palatko (1981) Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis. Biosynthesis of pentalenolactone from [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucose and [6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]glucose. *J.Am.Chem.Soc.*, 103, 1838-1843.
- [121] L. Du, M. Chen, C. Sanchez and B. Shen (2000) An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol.Lett.*, 189, 171-175.
- [122] S. I. Patzer and V. Braun (2010) Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J.Bacteriol.*, 192, 426-435.
- [123] F. Lombo, A. Velasco, A. Castro, C. F. de la, A. F. Brana, J. M. Sanchez-Puelles, C. Mendez and J. A. Salas (2006) Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species. *Chembiochem.*, 7, 366-376.
- [124] S. Donadio and L. Katz (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene*, 111, 51-60.
- [125] H. Motamedi, S. J. Cai, A. Shafiee and K. O. Elliston (1997) Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *Eur.J.Biochem.*, 244, 74-80.
- [126] B. Ostash, A. Saghatelian and S. Walker (2007) A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A. *Chem.Biol.*, 14, 257-267.
- [127] C. Zhao, J. M. Coughlin, J. Ju, D. Zhu, E. Wendt-Pienkowski, X. Zhou, Z. Wang, B. Shen and Z. Deng (2010) Oxazolomycin biosynthesis in *Streptomyces albus* JA3453 featuring an "acyl-transferase-less" type I polyketide synthase that incorporates two distinct extender units. *J.Biol.Chem.*, 285, 20097-20108.
- [128] S. G. Van Lanen, T. J. Oh, W. Liu, E. Wendt-Pienkowski and B. Shen (2007) Characterization of the maduropeptin biosynthetic gene cluster from *Actinomadura madurae* ATCC 39144 supporting a unifying paradigm for enediynes biosynthesis. *J.Am.Chem.Soc.*, 129, 13082-13094.
- [129] G. L. Tang, Y. Q. Cheng and B. Shen (2004) Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. *Chem.Biol.*, 11, 33-45.
- [130] F. H. Vaillancourt, J. Yin and C. T. Walsh (2005) SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII alpha-ketoglutarate- and O<sub>2</sub>-dependent halogenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 10111-10116.
-

- 
- [131] M. K. Kharel, P. Pahari, M. D. Shepherd, N. Tibrewal, S. E. Nybo, K. A. Shaaban and J. Rohr (2012) Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat.Prod.Rep.*, 29, 264-325.
- [132] Q. Zhao, Q. He, W. Ding, M. Tang, Q. Kang, Y. Yu, W. Deng, Q. Zhang, J. Fang, G. Tang and W. Liu (2008) Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chem.Biol.*, 15, 693-705.
- [133] W. S. Choi, X. Wu, Y. H. Choeng, T. Mahmud, B. C. Jeong, S. H. Lee, Y. K. Chang, C. J. Kim and S. K. Hong (2008) Genetic organization of the putative salbostatin biosynthetic gene cluster including the 2-epi-5-epi-valiolone synthase gene in *Streptomyces albus* ATCC 21838. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 80, 637-645.
- [134] R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt and P. Krastel (2009) Ribosomally synthesized thiopeptide antibiotics targeting elongation factor Tu. *J.Am.Chem.Soc.*, 131, 5946-5955.
- [135] W. Liu, K. Nonaka, L. Nie, J. Zhang, S. D. Christenson, J. Bae, S. G. Van Lanen, E. Zazopoulos, C. M. Farnet, C. F. Yang and B. Shen (2005) The neocarzinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases. *Chem.Biol.*, 12, 293-302.
- [136] J. R. Baker, D. N. Woolfson, F. W. Muskett, R. G. Stoneman, M. D. Urbaniak and S. Caddick (2007) Protein-small molecule interactions in neocarzinostatin, the prototypical enediyne chromoprotein antibiotic. *Chembiochem.*, 8, 704-717.
- [137] D. Zhu, X. He, X. Zhou and Z. Deng (2005) Expression of the melC operon in several *Streptomyces* strains is positively regulated by AdpA, an AraC family transcriptional regulator involved in morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *J.Bacteriol.*, 187, 3180-3187.
- [138] N. Gehring (2012) Untersuchungen zur Saccharomicin Biosynthese. Bachelorarbeit, Universität Freiburg.
- [139] J. E. Dominy, Jr., C. R. Simmons, P. A. Karplus, A. M. Gehring and M. H. Stipanuk (2006) Identification and characterization of bacterial cysteine dioxygenases: a new route of cysteine degradation for eubacteria. *J.Bacteriol.*, 188, 5561-5569.
- [140] A. Ramos, F. Lombo, A. F. Brana, J. Rohr, C. Mendez and J. A. Salas (2008) Biosynthesis of elloramycin in *Streptomyces olivaceus* requires glycosylation by enzymes encoded outside the aglycon cluster. *Microbiology*, 154, 781-788.
- [141] J. Ahlert, E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M. Farnet and J. S. Thorson (2002) The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science*, 297, 1173-1176.
- [142] C. Bihlmaier, E. Welle, C. Hofmann, K. Welzel, A. Vente, E. Breitling, M. Muller, S. Glaser and A. Bechthold (2006) Biosynthetic gene cluster for the polyenoyltetramic acid alpha-lipomycin. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 50, 2113-2121.
- [143] S. Herrmann, T. Siegl, M. Luzhetska, L. Petzke, C. Jilg, E. Welle, A. Erb, P. F. Leadlay, A. Bechthold and A. Luzhetskyy (2012) Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes. *Appl.Environ.Microbiol.*, 78, 1804-1812.
-

- 
- [144] C. Fischer, L. Rodriguez, E. P. Patallo, F. Lipata, A. F. Brana, C. Mendez, J. A. Salas and J. Rohr (2002) Digitoxosyltetracenomycin C and glucosyltetracenomycin C, two novel elloramycin analogues obtained by exploring the sugar donor substrate specificity of glycosyltransferase ElmGT. *J.Nat.Prod.*, 65, 1685-1689.
- [145] O. N. Sekurova, T. Brautaset, H. Sletta, S. E. Borgos, M. O. Jakobsen, T. E. Ellingsen, A. R. Strom, S. Valla and S. B. Zotchev (2004) In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J.Bacteriol.*, 186, 1345-1354.
- [146] R. Pukall, A. Lapidus, R. T. Glavina Del, A. Copeland, H. Tice, J. F. Cheng, S. Lucas, F. Chen, M. Nolan, K. Labutti, A. Pati, N. Ivanova, K. Mavromatis, N. Mikhailova, S. Pitluck, D. Bruce, L. Goodwin, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, A. Chen, K. Palaniappan, P. Chain, M. Rohde, M. Goker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, N. C. Kyrpides, H. P. Klenk and T. Brettin (2010) Complete genome sequence of *Kribbella flavida* type strain (IFO 14399). *Stand.Genomic.Sci.*, 2, 186-193.
- [147] A. Hosoyama, K. Sasaki, T. Harada, R. Igarashi, A. Kawakoshi, M. Sasagawa, J. Fukada, S. Nakamura, Y. Katano, S. Hanada, Y. Kamagata, N. Nakamura, S. Yamazaki and N. Fujita (2011) Whole genome sequence of *Microlunatus phosphovor* NM-1. Unpubliziertes NCBI Genom Projekt.
- [148] E. Brötz (2012) Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Streptomyceten und Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung von ausgewählten Naturstoffderivaten. Dissertation Universität Siegen.
- [149] T. Isturiz, R. az-Benjumea, N. Rodriguez and A. Porco (2001) Involvement of gntS in the control of GntI, the main system for gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *J.Basic Microbiol.*, 41, 75-83.
- [150] A. Reizer, J. Deutscher, M. H. Saier, Jr. and J. Reizer (1991) Analysis of the gluconate (gnt) operon of *Bacillus subtilis*. *Mol.Microbiol.*, 5, 1081-1089.
- [151] N. J. Kruger and S. A. von (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr.Opin.Plant Biol.*, 6, 236-246.
- [152] N. Entner and M. Doudoroff (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J.Biol.Chem.*, 196, 853-862.
- [153] S. J. Lee, M. Surma, W. Hausner, M. Thomm and W. Boos (2008) The role of TrmB and TrmB-like transcriptional regulators for sugar transport and metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch Microbiol.*, 190, 247-256.
- [154] T. Strobel, A. Al-Dilaimi, J. Blom, A. Gessner, J. Kalinowski, M. Luzhetska, A. Pühler, R. Szczepanowski, A. Bechthold and C. Rückert (2012) Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229<sup>T</sup> and comparison to the other completely sequenced Pseudonocardiaceae. *BMC.Genomics*, 13, 465.
- [155] L. Michaelis, M. L. Menten, K. A. Johnson and R. S. Goody (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, 50, 8264-8269.
- [156] H. Lineweaver and D. Burk (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J.Am.Chem.Soc.*, 56, 658-666.
- [157] A. Henssen (1957) Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceeten. *Arch Mikrobiol*, 26, 373-414.
-

- 
- [158] E. Küster and R. Locci (1963) Studies on Peat and Peat Microorganisms. I Taxonomic studies on thermophilic Actinomycetes isolated from peat. *Arch Mikrobiol*, 45, 188-197.
- [159] R. H. Baltz (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr.Opin.Pharmacol.*, 8, 557-563.
- [160] G. L. Challis (2008) Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154, 1555-1569.
- [161] M. F. Kreutzer and M. Nett (2012) Genomics-driven discovery of taiwachelin, a lipopeptide siderophore from *Cupriavidus taiwanensis*. *Org.Biomol.Chem.*.
- [162] W. T. Liu, R. D. Kersten, Y. L. Yang, B. S. Moore and P. C. Dorrestein (2011) Imaging mass spectrometry and genome mining via short sequence tagging identified the anti-infective agent arylomycin in *Streptomyces roseosporus*. *J.Am.Chem.Soc.*, 133, 18010-18013.
- [163] W. T. Liu, Y. L. Yang, Y. Xu, A. Lamsa, N. M. Haste, J. Y. Yang, J. Ng, D. Gonzalez, C. D. Ellermeier, P. D. Straight, P. A. Pevzner, J. Pogliano, V. Nizet, K. Pogliano and P. C. Dorrestein (2010) Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 107, 16286-16290.
- [164] Y. L. Yang, Y. Xu, P. Straight and P. C. Dorrestein (2009) Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nat.Chem.Biol.*, 5, 885-887.
- [165] Y. L. Yang, Y. Xu, R. D. Kersten, W. T. Liu, M. J. Meehan, B. S. Moore, N. Bandeira and P. C. Dorrestein (2011) Connecting chemotypes and phenotypes of cultured marine microbial assemblages by imaging mass spectrometry. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, 50, 5839-5842.
- [166] Y. Chen, E. Wendt-Pienkowski and B. Shen (2008) Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *J.Bacteriol.*, 190, 5587-5596.
- [167] R. P. Garg and R. J. Parry (2010) Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VlmI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP). *Microbiology*, 156, 472-483.
- [168] F. Lombo, A. F. Brana, C. Mendez and J. A. Salas (1999) The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J.Bacteriol.*, 181, 642-647.
- [169] Q. Yu, A. Du, T. Liu, Z. Deng and X. He (2012) The biosynthesis of the polyether antibiotic nanchangmycin is controlled by two pathway-specific transcriptional activators. *Arch Microbiol.*, 194, 415-426.
- [170] L. Laureti, L. Song, S. Huang, C. Corre, P. Leblond, G. L. Challis and B. Aigle (2011) Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 108, 6258-6263.
- [171] W. Kim, J. J. Lee, S. G. Paik and Y. S. Hong (2010) Identification of three positive regulators in the geldanamycin PKS gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* JCM4427. *J.Microbiol.Biotechnol.*, 20, 1484-1490.
- [172] X. Huang, D. Zhu, Y. Ge, H. Hu, X. Zhang and Y. Xu (2004) Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol.Lett.*, 232, 197-202.
-

- 
- [173] X. Mo, Z. Wang, B. Wang, J. Ma, H. Huang, X. Tian, S. Zhang, C. Zhang and J. Ju (2011) Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster of the bacterial RNA polymerase inhibitor tirandamycin from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO1666. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 406, 341-347.
- [174] F. Lombo, M. Gibson, L. Greenwell, A. F. Brana, J. Rohr, J. A. Salas and C. Mendez (2004) Engineering biosynthetic pathways for deoxysugars: branched-chain sugar pathways and derivatives from the antitumor tetracenomycin. *Chem.Biol.*, 11, 1709-1718.
- [175] S. E. Nybo, K. A. Shabaan, M. K. Kharel, H. Sutardjo, J. A. Salas, C. Mendez and J. Rohr (2012) Ketoolivosyl-tetracenomycin C: a new ketosugar bearing tetracenomycin reveals new insight into the substrate flexibility of glycosyltransferase ElmGT. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 22, 2247-2250.
- [176] C. Albermann, A. Soriano, J. Jiang, H. Vollmer, J. B. Biggins, W. A. Barton, J. Lesniak, D. B. Nikolov and J. S. Thorson (2003) Substrate specificity of NovM: implications for novobiocin biosynthesis and glycorandomization. *Org.Lett.*, 5, 933-936.
- [177] M. Fischbach, D. Ward, S. Young, C. D. Kodira, Q. Zeng, M. Koehrsen, P. Godfrey, L. Alvarado, A. M. Berlin, D. Borenstein, Z. Chen, R. Engels, E. Freedman, M. Gellesch, J. Goldberg, A. Griggs, S. Gujja, D. I. Heiman, T. A. Hepburn, C. Howarth, D. Jen, L. Larson, B. Lewis, T. Mehta, D. Park, M. Pearson, A. Roberts, S. Saif, T. D. Shea, N. Shenoy, P. Sisk, C. Stolte, S. N. Sykes, T. Walk, J. White, C. Yandava, P. Straight, J. Clardy, D. Hung, R. Kolter, J. Mekalanos, S. Walker, C. T. Walsh, B. L. C. Wieland, M. Ilzarbe, J. Galagan, C. Nusbaum and B. Birren (2010) Annotation of *Streptomyces albus* strain J1074. Unpubliziert, The Broad Institute Genome Sequencing Platform, Broad Institute Microbial Sequencing Center.
- [178] J. Axelrod and R. Tomchick (1958) Enzymatic O-Methylation of Epinephrine and Other Catechols. *J.Biol.Chem.*, 233, 702-705.
- [179] J. P. Brown and R. J. Brown (1976) Mutagenesis by 9,10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutat.Res.*, 40, 203-224.
- [180] J. Wu and B. P. Rosen (1993) Metalloregulated expression of the ars operon. *J.Biol.Chem.*, 268, 52-58.
- [181] S. K. Kim, S. J. Im, D. H. Yeom and J. H. Lee (2012) AntR-mediated bidirectional activation of antA and antR, anthranilate degradative genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 505, 146-152.
- [182] L. Betancor, M. J. Fernandez, K. J. Weissman and P. F. Leadlay (2008) Improved catalytic activity of a purified multienzyme from a modular polyketide synthase after coexpression with *Streptomyces* chaperonins in *Escherichia coli*. *Chembiochem.*, 9, 2962-2966.
- [183] M. C. Moncrieffe, M. J. Fernandez, D. Spiteller, H. Matsumura, N. J. Gay, B. F. Luisi and P. F. Leadlay (2012) Structure of the glycosyltransferase EryCIII in complex with its activating P450 homologue EryCII. *J.Mol.Biol.*, 415, 92-101.
- [184] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran and G. M. Whitesides (1991) Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J.Org.Chem.*, 56, 2648-2650.
- [185] E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke and P. R. Selvin (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal.Biochem.*, 273, 73-80.
-

- 
- [186] J. C. Han and G. Y. Han (1994) A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal.Biochem.*, 220, 5-10.
- [187] W. W. Cleland (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim.Biophys.Acta*, 67, 104-137.
- [188] A. J. Norris, J. P. Whitelegge, K. F. Faull and T. Toyokuni (2001) Analysis of enzyme kinetics using electrospray ionization mass spectrometry and multiple reaction monitoring: fucosyltransferase V. *Biochemistry*, 40, 3774-3779.
- [189] S. Gosselin, M. Alhussaini, M. B. Streiff, K. Takabayashi and M. M. Palcic (1994) A continuous spectrophotometric assay for glycosyltransferases. *Anal.Biochem.*, 220, 92-97.
- [190] M. Yang, M. R. Proctor, D. N. Bolam, J. C. Errey, R. A. Field, H. J. Gilbert and B. G. Davis (2005) Probing the breadth of macrolide glycosyltransferases: in vitro remodeling of a polyketide antibiotic creates active bacterial uptake and enhances potency. *J.Am.Chem.Soc.*, 127, 9336-9337.
- [191] E. D. Lee, W. Mück, J. D. Henion and T. R. Covey (1989) Real-Time Reaction Monitoring by Continuous-Introduction Ion-Spray Tandem Mass Spectrometry. *J.Am.Chem.Soc.*, 111, 4600-4604.
- [192] J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [193] G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Cullum and S. G. Oliver (1989) Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 272-277.
- [194] M. Richter, J. M. Willey, R. Süßmuth, G. Jung and H.-P. Fiedler (1998) Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. *FEMS Microbiology Letters*, 163, 165-171.
- [195] M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao and B. E. Schoner (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 116, 43-49.
- [196] X. Yan (2012) Investigation of the Biosynthesis of Ganefromycins and Rishirilides. Dissertation, Universität Freiburg.
- [197] D. Hoffmeister, K. Ichinose and A. Bechthold (2001) Two sequence elements of glycosyltransferases involved in urdamycin biosynthesis are responsible for substrate specificity and enzymatic activity. *Chem.Biol.*, 8, 557-567.
- [198] I. Oberbäumer (1986) New pUC-derived expression vectors for rapid construction of cDNA libraries. *Gene*, 49, 81-91.
- [199] U. Hardter (2007) Heterologe Expression der Glykosyltransferasen SaqGT1 und SaqGT2 des Saquayamycin Z-Produzenten *Micromonospora* sp. Tü 6368. Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [200] M. S. Paget, L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster and M. J. Buttner (1999) Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J.Bacteriol.*, 181, 204-211.
-

- 
- [201] D. J. MacNeil, K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons and T. MacNeil (1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111, 61-68.
- [202] D. P. Labeda (1987) Transfer of the Type Strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948 to the Genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and Designation of Neotype Strain for *Streptomyces erythraeus*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 37, 19-22.
- [203] K. F. Chater and L. C. Wilde (1980) *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system. *J.Gen.Microbiol.*, 116, 323-334.
- [204] U. von Mulert, A. Luzhetskyy, C. Hofmann, A. Mayer and A. Bechthold (2004) Expression of the landomycin biosynthetic gene cluster in a PKS mutant of *Streptomyces fradiae* is dependent on the coexpression of a putative transcriptional activator gene. *FEMS Microbiol.Lett.*, 230, 91-97.
- [205] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.*, 23, 2947-2948.
- [206] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios and H. Stockinger (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.*, 40, W597-W603.
- [207] F. Meyer, A. Goesmann, A. C. McHardy, D. Bartels, T. Bekel, J. Clausen, J. Kalinowski, B. Linke, O. Rupp, R. Giegerich and A. Puhler (2003) GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.*, 31, 2187-2195.
- [208] M. Röttig, M. H. Medema, K. Blin, T. Weber, C. Rausch and O. Kohlbacher (2011) NRP-Spredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.*, 39, W362-W367.
- [209] B. O. Bachmann and J. Ravel (2009) Chapter 8. Methods for in silico prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol.*, 458, 181-217.
- [210] S. Anand, M. V. Prasad, G. Yadav, N. Kumar, J. Shehara, M. Z. Ansari and D. Mohanty (2010) SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. *Nucleic Acids Res.*, 38, W487-W496.
- [211] R. D. Page (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput.Appl.Biosci.*, 12, 357-358.
- [212] P. Mazodier and J. Davies (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu.Rev.Genet.*, 25, 147-171.
- [213] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- [214] L. Petzke (2010) Transgenese in Streptomyceten: Transposons, Rekombinasen und Meganukleasen. Dissertation, Universität Freiburg.
-

- 
- [215] M. Myronovskyi, E. Welle, V. Fedorenko and A. Luzhetskyy (2011) Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 5370-5383.
- [216] H. Edelhoch (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-1954.
- [217] S. C. Gill and P. H. von Hippel (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182, 319-326.
- [218] U. K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [219] T. Stachelhaus, H. D. Mootz and M. A. Marahiel (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 6, 493-505.



## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungen

#### Physikalische Größen

A	Absorption
J	Kopplungskonstante
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
m	Masse
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
$M_r$	molare Masse
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RT	retention time: Retentionszeit
t	Zeit
V	Volumen
v <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

#### Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Au	absorption units: Absorptionseinheiten
b(p)	Basenpaar
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
L	Liter
M	molar
m	Meter
min	Minute(n)
mol	Einheit der Stoffmenge

---

Pa	Paskal
ppm	parts per million
psi	pound-force per square inch
psig	pound-force per square inch gauge, relativer Druck
rpm	revolutions per minute: Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
u	unit: Enzymmenge, die $\mu\text{mol}$ Substrat pro Minute umsetzt
V	Volt
$\Omega$	Ohm

### Vorsilben

G	Giga	$10^9$
M	Mega	$10^6$
k	kilo	$10^3$
c	zenti	$10^{-2}$
m	milli	$10^{-3}$
$\mu$	micro	$10^{-6}$
n	nano	$10^{-9}$
p	pico	$10^{-12}$

### Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

### Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H

## ANHANG

---

Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

**Bakterienstämme**

<i>A. mediterranei</i>	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> U32
<i>A. mirum</i>	<i>Actinosynnema mirum</i> DSM 43827
<i>A. orientalis</i>	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. dioxanivorans</i>	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190
<i>S. albus</i>	<i>Streptomyces albus</i> J1074
<i>S. avermitilis</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
<i>S. erythraea</i>	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338
<i>S. espanaensis</i>	<i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229
<i>S. fradiae</i> XKS	<i>Streptomyces fradiae</i> XKS
<i>S. roseosporus</i>	<i>Streptomyces roseosporus</i>
<i>S. viridis</i>	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017
<i>T. bispora</i>	<i>Thermobispora bispora</i> DSM 43833

**Sonstige**

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
2-MIB	2-Methylisoborneol
<i>aac(3)IV</i>	Apramycinresistenzgen
<i>aadA</i>	Spectinomycinresistenzgen
ABC-Transporter	ATP-binding cassette transporter: ATP abhängiger Transporter

---

ADO	2-Aminoethanethiol-Dioxygenase
A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
<i>aphII</i>	Kanamycinresistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bidest.	bidestilliert
<i>bla</i>	β-Lactamresistenzgen
BLASTp	basic local alignment search tool zum Vergleich von Proteinen
BSA	Rinderserumalbumin
C <sub>5</sub> N	2-Amino-3-hydroxy-cyclopent-2-en-1-on
<i>cat</i>	Chloramphenicolresistenzgen
CAZy	carbohydrate active enzymes
CD <sub>3</sub> OD	deutertes Methanol
CDO	Cysteindioxygenase
CDS	coding DNA sequence: codierende DNA-Sequenz
CoA	Coenzym A
COG	cluster of orthologous groups
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COSY	correlation spectroscopy: homonukleare Korrelationspektroskopie für <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H
CSAD	Cysteinsulfinat-Decarboxylase
DAD	Dioden array detector: UV/Vis-Detektor
DEBS 3	6-Deoxyerythronolid-Synthase 3
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eggNOG	evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	et alii: und andere
FPLC	fast protein liquid chromatography
GEBA	Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea
GPP MT	Geranylpyrophosphat-2-Methyltransferase
GT(s)	Glycosyltransferase(n)

---

## ANHANG

---

H2BC	heteronuclear 2-bond correlation
His <sub>6</sub> -tag	Hexapeptid der Aminosäure Histidin
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation: heteronukleare Korrelationsspektroskopie über mehrere Bindungen ( <sup>1</sup> J)
HPLC	high performance liquid chromatography: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPQ-Melanin	Hexahydroxyperylene-Quinon-Melanin
HSQC	heteronuclear single quantum coherence: Heteronukleare Korrelationsspektroskopie über mehrere Bindungen ( <sup>2</sup> J, <sup>2</sup> J)
IMS	imaging mass spectrometry: bildgebenden Massenspektroskopie
<i>int</i>	Integrations
IPTG	Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid
LDH	Laktat Dehydrogenase
LN	1 kb-Leiter NEB
LP	1 kb-Leiter Promega
MEP-Weg	Methylerythritolphosphatweg
MS	Massenspektrometrie
MSD	Quadrupol Massendetektor
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDP	Nukleosid-Diphosphat
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
NMR	nuclear magnetic resonance: Kernspinresonanzspektroskopie
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase(n)
ORF	open reading frame: offener Leserahmen
<i>oriT</i>	origin of transfer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction: Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PF	Proteinstandard PageRuler™ Prestained Protein Marker
PK	Pyruvatkinase
PKS	Polyketidsynthase
PR	Proteinstandard Roti®-Mark Standard
Ref.	Referenz
RNA	ribonucleic acid: Ribonukleinsäure
ROESY	rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
rRNA	ribosomale RNA
sam-Cluster	Saccharomicin-Cluster
SARP	Streptomyces antibiotic regulatory protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	species

---

---

SPE	solid phase extraction: Festphasenextraktion
ssp.	subspecies
SST	short sequence tagging, Genomanalyse, die auf der Identifizierung von kurzen Sequenzen basiert
TCEP	<i>Tris</i> -(2-carboxyethyl)-phosphin
<i>tcr</i>	Tetracyclinresistenzgen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOCSY	total correlation spectroscopy
trans-AT	separat arbeitende Acyltransferase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
<i>tsr</i>	Thiostreptonresistenzgen
U2	1,4-Dihydroxyanthrachinon
U3	1,4-Diaminoanthrachinon
U7	1-Amino-2-methylanthrachinon
U8	2-Aminoanthrachinon
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteile
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ - D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ - D-glucuronsäure
$\Delta$	in einer Mutante inaktiviertes Gen

7.2 Sekundärstoffcluster aus *S. espanaensis*Tabelle 7-1 Sekundärstoffcluster aus dem Genom von *S. espanaensis*. Angegeben sind Start und Ende der Cluster, die Anzahl der Gene, die Länge der Cluster und die Gennamen.

Cluster	Start	Ende	Gene	Länge (bp)	Gene ID
<b>Terpene</b>					
tpc 1	1166889	1170617	2	3728	<i>ses11180-ses11190</i>
tpc 2	1706767	1712091	4	5324	<i>ses16510-ses16540</i>
tpc 3	5680801	5688469	8	7668	<i>ses50830-ses50900</i>
tpc 4	6114314	6115375	1	1061	<i>ses54650</i>
tpc 5	6295999	6297102	1	1103	<i>ses56360</i>
tpc 6	6630735	6631823	1	1088	<i>ses59350</i>
tpc 7	6954768	6955850	1	1082	<i>ses62220</i>
<b>Nichtribosomale Peptide, Polyketide und Hybride</b>					
Cluster 1	2349924	2370700	15	20776	<i>ses22350-ses22490</i>
Cluster 2	2831236	2865923	16	34687	<i>ses26880-ses27030</i>
Cluster 3	3453255	3504409	15	51154	<i>ses32450-ses32590</i>
Cluster 4	3600126	3651122	30	50996	<i>ses33420-ses33720</i>
Cluster 5	3831231	3881764	31	50533	<i>ses35380-ses35690</i>
Cluster 6	4248529	4303665	44	55136	<i>ses38940-ses39380</i>
Cluster 7	4972661	4999886	20	27225	<i>ses45570-ses45780</i>
Cluster 8	5008350	5094309	41	85959	<i>ses45860-ses46270</i>
Cluster 9	5186392	5271055	31	84663	<i>ses47160-ses47500</i>
Cluster 10	5283255	5336168	33	52913	<i>ses47640-ses47960</i>
Cluster 11	5367953	5424891	25	56938	<i>ses48290-ses48530</i>
Cluster 12	5732076	5753813	11	21737	<i>ses51300-ses51400</i>
Cluster 13	6124164	6177506	46	53342	<i>ses54730-ses55180</i>
Cluster 14	6306803	6368410	45	61607	<i>ses56460-ses56900</i>
<b>Weitere Cluster</b>					
Aminocyclitol	5883892	5891400	8	7508	<i>ses52590-ses52660</i>
lan 1	4529644	4536759	5	7115	<i>ses41310-ses41350</i>
lan 2	6044178	6076769	31	32591	<i>ses54000-ses54300</i>
mel	4916581	4917904	2	1323	<i>ses45020-ses45030</i>
sam	6549548	6596050	38	46502	<i>ses58620-ses58990</i>
<b>26 Cluster</b>			<b>506</b>	<b>823759</b>	

## 7.3 Nichtribosomale Peptidsynthase Cluster

**Tabelle 7-2 Abgeleitete Funktion von Genen aus dem Genom von *S. espanaensis*, die für Nichtribosomale Peptidsynthasen codieren. Es sind die von Stachelhaus *et al.* definierten Aminosäuren der Adenylierungs-Domänen (A-Domänen) angegeben <sup>[219]</sup>, die möglichen Substrate der A-Domänen und der Aufbau der NRPS-Module.**

Polypeptid	Gen	Aminosäuren der A-Domäne										Substrat	Modul-Aufbau
		235	236	239	278	299	301	322	330	331	517		
Nrps1	<i>ses22480</i>	D	A	C	E	M	S	E	L	A	K	unbekannt	A-T-C
Nrps1-t2	<i>ses22460</i>												T
Nrps1-a2	<i>ses22430</i>	D	L	T	K	V	G	E	V	G	-	Asn	A
Nrps1-t3	<i>ses22390</i>												T
Nrps1-c2	<i>ses22380</i>												C
Nrps1-a3	<i>ses22370</i>	D	V	W	H	A	S	M	I	D	-	unbekannt	A
Nrps1-t4	<i>ses22360</i>												T
Nrps2-1	<i>ses26940</i>	D	A	E	D	V	G	T	V	V	-	unbekannt	C-A
Nrps2-2	<i>ses26930</i>	D	V	W	H	I	S	L	V	D	K	Ser	T-C-A-T
		D	A	D	D	A	G	L	V	D	K	unbekannt	C-A-T-E
		D	A	D	D	C	G	L	V	D	K	unbekannt	C-A-T
		D	A	D	D	C	G	C	V	D	K	unbekannt	C-A-T-E
		D	L	F	A	L	G	A	V	N	K	Haorn	C-A-T-Te
Nrps3-1	<i>ses32580</i>	D	A	L	L	I	G	A	V	V	K	Val	A-T-C-T-E
		D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	Thr	C-A-T
Nrps3-2	<i>ses32570</i>	D	T	E	D	M	G	F	V	D	K	unbekannt	C-A-T-E
		D	T	E	D	L	G	Y	V	D	K	unbekannt	C-A-T
		D	T	E	D	M	G	F	V	D	K	unbekannt	C-A-T-E
		D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	Thr	C-A-T
Nrps3-3	<i>ses32470</i>	D	A	L	L	V	G	A	V	V	K	Tyr	C-A-T-E
		D	I	W	E	V	T	A	D	D	K	unbekannt	C-A-T-E
		D	A	W	A	V	A	G	L	A	K	unbekannt	C-A-T
		D	I	W	E	V	T	A	D	D	K	unbekannt	C-A-T
Nrps5-1	<i>ses35630</i>	-	-	L	R	V	A	G	V	D	K	unbekannt	C-A-T-Te
		D	L	L	W	L	G	G	T	F	K	Val	C-A-T-?
		D	V	V	Q	V	G	G	V	Y	K	unbekannt	C-A-T
		D	I	L	Q	I	G	V	V	W	K	unbekannt	C-A-T
Nrps5-3	<i>ses35580</i>	D	I	L	Q	I	G	V	V	W	K	unbekannt	C-A-T
Nrps5-4	<i>ses35560</i>	D	A	G	D	M	G	H	V	C	K	unbekannt	C-A-T-Red
Nrps5-a5	<i>ses35450</i>	D	P	F	F	V	I	V	V	A	K	unbekannt	A
Nrps5-t5	<i>ses35380</i>												T
Nrps6-c	<i>ses39030</i>												C
Nrps6	<i>ses39040</i>	S	M	F	H	M	G	M	L	F	K	unbekannt	A-T

Fortsetzung von Tabelle 7-2 Abgeleitete Funktion von Genen aus dem Genom von *S. espanaensis*, die für Nichtribosomale Peptidsynthesen codieren. Es sind die von Stachelhaus *et al.* definierten Aminosäuren der Adenylierungs-Domänen (A-Domänen) angegeben <sup>[219]</sup>, die möglichen Substrate der A-Domänen und der Aufbau der NRPS-Module.

Polypeptid	Gen	Aminosäuren der A-Domäne										Substrat	Modul-Aufbau
		235	236	239	278	299	301	322	330	331	517		
Nrps7	<i>ses45580</i>	D	A	Y	F	L	G	G	T	F	K	Val	A-T
		D	A	Y	F	W	G	G	V	F	K	Val	C-A-T-Red
Nrps8	<i>ses46030</i>	D	F	W	S	V	G	M	V	H	K	Thr	A-T
Nrps8	<i>ses46060</i>	D	L	F	N	F	S	L	V	W	K	Cys	T-Cy-?-A-T-KS
Nrps10-1	<i>ses47680</i>	D	V	W	H	F	S	L	V	D	K	Ser	C-A-T
		D	V	Q	F	I	S	Q	V	A	K	unbekannt	C-A-T-Te
Nrps10-2	<i>ses47940</i>	D	V	W	N	V	A	M	V	H	K	Ser	A-T
Nrps10-3	<i>ses47910</i>	D	I	L	Q	V	G	V	I	W	K	Gly	Cy/C-A-T-Te
Nrps10-4	<i>ses47890</i>	A	A	F	-	V	T	L	V	A	K	unbekannt	C-A-T
Nrps10-a6	<i>ses47870</i>	D	A	F	F	L	G	L	I	T	K	unbekannt	A
Nrps12-1	<i>ses51320</i>	D	A	L	W	L	G	G	T	F	K	Val	C-A-T
		D	L	F	N	N	A	L	T	Y	K	Ala	C-A-T
Nrps12-2	<i>ses51330</i>												?-C-T-C
Nrps13	<i>ses55100</i>	D	L	Y	N	M	S	L	I	W	K	Cys	C-A-T
Nrps14-1	<i>ses56580</i>	D	I	L	A	-	-	-	V	L	-	unbekannt	C-A-?
		-	-	A	Q	V	G	M	V	W	K	unbekannt	A-T-C
Nrps14-2	<i>ses56610</i>	D	M	V	Q	F	G	L	V	Y	K	unbekannt	C-A-T
		D	A	T	E	Q	S	Q	L	A	K	unbekannt	C-A-T
Nrps14-3	<i>ses56790</i>	D	V	F	D	F	G	G	V	T	K	unbekannt	C-A-T
Nrps14-4	<i>ses56830</i>	G	C	V	H	L	S	L	V	F	-	unbekannt	A-T
Nrps14-5	<i>ses56850</i>	D	L	Y	N	I	A	S	V	W	K	unbekannt	C-A-T

Abkürzungen: A, Adenylierung; C, Kondensation; Cy, Zyklisierung; E, Epimerisierung; Red, Reduktion; T, Thiolation; Te, Thioesterase; ?, Domäne mit neuer Funktion (Domäne bestehend aus mehr als 450 Aminosäuren mit keiner Ähnlichkeit zu bekannten Domänen); KS, Ketosynthase. Haorn, delta-N-Acetyl-delta-N-hydroxyornithin.

## 7.4 Polyketidsynthese Cluster

Tabelle 7-3 Abgeleitete Funktion von Genen aus dem Genom von *S. espanaensis*, die für Polyketidsynthesen codieren. Angegeben sind die vorhandenen Module und deren Aufbau.

<b>Polypeptid</b>	<b>Gen</b>	<b>Modul</b>	<b>Modulaufbau</b>
<b>Pks4-1</b>	<i>ses33510</i>	Modul 1	KS-AT-DH-ER-KR-ACP
<b>Pks4-2</b>	<i>ses33620</i>	Modul 2	KS-AT-ACP KR-ACP
<b>Pks4-3</b>	<i>ses33690</i>	Modul 3	KS-AT-DH-?-ER-KR-ACP
<b>Pks5</b>	<i>ses35390</i>	Beladung	KS-ACP
<b>Pks6-1</b>	<i>ses39100</i>	Modul 1	KS-AT-DH-KR-ACP
<b>Pks6-2</b>	<i>ses39290</i>	Modul 2	KS-AT-ACP-KR-DH
<b>Nrpk8</b>	<i>ses46060</i>	Modul 2	T-Cy-?-A-T-KS
<b>Pks8-1</b>	<i>ses46180</i>	Beladung	ACP
		Modul 1	KS-KR-ACP
		Modul 2	KS
<b>Pks8-2</b>	<i>ses46170</i>	Modul 2	DH-ACP KR
		Modul 3	KS-ACP
		Modul 4	KS-DH-KR-ACP
		Modul 5	KS-KR-ACP
		Modul 6	KS-ACP-ACP
<b>Pks8-3</b>	<i>ses46000</i>		KS
<b>Pks8-4</b>	<i>ses45860</i>	Modul 7	KS-AT-ACP-KR
<b>Pks8-5</b>	<i>ses45870</i>		KS-AT
<b>Pks9-1</b>	<i>ses47260</i>	Beladung	KS-ACP
		Modul 1	KS-AT-DH-KR-ACP
		Modul 2	KS-AT-DH-KR-ACP
		Modul 3	KS-AT-DH-KR-ACP
<b>Pks9-2</b>	<i>ses47240</i>	Modul 4	KS-AT-KR-ACP
<b>Pks9-3</b>	<i>ses47230</i>	Modul 5	KS-AT-KR-ACP
		Freigabe	TRed
<b>Pks9-4</b>	<i>ses47420</i>	Modul 1	KS-AT-ACP
		Modul 2	KS-AT-DH-KR-ACP
<b>Pks9-5</b>	<i>ses47410</i>	Modul 3	KS-AT-KR-ACP
<b>Pks9-6</b>	<i>ses47400</i>	Modul 4	KS-AT-DH-KR-ACP KS-AT
<b>Pks9-7</b>	<i>ses47370</i>	Modul 5	KS-AT-DH-KR-ACP
		Freigabe	TE
<b>Pks10</b>	<i>ses47930</i>	Modul 1	KS-AT-?-KR-ACP

Fortsetzung von Tabelle 7-3 Abgeleitete Funktion von Genen aus dem Genom von *S. espanaensis*, die für Polyketid-synthesen codieren. Angegeben sind die vorhandenen Module und deren Aufbau.

<b>Polypeptid</b>	<b>Gen</b>	<b>Modul</b>	<b>Modulaufbau</b>
<b>Pks11-1</b>	<i>ses48330</i>	Modul 1	KS-AT-ACP
		Modul 2	KS-AT-DH-KR-ACP
		Modul 3	KS-AT-DH-KR-ACP
<b>Pks11-2</b>	<i>ses48320</i>	Modul 4	KS-AT-DH-KR-ACP
		Modul 5	KS-AT-DH-ACP
<b>Pks11-3</b>	<i>ses48310</i>	Modul 6	KS-AT-DH-KR-ACP
		Freigabe	TRed
<b>Pks13</b>	<i>ses55110</i>	Modul 1	KS-AT-DH-KR-ACP
<b>Pks14</b>	<i>ses56590</i>	Modul 1	KS-AT-ACP
			KR-ACP

Abkürzungen: ACP, Acyl Carrier Protein; AT, Acyltransferase; Cy, Zyklisierung; DH, Dehydratase; ER, Enoylreduktase; KR, Ketoreduktase; KS, Ketosynthase; TE, Thioesterase; TRed, Thioester Reduktase; ?, Domäne mit neuer Funktion (Domäne bestehend aus mehr als 450 Aminosäuren mit keiner Ähnlichkeit zu bekannten Domänen); A, Adenylierung; T, Thiolation.

## 7.5 NMR-Daten

## 7.5.1 AliPro2

Das Lösungsmittel DMSO-d<sub>6</sub> wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39,5$  ppm).

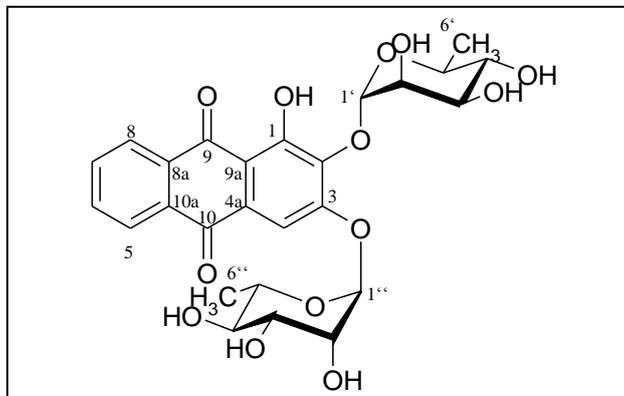


Abbildung 7-1 Strukturvorschlag für AliPro2. Es handelt sich dabei um 2,3-Di-O- $\alpha$ -L-rhamnosylanthragallole ( $M_r$ : 548,49 g/mol).

Tabelle 7-4 NMR-Daten für AliPro2, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz) [ppm]	$^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC	ROESY
1	156,5 (br)				
1-OH		12,78 bs s			
2	138,2 (br)			4-H	
3	154,8			4-H, 1''-H	
4	106,5	7,57	-		1''-H
4a	128,9			4-H	
5	126,8	8,15 m	7-H	7-H, 8-H	7-H
6	134,7	7,91 m	6-H	9-H	6-H
7	134,4	7,91 m	9-H	6-H (7-H)	9-H
8	126,4	8,21 m	8-H	7-H, 8-H	8-H
8a	132,9			(6-H), 7-H, 8-H, 9-H	
9	187,1			9-H	
9a	112,2			4-H	
10	181,4			4-H, 6-H	
10a	129,6				
1'	102,1	5,47 s	2'-H	5'-H	2'-H, (3'-H)
2'	70,0	4,03 br m	1'-H, 2'-OH, 3'-H	1'-H	1'-H, 2'-OH, 3'-H
2'-OH		5,01 (br s)	2'-H		2'-H
3'	70,39	3,75 m	2'-H, 3'-OH, 4'-H	1'-H, 4'-OH	2'-H, 3'-OH, 5'-H
3'-OH		4,82 (br s)	3'-H		3'-H
4'	71,5	3,31 m	3'-H, 4'-OH, 5'-H	3'-H, 4'-OH, 3'-OH, 5'-H, 6'-H <sub>3</sub>	3'-H, 5'-H, 6'-H <sub>3</sub>
4'-OH		4,85 (br s)	4'-H		4'-H
5'	70,42	3,97 m	4'-H, 6'-H <sub>3</sub>	1'-H, 4'-OH, 6'-H <sub>3</sub>	3'-H, 6'-H <sub>3</sub>
6'	17,8	1,09 d (6,2)	5'-H	4'-H, 5'-H, $^1\text{J}$	4'-H, 4'-OH, 5'-H
1''	99,1	5,62 s	2''-H	2'-OH, 5''-H	4-H, 2''-H, 2''-OH
2''	69,8	3,94 br m	1''-H, 2''-OH, 3''-H	2''-OH	1''-H, 2''-OH, 3''-H, 4''-H

Fortsetzung von Tabelle 7-4 NMR-Daten für AliPro2, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz) [ppm]	$^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC	ROESY
2 $''$ -OH		5,26 (br s)	2 $''$ -H		1 $''$ -H, 2 $''$ -H
3 $''$	70,3	3,71 m	2 $''$ -H, 3 $''$ -OH, 4 $''$ -H	1 $''$ -H, 4 $''$ -OH, 5 $''$ -H	2 $''$ -H, 3 $''$ -OH, 4 $''$ -OH, 5 $''$ -H
3 $''$ -OH		4,82 (br s)	3 $''$ -H		3 $''$ -H
4 $''$	71,5	3,36 m	3 $''$ -H, 4 $''$ -OH, 5 $''$ -H	4 $''$ -OH, 5 $''$ -H, 6 $''$ -H <sub>3</sub>	6 $''$ -H <sub>3</sub>
4 $''$ -OH		4,93 (br s)	4 $''$ -H		
5 $''$	70,2	3,46 m	4 $''$ -H, 6 $''$ -H <sub>3</sub>	1 $''$ -H, 4 $''$ -OH	4 $''$ -OH, 3 $''$ -H, 6 $''$ -H <sub>3</sub>
6 $''$	17,8	1,13 d (6,2)	5 $''$ -H	5 $''$ -H, $^1\text{J}$	4 $''$ -H, 5 $''$ -H

### Nachweis der Zuckerkonfiguration

$^1\text{H}$ -NMR und 1D-TOCSY mit gezielter Anregung von 1 $''$ -H und 1 $''$ -H nach Zugabe von D<sub>2</sub>O durchgeführt (600MHz, 35 °C, DMSO-d<sub>6</sub> /D<sub>2</sub>O). Die erhaltenen Werte sind:  $\delta_{\text{H}}$  = 8,13 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 9-H); 8,08 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 6-H); 7,85 (dd,  $J$  = 9,0; 9,0 Hz, 7-H, 8-H); 7,48 (s, 4-H); 5,56 (br s, 1 $''$ -H); 5,40 (br s, 1 $''$ -H); 4,01 (dd,  $J$  = 3,1; 1,8 Hz, 2 $''$ -H); 3,95 (dq,  $J$  = 9,4, 6,3 Hz, 5 $''$ -H); 3,92 (dd,  $J$  = 3,4, 1,8 Hz, 2 $''$ -H); 3,72 (dd,  $J$  = 9,5, 3,1 Hz, 3 $''$ -H); 3,67 (dd,  $J$  = 9,5, 3,4 Hz, 3 $''$ -H); 3,43 (dq,  $J$  = 9,2, 6,2 Hz, 5 $''$ -H); 3,34 (dd,  $J$  = 9,5, 9,1 Hz, 4 $''$ -H); 3,32 (dd,  $J$  = 9,5, 9,2Hz, 4 $''$ -H); 1,11 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 6 $''$ -H<sub>3</sub>); 1,09 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 6 $''$ -H<sub>3</sub>) ppm.

### 7.5.2 AliC1

Das Lösungsmittel DMSO-d<sub>6</sub> wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_{\text{H}}$  = 2,50 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  = 39,5 ppm).

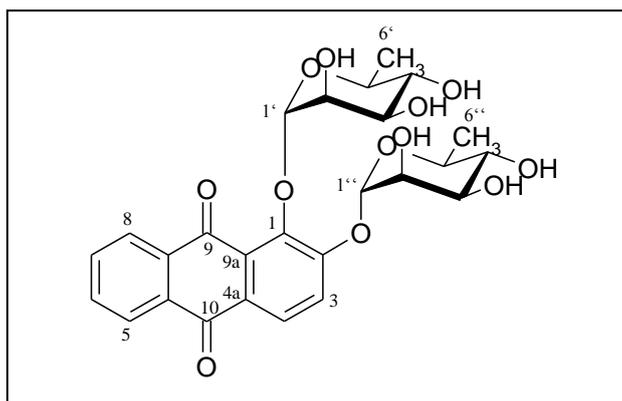


Abbildung 7-2 Strukturvorschlag für AliC1. Es handelt sich dabei um 1,2-Di- $\alpha$ -L-rhamnosylalazarin (M<sub>r</sub>: 532,49 g/mol).

Tabelle 7-5 NMR-Daten für AliC1, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz) <sup>a</sup> [ppm]	$^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY <sup>b</sup>	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC <sup>b</sup>	ROESY <sup>b</sup>
1	146,2			3-H, 1 <sup>''</sup> -H	
2	154,8			3-H, 4-H, 1 <sup>''</sup> -H	
3	120,2	7,69 d (8,6)	4-H	(4-H)	4-H, 1 <sup>''</sup> -H
4	124,2	8,02 d (8,6)	3-H		4-H
4a	127,8			3-H	
5	126,7	8,12 d (8,0)	7-H	8-H	7-H
6	133,9	7,87 m	6-H	6-H	6-H
7	134,7	7,89 m	9-H	7-H	9-H
8	126,7	8,12 d (8,4)	8-H	7-H	8-H
8a	132,2			6-H, 7-H	
9	182,0			6-H	
9a	126,6			4-H	
10	181,6			4-H	
10a	134,3				
1 <sup>'</sup>	104,4	5,23 br s	2 <sup>'</sup> -H	<sup>1</sup> J	2 <sup>'</sup> -H
2 <sup>'</sup>	70,3	4,26 br m	1 <sup>'</sup> -H, 2 <sup>'</sup> -OH, 3 <sup>'</sup> -H		1 <sup>'</sup> -H, 2 <sup>'</sup> -OH, 3 <sup>'</sup> -H
2 <sup>'</sup> -OH		4,98 br s	2 <sup>'</sup> -H		2 <sup>'</sup> -H
3 <sup>'</sup>	70,6	3,85 br d (9,1)	2 <sup>'</sup> -H, 4 <sup>'</sup> -H		2 <sup>'</sup> -H, 5 <sup>'</sup> -H
4 <sup>'</sup>	71,5	3,32 *	3 <sup>'</sup> -H	5 <sup>'</sup> -H, 6 <sup>'</sup> -H <sub>3</sub>	2 <sup>'</sup> -H, 5 <sup>'</sup> -H
5 <sup>'</sup>	70,8	3,92 dq (9,7; 6,3)	(4 <sup>'</sup> -H), 6 <sup>'</sup> -H <sub>3</sub>	6 <sup>'</sup> -H <sub>3</sub>	3 <sup>'</sup> -H, 6 <sup>'</sup> -H <sub>3</sub>
6 <sup>'</sup>	17,8	1,02 d (6,3)	5 <sup>'</sup> -H	4 <sup>'</sup> -H	4 <sup>'</sup> -H, 5 <sup>'</sup> -H
1 <sup>''</sup>	98,8	5,63 br s	2 <sup>''</sup> -H		3-H, 2 <sup>''</sup> -H
2 <sup>''</sup>	69,9	3,96 m	1 <sup>''</sup> -H, 2 <sup>''</sup> -OH, 3 <sup>''</sup> -H		1 <sup>''</sup> -H, 3 <sup>''</sup> -H
2 <sup>''</sup> -OH		5,26 br s	2 <sup>''</sup> -H		
3 <sup>''</sup>	70,4	3,77 m	2 <sup>''</sup> -H, 4 <sup>'</sup> -H		1 <sup>''</sup> -H, 2 <sup>''</sup> -H, 5 <sup>''</sup> -H
4 <sup>''</sup>	71,6	3,33 *	3 <sup>''</sup> -H	5 <sup>''</sup> -H, 6 <sup>''</sup> -H <sub>3</sub>	
5 <sup>''</sup>	70,1	3,41 *	6 <sup>''</sup> -H <sub>3</sub>	1 <sup>''</sup> -H, 6 <sup>''</sup> -H <sub>3</sub>	3 <sup>''</sup> -H, 6 <sup>''</sup> -H <sub>3</sub>
6 <sup>''</sup>	17,8	1,09 d (6,1)	5 <sup>''</sup> -H	4 <sup>''</sup> -H	2 <sup>''</sup> -H, 4 <sup>''</sup> -H, 5 <sup>''</sup> -H

<sup>a</sup>3<sup>'</sup>-OH, 4<sup>'</sup>-OH, 3<sup>''</sup>-OH und 4<sup>''</sup>-OH waren nicht zuordnebar

<sup>b</sup>Kreuzsignale schwacher Intensität werden in Klammern dargestellt.

\* vom Wassersignal überdeckt

### Nachweis der Zuckerkonfiguration

$^1\text{H}$ -NMR und 1D-TOCSY mit gezielter Anregung von 2<sup>'</sup>-H und 3<sup>''</sup>-H nach Zugabe von D<sub>2</sub>O durchgeführt (600MHz, 35 °C, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O). Die erhaltenen Werte sind:  $\delta_{\text{H}}$  = 8,08 (m, 6-H, 9-H), 7,99 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 4-H); 7,86-7,84 (m, 7-H, 8-H); 7,64 (d,  $J$  = 9,0 Hz, 3-H); 5,60 (d,  $J$  = 1,6 Hz, 1<sup>''</sup>-H); 5,17 (br s, 1<sup>'</sup>-H); 4,26 (dd,  $J$  = 3,2; 1,7 Hz, 2<sup>'</sup>-H); 3,94 (dd,  $J$  = 3,5; 1,7 Hz, 2<sup>''</sup>-H); 3,91 (dq,  $J$  = 9,6; 6,3 Hz, 5<sup>'</sup>-H); 3,82\*\* (dd,  $J$  = 9,5; 3,2 Hz, 3<sup>'</sup>-H); 3,73 (dd,  $J$  = 9,3; 3,3 Hz, 3<sup>''</sup>-H); 3,39 (dq,  $J$  = 9,5; 6,2 Hz, 5<sup>''</sup>-H); 3,31 (dd,  $J$  = 9,5; 9,3 Hz, 4<sup>''</sup>-H); 3,31 (dd,  $J$  = 9,6; 9,5 Hz, 4<sup>'</sup>-H); 1,07 (d,  $J$  = 6,2 Hz, 6<sup>''</sup>-H<sub>3</sub>); 1,02 (d,  $J$  = 6,3 Hz, 6<sup>'</sup>-H<sub>3</sub>) ppm.

\*\*vom Wassersignal überdeckt (Kupplungsmuster und -konstanten abgeleitet von den Nachbaratomen)

### 7.5.3 AliProN

Das Lösungsmittel DMSO- $d_6$  wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_H = 2,50$  ppm,  $\delta_C = 39,5$  ppm).

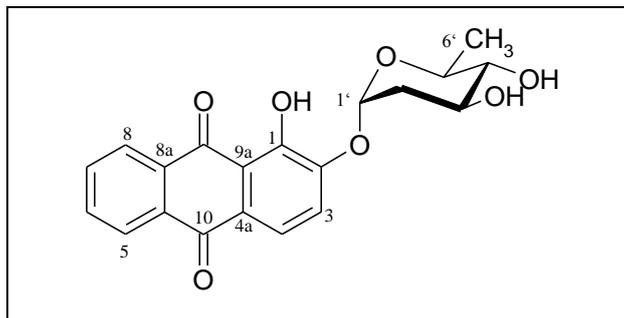


Abbildung 7-3 Strukturvorschlag für AliProN. Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Olivosylalizarin ( $M_r$ : 370,35 g/mol).

Tabelle 7-6 NMR-Daten für AliProN, die aus den  $^1H$ - und  $^{13}C$ -1D-Spektren und den  $^1H/^1H$ -COSY-,  $^1H/^{13}C$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_C$ [ppm]	$\delta_H$ (J Hz) [ppm]	$^1H/^1H$ - COSY <sup>a</sup>	$^1H/^{13}C$ -HMBC <sup>a</sup>	ROESY <sup>a</sup>
1	156,6				
2	152,5			4-H, (3-H), 1'-H)	
3	119,8	7,37 d (7,9)	4-H	4-H	1'-H
4	125,4	7,52 d (7,9)	3-H		
4a	126,6			3-H	
5	126,4	8,13 dd (1,6 7,2)	6-H	7-H	7,86
6	133,9	7,86 ddd (1,6 7,2 7,3)	7-H, 5-H, 8-H	5-H, 8-H, (7-H)	8,13
7	133,9	7,86 ddd (1,6 7,3 7,3)	6-H, 8-H, 5-H	5-H, 8-H, (6-H)	8,21
8	126,5	8,21 dd (1,6 7,3)	7-H	6-H	7.86
8a	134,1			7-H	
9	185,9			8-H	
9a	116,8			4-H	
10	181,3			5-H, (4-H)	
10a	133,3			6-H	
1'	96,0	5,81 d (2,8)	2'-H <sub>ax</sub>	2'-H <sub>eq</sub>	2'-H <sub>ax</sub> , (2'-H <sub>eq</sub> ), (3-H)
2'	37,6	1,69 m ax (13,3 11,4 3,4) 2,20 dd eq (6,3 13,3) <sup>b</sup>	2'-H <sub>eq</sub> , 3'-H 3'-H, (1'-H)		2'-H <sub>eq</sub> , 1'-H, 4'-H, (3'-H) 2'-H <sub>ax</sub> , (1'-H), (3'-H)
3'	67,3	3,85 m	2'-H, 4'-H	2'-H, 4'-H, (5'-H), 1'-H	(2'-H <sub>ax</sub> ), 2'-H <sub>eq</sub> , (4'-H), 5'-H
4'	77,0	2,92 dd (9,0 9,2) <sup>b</sup>	5'-H, 3'-H	6'-H <sub>3</sub> , 2'-H <sub>ax</sub> , 5'-H, 3'-H	6'-H <sub>3</sub> , 2'-H <sub>ax</sub> , (3'-H)
5'	69,2	3,53 dd (6,4 9,2) <sup>b</sup>	4'-H	6'-H <sub>3</sub> , 4'-H, 1'-H	6'-H <sub>3</sub> , (4'-H), 3'-H
6'	18,0	1,10 d (6,4)	5'-H	<sup>1</sup> J, 4'-H	4'-H, 5'-H, (1'-H)

**a** Kreuzsignale schwacher Intensität werden in Klammern dargestellt.

**b** Daten mittels 1D-TOCSY Experiment unterstützt <sup>[148]</sup>.

### 7.5.4 AliPro4

Das Lösungsmittel DMSO- $d_6$  wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_H = 2,50$  ppm,  $\delta_C = 39,5$  ppm).

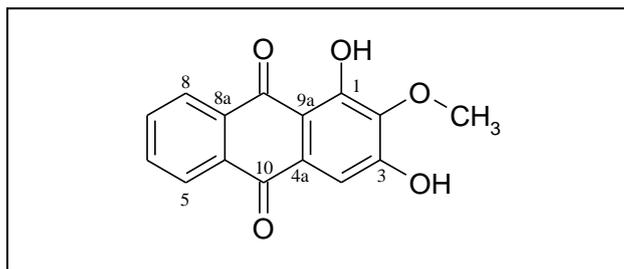


Abbildung 7-4 Strukturformel von AliPro4, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2-O-Methylantragallol ( $M_r$ : 270,24 g/mol).

Tabelle 7-7 NMR-Daten für AliPro4, die aus den  $^1H$ - und  $^{13}C$ -1D-Spektren und den  $^1H/^1H$ -COSY- und  $^1H/^{13}C$ -HMBC-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_C$ [ppm]	$\delta_H$ (J Hz) [ppm]	$^1H/^1H$ -COSY	$^1H/^{13}C$ -HMBC
1	157,0			
1-OH		13,23 s (br)		
2	140,1			2-OCH <sub>3</sub> , 4-H
2-OCH <sub>3</sub>	58,9	3,76 s		
3	157,0			
4	114,5	6,88 s		
4a	129,3			
5	126,2	8,06 dd (7,7 1,2)	7-H	8-H
6	133,9	7,76 dd (7,6 7,5)	6-H, 8-H	6-H
7	132,8	7,83 dd (7,6 7,5)	7-H, 9-H	7-H, 9-H
8	125,6	8,13 dd (7,7 1,2)	8-H	7-H
8a	134,5			6-H, 8-H
9	181,6			9-H
9a	105,7			4-H
10	182,9			4-H, 6-H
10a	132,8			7-H, 9-H

## 7.5.5 Sace\_15

Das Lösungsmittel CD<sub>3</sub>OD wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_{\text{H}} = 3,30$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 49,0$  ppm).

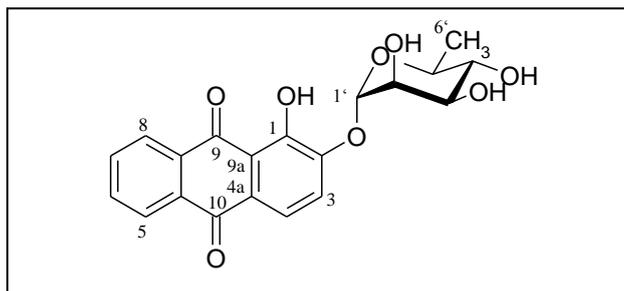


Abbildung 7-5 Strukturformel von Sace\_15, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 2-O- $\alpha$ -L-Rhamnosylalizarin ( $M_r$ : 386,35 g/mol).

Tabelle 7-8 NMR-Daten für Sace\_15, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz) [ppm]	$^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC	ROESY <sup>a</sup>
1	155,0*				
2	155,0			1'-H	
3	120,7	7,34 d (8,0)	4-H	-	-
4	118,3	7,51 d (8,0)	3-H	-	(1'-H)
4a	129,2			3-H	
5	127,5	8,15 d (7,2)	7-H	8-H	7-H
6	134,5	7,74 dd (7,2 7,2)	6-H, 8-H	9-H	6-H
7	134,8	7,77 dd (7,3 7,2)	7-H, 9-H	6-H	9-H
8	127,9	8,27 d (7,3)	8-H	7-H	8-H
8a	134,4			9-H	
9	187,0			(9-H)	
9a	119,3			4-H	
10	184,2			(4-H), 6-H	
10a	135,0			7-H	
1'	100,3	5,56 d (1,7)	2'-H	$^1\text{J}$ , (2'-H), 5'-H, (6'-H <sub>3</sub> )	3-H, 2'-H
2'	71,9	4,16 dd (3,4 1,7)	1'-H, 3'-H	1'-H, 4'-H	1'-H, 3'-H
3'	72,1	4,01 dd (9,6 3,4)	2'-H, 4'-H	2'-H, $^1\text{J}$ , 5'-H	2'-H, (4'-H), 5'-H
4'	73,8	3,48 dd (9,6 9,3)	3'-H, 5'-H	2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H <sub>3</sub>	(3'-H), (5'-H), 6'-H <sub>3</sub>
5'	71,1	3,70 dq (9,3 6,2)	4'-H, 6'-H <sub>3</sub>	1'-H, (3'-H), 4'-H, 6'-H <sub>3</sub>	3'-H, (4'-H), 6'-H <sub>3</sub>
6'	18,1	1,23 d (6,2)	5'-H	4'-H, 5'-H, $^1\text{J}$	4'-H, 5'-H

\* Signal nicht sicher

<sup>a</sup> Signale in Klammern sind schwache Signale

## 7.5.6 U3-8

Das Lösungsmittel DMSO-d<sub>6</sub> wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39,5$  ppm).

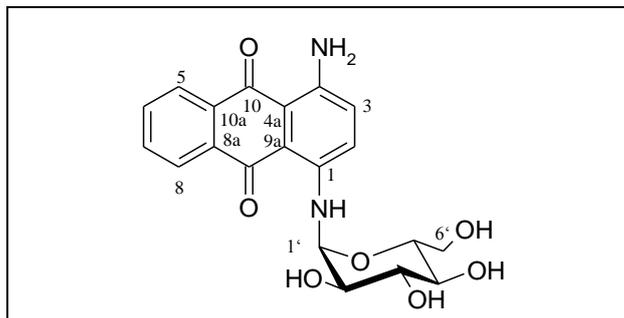


Abbildung 7-6 Strukturformel von U3-8, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 1-N- $\alpha$ -Glucosyldiaminoanthracinon ( $M_r$ : 400,38 g/mol).

Tabelle 7-9 NMR-Daten für U3-8, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC- und ROESY-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz)* [ppm]	$^1\text{H}/^1\text{H}$ - COSY	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC	ROESY
1	144,9			2-H, 1'-H	
1-NH	-	10,89 d (4,8)	1'-H		(1'-H), 3'-H
2	125,2	7,59 d (9,7)	3-H	1-NH	3-H, (1'-H)
3	129,0	7,29 d (9,7)	2-H		2-H
4	146,7			2-H	
4a	108,2			3-H	
5	125,9	8,24 m	7-H	7-H, 8-H	7-H
6	133,8	7,82 m	6-H, 8-H	6-H, 8-H	6-H
7	133,6	7,82 m	7-H, 9-H	6-H, 9-H	9-H
8	125,9	8,48 m	8-H	7-H, 8-H	8-H
8a	133,8			8-H, 9-H	
9	181,7			9-H	
9a	109,8			1-NH, 2-H	
10	182,3			6-H	
10a	133,8			6-H, 7-H	
1'	80,7	5,33 dd (4,8; 4,8)	1-NH, 2'-H	1-NH	(1-NH), 2-H, 2'-H
2'	70,3	3,59 dd (8,9; 4,8)	1'-H, 3'-H	(1-NH), 1'-H	4'-H
3'	73,7	3,63 dd (9,4; 8,9)	2'-H, 4'-H	1'-H, 2'-H, 4'-H	1-NH, 1'-H, 4'-H, 5'-H
4'	70,2	3,17 dd (9,5; 8,9)	3'-H, 5'-H	3'-H	2'-H, 3'-H
5'	72,2	3,29 m**	4'-H, 6'-H <sub>b</sub>	1'-H, $^1J$ , 4'-H	3'-H, 6'-H <sub>a</sub>
6'	61,0	H <sub>a</sub> : 3,56 m; H <sub>b</sub> : 3,46 dd (11,8; 6,9)	6'-H <sub>b</sub> 5'-H, 6'-H <sub>a</sub>	4'-H	5'-H

\*Kopplungskonstanten vom  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum und 1D-TOCSY angeregt bei 5,32 ppm

\*\*vom Wassersignal überdeckt

## 7.5.7 U3-21

Das Lösungsmittel DMSO-d<sub>6</sub> wurde als interner Standard verwendet ( $\delta_{\text{H}} = 2,50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39,5$  ppm).

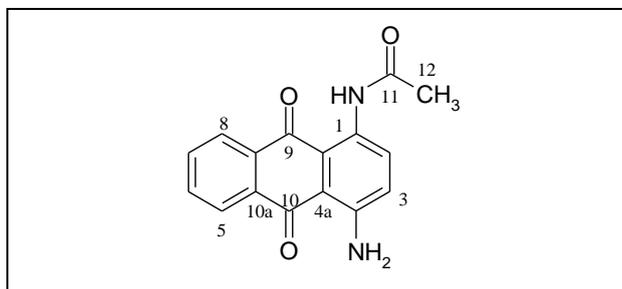


Abbildung 7-7 Strukturformel von U3-21, die mittels NMR-Analyse aufgeklärt wurde. Es handelt sich dabei um 1-N-Acetyldiaminoanthrachinon ( $M_r$ : 280,28 g/mol).

Tabelle 7-10 NMR-Daten für U3-21, die aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren und den  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMBC-,  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMBC- und H2BC-2D-Spektren abgelesen wurden.

Position	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{N}}$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}$ (J Hz) [ppm]	COSY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC ( $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HMBC)	H2BC
1	133,5			2-H, 3-H	
2	128,6	8,68 d (9,5)	3-H	1-NH	3-H
3	126,9	7,33 d (9,5)	2-H		2-H
4	149,0			2-H	
4a	108,9*			3-H	
5	125,9	8,20 dd (7,7; 1,6)	7-H	8-H	7-H
6	134,3	7,90 ddd (7,7; 7,7; 1,6)	6-H, 8-H	9-H	6-H, 8-H
7	133,2	7,85 ddd (7,7; 7,7; 1,4)	7-H, 9-H	6-H	7-H, 9-H
8	126,4	8,21 dd (7,5; 1,4)	8-H	7-H	8-H
8a	132,9			8-H	
9	186,0			10-H	
9a	116,0			1-NH, 2-H	
10	182,8			6-H	
10a	133,7			7-H	
11	169,1			1-NH, 12-H <sub>3</sub>	
12	25,4	2,21 s			
1-NH	127,7	12,2 s br		1-NH ( $^1\text{J}$ ), 12-H <sub>3</sub>	
4-NH <sub>2</sub>	108,8*	7,17* s br / 6,57* s br			

\*Signal und Zuordnung nicht klar

## 7.6 Plasmidkarten

## 7.6.1 pTESb-sam8+5

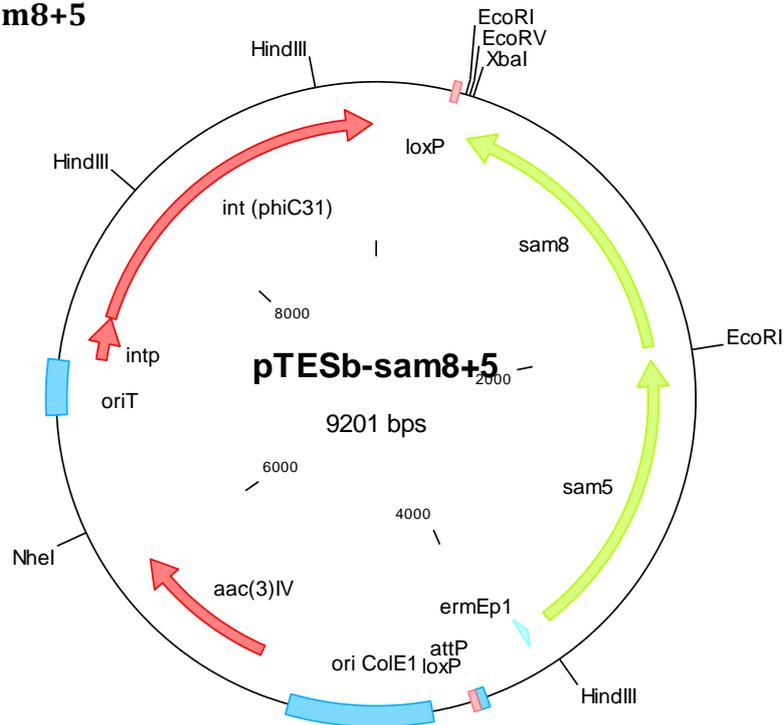


Abbildung 7-8 Plasmidkarte von pTESb-sam8+5, verwendet für die heterologe Expression des Tyrosin-Ammoniak-Lyasegens *sam8* und des 4-Cumarat-3-Hydroxylasegens *sam5* in Actinomyceten.

## 7.6.2 pSET\*sam7

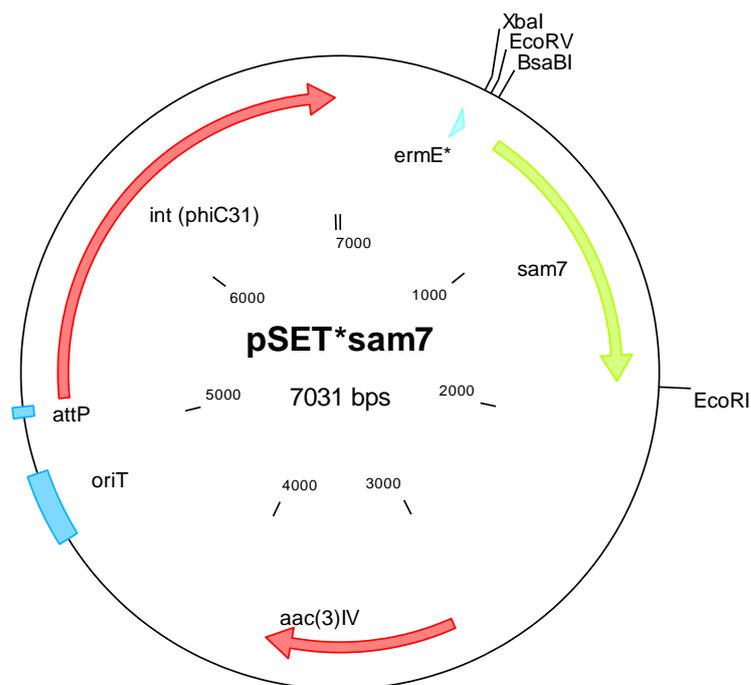


Abbildung 7-9 Plasmidkarte von pSET\*sam7, verwendet für die heterologe Expression des putativen Kaffeyl-CoA-Lyasegens *sam7* in Actinomyceten.

## 7.6.3 pTOS\*sam7+5+8

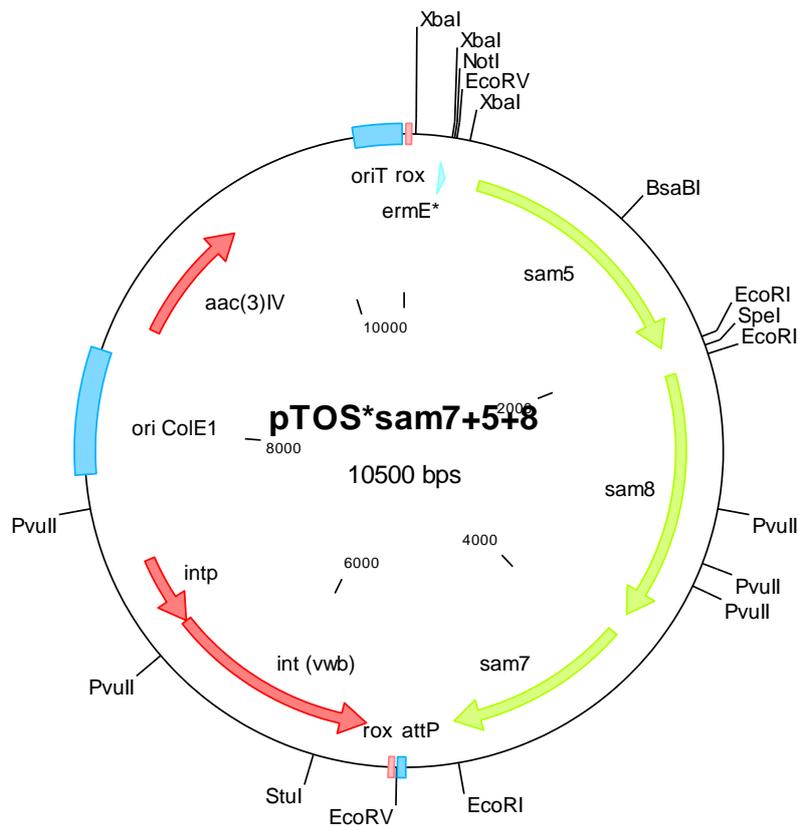


Abbildung 7-10 Plasmidkarte von pTOS\*sam7+5+8, kann zur heterologen Expression von *sam7*, *sam8* und *sam5* in Actinomyceten verwendet werden.

## 7.6.4 pTOS\*sam7+5+8+36

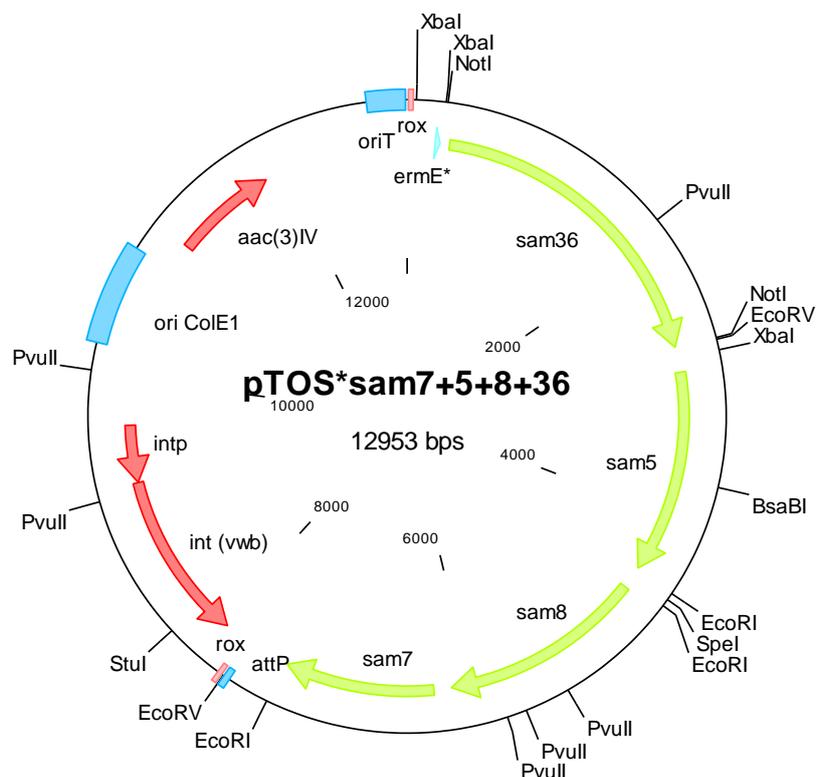


Abbildung 7-11 Plasmidkarte von pTOS\*sam7+5+8+36, kann zur heterologen Expression von *sam7*, *sam8*, *sam5* und *sam36* in Actinomyceten verwendet werden.

### 7.6.5 pTOS-Rham

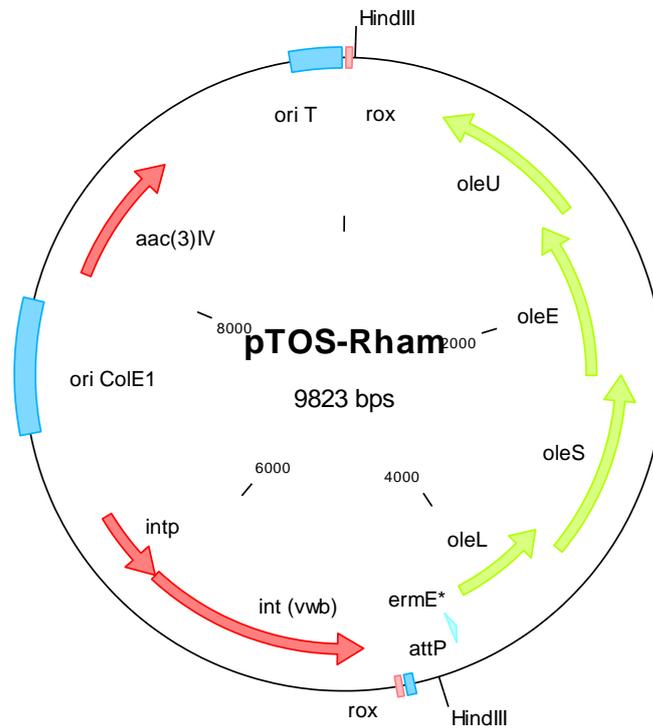


Abbildung 7-12 Plasmidkarte von pTOS-Rham, verwendet für die heterologe Expression der dTDP-Rhamnose Biosynthesegene *oleS*, *oleE*, *oleL* und *oleU* in *S. albus*.

### 7.6.6 pUWL-A-698

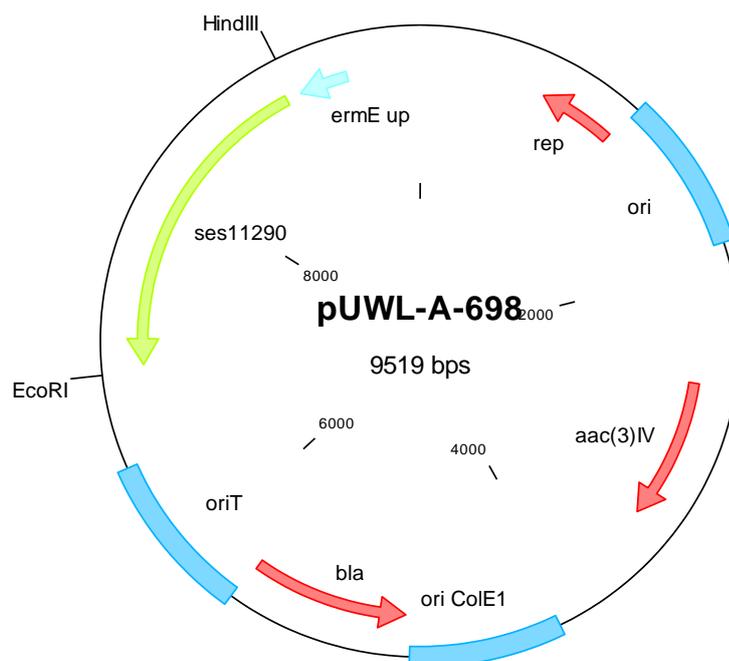


Abbildung 7-13 Plasmidkarte von pUWL-A-698, verwendet für die heterologe Expression des Glycosyltransferasegens *ses11290* in *S. albus* Rham.

## 7.6.7 pUWL-A-7665

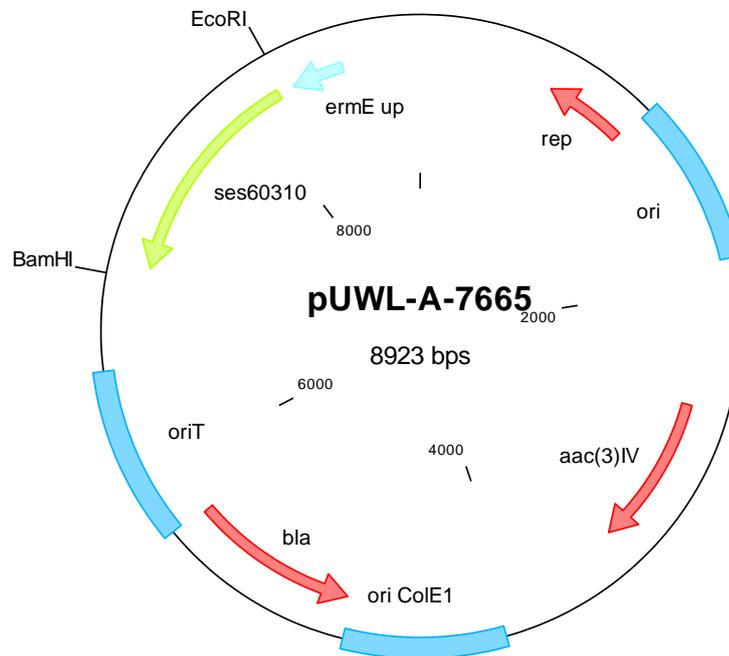


Abbildung 7-14 Plasmidkarte von pUWL-A-7665, verwendet für die heterologe Expression des Glycosyltransferasegens *ses60310* in *S. albus* Rham.

## 7.6.8 pUWL-A-7668

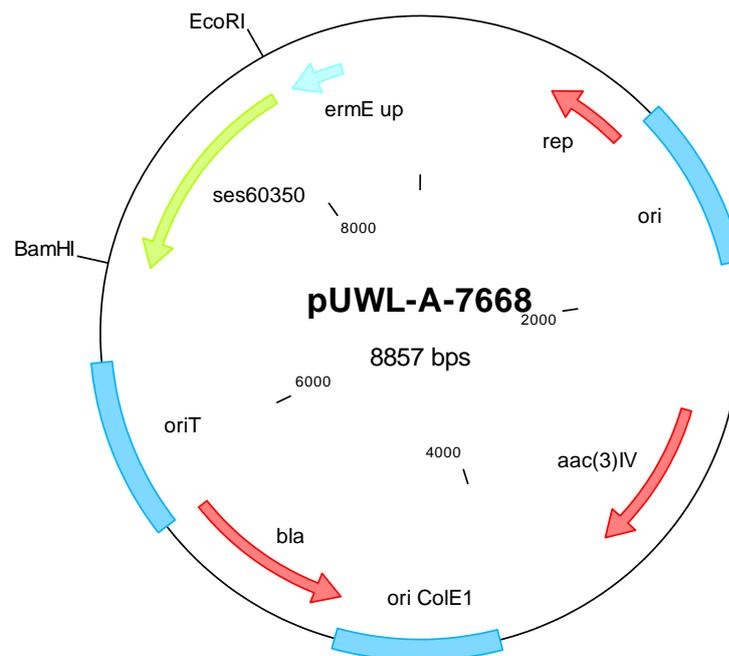


Abbildung 7-15 Plasmidkarte von pUWL-A-7668, verwendet für die heterologe Expression des Glycosyltransferasegens *ses60350* in *S. albus* Rham.

## 7.6.9 pUWL-A-sace\_2010

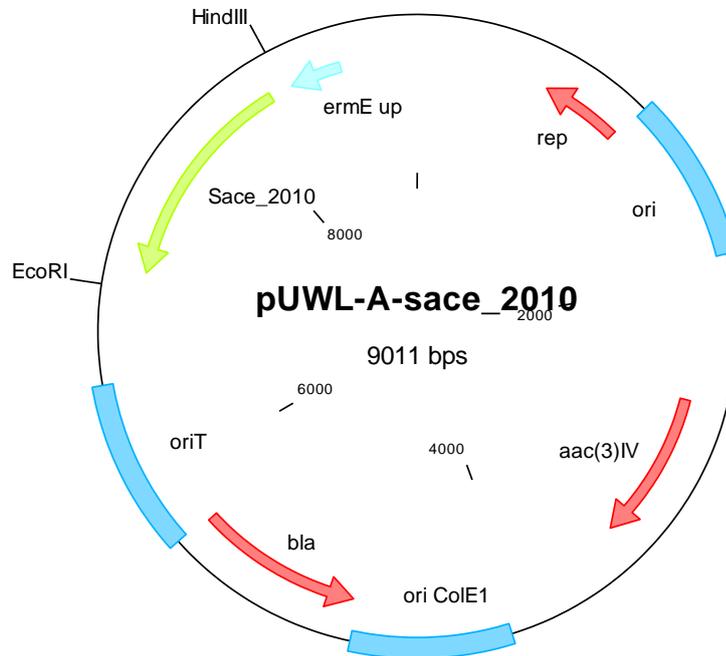


Abbildung 7-16 Plasmidkarte von pUWL-A-sace\_2010, verwendet für die heterologe Expression des Glycosyltransferasegens *sace\_2010* in *S. albus* Rham.

## 7.6.10 pKΔ6130

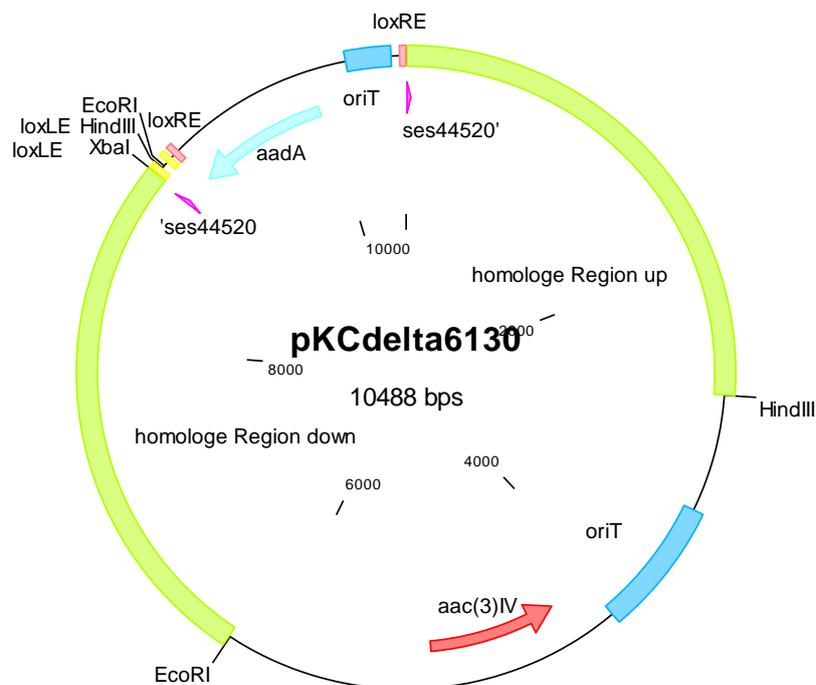


Abbildung 7-17 Plasmidkarte von pKΔ6130, verwendet zur Inaktivierung des Glycosyltransferasegens *ses44520* in *S. espanaensis*.

## 7.6.11 pKΔ6266

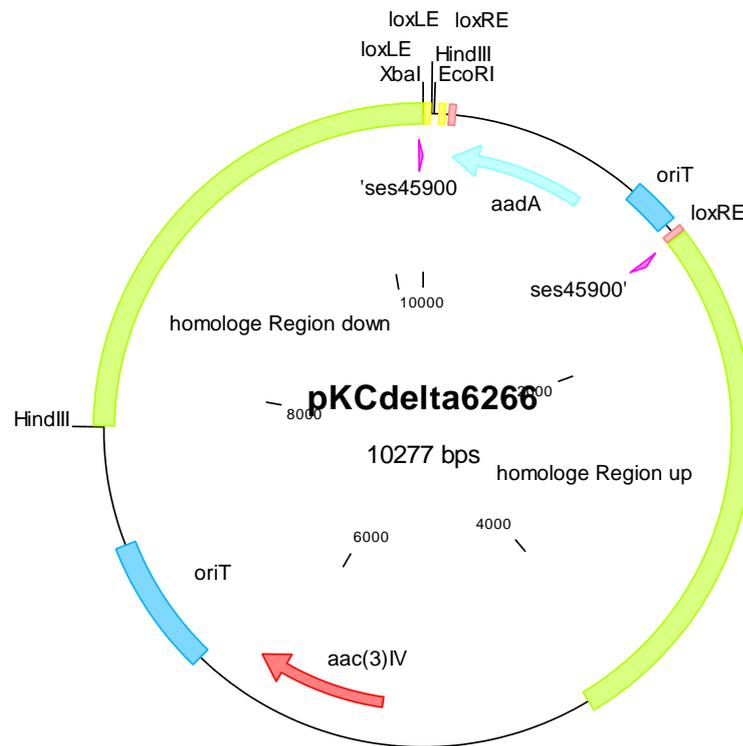


Abbildung 7-18 Plasmidkarte von pKΔ6266, verwendet zur Inaktivierung des Glycosyltransferasegens *ses45900* in *S. espanaensis*.

## 7.6.12 pKΔ6449

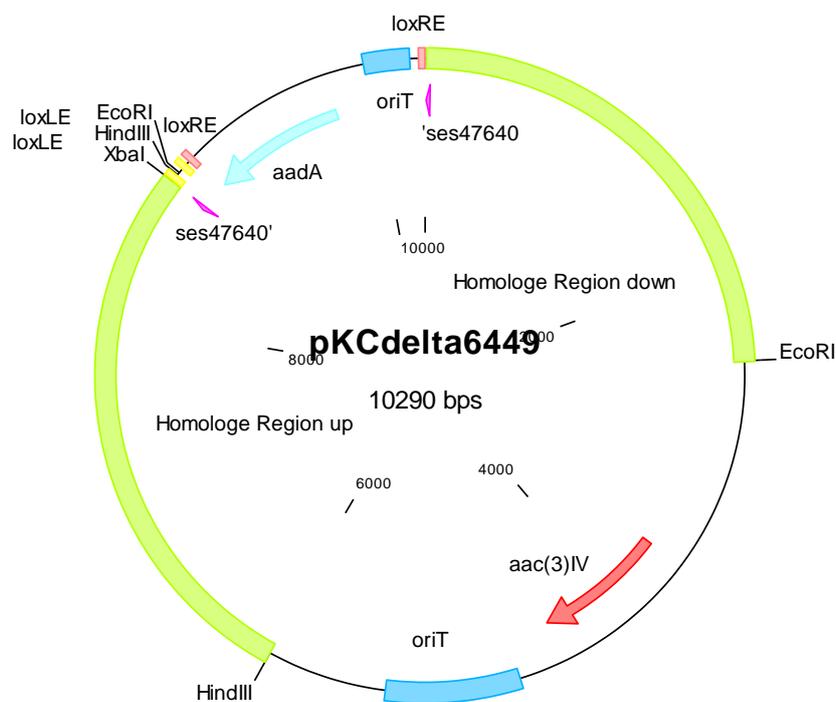


Abbildung 7-19 Plasmidkarte von pKΔ6449, verwendet zur Inaktivierung des Glycosyltransferasegens *ses47640* in *S. espanaensis*.

## 7.6.13 pKΔ6609

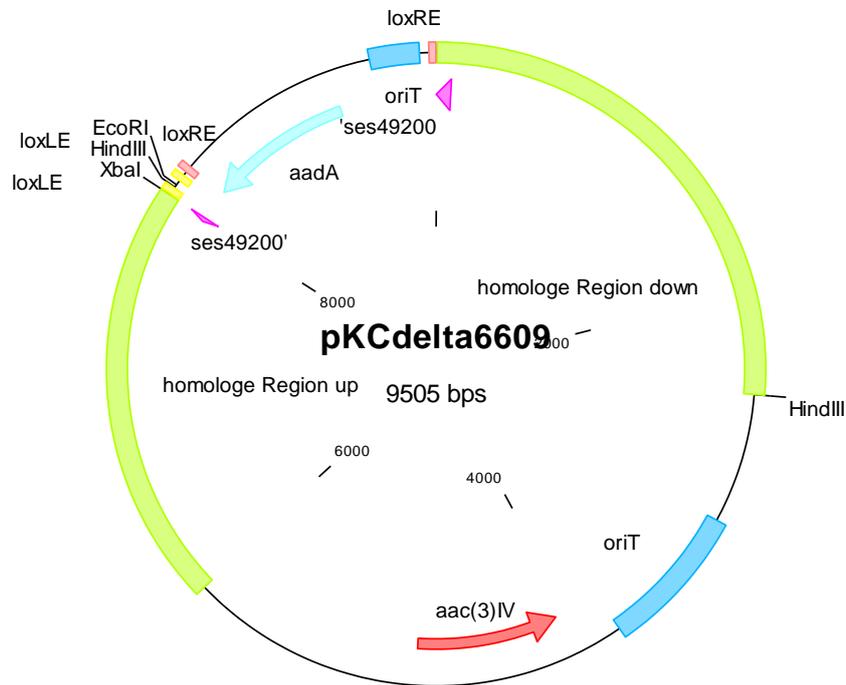


Abbildung 7-20 Plasmidkarte von pKΔ6609, verwendet zur Inaktivierung des Glycosyltransferasegens *ses49200* in *S. espanaensis*.

## 7.6.14 pKΔ7665

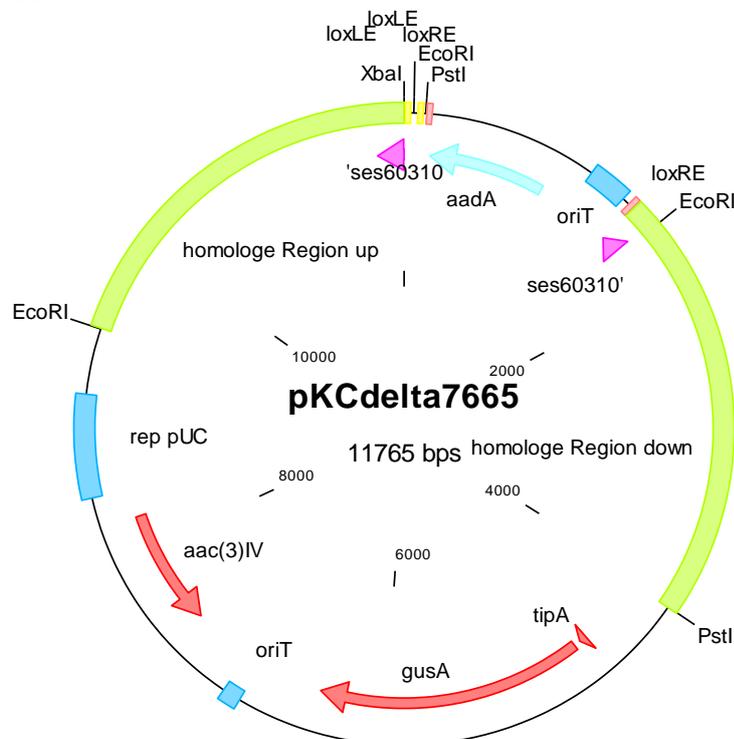


Abbildung 7-21 Plasmidkarte von pKΔ7665, verwendet zur Inaktivierung des Glycosyltransferasegens *ses60310* in *S. espanaensis*.

7.6.15 pSET-7665

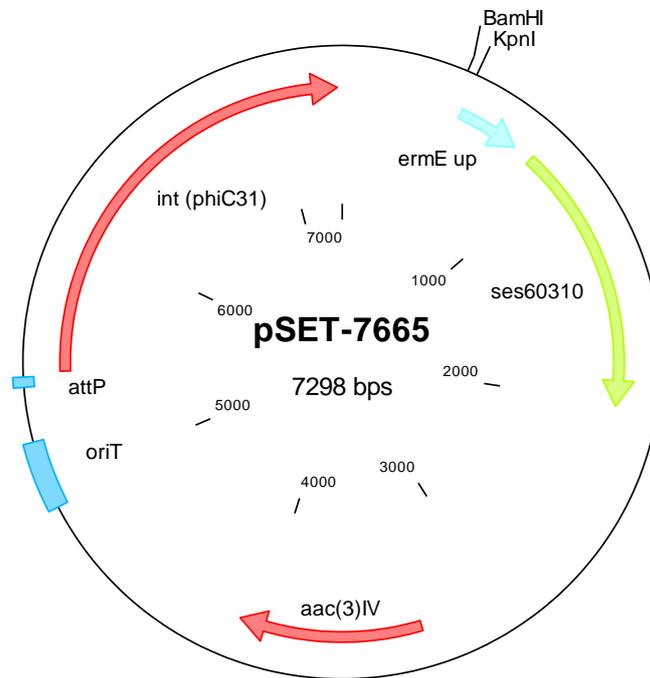


Abbildung 7-22 Plasmidkarte von pSET-7665, verwendet zur Komplementierung von *S. espanaensis*  $\Delta$ 7665 mit dem Glycosyltransferasegens *ses60310*.

7.6.16 pET28a-7665-N-his

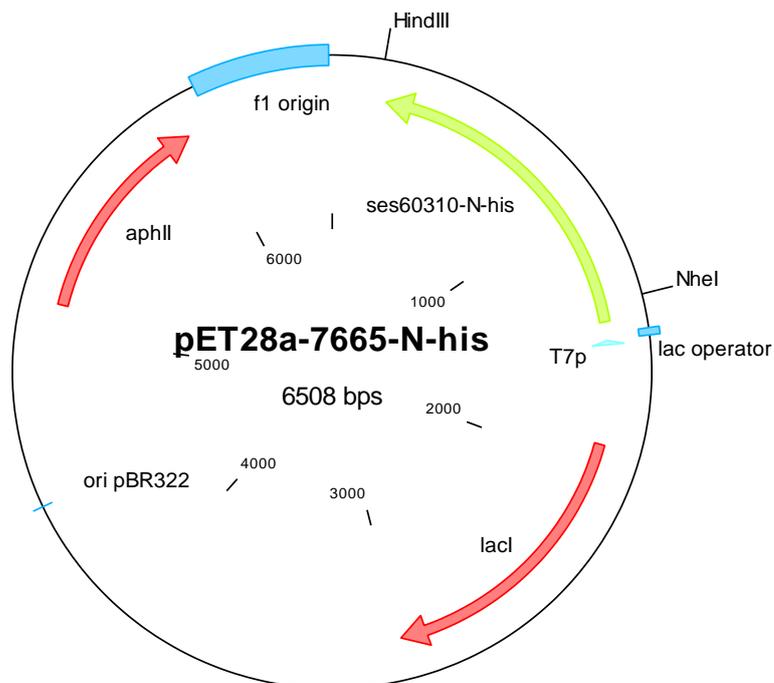


Abbildung 7-23 Plasmidkarte von pET28a-7665-N-his, verwendet zur Expression des Glycosyltransferasegens *ses60310* mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli*.

---

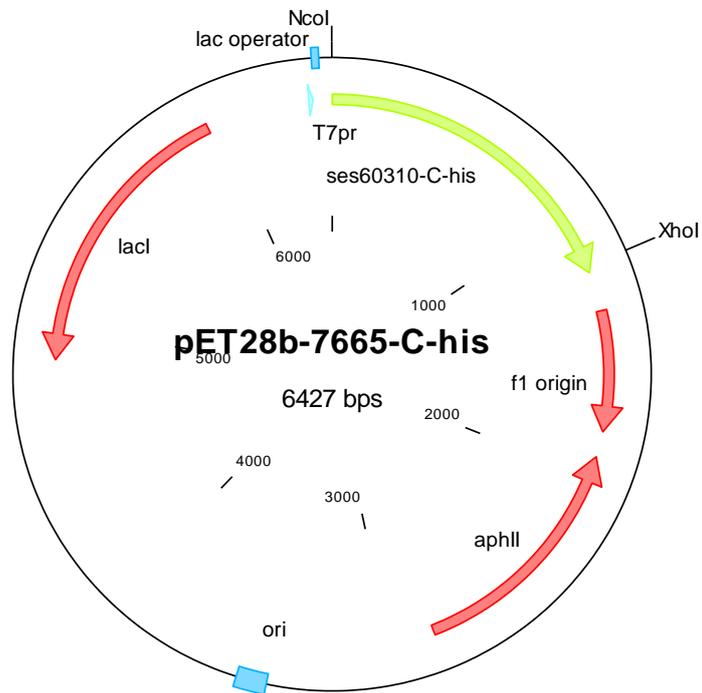
**7.6.17 pET28b-7665-C-his**

Abbildung 7-24 Plasmidkarte von pET28b-7665-C-his, verwendet zur Expression des Glycosyltransferasegens *ses60310* mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli*.

## 8 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Andreas Bechthold für die Überlassung des interessanten Themas, für die wissenschaftliche Freiheit und seine offene Tür bei Problemen und Fragen. Besonders bedanken möchte ich mich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren. Die dort gewonnen Eindrücke haben meine Arbeit sehr bereichert.
- Prof. Dr. Regine Süß für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats, sowie Jun.-Prof. Dr. Stefan Günther für die sofortige Bereitschaft, an meinem Rigorosum als Drittprüfer teilzunehmen.
- Dr. Christian Rückert und Dr. Jörn Kalinowski von CeBiTec an der Universität Bielefeld für die erfolgreiche Zusammenarbeit zur Veröffentlichung des Genoms von *Saccharothrix espanaensis*. Danke Christian, für Deine „Computer-Magie“. Sie hat mir die Arbeit oft sehr erleichtert.
- Dr. Elke Brötz und Dr. Thomas Paululat an der Universität Siegen für die Durchführung der NMR-Messungen und die Strukturaufklärung der Biotransformationsprodukte. Vielen Dank für die stets hilfbereite und verlässliche Kooperation.
- Dr. Marta Luzhetska und Dr. Andriy Luzhetskyy für ihr großes Interesse an meiner Arbeit und die unzähligen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.
- Prof. Dr. Jose A. Salas an der Universität Oviedo, der mir das Plasmid pRHAM zur Verfügung gestellt hat, Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel an der Universität Marburg für den Stamm *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 23338 und Prof. Dr. Peter F. Leadlay an der Universität Cambridge für den Stamm *Escherichia coli* BL21 Codon Plus RP x pL1SL2.
- meinen Korrekturlesern Yvonne Schmidt, Katharina Asmus, Tanja Heitzler, Linda Strobel und Stephan Flemming für die hilfreichen Anmerkungen zu dieser Arbeit.
- meiner ehemaligen Masterstudentin Suzan Samra für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Vielen Dank für Dein großes Herz.
- meiner ehemaligen Diplomandin Yvonne Schmidt für das große Interesse an unseren gemeinsamen Projekten. Vielen Dank für die moralische Unterstützung bei den letzten Sätzen dieser Arbeit.
- Lutz Petzke, Katharina Asmus, Suzan Samra, Tanja Heitzler und Yvonne Schmidt für die gemeinsame Zeit in der Denkwelle. Danke für die freundschaftliche und diskussionsfreudige Zusammenarbeit. Ohne Euch hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.
- Theresa Siegl, Simone Bläsi, Julia Wunsch-Palasis, Sarah Maier und Sandra Ebeling für die großartige Zeit auf den Reisen nach Australien, Spanien und New York.

- den Mitgliedern unserer Kochgruppe Katharina Asmus, Simone Bläsi, Katrin Naumann, Ulrike Linder, Bettina Siedle, Tanja Heitzler, Tina Wardecki und Katharina Heßelbach dafür, dass Ihr mir jede Mittagspause eine leckere Alternative zu Salami-Weckle und Co geboten habt.
- den „Guten Feen der Labore“ Elisabeth Welle, Marcus Essing und Monika Weber.
- allen anderen lieben Kollegen für die gute Arbeitsatmosphäre.
- meiner Familie und meinen Freunden für die große Unterstützung. Danke vor allem dafür, dass Ihr mich regelmäßig daran erinnert habt, dass das Leben nicht nur aus Arbeit besteht.
- meinen Eltern für alles was sie für mich tun. Danke schön.

---

## **Bildungsgang**

*Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung*

