Das Biosynthesegencluster und Geninaktivierungsstudien des Polyketidantibiotikums *atrop*-Abyssomicin C

vorgelegt von
Mag. rer. nat.
Elvira Maria Gottardi
aus Innsbruck, Österreich

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr.rer.nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Friedrich
Gutachter: Prof. Dr. Roderich Süßmuth
Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ullrich Keller

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. November 2009

Berlin 2009

D 83

Danksagung

Prof. Dr. Roderich Süßmuth danke ich für die Überlassung dieses spannenden Themas und für die Freiheiten bei der Bearbeitung.

Priv.-Doz. Dr. Ullrich Keller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Tipps, die ich im Laufe der Jahre von ihm erhalten habe.

PD Dr. Stefan Pelzer und Dr. Agnes Mühlenweg danke ich sehr herzlich für die Vorarbeiten und die Unterstützung die in dieses Projekt eingeflossen sind.

Hanna von Suchodoletz hat mich in die praktischen Arbeiten mit Actinomyceten eingeführt und lange gemeinsam mit mir nach dem Abyssomicin-Gencluster gejagt. Ohne ihre Vorarbeiten wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Darüber hinaus möchte ich mich für die vielen netten Stunden an der Bench und im gemeinsamen Büro herzlichst bedanken.

Joanna Krawczyk hat sich einen Orden dafür verdient, dass sie nach meinem Umzug nach Heidelberg trotz vielfacher anderweitiger Belastungen noch Experimente für dieses Projekt gemacht hat und sogar eine Produktionsoptimierung auf sich genommen hat. Für diesen „Freundschaftsdienst“ und die lustige Zeit zwischen Deutsch und Englisch möchte ich mich bedanken.

Nicole Sattler danke ich sehr herzlich für die unzähligen Stunden, in denen sie Klone gepickt und PCRs angesetzt hat – ohne diese Hilfe stünde ich wahrscheinlich immer noch im Labor!

Simone Schadt danke ich für die Betreuung am Anfang meiner Doktorarbeit und für die Einführung in die Thematik.

Kathrin Schneider danke ich für die Einführung in die Kunst der Isolierung von Naturstoffen und die Betreuung in Analytik-Fragen sowie die netten Stunden – manchmal auch spätabends.

Meinen drei Praktikantinnen Chantal Stieber, Katharina Witting und Ginka Kazakova danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung – ihr habt mir das Leben oft ein wenig leichter gemacht.

Allen „Süßmuths“, denen ich über die Jahre begegnet bin, danke ich für die gute Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch, die Tipps und die schöne Zeit im und außerhalb des Labors, vor allem auch während der Seminarwochenenden! Die entstandenen Freundschaften werden auch den Abschied vom Süßmuth-Labor überstehen. Mein besonderer Dank geht dabei an Timo & Diane Schmiederer, Falko Wolter, Stefan Pohle, Christian Appelt, Anne Hänchen, Wolfgang Müller und Jonny Nachtigall.

Christian Friese danke ich für die kritische Durchsicht des Methodenteils.

Bertram Schemel danke ich für die moralische und seelische Unterstützung sowie fürs Einkaufen, wenn ich wieder einmal nach 20h das Labor verlassen habe!

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Biosynthesegencluster des Polyketidantibiotikums *atrop*-Abyssomicin C identifiziert, sequenziert und durch Geninaktivierungsmutagenese untersucht werden. Dies versprach Einblick in die Biosynthese der Tetronsäureantibiotika im Allgemeinen, zu denen die Abyssomicine gehören, sowie in die Biosynthese von *atrop*-Abyssomicin C im Speziellen. Aus einer Cosmidbank wurden mehrere Cosmide identifiziert, welche Teile des Biosynthesegenclusters für *atrop*-Abyssomicin C beinhalten. Ein Cosmid wurde vollständig sequenziert (C17), zwei weitere Cosmide (C45 und C49) wurden mittels Primer-Walking teilweise sequenziert. Das vorliegende *Contig* (überlappendes DNA-Stück) von 57kb enthält 25 ORFs. Hiervon sind wahrscheinlich 24 für die Biosynthese von Abyssomicin C notwendig. Das *Contig* umfasst drei Polyketidsynthase-Gene (*abyB1-B3*), fünf Gene, welche für die Tetronsäurebiosynthese notwendig sind (*abyA1-A5*) und bereits in anderen Biosynthesegenclustern für Tetronsäureantibiotika gefunden wurden, ein Monooxygenase-Gen (*abyE*), ein drei Gene umfassendes Cytochrom P450 Redox-Set (*orfV*, *W* und *Z*), ein einzelnes Cytochrom P450-Gen (*orfX*), ein vier Gene umfassendes ABC-Transporter-Set (*abyF1-F4*), ein weiteres Transporter-Gen (*abyD*), drei Regulator-Gene (*abyC*, *abyH*, *abyI*), eine Thioesterase Typ II (*orfT*), eine Zink-bindende Alkoholdehydrogenase (*orfU*) sowie ein Gen unbekannter Funktion (*abyK*). Die Cluster-Ränder sind noch nicht abschließend untersucht, *orfX* (am 5'-Ende der Sequenz) und *orfU* (am 3'-Ende der Sequenz) sind wahrscheinlich nicht mehr Teil des Abyssomicin-Genclusters. Die Gene *abyB1–B3* enthalten sieben PKS-Module, fünf codieren für den Einbau von Acetat, zwei für den Einbau von Propionat. Einzelne Deletion der Gene *abyI*, *abyA1*, *abyA2*, *abyA3* und *abyA4* führte zu einem kompletten Ausfall der *atrop*-Abyssomicin C Biosynthese, was die Notwendigkeit dieser Gene für die Abyssomicin-Biosynthese bestätigt. Die Deletion des Gens *abyD* führte zu einer Verringerung der Produktion auf ca. 10% des Wildtyp-Niveaus. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Transporter nicht alleine die Selbstresistenz von *Verrucosispora* AB-18-032 bewirkt. Die Deletion von *abyE* führte zu einer Reduktion der Abyssomicin-Produktion auf ca. 10% des Wildtyp-Niveaus. Die Biosynthesehypothese für *atrop*-Abyssomicin C umfasst nach der Bildung eines linearen Vorläufers durch die Polyketidsynthase die Biosynthese der Tetronsäure durch AbyA1-A5 und eine anschließende Diels-Alder-Reaktion. Das Diels-Alder-Produkt wird entweder durch AbyE oxidiert, worauf sich ein nukleophiler Angriff durch eine Hydroxygruppe der Tetronsäure an das Epoxid anschließt, was zur Bildung der fertigen Spiroverbindung mit vier Ringen führt. Alternativ könnte OrfV die Hydroxylierung des Diels-Alder-Produkts katalysieren. Im Kulturfiltrat der Mutanten *VerrucosisporaΔabyE* und *Verrucosispora pK18mob2[orfV]* konnten keine Biosyntheseintermediate gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Biosynthesegencluster für *atrop*-Abyssomicin C erfolgreich identifiziert, sequenziert und mittels bioinformatischer Analyse sowie Geninaktivierungs- und Gendeletionsexperimenten charakterisiert. Darüber hinaus wurde eine Biosynthesehypothese aufgestellt. Weitere Experimente werden nötig sein, um die Biosynthese von *atrop*-Abyssomicin C im Speziellen und Tetronsäureantibiotika im Allgemeinen abschließend zu klären.

Widmung

Für Bertram

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Die Abyssomicine	8
1.2	Polyketide und Polyketidsynthasen	14
1.3	Tetronsäureantibiotika	20
2	Zielsetzung	24
3	Methoden und Durchführung	25
3.1	Allgemeine Methoden	25
3.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von *Verrucosispora sp.* AB-18-032	25
3.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*	27
3.1.3	Isolierung von DNA	27
3.1.4	Methoden zum Transfer von DNA	29
3.1.5	Analyse von DNA	31
3.2	Anlegen einer Cosmidbank, Genidentifizierung und -sequenzierung	37
3.2.1	Auffinden des Abyssomicin-Genclusters	37
3.2.2	Sequenzierung der Cosmide	42
3.3	Mutanten und Produktionskontrolle	56
3.3.1	Singlecrossover-Mutanten – Insertion von pK18mob2	56
3.3.2	Doppelcrossover-Mutanten durch λ-Red vermittelte Rekombination	61
3.3.3	Komplementation und Überexpression mit dem Plasmid pSETermE*	78
4	Ergebnisse und Diskussion	81
4.1	Das Abyssomicin-Biosynthesegencluster – Sequenz und Annotierung	81
4.2	Clusterränder	85
4.2.1	Die Singlecrossover-Mutante von *orfV* (Cytochrom P450)	85
4.2.2	Die Singlecrossover-Mutante von *orfX* (Cytochrom P450)	87
4.2.3	Selbstresistenz	89
4.2.4	Regulation	93
4.2.5	Die Polyketidsynthasegene *abyB1-abyB3*	95
4.2.6	Die Tetronsäurebiosynthese (*abyA1-abyA5*)	97
4.2.7	Die *atrop*-Abyssomicin-Biosynthese	104
4.2.8	Weitere Abyssomicine aus *Verrucosispora* AB-18-032 und *Streptomyces sp.* (HKI0381)	109
4.3	Fütterungsstudien zur Herkunft der C3-Einheit im Tetronsäure-Motiv	110

4.4	Abyssomicin im Überstand	111
4.5	Mutagenisierung mit Streptomycin	113
4.5.1	Durchführung	113
5	Abschlussdiskussion	116
6	Material	118
6.1	Bakterienstämme	118
6.2	Plasmide	118
6.3	Geräte	123
6.4	Chemikalien und Medienbestandteile	125
6.5	Kits	126
6.6	Enzyme	127
6.7	Medien	128
6.8	Antibiotika und andere Medienzusätze	130
6.9	Lösungen und Puffer	131
7	Anhang	134
7.1	Abkürzungsverzeichnis	134
7.2	Literaturverzeichnis	136

1 Einleitung

Infektionskrankheiten – Geißel der Menschheit

In früheren Jahrhunderten waren die Menschen Infektionskrankheiten vollkommen ausgeliefert – eine harmlose Verletzung konnte zu schwerer Krankheit oder gar zum Tod binnen Tagen führen, Epidemien wie die Pest oder die Cholera rafften in kürzester Zeit tausende Menschen dahin – Infektionskrankheiten waren bis 1900 die Haupttodesursache weltweit.[1] Der Siegeszug der wissenschaftlichen Hygiene ab der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts führte zwischen 1900 und 1940 zu einem deutlichen Anstieg Lebenserwartung in der westlichen Welt, Todesfälle aufgrund von Infektionskrankheiten verringerten sich um durchschnittlich 2,8 % pro Jahr.[2] Das Ausmaß einer Epidemie konnte dann zwar verringert und eine Ansteckung verhindert werden, eine ausgebrochene Krankheit aber konnte nicht behandelt werden. Erst mit der Entwicklung der wissenschaftlichen Bakteriologie und dem Sieg der Kontagienlehre[a] über die Miasmentheorie[b] konnte die gezielte Suche nach Wirkstoffen gegen bakterielle Infektionen beginnen.

Entwicklung der ersten Antiinfektiva

Den ersten großen Erfolg hatte Paul Ehrlich, dessen arsenhaltiges Präparat *Salvarsan* 1910 (und der weniger toxische Nachfolger *Neosalvarsan* 1912) auf den Markt kam: Nun konnte erstmals die Syphilis einigermaßen spezifisch und ohne zu schwere Nebenwirkungen behandelt werden.[3] Der nächste Meilenstein war die Entwicklung des Sulfonamids *Prontosil* durch Gerhard Domagk, welches 1935 in den Handel kam. Domagk hatte beobachtet, dass Bakterien nicht unbedingt abgetötet, sondern vor allem geschädigt werden müssen – anschließend würden die geschwächten Keime im Organismus phagozytiert und so durch „innere Desinfektion" unschädlich gemacht.[3] Für die Entwicklung der Sulfonamide sollte ihm 1939 der Nobelpreis verliehen werden – allein die Annahme blieb ihm durch ein Verbot Hitlers verwehrt. Eine der bekanntesten Episoden aus den Biowissenschaften ist die Entdeckung von Alexander Fleming, dass ein Schimmelpilz (später klassifiziert als *Penicillium notatum*) die Ausbreitung von *Staphylococcus aureus* hemmt – und dies durch den Zufall, dass Fleming 1928 nach der Rückkehr von einem einmonatigen Urlaub im Labor alte, ursprünglich mit *S. aureus* beimpfte Petrischalen vorfand, die mit dem Schimmel kontaminiert waren. Fleming kulti-

[a] bereits 1546 formulierte Girolamo Fracastoro, dass die Ausbreitung von Epidemien über spezifische, abströmende Partikel, durch direkten Kontakt oder durch die Luft erfolgt

[b] epidemische Krankheiten werden durch Ausdünstungen des Bodens oder krank machende Bestandteile der Luft verursacht (*Pesthauch* oder *mal aria*, schlechte Luft)

vierte den Pilz, führte verschiedenste Hemmtests mit der Kulturflüssigkeit durch und publizierte seine Ergebnisse im *British Journal of Experimental Pathology*.[4] Die Isolierung der aktiven Substanz allerdings wollte ihm auch aufgrund der niedrigen Produktionsrate nicht gelingen und er konnte keinen Chemiker für die Substanz begeistern. Erst 12 Jahre später nahm die Geschichte Fahrt auf und binnen fünf Jahren wurde Penicillin auf industriellem Niveau hergestellt und Menschen in den USA und Europa konnten schließlich behandelt werden.[2] Hier war sie nun, die „Zauberkugel", nach der noch Paul Ehrlich gesucht hatte – gut verträglich, schnell und sicher wirksam sowie gut verfügbar.[a] Für die Entdeckung und Entwicklung von Penicillin wurde Alexander Fleming gemeinsam mit Howard Walter Florey und Ernst Boris Chain 1945 der Nobelpreis verliehen. Es schien damals absehbar, dass die Ära der Infektionskrankheiten vorbei sei und dass der Mensch über die Mikroorganismen gesiegt hätte.

Bakterielle Resistenzen

Die rasche Resistenzentwicklung gegen die Sulfonamide und bald auch gegen Penicillin wurde durch die Entwicklung immer neuer Wirkstoffe in den Hintergrund gedrängt. Zwischen 1930 und 1970 wurden immer neue antimikrobielle Wirkstoffe auf den Markt gebracht, mehr als 150 stehen heute zur Verfügung. Dieser Prozess der Wirkstofffindung hat sich seitdem aber stark verlangsamt.[5] In den 1980er Jahren begannen viele Pharmafirmen, sich lukrativeren Geschäftsfeldern zuzuwenden und die „Pipelines" wurden immer leerer.[6] Vor allem das alarmierende Auftreten von Mikroorganismen, die gegen alle verfügbaren Antibiotika resistent sind, lässt das Szenario einer post-antibiotischen Ära nicht gänzlich unmöglich erscheinen.[5] Am bekanntesten sind die häufig in Krankenhäusern auftretenden MRSA oder Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme. Aber auch die vor allem in Ländern der ehemaligen UdSSR wieder vermehrt grassierende Tuberkulose lässt sich nur durch eine langwierige Kombinationstherapie behandeln – die Zeit der Wunderdrogen ist vorbei. Die Ursachen für die Resistenzentwicklung liegen zu einem großen Teil in der falschen Anwendung der Antibiotika: die Einnahme zu geringer Dosen, zu früher Abbruch der Behandlung oder die Anwendung bei Virusinfekten und andere Gründe. Aber auch Ursachen wie der übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Tiermast (geschätzte 50 % der in Europa und den USA produzierten Antibiotika wurden oder werden bei Nutztieren eingesetzt), die zunehmende Zahl an immungeschwächten Patienten (AIDS-Kranke, immunsupprimierte Transplantationspatienten, alte Menschen) und der Aufenthalt in Krankenhäusern, wo besonders viele multiresistente Keime auftreten, sind zu nennen. Sogenannte *nosokomiale Infekte* (im Kranken-

[a] Ursprünglich musste Penicillin injiziert werden, erst durch die Entwicklung des Oralen Penicillins 1948 in der *Biochemie Gesellschaft* in Kundl, Österreich konnte es als Penicillin V (V = vertraulich) in Tabletten gepresst werden.[2] Penicillin V wird heute noch als primäres Medikament bei Streptokokken-Infektionen eingesetzt.

haus erworben) sind in der industrialisierten Welt ein großes Problem, während in Entwicklungsländern das Wiederaufflammen der Tuberkulose viele Menschen gefährdet.[5] Weltweit stehen Infektionskrankheiten nunmehr an zweiter Stelle der Todesursachen und in den Industrienationen an dritter Stelle.[1]

Entwicklung neuer Antibiotika

Doch woher kommen die immer neuen Antibiotika (und andere biologisch aktive Substanzen wie Immunsuppressiva, Zytostatika oder Pflanzenschutzmittel)? Es gibt verschiedene Möglichkeiten, neue Substanzen zu gewinnen:

- Isolierung aus biologischen Materialien (wie Pflanzen oder Mikroorganismen)
- Heterologe Expression von Biosynthesegenen aus nichtkultivierbaren Organismen
- Chemisch-synthetische Veränderung von aus der Natur isolierten Grundsubstanzen (semisynthetische Substanzen) und Mutasynthese
- Chemische Totalsynthese

Jeder dieser Wege hat Vor- und Nachteile, die hier im Folgenden aufgeführt werden.

Isolierung von aktiven Substanzen aus biologischem Material

Die Vielfalt der in der Natur zu findenden Substanzen ist unübertroffen. Andererseits gibt es sehr viele Substanzen, die nicht nur von einer Spezies produziert werden, sondern von Gattungen. Dies führt dazu, dass sich bei der Analyse von bisher unbekannten Lebewesen häufig bereits beschriebene Metabolite wiederfinden – die Identifikation der Substanzen ist aber oft erst möglich, wenn die Charakterisierung der Substanz bereits weit fortgeschritten ist, was ein meist sehr komplexer und zeitintensiver Prozess ist. So ist die Suche nach neuartigen Substanzen aus biologischem Material ein mühsamer, aber dennoch sehr lohnender Weg. Je nach Quelle kann die Isolierung von Substanzen aus biologischem Material eine sehr kostengünstige, einfache Lösung sein (bei der die Substanz aus wenigen Litern Kulturbrühe im Gramm-Maßstab isoliert werden kann) aber auch ein mühsames, teures Unterfangen (wie z.B. bei Taxol, welches anfangs aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* mit einer Ausbeute von 10 g aus 1.200 kg Rinde isoliert wurde, nunmehr aber semisynthetisch gewonnen werden kann).[7,8] Über 60 % aller Wirkstoffe, die auf dem Markt sind, sind Naturstoffe oder verwandt mit Naturstoffen (6 % Naturstoffe, 27 % Naturstoff-Derivate, 5 % sind zwar synthetisch, haben aber einen aus der Natur stammenden Pharmakophor und 23 % sind synthetische Nachahmungen von Naturstoffen). Bei Antibiotika und Zytostatika (Krebsmedikamente) ist diese Rate sogar noch dramatischer: 78 % der Antibiotika und 74 % der Zytostatika stammen direkt oder indirekt aus der Natur.[1] Etwa 66 % der ca. 12.000 bekannten, aus Mikroorganismen isolierten Antibiotika stammen aus Actinomyceten (55 % davon aus Streptomyceten).[1]

Heterologe Expression von Biosynthesegenclustern

Nur 0,1 % der Mikroorganismen können kultiviert werden;[9,10] die Gewinnung von Naturstoffen geschah bis jetzt also nur aus einem kleinen Teil der möglichen Produzenten. Hier kommt die Metagenomik ins Spiel, bei der aus einer Bodenprobe oder aus einem

Symbionten wie z.B. einem Schwamm das *Metagenom* gewonnen wird. Es besteht aus der Gesamtheit der genetischen Information der Organismen, die sich in der Probe befunden haben und kann, in Fragmente zerteilt, mit einem Vektor in eine Metagenom-Bank verwandelt werden. Die Klone der Bank werden sequenziert, die Sequenzen auf für interessante Substanzen typische Biosynthesegene untersucht und derartige Fragmente in einen Wirt transformiert. Idealerweise ist so die heterologe Expression einer vielversprechenden Struktur möglich. Dieser Ansatz hat allerdings noch viele Probleme und es wird noch einige Jahre dauern, bis hier ein Durchbruch erzielt wird.[11]

Semisynthetische Wege und Mutasynthese

Mischformen zwischen Synthese und Isolierung sind einerseits die Semisynthese, bei der ein Naturstoff isoliert wird und anschließend auf chemisch-synthetischem Weg derivatisiert wird und andererseits die Mutasynthese, bei der die Biosynthese des Naturstoffes auf genetischem Wege unterbrochen wird und der nun fehlende Baustein in modifizierter Form zugeführt wird.[12] Während die Semisynthese breite Anwendung findet (z.B. bei der Herstellung von Taxol),[7] steckt die Mutasynthese noch in den Kinderschuhen.[12,13]

Chemische Synthese

Grundlage für die chemische Synthese ist ein Syntheseplan, d.h. dass eine Struktur erdacht und für diese Struktur ein Syntheseweg gefunden wird. Die Idee für eine Synthese kann aus der Natur kommen, das heisst, dass ein bereits bekannter Stoff oder dessen Derivat synthetisiert wird. Viele Naturstoffe werden aus Interesse, um die Methodik zu erweitern oder um eine Grundlage für eine Derivatisierung zu haben synthetisiert. Eine Derivatisierung ist oft geeignet, die Eigenschaften des Wirkstoffes zu verbessern – es können die Bioverfügbarkeit oder die Wirkung verbessert werden, aber auch Nebenwirkungen vermindert und Resistenzen umgangen werden. Für die industrielle Produktion werden Naturstoffe nur dann auf chemisch-synthetischem Wege hergestellt, wenn eine Gewinnung aus dem Ursprungsorganismus zu aufwendig ist. Eine der moderneren Ideen ist die Kombinatorische Chemie, bei der in vielen gleichzeitigen, automatisierten Reaktionen unterschiedliche Bausteine miteinander verknüpft werden (etwa Aminosäuren) und so mit einem Versuch eine ganze Substanzbibliothek generiert werden kann. Anschließend wird üblicherweise ein Hochdurchsatz-Screening erfolgen, etwa mit einem biochemischen Test oder mit einem zellbasierten Ansatz. Hochdurchsatz-Screenings werden üblicherweise mit großen Substanzbibliotheken durchgeführt, wie sie Pharmafirmen mit einer typischen Größe von 10^6 Substanzen besitzen.[14] Eine weitere moderne Methode ist die Computer-gestützte Wirkstoff-Entwicklung, bei der die Eigenschaften des Targets in Funktionen verpackt werden und mithilfe von Berechnungen eine Leit-Struktur gefunden werden soll, die etwa in ein bestimmte Bindungstasche eines Enzyms hineinpasst (Docking).[15]

Die Entdeckung von Abyssomicin

All diese Methoden können aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die erfolgreichste Quelle für neue Wirkstoffe seit der Entdeckung des Penicillins immer noch die Natur ist

– 63 % der in den letzten 25 Jahren auf den Markt gekommenen *small molecules* (niedermolekulare Wirkstoffe) waren entweder Naturstoffe, Semisynthetika, Derivate von Naturstoffen oder enthielten einen aus der Natur entlehnten Pharmakophor.[16] In den vergangenen Jahren konzentrierte sich die Suche nach neuen Antibiotika auf unbekannte Habitate und hat Expeditionen in unwirtliche und bisher unerforschte Habitate geführt: in der Tiefsee, in Höhlen, in Wüsten und in Bergen wurden Bodenproben gesammelt, um Mikroben mit einem unerschlossenen biosynthetischen Potential zu finden.[17-21] Gleichzeitig wurde in den vergangenen Jahren die rationale Identifizierung von neuen Targets in Bakterien immer weiter entwickelt.[21, 22] 2004 wurde eine dieser vielen Initiativen mit der Entdeckung einer neuen Substanz belohnt, die von einem Bakterium produziert wird, das aus der japanischen Sagami Bay aus 298 m Tiefe stammt und antibakterielle Wirkung gegen ein neues Target zeigt. Diese Substanz wird vom bis dahin unbekannten Stamm *Verrucosispora sp.* AB-18-032 produziert und wurde „Abyssomicin C" genannt. Abyssomicin C zeigte Wirksamkeit gegen verschiedene Gram-positive Bakterien, darunter Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). [22,]

Abyssomicin C inhibiert die Biosynthese der p-Aminobenzoesäure (pABA), die ein Teilbereich des Folat-Biosynthesewegs ist.[23,24] Dr. Simone Keller aus unserer Arbeitsgruppe konnte 2007 zeigen, dass Abyssomicin C kovalent an PabB (Aminodesoxychorismat-Synthase) bindet, die Bildung von *p*ABA und damit die Biosynthese von Folsäure verhindert.[23,24] Die Folsäurebiosynthese ist essentiell für Pflanzen, Prokaryonten, Pilzen und Parasiten der Apicomplexa-Gruppe (wie z.B. Plasmodien), existiert aber nicht in Wirbeltieren, die Folsäure über ihre Nahrung aufnehmen.[22] Daher ist die Folsäure-Biosynthese ein ideales Target bei der Suche nach neuen Leit-Strukturen. Bisher waren nur synthetische Stoffe bekannt, die gegen dieses Target wirken: die ersten waren die Sulfonamide, die von Georg Domagk 1935 erstmals als Antiinfektiva beschrieben wurden (Prontosil),[25,26,27] und die Diaminobenzylpyrimidine (Trimethoprim). [28, 29]

Seit 2005 wurden von mehreren renommierten Gruppen erfolgreiche Strategien zur Totalsynthese von Abyssomicin C publiziert.[30-34] Die meisten von ihnen enthielten Diels-Alder-Reaktionen, am elegantesten ist die biomimetische Strategie der Gruppe von Sorensen, die ein mögliches Modell der Biosynthese von Abyssomicin C darstellt.[33] Die Gruppe von K.C. Nicolaou konnte im Rahmen einer weiteren Totalsynthese von Abyssomicin C ein *atrop*-Isomer von Abyssomicin C charakterisieren, welches sich anschließend als Hauptprodukt im Kulturfiltrat von *Verrucosispora* AB 18-032 entpuppte. Beide Isomere haben eine nahezu identische Retentionszeit, allerdings ist das UV-Spektrum unterschiedlich.[35]

Atrop-Abyssomicin C und Abyssomicin C sind verwandt mit Tetronomycin-ähnlichen Antibiotika wie Chlorothricin,[36,37] Tetronomycin[38] und Tetrocarcin,[39] die alle eine Tetronsäureeinheit beinhalten (4-Hydroxy-(5H)-furan-2-on). Tetronsäureantibiotika sind eine wichtige Subklasse der Polyketidantibiotika mit vielen verschiedenen Targets. In den vergangenen drei Jahren wurden die Biosynthesegencluster von vier verschiedenen Tetronaten aufgeklärt: Chlorothricin, Kijanimicin, Tetronomycin und Tetrocarcin.[40-43] Mehrere Gene wurden bei allen vier Tetronaten gefunden und stellen wahrscheinlich das Basisset dar,[41] welches für die Biosynthese der Tetronsäure notwendig ist.

1.1 Die Abyssomicine

2003 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Peter Fiedler, Universität Tübingen ein Screening mit 930 Extrakten von 301 Actinomyces-Stämmen durchgeführt. Dabei wurde nach einem Inhibitor der *p*-Aminobenzoesäure (*p*ABA)-Biosynthese gesucht.[22,44] Die *p*ABA ist ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese der Folsäure, welche von Pflanzen, Prokaryonten, Pilzen sowie von Parasiten der Apicomplexa-Gruppe synthetisiert werden kann, aber nicht von Wirbeltieren, welche Folsäure aus der Nahrung aufnehmen. Daher wirkt ein Inhibitor der Folsäurebiosynthese nicht bei Wirbeltieren. Ein einziger Extrakt führte zu dem gesuchten Effekt: der spezifischen Hemmung der Umwandlung von Chorismat zu *p*ABA. Dieser Extrakt wurde mittels HPLC-DAD analysiert und fünf Peaks konnten identifiziert werden, deren UV-Spektrum auf neuartige Strukturen hinwiesen (Abbildung 1).[45]

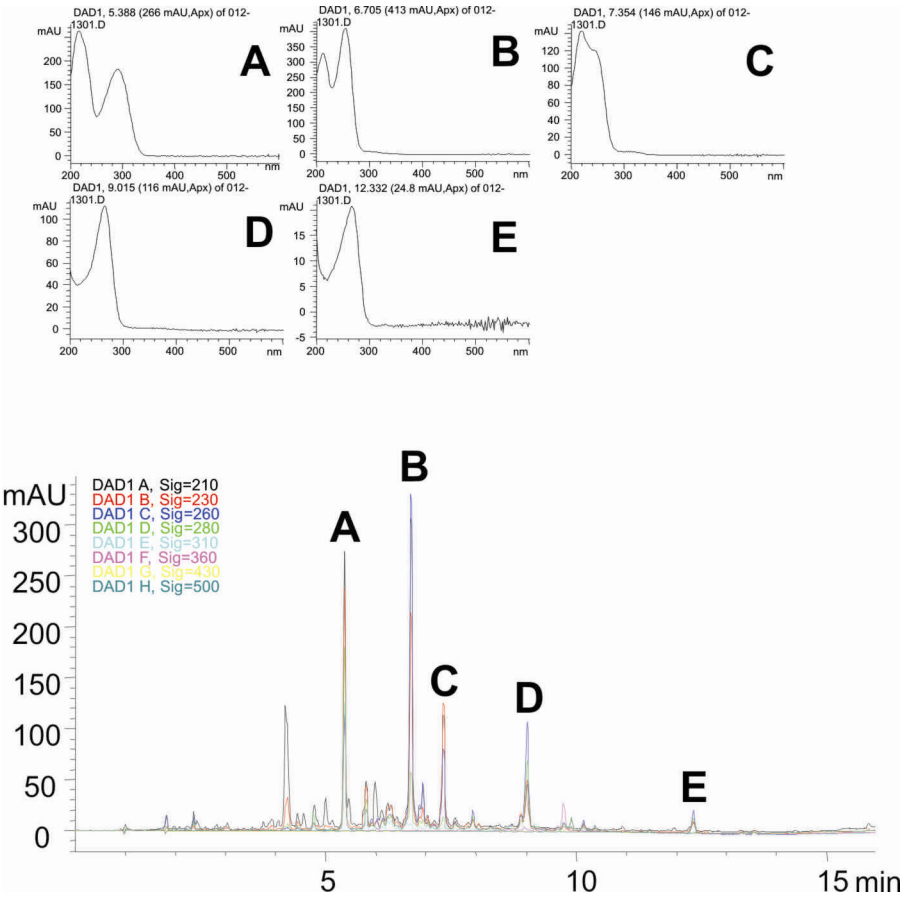


Abbildung 1: Chromatogramm eines Verrucosispora AB-18-032 Extrakts mit den UV-Spektren der einzelnen Abyssomicine.[22]

Die Isolierung und Strukturaufklärung der einzelnen Substanzen durch Bojan Bister *et al.* und Simone Keller sowie Kathrin Schneider aus der Arbeitsgruppe von Prof. Roderich Süßmuth führte zur Identifizierung von zwei Substanzgruppen. Abyssomicin B-D sind Spiroverbindungen mit mindestens vier Ringen (Abbildung 2), Abyssomicin A ist ein Peptid, welches große Ähnlichkeit zu Distamycin zeigt und Proximicin C genannt wurde

(Abbildung 3).[46,47] Abyssomicin E konnte nicht isoliert werden, da es außer im initialen Extrakt nie wieder nachgewiesen wurde.

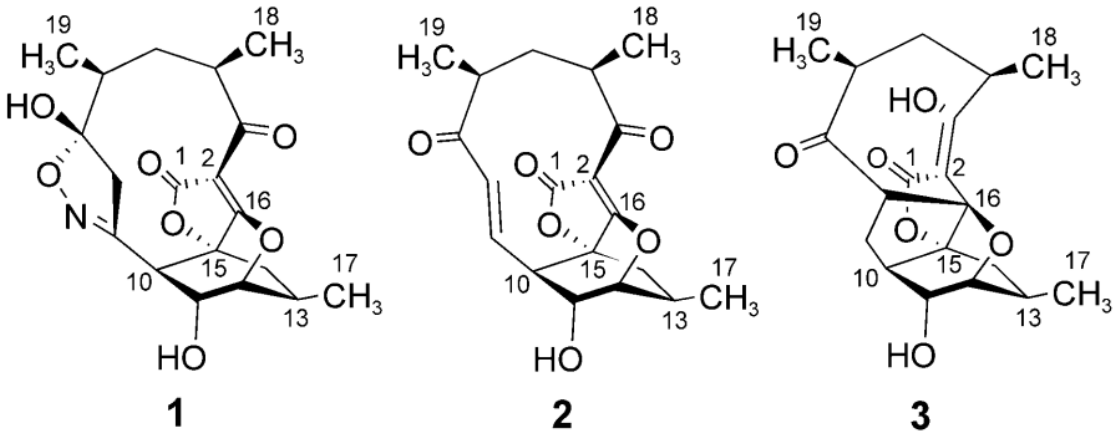


*Abbildung 2: Strukturformeln von Abyssomicin B (**1**), C (**2**) und D (**3**).[46]*

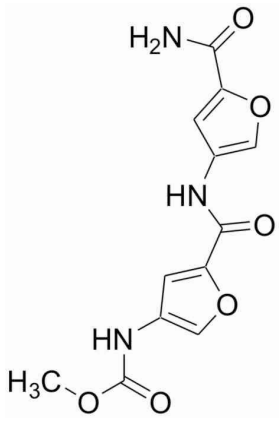


Abbildung 3: Proximicin C, vormals Abyssomicin A.[47]

Wirkung

Die im Screening gesuchte Wirkung (Tabelle 1) war alleine auf Abyssomicin C zurückzuführen. Die Ähnlichkeit von Abyssomicin C zu Chorisminsäure führte zur Hypothese, dass Abyssomicin C die Bindungstasche für Chorisminsäure im Enzym PabB blockiert.

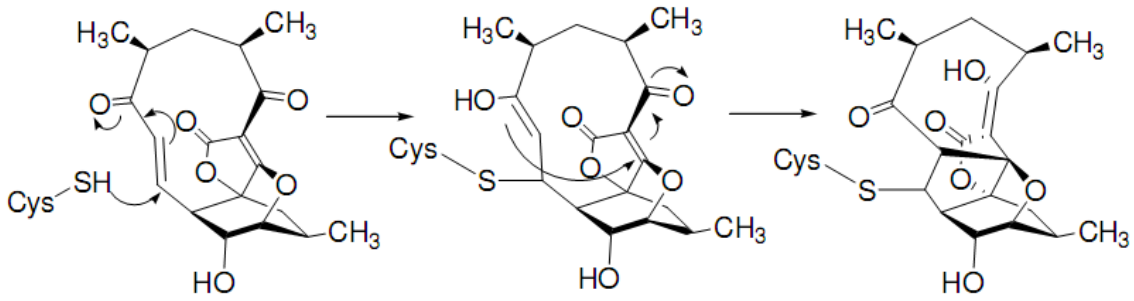


Abbildung 4: Wirkmechanismus von Abyssomicin C.

Diese Hypothese wurde später in Arbeiten von Simone Keller *et al.* bestätigt, indem eine kompetitive Hemmung durch kovalente Bindung von Abyssomicin C an ^{263}Cys der 4-Amino-4-desoxychorismat-Synthase PabB von *Bacillus subtilis* mit enzymkinetischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4).[23]

Tabelle 1: Antibakterielles Wirkspektrum von Abyssomicin C. Größe der Hemmhöfe [mm] beim Plattendiffusionstest bei Verwendung von Komplexmedium, Riedlinger et al.[22] Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wirkt Abyssomicin C gegen gram-positive Bakterien.

Organismus	Abyssomicin C [mg/ml]		
	1	0,3	0,1
Arthrobacter aurescens DSM 20166	14	10	-
Brevibacillus brevis DSM 30	17	12	9
Bacillus subtilis DSM 10	16	12	10
Micrococcus luteus ATCC 381	-	-	-
Mycobacterium phlei DSM 750	-	-	-
Staphylococcus aureus DSM 20231	19	11	9
Rhodococcus erythropolis DSM 1069	27	18	15
Streptomyces viridochromogenes Tü 57	11	9	-

Abyssomicin C und *atrop*-Abyssomicin C

Im Rahmen der Totalsynthese von Abyssomicin C durch K. C. Nicolaou und S. T. Harrison im Jahr 2006 wurde eine *atrop*-Form von Abyssomicin C beschrieben, welche wirksamer war als die ursprünglich beschriebene Form von Abyssomicin C und sich durch Säurekatalyse in Abyssomicin C umwandeln ließ (Abbildung 5).[30]

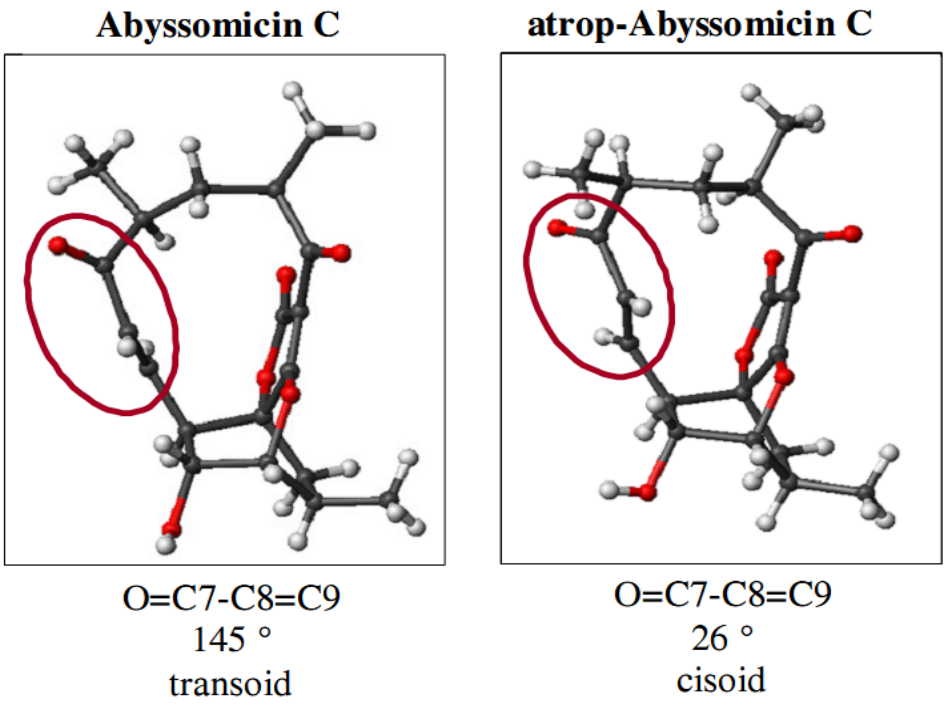


Abbildung 5: Röntgenkristallstrukturen von Abyssomicin (links, Bister et al, 2004[46]) und atrop-Abyssomicin C (rechts, Nicolaou und Harrison, 2006[30]).

Anschließend stellte sich heraus, dass das Hauptprodukt von *Verrucosispora* AB-18-032 ebenfalls *atrop*-Abyssomicin C ist.[48] Wahrscheinlich wurde in den Arbeiten von Bister *et al.* während der Aufarbeitung des Kulturextrakts mit säurehaltigen Lösungsmitteln gearbeitet, woraufhin die *atrop*-Isomerisierung stattfand und bei der Strukturaufklärung durch Röntgenkristallanalyse nur (das möglicherweise bevorzugt kristallisierende) Abyssomicin C untersucht werden konnte.

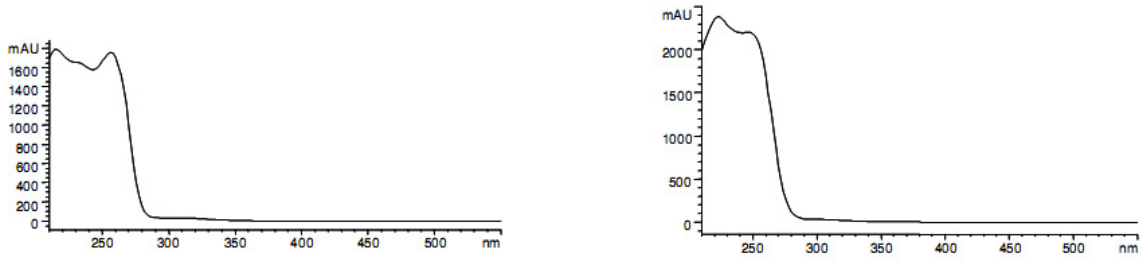


Abbildung 6: UV-Spektren von Abyssomicin (links) und atrop-Abyssomicin (aus: Simone Keller, Dissertation, 2007[48])

Dass *atrop*-Abyssomicin C der eigentliche, in der Natur vorkommende Wirkstoff ist, wird auch durch die bessere Wirkung in antibakteriellen Tests reflektiert: die MIC (minimale Hemmkonzentration) gegen MRSA beträgt für Abyssomicin C 5,2 µg/ml und für *atrop*-Abyssomcin C 3,5 µg/ml.[30]

Weitere Abyssomicine

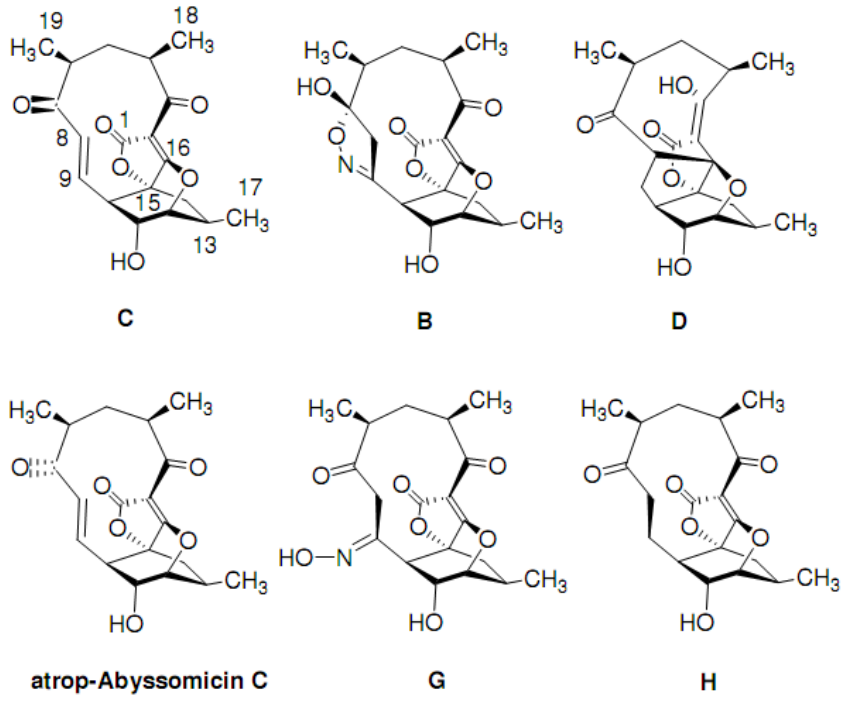


Abbildung 7: Alle bisher mit NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenkristallstrukturanalyse charakterisierten Abyssomicine aus Verrucosispora AB-18-032.[48]

Später wurden im Kulturfiltrat von *Verrucosispora* AB-18-032 noch weitere Abyssomicine entdeckt, Abyssomicin G und Abyssomicin H konnten isoliert werden und ihre Struktur wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 7). Nur Abyssomicin C und *atrop*-Abyssomicin C sind antibakteriell aktiv. Dr. Simone Keller fand noch zwei weitere (mutmaßliche) Abyssomicine im Kulturfiltrat von *Verrucosispora* AB-18-032, allerdings in so geringen Mengen, dass eine Strukturaufklärung nicht möglich war.[48] Anhand der exakten Molekülmasse, die durch ESI-FT-ICR-Messungen der aufgereinigten Verbindungen bestimmt werden konnte, postulierte Dr. Simone Keller die in Abbildung 8 gezeigten Strukturformeln. Versuche, diese beiden Verbindungen durch Umsetzung von Abyssomicin mit Hydroxylamin und Ammoniak synthetisch herzustellen, waren nicht erfolgreich.

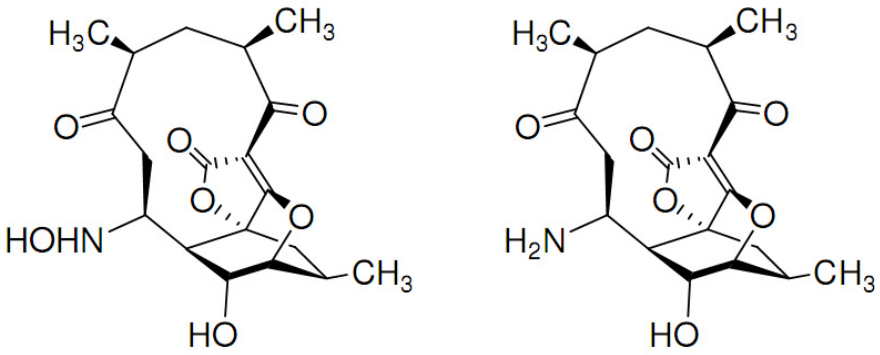


Abbildung 8: Hydroxylaminoabyssomicin und Aminoabyssomicin.[48]

Im Jahr 2007 wurde von Niu *et al.* aus dem Stamm *Streptomyces sp.*(HKI0381) Abyssomicin E isoliert, es zeigt keine antibakterielle Aktivität (Abbildung 9).[49] Für eine Biosynthesehypothese siehe Abschnitt 4.2.6.

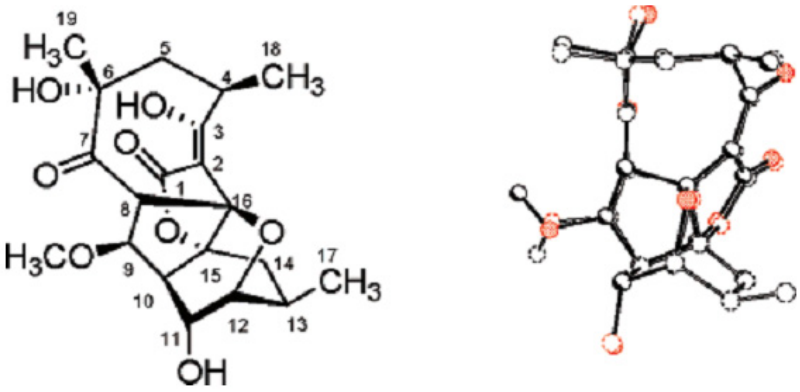


Abbildung 9: Abyssomicin E aus Streptomyces sp. (HKI0381).[49]

Experimente zur Biosynthese: Fütterung mit ^{13}C-markierten Bausteinen

Aufgrund der strukturellen Eigenschaften von Abyssomicin wurde vermutet, dass die Biosynthese durch eine Polyketidsynthase (PKS) geschieht. Um diese Hypothese zu überprüfen und um erste Hinweise über den genauen Biosyntheseweg zu erhalten, wurden Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Bausteinen durchgeführt. Es wurden 1-^{13}C-Acetat, 1,2-^{13}C-Acetat und 1-^{13}C-Propionat verfüttert.[48] Nach Aufreinigung und NMR-Messungen konnte der Einbau von zwei Propionat-Einheiten sowie fünf Acetat-Einheiten bestätigt werden. Drei C-Atome konnten nicht zugewiesen werden (C-13, C-14 und C-15). Eine Literaturrecherche ergab, dass bei verschiedenen Tetronsäureantibiotika genau diese Positionen durch den Einbau von ^{13}C-Glycerin markiert wurden: Acaterin, Agglomerin A, Tetronasin und Versipelostatin (siehe auch Tabelle 2).[50-52]

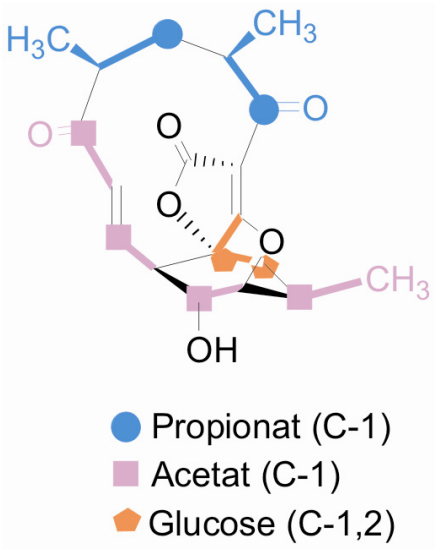


Abbildung 10: Ergebnis der Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Biosynthesevorläufern.[48]

1.2 Polyketide und Polyketidsynthasen

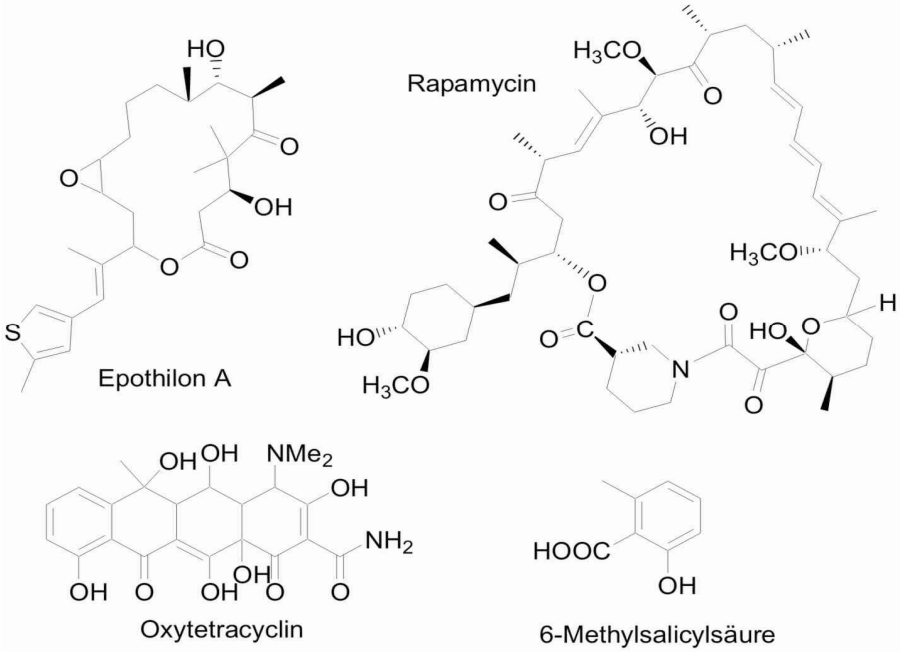
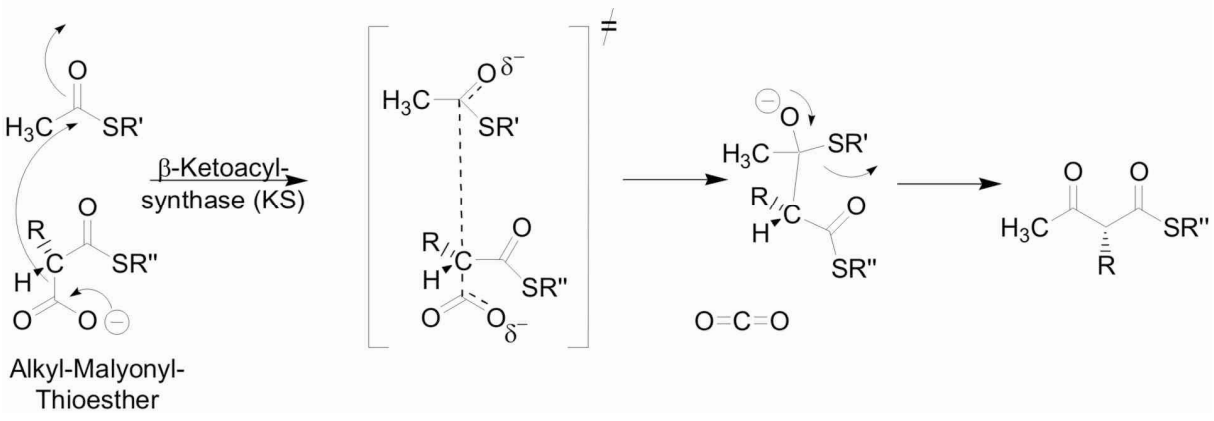
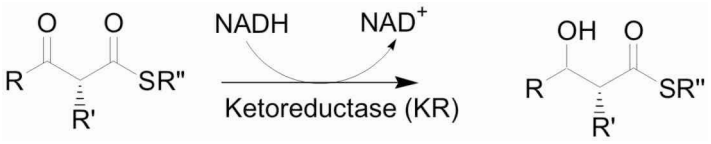


Abbildung 11: Berühmte, pharmazeutisch wichtige Polyketide (Epothilon: Zytostatikum, Rapamycin: Immunsuppressivum, Oxytetracyclin: Antibiotikum, 6-Methylsalicylsäure = Aspirin)

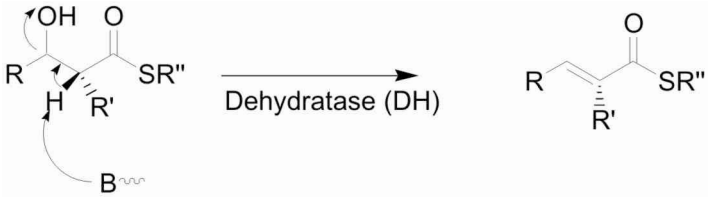
Polyketide sind eine Naturstoffklasse wie es auch Zucker, Terpene, Peptide oder Fettsäuren sind. Sie besitzen eine große strukturelle Vielfalt, sind pharmazeutisch sehr wichtig und weisen unterschiedlichste Bioaktivitäten auf (Abbildung 11, Beispiele von wichtigen Polyketiden). Von ca. 7.000 bekannten Polyketiden wurden bisher über 20 als Wirkstoffe auf den Markt gebracht (0,3 %) – dies ist bedeutend besser als die <0,001 % "Hit-Rate" eines Standard-Screens in der Pharmazeutischen Industrie.[53] Um die Biosynthese von *atrop*-Abyssomicin C zu verstehen, ist es nötig, sich mit dem Mechanismus der Polyketidsynthese auseinanderzusetzen. Gemeinsames Merkmal der Polyketide ist die Biosynthese aus kurzen Carbonsäuren durch Polyketidsynthasen. Die Kopplung der Bausteine geschieht wie bei der Fettsäuresynthese durch decarboxylierende Kondensation.



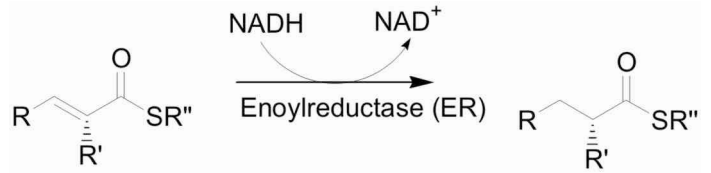
Mögliche Bausteine sind z.B. Propionsäure oder Essigsäure, die am C2 carboxyliert werden und anschließend in der Synthese zum Einsatz kommen. Erster Schritt ist die durch eine Ketosynthase (KS) katalysierte Kopplungsreaktion (s. o.). Anschließend kann die Carbonylgruppe durch eine Ketoreduktase-Domäne (KR) zu einem Alkohol reduziert werden.



Daraufhin folgt je nach Vorhandensein einer Dehydratase-Domäne die Eliminierung von Wasser.



Schließlich kann die Doppelbindung durch eine Enoylreduktase-Domäne mit NADH reduziert werden.



Je nach Vorhandensein der Domänen KR, DH und ER in einem Modul kann das Biosyntheseintermediat auf einem unterschiedlichen Reduktionszustand stehen bleiben. Dies erhöht die chemische Diversität um ein Vielfaches im Vergleich zur Fettsäuresynthese, wo ausschließlich Doppel- oder Einfachbindungen möglich sind. Ein Modul besteht mindestens aus einer Ketosynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und einem Acyl-Trägerprotein (ACP). Das Startermodul besteht mindestens aus AT und ACP (Abbildung 13). Die gebildete Polyketidkette kann weiteren intramolekularen Reaktionen, der Ergänzung um funktionelle Gruppen und der Dekorierung mit kleineren Molekülen unterzogen werden. Dies führt zu teilweise sehr komplexen Ringsystemen und zu einer reichen Funktionalität durch Glykosylierung, Halogenierung, Oxygenierung, Methylierung und vieles mehr. Die Gene für diese Enzyme befinden sich meist in der Nähe der PKS-Gene (innerhalb des Biosynthesegenclusters). Man unterscheidet prinzipiell drei Typen von Polyketidsynthasen, wobei es auch viele Mischformen gibt, die in diese Klassifikation nicht gut hineinpassen wollen.[54]

PKS Typ I oder auch Modulare PKS bestehen aus mehreren Modulen, welche jeweils die Kupplung eines Bausteins und die Reduktion auf eine bestimmte Stufe katalysieren. Die Module sind üblicherweise in der Reihenfolge der Reaktionen aufgereiht und entsprechen so einem Fließband. Ein berühmtes Beispiel ist die Erythromycin-Synthase (DEBS), die auch die erste PKS Typ I war, die untersucht wurde (Abbildung 12).[55] Die Polyketidsynthase im hier untersuchten Abyssomicin-Gencluster ist ebenfalls eine PKS Typ I. Die Module der modulären Polyketidsynthasen sind wie die Module der Fettsäuresynthase als Homodimer organisiert (Abbildung 14).[56]

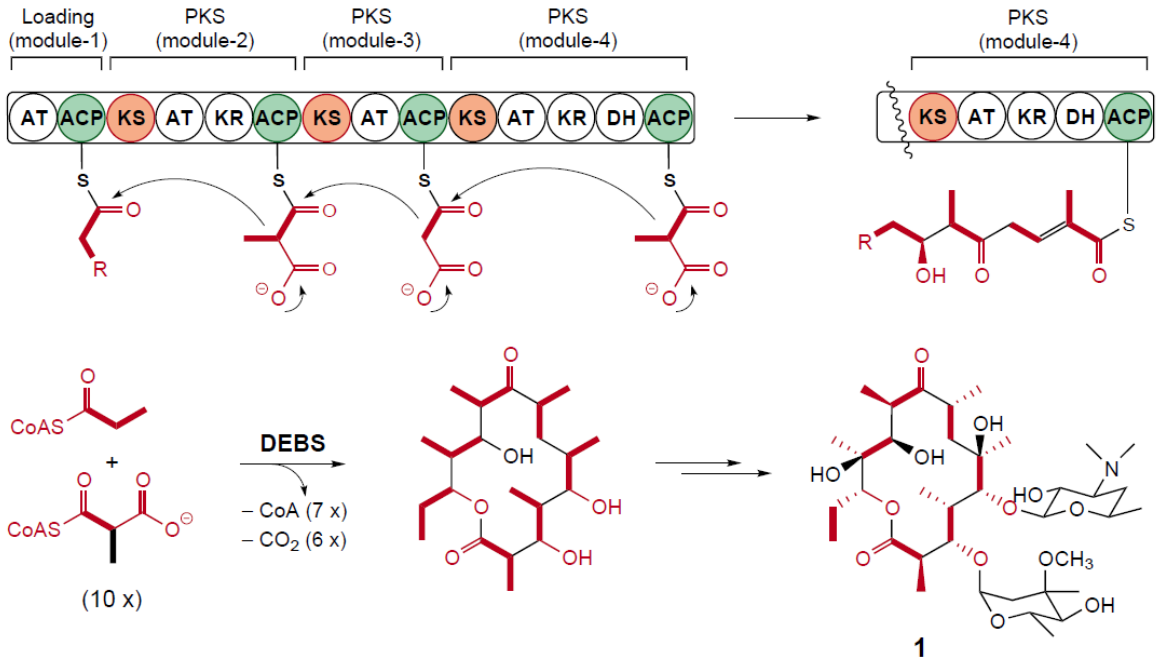


Abbildung 12: Modell der Biosynthese von Erythromycin durch eine Typ I-Polyketdisynthase. Abbildung aus: Ben Shen, 2003.[54]

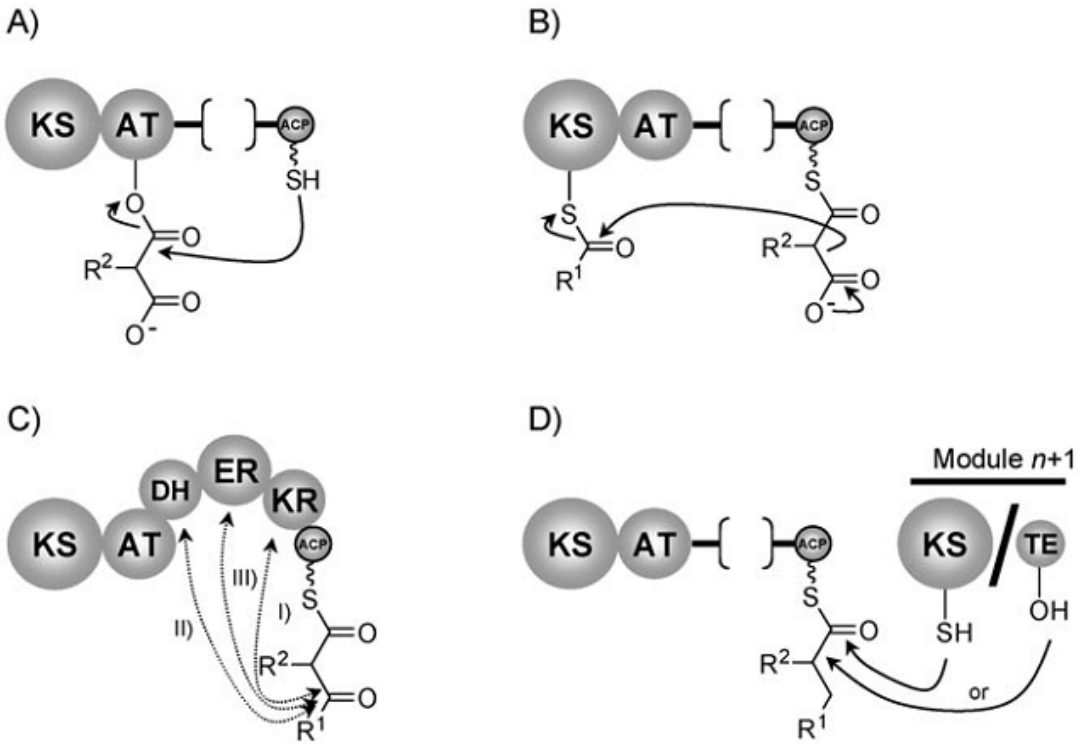


Abbildung 13: A) Die Bausteine werden durch die jeweilige Acyltransferase rekrutiert. B) Durch die Ketosynthase wird die decarboxylierende Kondensation katalysiert und die wachsende Kette hängt in jedem Modul an einem Acyl-Trägerprotein (ACP). C) Die Modifizierungsreaktionen laufen ab, indem der Phosphopanthethein-Arm des ACPs zu den jeweiligen aktiven Zentren schwingt. D) Zuletzt steht üblicherweise eine Thioesteraseeinheit, die die Abspaltung der Polyketidkette von der Synthase katalysiert. (Abbildung nach Weissman & Müller, 2008).[56]

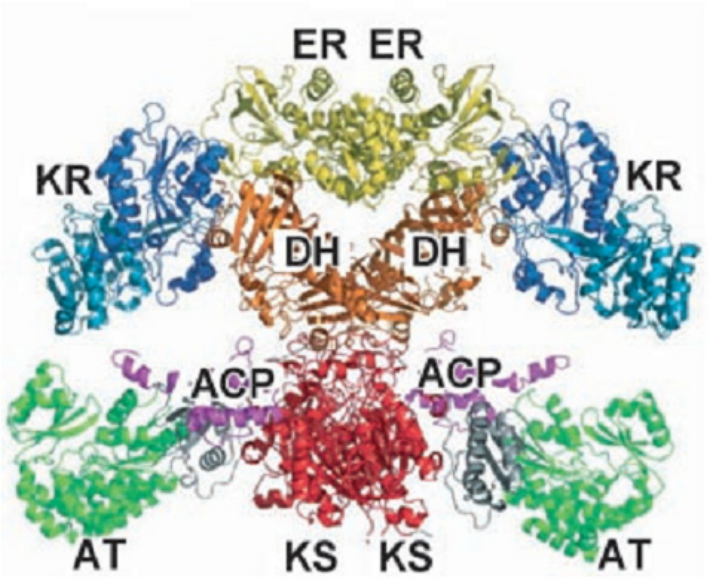


Abbildung 14: Modell von Modul 4 der Erythromycin-Synthase DEBS.[56]

PKS Typ II oder Iterative PKS bestehen nur aus einem Modul, welches iterativ, also wiederholt benützt wird und kommen häufig in Pilzen vor. Die Produkte von Typ II-Synthasen sind üblicherweise (polyzyklische) aromatische Moleküle, die weniger stark prozessiert und dekoriert sind als Produkte von Typ I-Synthasen. Bekanntes Beispiel ist die Actinorhodin-Synthase, die die erste Polyketidsynthase überhaupt war, deren Gensequenz bekannt war und die ebenfalls sehr gut untersucht ist.[57] Hier abgebildet ist die Tetracenomycin-Synthase.

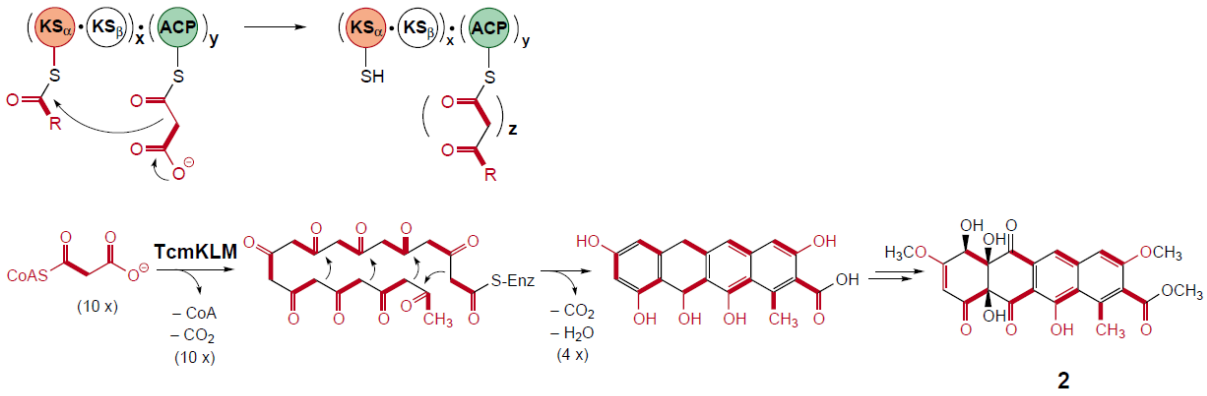


Abbildung 15: Modell der Biosynthese von Tetracenomycin durch eine Typ II-Polyketidsynthase. Abbbildung aus: Ben Shen, 2003.[54]

PKS Typ III sind dadurch gekennzeichnet, dass sie üblicherweise ein Homodimer bilden, welches wie PKS II iterativ arbeitet. Anders als PKS Typ I und Typ II verwenden Typ III PKS keine Acyl-Trägerproteine (ACP) sondern reagieren direkt mit den Acyl-CoA gebundenen Substraten. Sie waren ursprünglich hauptsächlich als *Chalkon-Synthasen* aus Pflanzen bekannt, mittlerweile sind aber einige Beispiele bakterieller PKS Typ III bekannt wie das hier abgebildete Falvolin.[58]

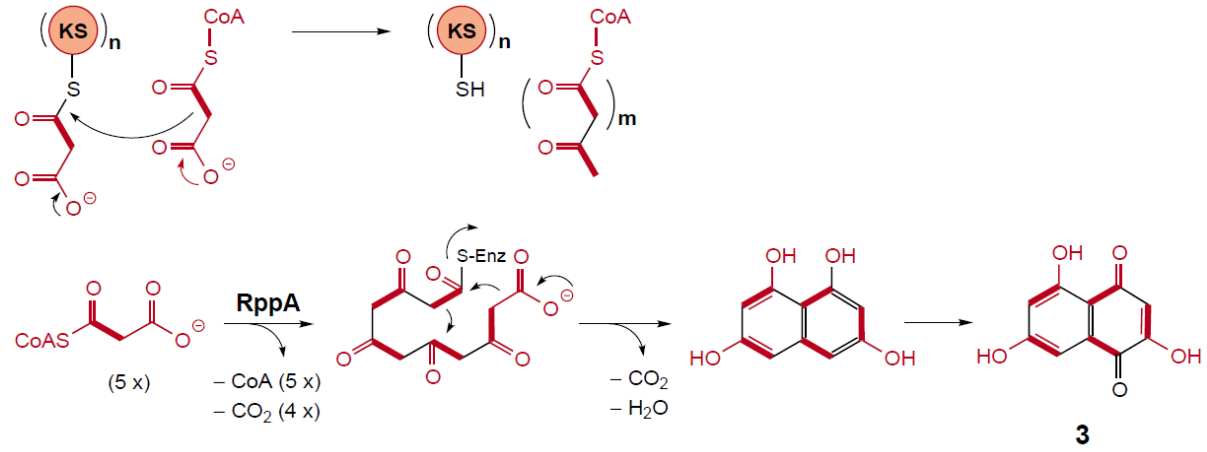


Abbildung 16: Modell der Biosynthese von Falvolin durch eine Typ III-Polyketidsynthase. Abbildung aus: Ben Shen, 2003.[54]

Diese strenge Unterteilung von PKS I/II und III wurde durch viele weitere Beobachtungen und Ergebnisse in jüngster Zeit aufgeweicht; es wurden PKS Typ I gefunden, die

einzelne Module wiederholt verwenden (sie „stottern“) oder Module überspringen, aber auch AT-los waren und mit einer eigenständigen Acyltransferase funktionieren. Daneben wurden PKS Typ II gefunden, die nicht iterativ arbeiten und kein ACP verwenden sowie die Bildung von C-C- und C-O-Doppelbindungen katalysieren.[54]

1.3 Tetronsäureantibiotika

Spirotetronate sind eine hochkomplexe Klasse von Polyketiden, die häufig sehr stark dekoriert sind, d.h. sie besitzen vielfältige funktionelle Gruppen und oft Zuckerreste oder kleinere Polyketid- oder Peptid-Einheiten, die unabhängig von der Polyketidsynthese angehängt werden. *Atrop*-Abyssomicin C ist das kleinste und einfachste Beispiel von Spirotetronaten, deren Biosynthesegencluster untersucht wurde. Aus der Natur isolierte Tetronate zeigen häufig antibiotische Aktivität, haben aber auch oft antivirale und/oder zytostatische Eigenschaften (Tabelle 2). Hier aufgeführt sind nur Tetronate aus Actinomyceten, etwa 10 weitere aus Pilzen und gram-negativen Bakterien konnten in einer Literaturrecherche gefunden werden.

Tabelle 2: Verschiedene Tetronsäureantibiotika aus Actinomyceten. Bei einigen der unten angegebenen Tetronsäureantibiotika existieren Daten zur Biosynthese aus Fütterungsexperimenten (Tetrodecamycin, Tetronasin, Tetronothiodin, Versipelostatin). In den beschriebenen Fällen zeigt sich häufig das gleiche Einbaumuster wie bei Abyssomicin: eine C3-Einheit in der Tetronsäure wird nicht durch die Fütterung von ^{13}C-Acetat oder ^{13}C-Propionat markiert, sondern nur bei Fütterung von Glyzerin oder einem anderen Vorläufer.

Tetronsäure-antibiotikum	Produzentenstamm	Literatur	Wirkung	Anmerkungen
A80577	Actinomadura verrucosospora NRRL 18236	[59]	antibiotisch	ähnelt Tetronasin
Abyssomicin	*Verrucosispora* sp. AB-18-032	[46]	antibiotisch gegen Gram(+)-Bakterien	
Antibiotic PA 46101A and B	Streptomyces sp.	[60]	antibiotisch gegen Gram(+)-Anaerobier	Chlorothricin-Derivat
Arisostatin	Micromonospora sp. TP-A0316	[61]	zytostatisch	Tetronomycin-Derivat
Chlorothricin	Streptomyces antibioticus	[36]	Bei Mäusen: hemmt Leber-Pyruvat-Carboxylase[36]	Bisoyntheseclusters sequenziert
Cuonin F/ A88696F	Streptomyces sclerotialus	[62,63]	Magen-ATPse Inhibitor	Große Ähnlichkeit zu Abyssomicin!
Decatromicin	Actinomadura sp. MK73-NF4	[64]	antibiotisch gegen Gram(+)-Bakterien	Tetrocarcin/Kijanimicin-ähnlich
Kijanimicin/ Sch 25663	Actinomadura kijaniata SCC 1256	[65]	antibiotisch, zytostatisch, antimalarial	Biosynthesegencluster sequenziert
Lobophorin	marines Bakterium, unbek.	[66]	Gegen PMA-induziertes Ödem im Mausohr[67]	von karibischer Braunalge *Lobophoria variegata* isoliert, Kijanimicin-Derivat

Tetronsäure-antibiotikum	Produzentenstamm	Literatur	Wirkung	Anmerkungen
MC-033	Streptomyces sp. A7361	[68]	Hemmt Cholesterol-Biosynthese, zytostatisch, schwach antibiotisch	Chlorothricin-Derivat
MM46115	Actinomadura pelletieri	[69]	antiviral, antibiotisch gegen Gram(+)- Bakterien	Kijanimicin-Derivat
RK-682	Streptomyces sp. 88-682	[70]	Inhibiert HIV-1 protease und Protein Tyrosin Kinasen und Phosphatasen[67]	Ähnelt dem linearen Vorläufer von *atrop*-Abyssomicin C
Tautomycin	Streptomyces spiroverticillatus bzw. S. griseochromogenes	[71]	zytotoxisch	Polyether
Tetrocarcin alias Antlermicin A	Micromonospora chalcea KY11091	[71]	zytostatisch	Biosynthesegencluster sequenziert
Tetrodecamycin	Streptomyces sp.	[72]	antibiotisch gegen Gram(+)- und Gram(-)-Bakterien	Nach Fütterung mit ^{13}C-markiertem Acetat und Propionat keine Markierung von C3 Einheit in Tetronsäure (wie bei Abyssomicin)
Tetronasin alias ICI 139603	Streptomyces longisporoflavus	[73]	antibiotisch	Glyzerin-Einbau als C3-Einheit; Polyether-Ionophor
Tetronomycin	Streptomyces sp.	[38]	antibiotisch gegen Gram(+)-Bakterien	Biosynthesegencluster sequenziert
Tetronothiodin	Streptomyces sp.	[74]	Antagonist von Cholecystokinin-Rezeptoren, die Apptetit, Schmerz und Hunger hervorrufen können[67]	Glycerin-Einbau als C2-Einheit; zeigt gewisse Ähnlichkeit zum Kijanimicin/Tetrocarcin-Aglycon, enthält einen zyklischen Thioether

| Tetronsäure-antibiotikum | Produzentenstamm | Literatur | Wirkung | Anmerkungen |

Versipelostatin	Streptomyces versipellis 4083-SVS6	[52]	Hemmt Tumormarker GRP78[67]	Glyzerin-Einbau bestätigt, Ähnlichkeit zu Tetrocarcin und Kijanimicin, aber umgekehrte Stereochemie!
Quartromicin	Amycolatopsis orientalis	[75]	antiviral (Influenza)	anderer Biosyntheseweg! Teilstruktur ähnlich zu Tetrocarcin/ Kijanimicin

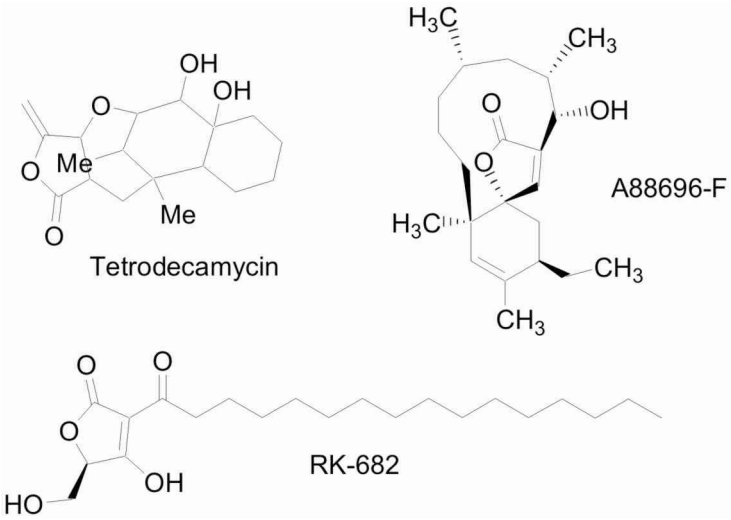


Abbildung 17: Dem Abyssomicin ähnliche Tetronate (sowohl A88696-F als auch RK-682 sind nicht als Antibiotikum beschrieben, s. Tabelle 2).

Interessanterweise sind viele der bisher beschriebenen Tetronsäureantibiotika Kijanimicin/Tetrocarcin und Tetronomycin sehr ähnlich (s. Tabelle 2). Versipelostatin (Abbildung 19) ist ein besonderes Beispiel, es ähnelt oberflächlich sehr stark Kijanimicin/Tetrocarcin. Die Gruppe von Peter Leadlay untersucht derzeit die Biosynthese von Versipelostatin und vorläufige Ergebnisse zeigen, dass Versipelostatin auf einem komplett anderen Weg synthetisiert wird – es handelt sich also wahrscheinlich um konvergente Evolution (Peter Leadlay, persönliche Mitteilung). A88696-F, welches eine besonders hohe Ähnlichkeit mit Abyssomicin C aufweist (Abbildung 17), wurde 1993 als Inhibitor einer Magen-ATPase (gastric ATPase) beschrieben.[62]

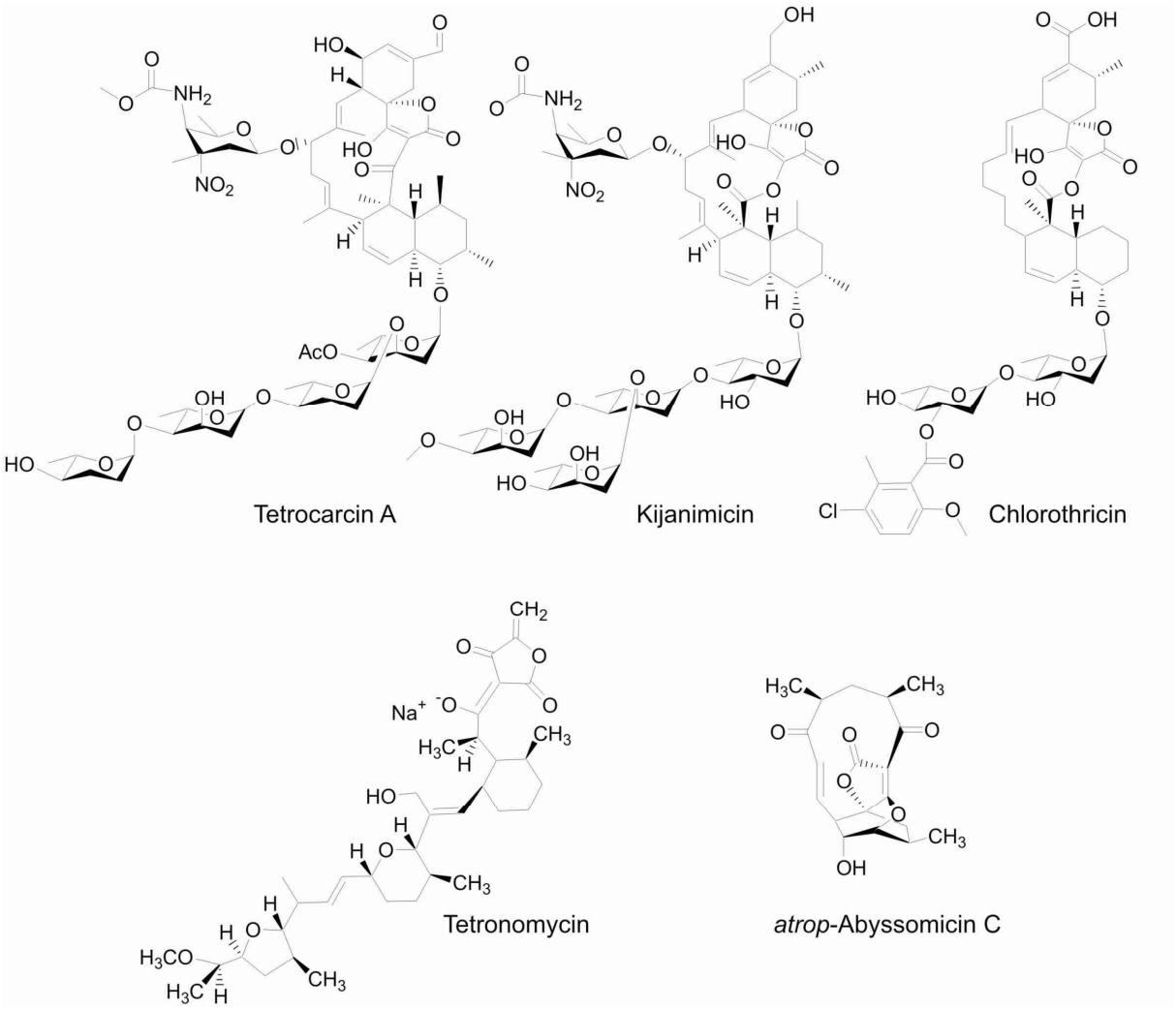


Abbildung 18: Fünf Tetronsäureantibiotika, deren Biosynthesegencluster aufgeklärt ist.[40-43]

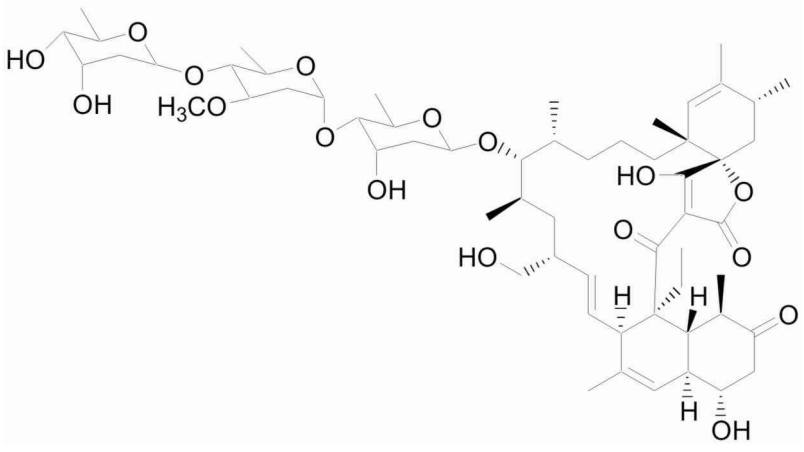


Abbildung 19: Strukturformel von Versipelostatin[76]

2 Zielsetzung

Das Biosynthesegencluster von *atrop*-Abyssomicin C

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Biosynthese von *atrop*-Abyssomicin C untersucht werden. Die für die Biosynthese verantwortlichen Gene sollten in einer Cosmidbank gefunden, sequenziert und ihre Identität bzw. Funktion durch Inaktivierungsexperimente bestätigt werden. Die generierten Mutanten sollten mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS untersucht und möglicherweise vorhandene Biosyntheseintermediate charakterisiert werden. Eine Biosynthesehypothese sollte aufgestellt und bestätigt werden.

Der Biosyntheseweg der Tetronsäureantibiotika

Im Herbst 2005, als die Arbeiten für diese Dissertation begannen, war kein einziges Biosynthesegencluster für die Klasse der Tetronsäureantibiotika bekannt. Ein gemeinsamer Mechanismus war denkbar und die Aufklärung des Biosynthesewegs von *atrop*-Abyssomicin C versprach interessante Einblicke in die Biosynthese auch anderer Sekundärmetabolite.

3 Methoden und Durchführung

3.1 Allgemeine Methoden

Die Zusammensetzung sämtlicher im Text erwähnten Lösungen, Puffer und Nährmedien ist im Anhang ab Seite 128 beschrieben.

3.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Verrucosispora sp.* AB-18-032

Verrucosispora sp. AB-18-032 wurde vorwiegend in SGG-Medium (Zusammensetzung: siehe Anhang) in Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen bei 27° C sowie 120 Upm im Schüttelinkubator fermentiert. Hier waren Wachstum und Produktion am besten. Die Produktion von *atrop*-Abyssomicin C ist unter Standardbedingungen sehr gut reproduzierbar. Abweichungen, die das Medium (Wasser, Medienbestandteile, …), die Temperatur oder die Schüttelgeschwindigkeit betreffen, führen allerdings zu dramatischen Produktionseinbrüchen. Wird die Fermentation beispielsweise bei 160 Upm statt 120 Upm durchgeführt, bewirkt dies ein völliges Fehlen von Abyssomicin im Kulturfiltrat. Eine gute Produktion wurde im Labor nur mit SGG-Medium mit Leitungswasser erreicht. Die Anzucht für die Gewinnung von Gesamt-DNA erfolgte als Vorkultur in KM4-Medium und als Hauptkultur in CRM-Medium. Für die Stammhaltung und die Konservierung der Mutanten wurden 0,75-1 ml einer 72 h-alten Vorkultur mit dem gleichen Volumen Kryolösung versetzt und bei -80° C gelagert. Alternativ wurde ein Agarblöckchen mit sporeliertem Myzel (ca. 5x5mm) in Kryolösung eingefroren. *Verrucosispora sp.* AB-18-032 verliert nach vielen Passagen auf Platte oder in Flüssigkultur langsam die Fähigkeit, Abyssomicin C zu produzieren. Daher wurden sämtliche Produktionskontrollen mit einem Kryostock aus dem Jahr 2006 angeimpft (der seinerseits mit einer Platte von Prof. Hans-Peter Fiedler hergestellt wurde, die aus einem Ur-Stock angeimpft worden war).

3.1.1.1 Produktionskontrolle

Nach 72 h Kultivierung von *Verrucosispora* AB-18-032 unter Produktionsbedingungen (SGG-Medium mit Leitungswasser, drei Schikanen) wurden 10ml der Kultur abgenommen und zentrifugiert (4500 Upm, 5 min). 5 ml des Überstandes wurden in ein frisches Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 1N HCl auf pH 4 eingestellt. Nach Zugabe von 5 ml Essigsäureethylester wurde das Gemisch 30 min geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation konnte der organische Überstand abgenommen und in einem 25 ml-Spitzkölbchen im Vakuum bis zur Trockne eingedampft werden. Der ölige Kolbenrückstand wird in 500 µl Methanol gelöst und erneut zentrifugiert, um Schwebstoffe zu entfernen. Die klare Lösung wird mittels HPLC-DAD analysiert (Gradient s. Tabelle 3). *Atrop*-Abyssomicin C eluiert bei ca. 5,63 min (Abbildung 20) und hat ein spezifisches Absorptionsspektrum (Abbildung 21).[22]

Tabelle 3: Gradient „Scree“, säurefrei

Zeit [min]	Anteil Acetonitril [%]
0	5
10	100
12	100
12,1	5
15	5

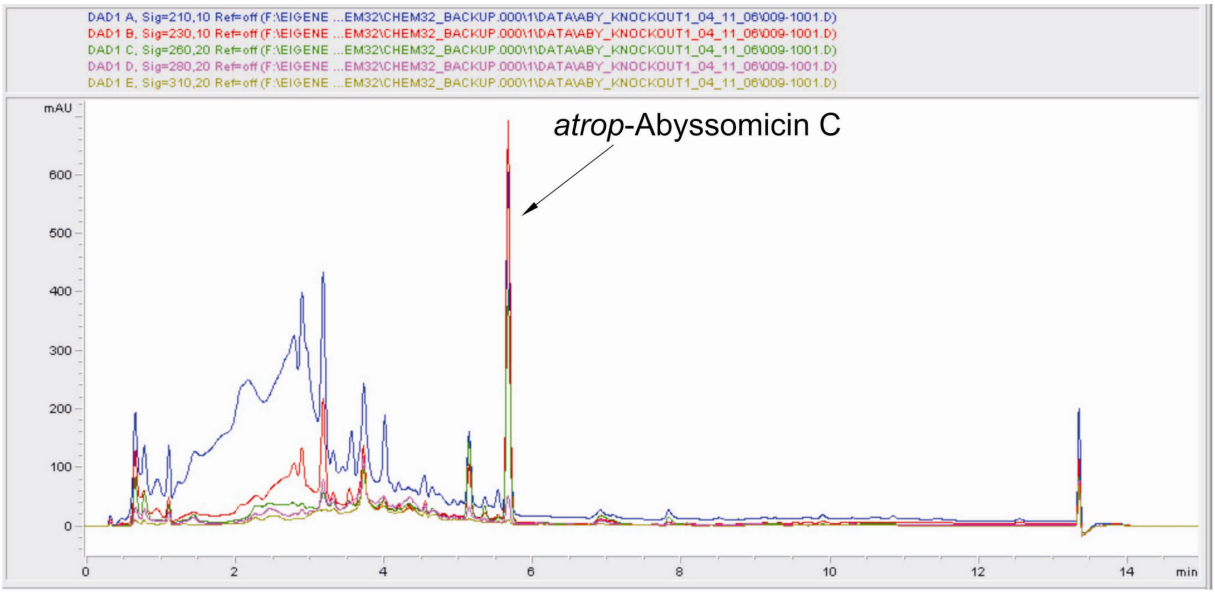


Abbildung 20: Essigsäureethylester-Extrakt vom Überstand Verrucosispora WT (t_R=5,63 min).

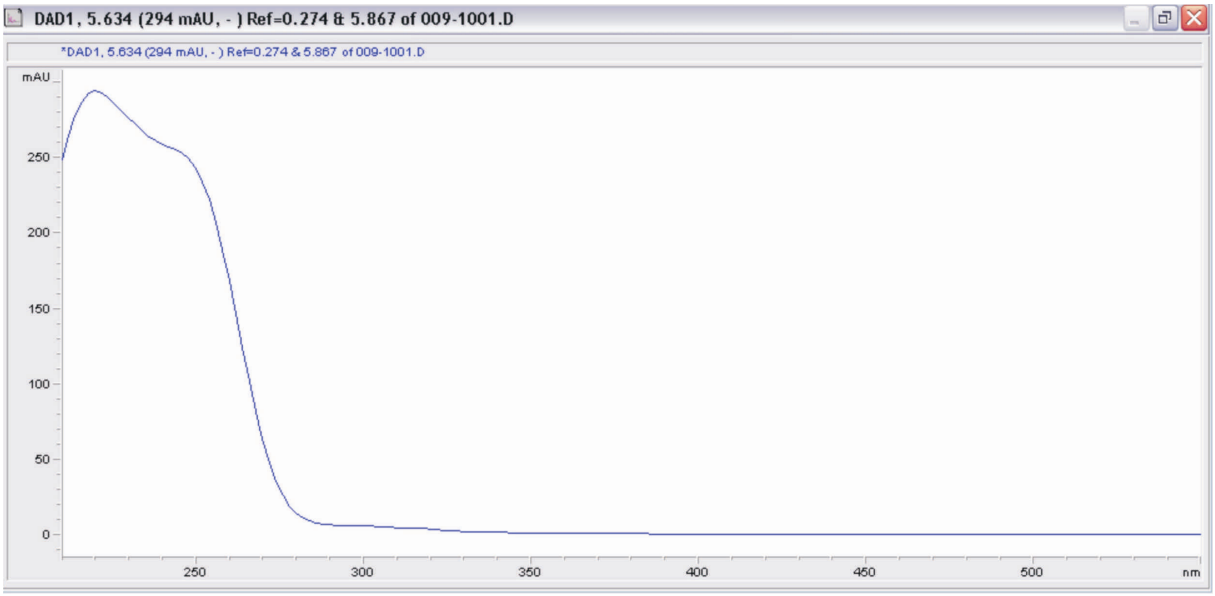


Abbildung 21: UV-Vis-Absorptionsspektrum von atrop-Abyssomicin C

3.1.1.2 Gewinnung von Sporen

Nach 1-2 Wochen Inkubation auf Agarplatten bei 28° C verfärbt sich *Verrucosispora sp.* AB-18-032 von orange zu braun. Dies zeigt das Vorhandensein von Sporen an, welche dunkelbraun pigmentiert sind. Zur Sporengewinnung wurden auf die Oberfläche der Platte 2-5 ml 0,1 % Tween (steril) pipettiert und das Myzel mit einem sterilen Wattebausch abgewischt. Die Flüssigkeit wurde anschließend durch einen zweiten, sauberen und sterilen Wattebausch hindurch mit einer Spritze aufgesogen. Unter dem Mikroskop wurde überprüft, ob Myzelreste in der Suspension vorhanden waren. Traf dies zu, so wurde die Sporensuspension noch einmal über sterile Watte filtriert. Normalerweise war dies jedoch nicht nötig und die Sporen konnten sofort abzentrifugiert werden (10 min, 15.000 Upm, 4° C). In einem Waschschritt mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Saline) wurde das Tensid Tween 20 entfernt, da es das Austreiben der Sporen hemmen könnte. Zuletzt wurden die Sporen in ca. 200 µl Kryolösung resuspendiert und bei -28° C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über das Ausstreichen einer Verdünnungsreihe auf SGG-Agarplatten. Nach ca. 5 Tagen waren einzelne Kolonien sichtbar, die gezählt werden konnten.

3.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* für die Plasmidisolierung erfolgte mit LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum in sterilen 10 ml Glasröhrchen oder 100 ml Erlenmeyerkölbchen. Nach ca. 16 h Schütteln bei 37° C bzw. 30° C (für instabile Cosmide) und 180-200 Upm wurde die Kultur geerntet und das Pellet eingefroren oder sofort zur Plasmidisolierung eingesetzt. Für die Stammhaltung wurden 750-1000 µl Kultur im Verhältnis 1:1 mit Kryolösung oder 50 %-iger Glyzerinlösung gemischt und im -80° C-Schrank kryokonserviert.

3.1.3 Isolierung von DNA

Für die Isolierung von DNA wurden sowohl kommerzielle Kits (*GeneJet Plasmid Isolation Kit* von Fermentas, St. Leon-Rot und *PeqGOLD Plasmid mini Kit I* von Peqlab, Erlangen. Beide wurden standardmäßig für Plasmid-Isolierung von Plasmiden < 30kb verwendet.) als auch selbst hergestellte Lösungen (publizierten Protokollen folgend) verwendet. Die kommerziellen Kits zur Aufreinigung von Plasmid-DNA bedienen sich der spezifischen Adsorption von DNA an Kieselgel-Material. Die Vorteile dieser Methoden sind geringerer Zeitaufwand, hohe Reinheit und Verzicht auf die Verwendung von giftigen Phenol/Chloroform-Mischungen. Abgesehen vom höheren Preis ist ein Nachteil, dass die Wechselwirkung zwischen DNA und Kieselgel mit zunehmender DNA-Molekülgröße so stark wird, dass keine quantitative Elution mehr möglich ist. Im Falle der Cosmide, die eine Länge zwischen 40kb und 50kb haben, sowie bei genomischer DNA, ist keine effiziente Aufreinigung mit dieser Methode möglich. Um eine hohe Reinheit der Cosmid-DNA zu erreichen und ein Zersetzen der DNA zu vermeiden, wurden diese Moleküle mit der Methode der Alkalischen Lyse isoliert.[77]

3.1.3.1 Alkalische Lyse mit Phenol/Chloroform-Extraktion

Eine 4-5 ml Übernachtkultur von *E. coli* wurde abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl AL1 (Rezepte zu den Lösungen in Kapitel 6.9) resuspendiert. Sofort wurden 400 µl AL2 zugegeben und das Gefäß zehnmal invertiert. 300 µl AL3 wurden zugegeben und das Gefäß 5-mal invertiert. Die ausgefallenen Flocken (Proteine) wurden abzentrifugiert (5-10 min bei 16.000 g) und der Überstand in ein neues 2 ml-Gefäß gefüllt. Nach Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform wurde der Ansatz durch 2-minütiges Vortexen gut gemischt und anschließend 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß pipettiert und anschließend 1,2 ml 2-Propanol zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 16.000 g) und das Pellet wurde mit ca. 400 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die Flüssigkeit wurde mit einer Pipette restlos abgenommen und das Pellet ca. 5 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Tris/HCl (10 mM, pH8) gelöst. Waren weder besondere Reinheit noch Haltbarkeit der isolierten DNA erforderlich, so wurde der Schritt der Phenol/Chloroform-Extraktion auch ausgelassen.

3.1.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Verrucosispora* AB-18-032[a]

Ca. 20 ml KM4-Medium wurden in einem sterilen Erlenmeyer-Kölbchen mit drei Schikanen und Wattestopfen mit einem Agarblöckchen oder einer Kryokultur beimpft und für 48-72 h bei 27° C und 120 Upm im Schüttler inkubiert. Wenn die Kultur dicht gewachsen war (ca. 48-96 h, manche Mutanten wuchsen langsamer als der Wildtyp), wurde eine Hauptkultur in CRM-Medium angesetzt (1 ml Vorkultur auf 20 ml Medium) und für weitere 72 h geschüttelt (27° C, 120 Upm). Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (5 min bei 4.500 Upm, 4° C) und das Pellet mit ca. 20 ml TE/Saccharose (Kapitel 6.9) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in ca. 4 ml TE/Saccharose plus Lysozym (10 mg/ml, frisch angesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert) resuspendiert und 45 min bei 30° C inkubiert. Wenn das Pellet sehr groß war, wurde die Menge an TE/Saccharose erhöht. Nach der Behandlung mit Lysozym wurden 1,5 ml 5 %-ige SDS-Lösung zugeben und der Ansatz 10 min bei 60° C inkubiert. 1,5 ml Phenol/Chloroform wurden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt und das abgekühlte Zelllysat dazugegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (Scherung der DNA sollte vermieden werden) mit einer umgedrehten 20 ml Glaspipette wurde eine Durchmischung des Ansatzes erreicht. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (15.000 Upm, 15 min) voneinander getrennt. War der Überstand nicht klar, wurde die Phenolisierung wiederholt. Der klare Überstand wurde in ein sauberes 15 ml-Zentrifugenröhren gekippt und 1/10 Volumen 3M NaOAc, pH 8 sowie 1 Volumen Isopropanol (-20° C) zugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken mischten sich die Lösungen und die DNA fiel aus. Die ausgefallene DNA wurde mit einer an der Spitze zuge-

[a] nach Altenbuchner und Cullum, 1987, mehrfach modifiziert (von Combinature Biopharm AG)

schweißten Pasteurpipette aufgewickelt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde durch Inkubation bei Raumtemperatur (5 min) angetrocknet und in 0,5-1 ml TE gelöst.

3.1.4 Methoden zum Transfer von DNA

Für den Transfer von DNA in Bakterien stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung. Man unterscheidet unter anderem zwischen Transformation, Phagentransduktion und Konjugation. Bei der Transformation gelangen freie DNA-Moleküle direkt in die Zellen. Je nach Organismus ist die „Kompetenz", also die Aufnahmefähigkeit, bei intakten Zellen sehr gering, weswegen verschiedene Methoden entwickelt wurden, um eine verbesserte Kompetenz zu erreichen. Zwei Methoden, die häufig und erfolgreich angewandt werden und auch in dieser Arbeit genützt wurden, sind die Transformation von Zellen, die mit Lösungen mono- oder divalenter Kationen behandelt wurden (meist Calcium) und die Elektroporation. Wie die DNA-Aufnahme mikroskopisch aussieht, ist noch sehr schlecht untersucht.
Eine weitere Möglichkeit für die Transformation ist die PEG-unterstützte Protoplastentransformation. Sie wird bei vielen Actinomyceten erfolgreich genutzt; zahlreiche Versuche mit *Verrucosispora* waren jedoch nicht erfolgreich. Es wurden hierbei die Standardmethoden nach Kieser *et al.* angewandt.[78] Die Bildung der Protoplasten sowie die Regeneration, gestützt durch Überschichten mit Weichagar, waren erfolgreich, allerdings konnte keine Aufnahme der DNA erreicht werden.
Die Methode der Wahl für den Transfer von DNA in *Verrucosispora*-AB-18-032 war in dieser Arbeit die Konjugation. Sie bezeichnet den Austausch von genetischer Information zwischen zwei Spezies, z.B. *E. coli* und einem Actinomyceten wie *Verrucosispora* AB-18-032. Das Plasmid oder Cosmid, das weitergegeben werden soll, muss mobilisierbar sein (d.h. im Fall von *E. coli*/Actinomyceten einen *oriT* haben). Außerdem müssen die verwendeten *E. coli*-Zellen ein zusätzliches „Helferplasmid" enthalten (hier pUB307 bzw. pUZ8002). Actinomyceten haben darüber hinaus häufig ein effizientes methylierungsspezifisches Restriktionssystem, das das Eindringen von (fremder) methylierter DNA verhindert. Daher wird für die Konjugation der methylierungsdefiziente Zwischenwirt *E. coli* ET12567[79] verwendet (bei Protoplastentransformation wurde das Plasmid aus diesem Stamm isoliert).

3.1.4.1 Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*[80]

Zwei 500 ml–Erlenmeyerkolben wurden mit jeweils 50 ml TY- oder LB-Medium und je 500 µl einer Vorkultur befüllt und in einem Schüttler bei 37° C und 200 Upm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 bis 0,8 inkubiert. Die Kulturen wurden dann in zwei sterile 50 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und 10 min bei 4500 Upm und 4° C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und in auf 4° C vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Jedes Pellet wurde mit 5 ml eiskalter und steriler 100 mM $CaCl_2$-Lösung vorsichtig resuspendiert und anschließend wieder 10 min bei 4500 Upm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet mit 20 ml eiskalter, steriler 50 mM $CaCl_2$ Lösung resuspendiert. Die vereinte Zellsuspension wurde 30 min auf Eis

inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie vorher) wurde das Pellet in 1,85 ml 100 mM $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und 1-16 h auf Eis gelagert. Schließlich wurden zu je 860 µl Zellsuspension 240 µl 50 %-iges Glyzerin gegeben und die Zellen in eiskalt vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert (100 µl).
Die kompetenten Zellen (100 µl Aliquots, aus dem -80° C Schrank) wurden zusammen mit dem Ligationsansatz (10 µl) oder dem Plasmid (etwa 100ng DNA, ca. 0,5-2 µl) auf Eis aufgetaut. Nach 30 min folgte ein 2-minütiger Hitzeschock bei 42° C und kurzes Auskühlen auf Eis. Der Ansatz wurde in 1 ml TY-Medium (oder LB-Medium) ohne Antibiotikum suspendiert und 30-60 min bei 37° C geschüttelt. Danach wurde abzentrifugiert und der Überstand abgegegossen. Die Zellen wurden in dem rückfließenden Medium (ca. 100 µl) resuspendiert, auf einer Agar-Platte mit dem geeigneten Antibiotikum mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und bei 37° C über Nacht im Inkubator bebrütet. Bei der Transformation von *E. coli* ET12567 wurden 10 µl (ca. 1µg) Plasmid statt der üblichen 1-2 µl (100ng) verwendet. Ligationsansätze können nicht direkt in ET12567 transformiert werden.

3.1.4.2 Elektroporation von *E. coli*[80]

10-100 ml SOB-Medium (evt. mit Antibiotikum) wurden mit 0,1-1 ml Übernachkultur beimpft und 3-6 h bei 37° C und 200 Upm geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0,4 wurde die Kultur 5 min bei 4° C und 4500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskalter, steriler 10 %-iger Glyzerinlösung gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis und in auf 4° C vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Dies wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und die Zellen in 0,1 bis 1 ml 10 %-iger Glyzerinlösung aufgenommen (1/10 des Anfangsvolumen). Je 50 µl der Zellsuspension wurden mit max. 2 µl DNA-Lösung gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte in einem BioRad GenePulserII (Einstellungen 200Ω, 25µF und 2,5kV). Die Zeitkonstante lag bei ca. 4,5-4,9ms. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen sofort in ca. 1 ml eiskaltem LB-Medium suspendiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei 37° C geschüttelt. Danach wurde abzentrifugiert und der Überstand weggegossen. Die Zellen wurden in dem rückfließenden Medium (ca. 100 µl) resuspendiert, auf einer Agar-Platte mit dem geeigneten Antibiotikum mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen und bei 37° C über Nacht im Inkubator bebrütet.

3.1.4.3 Sporenkonjugation –DNA-Aufnahme durch *Verrucosispora* AB-18-032

50 ml TY-Medium (Apramycin, Chloramphenicol, Kanamycin) wurden mit 1-5 ml einer ÜN-Vorkultur beimpft und bei 37° C und 210 Upm inkubiert bis eine OD_{600} von 0,4-0,6 erreicht war. Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 min, 4500 Upm) und das Pellet zweimal mit je 50 ml TY ohne Antibiotikum gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml TY aufgenommen. Währenddessen wurden ca. 1 x 10^8 *Verrucosispora*-Sporen (etwa 50µl) zu 500µl TY-Medium gegeben und 10 min bei 50° C inkubiert, um die Sporen zur Keimung anzuregen. Schließlich wurden je 0,5 ml hitzegeschockte Sporensuspension und antibiotikafreie *E. coli* vereint und abzentrifugiert. Der Überstand wurde weggegossen und das Pellet mit der rückfließenden Flüssigkeit resuspendiert und auf

einer MS-Agar-Platte, 10 mM $MgCl_2$, ausgestrichen. Nach 12-16-stündiger Inkubation bei 30° C wurde jede Platte mit 4 ml NB-Weichagar plus 10 µl Nalidixinsäure (25 mg/ml) und 10 µl Apramycin (100 mg/ml) überschichtet und weiter bei 30° C inkubiert. Nach 5-7 Tagen waren einzelne Apramycin-resistente Klone sichtbar (sogenannte Exkonjuganten), welche auf frische SGG-Agarplatten (enthalten 25µg/ml Nalidixinsäure und 100µg/ml Apramycin) überimpft wurden. Dieses Überimpfen wurde so oft wiederholt, bis die Klone frei von *E. coli* Kontamination waren.[78]

3.1.5 Analyse von DNA

3.1.5.1 DNA-Fällung

Um DNA-Proben zu konzentrieren oder sie von einem bestimmten Puffer oder Salzen zu befreien, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Mit in kommerziellen Kits erhältlichen Säulchen oder Silica-Pulver kann die DNA gebunden und nach einem Waschschritt wieder eluiert werden (z.B. Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purication Kit von *GEHealthcare*, München). Diese Methode hat jedoch mehrere Nachteile: Der Weg über Silicamaterial ist immer mit Substanzverlust verbunden, große Moleküle lassen sich schlecht eluieren (s. Abschnitt 3.1.3) und für die Elution muss eine gepufferte Lösung verwendet werden, da das deionisierte Wasser fast immer einen pH-Wert < 7 hat. Für eine effiziente Elution ist ein pH-Wert ≥8 oder besser 8,5 notwendig. Der DNA-Fällung kann auch eine Phenol/Chloroform-Extraktion vorausgehen, um eventuell vorhandene Enzyme zu inaktivieren. Hierzu wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform (für die Molekularbiologie, mit TE/pH7 gesättigt) zur Probe gegeben und der Ansatz mittels Vortexer gut gemischt (bei sehr großen DNA-Molekülen sollte auf Vortexen verzichtet werden). Nach einminütiger Zentrifugation (16.000 g) wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß gefüllt. Die Phenol-Chloroform-Phase (unten) wurde ordnungsgemäß entsorgt. Zur wässrigen Phase wurden drei Volumina Ethanol und 1/10 Volumen NaOAc 3M zugegeben, gemischt und 30 min bei -75° C inkubiert. Danach wurde die Fällung 30 min auf höchster Stufe zentrifugiert und der Überstand weggegossen (Vorsicht, Pellet nicht verlieren!). Nach dem Waschen mit 70 %-igem Ethanol und kurzem Trocknen wurde das Pellet in dem gewünschten Volumen Puffer oder reinem Wasser (je nach Anwendung) wieder gelöst werden. Alternativ, besonders zur Konzentrierung eines Ligationsansatzes, der transformiert werden soll, wurde die Fällung auch mit Butanol durchgeführt: 1 Volumen DNA-Lösung plus 10 Volumina Butanol. Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.1.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele eignen sich hervorragend, um DNA-Fragmente in der Größe von ca. 100 bis 60.000bp aufzutrennen. Die Agarose bildet beim Gelieren ein Netz aus, das je nach Konzentration unterschiedlich dicht ist und die DNA-Moleküle bei ihrer Wanderung im Feld unterschiedlich stark zurückhält. Je nach interessierendem Größenbereich wird die

Agarose-Konzentration gewählt. Die in unserem Labor verwendete Standardkonzentration von 1 % Agarose in TAE-Puffer eignet sich, um Fragmente zwischen 300 und 10.000bp aufzutrennen. Hierzu wurde die Agarose im Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgekocht. Um eine hohe Qualität des Agarosegels zu erreichen, sollte die Lösung einige Minuten köcheln, bis sie bei Raumtemperatur auf ca. 60° C abgekühlt ist und anschließend in den Gelschlitten gegossen werden kann. Kochende Agarose sollte nicht verwendet werden, da das Material des Gelschlittens sehr darunter leidet. Die Gele hatten üblicherweise eine Dicke von ca. 0,5cm, die Geltaschen eine Breite von 1-3mm. Nachdem das Gel fest wurde, wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Puffer überschichtet. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit einem Probenauftragspuffer gemischt, der 5 % Saccharose enthielt, um die Dichte der Probe zu erhöhen und ein gutes Einsinken in die Taschen zu gewährleisten, und Bromphenolblau, um die Proben sichtbar zu machen. Zusätzlich zu den Proben wurden auch 1-2 Taschen mit einem Marker befüllt. Je nach Größe der interessierenden Fragmente stand ein *100bp*-Marker zur Verfügung, der in Abständen von 100bp Banden zwischen 100 und 1.000bp enthält, und ein *2-log*-Marker, der zwischen 100bp und 10.000bp Banden enthält (beide von *New England Biolabs*, Ipswich, MA, USA; Abbildung 22).

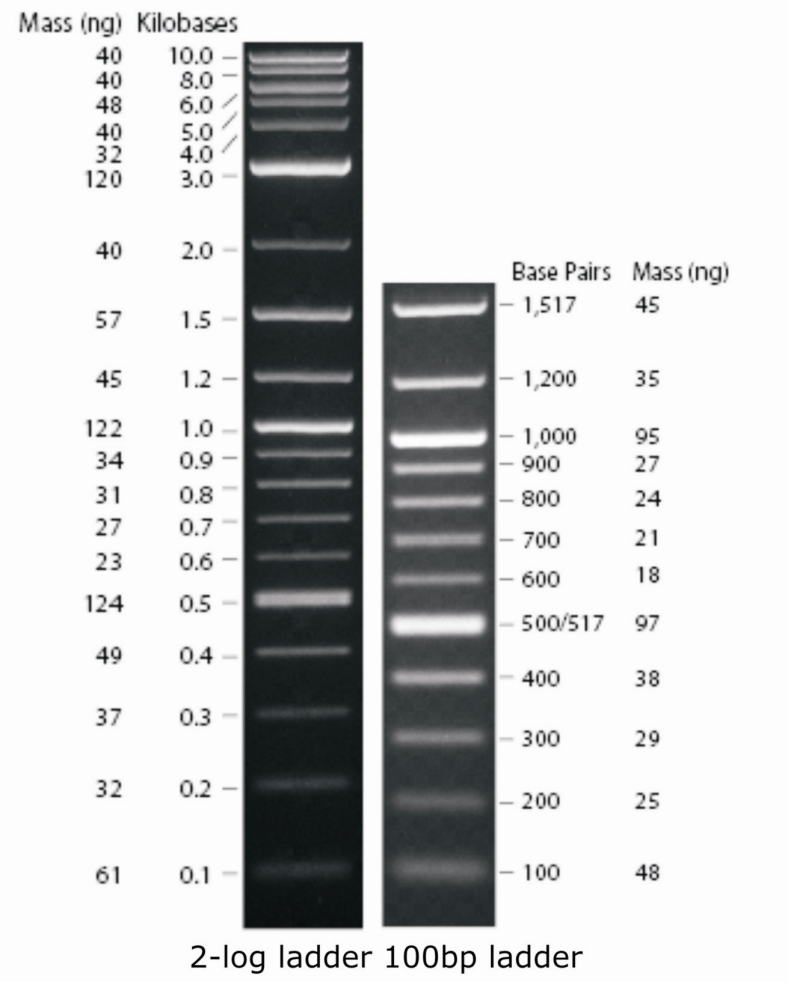


Abbildung 22: DNA-Längenstandards von NEB[81]

Unmittelbar nach dem Befüllen der Taschen wurde eine Spannung angelegt (üblicherweise 70-80V) und die Elektrophorese für ca. 40-60 min durchgeführt. Je länger das Gel unter Spannung steht, umso größer ist die Auftrennung, allerdings verschwinden die kleinen Banden mit der Zeit aufgrund von Diffusionseffekten. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad für ca. 10 min gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Alternativ wurde das Gel mit SYBR-Green gefärbt. Dieses hat eine niedrigere Nachweisgrenze, ist allerdings wesentlich teurer und wurde daher nur in bestimmten Fällen verwendet.

3.1.5.3 Eckhardt-Lyse[82,83]

Um eine große Anzahl von Klonen schnell und billig auf den Erfolg einer Klonierung hin zu analysieren, wurde *E. coli*-Zellmasse in einem speziellen Probenauftragspuffer (Eckhardtpuffer) suspendiert und auf ein SDS-haltiges Agarosegel (1 % Agarose, 0,3 % SDS), aufgetragen. Der Puffer enthielt Lysozym, welches die Zellmembran auflöst und RNAse A, welche RNA verdaut; das SDS im Gel führte zur Denaturierung der Zellproteine. Jeder Klon wurde in 18µl Eckhardt-Puffer suspendiert und sofort auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zuerst 15 min bei 1,5V/cm und dann 30 min bei 8V/cm durchgeführt. Nach Elektrophorese und Färben des Gels im Ethidiumbromid-Bad war das CCC- Plasmid (*covalently closed circular*) sichtbar. Für eine Interpretation des Gelbildes war es nötig, zusätzlich im gleichen Gel eine Kolonie mit Leervektor oder den isolierten, ringförmigen Leervektor zu analysieren. Die Klone, die eine andere Laufhöhe als der Leervektor hatten, konnten mittels Kolonie-PCR oder Plasmid-Isolierung und anschließendem Restriktionsverdau genauer untersucht werden.

3.1.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Fragmente kurzer bis mittlerer Länge (100bp-10.000bp) routinemäßig vervielfältigt werden. Ihre Entwicklung wurde durch die Entdeckung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem Bakterium, das in heißen Quellen lebt, ermöglicht und mit dem Nobelpreis (Kary B. Mullis) belohnt.[84] Polymerase-Kettenreaktionen werden in *Thermocyclern* durchgeführt, welche in kürzester Zeit und mit höchster Präzision einzelne Reaktionsgefäße (üblicherweise dünnwandige 200 µl *Eppendorf*-Gefäße) auf unterschiedliche Temperaturen bringen können. Eine weitere Voraussetzung für das Gelingen einer PCR ist, dass die Randbereiche der zu vervielfältigenden Sequenz in einer Länge von jeweils mindestens 18bp bekannt sind und als sogenannte „Primer“ mittels Oligonukleotidsynthese hergestellt werden können. Diese Primer können an die durch Hitze denaturierte Ursprungs-DNA (1. Schritt: Denaturierung der DNA bei 94° C), die als Matrize dient, binden, und so das Andocken der DNA-Polymerase ermöglichen. Um zu erreichen, dass die Primer mit einer möglichst hohen Sequenzspezifität binden, wird der PCR-Ansatz im zweiten Schritt bei einer Temperatur inkubiert, die gerade so hoch ist, dass unspezifische Bindung ausgeschlossen wird, die Affinität zur Bindestelle aber noch hinreichend hoch ist (2. Schritt: Glühen bzw. *Annealing*, Temperatur je nach Primersequenz). Nachdem die Primer gebunden haben, wird die Temperatur auf die ideale Arbeitstemperatur der Polymerase gebracht (Taq-Polymerase: 72° C) und einige Zeit (je nach Sequenzlänge und

Prozessivität der Polymerase 30 s-10 min) inkubiert (3. Schritt: Elongation). Anschließend wiederholt sich der ganze Prozess ab dem 1. Schritt 20-30x und führt so zur Vervielfältigung des gewünschten PCR-Fragments. Eine PCR enthält immer folgende Zutaten: Die Matrize (Templat), mindestens zwei *Primer*, eine Mischung der vier Desoxynukleotide (*dNTP-Mix*), die *Polymerase* sowie einen *Puffer*, der Zusatz- und Hilfsstoffe wie Salze, DMSO oder auch einen Farbstoff enthält.

3.1.5.5 Kolonie-PCR

Im Idealfall liegt die Matrize (genomische DNA oder ein Plasmid/Cosmid) für eine PCR isoliert vor. Will man viele Kolonien untersuchen, die z.B. nach einer Transformation auf einer Platte gewachsen sind, ohne den mühseligen Weg der Anzucht und Isolierung der einzelnen Klone zu beschreiten, bietet es sich an, die Zellmasse direkt in der PCR einzusetzen. *E. coli* ist hierfür gut geeignet, die Zellmembran wird durch die hohen Temperaturen teilweise zerstört und es wird genügend DNA an die Reaktionsmischung abgegeben, um die PCR zu ermöglichen. Zu beachten ist allerdings, dass die eingesetzte Zellmenge nicht zu hoch sein darf (kaum sichtbar) und dass zum Picken der Kolonien auf keinen Fall Holz-Zahnstocher verwendet werden dürfen, da im Holz Substanzen vorhanden sind, die die PCR inhibieren.[85]
Für die Kolonie-PCR von Actinomyceten mussten die Proben vorbereitet werden: Eine Stecknadelkopfgroße Zellmasse wurde in 100 µl $H_2O_{deion.}$ mit einem mini-Pistill (*Eppendorf*, passgenau für 1,5 ml Eppendorf-Gefäße) homogenisiert und anschließend 10 min bei 100° C inkubiert (Gefäße mit Klammern sichern!). Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Gefäße zentrifugiert und der Überstand sofort in der PCR eingesetzt (ca. 1-5 µl je Reaktion).

3.1.5.6 Blotting und Southern-Hybridisierung

Das Ziel einer Southern-Hybridisierung ist die Detektion eines bestimmten DNA-Fragments innerhalb einer Anzahl von auf einer Membran immobilisierten Proben (dem Blot). Diese Proben können z.B. mit Restriktionsenyzmen verdaute Plasmide oder Gesamt-DNA sein, die mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurden, oder aber auch *E. coli*-Kolonien, die auf der Membran gewachsen sind und dort aufgeschlossen werden. Je nach Art der Membran (Nylonmembran oder Nitrocellulosemembran) erfolgt die Fixierung der DNA durch UV-Licht (Nylonmembran) oder Hitze (Nitrocellulosemembran). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Nylonmembranen verwendet. Nach dem Fixieren wird die Membran mit verschiedenen Puffern gewaschen. Wichtig ist auch das *Blocking*, mit dem das Auftreten von Hintergrundsignalen (unspezifisches Binden der Sonde) minimiert werden soll. Dies geschieht meist mit BSA (bovines Serumalbumin) oder Magermilchpulver. Nach erneuten Waschschritten und einem Äquilibrierungsschritt wird die für die Zielsequenz spezifische, markierte Sonde in einem hochkonzentrierten Puffer zur Membran zugegeben und das Gefäß bei einer bestimmten Hybridisierungstemperatur, die je nach Sonde und Probe variiert wird, meist jedoch bei ca. 60° C liegt, über Nacht hybridisiert. D.h. ein zu einer gesuchten Sequenz komplementäres, markiertes DNA-Fragment wird auf die Membran gebracht und unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen bis zu 16 h inkubiert. Nach mehreren

Waschschritten wird die Sonde sichtbar gemacht. Dies geschieht je nach Markierungsmethode (radioaktiv oder Digoxygenin) photochemisch oder enzymatisch. Anhand des Signals auf der Membran oder dem Film kann das Vorhandensein und die Fragmentgröße der gesuchten Sequenz bestätigt werden.

Durchführung:

Die Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Zusätzlich kam eine DIG-markierte DNA-Leiter zur Anwendung: *DNA Molecular Weight Marker VII, Digoxigenin-labeled* (Roche Applied Science, Penzberg). Fragmentgrößen: 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 718, 710, 492, 359, 81bp. Dies war hilfreich, um später die Fragmentgrößen nach der Hybridisierung zu bestimmen. Das Gel wurde gefärbt, fotografiert und kurz in deionisiertem Wasser gewaschen. Es folgte die Denaturierung: Das Gel wurde zweimal 15 min bei leichter Bewegung (Taumeltisch) mit Denaturierungslösung inkubiert und noch einmal mit H_2O_{dest} gewaschen. Nach zweimaligem 15 minütigem Schütteln mit Neutralisierungslösung wurde der Blot aufgebaut: Auf einer Glasplatte, die über einer mit 20xSSC gefüllten Wanne lag, wurden nacheinander aufgelegt: ein Streifen Whatman-Papier, der in den Puffer reichte, drei Blätter feuchtes Whatmanpapier, das Gel, die Membran, weitere drei Blätter feuchtes Whatman-Papier, ein Stapel trockene, saugfähige Papierhandtücher, eine zweite Glasplatte und ein Gewicht. Die einzelnen Schichten wurden mit einem Glasstab luftblasenfrei gerollt. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die Geltaschen auf der Membran markiert. Zur Fixierung der DNA wurde die angetrocknete Membran für 1,5 min mit UV-Licht bestrahlt, anschließend konnte die Membran bis zu zwei Tage bei 4° C gelagert werden. Für die Hybridisierung wurde die Membran 2 bis 4 h mit 65° C-heißem Church-Puffer äquilibriert und anschließend über Nacht bei 65° C unter Schütteln mit der Sonde inkubiert (Sonde: 50 µl PCR-Produkt (mit DIG-markierten dNTPs synthetisiert wurde) wurde für 5 min bei 95° C inkubiert und schließlich mit 50 ml vorgewärmtem Church-Puffer gemischt). Die Sondenlösung wurde zur Wiederverwendung bei -20° C aufbewahrt werden, vor einer erneuten Hybridisierung wurde die Lösung 10 min bei 70° C inkubiert). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C im Hybridisierungsofen, darauf folgten mehrere Waschschritte bei Raumtemperatur (zwei mal 15 min mit 50 ml 2 x SSC + 0,1 % SDS und zwei mal 15 min mit 50 ml 0,5 x SSC + 0,1 % SDS) und die Immunologische Detektion, ebenfalls bei Raumtemperatur (5 min in Waschpuffer, 30 min mit 50 ml Blocking-Lösung geschüttelt, 30 min mit 10 ml Antikörper-Lösung geschüttelt, zwei mal 15 min mit 50 ml Waschpuffer geschüttelt, 2-5 min in 10 ml Detektionslösung schütteln und bis zu 16 h im Dunkeln mit 5 ml Färbelösung inkubieren, dabei wurde öfter den Fortschritt der Färbereaktion überprüft und die Membran zum Stoppen der Reaktion mit H_2O_{dest} abgespült). Die Membran wurde noch feucht fotografiert oder eingescannt, da die Farben beim Trocknen verblassen. Die Membran wurde entweder archiviert oder zur erneuten Verwendung „gestrippt“. Hierzu durfte die Membran nicht austrocknen, das Strippen geschah gleich nach dem Färben: Für die Entfärbung wurde die Membran einige Stunden bis zum Verschwinden der Farbe bei ca. 50-60° C in DMF inkubiert. Danach wurde die Membran mit H_2O_{dest} gewaschen und zweimal 20 min bei

37° C mit Dehybridisierungslösung geschüttelt. Zuletzt wurde die Membran bei RT mit 2 x SSC äquilibriert, getrocknet und zwischen zwei Whatman-Papieren bei 4° C gelagert.

3.2 Anlegen einer Cosmidbank, Genidentifizierung und -sequenzierung

3.2.1 Auffinden des Abyssomicin-Genclusters

Um das Genom eines Organismus untersuchen zu können, muß die Gesamt-DNA in kleinere Abschnitte verpackt werden. Hierzu werden routinemäßig BAC-Vektoren, Bakteriophagen oder Cosmide verwendet.

3.2.1.1 Herstellung der Cosmidbank

Cosmide sind Vektoren, die neben einem Plasmidanteil noch die *cos*-Stellen des Bakteriophagen λ enthalten und somit mittels eines Phagenextrakts *in vitro* verpackt werden können. Das Genom von *Verrucosispora* AB 18-032 wurde in der *Combinature Biopharm AG,* Berlin in Cosmide verpackt und anschließend einem Screening mit PKS I-Sonden unterzogen. Die Methode der Genbankherstellung basiert auf Protokollen, die von Beye *et al.*[86] und Burgtorf *et al.*[87] beschrieben wurden. Homogenisierte Bakterienkulturen wurden in 0,5 % *low melting point agarose* (SeaPlaque GTG, *Biozym*) eingebettet und anschließend mit 2 mg/ml HEW-Lysozym (*Roth*) für 14 h bei Raumtemperatur und mit 1 mg/ml Proteinase K (*Merck*) für 24 h bei 50° C inkubiert. Die eingebettete DNA wurde partiell mit Sau3AI gespalten, mit Gelase (*Epicentre*) extrahiert und nach beschriebenen Methoden dephosphoryliert. Die genomische DNA wurde mit 750ng BamHI gespaltenem Cosmidvektor pOJ436[78] ligiert, entsalzt, verpackt (Gigapack III Gold Packaging Extract, *Stratagene*) und in DH5α (*Invitrogen*) transfiziert. Die Cosmidklone wurden in 384 MTP (MTP = Mikrotiterplatten, eine Genbank enthält 6 x 384 = 2304 Klone) gepickt.

3.2.1.2 Hybridisierung

Um aus 2304 Cosmiden diejenigen zu identifizieren, die das Abyssomicin-Biosynthesegencluster enthalten, wurde ein *Screening* mittels *Southern-Hybridisierung* durchgeführt. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften von Abyssomicin C wurde vermutet, dass es sich um ein Polyketid handelt, das von einer Polyketidsynthase Typ I (PKS I) synthetisiert wird. Diese Vermutung wurde mittels Fütterung ^{13}C-markierter Polyketid-Bausteine überprüft und konnte schließlich bestätigt werden.[48] Um PKS I-kodierende Bereiche zu finden, sollte eine Southern-Hybridisierung mit PKS I-Sonden durchgeführt. Dazu wurden degenerierte PCR-Primer abgeleitet und auf der genomischen DNA von *Verrucosispora* mit Digoxygenin (DIG)-markierten Nukleotiden ein PCR-Produkt gewonnen werden.

Durchführung:

Die 2304 gewonnen Klone waren auf Nylonfilter (*Amersham*) immobilisiert. Nachdem die Kolonien auf den Membranen gewachsen waren, wurden diese nach Nizetic *et al.*[88] prozessiert und unter Verwendung von Standard-Methoden nicht-radioaktiv mit der Sonde hybridisiert (*Roche,* die Primer sind in Tabelle 4 angegeben, für die Zusammen-

setzung der PCR-Reaktion siehe Tabelle 5 und für das PCR-Programm siehe Tabelle 6). PKS I-Amplifikate zeigen eine charakteristische Größe von ca. 850 bp.

Tabelle 4: Primer für die Generierung von PKS I-Sonden (S = G oder C; W =A oder T):

KSIIFOR	5'-CTSGGSGACCCSATCGAG-3'
ATIREV	5'-GCSGCSGCGATCTCSCCCTGSSWGTGSCC-3'

Tabelle 5: PCR-Ansatz

1,0 µl genomische DNA (ca. 0,2µg) von *Verrucosispora* AB-18-032
2,5 µl 10xPuffer
2,5 µl PCR-DIG probe Synthesis Mix (Roche)
5,0 µl Q-Solution
0,5 µl KSIIFOR-Primer (50pmol)
0,5 µl ATIREV-Primer (50pmol)
0,5 µl Qiagen Taq Polymerase (2,5u)
14,5 µl H_2O

Tabelle 6: PCR-Programm

95° C, 2 min	
94° C, 1 min	30x
64° C, 1 min	
72° C, 2 min	
72° C, 10 min	

3.2.1.3 Einschränkung der Cosmide

Im Screening wurden 49 Cosmide gefunden, die PKS I-kodierende Bereiche enthielten. Um ein einzelnes Cosmid für eine Sequenzierung auswählen zu können, musste diese Zahl weiter eingeschränkt werden. Hierfür werden üblicherweise die konservierten Bereiche von zusätzlichen Enzymen, die für die Biosynthese des jeweiligen Moleküls notwendig sind, herangezogen. Von Abyssomicin C erwarteten wir aufgrund einer vorläufigen Biosynthese-Hypothese das Vorhandensein einer Monooxygenase und möglicherweise einiger Gene, die für die Biosynthese der Tetronsäureeinheit kodieren. Das Screening mit einer Monooxygenase-Sonde wurde bei Combinature Biopharm AG durchgeführt, ergab aber keine weitere Einschränkung der Cosmide. Des Weiteren wurde versucht, aus einem *alignment* FkbH-ähnlicher Gene aus verschiedenen Actinomyceten degenerierte Primer abzuleiten und mit diesen das entsprechende Gen in *Verrucosispora sp.* AB-18-032 mittels PCR zu amplifizieren. Es konnte kein spezifisches PCR-Produkt gewonnen werden, was wahrscheinlich daran liegt, dass zu diesem Zeitpunkt nur wenige Vertreter dieses Gens bekannt waren und hoch-konservierte Bereiche schwer bis gar nicht gefunden werden konnten. Die Erstellung der Cosmidbank, und das Screening mit PKS I- und Monooxygenase-Sonden wurde bei Combinature Biopharm AG

von Dr. Agnes Mühlenweg und Dipl. Biol. Hanna von Suchodoletz durchgeführt. Das Ableiten der Primer für FkbH-Sonden und die PCR-Optimierung wurden an der TU Berlin im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt.

3.2.1.4 Familienbildung

Da durch Screenen keine weitere Einschränkung der Cosmide erreicht werden konnte, wurden die Cosmide mittels Restriktionsanalyse in „Familien" unterteilt (Abbildung 23). Hierfür wurden die Cosmide mit BamHI bzw. SmaI verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und schließlich auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Hybridisierung mit PKS I-Sonden war es möglich, die Cosmide anhand der Fragmentgrößen in Gruppen, sogenannte Familien, einzuteilen.

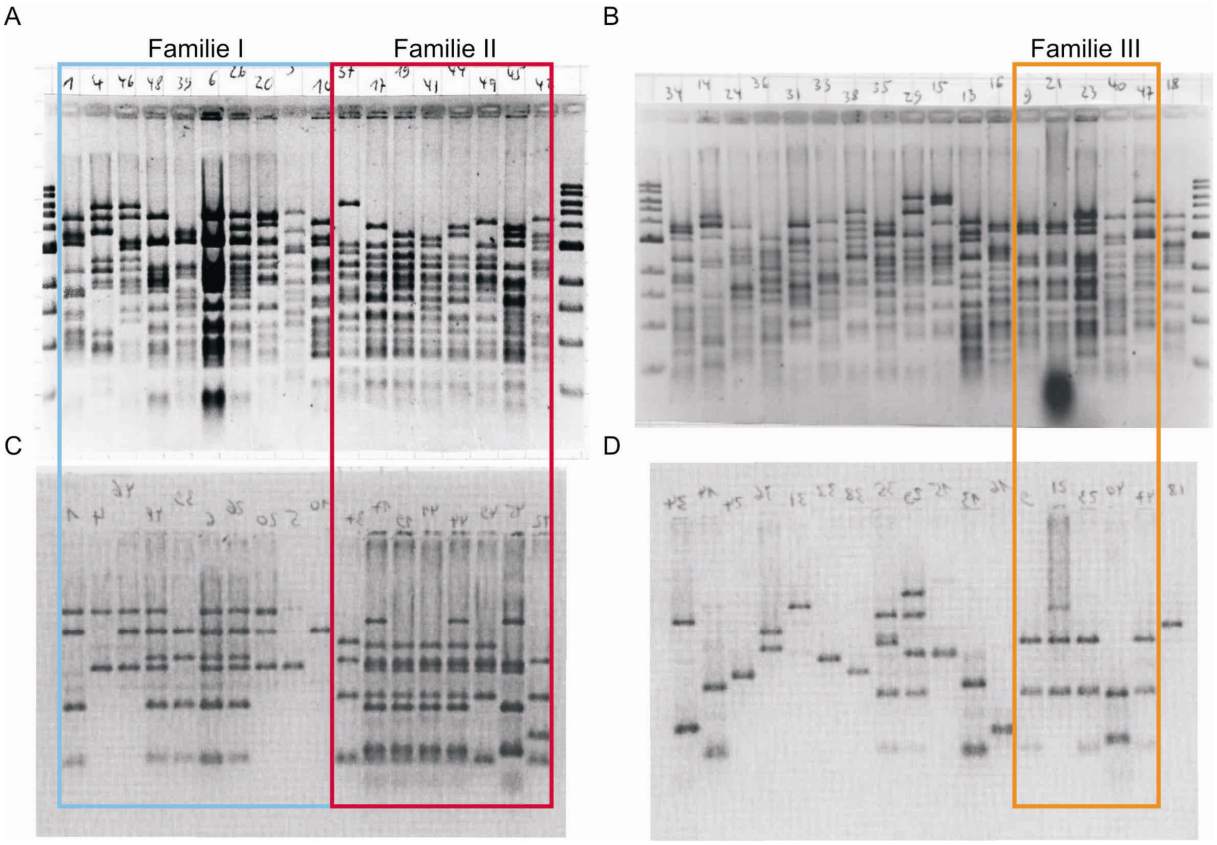


Abbildung 23: Verdau der 49 PKS I-positiven Cosmide mit SmaI: Agarosegel (A und B) und Southern Blot (C und D) mit PKS I-Sonden

Es konnten drei Familien mit je ca. 5-10 Vertretern gefunden werden sowie vier kleinere Familien mit je zwei Vertretern und 14 Cosmide, die keiner Familie zugewiesen werden konnten. Dies weist darauf hin, dass Abyssomicin C nicht das einzige Typ I Polyketid ist, das von *Verrucosispora* produziert werden kann. Möglicherweise ist die Expression aber nicht unter unseren Produktionsbedingungen aktiviert. Die Sequenzierung des Gesamtgenoms von *Verrucosispora sp.* AB-18-032, die derzeit von James E.M. Stach an der Universität Newcastle durchgeführt wird, sollte uns hier weitere Hinweise geben können.
Ergebnisse der verschiedenen Versuche zur Familienbildung sind in bis Tabelle 10 bis Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 7: BamHI-Verdau, Gel. Die Nummern bezeichnen die Cosmide. Die Cosmide in Klammern konnten nicht eindeutig zugewiesen werden.

Familie I	Familie II	Familie III	Familie IV	Familie V	Familie VI	Familie VII
C1	C17	C3	C5	C2	C16	C11
C4	C19	C9	C36	C32	C29	C22
C6	C24	C21				
C20	C41	C23				
C26	C42	C40				
C29	C44	C47				
C46	C45	(C30)				
C48	C49					
(C39)	(C37)					

Tabelle 8: BamHI-Verdau, Blot mit PKS I-Sonde. Die Nummern bezeichnen die Cosmide.

Familie I	Familie II	Familie III	Familie IV	Familie V
C1	C17	C7	C40	C22
C4	C19	C9	C43	C32
C6	C41	C16	C47	
C20	C44	C21	(C33)	
C29	C49	C27		
C46	(C45)			
C48				

Tabelle 9: SmaI-Schnitt, Blot mit PKS I-Sonde. Die Nummern bezeichnen die Cosmide.

Familie I	Familie II	Familie III	Familie IV
C1	C17	C9	C30
C6	C19	C23	C27
C26	C41	C47	C43
C39	C44		
C48	C49		
	(C37)		
	((C45))		
	((C42))		

Tabelle 10: Übereinstimmung – kleinster gemeinsamer Nenner. Die Nummern bezeichnen die Cosmide.

Familie I	Familie II	Familie III
C1	C17	C9
C6	C19	C21
C48	C41	
	C44	
	C49	

3.2.1.5 Shotgun Klonierung der Vertreter der Cosmidfamilien.

Um herauszufinden, welche Cosmidfamilie für die Abyssomicin-Biosynthese kodiert, wurde von jeder Familie ein Cosmid ausgewählt und mit BamHI verdaut (C48, C49 und C9). Der gesamte Ansatz wurde in den Vektor *pBluescript* kloniert und die Klone mittels Restriktionsverdau analysiert. Klone, die Fragmente enthielten, deren Größe den PKS I-positiven Fragmenten auf dem Southern Blot entsprach, wurden sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz). Enthielt die Sequenz PKS I-Motive, so wurde das Insert in pK18mob2 kloniert. Dieser Vektor enthält eine Apramycin-Resistenzkassette sowie einen *oriT* (origin of Transfer, notwendig für die Übertragung mittels intergenerischer Konjugation) und ist in Actinomyceten nicht replikativ (s. Anhang für eine Vektorkarte).[89]

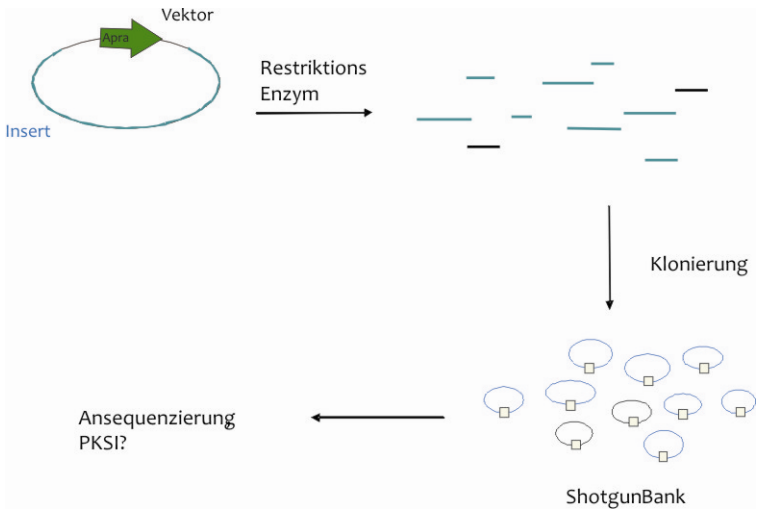


Abbildung 24: Shotgun Sequenzierung der einzelnen Cosmidfamilien

Das Plasmid wurde durch Sporen-Konjugation in *Verrucosispora* sp. AB-18-032 eingebracht und mit Apramycin selektioniert. Die Exkonjuganten wurden anschließend fermentiert und auf Produktion von *atrop*-Abyssomicin C untersucht. Familie 1 trägt nicht zur Abyssomicin-Produktion bei, die Singlecrossover-Mutante produzierte weiterhin *atrop*-Abyssomicin C.

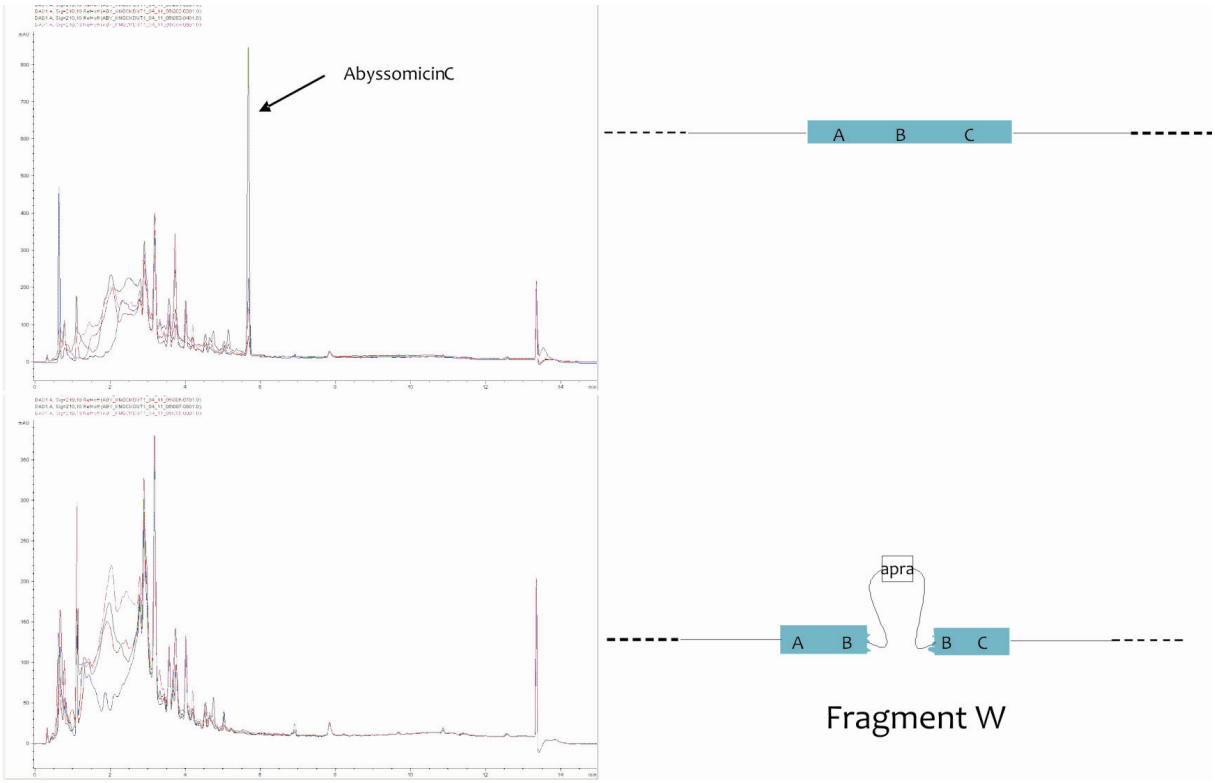


Abbildung 25: Die Insertion des Vektors pK18mob2 an der Stelle des Fragments „W" führt zu einem Fehlen der Produktion von atrop-*Abyssomicin C*

Eine Singlecrossover Mutante, die mit Fragment „W" von Cosmid 49 aus Familie 2 generiert wurde, produzierte kein *atrop*-Abyssomicin C mehr. Dies war ein starkes Indiz dafür, dass auf Familie 2 das Abyssomicin-Gencluster liegt, und ein Vertreter der Familie sollte sequenziert werden. Aufgrund der Restriktionsanalyse und der Hybridisierung mit PKS I-Sonden wurde Cosmid 17 ausgewählt, da es besonders viele Banden enthält, die PKS I-positiv sind.

3.2.2 Sequenzierung der Cosmide

3.2.2.1 Sequenzierung von Cosmid 17 – die Polyketidsynthase

Eine Platte mit Cosmid 17 (C17) wurde an die Firma AGOWA GmbH, Berlin geschickt. Dort wurde die Cosmid-DNA isoliert, verdaut und in Sequenzierungsvektoren ligiert. Diese sogenannte Shotgun-Bank wurde in 4-facher Abdeckung sequenziert, fehlende Sequenzabschnitte wurden durch *Primer Walking* komplettiert (d.h. von einer erhaltenen Sequenz werden am 3'-Ende neue Primer abgeleitet und eine neue Sequenz generiert. Ein Sequenzierlauf führt üblicherweise zu ca. 750bp von guter Qualität. Diese Schritte werden beliebig oft wiederholt.). Die endgültige Sequenz (das so genannte „*Contig*", von engl. *Contiguous* = angrenzend, zusammenhängend) von C17 bestand aus 35567 Basenpaaren und wurde mit dem Programm glimmer (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/glimmer_3.cgi) und mittels BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) untersucht.[90-93] Es konnten 11 *open reading*

frames, sogenannte ORFs gefunden werden. Drei kodieren für die erwarteten PKS I-Gene und vier weitere Gene besitzen sehr hohe Homologie zu *chlD1-4*, Genen aus dem Chlorothricin Biosynthesegencluster, die vermutlich für die Biosynthese der Tetronsäureeinheit verantwortlich sind. Weitere Gene umfassen ein Regulatorgen, einen *drug resistance transporter*, eine Monooxygenase und einen ABC-Transporter. Darüber hinaus lieferte die Sequenz von C17 (35567bp) einige Gene, deren Zuordnung nicht klar war – später stellte sich heraus, dass dieser Bereich nicht zum Abyssomicin-Cluster gehört, sondern dass ein kleineres Fragment bei der Herstellung der Cosmidbank fälschlicherweise mit dem großen Fragment, welches das Gencluster enthält, ligiert wurde. Die genauere Analyse der Sequenz mit dem Programm *SearchPKS* (http://www.nii.res.in/searchpks.html),[94] mit dem eine genaue Zuordnung der Module und Domänen einer Polyketidsynthase möglich ist, ermöglichte die Erstellung eines Modells der Synthase.

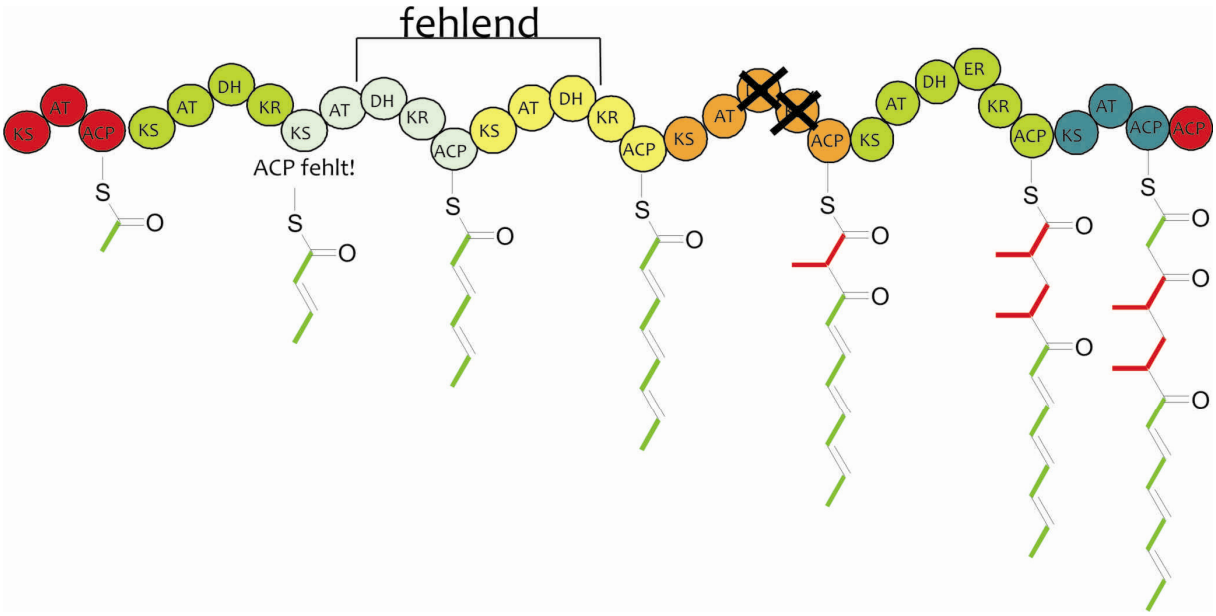


Abbildung 26: Polyketidsynthase: Modell des Abyssomicin-Biosynthesegenclusters nach Sequenzierung von C17. Teile von zwei Modulen fehlen.

3.2.2.2 Fehlende Sequenz innerhalb der Polyketidsynthase

Dieses erste Modell der Polyketidsynthase zeigte grobe Ungereimtheiten. Es fehlte die Hälfte der Module 3 und 4 sowie eine ACP-Domäne in Modul 2 (in Abbildung 26 sind die erwarteten Module eingezeichnet, wobei die fehlenden Domänen durch die Klammer und das Fragezeichen angedeutet sind). Die gründliche Analyse der bisher erhaltenen Sequenzen aus Cosmid Familie 2 (Fragment W aus C49, die ersten 96 *reads* aus der Shotgun-Sequenzierung und das fertige *Contig* von C17) führte zu dem Schluss, dass das *Contig* von C17 (35.567bp) nicht die vollständige PKS I-Sequenz enthält.
Nach der Shotgunklonierung von C49 wurde ein Fragment („W“, ca. 4kb groß) von beiden Seiten ansequenziert und zeigte beidseitig PKS I-Sequenzen. Dieses Fragment wurde in den Vektor pK18mob2 kloniert und anschließend mittels Konjug*ation in Verrucosispora* AB-18-032 gebracht. Die derart gewonnenen Singlecrossover-Mutanten

produzierten kein *atrop*-Abyssomicin C mehr, was auf die Unterbrechung des Abyssomicin-Biosynthesegenclusters hinwies (vgl. Abschnitt 3.2.1.5). Anschließend wurde C17 zur Sequenzierung ausgewählt und das *Contig* C17_091006.cons erhalten. Im Vergleich von C17_091006.cons mit den Randsequenzen von Fragment W fiel auf, dass nur eine Seite im *Contig* enthalten ist, die andere kommt nicht vor (vgl. Abbildung 27).

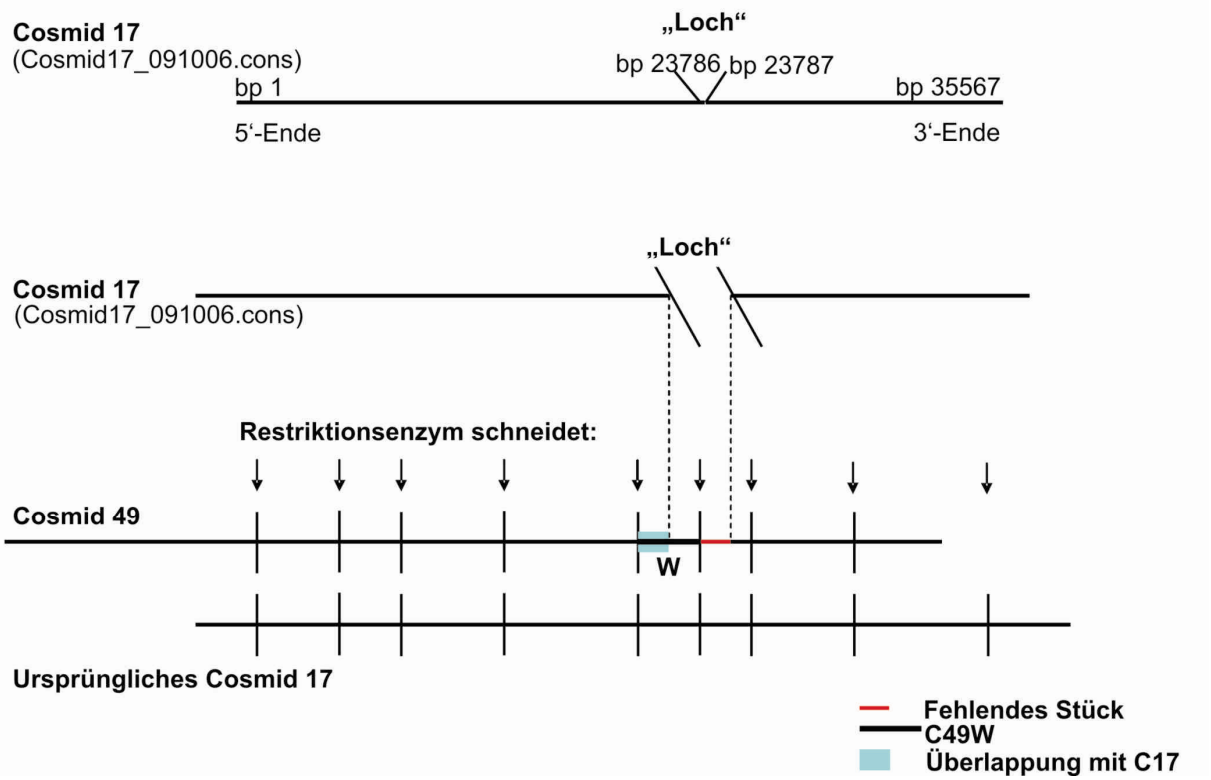


Abbildung 27: Erklärungsmodell für den Verlust von DNA bei Cosmid 17. Das „ursprüngliche Cosmid 17“ enthält das im Genom enthaltene, für die Biosynthese von atrop-Abyssomicin C notwendige Polyketidsynthasegen. Von den beiden Randsequenzen von Fragment W aus C49 konnte nur eine Sequenz im Contig Cosmid17_091006.cons wiedergefunden werden (blau markiertes Fragment). Nach der Totalsequenzierung von Fragment W konnte die Lücke zum Teil geschlossen werden, ein großes Stück (ca. 1,5kb) der im Genom vorhandenen Sequenz war weiterhin unbekannt (rot markiertes Fragment). Dieses Fragment wurde über Primer Walking auf C49 sowie Sequenzierung von PCR-Produkten aus C49 gewonnen.

Vergleicht man aber die Sequenzen, die in der ersten Runde zustande gekommen waren (die ersten 96 *reads*), so gibt es sehr wohl ein Fragment, das mit einem Teil von W 100 % übereinstimmt. Anscheinend hat C17 in der ersten Runde der Sequenzierung noch eine andere Sequenz enthalten als in der weiteren Sequenzierung. Die Erklärung hierfür ist, dass Polyketidsynthasen hochrepetitive Sequenzen enthalten können, deren einzelne Domänen sich oft wiederholen, wenn auch meist mit leicht bis stark unterschiedlicher Sequenz. Im Fall von Cosmid 17 scheint ein Stück des Genclusters durch homologe Rekombination verloren gegangen zu sein (vgl. Abbildung 28). Es wird vermutet, dass die Evolution von Polyketidsynthasen durch zufällige Verdopplung und Deletion von einzelnen Domänen oder Modulen geschieht, was durch eine hohe Übereinstimmung der Module innerhalb eines Biosynthesegenclusters reflektiert wird.[95] Je

mehr Zeit (und damit Zellteilungen) seit dieser Verdopplung vergangen ist, umso unterschiedlicher wird die Gensequenz der jeweiligen Domänen, da bei oftmaliger Zellteilung statistisch gesehen häufiger Fehler entstehen.

Tabelle 11: Homologe und identische Bereiche innerhalb des Abyssomicin-Biosynthesegenclusters. Ergebnis eines „FastScan" lokalen Sequenzvergleichs des Gesamt-Contigs mit sich selbst mit dem Programm Clone Manager Suite 7. „Molekül 1" bezeichnet eine Kopie der Sequenz des Gesamt-Contigs, „Molekül 2" die zweite Kopie. Es wird deutlich, dass mehrere Bereiche innerhalb der PKS I-Gene in duplizierter Form auftreten d.h. sehr hoch homologe Bereiche zu beobachten sind. Grau unterlegt ist jener doppelt vorkommende Bereich, der bei C17 zum Verlust eines 4,8kb langen Fragments zwischen Position 20303 und Position 25121 führte (Position 1 wurde auf das 5'-Ende der in dieser Arbeit bestimmten Sequenz (orfX, unvollständig) festgelegt).

Übereinstimmung [%]	Länge [bp]	"Molekül 1" Beginn [bp]	Ende	"Molekül 2" Beginn [bp]	Ende
99	934	16397	17332	21149	22084
100	575	20303	20877	25121	25695
91	171	15851	16127	20606	20882
91	166	15851	16122	25424	25695
93	138	20060	20241	24878	25059
100	132	19596	19727	24411	24542
82	80	15349	15658	30038	30347
81	72	30445	30676	35233	35464
88	69	31290	31406	36051	36167

Im Fall des Biosynthesegenclusters von *atrop*-Abyssomicin C gibt es nicht nur *ähnliche*, sondern über weite Bereiche *identische* Sequenzabschnitte (Tabelle 11). Die Abschnürung des Fragments durch homologe Rekombination erfolgte durch ein 575bp langes Stück, dessen Sequenz zweimal im Gencluster vorkommt: Bei Position 20303-20877bp und 25121-25695bp. Hierauf ging ein 4,8kb langes Fragment verloren (Position 1 wurde auf das 5'-Ende der in dieser Arbeit bestimmten Sequenz (*orfX*, unvollständig) festgelegt). Insgesamt treten in den PKS-Genen sechs Bereiche auf, die mit einer Übereinstimmung von über 90 % und einer Länge zwischen 132 und 934 Basenpaaren mehrfach vorkommen (Tabelle 11).

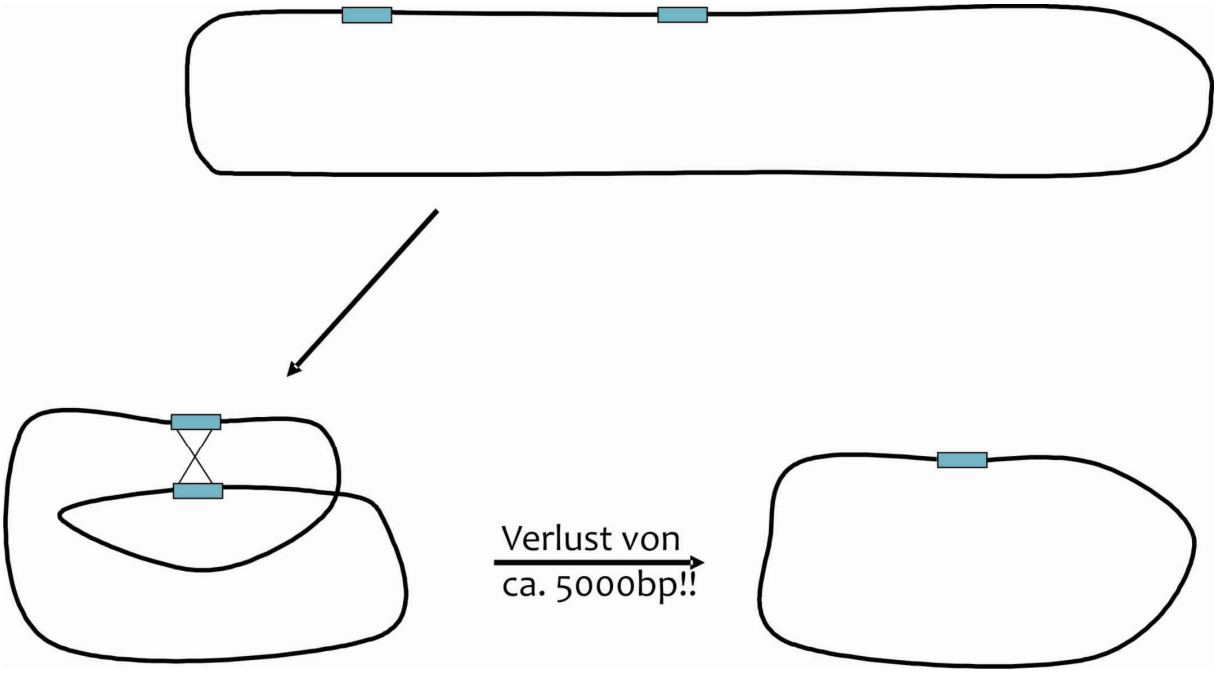


Abbildung 28: Ein Bereich von 575bp, der zweimal im Gencluster vorkommt, ermöglichte über homologe Rekombination ein Doppel-Crossover. Der Verlust von ca. 5000bp (ca. 10 % der Gesamtgröße des Cosmids!) ist ein Wachstumsvorteil für diese Mutanten und führte zu überproportionaler Anreicherung dieser Variante. Um eine starke Anreicherung von fehlerhaften Cosmiden zu vermeiden, wurden die E. coli-Kulturen mit Cosmiden anschließend nur mehr bei 30°C kultiviert, da hier die Teilungsrate nicht exponentiell und die Anreicherung der fehlerhaften Mutanten etwas weniger stark ist.

3.2.2.3 Sequenzierung des vollständigen Abyssomicin-Biosynthesegenclusters

Auf Cosmid 17 finden sich außer der Polyketidsynthase noch neun weitere Gene: in 5'-Richtung der Polyketid-Sequenzen sind vier *open reading frames* (ORFs), die sehr hohe Homologien zu vier Genen zeigten: ChlD1-ChlD4 waren im damals erst kurz zuvor publizierten Chlorothricin-Gencluster, welches ebenfalls eine Tetronsäureeinheit enthält, beschrieben worden. ChlD1 ist ein Enzym des Typs FkbH.[42] In 3'-Richtung enthält Cosmid 17 fünf zusätzliche Gene: ein Regulator-Gen des Typs TetR, ein Resistenz-Transporter-Gen, ein Monooxygenase-Gen, ein ABC Transporter-Gen sowie ein Helicase-Gen, Typ c2. Wie sich später anhand von Ungereimtheiten beim Vergleich mit dem Anschlusscosmid herausstellte, stammt die Helicase ursprünglich nicht aus der Umgebung des *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthesegenclusters sondern wurde während der Cosmidbankherstellung als „falsches Ende" in Cosmid 17 verpackt. Bei der Cosmidbankherstellung (s. 3.2.1.1) wurde das Gesamtgenom von *Verrucosispora* sp. AB-18-032 mit Sau3AI partiell verdaut und in Segmenten in der Größenordnung von ca. 40kb in den Vektor pOJ436 verpackt. Hierbei kann es vorkommen, dass sich kürzere Fragmente aneinander anlagern und zu einem DNA-Fragment religieren, welches die richtige Größe hat, um verpackt zu werden, aber nicht die Lage im Genom widerspiegelt.

3.2.2.4 Anschlusscosmide

Da das Homologe zu ChlD1 auf C17 nicht vollständig vorhanden ist, war klar, dass Anschlusscosmide gefunden werden mussten. Hierzu wurden verschiedene Cosmide ansequenziert (mit den Standard-Sequenzierungsprimern T7 und pBR3, die im Vektor binden): C37, C45 und C49. Da die Ergebnisse teilweise nicht interpretierbar waren (durch Vorhandensein falscher Enden) wurden Sonden aus Teilen von *abyA2* und *abyF1* abgeleitet und eine Southern-Hybridisierung mit Restriktionsfragmenten aller Mitglieder aus Familie II durchgeführt (Abbildung 29 bis Abbildung 31. Dies ergab, dass die Cosmide C17, C19, C37, C41, C44 und C49 eher die Gene *upstream* der PKS I-Gene enthalten und dass nur C45 Gene *downstream* von AbyE enthält

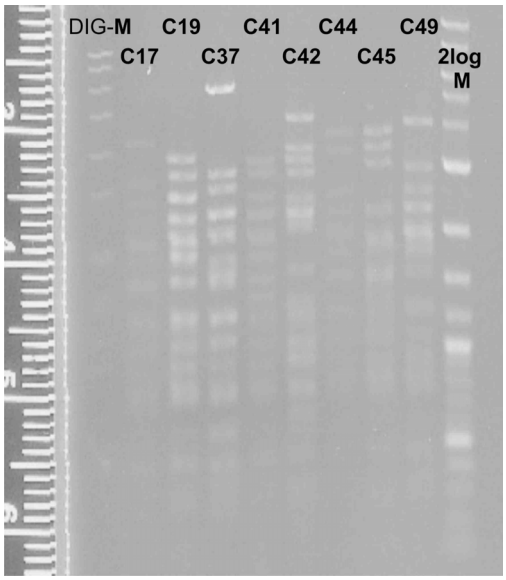


Abbildung 29: Gel des SmaI-Verdaus aller Cosmide von Familie I

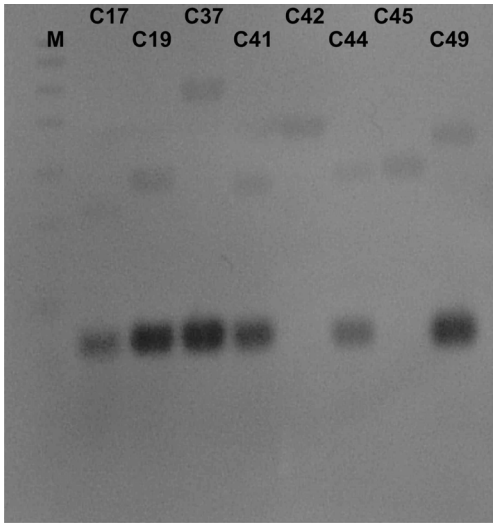


Abbildung 30: Blot eines SmaI-Verdaus, Sonde abgeleitet von abyA2*, dem Gen einer Phosphatase und Glyceryl-Transferase.*

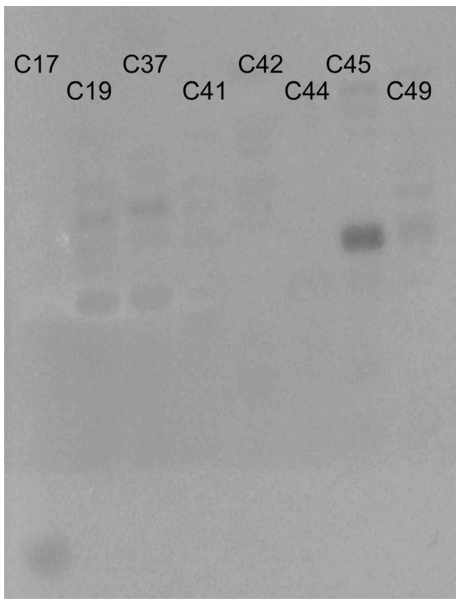


Abbildung 31: Blot eines SmaI-Verdaus mit Sonde abgeleitet von abyF1, dem Gen eines ABC-Transporter Oligopeptid-bindenden Proteins (der Blot war zum zweiten Mal verwendet worden, daher ist der Marker nicht mehr sichtbar, er wurde vom Bild abgeschnitten).

Als nächster Schritt wurde von den Rändern von C17 ausgehend auf C45 bzw. C49 weiter sequenziert (Ergebnisse s. Kapitel 4). Anhand der PKS I-Gene, die sowohl auf C17 also auch auf C45 bzw. C49 zu finden sind, konnte die relative Orientierung der zwei Cosmide bestimmt werden (Abbildung 32).

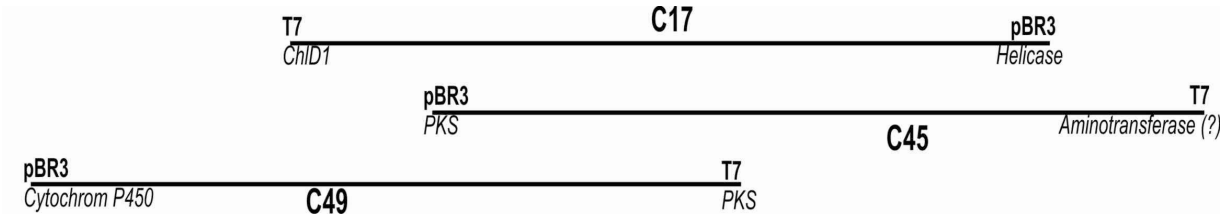


Abbildung 32: Orientierung der Anschlusscosmide zu C17, C49 und C45.

3.2.2.5 Sequenzierprobleme

Da ein großer Teil des Genclusters durch *Primer Walking* ermittelt wurde, ergaben sich auch in anderen Regionen Probleme. Actinomyceten-DNA hat einen sehr hohen GC-Anteil (durchschnittlich 72 %) und bildet daher häufig starke Sekundärstrukturen aus, welche mit Standard-Sequenziermethoden nur schwer aufzulösen sind. Wenn über modifizierte Sequenzierbedingungen keine angrenzende Sequenz ermittelt werde konnte, was dreimal der Fall war, wurde vom Rand der vorhandenen Sequenz eine Primersonde abgeleitet (zwei PCR-Primer im Abstand von ca. 300bp, die PCR erfolgte mit Digoxygenin-markierten Desoxynukleotiden). Für eine Southern-Hybridisierung (s. Abschnitt 3.1.5.6) wurden zunächst mehrere Restriktionsenzyme ausgewählt, die folgende Bedingungen erfüllen mussten:

- keine Schnittstelle innerhalb der Sonde
- keine Schnittstelle zwischen Sonde und Beginn der unbekannten Sequenz
- eine Schnittstelle möglichst nahe an der Sonde innerhalb der bekannten Sequenz

In einem Vorversuch wurde C49 mit diesen Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt und geblottet. Nach der Southern-Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde wurden ein oder zwei Restriktionsenzyme ausgewählt, die zu einem Restriktionsfragment führten, welches sich mit der Sonde detektieren ließ und idealerweise zwischen 1,5 und 2kb groß war, um es gut durch Sequenzierung vom Vektor aus in wenigen Schritten abdecken zu können (Abbildung 33 und Abbildung 34).
In einem anschließenden präparativen Ansatz wurde C49 mit dem/n entsprechenden Enzym/en geschnitten und mit dem – mit einem kompatible Enden erzeugenden Enzym verdauten und dephosphorylierten – Vektor pBKS ligiert. Nach der Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen und Anzucht von mehreren Klonen wurde mittels erneuten Restriktionsverdaus und ggf. Southern-Hybridisierung jener Klon ausgewählt, der das richtige Restriktionsfragment enthielt, und zur Sequenzierung eingeschickt. So konnte vom Vektor aus die schwierige Sequenz von beiden Seiten in Angriff genommen werden. In einem Fall reichte diese Maßnahme aus, um zur fehlenden Sequenz zu kommen, in einem Fall war die Sequenzierung eines PCR-Produktes erfolgreich – und im dritten Fall waren sämtliche Sequenzierversuche fruchtlos. Diese Probleme traten nur bei Cosmid 49 auf, die Basenabfolge von Cosmid 45 konnte problemlos mittels *Primer Walking* ermittelt werden.

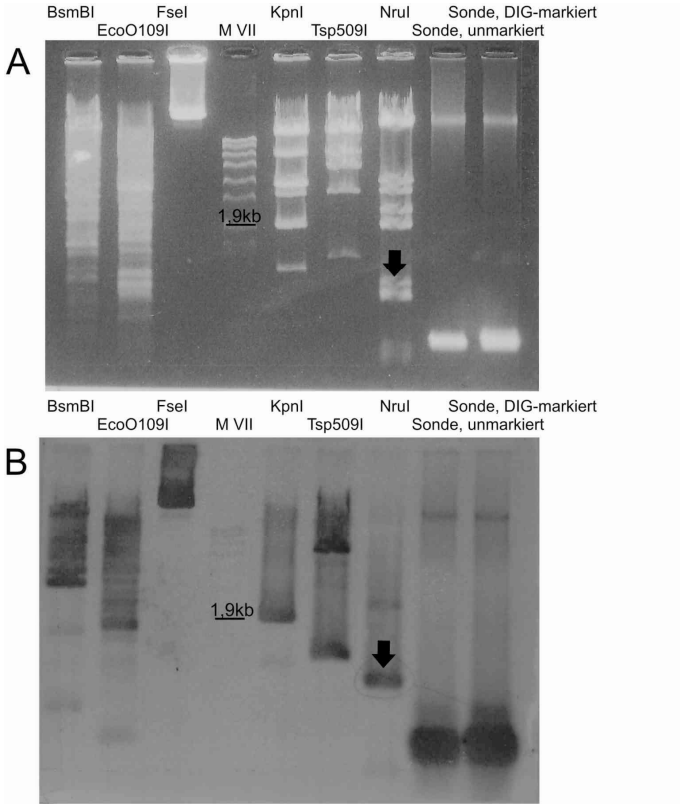


Abbildung 33: Vorversuch zur Subklonierung von C49, um ein geeignetes Restriktionsenzym zu identifizieren. A: Gel mit C49, das mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurde. B: Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter abyK-Sonde. Das mit einem Pfeil markierte Fragment wurde kloniert und sequenziert. M VII: DIG-markierte DNA-Leiter.

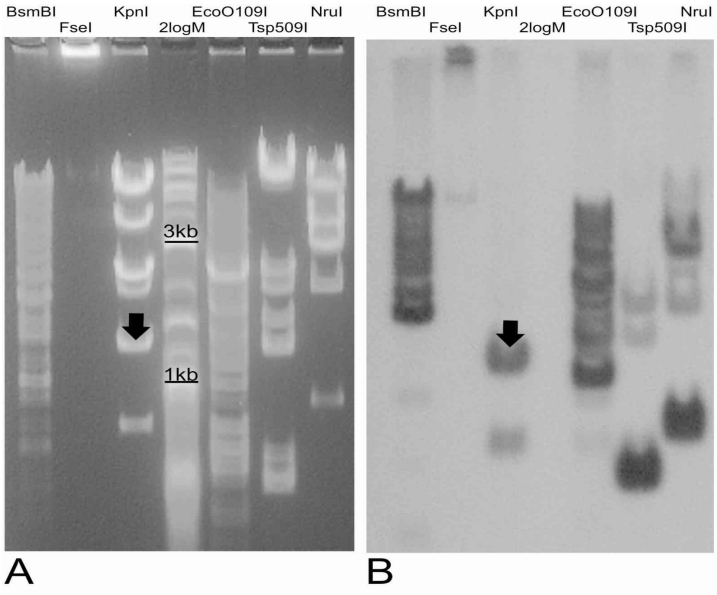


Abbildung 34: Vorversuch zur Subklonierung von C49, um ein geeignetes Restriktionsenzym zu identifizieren. A: Gel mit C49, das mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurde. B: Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter abyI-Sonde. Das mit einem Pfeil markierte Fragment wurde kloniert und sequenziert.

3.2.2.6 Nicht sequenzierbare Terminatorstruktur

C49 wurde mit NruI verdaut und ein 1.6kb großes Fragment aus dem Gel ausgeschnitten (Abbildung 35 und Tabelle 12). Nach Ligation mit pJET und Transformierung in DH5α-Zellen konnte ein Plasmid mit einer Größe von 4,5kb isoliert und zum Sequenzieren geschickt werden (Abbildung 36). 1,65µg Plasmid wurden mit BamHI verdaut (Fermentas, 2 *units* in 200 µl Gesamtvolumen, 16 h bei 37° C, Tabelle 13). Die DNA wurde gefällt (s. Abschnitt 3.1.5.1) und in 16 µl Wasser gemischt mit 4 µl *Orange Loading Dye Solution* (Fermentas, *O'Range Ruler 10bp* Kit) gelöst. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Lösung mit 1:10.000 SYBR-Green komplementiert (je 10 µl Probe, 1 µl der 1:1.000-Verdünnung der Stammlösung) und 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach
elektrophoretischer Auftrennung (5 % Agarose *High Resolution* von Roth, TAE-Puffer, 3,5V/cm, 90 min) wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator fotografiert (Abbildung 38).

Tabelle 12: Verdau von C49 mit NruI: erwartete Fragmentgrößen. Das gesuchte Fragment von C49 ist grau unterlegt.

Fragment-Größen [bp]
9101
8782
6478
6116
4815
3984
1592
1311

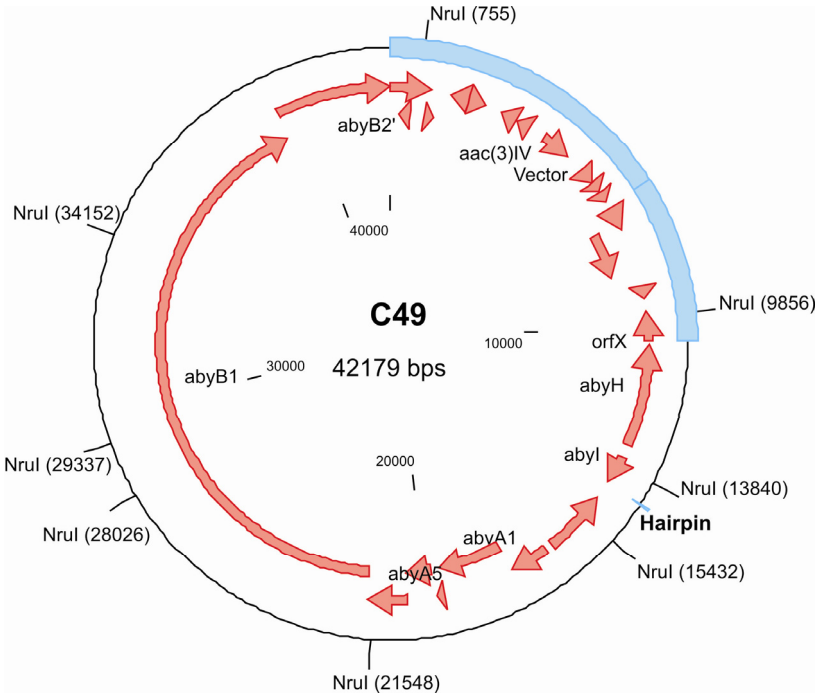


Abbildung 35: Cosmid 49 (soweit es bekannt ist: die falschen Enden sind nicht berücksichtigt), Restriktionsstellen für NruI sind eingezeichnet. Als „Hairpin" bezeichnet ist die nicht sequenzierbare Stelle, von der vermutet wird, dass es sich um eine Sekundärstruktur handelt.

Tabelle 13: Verdau von C49/NruI in pJET mit BamHI: erwartete Fragment-Größen. Das interessierende Fragment, welches die nicht sequenzierbare Stelle enthält, ist grau unterlegt.

Fragment-Größe [bp]
3018
609
450
379
110

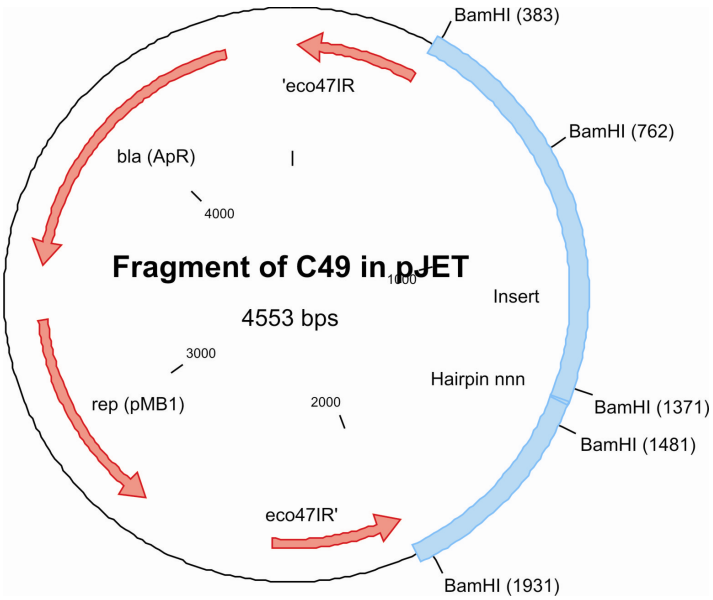


Abbildung 36: Vektorkarte des NruI-Fragments in pJET. Das Insert (blau unterlegt) entspricht dem Fragment des NruI-Verdaus von Cosmid 49 (NruI 13840- NruI 15432). Als „Hairpin" bezeichnet ist die nicht sequenzierbare Stelle, von der vermutet wird, dass es sich um eine Sekundärstruktur handelt.

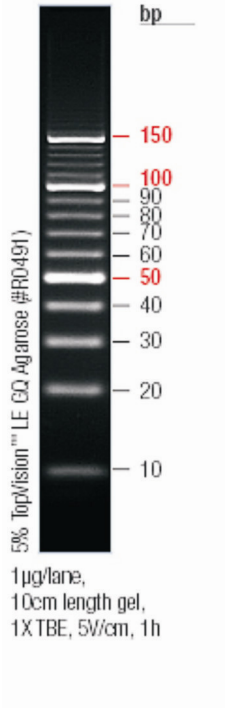


Abbildung 37: O'Range ruler 10bp, Längenstandard für kleine DNA-Fragmente.

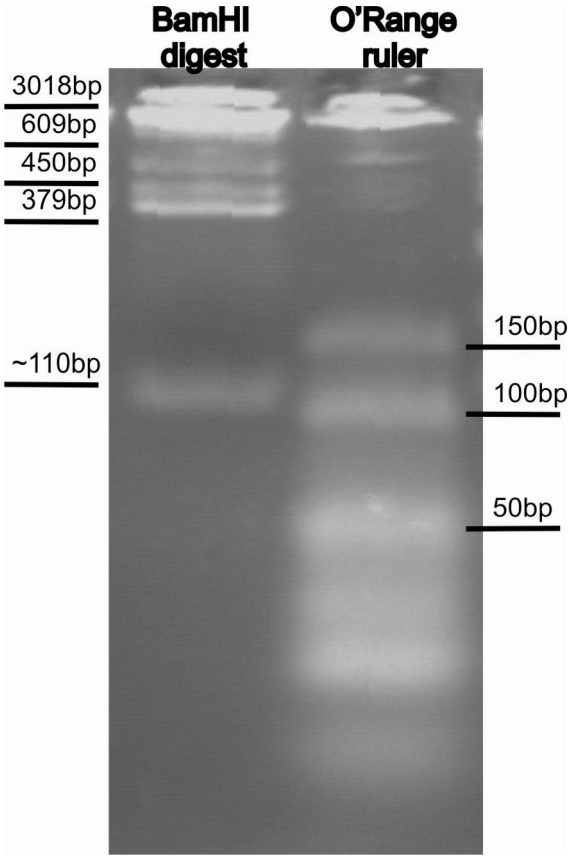


Abbildung 38: Gel des BamHI-Verdaus von C49/BamHI::pJET (links) und Marker O'Range ruler für kleine DNA-Fragmente (rechts).

3.2.2.7 Zusammensetzung des Gesamt-*Contigs*

Das komplette *Contig* (57kb) wurde aus drei verschiedenen Cosmiden zusammengesetzt: C17 (34.5kb), C45 (8.6kb am 3'-Ende des *Contigs*) und C49 (8.5kb am 5'-Ende des *Contigs* und 5.2kb innerhalb der PKS-Module).

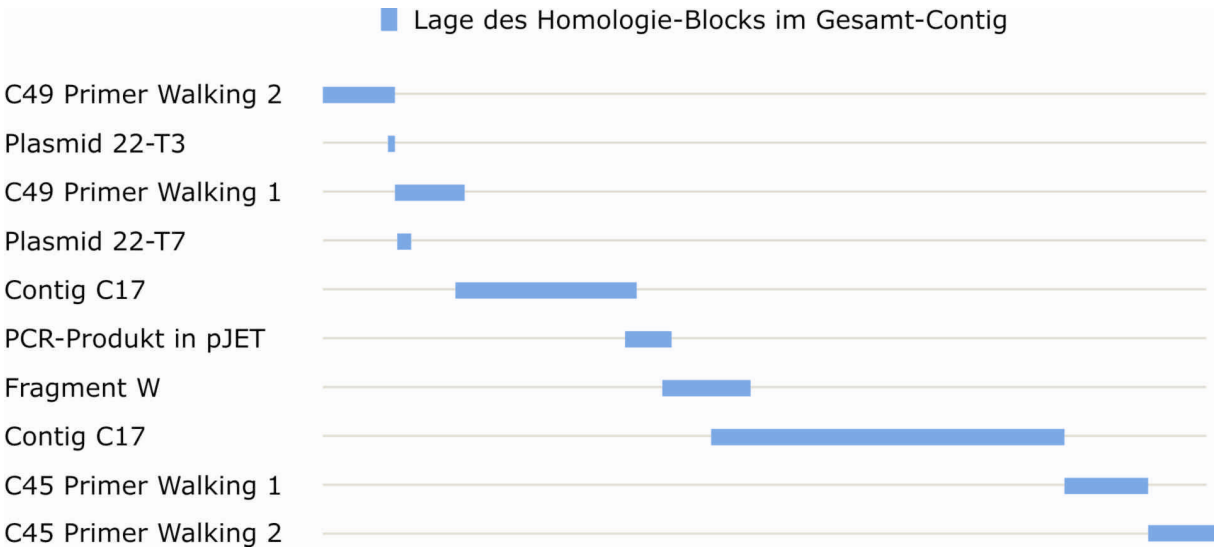


Abbildung 39: Zusammensetzung des Gesamt-Contigs aus einzelnen Abschnitten

Tabelle 14: Zusammensetzung des Gesamt-Contigs

Bezeichnung	Name File	Start	Ende	Qualität
C49 Primer Walking 2	C49_T3R-KpnI_250208.cons	1	4664	Doppelsträngig
Plasmid 22-T3	plasmid22-T3.cons	4127	4658	Doppelsträngig
C49 Primer Walking 1	C49walk190407.cons	4685	9159	Doppelsträngig
Plasmid 22-T7	plasmid22-T7.cons	4782	5718	Doppelsträngig
Contig C17	Cosmid17_091006.cons	8608	20135	Doppelsträngig
PCR-Produkt in pJET	Loch_PCR_pJET_*Contig*09_03_09.cm5	19517	22498	Doppelsträngig
Fragment W	C49W_200507.cons	22007	27657	Doppelsträngig
Contig C17	Cosmid17_091006.cons	25134	47999	Doppelsträngig
C45 Primer Walking 1	C45walking_120308.cons	47977	53441	Doppelsträngig
C45 Primer Walking 2	C45walking_09_07_12.cons	52834	57157	Einzelsträngig, schlecht

3.3 Mutanten und Produktionskontrolle

Will man die Funktion eines Gens untersuchen, so gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Eine Expression des Gens wird verhindert (durch Unterbrechung oder Deletion oder auch durch einen Eingriff in die Regulation des Gens).
- Das Gen wird durch Hochregulation oder Überexpression des Gens auf einem Plasmid im gleichen oder einem ähnlichen Organismus überexprimiert und die Auswirkungen auf den Phänotyp untersucht (*in vivo*).
- Das Gen wird (evt. in einem Wirtsorganismus wie *E. coli*) überexprimiert, proteinchemisch aufgereinigt und seine Funktion untersucht, z.B. mittels Enzymkinetik (*in vitro*).

Im Falle des Biosynthesegenclusters von *atrop*-Abyssomicin C wurden Mutanten hergestellt um

- die Cosmidfamilie zu finden, auf der das Gencluster liegt
- die Ränder des Clusters zu definieren
- einzelne Gene gezielt zu deletieren
- die Funktion eines deletierten Gens durch konstitutionelle Expression einer Kopie des Gens auf einem Plasmid wiederherzustellen
- die Funktion eines Gens durch Überexpression einer Kopie des Gens auf einem Plasmid zu untersuchen.

Die Experimente, um die Cosmidfamilie zu finden und um den Rand des Clusters zu definieren wurden mit Singlecrossover-Mutanten durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.1). Die gezielte Deletion der Gene wurde mit Doppelcrossover-Mutanten erzielt (s. Abschnitt 3.3.2). Für die Überexpression wurde das Plasmid pSETermE* verwendet (s. Abschnitt 3.3.3).

3.3.1 Singlecrossover-Mutanten – Insertion von pK18mob2

3.3.1.1 Prinzip

Eine vergleichsweise einfache und schnelle Methode der Unterbrechung eines Gens ist die Herstellung einer Singlecrossover-Mutante. Hierbei wird ein Stück, das innerhalb des Gens liegt, in einen Vektor kloniert, welcher in Actinomyceten nicht replikativ ist. Durch homologe Rekombination integriert dieses Stück in das Chromosom, was dazu führt, dass eine Kopie des Vektors, an beiden Seite umgeben von einer verkürzten Kopie des Gens, im Chromosom integriert vorliegt (Abbildung 40).[78]

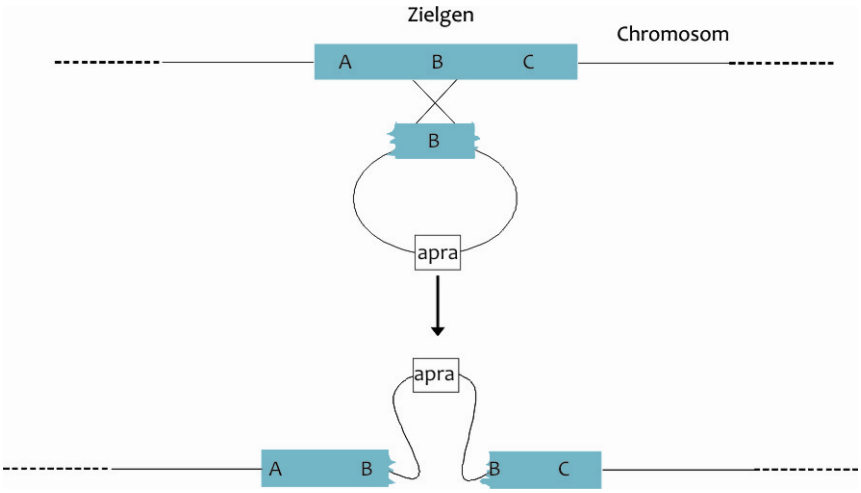


Abbildung 40: Homologe Rekombination: Ein Gen-identisches Stück in einem Vektor integriert in das Chromosom. Der Vektor unterbricht das Gen und wird von zwei verkürzten (und damit inaktiven) Genkopien flankiert.[78]

Diese Methode hat allerdings gravierende Nachteile; zu beachten sind die Größe des Gens, polare Effekte und die mangelnde Stabilität der Mutanten.[78]

- Das Gen-identische Fragment sollte mindestens 300bp lang sein, da die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination stark von der Länge der homologen Bereiche abhängig ist. Zusätzlich muss das Fragment so gewählt werden, dass rechts und links davon für die Funktion essentielle Bereiche liegen, so dass gewährleistet ist, dass im Exkonjuganten beide Genkopien inaktiv sind. Bei kleinen Genen (<500bp) ist es daher schwierig bis unmöglich, eine verlässliche Mutante mittels Singlecrossover zu erhalten.
- Polare Effekte: Durch die Insertion des Vektors ist es möglich, dass auf das Zielgen folgende (also in die gleiche Richtung abgelesene) Gene ebenfalls inaktiviert werden. Somit kann keine verlässliche Aussage über die Auswirkungen der Mutation erhalten werden, da nicht klar ist, welches Gen aktiv ist und welches inaktiv.
- Stabilität der Mutanten: Prinzipiell ist es möglich, dass der Vektor durch erneute homologe Rekombination wieder „herausfällt". Auch während Aufrechterhaltung der Selektion mit dem geeigneten Antibiotikum kann es sein, dass einzelne Zellkerne zum Wildtyp revertieren. Actinomyceten besitzen meist mehrere Zellkerne pro Zelle und nicht alle Kerne müssen die Antibiotikaresistenz besitzen.

3.3.1.2 Gewinnung von Singlecrossover-Mutanten

Gen-interne Fragmente von *abyB1*, *orfV* und *orfX* wurden mittels PCR amplifiziert (*orfV* und *orfX* je ca. 300bp, *abyB1* ca. 700bp, für Primer siehe Tabelle 15, Gel von *abyB1*: Abbildung 41). Ein Aliquot wurde auf einem Agarosegel analysiert und der Rest der Amplifikate mit einem Säulchen aufgereinigt (*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purication Kit* von *GE Healthcare,* München). Anschließend folgte die Ligation mit dem Vektor pDrive (*Qiagen PCR cloning kit*, Vektorkarte s. Abschnitt 6.2), der einen zum polyA-Schwanz des Taq-Polymerase-Produkts komplementären U-Überhang aufweist. Alternativ kann mit einem *A-addition Kit* auch ein Blunt-End-Restrikionsfragment oder

ein PCR-Produkt einer anderen Polymerase (z.B. *PWO*-Polymerase) mit einem poly-A-Schwanz versehen und anschließend mit pDrive ligiert werden. Nach der Transformation wurden weiße Klone gepickt (Blau-Weiß-Selektion), in Flüssigkultur angezogen und die Plasmid-DNA isoliert. Es folgte ein Restriktionsverdau mit EcoRI und nach Kontrolle der Größe des Inserts wurde ein Teil des Verdaus in einer Ligation mit dem ebenfalls mit EcoRI verdauten und mit Antarktischer Phosphatase dephosphorylierten Vektor pK18mob2 eingesetzt. Nach erneuter Transformation wurden mehrere Klone gepickt (mit pK18mob2 ist keine Blau-Weiß-Selektion möglich), über Nacht angezogen und Plasmide isoliert. Diese Plasmide wurden einem Kontrollverdau mit EcoRI unterzogen und die positiven Klone zum Sequenzieren eingeschickt. Das korrekte Plasmid wurde in *E. coli* ET12467/pUB307 transformiert und auf TY mit Apramycin (pK18mob2), Kanamycin (pUB307) und Chloramphenicol (*E. coli* ET12567) ausplattiert. Ein Klon wurde in Flüssigkultur angezogen, als Glyzerinstock konserviert und in einer Konjugation mit Sporen von *Verrucosispora* AB-18-032 eingesetzt (s. Abschnitt 3.1.4.3).

Tabelle 15: Primer für die Insertionsfragmente

SXO *orfX* fw	TCGAGACGGGCGCTGACG
SXO *orfX* rev	CCGCCCTGCGCGAGAATG
SXO *orfV* fw	AGAGCCACTCCGAGCGCCAACG
SXO *orfV* rev	CTCCTCGACGAGGTGGTTC
SXO *abyB1* fw	GTCATGTACGGCGACTACG
SXO *abyB1* rev	GTTGCATGGCTTGGATGAC

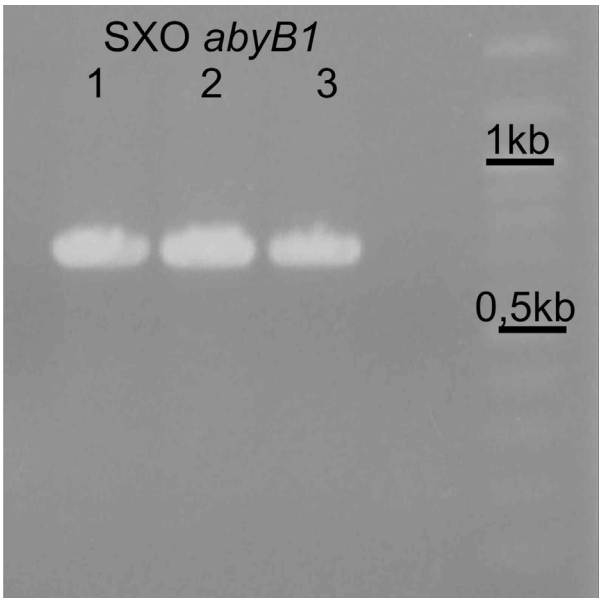


Abbildung 41: PCR mit SXO abyB1-Primern auf C17-Cosmid-DNA. Die erwartete Produktgröße liegt bei 727bp.

3.3.1.3 Bestätigung von Singlecrossover-Mutanten für *orfV* und *orfX*

Sowohl *orfV* als auch *orfX* sind Cytochrom P450-Proteine. Diese Klasse von Enzymen kommt in jedem Organismus vielfach vor und da auch heterologe Rekombination vorkommen kann, muss überprüft werden, ob die Insertion an der richtigen Stelle im Genom stattgefunden hat. Die Kontrolle der Insertion am richtigen Ort im Genom erfolgt über eine PCR mit drei Primern (Abbildung 42). Ein Primer bindet innerhalb des Vektors, zwei weitere Primer binden im Genom rechts und links vom amplifizierten Fragment. Hat die Insertion an der richtigen Stelle stattgefunden, so gibt es ein PCR-Produkt des Bestätigungsprimers *Vektor* und eines der beiden Primer, die im Genom binden (die Orientierung des Inserts im Vektor ist unbekannt). Hat keine Insertion stattgefunden, gibt es ein Produkt der beiden Primer, die rechts und links des Fragments binden (siehe Tabelle 17 für die Länge des jeweiligen Produkts). Bei *abyB1* wurde keine Bestätigung mittels PCR durchgeführt. Es handelt sich um die zweite Mutante, die eine Unterbrechung der PKS-Gene bewirkt: die erste Mutante war diejenige, die anfangs mit dem Restriktionsfragment W generiert wurde und die bestätigte, dass Cosmidfamilie 2 die für die *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthese notwendigen Gene enthält.

Tabelle 16: Bestätigungsprimer für Singlecrossover (SXO).

Bestätigungsprimer *Vektor*	CGCGCCATTCGCCATTCAGG
orfX Bestätigungsprimer 1	CCTGTGCGGTGCTCGAAC
orfX Bestätigungsprimer 2	ATGACCCGCACCTGTCCC
orfV Bestätigungsprimer 1	CGCGGTCCGCAACTTCATCG
orfV Bestätigungsprimer 2	TGCCGCAGGATCTCCTCCAC

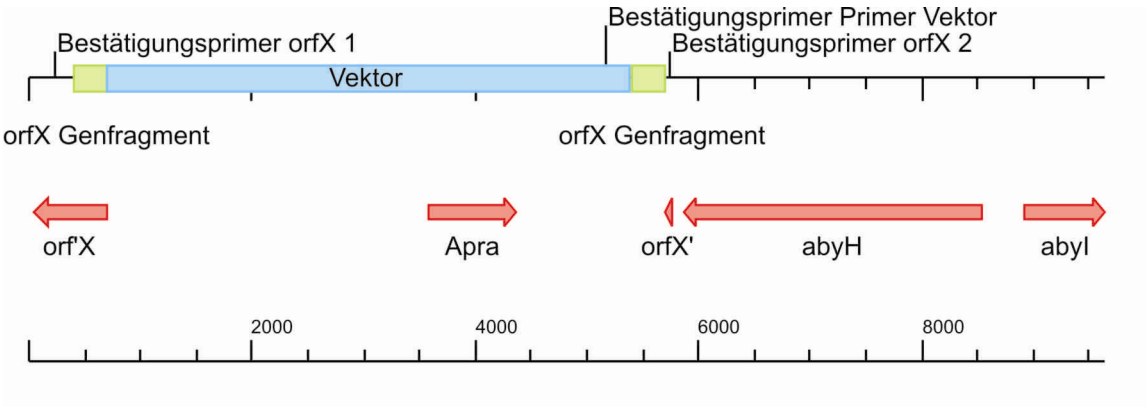


Abbildung 42: Prinzip der Insertion bei Singlecrossover-Mutanten am Beispiel von pK18mob2[orfX_Fragment] in das Genom von Verrucosispora *AB-18-032. Die Insertion kann mittels PCR bestätigt werden (Bestätigungsprimer orfX1 und Bestätigungsprimer orfX2 sowie Bestätigungsprimer Vektor).*

Tabelle 17: Länge der möglichen PCR-Fragmente Wildtyp vs. Singlecrossover-Mutanten.

Gen	*Verrucosispora*::pK18_Genfragment	WT
orfX	689 oder 568bp	504bp
orfV	732 oder 682bp	584bp

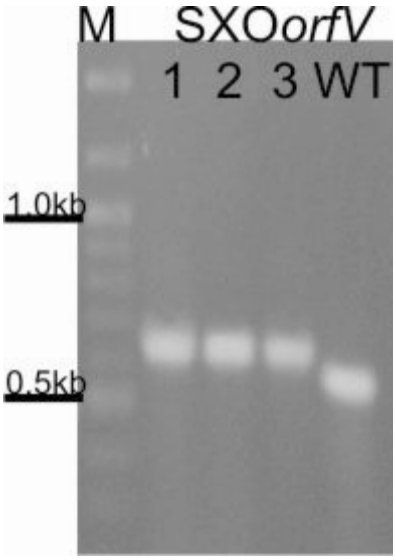


Abbildung 43: Bestätigung der Insertion von orfV ins Genom von Verrucosispora AB-18-032 (SXOorfV = Singlecrossover-Mutanten von orfV*. 1-3 = Mutanten, WT = Wildtyp)*

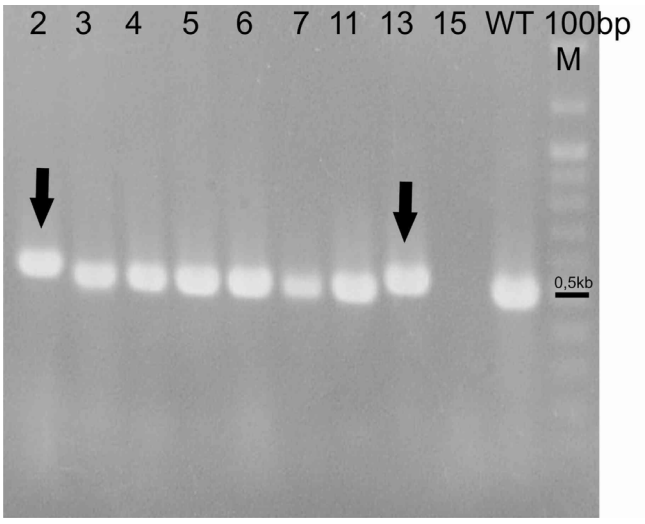


Abbildung 44: Bestätigung der Insertion von orfX ins Genom von Verrucosispora *AB-18-032 (2-15 = Singlecrossover-Mutanten von* orfX*, WT= Wildtyp, M = Marker)*

Je Konjugation und Platte wurden ca. 3-5 Exkonjuganten erhalten. Bei *orfX* mussten 26 Exkonjuganten analysiert werden, um zwei zu finden, deren PCR-Produkt der erwarteten Länge entsprach, bei *orfV* waren drei von 14 analysierten Klonen korrekt. Alle PCR-Produkte der richtigen Größe konnten durch Kontrollsequenzierung bestätigt werden.

3.3.2 Doppelcrossover-Mutanten durch λ-Red vermittelte Rekombination

Um eine verlässliche Aussage über die Auswirkungen des Fehlens eines Gens und damit des Genproduktes zu erhalten, ist eine Deletion *in frame* (d.h. ohne Verschiebung des Leserahmens) die Methode der Wahl. So wird die Transkription der übrigen Gene nicht gestört und das Fehlen eines einzigen Proteins kann untersucht werden. In dieser Arbeit wurden die von Gust *et al.*[96,97] beschriebenen Protokolle zur λ-Red vermittelten PCR-Mutagenisierung befolgt: In den meisten Bakterien wird lineare DNA durch die intrazelluläre *recBCD* Exonuklease abgebaut. Mit dem λ-Red-System kann dieses System umgangen und eine hohe Rekombinationsrate mit linearer DNA erreicht werden. Hierfür wird ein System von drei Genen aus dem λ-Phagen, RED (*gam*, *bet*, *exo*) verwendet. Datsenko und Wanner haben sich dieses System im Jahr 2000 als erste zu Nutze gemacht: 40 verschiedene *E. coli*-Gene wurden in wenigen Schritten gegen eine selektierbare Kassette ausgetauscht.[98] Im Jahr 2003 wurde in einer Publikation von Gust *et al.* erstmals die Anwendung der λ-Red vermittelten Rekombination auf Streptomyceten beschrieben.[77] Heute steht eine Vielfalt an Resistenzkassetten mit verschiedenen zusätzlichen Funktionen zur Verfügung (s. http://recombineering.ncifcrf.gov/).[77,96] Auch die Insertion von DNA-Fragmenten ist mit dieser Technik mit wesentlich weniger Aufwand möglich als mit herkömmlichen Klonierungsmethoden.

3.3.2.1 Gewinnung von Doppelcrossover-Mutanten

Die Resistenzkassette wird mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer um jeweils mindestens 39 nt verlängert werden (Abbildung 45). Diese Verlängerungen sind homolog zu den Rändern der Sequenz, die ausgetauscht werden soll und liegen genau so, dass die Deletion *in frame* erfolgt (d.h. dass die Primerverlängerungen durch drei teilbar sein müssen und im Leseraster liegen, Abbildung 48). Üblicherweise werden die Primer so gewählt, dass das Start- und Stopcodon des jeweiligen Gens erhalten bleibt. Anschließend wird ein *E. coli*-Stamm, der ein Cosmid mit dem Gencluster sowie auf einem zusätzlichen Plasmid die Gene *gam*, *bet* und *exo* enthält, mit dem linearen PCR-Produkt transformiert und nach der Resistenz-Kassette selektiert. Das Ergebnis ist ein Cosmid, dessen Zielgen mit der Resistenzkassette ausgetauscht wurde (Abbildung 46). Für die Mutagenisierung von *Streptomyces coelicolor* entwickelten Gust *et al.* eine Strategie, bei der zuerst ein Cosmid mit der λ-Red-Methode verändert wird, um es anschließend mittels Sporenkonjugation in den Streptomyceten zu bringen. Die langen homologen Bereiche zwischen Cosmid und Genom führen dazu, dass eine spontane homologe Rekombination mit hoher Wahrscheinlichkeit auftreten kann (Abbildung 47).

Abbildung 45: Die auf einem Plasmid befindliche Kassette wird mit verlängerten Primern amplifiziert.

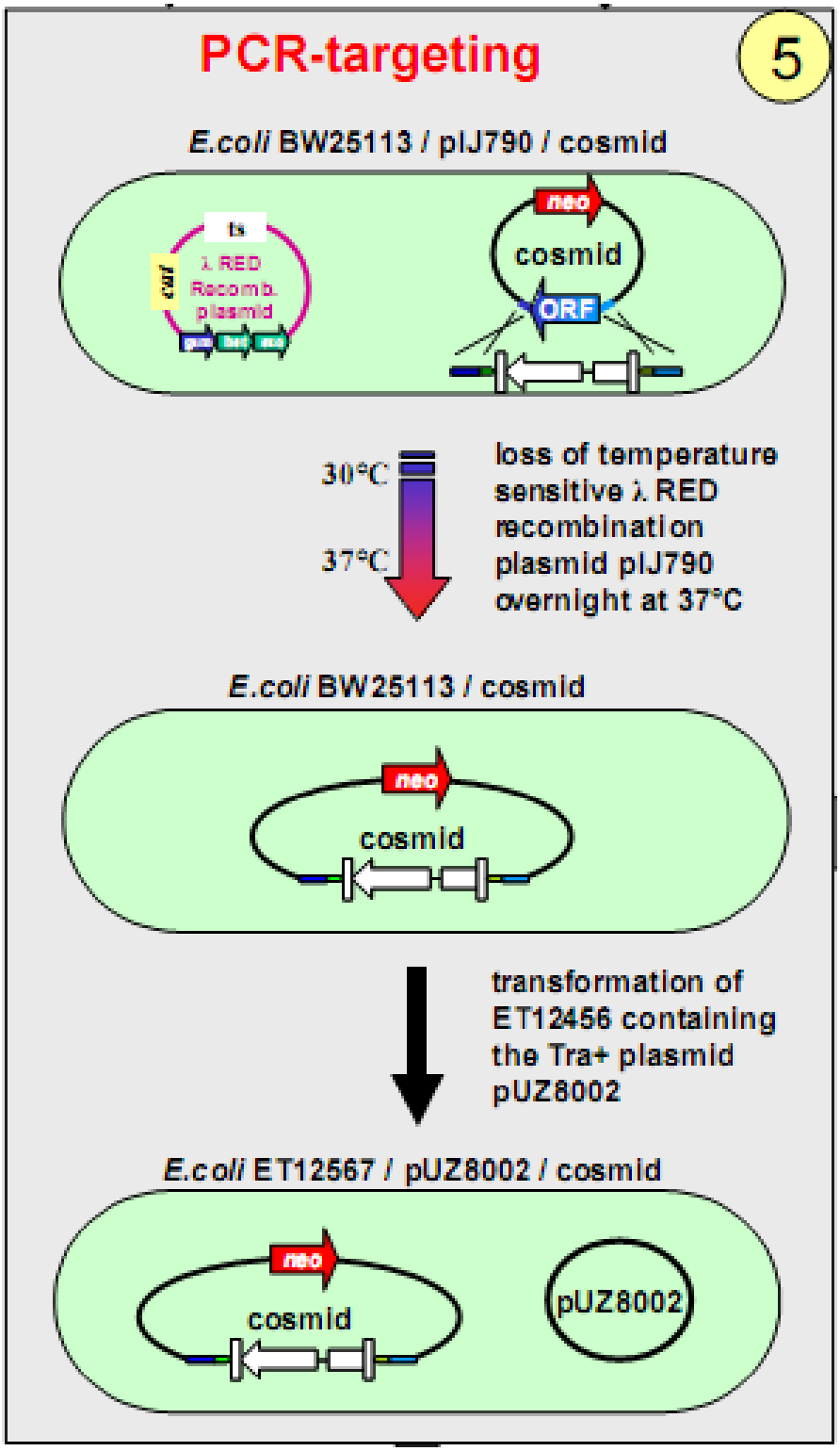


Abbildung 46: Das Zielcosmid wird in E. coli *BW 25113 mit dem Plasmid pIJ790 gebracht, welches die Gene gam, bet und exo enthält. Durch Elektroporation wird anschließend ein lineares PCR-Produkt eingebracht, welches über homologe Bereiche und mit Hilfe von gam, bet und exo in das Cosmid integrieren kann und somit das Zielgen durch eine Resistenzkassette ersetzt. Schließlich kann das mutagenisierte Cosmid in den E. coli Stamm ET12567 / pUZ8002 gebracht werden, mit dem eine Konjugation mit Actinomyceten in der Regel möglich ist. In dieser Arbeit wurde zuerst die Kassette mittels Restriktionsverdau und Religation entfernt, erst anschließend erfolgte die Konjugation mit Verrucosispora AB-18-032. Schema nach Gust et al.*[97]

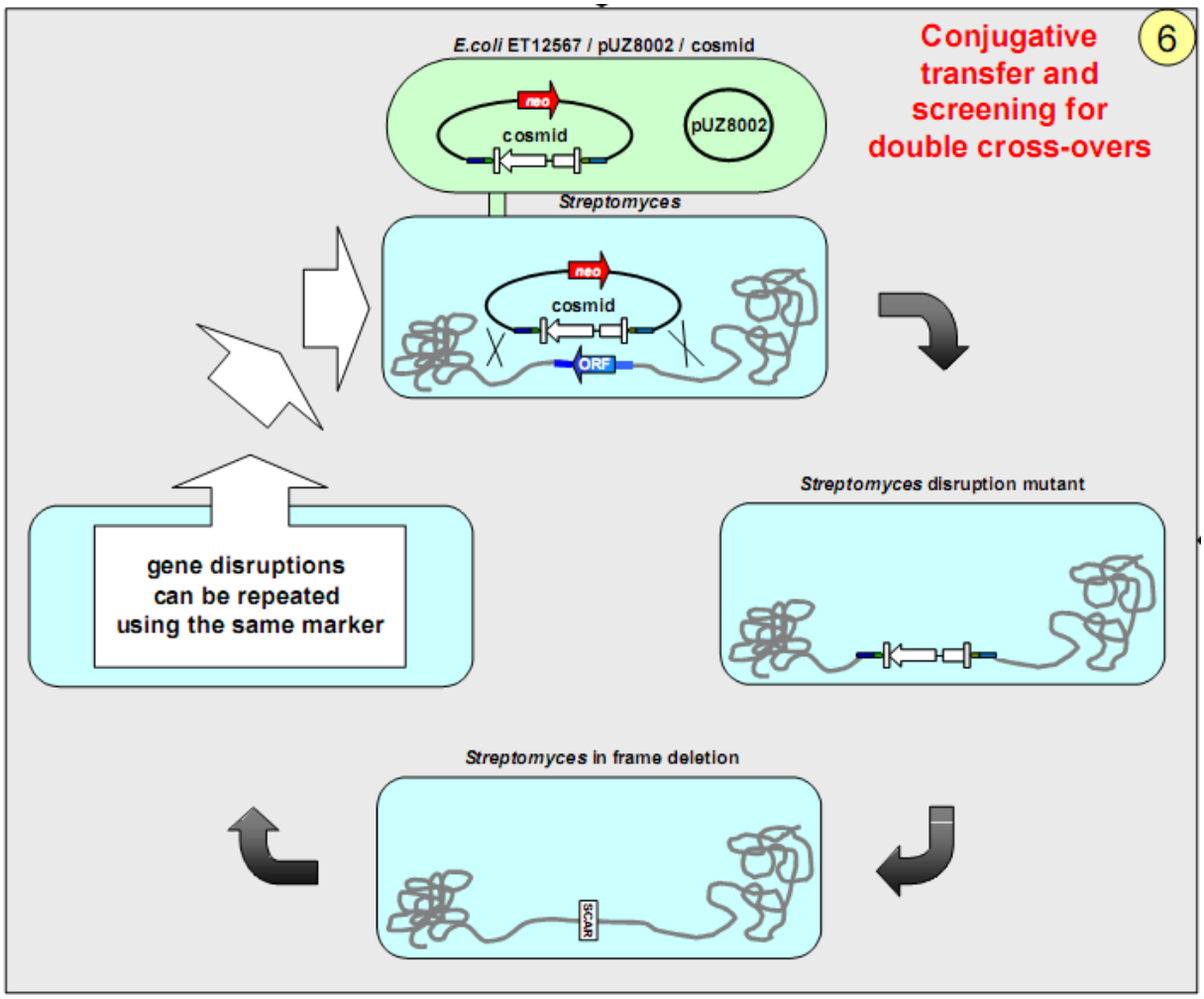


Abbildung 47: Das mutagenisierte Cosmid wird durch Konjugation mithilfe des Plasmids pUZ8002 in den Actinomyceten/Streptomyceten gebracht. Dort findet ein Doppelcrossover statt, der mittels Resistenzkassette selektiert wird. Alternativ kann die Konjugation mit dem Cosmid mit Narbe durchgeführt werden (1. Selektion nach dem Cosmid-Rückgrat, 2. Selektion nach Verlust des Cosmid-Rückgrats). Grafik nach Gust et al.[97]

Entweder wird zuerst nach der Resistenz selektiert, die im Cosmid-Rückgrat kodiert ist und erst in einem zweiten Schritt nach der Kassette, gegen die das Gen ausgetauscht wurde- oder die Selektion der Doppelcrossover-Klone erfolgt in einem Schritt mit der in der Kassette kodierten Resistenz. Um sicher zu gehen, dass die Resistenzkassette keinen Einfluss auf die Transkription der nachfolgenden (*down stream*) Gene hat, kann die Kassette vor dem Transfer in den Streptomyceten ausgeschnitten werden. Hierfür stehen zwei Methoden zur Verfügung: Das FLP-Rekombinase-vermittelte Ausschneiden der Kassette zwischen zwei FRT-Sites (*FLP recognition targets*) oder das Ausschneiden durch Restriktionsverdau und anschließender Religation des Cosmids. In dieser Arbeit wurde nur das Ausschneiden mittels Restriktionsenzym und anschließender Religation durchgeführt (Abbildung 48).

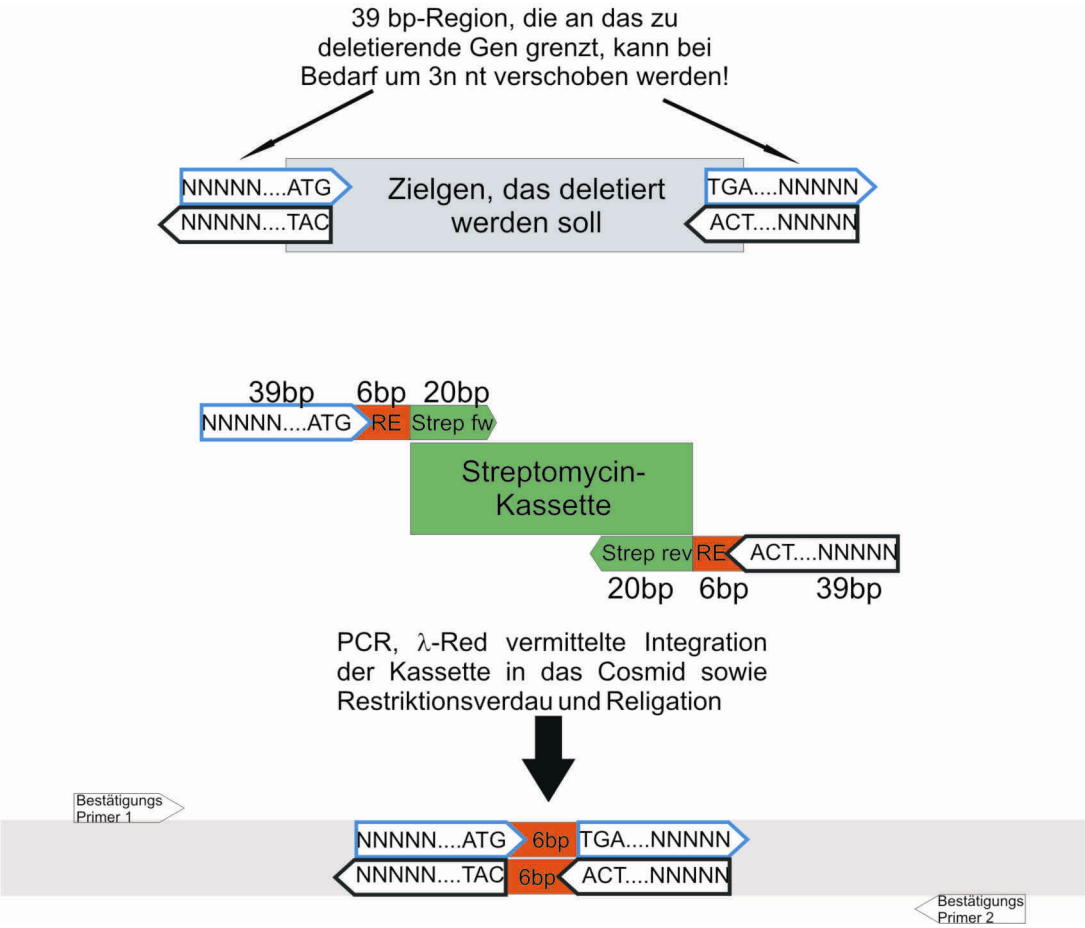


Abbildung 48: Schema zum Primerdesign (modifiziert nach Gust et al.):[77] Aus der Umgebung des zu deletierenden Gens wird eine Sequenz von 39 Nukleotiden ausgewählt. Üblicherweise sind das Start- und das Stopcodon in diesen Primern enthalten, die 39nt Sequenz kann in 3n nt-Schritten verschoben werden. Die 39nt-langen homologen Bereiche werden um 6nt-lange Restriktionsschnittstellen und die Primer für die Amplifikation der Streptomycin-Kassette ergänzt. Nach λ-Red vermittelter Integration der Resistenzkassette in das Cosmid kann die Kassette durch Restriktionsverdau und Religation entfernt werden. Die Bestätigung der erfolgreichen Insertion bzw. Entfernung der Kassette erfolgt durch Kolonie-PCR mit Bestätigungsprimern 1+2, welche ca. 100bp rechts und links von der Insertionsstelle liegen.

Die Entwicklung von Gust ist optimiert für die Verwendung des Cosmid-Vektors Supercos-1, der in der allgemein zugänglichen Cosmidbank von *Streptomyces coelicolor* verwendet wurde.[99] Es wurden mehrere Kassetten entwickelt, die Resistenzgene enthalten, die sowohl in *E. coli* als auch in Actinomyceten selektierbar sind. Darüber hinaus enthalten sie meist einen *oriT* sowie FRT-sites. Da der für die Herstellung der *Verrucosispora*-Genbank verwendete Vektor pOJ436 bereits einen *oriT* enthält, wurden die Primer in diesem Projekt abweichend von den von Gust *et al.* vorgegebenen Sequenzen gewählt (Abbildung 49) und beinhalten nur das Streptomycin-Resistenzgen und den zugehörigen Promoter. Dieser Promoter ist identisch mit dem Promoter für die Apramycin-Resistenz auf dem Cosmid-Rückgrat; es kam aber zu keinen Problemen durch falsche Rekombination bei der Gewinnung von Mutanten. Zusätzlich wurde zwischen Streptomycin-Primer und der 39nt-langen Gen-spezifischen homologen Region

eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, um ein Ausschneiden der Kassette zu ermöglichen. Idealerweise wird eine Kombination aus zwei Restriktionsenzymen gewählt, die kompatible Enden erzeugen, sodass die DNA nach der Ligation nicht mehr von den ursprünglichen Enzymen verdaut werden kann. Dies ermöglicht das Entfernen mehrerer Gene nach einander pro Cosmid. Bei Cosmid C49 (*orfX* bis *abyA4*) war es nicht möglich, aus den zugänglichen Restriktionsenzymen eine geeignete Kombination zu finden, daher wurde NdeI eingesetzt. Für die Cosmide C17 (*abyC*) und C45 (*abyD*, *abyE*) konnte eine Kombination aus NheI und XmaJI verwendet werden.

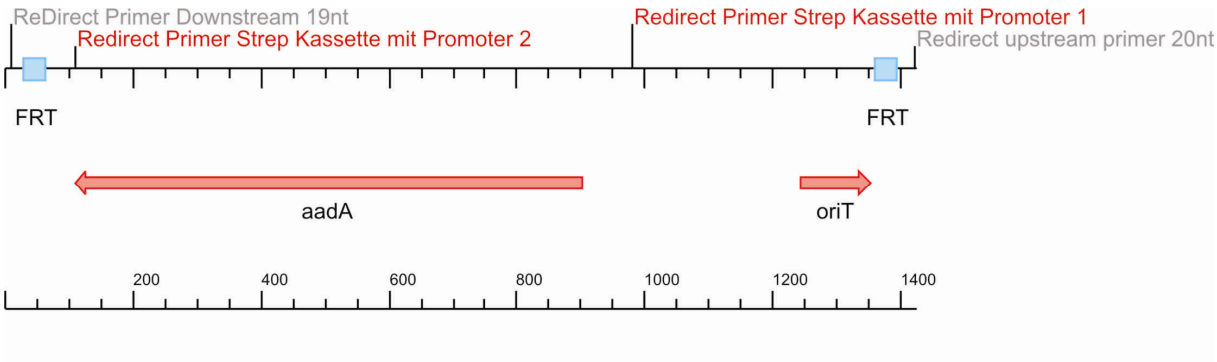


Abbildung 49: Kassette für die Mutagenisierung von pOJ436: aus dem Vektor pIJ778 mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten (1425bp). Die von Gust vorgegebenen Primer sind in grau angedeutet. In rot sind die hier verwendeten Primer eingezeichnet.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des Cosmid-Vektors pOJ436[78] stellte sich nach den ersten Experimenten heraus: pOJ436 enthält eine ΦC31 Integrase (*int*) und eine ΦC31 *attachment site* (*attP*), mit der das Cosmid in Stämmen, die eine entsprechende Sequenz im Genom (*attB*) besitzen, integrieren kann. Von *Verrucosispora* AB-18-032 war durch Vorversuche bekannt, dass es *attB* besitzt, allerdings war nicht klar, wie effizient die Integration an dieser Stelle ist. In einer Publikation aus dem Jahr 1994 war beschrieben worden, dass die Effizienz der Homologen Rekombination unter der Verwendung von pOJ436 und dem Actinomyceten *Saccharopolyspora spinosa* bei Sequenzen von ca. 30kb sehr hoch ist (10^{-4} Exkonjuganten pro Rezipientenzelle), während die ΦC31-Integration desselben Vektors mit ca. 2kb homologer Sequenz nur ca. 10^{-7} Exkonjuganten pro Rezipientenzelle ergab.[100] Dies ließ vermuten, dass die langen homologen Bereiche des Cosmids eine Homologe Rekombination zum bevorzugten Vorgang machen. Allerdings konnte bei *Verrucosispora* AB-18-032 selbst bei langen (ca. 30kb) homologen Bereichen kein einziger Exkonjugant gefunden werden, der den Vektor wieder verloren hätte (d. h. nach dreifachem Ausstreichen auf Agar ohne Antibiotikum waren diese Klone immer noch Apramycin-resistent). Nach der Entfernung der Integrase und der *attachment site (attP)* war die Häufigkeit der Exkonjuganten, die nach drei Passagen ohne Antibiotikum Apramycin-resistent waren, teilweise (je nach Gen) sehr hoch (> 50 %). Dies zeigt, dass bei *Verrucosispora* AB-18-032 die Integration mittels ΦC31 *attachment site* in direkter Konkurrenz zur Homologen Rekombination mittels langer homologer Bereiche wesentlich effizienter ist. Für die *ReDirect*-Methode ist daher unbedingt ein Cosmid ohne ΦC31 Integrase und *attP* notwendig. Nach dem Ersetzen der je-

weiligen Gene und dem Ausschneiden der Kassette wurde mittels λ-Red vermittelter Mutagenese die ΦC31-Integrase sowie die *attachment site* mit einer Streptomycinkassette ersetzt. Schließlich wurden die Cosmide via Sporenkonjugation (s. Abschnitt 3.1.4.3) in *Verrucosispora* AB-18-32 eingebracht.

Tabelle 18: Lange ReDirect Primer für die PCR-Mutagenisierung; ***FETT*** *sind die Primer für die Amplifikation der Kassette,* ***UNTERSTRICHEN*** *sind die zusätzlich eingeführten Restriktionsschnittstellen.**

abyI Red up	GCAATGCGCTACGAATTACTCGGACCACTACGACTGGTG**CATATGCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyI Red down	GCCTGCCCTTCAGCAGGCTTGGGCTACCTCCCGCCGCCG**CATATGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyA1 Red up	CCGCCTCACGCCGACCCCCTCGGGAGGACTGCAATGACC**CATATGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyA1 Red down	ACCCGGTGGCGGACGGGGCCGCGGCACCCGCCGTCACAG**CATATGCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyA2 Red up	GATCAAGTCGGGCTTCGCGTTGGAGGGCCTGTGACGGCG**CATATGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyA2 Red down	GGGTGACGAAGTCGTGGACGGATCGCAGGGTGCTCACGG**CATATGCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyA3 Red up	GTTGACCGGCTCCTGGCCCCCCGGAGGAACCCCGTGAGC**CATATGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyA3 Red down	GCCGGCGCTCGCGGGCGACGGGGGAGACGCTGGTCACCG**CATATGCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyA4 Red up	CCTGGGCGGGATCTACGCGACGGCGGTGGATCGGTGACC**CATATGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyA4 Red down	GGACGTACTGCTTCAGCTCTGCGACGTCGTTGCTCATGC**CATATGCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyC Red up	ACCAGCCCCGGCCGGGTCGGCGCGGCCCGCCGGGGCTCA**CCTAGGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyC Red down	AGTTCAGTTCGGCGCACTGCACGGTAACATGGCCGAATG**GCTAGCCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyD Red up	TCTATCGAACCGGCCCGACAAAAACCGGAGACGGCCATG**CCTAGGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyD Red down	CTCGGGGGCGCCGACCGGCCCCGGGTTTGGGGGTCGTCA**GCTAGCCTTATTTGCCGACTACCTTG**
abyE Red up	AGTCGACCGGCCCCGTACCCACCCAGAGAGGCCCCGATG**CCTAGGTATCACCACCGACTATTTGC**
abyE Red down	GCGCCTAAAGCTGGCCTAAACCCGCAGGTCGCGCGCCTA**GCTAGCCTTATTTGCCGACTACCTTG**
*ΦC31*Integr up	CTGGGTGGGTTACACGACGCCCCTCTATGGCCCGTACTG**TATCACCACCGACTATTTGC**
*ΦC31*Integr down	CCGTCTCAGCGCCTAACAGGCTTCCCGGGTGTCTCGCTA**CTTATTTGCCGACTACCTTG**

*Restriktionsschnittstellen: CATATG… NdeI CCTAGG… XmaJI GCTAGC… NheI

3.3.2.2 Vorbereitung des Templats und *ReDirect*-PCR

pIJ778 wurde mit EcoRI und HindIII verdaut und zweimal aus dem Gel aufgereinigt (mit dem *QiaexII Gel Extraction Kit*, Qiagen), um zu verhindern, dass die Transformation mit dem zirkulären Plasmid pIJ778 aus der PCR-Reaktion zu falsch-positiven Streptomycin-resistenten Klonen führt. Die PCR wurde mit unten angegebenem Ansatz (Tabelle 20, je Primerpaar 2x50 µl) und Thermocycler-Programm durchgeführt (Primer s. Tabelle 18). Anschließend folgte die Kontrolle der PCR im Agarosegel und Aufreinigung des PCR-Produktes, 100 µl PCR-Reaktion wurden auf ein Säulchen aufgetragen und mit 12 µl Tris/HCl pH8,5 eluiert. *E. coli* BW25113/pIJ790 wurden mit Kanamycin (pIJ790) bei 30° C angezogen (pIJ790 hat ein temperaturempfindliches Replikationssystem und wird bei

37° C verloren) und mit den Cosmiden C17, C45 und C49 mittels Elektroporation transformiert (s. Abschnitt 3.1.4.2).

Tabelle 19: ReDirect PCR mit langen Primern: PCR-Programm

94° C, 2 min		
94° C, 45 s	⎫	
49° C, 45 s	⎬	10x
72° C, 90 s	⎭	
94° C, 45 s	⎫	
54° C, 45 s	⎬	20x
72° C, 90 s	⎭	
72° C, 5 min		

Tabelle 20: ReDirect PCR mit langen Primern: PCR-Ansatz

0,7 µl pIJ778, EcoRI/HindIII verdaut und gereinigt
5 µl 10xPuffer
1 µl dNTP-Mix
10 µl GC RICH
1,5 µl Primer Mix (je 10ng/µl)
0,5 µl PWO Polymerase (2,5u)
31,3 µl H_2O

3.3.2.3 Mutagenisierung

E. coli BW25113/pIJ790/Cosmid wurden in einer Übernachtkultur mit SOB-Medium (+ Kanamycin) angezogen und anschließend in SOB-Medium (mit 10 mM L-Arabinose um die λ-Red-Gene gam, bet und exo zu induzieren) einige Stunden bei 30° C und 200 Upm geschüttelt. Bei Erreichen der OD600=0,4 wurden die Zellen für eine Elektroporation vorbereitet, mit 1 µl PCR-Produkt gemischt und wie angegeben elektroporiert. Die Zellen wurden mit eiskaltem SOC-Medium gemischt und ca. eine Stunde bei 30° C geschüttelt, anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit Apramycin und Streptomycin ausgestrichen und über Nacht bei 30° C inkubiert. Die am nächsten Tag vorhandenen, großen Kolonien wurden direkt in einer Bestätigungs-Kolonie-PCR eingesetzt (die Primer liegen jeweils ca. 100nt rechts und links des Gens), Tabelle 23 bis Tabelle 25. Typischerweise gab es nach der λ-Red-Mutagenisierung zwei bis fünf Kolonien, selten zehn und mehr. Das Mischen mehrerer Elektroporationsansätze hat sich nicht bewährt, anscheinend inhibiert die Vielzahl zerstörter Zellen das Wachstum. Es sollten nur große Kolonien gepickt werden, die kleinen Kolonien sind üblicherweise falsch positiv.

Etwa die Hälfte der Klone war üblicherweise mutagenisiert (Abbildung 50). Mutagenisierte Klone wurden in Flüssigmedium angezogen (LB- oder TY-Medium, Streptomycin) und die Cosmide isoliert.

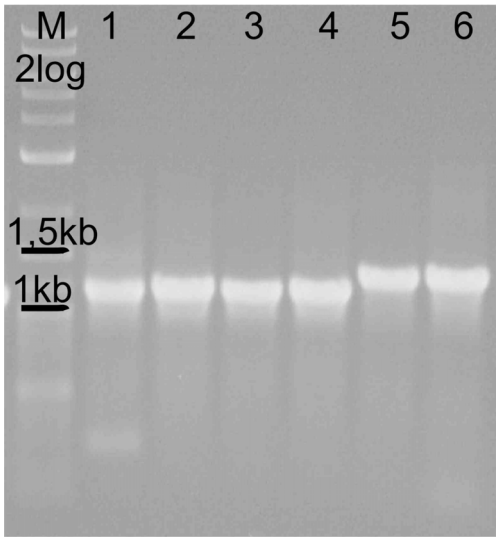


Abbildung 50: Ergebnis der Mutagenisierung mit abyA2*Red-PCR-Produkt. Klone 1-4 entsprechen der Mutante (1178), Klon 5 und 6 entsprechen dem Wildtyp (1288).*

3.3.2.4 Entfernung der Kassette

Anschließend folgte der Restriktionsverdau mit NdeI (*abyH-abyA4*) oder NheI/XmaJI (*abyC-abyF1*) für 3 h bei 37° C (Tabelle 21). Danach wurden die Restriktionsenzyme durch 20-minütige Inkubation bei 65° C (NheI) bzw. 80° C (NdeI/XmaJI) deaktiviert, die DNA gefällt und in 52 µl H_2O aufgenommen und bei 4° C für zwei bis sieben Tage religiert (Tabelle 22). Der Ligationsansatz wurde mit 600 µl *n*-Butanol gemischt, und 30 min bei 4° C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 16.000 Upm) und Waschen mit 300 µl 70 %-igem Ethanol wurde die DNA in 5-10 µl H_2O gelöst und in einer Transformation eingesetzt (in *E. coli* DH5α) und auf LB- oder TY-Agar mit Apramycin ausgestrichen. Nach gleichzeitigem Ausstreichen auf Streptomycin- und Apramycin-Platten wurden jene Klone herausgesucht, die Apramycin-resistent, aber Streptomycin-sensitiv waren (Apra^r Strep^s, also das Cosmid enthalten, aber keine Streptomycin-Kassette) und mittels Kolonie-PCR untersucht (Primer: Bestätigungsprimer Tabelle 23).

Tabelle 21: Restriktionsverdau CosmidΔGen

30 µl Cosmid (Strep^r, Apra^r, von 50 µl aus 1,5 ml Kultur) 55 µl H_2O	
10 µl Puffer O	10 µl Puffer Tango
5 µl NdeI (Fermentas)	5 µl NheI, 5 µl XmaJI

Tabelle 22: Religation des verdauten Cosmids

52 µl Verdau
6 µl T4-Ligase-Puffer
2 µl Ligase

3.3.2.5 Entfernung der ΦC31-Integrase und der *attB*-Integrations-Stelle

Die bestätigten ΔΔCosmide (Apra^r Strep^s) wurden isoliert und mittels Elektroporation in *E. coli* BW25113/pIJ790 gebracht. Mit einem PCR-Produkt, das mit Primern für die Streptomycin-Kassette gewonnen wurde und dessen Ränder homolog zu der Umgebung der ΦC31-Integrase und der ΦC31-*attachment site attP* waren, wurden diese Cosmide erneut mutagenisiert. Den bestätigten ΔΦC31/ΔΔCosmiden (Bestätigungs-PCR Tabelle 23, Tabelle 24 und Tabelle 25) fehlt die Fähigkeit, mittels *attB*/*attP* spezifischer Rekombination in das Genom von *Verrucosispora* zu integrieren. Sie wurden mittels Elektroporation in *E. coli* ET12567/pUZ8002 gebracht und für die Konjugation mit *Verrucosispora*-Sporen vorbereitet. Die Platten wurden nach ca. 16 h mit NB-Weichagar mit 10 µl Apramycin (100 mg/ml) und 10 µl Nalidixinsäure (25 mg/ml) überschichtet. Nach 5-6 Tagen wurden sichtbare Klone gepickt und auf SGG-Agar mit Nalidixinsäure und Apramycin ausgestrichen. Diese Apramycin-resistenten Klone wurden dreimal hintereinander auf SGG-Agar mit Nalidixinsäure ausgestrichen und beim dritten Mal ca. 7-10 Tage inkubiert, bis die Kolonien braun wurden, was das Vorhandensein von Sporen anzeigt. Die Sporen wurden in einer Verdünnungsreihe auf frischem SGG-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen und sobald Klone sichtbar waren, wurden diese gleichzeitig auf SGG-Apra- und reinem SGG-Agar ausgestrichen. Nach wenigen Tagen konnten Apramycin-sensitive Klone identifiziert und mittels Kolonie-PCR untersucht werden. Für jeden Gen-Knockout wurden mehrere Exkonjuganten analysiert, schließlich wurde für drei verschiedene Exkonjuganten je Gen eine Produktionskontrolle durchgeführt.
Die einzige Ausnahme hierbei ist Δ*abyA2*: die Gewinnung von Doppelcrossover-Mutanten bei *abyA2* erwies sich als sehr schwierig; acht Exkonjuganten wurden jeweils dreimal auf SGG-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen, nur ein einziger Exkonjugant lieferte die gewünschte Doppelcrossover-Mutante. Da zu diesem Zeitpunkt bereits klar war (durch vergleichbare Experimente anderer Arbeitsgruppen, s. Abschnitt 4.2.6), dass die Aussagekraft einer reinen Knockout-Mutante von *abyA2* wahrscheinlich eher gering sein würde, wurden keine weiteren Exkonjuganten untersucht und nur zwei Klone desselben Exkonjuganten einer Produktionskontrolle unterworfen. Zur Bestätigung der Identität der Gen-Knockouts wurden die PCR-Produkte sequenziert.

Tabelle 23: Bestätigungsprimer.

abyI Best. 1	CGGCGAAATACCATCCTGAC
abyI Best. 2	ACGTGCGGACGAGTAAGTG
abyA1 Best. upstream	CCGTCCGCTCGTTCATGG
abyA1 Best. downstream	CTGCGGTACAGCTCGGACAG
abyA2 Best. upstream	GACAGCGGGCGCTGGGTGTG
abyA2 Best. downstream	CGGCCGGGAGCGAGATGGAC
abyA3 Best. upstream	CGCCGGAACACGTCCAGTTG
abyA3 Best. downstream	CGCACGGCCTCCAGGAAGAAG
abyA4 Best. upstream	CGCCACCGGGCGGTCCATCTC
abyA4 Best. downstream	GCCGGCGCGGATCCACTGTGTC
abyC Best. upstream	TGTCGCCGCTGGCGCTGTTC
abyC Best. downstream	GTCGGGCCGGTTCGATAG
abyD Best. upstream	GGTGTCGCGCTCAGTCATTC
abyD Best. downstream	GACGTCGAGGACGGATAC
abyE Best. upstream	ACGCCCGCAGCCCGTCACCC
abyE Best. downstream	CGCGGTGGCGGCGACCAGGAG
ΦC31 Best. upstream	CGCCCACTGCCTTCAGAC
ΦC31 Best. downstream	CCGCTGTGCTGTGGTGAC

Tabelle 24: PCR-Ansatz für die Bestätigungs-PCR.

0-3 µl Templat
2 µl 10xPuffer
0,4 µl dNTP (10 mM je Nukleotid)
4 µl Q-Solution
2 µl Primer-Mix (10nM je Primer)
0,1 µl Qiagen Taq Polymerase (0,5u)
8,5-11,5 µl H_2O

Tabelle 25: Thermocycler-Gradient (ELV01) für Bestätigungs-PCR.

94° C, 10 min	
94° C, 1 min 30 s	30x
57+-9° C, 55 s	
72° C, 2 min 30 s	
72° C, 5 min	

Tabelle 26: Programm ELV01 – Bestätigungs-PCR ReDirect, Annealing-Temperaturen für die einzelnen Gene.

Gen	Well	*Annealing* – Temperatur	Gen	Well	*Annealing* – Temperatur
abyH	5	54,6° C	abyA4	11	64,3° C
abyI	1	48,0° C	abyA5	4	53,0° C
abyK	8	59,4° C	abyC	5	54,6° C
abyA1	6	56,2° C	abyD	1	48,0° C
abyA2	9	61,0° C	abyE	12	66,0° C
abyA3	7	57,8° C	ΦC31	8	60,0° C

Tabelle 27: Größe der Bestätigungs-PCR-Produkte.

Gen	Start Gen [bp]	Ende Gen [bp]	Länge Gen [bp]	Bestätigungs-primer 1 [bp]	Bestätigungs-primer 2 [bp]	Länge Best.-PCR WT [bp]	Ort der *ReDi-rect* Primer 1|2 [bp]		Differenz Red-Primer [bp]	Länge Kassette (Δ) Best. PCR [bp]	Länge Narbe (ΔΔ) Best. PCR [bp]
abyH	867	3536	2670	734	3680	2946	869	3540	1180	2671	281
abyI	3892	4650	759	3760	4836	1076	3927	4621	1287	694	388
abyK	5118	6857	1740	4623	7023	2400	4690	6856	1139	2166	240
abyA1	7061	8086	1026	6868	8156	1288	7067	8082	1178	1015	279
abyA2	8083	9951	1869	8013	10131	2118	8092	9947	1168	1855	269
abyA3	9948	10184	237	9899	10245	346	9954	10180	1025	226	126
abyA4	10181	10936	756	10100	11076	976	10187	10932	1136	745	237
abyA5	10933	12000	1068	10837	12083	1246	10939	11996	1094	1057	195
abyC	43400	44092	693	43249	44158	909	43402	44090	1126	688	227
abyD	44176	45603	1428	44075	45709	1634	44181	45604	1116	1423	217
abyE	45674	46681	1008	45549	46825	1276	45679	46682	1178	1003	279

Tabelle 28: Größe der Bestätigungs-PCR-Produkte, Übersichtstabelle.

Gen	Länge Best.-PCR WT [bp]	Länge Best. -PCR Kassette (Δ) [bp]	Länge Best.- PCR Narbe (ΔΔ) [bp]
abyH	2946	1180	281
abyI	1076	1287	388
abyK	2400	1139	240
abyA1	1288	1178	279
abyA2	2118	1168	269
abyA3	346	1025	126
abyA4	976	1136	237
abyA5	1246	1094	195
abyC	909	1126	227
abyD	1634	1116	217
abyE	1276	1178	279

3.3.2.6 Bestätigung von Doppelcrossover-Mutanten

Zur Bestätigung der einzelnen Schritte bis zur Doppelcrossover-Mutante wurde jeweils eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dies ist in den Abbildung 51 bis Abbildung 56 gezeigt: als Templat für die PCR-Produkte dienten *E. coli*-Kolonien, die das Cosmid auf unterschiedlichen Stufen enthalten (Wildtyp (WT), Gen ersetzt durch Kassette (Δ*Gen*), Gen ausgeschnitten (ΔΔ*Gen*) und nach der Entfernung der Integrase sowie der ΦC31-*attachment*-site (ΔΦC31)).
In den Abbildung 57Abbildung 60 sind die Bestätigungs-Amplifikate der Doppelcrossover-Mutanten zu sehen. Hier wurde ein Zellaufschluss von *Verrucosispora* AB-18-032 (s. Abschnitt 3.1.5.5) als Templat eingesetzt. In manchen Fällen war die Gewinnung eines PCR-Produkts aus einem Kolonie-Aufschluss schwierig, dies galt besonders für Wildtyp-Gene, die wesentlich länger als die Narben sind. Daher sind in Abbildung 58 noch einmal verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen mit genomischer DNA des Wildtyps V*errucosispora* AB-18-032 als Templat gezeigt.

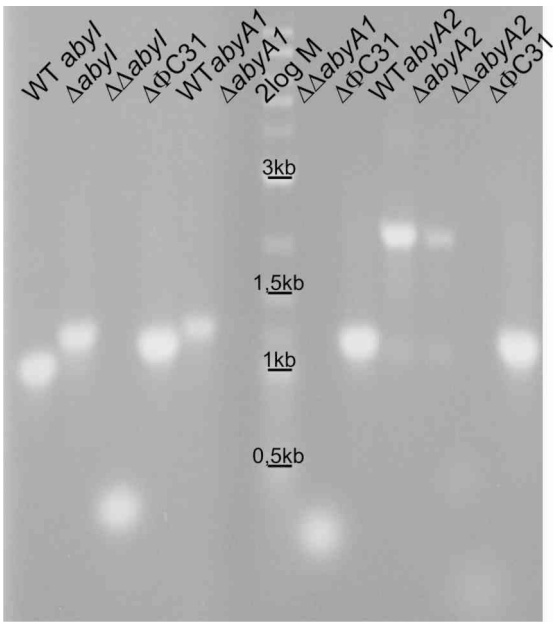


Abbildung 51: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen für die Gene abyI, abyA1 und abyA2; WT=Wildtyp Cosmid; ΔGen = Gen wurde gegen Streptomycin-Kassette ausgetauscht; ΔΔGen = Deletion mit 6p-Narbe; ΔΦC31 = ΦC31-attachment site und Integrase wurden gegen Streptomycin-Kassette ausgetauscht (Kolonie-PCR, für erwartete PCR-Produktlängen s. Tabelle 28). Die Reaktionen ΔabyA1 und ΔΔabyA2 waren in diesem Fall nicht gelungen (was bei Kolonie-PCR hin und wieder vorkommt). ΔabyA2 war mit Wildtyp-Templat verunreinigt. Erfolgreiche PCRs dieser Mutanten sind in Abbildung 50, Abbildung 52 und Abbildung 53 zu sehen.

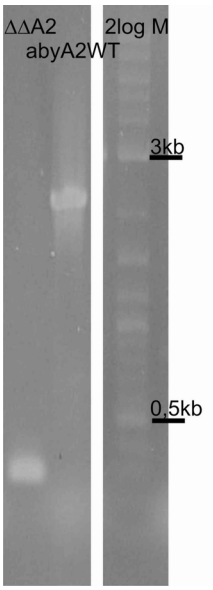


Abbildung 52: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen (Kolonie-PCR), abyA2-Wildtyp (2118bp) und ΔΔabyA2-Mutante (Deletion mit 6bp-Narbe; 269 bp).

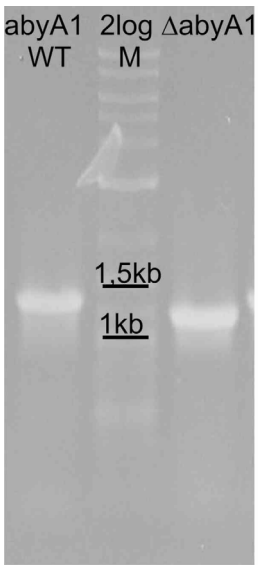


Abbildung 53: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen (Kolonie-PCR), abyA1-Wildtyp (1288bp) und ΔabyA1-Mutante (1178bp).

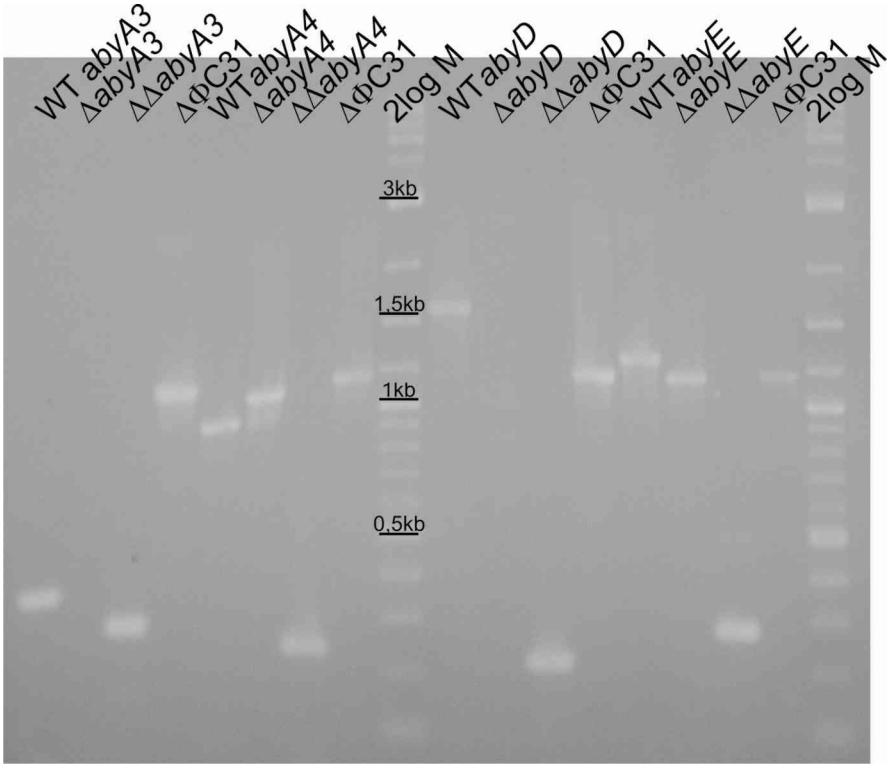


Abbildung 54: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen; WT=Wildtyp Cosmid; ΔGen = Gen wurde gegen Streptomycin-Kassette ausgetauscht; ΔΔGen = Deletion mit Narbe; ΔΦC31 = ΦC31-attachment site und Integrase wurden gegen Streptomycin-Kassette ausgetauscht. (Kolonie-PCR, für erwartete PCR-Produktlängen s. Tabelle 28). Die Reaktionen von ΔabyA3und ΔabyD haben in diesem Fall nicht funktioniert (was bei Kolonie-PCR durchaus vorkommen kann). Erfolgreiche PCRs dieser Mutanten sind in Abbildung 55 und Abbildung 56 zu sehen.

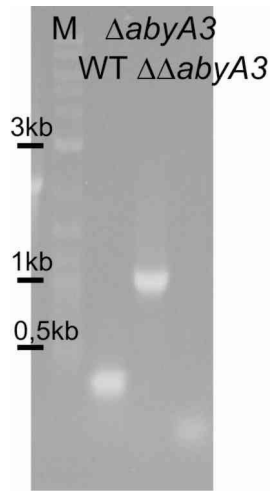


Abbildung 55: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen (Kolonie-PCR), abyA3-Wildtyp (346bp), ΔabyA3 (Strep-Kassette, 1025bp) sowie ΔΔabyA3 (Deletion mit 6bp-Narbe, 126bp). Das Bestätigungs-PCR-Produkt von ΔΔabyA3 ist bei längeren Gellaufzeiten eher schlecht zu erkennen.

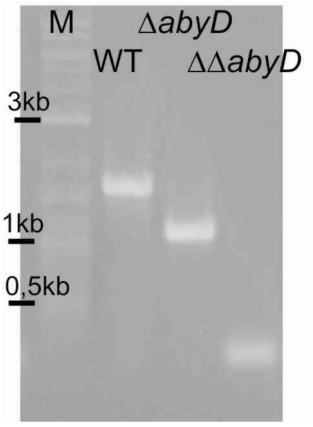


Abbildung 56: Bestätigungs-PCR mit E. coli-Klonen (Kolonie-PCR), abyD-Wildtyp (1634bp), ΔabyD (Strep-Kassette, 1116bp) sowie ΔΔabyD (Deletion mit Narbe, 217bp).

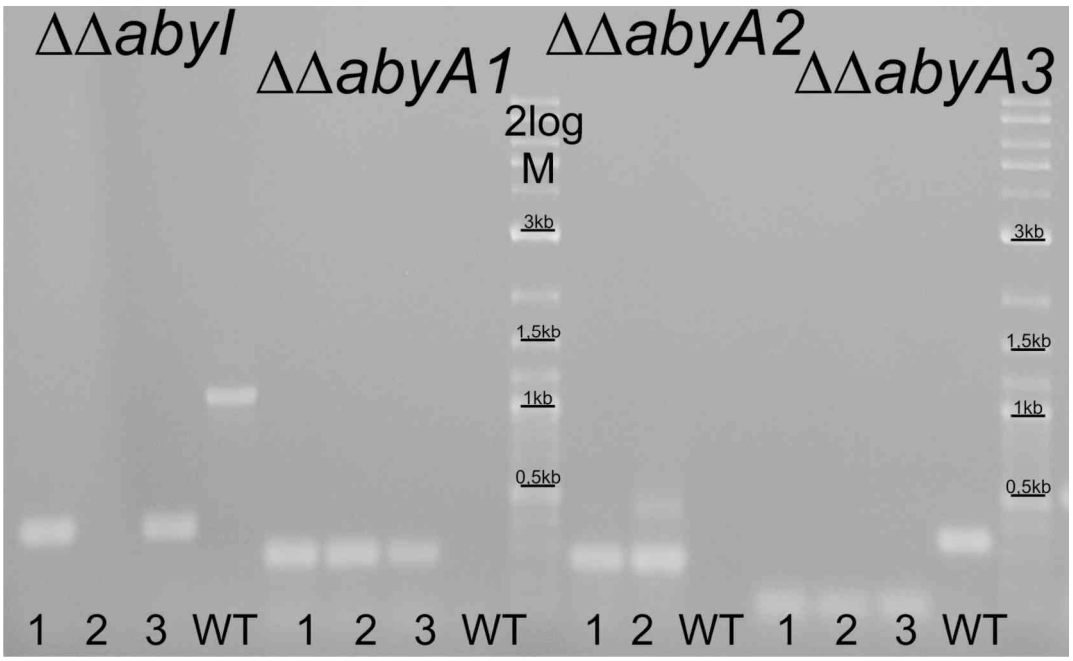


Abbildung 57: Bestätigungs-PCR mit Verrucosispora *AB-18-032-Mutanten ΔΔabyA4, ΔΔabyD und ΔΔabyE (Kolonie-PCR, für erwartete PCR-Produktlängen s.Tabelle 28). Die Reaktionen ΔabyI 2, abyA1 WT und abyA2 WT haben hier nicht zum gewünschten PCR-Produkt geführt, was bei Kolonie-PCR durchaus vorkommen kann. Erfolgreiche PCRs dieser Klone sind in den Abbildung 58 undAbbildung 59 zu sehen.*

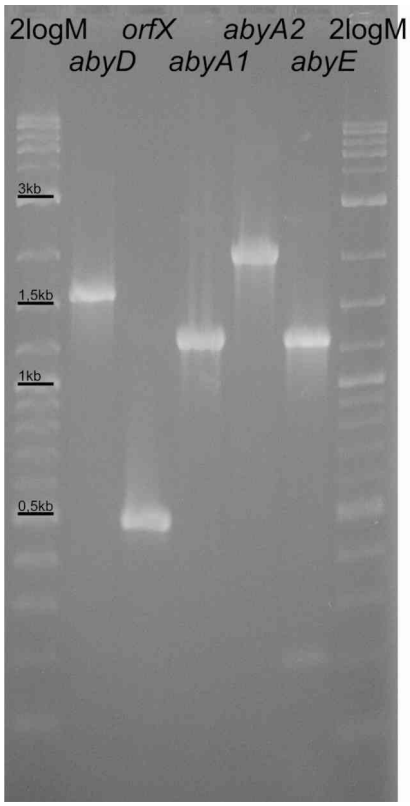


Abbildung 58: Bestätigungs-PCR mit genomischer DNA von Verrucosispora *AB-18-032 (WT).*

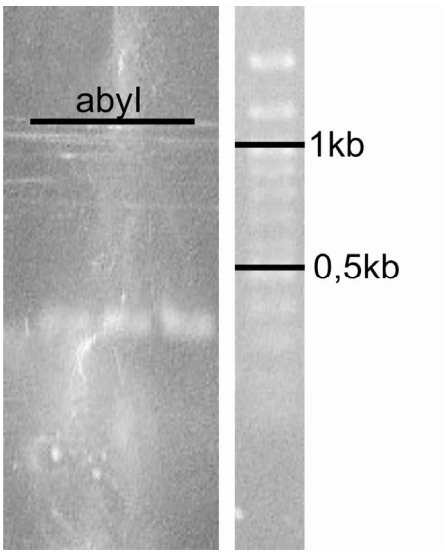


Abbildung 59: Bestätigungs-PCR mit drei der Klone der Verrucosispora *AB-18-032-Mutante ΔΔabyI (388bp, Kolonie-PCR).*

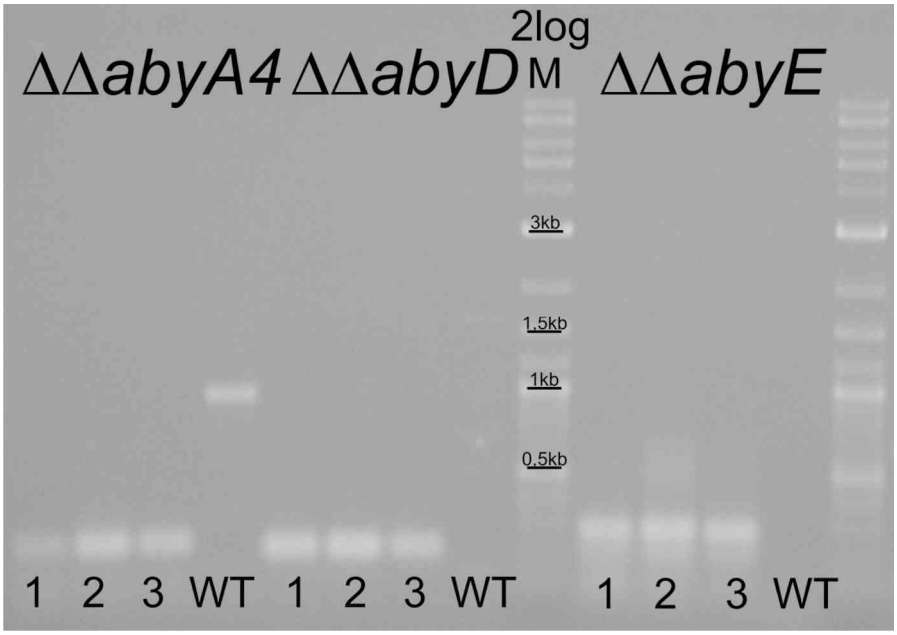


Abbildung 60: Bestätigungs-PCR mit Verrucosispora *AB-18-032-Mutanten ΔΔabyA4, ΔΔabyD und ΔΔabyE (Kolonie-PCR, für erwartete PCR-Produktlängen s.Tabelle 28). Die Reaktionen abyD WT und abyE WT haben hier nicht zum gewünschten PCR-Produkt geführt, was bei Kolonie-PCR durchaus vorkommen kann. Erfolgreiche PCRs dieser Klone sind in Abbildung 58 zu sehen.*

3.3.3 Komplementation und Überexpression mit dem Plasmid pSETermE*

Um zu zeigen, dass der Knockout eines Zielgens spezifisch die Biosynthese von Abyssomicin verhindert und der Produktionsausfall nicht durch polare Effekte verursacht wird, sollte das Gen auf einem Plasmid überexprimiert und so die Abyssomicin-Produktion wieder hergestellt werden. Außerdem sollte die Funktion der möglichen Aktivator/Repressor-Proteine LuxR und SARP getestet werden. Hierfür wurde das Plasmid pSETermE* verwendet, *ermE* ist ein konstitutiver Promoter, der für die Expression von Genen in Actinomyceten bereits erfolgreich eingesetzt wurde.[101,102] Die Gene *abyH* (LuxR), *abyI* (SARP Pathway specific activator) und *abyE* (Monooxygenase) sollten sowohl im Wildtyp als auch in der jeweiligen Mutante überexprimiert bzw. komplementiert werden.

Tabelle 29: Primer für die Amplifikation der Gene abyH (LuxR), abyI (SARP) und abyE (Monooxygenase). Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

abyI EcoRI fw	gaattctacgactggtgggcgtggac
abyI XbaI rev	tctagatcagcaggcttgggctacctc
abyH EcoRI fw	gaattctgtgctcgtgcgcgacac
abyH XbaI rev	tctagagggctcttcaggcgatgc
abyE EcoRI fw	gaattcggccccgatgaccgacacac
abyE XbaI rev	tctagacgcgcctacacggcgatg

Erwartete Produktgrößen: *abyH* 2,7kb; *abyI* 0,7kb; *abyE* 1kb. Die Gene wurden mit Cosmid-DNA als Templat, den Primern und einem Standard-PCR-Mix mit der Fehler-korrigierenden Polymerase *Herculase II* amplifiziert und in den *blunt end*-Vektor pJET2.1 kloniert (*abyH* konnte nicht mit Herculase II amplifiziert werden, vgl. Abbildung 61; hier wurde mit *Qiagen Taq* amplifiziert und die Poly-A-Überhänge anschließend mit dem FillUp-Enzym im pJET PCR Cloning Kit aufgefüllt). Anschließend wurden die Plasmide isoliert und mit XbaI/EcoRI verdaut. Der Vektor pSETermE* wurde ebenfalls mit XbaI/EcoRI verdaut, mit Antarktischer Phosphatase dephosphoryliert und schließlich mit dem Insert ligiert (da das Insert viel kleiner als pJET ist, ist die Wahrscheinlichkeit, dass beide Vektoren miteinander ligieren sehr klein und eine Aufreinigung aus dem Gel normalerweise nicht nötig) und in *E. coli* DH5α transformiert. Die hieraus isolierten Plasmide wurden (nach Kontrolle mittels PCR) in *E. coli* ET12567 transformiert und mittels Konjugation in *Verrucosispora* AB-18-032 gebracht.

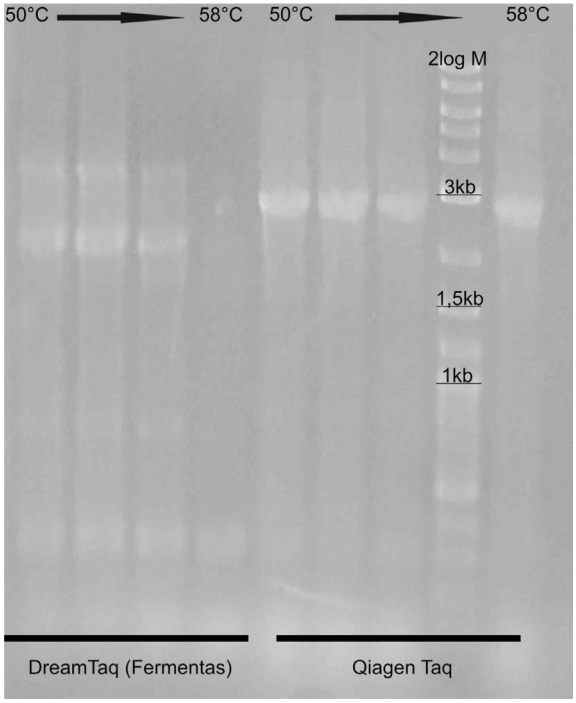


Abbildung 61: Gradienten-PCR mit abyH-Primern und Cosmid-DNA als Templat. Die PCR mit Dream Taq–Polymerase führte zu einem Produkt mit falscher Länge, Herculase II ergab gar kein Produkt (Gelbanden versehentlich abgeschnitten (rechts), da überhaupt keine Bande zu sehen war). Nur Qiagen Taq-Polymerase lieferte ein Produkt der richtigen Länge: ca. 2,7kb.

Die Expression der drei Gene *abyH*, *I* und *E* mittels pSETermE* in *Verrucosispora* AB-18-032 war nur mäßig erfolgreich. Nur in einem Fall war ein Effekt sichtbar, hier könnte es sich aber um die Verwechslung von Proben gehandelt haben (Abbildung 63). Um dies auszuschließen, müssten die Mutanten erneut fermentiert werden, nach einer genauen Analyse des Vektors war aber ein möglicher Grund klar: der Promoter *ermE*, wie er im Vektor pSET vorhanden ist, enthält keine ribosomale Bindestelle. Dies war durch unzureichende und teilweise falsche Annotierung des Vektors nicht bekannt. Ein weiterer möglicher Grund wäre, dass der Promoter für diesen Stamm nicht geeignet ist. Für zukünftige Experimente muss die ribosomale Bindestelle des Zielgens mit in das Primerdesign eingeschlossen werden. Derzeit wiederholt Joanna Krawzcyk diese Experimente mit modifizierten Primern, die die ribosomale Bindestelle der Zielgene enthalten.

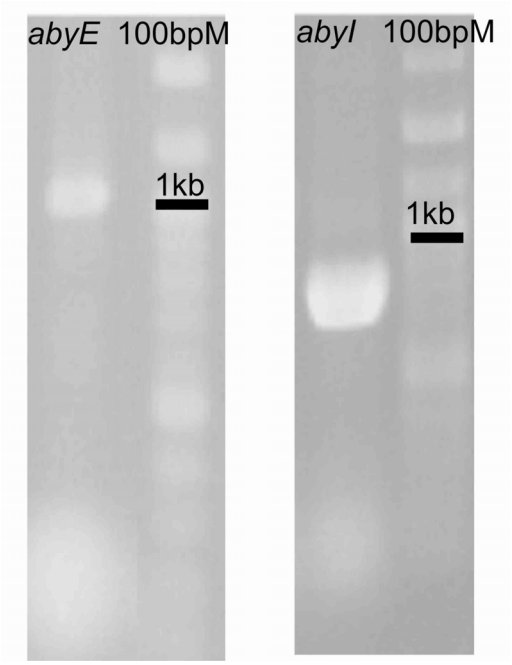


Abbildung 62: PCR mit Cosmid-DNA als Templat und Komplementations-Primern (Tabelle 29). PCR-Produkte abyE (erwartete Länge: 1kb) und abyI (erwartete Länge: 0,7kb).

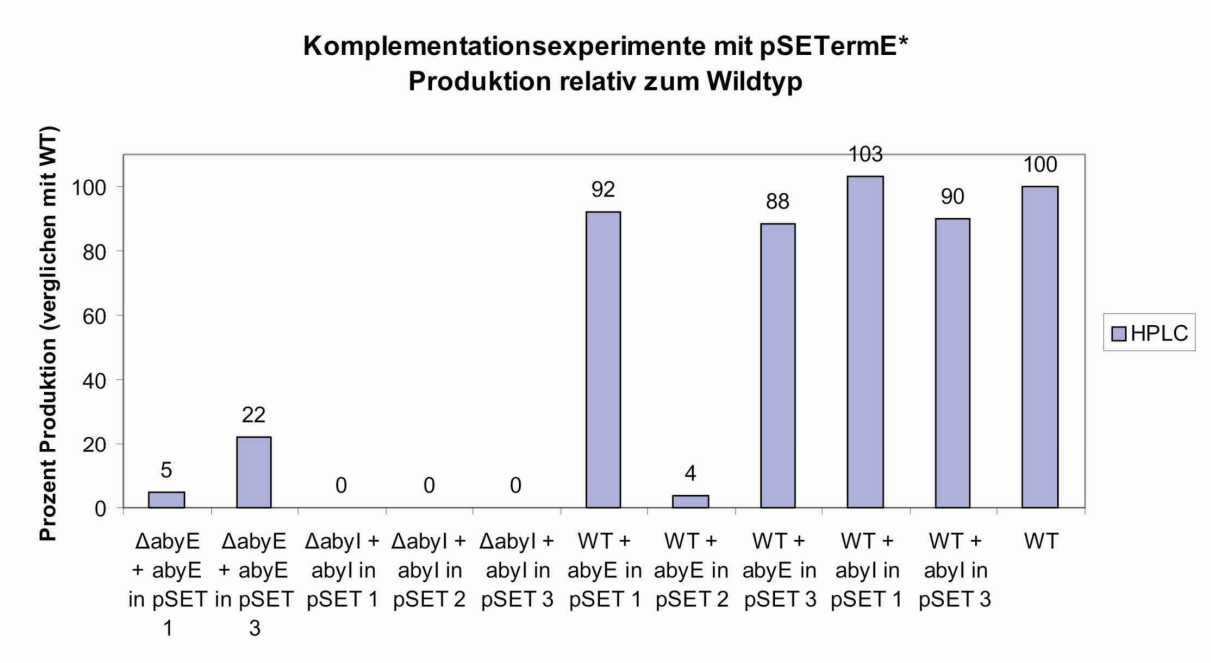


*Abbildung 63: Auswertung der Signalintensitäten im HPLC-DAD-Chromatogramm (normiert: (Peakfläche Probe / Peakfläche WT)*100). Auffällig ist, dass eine Komplementationsmutante,* Verrucosispora*Δ*abyE::*pSETermE*[*abyE*] Klon 3 ein doppelt so hohes Produktionsniveau aufweist wie durchschnittlich* Verrucosispora*Δ*abyE *(vgl. Abschnitt 4.2.7.1). Ebenfalls auffällig ist der dramatische Produktionseinbruch bei Klon 2 der Verrucosispora::pSETermE*[*abyE*]-Mutante.*

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Das Abyssomicin-Biosynthesegencluster – Sequenz und Annotierung

Die bioinformatische Analyse der DNA-Sequenz des 57kb großen Contigs mit dem Programm glimmer ergab 24 open reading frames, deren Funktion mittels Vergleich mit in Datenbanken hinterlegten Gen- und Proteinsequenzen (BLAST und InterProScan) untersucht wurde (Tabelle 30).
Interessanterweise ist bei vielen Genen die Sequenz mit höchster Homologie in *Frankia alni* ACN14a und/oder *Frankia sp.* EAN1pec zu finden, die beide in Gesamt-Genom-Sequenzierungsprojekten bearbeitet wurden.[103] Die teilweise starke Ähnlichkeit mit *Verrucosispora* AB-18-032 könnte darauf hinweisen, dass *Frankia* interessante Sekundärmetabolite produziert.

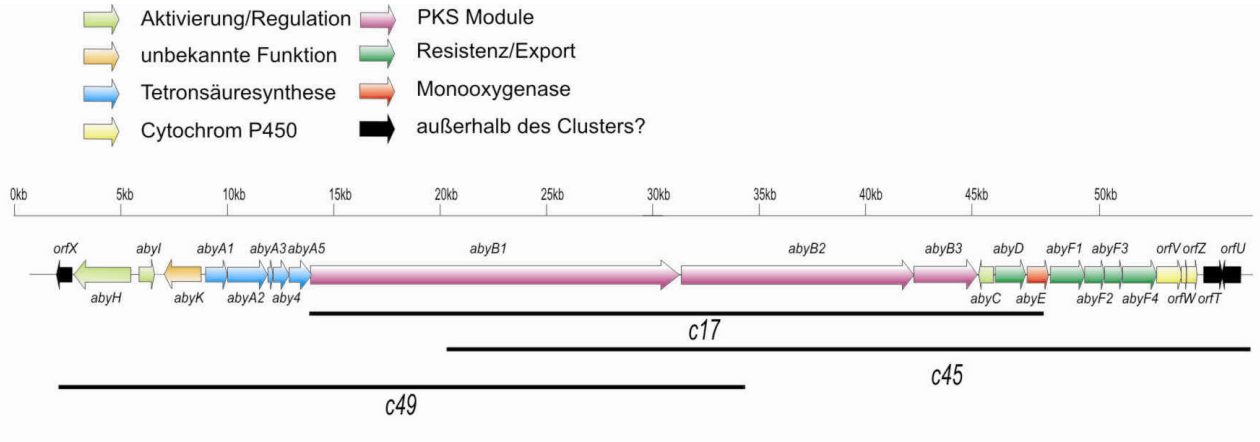


Abbildung 64: Das Biosynthesegencluster von atrop-Abyssomicin C

Außer der zu erwartenden Polyketidsynthase-Gene (*abyB1-abyB3*) sind fünf Gene besonders auffallend: *abyA1-abyA5*. Sie besitzen hohe Homologie zu einem Set aus vier bis fünf Genen, welches in jüngster Vergangenheit in vier verschiedenen Biosynthesegenclustern beschrieben wurde, die alle für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten kodieren, welche eine Tetronsäureeinheit enthalten: Chlorothricin, Kijanimicin, Tetrocarcin und Tetronomycin.[40-43] Weitere Gene umfassen Transkriptionsregulatoren (*abyH*, *abyI* und *abyC*), Transporter (*abyD* und *abF1-abyF4*) sowie ein Protein, das ein YD-repeat Motiv enthält (*abyK*). Eine Monooxygenase (*abyE*) oxygeniert möglicherweise eine *atrop*-Abyssomicin C-Vorstufe und könnte damit für die Reifung von *atrop*-Abyssomicin C nötig sein. Darüber hinaus sind noch ein Cytochrom P450-Set, bestehend aus drei Genen (*orfV-orfZ*), und eine Thioesterase Typ II (*orfT*) möglicherweise Teil des Abyssomicin C-Genclusters. *orfU*, eine Zink-abhängige Alkohol-Dehydrogenase gehört möglicherweise nicht mehr zum Biosynthesegencluster für *atrop*-Abyssomicin C.

Tabelle 30: Funktionen der einzelnen Gene aufgrund von Sequenzvergleichen mittels BLAST.

Name	Gen von-bis (bp)	Ribosomale Bindestelle (RBS)	Länge Protein (aa)	Funktion	Ähnlichkeit mit	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Referenz
orfX	776-39[a]	786-782	245	Cytochrome P450 Cytochrome P450 Hydroxylase	*Frankia sp.* EAN1pec *S. griseolus*	75/76 54/67	Unpublizierte Sequenz J. Bacteriol. 172 (6), 3335-3345 (1990)
abyH	3536-867	3552-3548	889	LuxR family transcriptional regulator Putative activator	*Frankia alni* ACN14a *S. carzinostaticus*	33/46 35/45	Unpublizierte Sequenz Antimicrob. Agents Chemother. 48 (9), 3468-3476 (2004)
abyI	3892-4650	3882-3886	252	Pathway specific activator	*Streptomyces sp.* NRRL 11266	50/63	ChemBioChem 9, 1136-1145 (2008).
abyK	6857-5118	6865-6862	579	YD repeat Secreted protein	*Frankia sp.* EAN1pec *S. coelicolor*	46/56 31/43	Unpublizierte Sequenz Nature 417 (6885), 141-147 (2002)
abyA1	7061-8086	7050-7054	341	Beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase I 3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III	*Frankia sp.* EAN1pec *Streptomyces sp.* NRRL 11266	68/81 64/75	Unpublizierte Sequenz ChemBioChem 9, 1136-1145 (2008)
abyA2	8083-9951	8074-8078	622	Phosphatase and glyceryl transferase ChlD1	*Streptomyces sp.* NRRL 11266 *S. antibioticus*	57/68 57/68	ChemBioChem 9, 1136-1145 (2008) Chem. Biol. 13, 575-585 (2006)
abyA3	9948-10184	9937-9941	78	Discrete ACP ChlD2	*Streptomyces sp.* NRRL 11266 *S. antibioticus*	58/75 53/72	ChemBioChem 9, 1136-1145 (2008) Chem. Biol. 13, 575-585 (2006)
abyA4	10181-10936	10172-10176?	251	dehydrogenase catalytic domain-containing protein pyruvate/2-oxogluatarate dehydrogenase	*Frankia sp.* EAN1pec; *Streptomyces sp.* NRRL 11266	64/78 60/73	Unpublizierte Sequenz ChemBioChem 9, 1136-1145 (2008)

[a] Gen unvollständig

Name	Gen von-bis (bp)	Ribosomale Bindestelle (RBS)	Länge Protein (aa)	Funktion	Ähnlichkeit mit	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Referenz
abyA5	10933-12000	10921-10926	355	hydrolase superfamily dihydrolipoamide acyltransferase-like protein ChlD4	*Actinomadura kijanata* *Streptomyces antibtioticus*	54/68 51/65	J. Am. Chem. Soc. 129, 14670-14683 (2007) Chem. Biol. 13, 575-585 (2006)
abyB1	11997-29342	11986-11990	5781	PKS I (Modul 1: KS, Ata, ACP; Modul 2: KS, Ata, DH, KR, ACP; Modul 3: KS, Ata, DH, KR, ACP; Modul 4: KS, Ata, DH, KR, ACP	*Streptomyces avermitilis* MA-4680	48/59	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 12215-12220 (2001)
abyB2	29419-40356	29405-29409	3645	PKS I (Modul 5: KS, Atp, DH, KR, ACP; Modul 6: KS, Atp, DH, ER, KR, ACP)	*Streptomyces sp.* DSM 21069	50/61	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 12215-12220 (2001)
abyB3	40353-43331	40338-40342	992	PKS I (module7: KS, Ata, ACP)	*Streptomyces antibioticus*	54/65	Chem. Biol. 13, 575-585 (2006)
abyC	44092-43400	?	230	regulatory protein, TetR	*Frankia sp.* EAN1pec; *Brucella abortus biovar* 1 str. 9-941	60/75 40/56	Unpublizierte Sequenz; J. Bacteriol. 187, 2715-2726 (2005)
abyD	44176-45603	44166-44170	475	Drug resistance transporter EmrB/QacA subfamily; export protein	*Frankia sp.* EAN1pec*;* *S. antibioticus*	66/79 44/60	Unpublished sequence; Chem. Biol. 13, 575-585 (2006)
abyE	45674-46681	45662-45668	335	Luciferase; Alkanal monooxygenase alpha chain/ Flavin utilizing monooxygenases	*Frankia sp.* EAN1pec*;* *Brucella melitensis* 16M	60/74 45/64	Unpublizierte Sequenz Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 443-448 (2002)
abyF1	46769-48385	46754-56760	538	ABC transporter oligopeptide binding protein peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	*Frankia alni* ACN14a*;* *Klebsiella pneumoniae* 342	45/59 40/55	Unpublizierte Sequenz; PloS Genet. 4, E1000141 (2008)
abyF2	48382-49317	48372-48374?	311	ABC transporter ologopeptide permease; binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	*Frankia alni* ACN14a *Frankia sp.* CcI3	53/74 51/69	Unpublizierte Sequenz Genome Res. 17, 7-15 (2007)
abyF3	49314-50165	49301-49305	283	binding-protein-dependent transport systems inner membrane component oligopeptide ABC transporter permease protein	*Frankia sp.* EAN1pec *Symbiobacterium thermophilum* IAM 14863	54/70 45/62	Unpublizierte Sequenz Nucleic Acids Res. 32 (16), 4937-4944 (2004)

Name	Gen von-bis (bp)	Ribosomale Bindestelle (RBS)	Länge Protein (aa)	Funktion	Ähnlichkeit mit	Identität/ Ähnlichkeit [%]	Referenz
abyF4	50155-51774	50139-50144	539	peptide ABC transporter ATP-binding protein ABC transporter ATP-binding protein	*Frankia alni* ACN14a *Janthinobacterium sp. Marseille*	59/71 52/63	Unpublizierte Sequenz PloS Genet. 3, E138 (2007)
orfV	51771-52958	51760-51766	395	Cytochrome P450 cytochrome P450 hydroxylase	*Frankia sp.* EAN1pec *Streptomyces avermitilis* MA-4680	62/71 48/62	Unpublizierte Sequenz Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 12215-12220 (2001)
orfW	52921-53172	52910-52914	83	AmphM Putative ferredoxin	*Streptomyces nodosus*	54/62	Chem. Biol. 8, 713-723 (2001)
orfZ	53738-53751	53763-53758	165	NAD(P)H-dependent FMN reductase	*Streptomyces avermitilis* MA-4680	69/85	Nat. Biotechnol. 21, 526-531 (2003)
orfT	53876 - 54772	53854 – 53857?	298	type II thioesterase thioesterase	*Streptomyces violaceoruber* *Gloeobacter violaceus* PCC 7421	39/49 38/51	Unpublizierte Sequenz DNA Res. 10, 181-201 (2003)
orfU	55579 - 54671	55591 - 55587	302	Zn-dependent oxidoreductase, NADPH: quinone reductase alcohol dehydrogenase, zinc-binding	*Thermomonospora curvata* DSM 43183 *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338	60/71 54/66	Unpublizierte Sequenz Nat. Biotechnol. 25 (4), 447-453 (2007)

4.2 Clusterränder

Die Clusterränder waren durch Probleme bei den Sequenzierungen (*Primer Walking*) nicht zum selben Zeitpunkt bekannt wie die Kernbereiche des Biosynthesegenclusters. Die Gene *abyH* bis *abyF4* schienen hinreichend für die Biosynthese von *atrop*-Abyssomicin C (frühere Inaktivierungsexperimente mittels Singlecrossover hatten auf die Notwendigkeit von *abyH* und *abyF*1 hingewiesen). Inaktivierungen von *orfX* und *orfV* mittels Singlecrossover-Experimenten weisen darauf hin, dass *orfX* möglicherweise außerhalb des Clusters, *orfV* aber höchstwahrscheinlich innerhalb des Clusters liegt. Durch Kooperation mit der Gruppe von James E. M. Stach von der Universität Newcastle werden unserer Arbeitsgruppe in der Zukunft größere Sequenzbereiche in der Umgebung der uns bekannten Sequenz zugänglich gemacht werden. Gemeinsam mit unseren Kooperationspartnern sollen die Clusterränder durch zukünftige Inaktivierungs-Experimente definiert werden.
Die Gen-Inaktivierungen am mutmaßlichen Clusterrand wurden mit Singlecrossover-Mutanten durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.1) – *orfX* und *orfV* wurden durch Insertion des Vektors pK18mob2 inaktiviert. *orfV*, *orfW* und *orfZ* sind als zusammenhängendes Ensemble zu sehen: Cytochrom P450, Ferredoxin und eine NAD(P)H-abhängige FMN-Reduktase bilden ein Redox-System. *orfT* zeigt laut InterPro-Analyse hohe Homologie zur Klasse der Thioesterasen Typ II. Diese Enzyme tauchen häufig in Biosynthesegenclustern von nicht-ribosomalen Peptiden (NRPS) und Polyketiden (PKS) auf, sie katalysieren die Hydrolyse von fehlerhaft prozessierten Zwischenprodukten von der Synthase und sorgen so für eine effizientere Synthese des Sekundärmetaboliten.
orfU ist eine Zink-bindende Alkohol-Dehydrogenase, die große Ähnlichkeit zu GroES zeigt. Ob und welche Rolle dieses Enzym in der *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthese spielen könnte, ist gänzlich unbekannt. Zukünftige Experimente werden dies untersuchen.

4.2.1 Die Singlecrossover-Mutante von *orfV* (Cytochrom P450)

Drei Klone der Singlecrossover-Mutante *orfV* (Cytochrom P450-Aktivität) wurden Produktionskontrollen unterzogen, welche zeigten, dass die Inaktivierung von *orfV* zum Ausfall der Abyssomicin – Produktion führt, wobei polare Effekte nicht ausgeschlossen werden können (Abbildung 65). Das heißt, möglicherweise ist *orfV* selbst nicht für die Abyssomicin-Biosynthese nötig, sondern ein darauffolgendes Gen. Dies wurde mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS bestätigt. *OrfV*, *orfW* und *orfZ* sind als ein Ensemble aufzufassen, sie bilden eine Redox-Einheit.

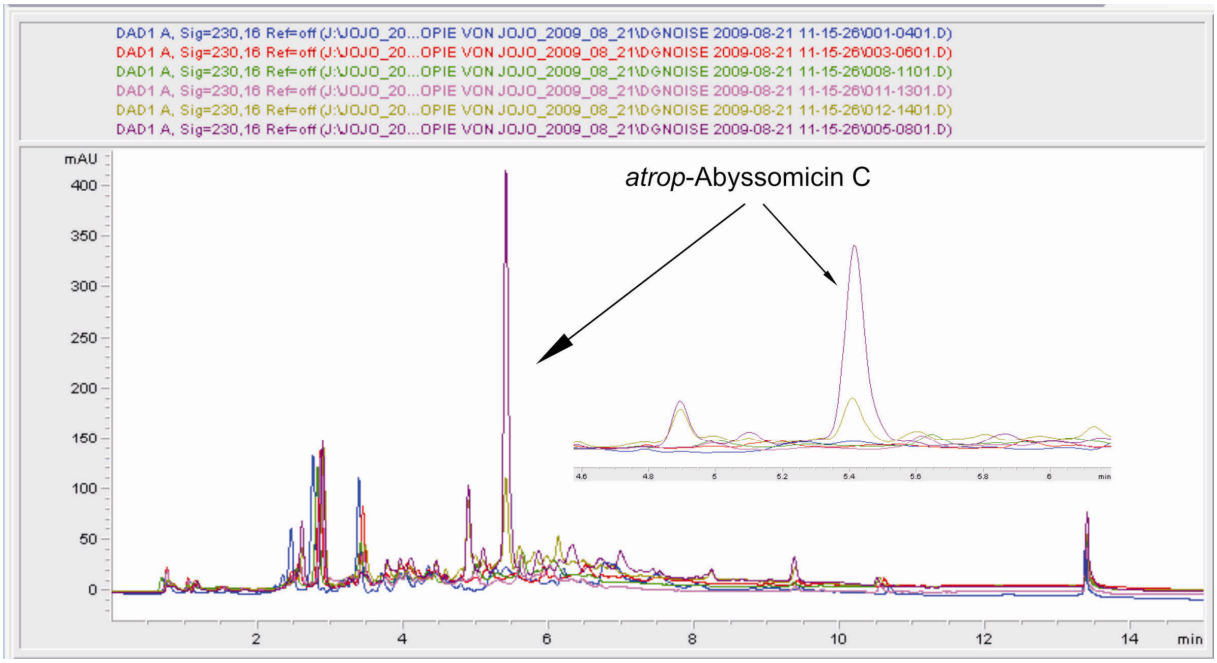


Abbildung 65: Vergleichende HPLC-DAD-Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp und Mutanten-Stämmen. Wildtyp-Fermentation mit Leitungswasser aus dem Oetker-Gebäude (gelbe Spur) bzw. mit Leitungswasser aus Moabit (violette Spur). Singlecrossover-Mutante Verrucosispora pK18mob2[orfV] Klon 6 mit Leitungswasser aus Moabit (blaue Spur), Verrucosispora pK18mob2[orfV] Klon 6 mit Leitungswasser aus dem Oetker-Gebäude (grüne Spur). Singlecrossover-Mutante Verrucosispora pK18mob2[orfV] Klon 7 (rote Spur) und Singlecrossover-Mutante Verrucosispora pK18mob2[orfV] Klon 9 (hellviolette Spur).

Die *atrop*-Abyssomicin C-Produktion mit Leitungswasser aus dem Oetker-Gebäude war im Sommer 2009 dramatisch eingebrochen (möglicherweise aufgrund von Veränderungen im Leitungssystem). Mit Leitungswasser aus Moabit produzierte der Wildtyp annähernd so viel wie zuvor mit Wasser aus dem Laborgebäude. Das mit einer blauen Linie gezeigte Chromatogramm (Abbildung 65, *Verrucosispora* pK18mob2[*orfV*], Klon 6 mit Leitungswasser aus Moabit) scheint einen kleinen Peak auf der Retentionszeit von *atrop*-Abyssomcin C zu zeigen. HPLC-ESI-MS-Messungen konnten aber das Fehlen von Abyssomicin bestätigen (Abbildung 66).

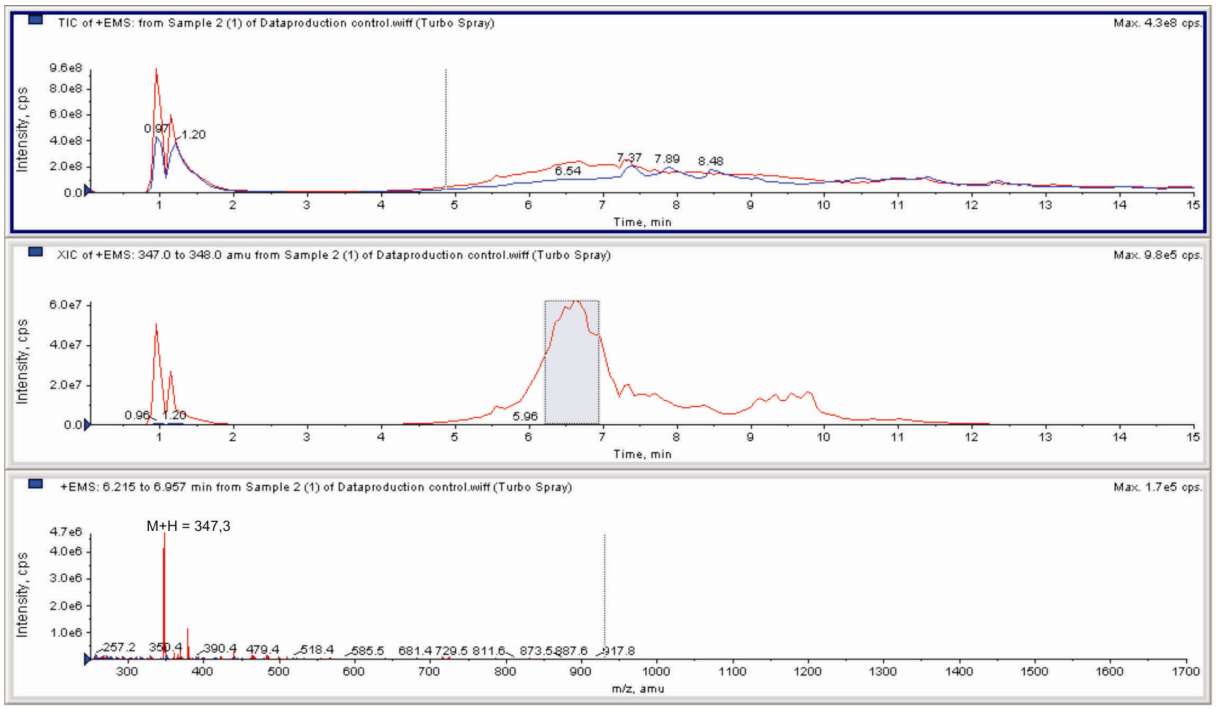


Abbildung 66: Vergleichende HPLC-ESI-MS-Läufe von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp und Mutanten-Stamm. Oberes Fenster: Totalionenchromatogramm von Wildtyp (rote Spur) und Verrucosispora pK18mob2[orfV] (blaue Spur). Mittleres Fenster: Extrahierter Ionenstrom (m/z 347-348) der Molekülmasse von Abyssomicin C. Unteres Fenster: ESI-Massenspektrum (Positivionenmodus) von Abyssomicin C ($[M+H]^+$ = 347,3). In der Singlecrossover-Mutante tritt diese Molekülmasse nicht auf.

4.2.2 Die Singlecrossover-Mutante von *orfX* (Cytochrom P450)

Von den Klonen, die nach der Konjugation von *Verrucosispora* mit pK18mob2(*orfX*) Apramycin-resistent waren, konnte nur bei zwei Exkonjuganten die Integration des Plasmids an der gewünschten Stelle bestätigt werden (mittels PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte). Die Produktionskontrolle dieser zwei Klone führte zu einem nicht eindeutigen, überraschenden Ergebnis. Daher werden weitere Experimente nötig sein, um endgültig zu bestätigen, ob *orfX* für die Biosynthese von Abyssomicin C nötig ist oder nicht.

4.2.2.1 *Verrucosispora* pk18mob2(*orfX*) Klon 2

Wie in Abbildung 70 zu sehen, ist die Produktion von Abyssomicin C in Klon 2 zwar vermindert, aber nicht vollkommen unterbrochen. Auffällig ist allerdings, dass sich das Produktionsspektrum hin zu Abyssomicin D verschoben hat, welches im Wildtyp nur in Spuren vorkommt. Darüberhinaus geht aus Abbildung 69 hervor, dass beim Gleichgewicht zwischen *atrop*-Abyssomicin C und Abyssomicin D auch das Wasser, mit dem das Medium hergestellt wurde, eine Rolle spielt. Klon 13 produziert überhaupt kein *atrop*-Abyssomicin C mehr.

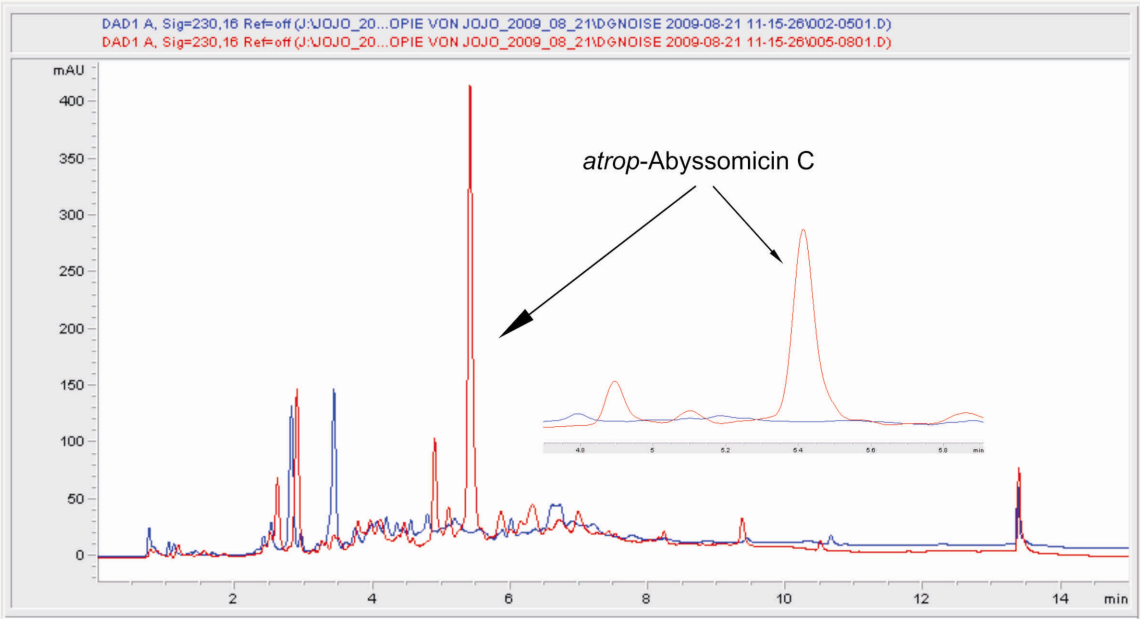


Abbildung 67: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (rote Spur) und dem Mutanten-Stamm Verrucosispora pK18[orfX] Klon 13 (blaue Spur).

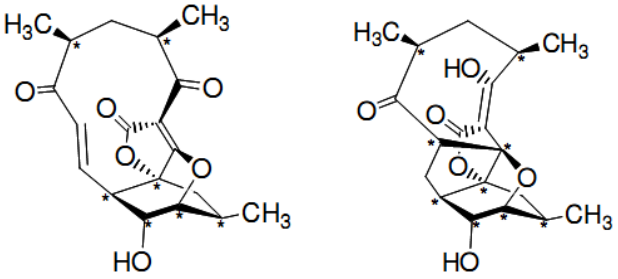


Abbildung 68: Strukturen von Abyssomicin C (links) und Abyssomicin D (rechts)

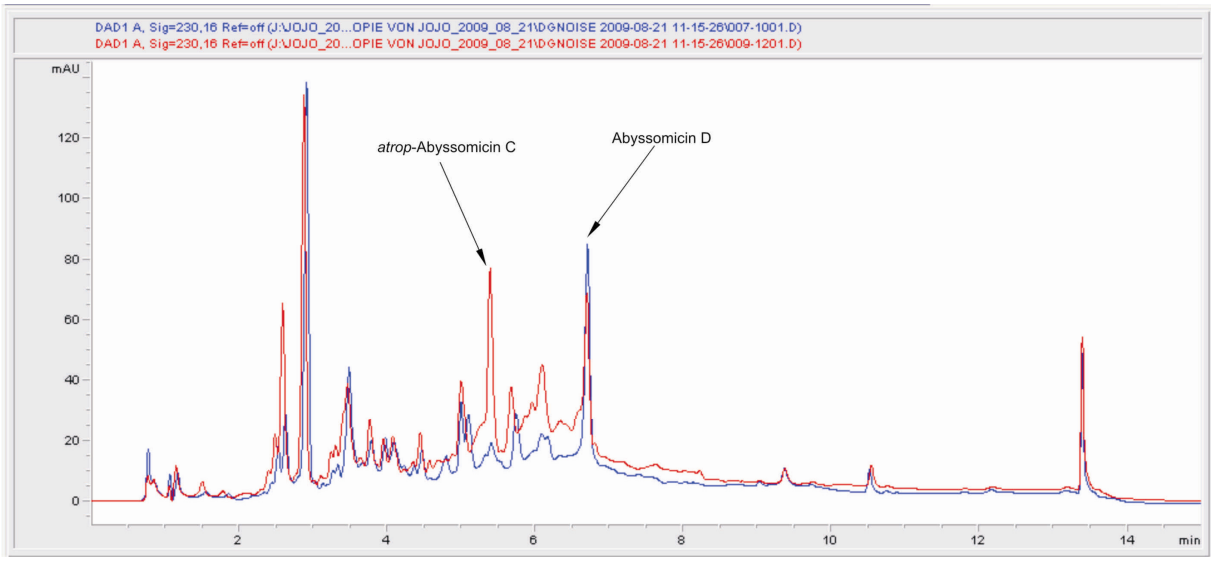


Abbildung 69: Vergleichende HPLC-DAD-Chromatogramme von Verrucosispora pK18mob2[orfX] Klon 2, Fermentation mit Leitungswasser aus Moabit (rote Spur) und Leitungswasser aus dem Oetker-Gebäude (blaue Spur).

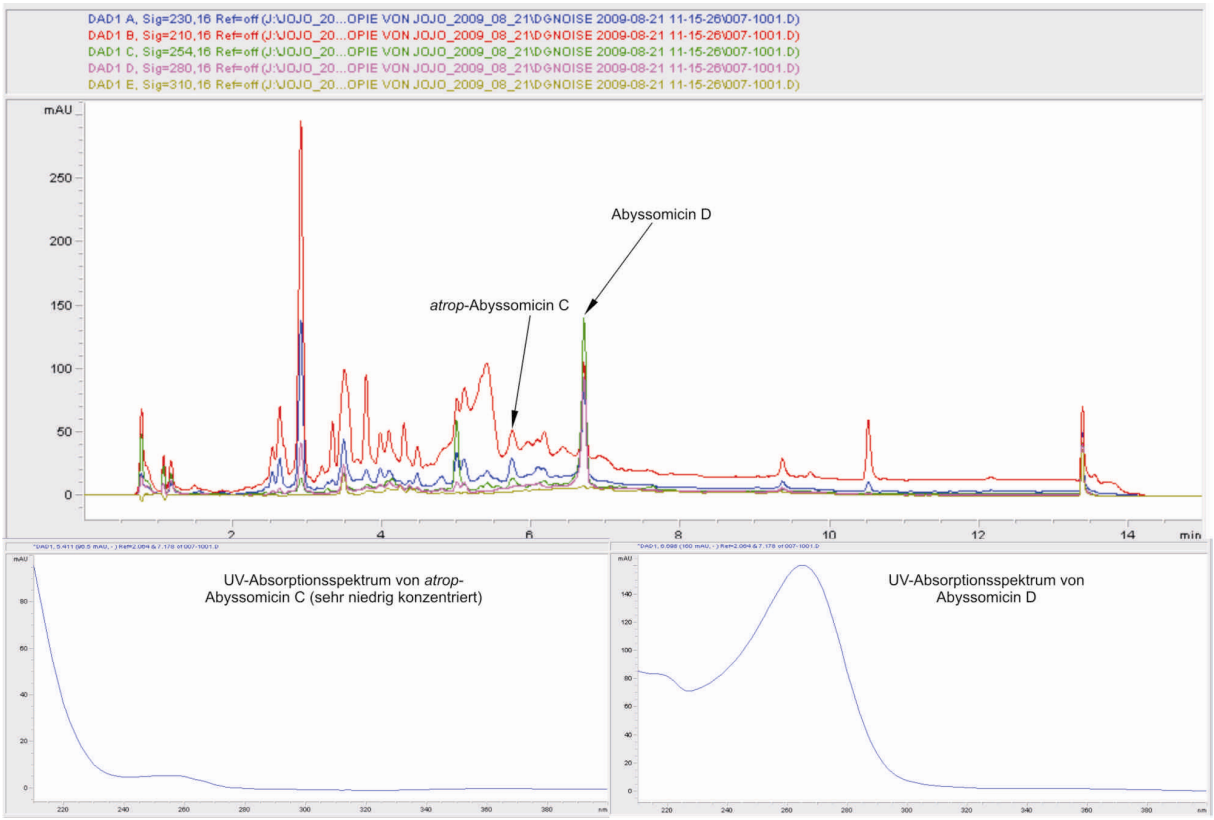


Abbildung 70: HPLC-DAD-Chromatogramm von Verrucosispora pK18mob2[orfX] Klon 2, Fermentation mit Leitungswasser aus dem Oetker-Gebäude. UV-Spektren von atrop-Abyssomicin C (t_R = 5,41 min min) und von Abyssomicin D (t_R = 6,70 min) aus dem Chromatogramm.

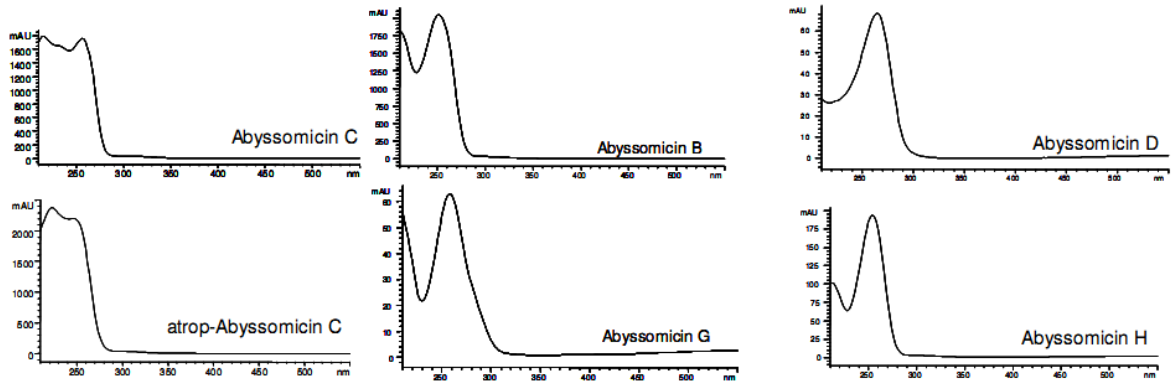


Abbildung 71: UV-Absorptionsspektren aller isolierten Abyssomicine (Dissertation von Dr. Simone Keller, TU Berlin 2007)[48]

Literaturangaben (Dissertation von Dr. Simone Keller, TU Berlin 2007): [48]

Abyssomicin H:	$[M+H]^+$ = 349,2	t_R = 5,24 min
atrop-Abyssomicin C:	$[M+H]^+$ = 347,2	t_R = 5,66 min
Abyssomicin D:	$[M+H]^+$ = 349,2	t_R = 6,89 min

Diese Arbeit:

atrop-Abyssomicin C	$[M+H]^+$ = 347,3	t_R = 5,33 min
Abyssomicin D	$[M+H]^+$ = 349,1	t_R = 6,70 min

Die Differenz der Retentionszeiten zwischen *atrop*-Abyssomicin C und Abyssomicin D betrug in der Dissertationsschrift von Dr. Simone Keller 1,23 min, in dieser Arbeit beträgt sie 1,37 min. Die HPLC-ESI-MS-Spektren zeigen klar, dass der Hauptpeak die Molekülmasse 349,2 aufweist (Abbildung 72). Der Vergleich der UV-Spektren, der Molekülmasse und der Retentionszeiten zeigt, dass es sich bei dem neu aufgetretenen Peak um Abyssomicin D handelt. Die Retentionszeitverschiebung kann durch die Verwendung unterschiedlicher Säulen in einem zeitlichen Abstand von mehr als einem Jahr erklärt werden.

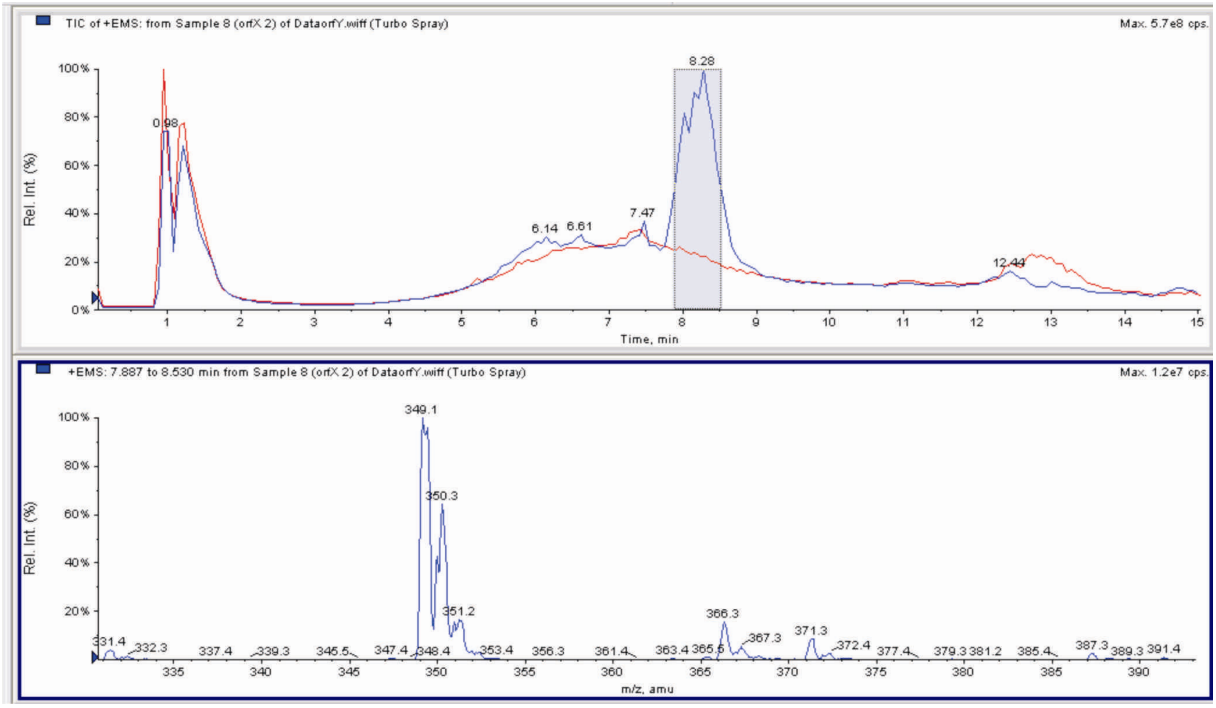


Abbildung 72: Vergleichende HPLC-ESI-MS-Läufe von Verrucosispora pK18mob2[orfX] Klon 2 und Verrucosispora pK18mob2[orfX] Klon 13. Oberes Fenster: Totalionenchromatogramm von Klon 2 (blaue Spur) und Klon 13 (rote Spur). Unteres Fenster: ESI-Massenspektrum (Positivionenmodus) von Abyssomicin D ($[M+H]^+$ = 349,1). In Klon 13 tritt die Molekülmasse von Abyssomicin D nicht auf.

Der Grund für diese Verschiebung hin zur Produktion von Abyssomicin D, noch dazu bei nur einem Klon, bleibt vorerst spekulativ. Eine Möglichkeit könnte sein, dass *orfX*, ein Cytochrom P450, zwar nicht direkt für die Biosynthese notwendig ist, aber einen Reduktionsschutz für *atrop*-Abyssomicin C bietet. Dies bedeutet, dass OrfX überschüssiges NAD(P)H abbaut und so die Reduktion zu inaktivem Abyssomicin D verhindert. Das eigentliche Biosyntheseprodukt wäre so Abyssomicin D.

4.2.3 Selbstresistenz

Im Rahmen der Versuche, die 49 PKS I-positiven Cosmide weiter einzuschränken, wurde auch erwogen, dass in der Nähe des Biosynthesegenclusters eine zweite Kopie des Enzyms PabB (Aminodesoxychorismatsynthase) zu finden sein könnte. *Atrop*-Abyssomicin

C und in etwas geringerem Maße Abyssomicin C hemmen PabB spezifisch durch irreversible, kovalente Bindung an Cys-263.[23,24] Eine zusätzliche, nicht im primären Metabolismus angesiedelte PabB-Kopie könnte diese Hemmung kompensieren. Alternativ könnte PabB aus *Verrucosispora* AB-18-032 resistent gegenüber *atrop*-Abyssomicin sein. PabB konnte in *Verrucosispora* AB-18-032 weder durch Screening der Cosmidbank mit einer heterologen Sonde noch über eine Vielzahl von PCR-Versuchen auf genomischer DNA mit degenerierten Primern nachgewiesen werden (Hanna von Suchodoletz, persönliche Mitteilung). Dies könnte darauf hinweisen, dass in *Verrucosispora* AB-18-032 ein alternativer Syntheseweg für *p*-Aminobenzoesäure (pABA, *para*-aminobenzoic acid) existiert. Im Moment arbeitet die Arbeitsgruppe von James EM Stach an der Universität Newcastle an der Sequenzierung des Gesamtgenoms von *Verrucosispora* AB-18-032. Möglicherweise ergibt sich hier eine Antwort auf die Frage der pABA-Biosynthese.
Da im Biosynthesegencluster für *atrop*-Abyssomicin C kein offensichtlich spezifischer Selbstresistenzmechanismus gefunden wurde, aber mehrere Gene für Exportproteine (*abyD* und *abyF1-abyF4*) vorhanden sind, scheint der effiziente Export des Moleküls dafür zu sorgen, dass *Verrucosispora* AB-18-032 von *atrop*-Abyssomicin C nicht gehemmt wird. Diese Theorie wird auch dadurch gestützt, dass *atrop*-Abyssomicin C in das Kulturmedium sekretiert wird und nicht aus den Zellen extrahiert werden kann.

4.2.3.1 Die Singlecrossover-Mutante von *abyD*

AbyD gehört zur Major Facilitator Superfamily (MFS). MFS-Transporter können als Reaktion auf chemiosmotische Ionengradienten kleine gelöste Stoffe transportieren.[104] Zur Tochterfamilie EmrB/QacA gehört neben AbyD auch das Tetracyclin Resistenz-Protein TetB. Die Deletion von *abyD* mittels Doppelcrossover mit der *ReDirect*-Methode (s. Abschnitt 3.3.2) führte zu einem Rückgang der Produktion auf ca. 10 % (Abbildung 73, Tabelle 31und Abbildung 91). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass AbyD nicht alleine bzw. nicht für den Export von *atrop*-Abyssomicin C verantwortlich ist.

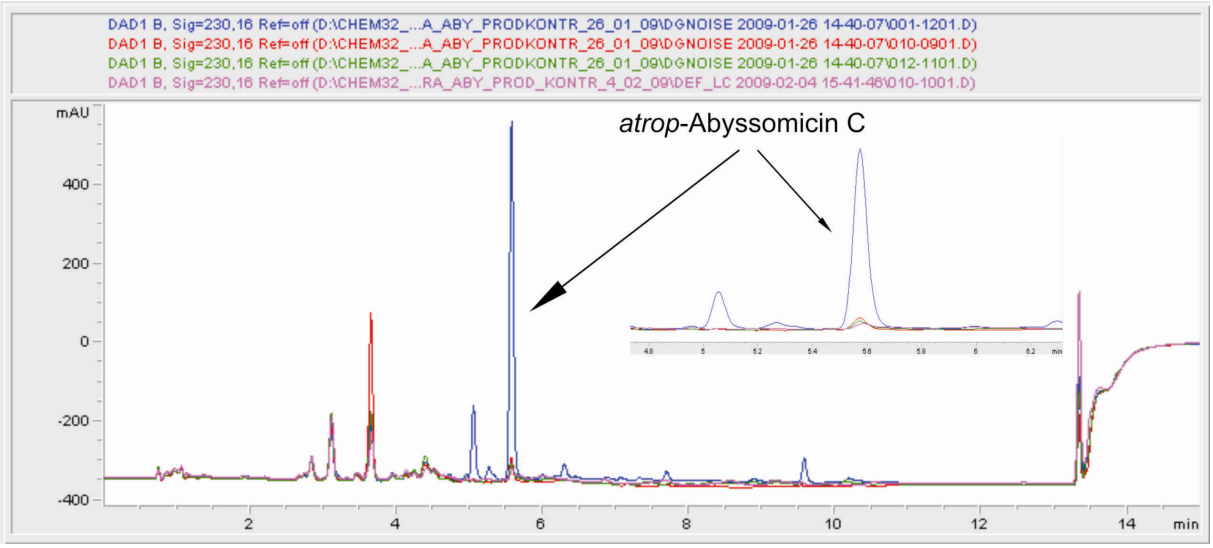


Abbildung 73: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyD *Mutanten (Klon III/3, rote Spur; Klon IV/10, grüne Spur; Klon V/6, violette Spur).*

Tabelle 31: Produktionskontrolle VerrucosisporaΔΔabyD: Peakflächen im Vergleich zum Wildtyp. Die Produktion durch den Wildtyp schwankt von Fermentation zu Fermentation stark. Siehe auch Abbildung 91.

Klon	Peakfläche [mAU]	Retentionszeit [min]	Relative Produktion [%][a]	Datum der Messung
Wildtyp, 3 Schikanen, aus Kryokultur	3568,4	5,573	100.0	26.01.2009
Wildtyp, 1 Schikane, aus Kryokultur	3129,5	5,572	87.7	26.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyD III 3	333,9	5,572	9.4	26.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyD V 6	377,9	5,575	10.6	26.01.2009
Wildtyp, 3 Schikanen, aus Kryokultur	10558,8	5,581	100.0	4.02.2009
VerrucosisporaΔΔabyD IV 10	310,3	5,585	2.9	4.02.2009

4.2.3.2 Die Gene *abyF1-abyF4*

AbyF1-F4 ist ein Bindeprotein-abhängiges ABC-Transporter System. Es besteht aus einem extrazellulären Bindeprotein (AbyF1), zwei *inner membrane component proteins* (AbyF2 und AbyF3) sowie einem *fused dimer* einer ABC-Transporter Domäne. Bindeprotein-abhängige ABC-Transporter Systeme wurden bisher ausschließlich als Import-Systeme beschrieben (wobei in manchen Fällen auch der Efflux vermittelt wird, in Summe handelt es sich aber immer um Aufnahme von Stoffen in die Zelle).[105,106] Entgegen der Erwartung, ein Abyssomicin-Exportsystem zu finden,[107] scheint es sich hier aufgrund der Architektur des Systems sowie der Sequenzhomologien um ein Oligopeptid-Importsystem zu handeln.[105] Eine Deletion des Gens *abyF1* konnte bisher nicht erreicht werden. Ergebnisse aus Singlecrossover-Knockout Experimenten mit *abyF*1 weisen auf die Notwendigkeit dieser Gene hin, allerdings können polare Effekte nicht ausgeschlossen werden. Die Gene *abyF1-F4* scheinen also für die *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthese notwendig zu sein, wobei eine Rolle im Abyssomicin-Export nicht gesichert ist. Das Gen *abyC2* ist auch in die *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthese involviert, agiert aber höchst-

[a] Alle Mutanten wurden in Kolben mit drei Schikanen kultiviert, angeimpft wurde mit einem Agarblöckchen. Die relative Produktion bezieht sich immer auf den Wildtyp (Kryokultur, 3 Schikanen), der zur gleichen Zeit wie die Mutante fermentiert, geerntet und gemessen wurde. Relative Produktion = (Peakfläche WT/ Peakfläche Mutante)*100.

wahrscheinlich nicht alleine. Weitere Experimente werden nötig sein, um den Weg von *atrop*-Abyssomicin C aus der Zelle in das Medium zu klären.

4.2.3.3 Das Gen *abyK*

InterPro Scan-Analysen ergaben, dass *abyK* mehrere Tandem-Kopien eines 21 Aminosäuren langen extrazellulären *Repeats* enthält, welches in Gram-negativen, Gram-positiven und tierischen Proteinen gefunden wird. Dieser *Repeat* wird nach dem YD-Dipeptid benannt, welches das am stärksten konservierte Motiv innerhalb des *Repeats* ist. YD-Repeats scheinen üblicherweise an der Bindung von Kohlenhydraten beteiligt zu sein, beim Hühner-Teneurin-1 YD-Repeat konnte gezeigt werden, dass es Heparin bindet.[108-110] *atrop*-Abyssomicin C kann nicht direkt im Kulturfiltrat nachgewiesen werden, sondern muss erst mit Essigsäureethylester extrahiert werden. Experimente mit reinem *atrop*-Abyssomicin C, welches zum Überstand hinzugegeben wurde, zeigten, dass auch ein Überschuss von *atrop*-Abyssomicin C mittels HPLC-DAD im Überstand nicht detektierbar ist (s. Abschnitt 4.4). Es ist denkbar, dass *atrop*-Abyssomicin C an AbyK gebunden wird und so „maskiert" ist. Dies ist jedoch Spekulation, die wahre Funktion von AbyK kann erst durch Expression und Aufreinigung des Proteins und darauf folgende Experimente identifiziert werden.

4.2.4 Regulation

Am 5'-Ende der PKS I-Gene befinden sich zwei Gene, welche für bekannte Regulatoren für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten kodieren: Ein zur LuxR-Familie gehörender Transkriptions-Regulator (*abyH*) und ein Biosyntheseweg-spezifischer Aktivator, der zur Familie der „*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins" *SARP* gehört (*abyI*). Die Deletion von *abyI* führte zum kompletten Ausfall der *atrop*-Abyssomicin Produktion, es handelt sich also wahrscheinlich um ein Aktivator-Protein. Dies sollte mittels Komplementation der Deletionsmutante Δ*abyI* und des Wildtyps mit einer Kopie des Gens im Vektor pSETermE* überprüft werden. Dieser Vektor kann ortsspezifisch im Genom von *Verrucosispora* integrieren (mittels einer ΦC31-*attachment site*) und enthält einen Promoter, der in Actinomyceten bereits oft mit Erfolg angewendet wurde. Jedoch kam es zu keiner Veränderung der Produktion von *atrop*-Abyssomycin C (WT::pSETermE*[*abyI*] = normale Produktion, *Verrucosispora*Δ*abyI*::pSETermE*[*abyI*] = keine Produktion), was bedeutet dass die Expression des Gens auf einem separaten Plasmid nicht erfolgreich war. Gründe hierfür könnten sein, dass *Verrucosispora* AB-18-032 den Promoter ermE* nicht erkennt oder dass die ribosomale Bindestelle fehlt. LuxR-Regulatoren können Aktivatoren oder Repressoren sein, deren Transkription durch einen sogenannten „*Quorum sensing mechanism*" aktiviert wird, wenn eine bestimmte Zelldichte erreicht wird.[111] Eine Doppelcrossover-Mutante für den Knockout von LuxR konnte nicht hergestellt werden, ebenso wenig gelang die Klonierung des Gens in den Vektor pSETermE*.

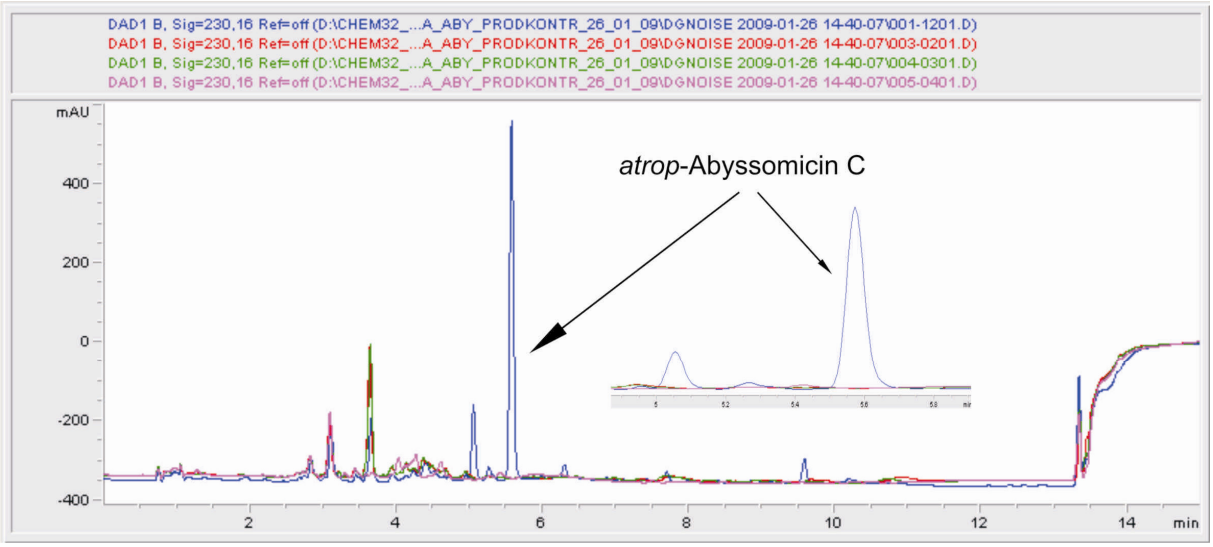


Abbildung 74: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyI *Mutanten (Klon IV/5, rote Spur; Klon V/1, grüne Spur; Klon VI/8, violette Spur).*

Am 3'-Ende der PKS I-Module befindet sich ein *tetR*-Regulatorgen, *abyC*. AbyC gehört zur Familie der TetR-Transkriptionsregulatoren (meist Repressoren) und enthält eine DNA-bindende Homeodomäne. Da die Deletion dieses Gens nicht erfolgreich war, kann für *abyC* nicht bestätigt werden, ob es sich um einen Repressor oder einen Aktivator handelt.

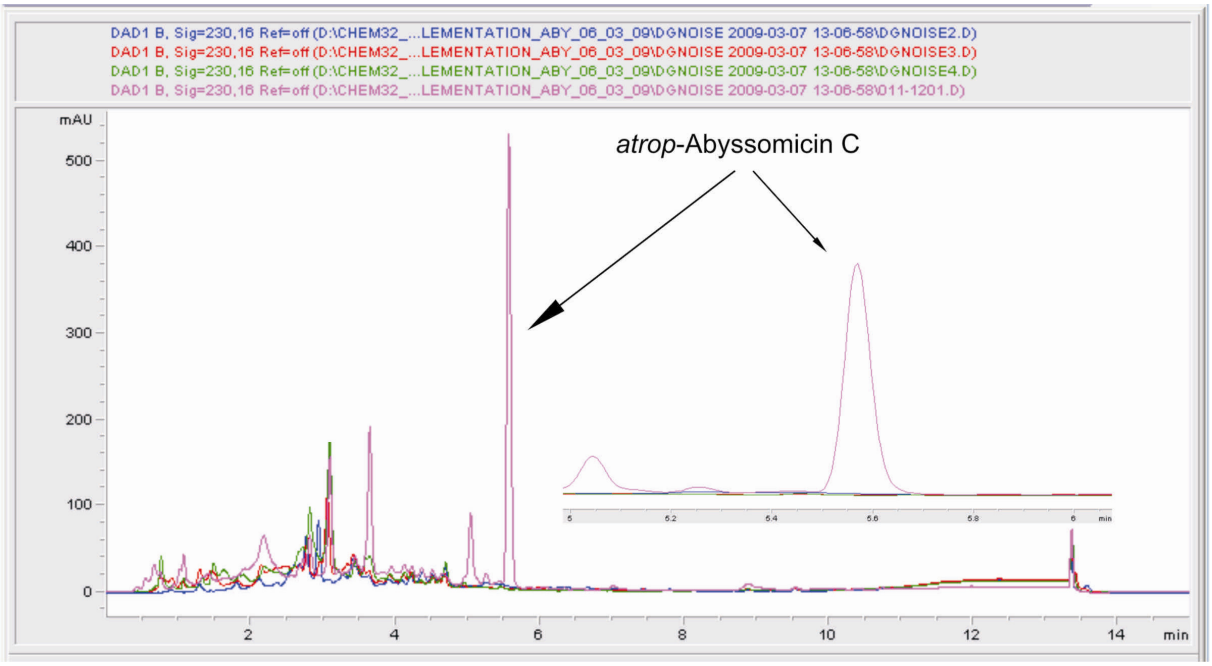


Abbildung 75: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (hell-violette Spur) und Verrucosispora*Δ*abyI*::pSETermE*[abyI] Mutanten (Klon 1, blaue Spur; Klon 2, rote Spur; Klon 3, grüne Spur).*

4.2.5 Die Polyketidsynthasegene *abyB1-abyB3*

Drei Gene im *aby*-Biosynthesegencluster kodieren für eine modulare Polyketidsynthase, welche das Polyketid-Gerüst von *atrop*-Abyssomicin C aus den einzelnen Bausteinen zusammenfügt. Insgesamt gibt es ein Lademodul und sechs Kettenverlängerungsmodule, die jeder dasminimale Ensemble aus Ketosynthase (KT), Acyltransferase (AT) und Acyl-Carrier-Protein (ACP) sowie teilweise zusätzliche Domänen wie Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und/oder Enoylreduktase (ER) enthalten. Diese Module sind in der Reihenfolge ihrer Funktion angeordnet (Abbildung 76). In AbyB2 enthält das zweite Modul zwei inaktive Domänen: AbyB2_DH1 und AbyB2_KR1 sind laut Sequenzvergleich mit einer Studie von Wu *et al.* aus dem Jahr 2005, die die aktiven Zentren in diesen Enzymen untersucht hat, nicht funktionell.[112] Insgesamt zeigen AbyB2_DH1 sowie AbyB2_KR1 die niedrigste Homologie zu den entsprechenden Domänen in den anderen Modulen (Abbildung 77). Ähnlich wie im Tetronomycin-Gencluster gibt es hier keine terminale Thioesterase-Domäne (TE). Dies bedeutet, dass die Abspaltung der Polyketidkette vom Polyketidsynthase-Megaenzym durch einen alternativen Mechanismus geschieht.[40]

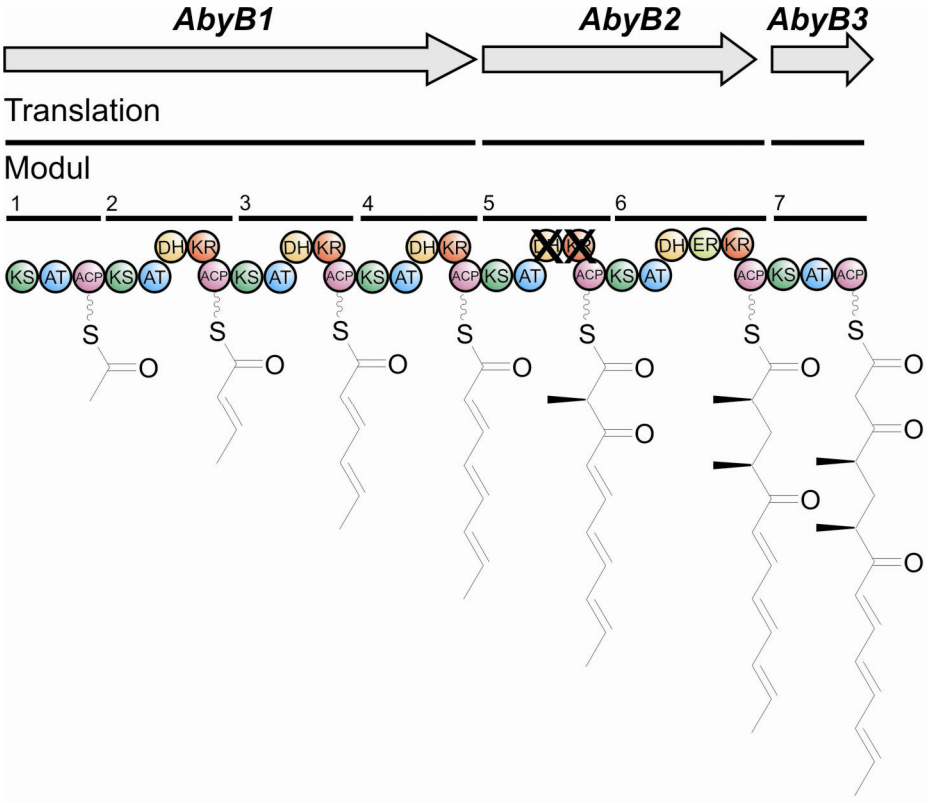


Abbildung 76: Module der atrop-*Abyssomicin C-Polyketidsynthase mit wachsender Polyketidkette und Modell der Biosynthese entsprechend der Collinearitätsregeln.*[113]

A

```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
AbyB1_DH1. : -GVREVDHPLLGAAVTLADDST-VYTGRLSRRTAPWLADHVVLGRALLPGTALLEYALWAGRDVGLPRVAELTLEAPLVLPD- :  80
AbyB1_DH2. : -GLDGSGHPLLPGVVDLADGG-LVLTGTVSADSHPWLAGHRIGGATLLPATAVVEAVAHAASRVGLD-VDELVLTA--AVPVD :  78
AbyB1_DH3. : ----GSGHPLLDAAVELPEGAVL-FTGRVAAEDADWLADHVVLGQTVVSGATLLSLVLHAAAAAGRPTVRRLTLHAPLVLPDD :  78
AbyB2_DH1. : VGVGPTDHPLLGGAVDVAGDGTLVLTGRLVPGADRAAAELRVGGVPVLSGTALLDLALRAGELAGLGAVGEFSVETPLVL-S- :  81
AbyB2_DH2. : LGLAATAHPLLGAAVDLADDEGVLLTGRLSLDSHPWLADHTVAGVPLLPGAAFVELCAQAAEAAGAAGVAELTLETPCVLPE- :  82
              g     HPLL  aV la       TGr       wlA h v G   l g a       A    G   V el l  p vlp
```

B

```
                  *       100         *       120         *       140         *       160
AbyB1_KR1. : LACLLADLPT---LDAVVHAAGVVRDATVSALTVEQ-V----RAAATKAESAWHLHELTRDRPLRAFVLFSSISGLLGTAGQG : 157
AbyB1_KR2. : VAALLASIPEEHPLTAVIHTAGVLDDGALTSLTEERLA----RVLRPKAEAAWHLHEFTRDRPLTAFVLFSSITGITGTAGQA : 154
AbyB1_KR3. : LARVLDTVPAAHPLTAVVHAAGVVSDGPLATLTPQRFA----EVLRPKVDAAWHLHELTCEQDLAAFVLFSSLAGLVGNAGQA : 151
AbyB2_KR1. : LAE---AVHRAANLRTVVHAVQPTADAPLAALSPEDLTALVERIVAP----ARHLHELTAHLPLTRFVLSGSAAGVLGGIGQA : 144
AbyB2_KR2. : VAGVLAAVPPEHPLTAVVHTAGVLDDGVLESLTPQKIA----RVLAPKVDAAWHLHELTRDLDLSAFLLFSSASGLLGGAGQA : 157
             6A  l  6p    L aV6H agv  D  6  L3 2       r   pk   AwHLHElT    L aF6LfsS  G6 G aGQa

                *       180         *       200
AbyB1_KR1. : AYAAANAALDALAAHRHALGLPALSLAWGLW---- : 188
AbyB1_KR2. : NYAAANAYLDALARHRRNLGLPGVSLAWGLW---- : 185
AbyB1_KR3. : NYAAANTGLDALAAYRRAAGLPAVSLAWGLW---- : 182
AbyB2_KR1. : AVAAATTGLGALAARRRADGLPAQVVAWG------ : 173
AbyB2_KR2. : NYAAANAFLDALATARRRAGLPAVSLAWGMWARAT : 192
              yAAAn  LdALA  Rr  GLPa s6AWG w
```

Abbildung 77: Alignments aller DH- und aller KR-Domänen im atrop-*Abyssomicin C-Biosynthesegencluster.* ***A)*** *In AbyB2_DH1 befindet sich an Position 40 anstelle eines Histidins ein Leucin.* ***B)*** *In AbyB2_KR1 fehlt sich auf Position 131 ein Lysin, an Position 168 befindet sich statt eines Tryptophans ein Valin.*[112]

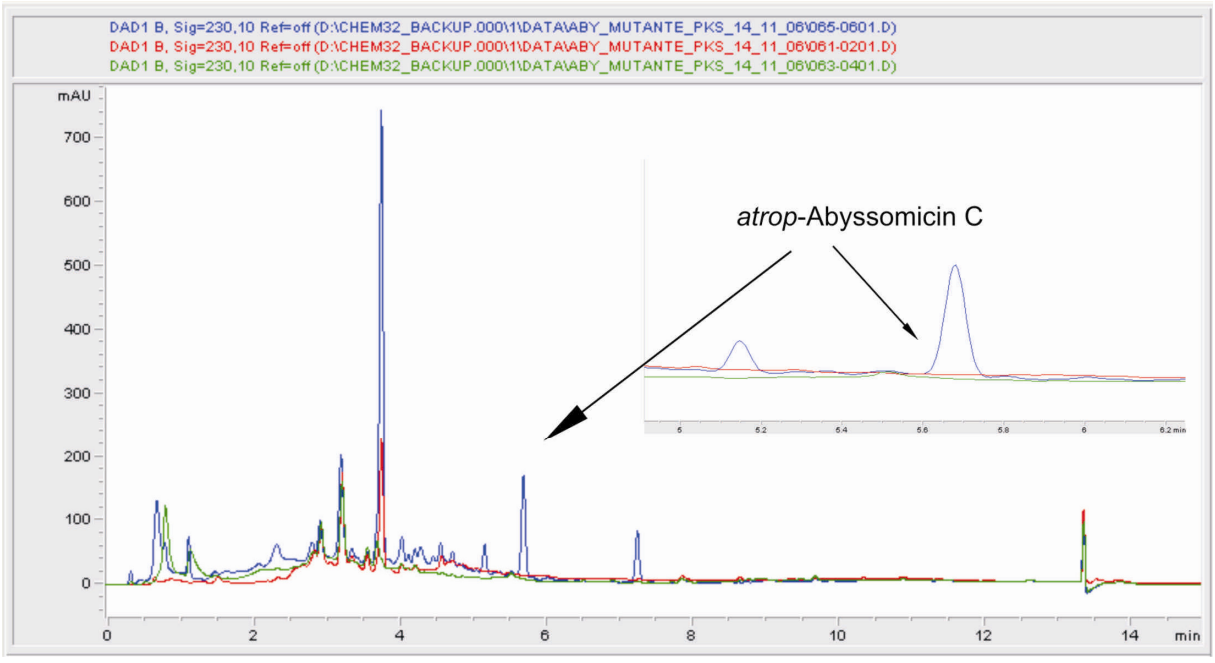


Abbildung 78: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und dem Mutanten-Stamm Verrucosispora pK18[abyB1] Klon 1 (rote Spur) und Klon 4 (grüne Spur). Die Produktion von atrop-Abyssomicin C war hier auch beim Wildtyp eher schlecht, dennoch ist eindeutig erkennbar, dass keine Abyssomicin-Produktion bei den Mutanten auftrat (Wie auch bei der Singlecrossover-Mutante mit Fragment W (Abschnitt 3.2.1.5)).

4.2.6 Die Tetronsäurebiosynthese (*abyA1-abyA5*)

Bisher wurden vier Biosynthese-Gencluster aufgeklärt, die für die Biosynthese von Tetronsäure-Antibiotika kodieren (Chlorothricin,[42] Kijanimicin,[43] Tetronomycin,[40] Tetrocarcin[41]). Alle enthalten ein einzigartiges Set von vier bis fünf Genen (Gen 4 und 5 treten manchmal fusioniert als ein Gen auf), das die Synthese der Tetronsäure-Einheit ermöglicht. Das erste Cluster, das identifiziert wurde, war das Chlorothricin-Gencluster (chl) im Jahr 2006.[42] Aufgrund von Ähnlichkeiten von ChlD1 (aus dem Biosynthesegencluster für Chlorothricin) mit FkbH,[114] von dem schon seit längerem bekannt ist, dass es in die Methoxymalonyl-ACP Synthese involviert ist, wurde vorgeschlagen, dass ChlD1-ChlD4 die Bildung der Tetronsäure-Einheit katalysieren.[42] Da die Inaktivierung von ChlM zu keinem Ausfall der Chlorothricin-Produktion führte, schien dieses Gen nichts mit der Biosynthese von Chlorothricin zu tun zu haben.[115] Später wurden Hinweise gefunden, dass im Genom des Chlorothricin-Produzenten mehrere Kopien von ChlM vorhanden sind, was dazu geführt haben könnte, dass die zusätzlichen Kopien die Unterbrechung von ChlM wettgemacht haben.[41] Alle weiteren Gencluster enthielten ebenfalls ein Homologes von ChlM; in allen Fällen ist dieses Gen im gleichen Operon mit den nachfolgenden Genen. Die Inaktivierung von *tmn15* im Tetronomyin-Gencluster (tmn) führte zum Ausfall der Tetronomycin-Produktion. Diese Fakten führen zur Annahme, dass statt der ursprünglich angenommenen vier Gene (*abyA2-A5*) fünf (*abyA1-A5*) für die Tetronat-Biosynthese notwendig sind.[40,41,43] Die Ergebnisse der Untersuchung des Abyssomicin-Genclusters stützen diese Hypothese – Deletion der Gene *abyA1*, *abyA2*, *abyA3*, *abyA4* führte zu einem kompletten Ausfall der Abyssomicin-Produktion. Aufgrund von Sequenzhomologien lassen sich die Funktionen der einzelnen Enzyme abschätzen. Biochemisch untersucht sind aber nur die Homologen von AbyA2 und AbyA3. AbyA1 ist eine 3-Oxoacyl-(ACP) Synthase III, AbyA2 eine Phosphatase und Glyceryl-Transferase (FkbH), AbyA3 ein diskretes ACP (Acyl-Carrier-Protein), AbyA4 ein Protein, das eine Dehydrogenase-Einheit enthält und AbyA5 ein Acyltransferase-ähnliches Protein. Sun *et al.* konnten in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass der Transfer einer Glyceryl-Einheit von D-1,3-Bisphosphoglycerat auf die AbyA2-Homologen Tmn7a und ChlD2 (diskrete ACP) durch das AbyA2-Homologe Tmn16 katalysiert wird und zu Glyceryl-S-ACP führt (Abbildung 79).[116] Der zweite Schritt, die Bindung von Glyceryl-ACP an die entstehende Polyketid-Kette und Abspaltung von der Polyketidsynthase ist ebensowenig aufgeklärt wie die Dehydratisierung des Addukts, um zum Diels-Alder-Edukt **3** zu kommen (Abbildung 86).

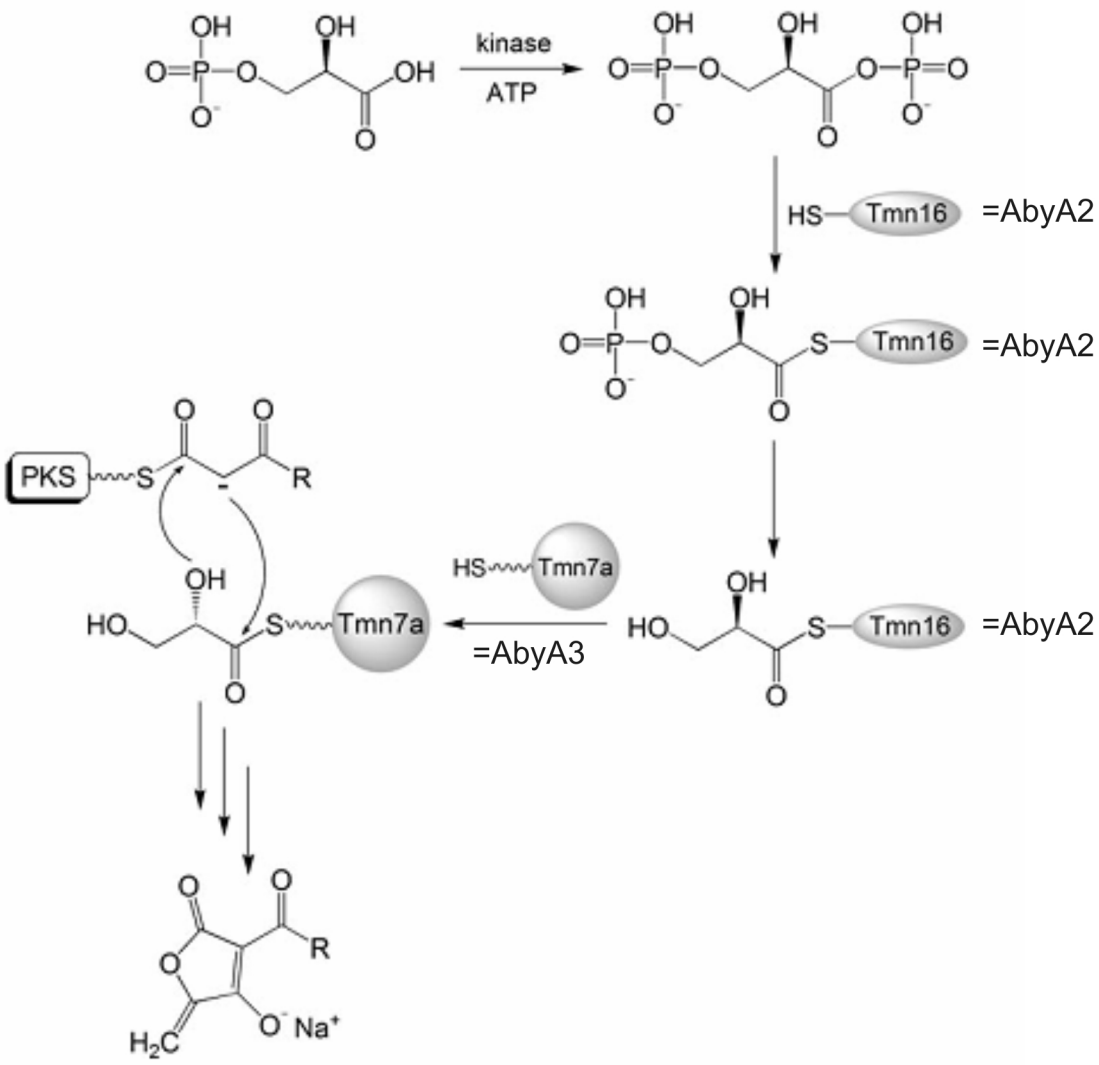


Abbildung 79: Schema aus Sun et al.[116]: D-1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) wird katalysiert von Tmn16 (entspricht AbyA2) auf Tmn7a (entspricht AbyA3, einer diskreten ACP) geladen. Anschließend folgen mehrere Reaktionen, die zur Bildung der Tetronsäure führen, aber noch nicht genau definiert werden können. Es ist unter anderem unklar, ob die C-O-Verknüpfung oder die C-C-Verknüpfung zuerst geschieht (siehe auch Abbildung 86).[116]

Interessanterweise fehlt beim Abyssomicin-Gencluster eine FAD-abhängige Oxidoreduktase wie KijA oder Tmn9, von der angenommen wurde, dass sie die Dehydratisierung des Addukts und möglicherweise die Diels-Alder-Reaktion katalysiert.[40,43] Kreuz-Komplementierungsexperimente *in vivo* haben gezeigt, dass die Homologen von AbyA3 und AbyA4 zwischen den Genclustern von Chlorothricin und Tetrocarcin austauschbar sind. Dies ist nicht außerordentlich überraschend, da die beiden Tetronsäureantibiotika sich strukturell sehr stark ähneln (Abbildung 18).[41] Die genaue Funktion dieser Enzyme ist jedoch nach wie vor unbekannt.

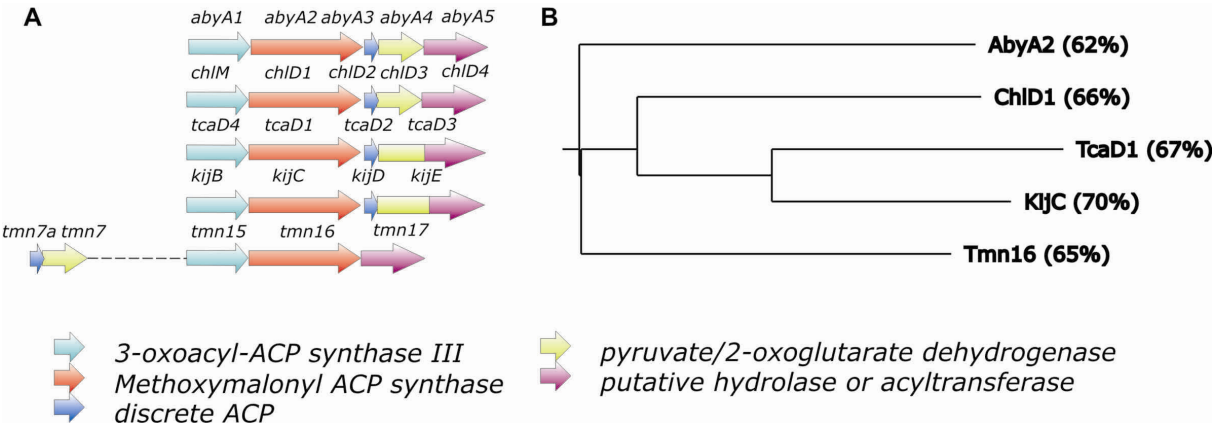


Abbildung 80: A) Gegenüberstellung der Tetronsäure-Gene aus den unterschiedlichen Organismen. Aby≙ Abyssomicin, chl ≙ Chlorothricin, tca ≙ Tetrocarcin, kij ≙ Kijanimicin, tmn ≙ Tetronomycin. B) Sequenzvergleich mittels Alignment der Homologen von AbyA2.

Sequenzvergleiche der fünf Versionen dieser Enzyme zeigen, dass Kijanimicin und Tetrocarin am nächsten miteinander verwandt sind (durchschnittlich 68 % bzw. 64,8 % Übereinstimmung bei einem *exhaustive pairwise global alignment* aller fünf Sequenzen sowie einem *progressive assembly of alignments using Neighbour–Joining phylogeny*). Chlorothricin mit 63 % Übereinstimmung ist an dritter Stelle, gefolgt von Tetronomycin und *atrop*-Abyssomicin C (59,5 % bzw. 58,75 %, Abbildung 80).

In allen bisher sequenzierten Genclustern befindet sich das Tetronsäure-Biosynthesegen-Set am 3'-Ende der PKS I-Gene, bei *atrop*-Abyssomicin C liegt es vollständig im 5'-Bereich. Es scheint als Ganzes weitergegeben zu werden. Nur im Tetronomycin-Cluster werden die Gene nicht in einem einzigen Operon transkribiert, sondern sind in zwei Bereiche innerhalb des Clusters aufgeteilt. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Substratspezifität von AbyA2 leicht von den entsprechenden verwandten Proteinen der anderen Biosynthesegencluster abweicht. Sequenzvergleiche mit dem Glyceryl-Transferase/Phosphatase-Prototyp OzmB und den AbyA1/FkBH-Homologen zeigen, dass in *Verrucosispora* AB-18-032 das konservierte Motiv der Glyceryl-Bindestelle leicht mutiert ist: A541 statt V541 (Abbildung 81).[117] Der sterische und chemische Unterschied zwischen Valin und Alanin ist allerdings so geringfügig, so dass der Austausch u. U. keine Auswirkungen hat.

```
AbyA1     530 -lhvdnfvlscrafsrgvet
TcaD1     539 -vhidnfllscrvfargiet
KijC      534 -lridnfvlscrvfsrgiet
Tmn16     536 -whvdnfllscrvfargieq
ChlD1     534 tlhldnfllscrvfsrgieq
OzmB      259 -whikllatscrvvsfgvga
```

Abbildung 81: Alignment der OzmB/AbyA1 analogen Proteine: Ausschnitt aus der Glyceryl-Bindestelle (AbyA1 ≙ Abyssomicin, TcaD1 ≙ Tetrocarcin, KijC ≙ Kijanimicin, Tmn16 ≙ Tetronomycin, ChlD1≙ Chlorothricin, OzmB ≙ Oxazolomycin).

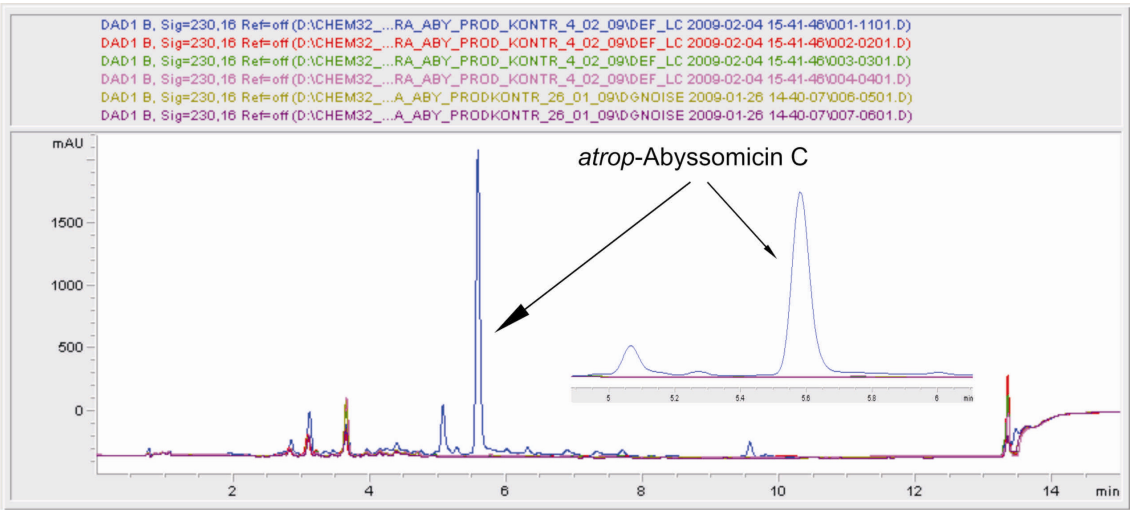


Abbildung 82: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyA1 *Mutanten (Klon VI, rote Spur; Klon 12, grüne Spur; Klon 14/9, hellviolette Spur; Klon VIII/1, gelbe Spur; Klon VIII/3, violette Spur).*

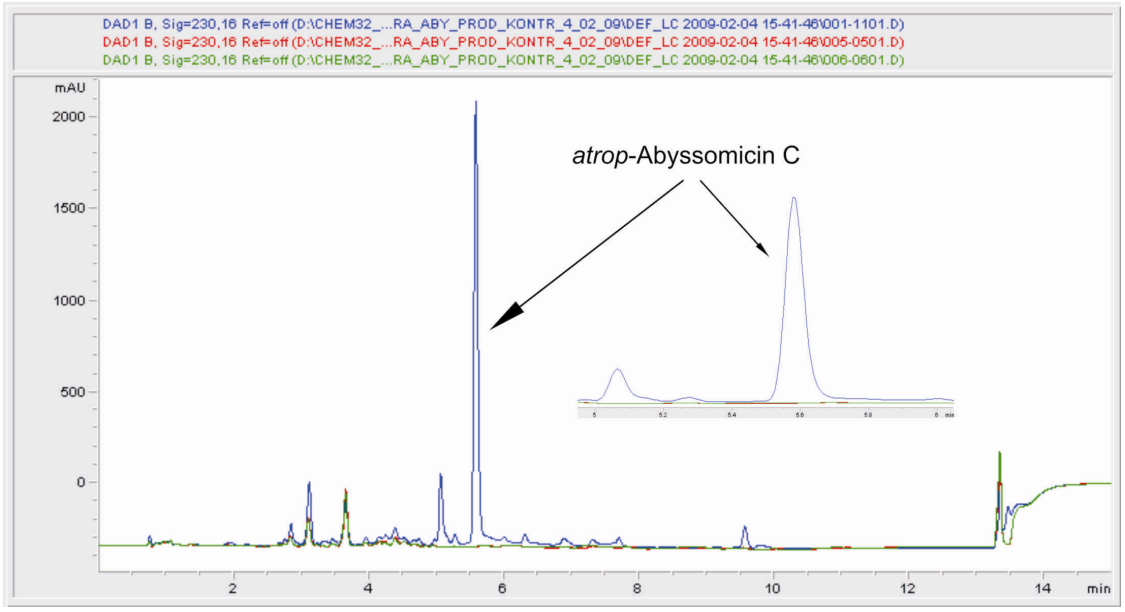


Abbildung 83: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyA2 *Mutanten (Klon III/1, rote Spur; Klon III/12, grüne Spur).*

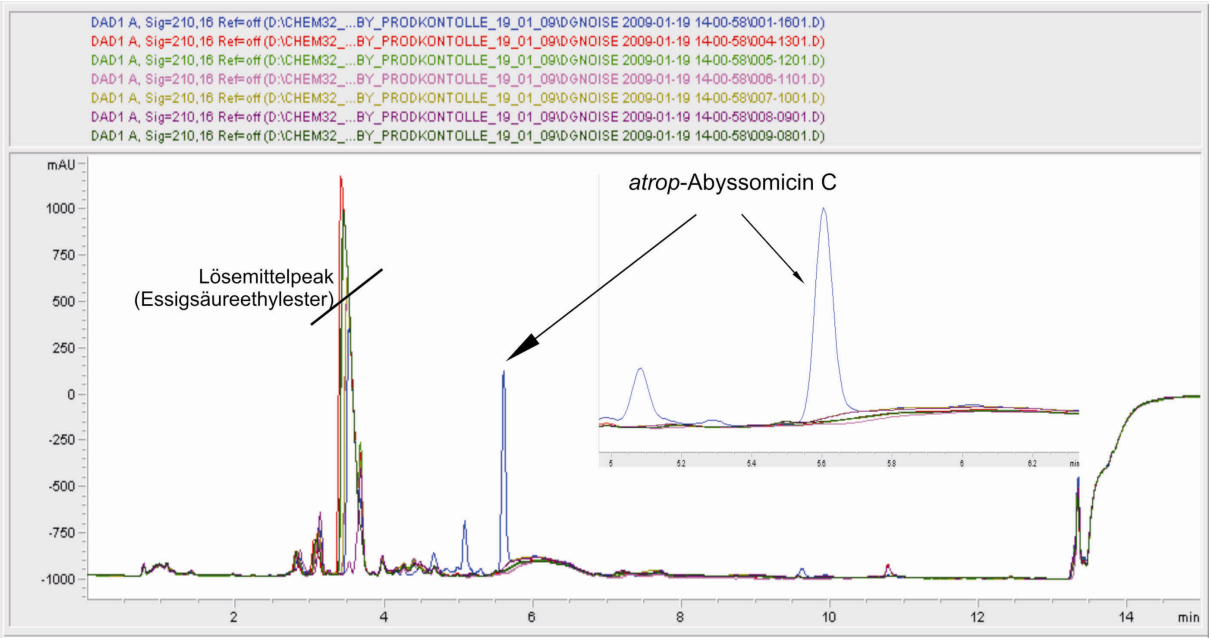


Abbildung 84: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyA3 *Mutanten (Klon I/5, rote Spur; Klon I/9, hellgrüne Spur; Klon II/2, hellviolette Spur; Klon II/5, gelbe Spur; Klon IIIb/3, dunkelviolette Spur; Klon IIIb/7, dunkelgrüne Spur)*

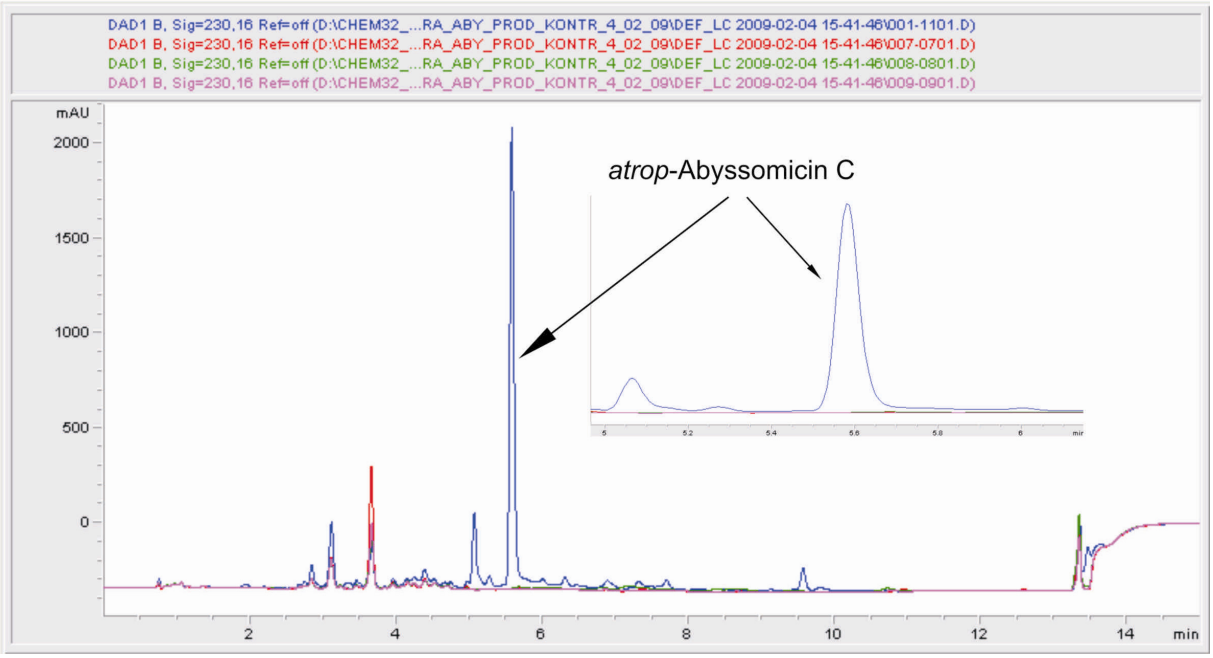


Abbildung 85: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyA4 *Mutanten (Klon IIb/32, rote Spur; Klon 7/2, grüne Spur; Klon 9/3, violette Spur).*

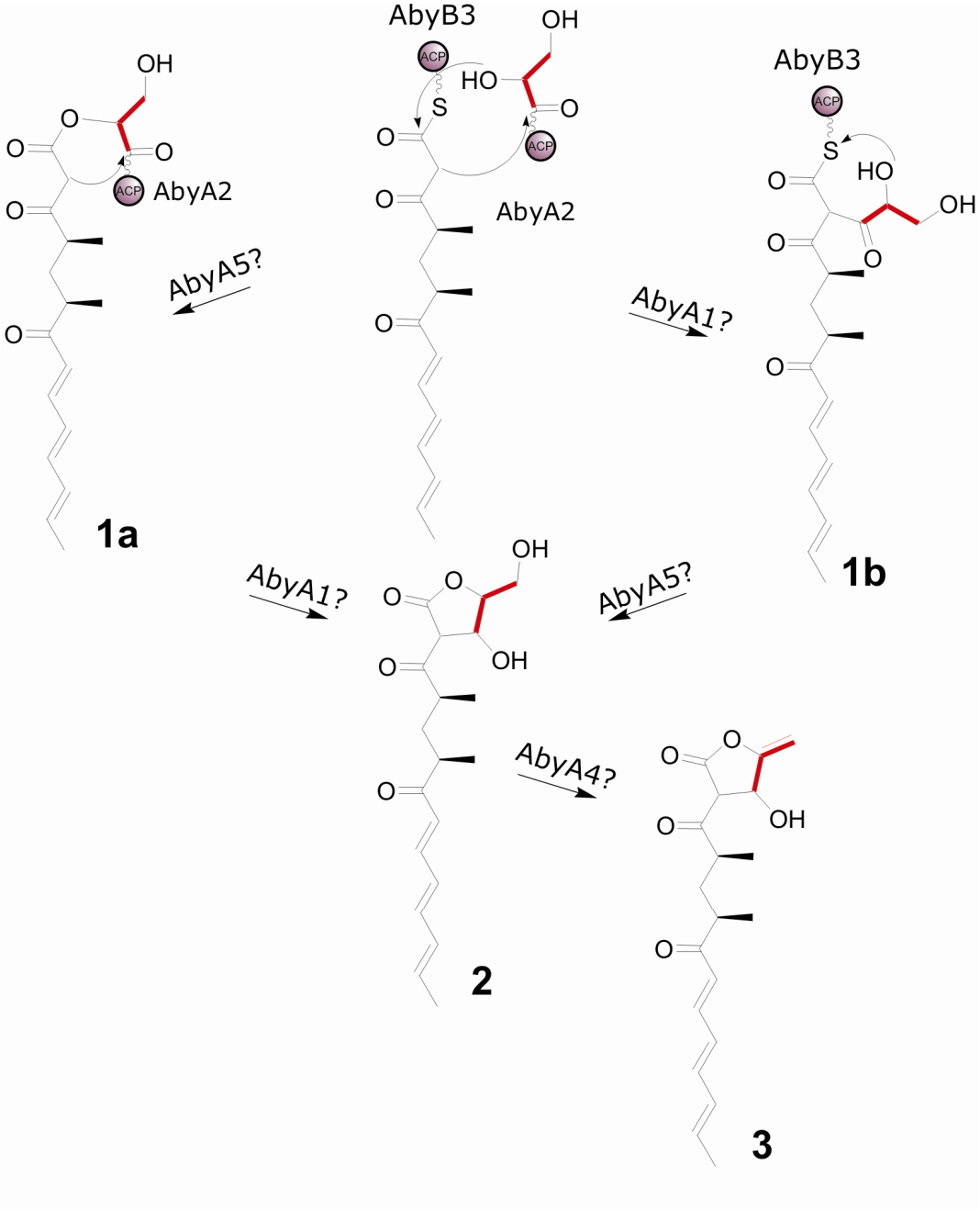


*Abbildung 86: Hypothetisches Biosyntheseschema der Tetronsäureeinheit.. Die Reihenfolge der Ausbildung der C-C-Bindung und der C-O-Bindungist hier noch nicht definiert. AbyA1 ähnelt einer β-Ketoacyl-ACP-Synthase III, welche den ersten Kondensationsschritt bei der Fettsäurebiosynthese katalyiert, und könnte die Ausbildung der C-C-Bindung katalysieren und zu **1b** bzw. **2** führen.[40] AbyA5 (ähnelt der α/β-Hydrolase-Proteinfamilie) könnte die C-O-Bindung katalysieren und zu **1a** bzw. **2** führen. Die in den anderen Tetronsäureantibiotika-Biosynthesegenclustern vorkommende FAD-abhängige Oxidoreduktase, die für die Katalyse der Dehydratisierung von **2** vorgeschlagen wurde,[40,43] fehlt beim atrop-Abyssomicin C-Biosynthesegencluster. Stattdessen könnte möglicherweise AbyA4 (enthält eine einer Dehydrogenase ähnliche Domäne) die Bildung von **3** katalysieren.*

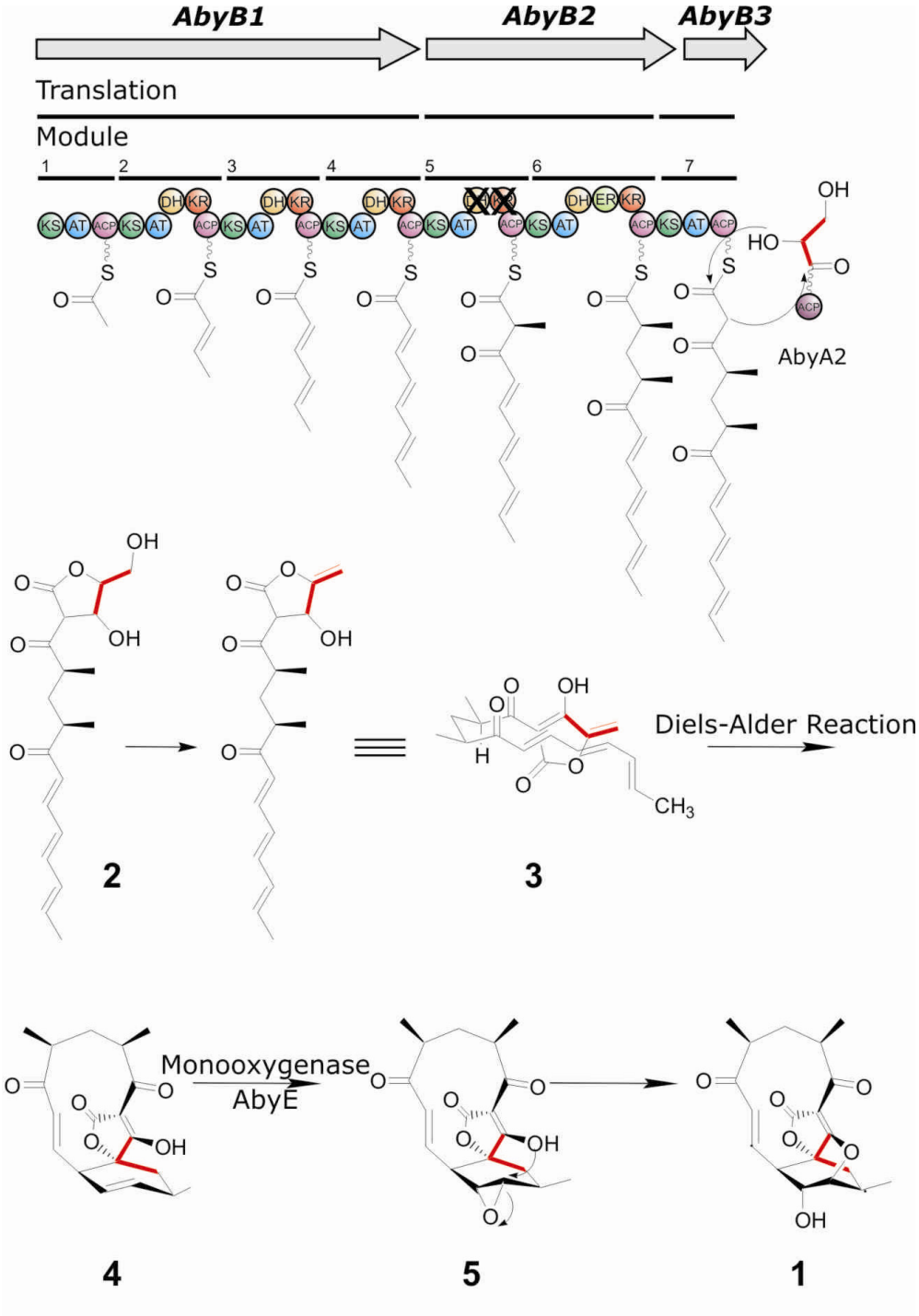


Abbildung 87: Hypothetisches Biosyntheseschema für atrop-*Abyssomicin C. Nachdem die Polyketidkette fertiggestellt ist, wird sie durch die Anbindung an Glyceryl-ACP (AbyA3) unter Bildung der Tetronsäureeinheit von der Polyketidsynthase abgespalten. Nach Dehydratisierung von* ***2*** *entsteht das Diels-Alder-Edukt* ***3****, welches entweder unter Mitwirkung einer unbekannten Diels-Alderase oder spontan in das Diels-Alder-Produkt* ***4*** *umgewandelt wird. Es folgt die Oxygenierung an der Doppelbindung des 6-Ringes, woraufhin die Hydroxyfunktion der Tetronsäure den Epoxidring öffnet und so zur Bildung von* atrop-*Abyssomicin C (****1****) führt.*

4.2.7 Die *atrop*-Abyssomicin-Biosynthese

Der lineare Vorläufer **3** des Abyssomicins (Abbildung 87), der nach der Bildung der Tetronsäure entstanden ist, wird höchstwahrscheinlich analog zur Totalsynthese von *atrop*-Abyssomicin C, die von Snider und Zou veröffentlicht wurde, in einer Diels-Alder-Reaktion in das Diels-Alder-Produkt **4** umgewandelt. Snider und Zou berichten, dass das Methoxy-geschützte lineare Tetronat unter sehr milden Bedingungen in das Diels-Alder-Produkt umgewandelt wurde: Nach einer Woche bei 25° C in $CDCl_3$ hatten 40 % reagiert (Abbildung 88).[32]

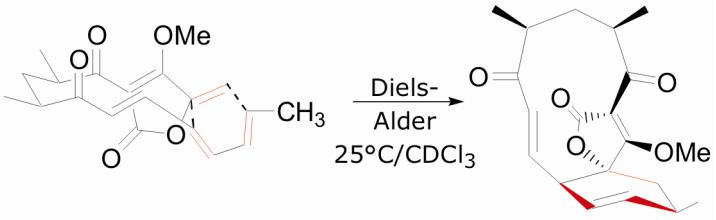


Abbildung 88: Chemisch-synthetische Umwandlung des linearen Methoxy-Tetronats in das Methoxy-Diels-Alder-Produkt.[32]

Daher scheint es durchaus möglich, dass *atrop*-Abyssomicin C unter physiologischen Bedingungen ohne die Hilfe einer mutmaßlichen Diels-Alderase entsteht. Von vielen in der Natur vorkommenden Stoffen wird angenommen, dass sie Diels-Alder-Produkte sind, allerdings konnten bisher erst zwei natürliche Enzyme isoliert und ihre Funktion als Katalysatoren für eine Diels-Alder-Reaktion bestätigt werden.[118,119] Bei der Betrachtung des *atrop*-Abyssomicin C-Genclusters und Naturstoffen der Tetronat-Familie, Kijanimicin, Chlorothricin und Tetrocarcin, [42,43] für die alle eine Diels-Alder-Reaktion vorgeschlagen wurde, fällt *ad hoc* kein Enzym auf, welches ein offensichtlicher Kandidat für die Diels-Alderase wäre – abgesehen von der Polyketidsynthase selbst. Allerdings geschehen die Abspaltung der Polyketidkette von der Synthase und mindestens zwei weitere Schritte vor der Diels-Alder-Reaktion. Es scheint daher fragwürdig, ob der Metabolit in der Nähe der Polyketidsynthase bleibt, um nach mehreren anderen Templat-unabhängigen Biosyntheseschritten von dieser katalysiert zum Diels-Alder-Addukt umgesetzt zu werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder klar ist, ob eine Diels-Alderase notwendig ist noch welcher ORF dafür kodieren könnte.

4.2.7.1 Oxidation des Diels-Alder Produkts – *abyE* und *orfV*

AbyE ist eine Monooxygenase, die der großen Familie der bakteriellen Luciferase-ähnlichen Proteinen stark ähnelt. Über diese Proteinfamilie ist wenig bekannt; die meisten Mitglieder sind nicht charakterisiert. Die *InterPro*-Analyse ergab, dass die bakterielle Luciferase eine Flavin-Monooxygenase ist, die die Oxidation von langkettigen Aldehyden unter Verwendung von molekularem Sauerstoff katalysiert und Energie in Form von sichtbarem Licht abgibt. Bakterielle Luciferasen nutzen Flavin als Substrat und nicht als Cofaktor. Die Deletion von *abyE* führte zu einer Reduktion der *atrop*-Abyssomicin C-Produktion auf ca. 10 % des Wildtyp-Niveaus (Abbildung 90, Abbildung 91 und Tabelle

32). Detaillierte Analyse des Extrakts aus dem Überstand und den Zellen mit Essigsäureethylester mittels HPLC-ESI-MS ergab keinen offensichtlichen Kandidaten für ein Biosyntheseintermediat. Eine Möglichkeit ist die anderweitige Oxidation des vermuteten Diels-Alder-Produkts in der Zelle, weswegen die Produktion nicht völlig zum Erliegen kommt. Komplementation der Mutante mit einer Kopie des Gens auf dem Plasmid pSETermE* führte in einem Fall zur Wiederherstellung der Produktion auf ca. 22 % des Wildtyp-Niveaus. Da die Produktion auch im Wildtyp teils größeren Schwankungen unterliegt, ist dieser Wert nicht signifikant. Im verwendeten Plasmid pSETermE* fehlt die ribosomale Bindestelle, daher ist die Effizienz der Translation wahrscheinlich eher gering. Derzeit werden diese Experimente mit neuen Primern, die auch jeweils die ribosomale Bindestelle des Gens enthalten, wiederholt.

Als alternatives Enzym, welches das Diels-Alder-Produkt oxidieren könnte, käme auch OrfV in Frage. OrfV gehört zur Cytochrom P450-Familie und besitzt hohe Homologie zur Vitamin D Hydroxylase Cytochrom P450 105a1, die zwei Hydroxylierungsreaktionen von Vitamin D3 katalysiert, welche zur aktiven Form 1,25-Dihydroxyvitamin D3 führen.[120] Bei der *atrop*-Abyssomicin C-Biosynthese könnte das Diels-Alder-Produkt hydroxyliert werden und so zu einem der unten abgebildeten Derivate führen (Abbildung 89).

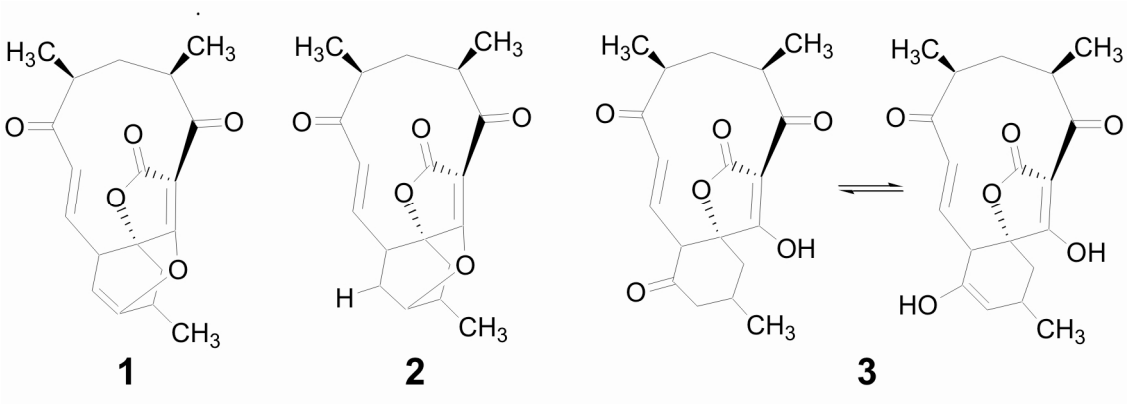


Abbildung 89: Mögliche Zwischenprodukte der atrop-Abyssomicin C-Biosynthese. ***1*** *und* ***2****: hypothetische Edukte der Hydroxylierung nach intramolekularem Angriff.* ***3****: hydroxyliertes Diels-Alder-Produkt, welches in der Keto-Form vorliegen müsste.*

Weder im Kulturfiltrat von *Verrucosispora*ΔΔ*abyE* noch von *Verrucosispora* pK18mob2[*orfV*] oder *Verrucosispora* pK18mob2[*orfX*] konnte eine der mutmaßlichen Vorstufen mittels HPLC-ESI-MS entdeckt werden. Mögliche Gründe hierfür könnten eine sehr geringe Konzentration der Zwischenstufen sein, der komplette Ausfall der Produktion (im Fall der Singlecrossover-Mutanten) durch polare Effekte oder der Umstand, dass unsere Biosynthesehypothese nicht korrekt ist. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die genaue Abfolge von Reaktionen zu untersuchen.

Tabelle 32: Produktionskontrolle VerrucosisporaΔΔabyE: Peakflächen im Vergleich zum Wildtyp

Klon	Peakfläche [mAU]	t_R	Relative Produktion [%]	Datum der Messung
Wildtyp, 3 Schikanen, aus Kryokultur	4931	5,604	100.0	19.01.2009
Wildtyp, 3 Schikanen, aus Sporen	2728,6	5,604	55.3	19.01.2009
Wildtyp, 1 Schikane, aus Sporen	2882,1	5,607	58.4	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE II 13	368,6	5,609	7.5	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE II 17	491,1	5,606	10.0	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE III 1	470,5	5,604	9.5	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE III 5	374,9	5,605	7.6	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE V 11	471,7	5,606	9.6	19.01.2009
VerrucosisporaΔΔabyE V 19	636,3	5,602	12.9	19.01.2009

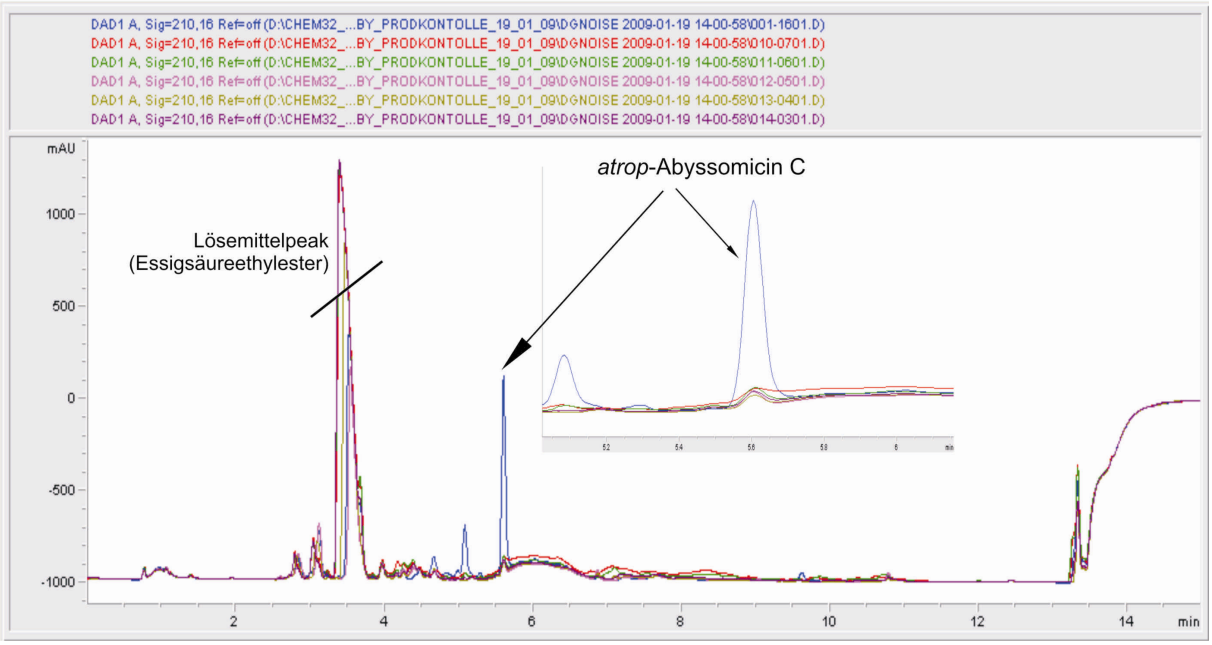


Abbildung 90: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (blaue Spur) und VerrucosisporaΔΔabyE *Mutanten (Klon II/13, rote Spur; Klon II/17, hellgrüne Spur; Klon III/1, hellviolette Spur; Klon V/13, gelbe Spur; Klon V/19, dunkelviolette Spur)*

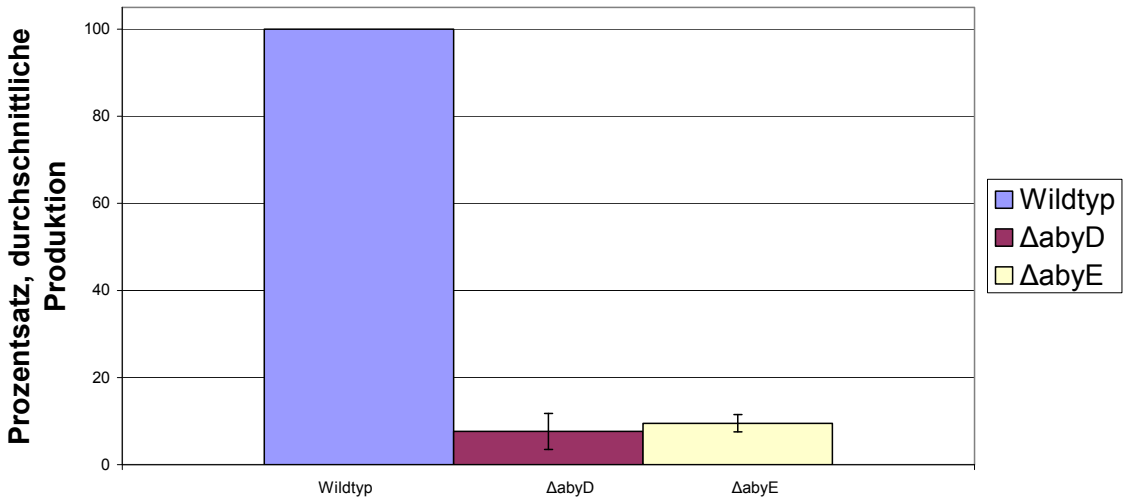


Abbildung 91: Durchschnittliche atrop-Abyssomicin-Produktion durch die Mutanten Verrucosispora*ΔΔ*abyD *und* Verrucosispora*ΔΔ*abyE *([Peakfläche Mutante/Peakfläche Wildtyp]*100, jeweils Durchschnitt aller getesteten Mutanten) Der Wildtyp hat keinen Fehlerbereich, da ein einziger Klon je Fermentation als Referenz diente (Tabelle 31 und Tabelle 32).*

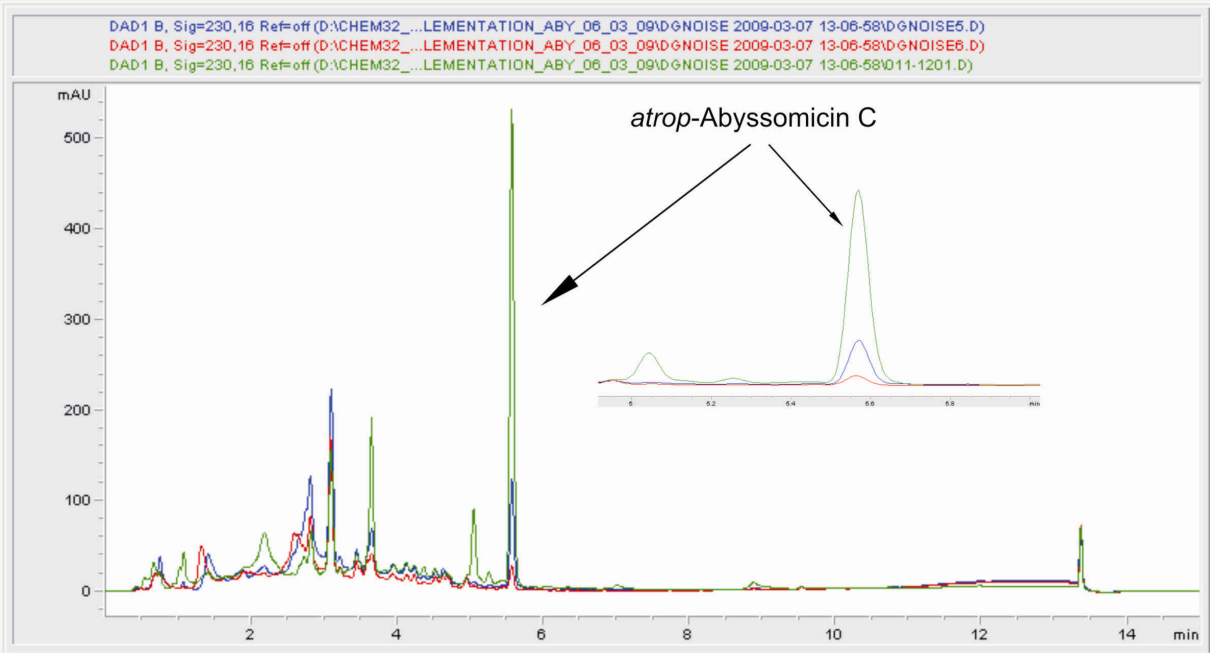


Abbildung 92: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp (grüne Spur) und Verrucosispora*ΔΔ*abyE*::pSETermE* Mutanten (Klon 1, rote Spur; Klon 2, blaue Spur).*

4.2.8 Zusammenfassung der Geninaktivierungs- und Gendeletionsexperimente

Tabelle 33: Zusammenfassung aller Knockout-Experimente: Art der Mutante, Anzahl der Klone, Analysemethode (HPLC-DAD oder HPLC-ESI-MS) und Ergebnis.

Gen	Art der Mutante	Analytik	Abyssomicin Produktion (ja / nein), Identifizierung
*orfX**	Singlecrossover	2 Klone; HPLC-DAD und HPLC-MS	1 Klon Abyssomicin D und C; Masse, UV-Spektrum 1 Klon keine Abyssomicin Produktion
abyH	-		
abyI	Doppelcrossover	3 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyK	-		
abyA1	Doppelcrossover	5 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyA2	Doppelcrossover	2 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyA3	Doppelcrossover	6 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyA4	Doppelcrossover	4 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyA5	Doppelcrossover – Mutantenerstellung gescheitert		
abyB1	Singlecrossover, nicht bestätigt.	2 Klone, HPLC-DAD	Keine Abyssomicin-Produktion
abyB2	-		
abyB3	-		
abyC	Doppelcrossover – Mutantenerstellung gescheitert		
abyD	Doppelcrossover	HPLC-DAD, 3 Klone	10% Aby C (UV Spektrum, t_R)
abyE	Singlecrossover, Doppelcrossover	6 Klone, HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS	10% Aby C (UV Spektrum, t_R, Masse
abyF1	-		
abyF2	-		

Gen	Art der Mutante	Analytik	Abyssomicin Produktion (ja / nein), Identifizierung
abyF3	-		
abyF4	-		
*orfV**	Singlecrossover	3 Klone, 2x angezogen, HPLC-DAD und HPLC-MS	Keine Abyssomicin-Produktion
orfW	-		
orfZ	-		
orfT	-		
orfU	-		

4.2.9 Weitere Abyssomicine aus *Verrucosispora* AB-18-032 und *Streptomyces sp.* (HKI0381)

2007 konnte von Niu *et al.* im Kulturfiltrat von *Streptomyces sp.* (HKI0381) ein Metabolit identifiziert werden, der hohe Ähnlichkeit zu der Familie der Abyssomicine aufwies.[49] Dieser Metabolit, der Abyssomicin E genannt wurde (nicht zu verwechseln mit dem Abyssomicin E genannten Peak, der von Bister *et al.* im Kulturfiltrat von *Verrucosispora* AB-18-032 gefunden wurde, s. Abschnitt 1.1), ähnelt am stärksten Abyssomicin D und entspricht den Produkten von Umsetzungsreaktionen von Abyssomicin C mit Nukleophilen.[23,24,46,48] Es ist somit denkbar, dass die Biosynthese von Abyssomicin E analog zu *atrop*-Abyssomicin C abläuft, allerdings analog zur Biosynthese von Erythromycin am C-6 hydroxyliert wird und anschließend während der Aufarbeitung in einer nukleophilen Addition am Michael-System mit dem Lösungsmittel Methanol reagiert (Abbildung 93).[121]

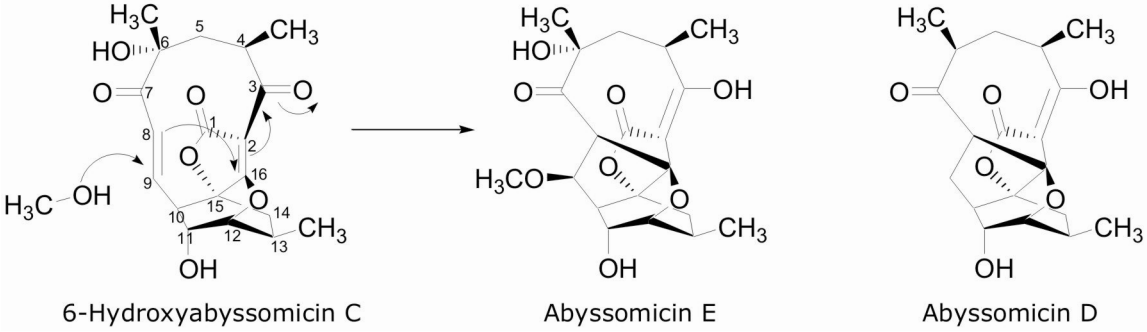


Abbildung 93: Hypothetisches Schema zur Umwandlung von Hydroxyabyssomicin C zu Abyssomicin E. Zum Vergleich Abyssomicin D, wie es im Kultufiltrat von Verrucosispora AB-18-032 vorkommt.

4.3 Fütterungsstudien zur Herkunft der C3-Einheit im Tetronsäure-Motiv

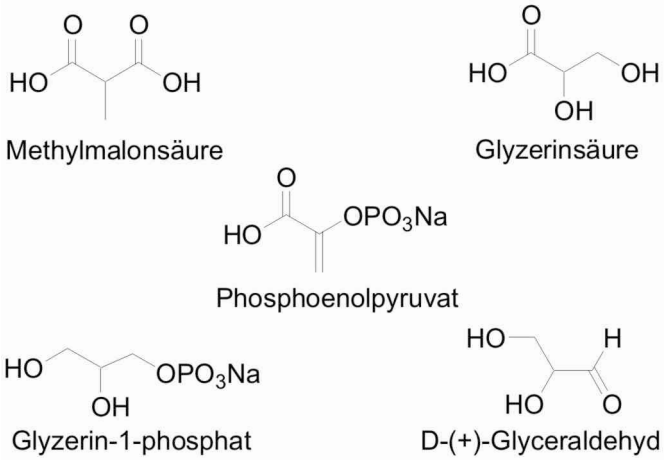


Abbildung 94: Mutmaßliche Vorstufen für die Biosynthese der Tetronsäure

Aufgrund der ursprünglichen Biosynthesehypothese für die Tetronsäure in Chlorothricin nach Jia et al.[42], in der angenommen wurde, dass Phosphoenolpyruvat auf eine diskrete ACP geladen wird (bei Abyssomicin AbyA3), sollten Fütterungsexperimente mit möglichen Vorstufen der Tetronsäure durchgeführt werden, um zu testen, welches dieser Substrate aufgeladen werden kann. In fünf Schüttelkolben (100 ml Kolben, 3 Schikanen, 30 ml SGG-Medium) einer 48 h alten Hauptkultur von *Verrucosispora*ΔΔ*abyA4* wurde jeweils eine der fünf mutmaßlichen Vorstufen für die Tetronsäurebiosynthese zugegeben (5 Pulse im Abstand von zwei Stunden; insgesamt jeweils ca. 15-20 mg in 1 ml H_2O, sterilfiltriert). Nach insgesamt 72 h Fermentation wurden die Kulturen geerntet und einer Produktionskontrolle mittels HPLC-ESI-MS unterzogen. Es konnte kein Abyssomicin im Kulturfiltrat detektiert werden. Die Fütterung der Zwischenstufen an *Verrucosispora*ΔΔ*abyA5* wäre ebenfalls von Interesse gewesen, leider gelang es nicht, diese Mutante zu generieren. Die Mutanten *Verrucosispora*ΔΔ*abyA2* und *Verrucosispora*ΔΔ*abyA3* wurden nicht gefüttert, da AbyA3 ein diskretes ACP ist und AbyA2 mit hoher Wahrscheinlichkeit die Beladung von AbyA3 katalysiert.[116]

4.4 Abyssomicin im Überstand

Abyssomicin lässt sich im Kulturüberstand nur schlecht nachweisen, für ein aussagekräftiges Chromatogramm muss die wässrige Lösung mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt werden. Die Extrakte werden nach einer 10-fachen Aufkonzentration gemessen (Extrakt aus 5 ml Überstand wird in 500 µl gelöst). Anschließend ist *atrop*-Abyssomicin C im Wildtyp üblicherweise sehr gut nachweisbar. Mittels Zugabe von aufgereinigtem *atrop*-Abyssomicin C zu Kulturüberstand sollte gezeigt werden, dass es sich nicht um ein Problem der Konzentration handelt, sondern dass Abyssomicin im Kulturüberstand maskiert wird. Hierzu wurde isoliertes *atrop*-Abyssomicin C in Methanol gelöst (ca. 1 mg/ml) und einerseits 1:10 (v/v) mit Wasser, andererseits 1:10 (v/v) mit Kulturüberstand verdünnt. Die darauf anschließende HPLC-DAD-Messung ergab, dass der hohe *atrop*-Abyssomicin C-Peak, der in der Wasserverdünnung sichtbar wird, im Überstand auf 45 % schrumpft. Dies lässt vermuten, dass *atrop*-Abyssomicin C von einem Protein oder anderen Bestandteilen im Kulturüberstand gebunden und so maskiert wird. Nach Inkubation für 14 h bei Raumtemperatur misst der *atrop*-Abyssomicin C-Peak nur mehr 23 % der Peakgröße derselben Menge an Abyssomicin in Wasser. Dies deutet entweder auf einen Abbauprozess hin oder auf die zunehmende Bindung von *atrop*-Abyssomicin C durch ein maskierendes Agens bei längerer Inkubation.

*Tabelle 34: Vergleich der Peakflächen bei Versuchen mit atrop-Abyssomicin im Kulturüberstand. Normierte Werte: (Peakfläche Probe / Peakfläche atrop-Abyssomicin 1:10 (v/v) in H_2O)*100*

Probe	Retentionszeit [min]	Fläche [mAU]	Fläche normiert auf reines *atrop*-Abyssomicin C [%]
Kulturüberstand	5,640	53	5
atrop-Abyssomicin C 1:10 (v/v) in H_2O	5,661	1010.6	100
atrop-Abyssomicin C 1:10 (v/v) im Überstand nach 0h	5,642	459	45
atrop-Abyssomicin C 1:10 (v/v) im Überstand nach 14 h	5,655	233.3	23

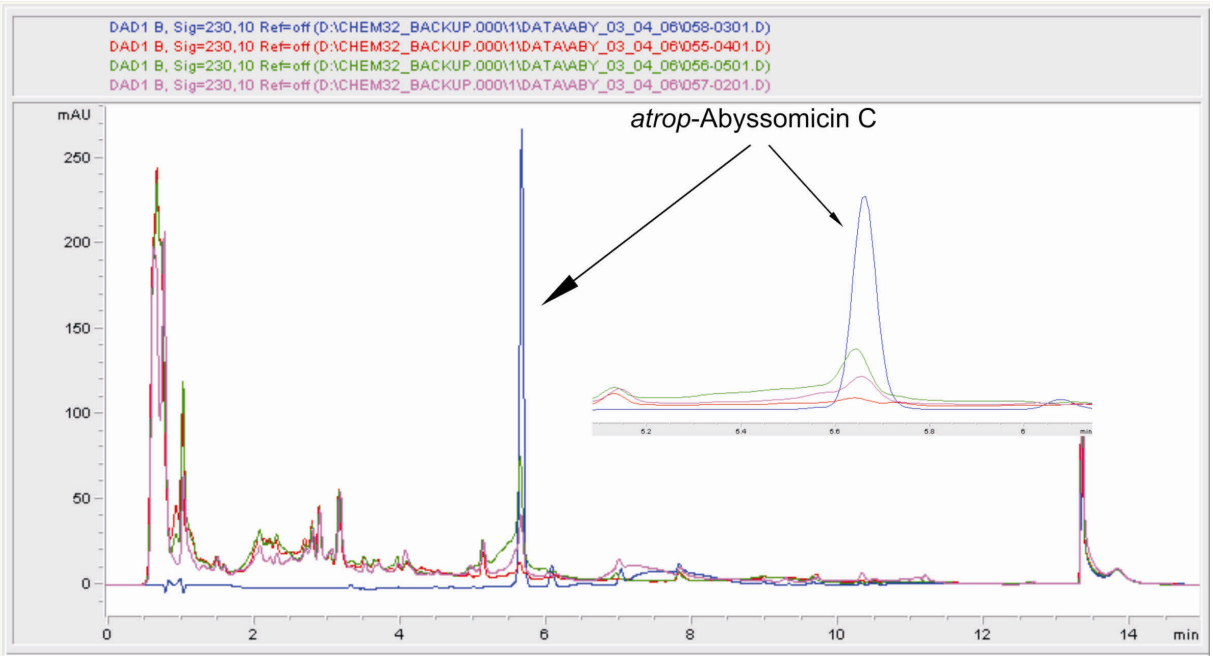


Abbildung 95: Vergleichende Chromatogramme vor und nach Zugabe von Abyssomicin zum Kulturfiltrat von Verrucosispora AB-18-032. Aufgereinigtes atrop-Abyssomicin C (1:10 in Wasser verdünnt, blaue Spur), Kulturfiltrat von Verrucosispora AB-18-032 (rote Spur), Kulturfiltrat unmittelbar nach Zugabe von atrop-*Abyssomicin C (grüne Spur) und Kulturfiltrat 14 h nach Zugabe von atrop-Abyssomicin C (violett Spur).*

4.5 Mutagenisierung mit Streptomycin

Haifeng Hu und Kozo Ochi berichteten 2001, dass es ihnen gelungen war, die Produktion von Actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* durch ein einfaches Experiment dramatisch zu erhöhen:[122] Kolonien, die spontan eine Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin, Gentamicin oder Rifampin entwickelten, produzierten in 5-10 % der Fälle um den Faktor 1,6 bis 3 mehr Actinorhodin als der Wildtyp. Die Generierung von mehrfach resistenten Stämmen führte zu Hochproduzenten, die bis zu 48mal mehr Actinorhodin produzierten. Mit dieser Methode sollte auch ein Hochproduzent von *atrop*-Abyssomicin C hergestellt werden, allerdings gibt es einen Nachteil im Vergleich zu Actinorhodin und *Streptomyces coelicolor*: Im Experiment von Ochi wurde die Menge an Actinorhodin durch Messung der OD_{633} abgeschätzt, d. h. dass der Kulturüberstand direkt gemessen werden konnte. Bei *Verrucosispora* hingegen ist eine aufwendige Extraktion nötig, die bei einer großen Anzahl an Proben sehr umständlich und zeitraubend wird (Verdampfen der Proben mit Rotationsverdampfern).

4.5.1 Durchführung

Die Gewinnung von spontanresistenten Klonen ist prinzipiell sehr einfach: Sporen werden auf SGG-Agar, der die geeignete Konzentration des Antibiotikums aufweist, ausgestrichen. Nach wenigen Tagen können die gewachsenen Kolonien auf eine frische Platte mit Antibiotikum übertragen, einige Tage inkubiert und schließlich konserviert werden. Zusätzlich wurde bei *Verrucosispora* AB-18-032 eine UV-Bestrahlung der Sporen vorgenommen, um einen zusätzlichen Mutationsdruck aufzubauen. Konkret muss also die geeignete Konzentration des jeweiligen Antibiotikums (der Wildtyp soll gerade nicht wachsen) und die geeignete Bestrahlungsdauer (5 % Überlebende) ermittelt werden.

4.5.1.1 Bestimmung derminimalen Hemmkonzentration

SGG-Platten mit verschiedenen Streptomycin-Konzentrationen (im ersten Experiment 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15 und 20µg/ml, im zweiten Experiment 1-5µg/ml) wurden mit je 30 µl Sporensuspension beimpft und bei 27° C 7 Tage lang inkubiert. Bei 2µg/ml Streptomycin war kein Wachstum von *Verrucosispora* AB-18-032 sichtbar. Diese Konzentration wurde für die weiteren Experimente eingesetzt. Streptomycin-Platten sollten immer frisch hergestellt werden, da Streptomycin nicht sehr stabil ist. Für Gentamicin wurde eine minimale Hemmkonzentration von 0,4µg/ml ermittelt.

4.5.1.2 Bestimmung der Überlebensrate bei UV-Bestrahlung

Die Sporen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-7}) auf SGG-Platten ausgestrichen und mit UV-Licht bestrahlt (umgekehrt ohne Deckel auf einen UV-Schirm gelegt), Bestrahlungsdauer: 0-20 s. Auszählbar waren die Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} (Abbildung 96).

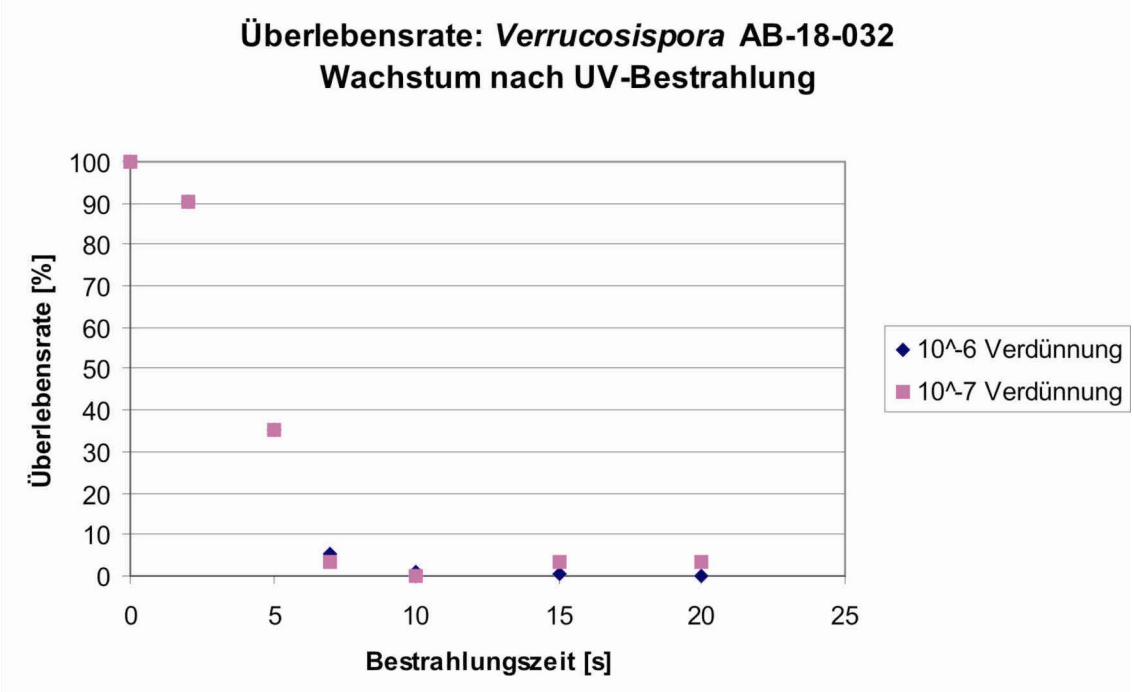


Abbildung 96: Bestimmung der Überlebensrate von Verrucosispora AB-18-032-Sporen nach UV-Bestrahlung.

4.5.1.3 Durchführung der Mutagenisierung von *Verrucosispora* AB-18-032

SGG-Agar-Platten mit 2µg/ml Streptomycin wurden mit 30 µl Sporensuspension beimpft und 7s lang mit UV bestrahlt. Die Platten wurden sofort im Dunkeln (um das Photo-Reparatursystem von Actinomyceten auszuschließen) und bei 27° C inkubiert. Nach 7 bis 10 Tagen konnten Einzelkolonien auf neuen Platten mit 2µg/ml Streptomycin ausgestrichen werden. Die Produktionskontrolle wurde immer mit Streptomycin im Medium durchgeführt. Von etwa 35 analysierten Streptomycin-resistenten Klonen produzierte ein einziger (Klon 15) signifikant mehr als der Wildtyp (Schwankungen beim Wildtyp um ca. 20 % sind normal). Bei einer Wiederholung der Fermentation produzierte dieser Klon allerdings signifikant weniger als der Wildtyp (Abbildung 97). Aufgrund der mangelnden Stabilität der Mutanten, der aufwendigen Analyse der Klone und weil eine Erhöhung der Produktivität durch gezielte genetische Manipulation von Regulatorgenen zielführender schien, wurden diese Experimente nicht weiter verfolgt.

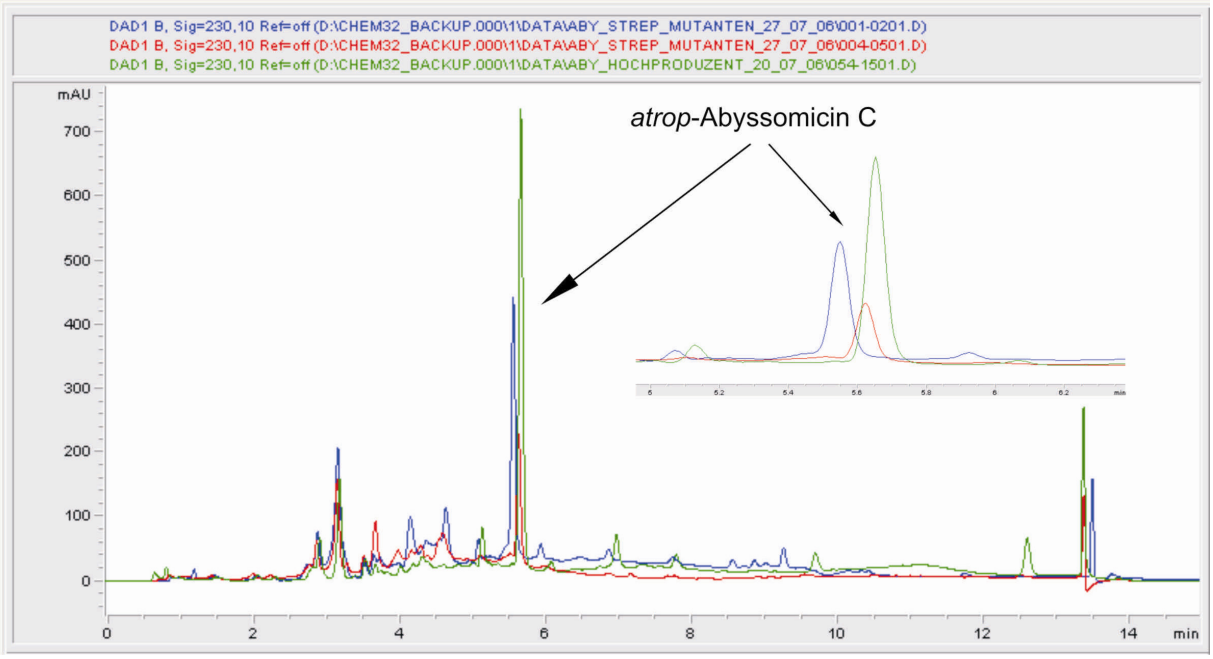


Abbildung 97: Vergleichende Chromatogramme von Verrucosispora AB-18-032 Wildtyp und Verrucosispra Streptomycin^R-Mutante Klon 15. Wildtyp (blaue Spur), Streptomycin^R-Mutante Klon 15 bei erster Fermentation (grüne Spur) und Streptomycin^R-Mutante Klon 15 bei zweiter Fermentation (rote Spur). Aufgrund von Pumpdruckschwankungen kam es zu leichten Retentionszeitenverschiebungen, mittels UV-Spektrum konnten diese Peaks eindeutig als atrop-*Abyssomicin C identifiziert werden.*

5 Abschlussdiskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Biosynthesegencluster des Polyketidantibiotikums *atrop*-Abyssomicin C identifiziert, sequenziert und untersucht. Mittels bioinformatischer Analyse konnte eine Reihe von Genen identifizert werden, die für die Biosynthese von atrop-Abyssomicin C notwendig sind. Die Ränder des Clusters können ebenso wie eine Biosynthesehypothese skizziert werden, eine endgültige Bestätigung dieser Punkte steht allerdings noch aus. Weitere Experimente, die die Eigenschaften von *atrop*-Abyssomicin C und *Verrucosispora* AB-18-032 charakterisierten, wurden ebenfalls beschrieben. Im Folgenden sind die momentan in unserer Arbeitsgruppe geplanten Experimente sowie noch nicht konkret geplante, aber interessante und möglicherweise lohnende Projekte aufgeführt.

Clusterränder

Die Clusterränder müssen noch näher bestimmt werden. Durch eine Kooperation mit der Gruppe von James E.M. Stach von der Universität Newcastle werden unserer Arbeitsgruppe Sequenzen der benachbarten Regionen zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung von Mutanten in diesen Regionen wird in Kooperation mit Stach *et al.* durchgeführt werden. Hier können möglicherweise Hinweise auf einen Selbstresistenz-Mechanismus gefunden werden.

Herkunft des Sauerstoffs an C-11

Mittels Fütterung von ^{18}O-markiertem molekularen Sauerstoff soll untersucht werden, ob die Hydroxygruppe am C-11 aus molekularem Sauerstoff oder aus Wasser stammt.

Überexpression auf einem Plasmid

Die Komplementation von verschiedenen Knockout-Mutanten (*abyI*, *abyE*, *abyC*, evt. weitere) wird mit neuen Primern, die die ribosomale Bindestelle des jeweiligen Gens einschließen, und dem Plasmid pUWL in unserer Arbeitsgruppe durch Joanna Krawczyk wiederholt werden (s. Abschnitt 3.3.3).

Regulation – Gewinnung eines Hochproduzenten

Ein weiterer Aspekt ist die Modifikation der Regulatorgene, durch die möglicherweise ein Hochproduzent von *atrop*-Abyssomicin C gewonnen werden kann. Eventuell könnte mittels dieser Modifikation die Findung von Biosynthese-Intermediaten erleichtert werden.

Gewinnung von Abyssomicin-Derivaten

Die beiden inaktiven Domänen in Modul 5, eine Dehydratase-Domäne und eine Ketoreduktase-Domäne könnten durch Punktmutationen der aktiven Aminosäuren aktiviert oder gegen funktionierende Kopien ausgetauscht werden. Die sich daraus theoretisch ergebenden Abyssomicin-Derivate sind in Abbildung 98dargestellt. Das aktive Michael-System würde dadurch zerstört, die Aufrechterhaltung der gleichen

Wirkungsweise ist daher eher unwahrscheinlich. Möglicherweise wären diese Derivate aber in anderer Weise biologisch aktiv.

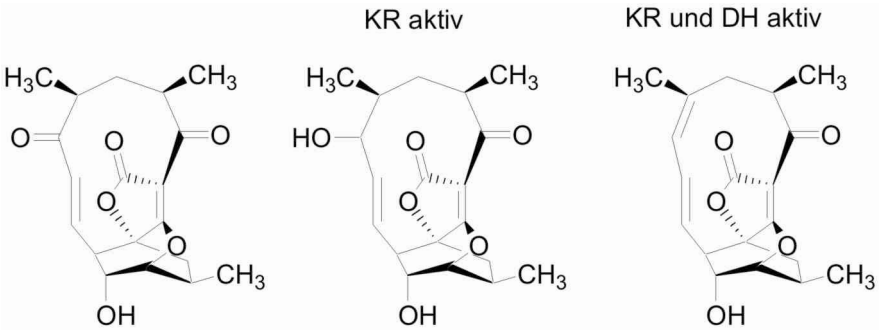


Abbildung 98: Abyssomicin, mit aktiver KR und/oder DH aus Modul 5.

Proteinbiochemische Untersuchung der Tetronsäurebiosynthese

Durch Expression der Gene *abyA1-A5* und anschließende Enzymcharakterisierung könnte Einblick in die Biosynthese der Tetronsäureeinheit bei Abyssomicin im Speziellen und bei Tetronsäureantibiotika im Allgemeinen gewonnen werden. Von besonderem Interesse wären hier *abyA1*, *abyA4* und *abyA5*, da diese Enzyme noch nicht untersucht wurden.

6 Material

6.1 Bakterienstämme

E. coli DH5α und *E. coli* ET12567/pUB307 wurden von Combinature Biopharm AG (Berlin) zur Verfügung gestellt. *E. coli* BW25113/pIJ790 und *E. coli* ET12567/pUZ8002 wurde zusammen mit dem Plasmid pIZ778 im Rahmen eines MTA über die *ReDirect*-Methode vom John Innes Centre (Norwich, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. *Verrucosispora* AB-18-032 stammt aus der Sammlung von Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler, Universität Tübingen.

6.2 Plasmide

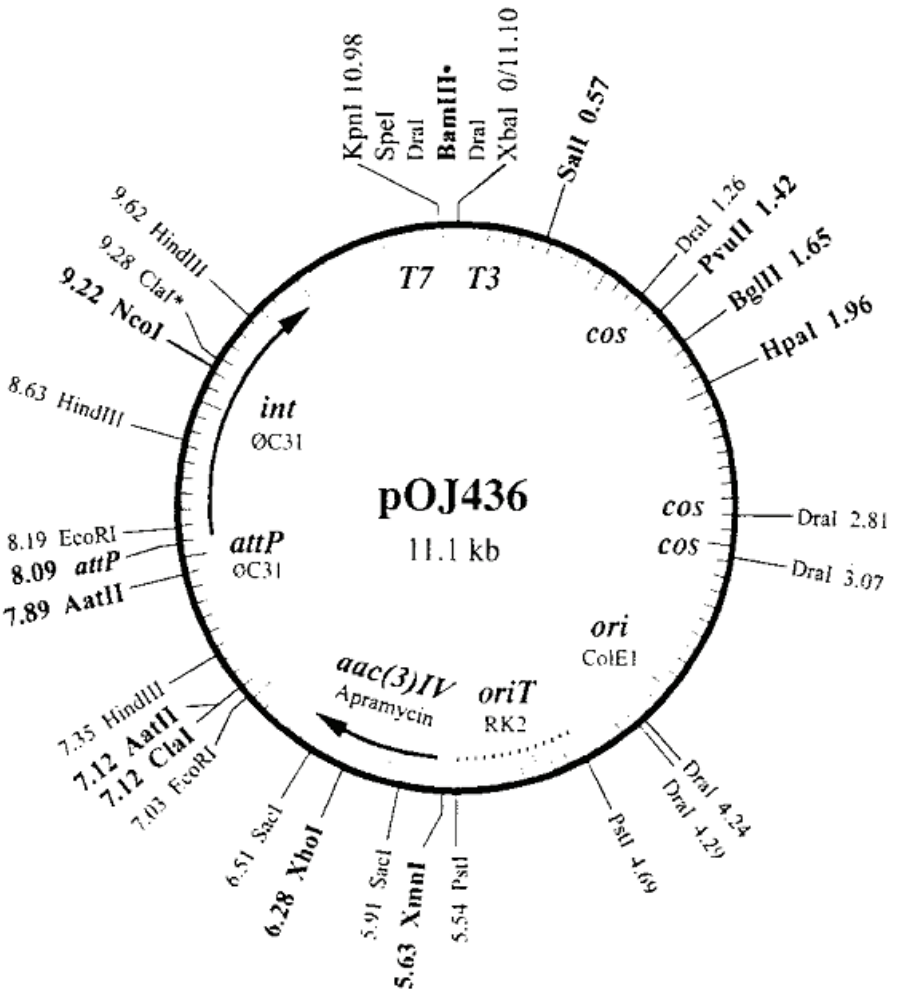


Abbildung 99: pOJ436, Cosmidvektor. Abbildung aus „Practical Streptomyces Genetics", Kieser et al.[78]

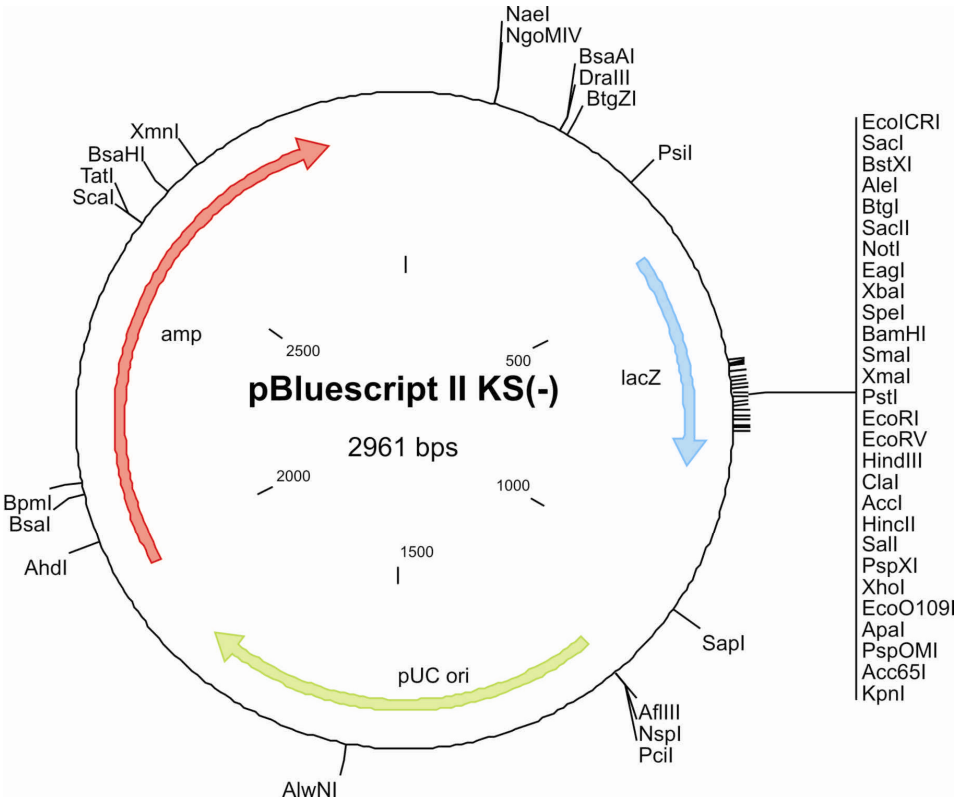


Abbildung 100: Klonierungsvektor pBluescript (Stratagene, Agilent Technologies, Cedar Creek, Texas, USA).[123]

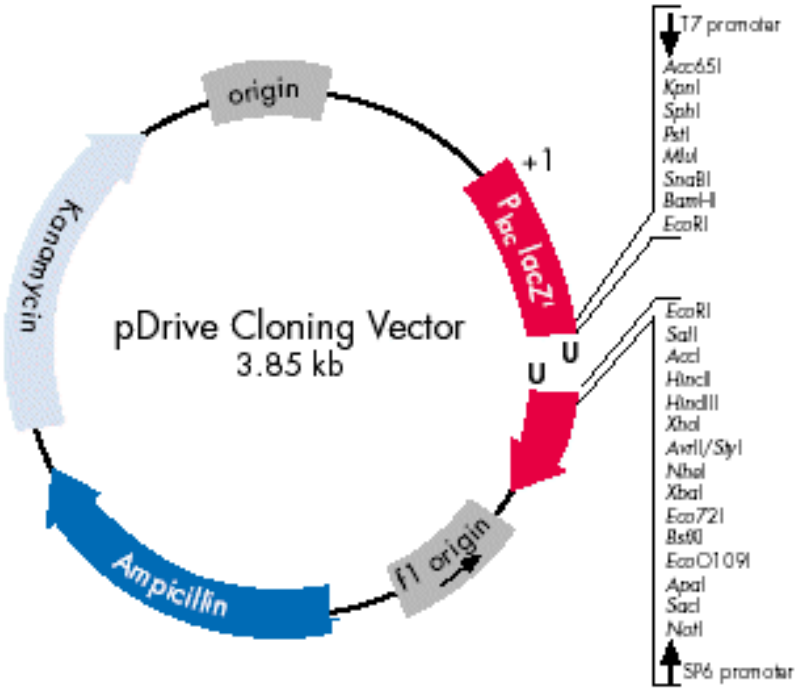


Abbildung 101: PCR-Klonierungsvektor pDrive (Qiagen, Hilden).

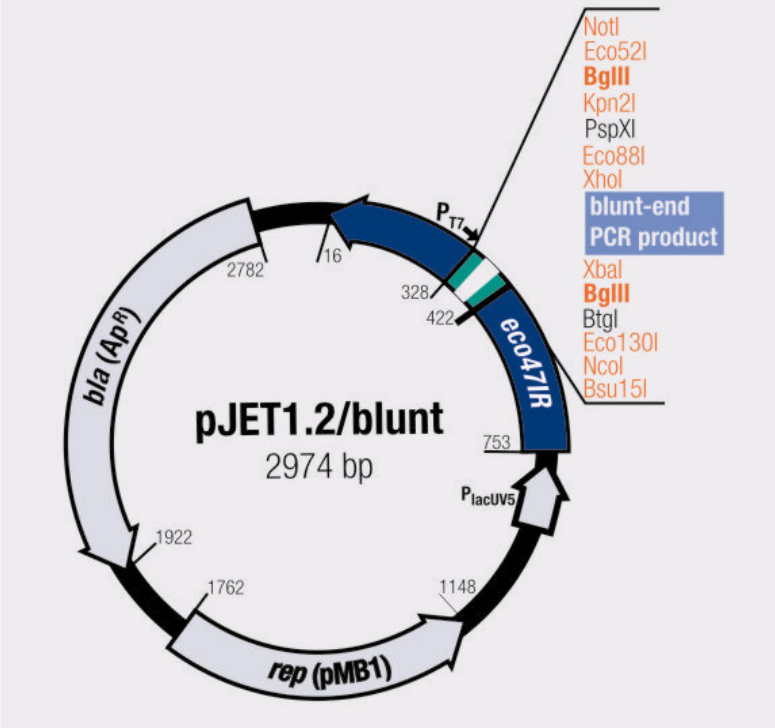


Abbildung 102: pJET1.2 blunt-Klonierungsvektor von Fermentas (mit Selbstmordgen eco47IR).[124]

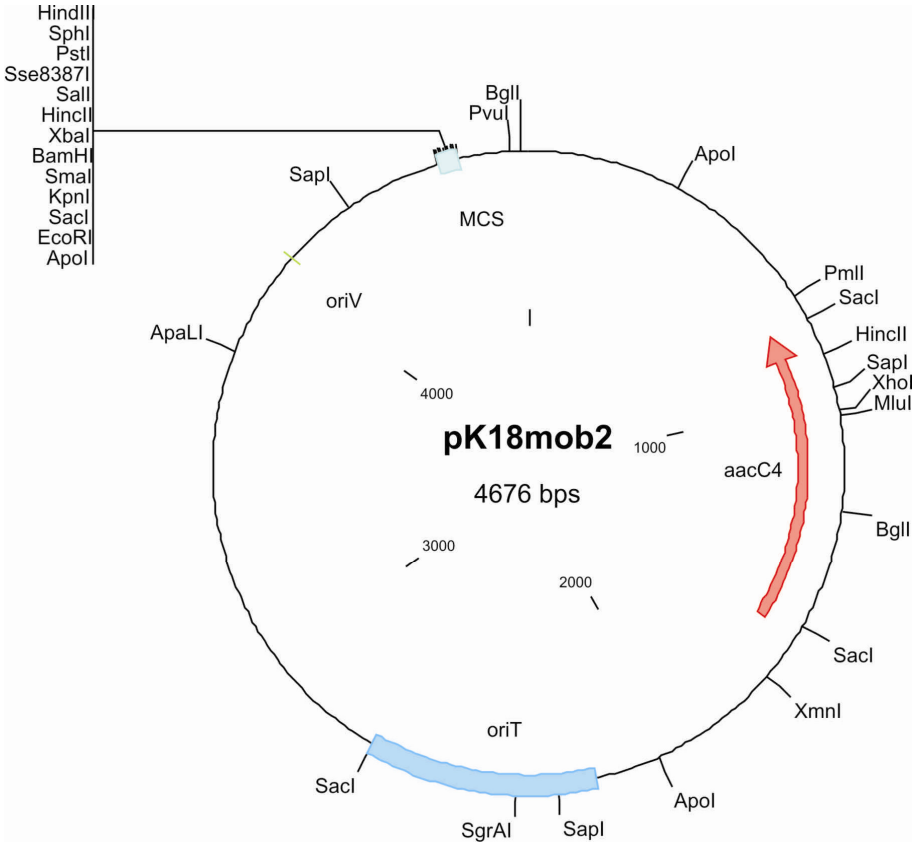


Abbildung 103: Vektor pK18mob2, der einen oriT besitzt und in Streptomyceten nicht replikativ ist.[89] *Er eignet sich insbesonders für Singlecrossover-Inaktivierungen und besitzt eine Apramycin-Resistenzkassette.*

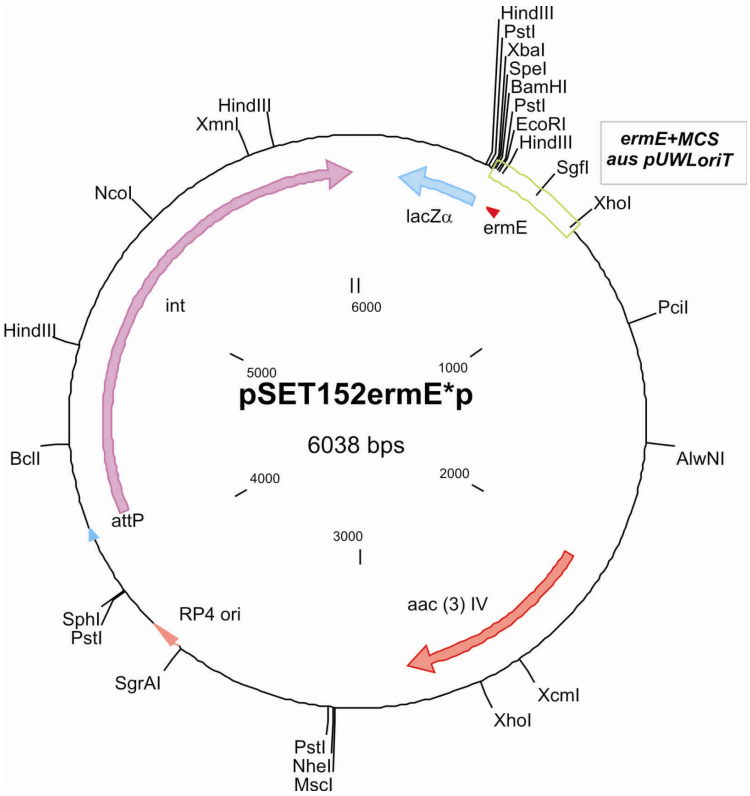


Abbildung 104: Expressionsvektor pSETermE, der einen oriT besitzt und über eine ΦC31-attachment site ins Genom vieler Actinomyceten integrieren kann.*[125,126]

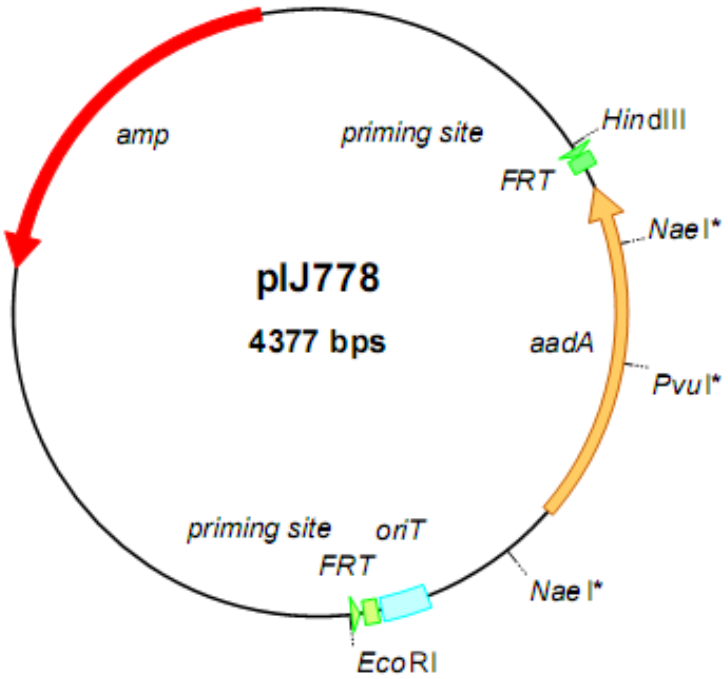


Abbildung 105: Vektor pIJ778 für ReDirect (Abbildung aus dem Protokoll von Bertolt Gust), enthält eine Streptomycin-Kassette, die für Mutagenisierungsexperimente mit der ReDirect-Methode verwendet wurde.[77]

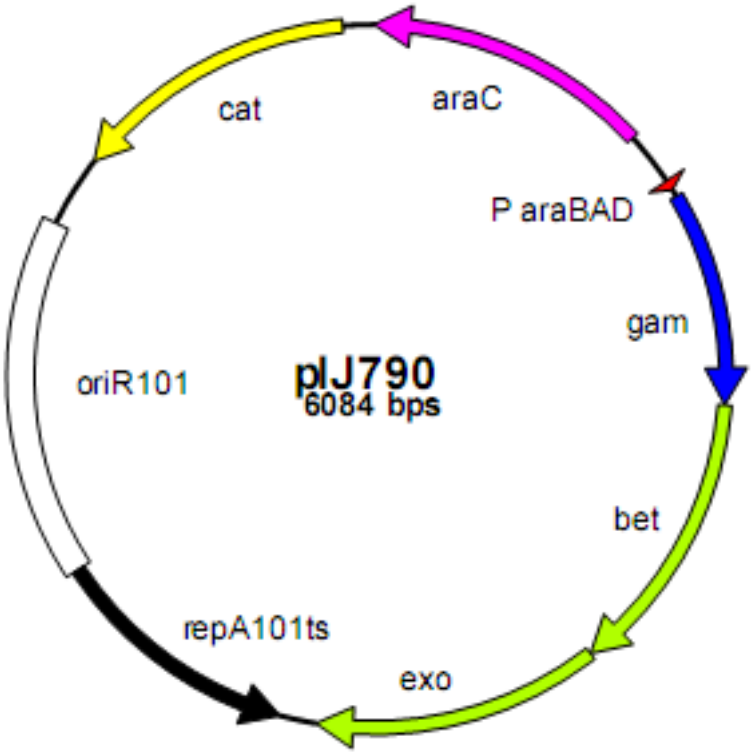


Abbildung 106: Vektor pIJ790, der die Gene gam, bet und exo enthält, deren Expression für die Mutagenisierung der Zielcosmide mit der ReDirect-Methode mit L-Arabinose induziert wurde.[77]

6.3 Geräte

Agarosegelkammern	Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank	BD 53, Binder, Tuttlingen
Eismaschine	AF 80 AS, Scotsman Europe, Mailand, Italien
Elektroporator	Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentation	GelSystem Flexi 5020 S, biostep GmbH, Jahnsdorf
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
HPLC	1100-Series, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
Hybridisierungsofen	Hybaid Maxi 14, Thermo Electron GmbH, Dreieich
Massenspektrometer	QTRAP 2000; Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Thermocycler	Primus 96 advanced Gradient, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	pH/Ion 510, Eutech Instruments Pte Ltd, Singapur
Rotoren	Festwinkelrotor 220.87 V05, HERMLE GmbH, Wehingen; Ausschwingrotor 221.08 V01, HERMLE GmbH, Wehingen (für Zentrifugationen bis 4500 Upm); Festwinkelrotor 220.78 V02, HERMLE GmbH, Wehingen (für Zentrifugationen über 4500 Upm)
Säulen	Luna 3u C18(2) 100Å, 50 x 1 mm, Phenomenex, Aschaffenburg (HPLC-ESI-MS)
	Luna 3u C18(2) 100Å, 50 x 4,5 mm, Phenomenex (HPLC-DAD)
Schüttelinkubatoren	MULTITRON II, Infors GmbH, Einsbach
Spannungsquellen	PowerPac Basic; Bio-Rad Laboratories GmbH, München; PowerPac HC; Bio-Rad Laboratories GmbH, München; PowerPac 1000; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilbank	Holten Safe 2010; Thermo Electron, Dreieich

Taumeltisch	Polymax 1040 Neigungswinkel 5°; Heidolph, Schwabach
Photometer	Ultrospec 2100 pro Classic; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer (Schüttler)	Reax top; Heidolph, Schwabach
Waagen	EW 6000-1M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, XR 125 sM, Precisa Instruments AG, Dietikon, Schweiz
Zentrifugen	Mikroliterzentrifuge Z233MK-2, HERMLE GmbH, Wehingen Tischkühlzentrifuge Z383K, HERMLE GmbH, Wehingen
Rotationsverdampfer	Pumpe: RZ6, Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim; Rotationsverdampfer: Rotavapor, Büchi, Essen

6.4 Chemikalien und Medienbestandteile

TriDye 2-log DNA ladder/100bp ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
dNTP Mix, 10 mM each	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Serva, Heidelberg
Corn Steep Powder	Marcor Development Corp., Carlstadt, NJ, USA
Sojamehl, vollfett	Hensel, Reformhaus
Apramycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, München

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Medienbestandteile waren analysenreine Substanzen von Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe.
Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen und vor dem Gebrauch im angegebenen Volumen $H_2O_{deion,\ steril}$ in einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst und anschließend 1:10 verdünnt.

6.5 Kits

GeneJet Plasmid Isolation Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
QiaexII DNA Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden
CloneJet PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
PeqGOLD Plasmidmini Kit I	Peqlab, Erlangen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

6.6 Enzyme

Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
PWO SuperYield DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Herculase II Fusion Enzyme	Agilent/Stratagene, Waldbronn
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Lysozym	Serva, Heidelberg
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von Fermentas, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

6.7 Medien

Jeweils ad 1 L (mit H_2O deion.), falls nicht anders angegeben. Gegebenenfalls (nötig z.B. bei SGG zur Produktion von *atrop*-Abyssomicin C) Glucose getrennt sterilisieren und Medium erst nach dem Autoklavieren komplettieren.

CRM	103 g Sucrose/Saccharose 20 g TSB (Tryptic Soy Broth) 10 g Hefeextrakt ad 1L
KM4	4 g Glucose 10 g Malzextrakt 4 g Hefeextrakt 15 g Agar ad 1L, warmes Leitungswasser pH 7
LB (Luria Broth)	5 g NaCl 5 g Difco Hefeextrakt 10 g Difco Bacto Trypton 1 g Glucose ad 1 L pH 7,2
MS-Agar	20 g Mannit 20 g Sojamehl, vollfett 20 g Agar ad 1 L, Leitungswasser
NB Weichagar	8 g Nutrient Broth 5 g Agar ad 1 L
R3-Weichagar, (Pelzer, S., Diss.)	171.0 g Sucrose/Saccharose 10.0 g Glucose 4.1 g Pepton 8.1 g $MgCl_2$ 0.5 g KCl 8.1 g $CaCl_2$ x 2 h_2O 8.0 g Agar in 860 ml H_2O Nach Autoklavieren steril zusetzen: 40.0 ml 0.5 % KH_2PO_4 100 ml 250 mM TES pH 7,2

	ad 1 L
SGG	10 g Dextrin 10 g Glucose (getrennt sterilisiert) 10 g Glyzerin 2.5 g Cornsteep Powder 5 g Pepton aus Casein 2 g Hefeextrakt 1 g NaCl 3 g $CaCO_3$ pH 7,2 ad 1 L, Leitungswasser
SOB	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,6 g NaCl 0,2 g KCl pH 6,8-7 Vor Verwendung mit einer steril filtrierten 2 M Mg^{2+}-Lösung (1 M $MgCl_2$ x 6 H_2O und 1 M $MgSO_4$ x 7 H_2O) auf eine Endkonzentration von 20 mM Mg^{2+} bringen.
SOC	SOC = SOB plus 3,6 g/l Glucose, direkt vor Verwendung steril zugeben.
Sporulationsmedium für *B. subtilis*	1,0 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O 14,5 mg $MnCl_2$ x 2 H_2O 540,0 mg NH_4Cl 105,0 mg Na_2SO_4 87,0 mg KH_2PO_4 194,7 mg $CaCl_2$ 96,0 mg NH_4NO_3 8,3 mg $MgCl_2$ x 6 H_2O 2,0 g Glucose 1,9 g Na-L-Glutamat-Monohydrat ad 1 L pH 7,1
TY	4 g NaCl 4 g Hefeextrakt 8 g Trypton/Pepton ad 1 L pH7,2

6.8 Antibiotika und andere Medienzusätze

Apramycinsulfat	Endkonzentration 100µg/ml, Stammlösung 1000 x: 100 mg/ml, sterilfiltriert
Carbenicillin	Endkonzentration 50µg/ml, Stammlösung 1000 x: 50 mg/ml, sterilfiltriert
Chloramphenicol	Endkonzentration 37µg/ml, Stammlösung 1000 x: 37 mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert
IPTG	Endkonzentration 50µM, Stammlösung 1000 x: 59,58 mg ad 5 ml H_2O, sterilfiltrieren
Kanamycinsulfat	Endkonzentration 50µg/ml, Stammlösung 1000 x: 50 mg/ml, sterilfiltrieren
Streptomycinsulfat	Endkonzentration 50µg/ml, Stammlösung 1000 x: 50 mg/ml, sterilfiltrieren
X-Gal	Endkonzentration 80µg/ml, Stammlösung 1000 x: 160 mg ad 2 ml DMF, sterilfiltrieren

6.9 Lösungen und Puffer

Agarosegel-Probenauftragspuffer	10 mM Tris 5 % Saccharose 0,02 % SDS 0,01 % Bromphenolblau 1 % Agarose 0.2 % SDS
Eckhardt-Gel-Probenauftragspuffer	26 ml Probenpuffer 25 g Saccharose 3 g Ficoll 400 ad 100 ml TAE, autoklavieren. 10 mg RNAse A zugeben, 15 min bei 100C inkubieren. 0,04 % Bromphenolblau 500 mg Lysozym
AL1	50 mM Tris/HCl pH8, 10 mM EDTA Volumen: 250 ml 1,5 g Tris 0,7 g EDTA 5 mg RNAse A
AL2	200 mM NaOH, 1 %SDS Aus Stammlösungen 1N NaOH: 10 ml*0.2M NaOH = x ml 1M NaOH => x = 2 ml Stammlösung SDS: 10 %: 1 ml 10 %SDS auf 10 ml Stammlösung 1 N NaOH: Volumen: 250 ml 1 mol/l * 0,25 * 40 g/mol = 10 g NaOH
AL3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5 (73,6 g KOAc) pH einstellen mit HOAc ad 250 ml
20xSSC Puffer	3 M NaCl 300 mM tri-Natriumcitrat x 2 h_2O pH 7,0
2xSSC-Puffer	2 x SSC 0,1 % SDS

0,5xSSC-Puffer	0,5 x SSC 0,1 % SDS
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Blocking-Lösung	0,1 % Blocking-Pulver in Maleinsäurepuffer
Church-Puffer	500 ml 1M NaH_2PO_4 500 ml 10 % SDS-Lösung 2 ml 0,5M EDTA pH 7,2
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen einstellen)
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl 3 M NaCl pH 7,5
Waschpuffer	0,3 % Tween-20 in Maleinsäurepuffer
Antikörperlösung	2 ml Blocking-Lösung 18 ml Maleinsäurepuffer 4 µl Anti-Digoxygenin-AP-Antikörper
Detektionslösung	0,1M Tris 0,1M NaCl pH 9,5
Färbelösung	10 ml Detektionslösung 200 µl NBT/BCIP-Stammlösung
Dehybridisierungslösung	0,2M NaOH 0,1 % SDS
Kryo-Lösung	100 ml Glyzerin 50 g Sucrose (=Saccharose) 850 ml H_2O dest. In 250 ml Flaschen auf 200 ml auffüllen

TE/Saccharose	10 mM Tris 1 mM EDTA 10 % Saccharose pH 7,5
TAE-Puffer für die Elektrophorese 50x	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 $H_2O_{deion.}$ ad 1L

7 Anhang

Allgemeine Anmerkungen:
Die Zentrifugation erfolgte üblicherweise bei maximaler Geschwindigkeit (Mikrozentrifuge: 16.000 Upm, Tischzentrifuge: 4.500 Upm mit Ausschwingrotor bzw. 22.000 Upm mit Festwinkelrotor). Zellsuspensionen werden üblicherweise nur mit 4.500 Upm zentrifugiert.

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ACP	*acyl carrier protein* (Acyl-Trägerprotein)
AT	Acyltransferase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
DH	Dehydratase
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Enoylreduktase
F	Farad
FRT	*flippase recognition target*, Erkennungssequenzen aus einem Rekombinationssystem aus *Saccharomyces cerevisiae*
HK	Hauptkultur
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase

l/L	Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NMR	*nuclear magnetic resonance* (Kernmagnetische Resonanz)
NRPS	*non ribosomal peptide synthetase* (Nicht-ribosomale Peptidsynthetase)
nt	Nukleotide
ORF	*open reading frame* (offener Leserahmen)
oriT	origin of transfer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
PKS I	Polyketidsynthase Typ I
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SSC	*saline-sodium citrate* (Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer)
TAE	Tris-Acetat EDTA
t_R	Retentionszeit
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VK	Vorkultur
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Ω	Ohm

7.2 Literaturverzeichnis

1. Demain, A.L. Antibiotics: Natural products essential to human health. *Med. Res. Rev.* **Epub ahead of Print**(2009).
2. Bud, R. *Penicillin - Triumph and Tragedy*, 330 (Oxford University Press, Oxford, 2007).
3. Eckart, W.U. *Geschichte der Medizin*, 368 (Springer, 2009).
4. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Path.* **10**, 226-236 (1929).
5. WHO. Antimicrobial Resistance, Fact Sheet No 194. Vol. 2009 (World Health Organization, 2002).
6. Theuretzbacher, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 15-20 (2009).
7. Exposito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M. H., Cusido, R. M., PalazonJ. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **9**, 109-121 (2009).
8. Wani, M.C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327 (2002).
9. Pace, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740 (1997).
10. Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787 (1990).
11. Gabor, E., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J., Lorenz, P. Updating the metagenomics toolbox. *Biotechnol. J.* **2**, 201-206 (2007).
12. Weissman, K.J. Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.* **25**, 139-142 (2007).
13. Weist, S. & Süssmuth, R.D. Mutational biosynthesis - a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 141-150 (2005).
14. Clardy, J., Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature* **432**, 829-837 (2004).
15. Ekins, S., Mestres, J., Testa, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 21-37 (2007).
16. Newman, D.J., Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477 (2007).
17. Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihm, G. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**, 37-42 (2005).
18. Herold, K., Gollmick, F. A., Groth, I., Roth, M., Menzel, K. D., Mollmann, U., Grafe, U., Hertweck, C. Cervimycin A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. *Chem. -Europ. J.* **11**, 5523-5530 (2005).
19. Takahashi, Y., Omura, S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**, 141-154 (2003).
20. Tsurumi, Y. Searching new antibiotic substances in mountains. *Kagaku* **58**, 28-29 (2003).
21. Clardy, J., Fischbach, M. A., Walsh, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotech.* **24**, 1541-1550 (2006).
22. Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Süssmuth, R. D., Fiedler, H. P. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* **57**, 271-279 (2004).
23. Keller, S., Schadt, H. S., Ortel, I., Süssmuth, R. D. *atrop*-Abyssomicin C als Inhibitor der 4-Amino-4-desoxychorismat-Synthase PabB13. *Angew. Chem.* **119**, 8433-8435 (2007).
24. Keller, S., Schadt, H. S., Ortel, I., Süssmuth, R. D. Action of *atrop*-abyssomicin C as an inhibitor of 4-amino-4-deoxychorismate synthase PabB13. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 8284-8286 (2007).
25. Domagk, G. Chemotherapy of bacterial infections. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **61**, 250-253 (1935).
26. Fuller, A.T. Is *p*-aminobenzenesulfonamide the active agent in prontosil therapy? *Lancet* **I**, 194-198 (1937).
27. Northey, E.H. Structure and chemotherapeutic activities of sulfanilamide derivatives. *Chem. Rev.* **27**, 85-197 (1940).
28. Nicol, C.A., Welch, A. D. Mechanism of action of aminopterin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 403-411 (1950).

29. Burchall, J., Hitchings, G. H. Inhibitor binding analysis of dihydrofolate reductases from various species. *Mol. Pharmacol.* **I**, 126-136 (1965).
30. Nicolaou, K.C., Harrison, S. T. Total synthesis of abyssomicin C and *atrop*-abyssomicin C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 3256-3260 (2006).
31. Peters, R., Fischer, D. F. Total syntheses of the antibacterial natural product abyssomicin C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5736-9 (2006).
32. Snider, B.B., Zou, Y. Synthesis of the carbocyclic skeleton of abyssomicins C and D. *Org. Lett.* **7**, 4939-41 (2005).
33. Zapf, C.W., Harrison, B. A., Drahl, C., Sorensen, E. J. A Diels-Alder macrocyclization enables an efficient asymmetric synthesis of the antibacterial natural product abyssomicin C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 6533-6537 (2005).
34. Rath, J.-P., Kinast, S., Maier, M. E. Synthesis of the fully functionalized core structure of the antibiotic abyssomicin C. *Org. Lett.* **7**, 3089-3092 (2005).
35. Keller, S., Nicholson, G., Drahl, C., Sorensen, E., Fiedler, H. P., Süssmuth, R. D. Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* **60**, 391-394 (2007).
36. Schindler, P.W., Zähner, H. Mode of action of the macrolide-type antibiotic, chlorothricin. *Eur. J. Biochem.* **39**, 591-600 (1973).
37. Lee, J.J., Lee, J. P., Keller, P. J., Cottrell, C. E., Chang, C.-J., Zähner, H., Floss, H. G. Further studies on the biosynthesis of Chlorothricin. *The Journal of Antibiotics* **39**, 1123-1134 (1986).
38. Keller-Juslén, C., King, H. D., Kuhn, M., Loosli, H. R., Pache, W., Petcher, T. J., Weber, H. P., von Wartburg, A. Tetronomycin, a novel polyether of unusual structure. *J. Antibiot.* **35**, 142-150 (1982).
39. Tamaoki, T. & Tomita, F. Biosynthesis of tetrocarcin. Incorporation of 14C- and 13C-labeled compounds into tetrocarcin. *J Antibiot (Tokyo)* **36**, 595-8 (1983).
40. Demydchuk, Y., Sun, Y. H., Hong, H., Staunton, J., Spencer, J. B., Leadlay, P. F. Analysis of the tetronomycin gene cluster: Insights into the biosynthesis of a polyether tetronate antibiotic. *ChemBioChem* **9**, 1136-1145 (2008).
41. Fang, J., Zhang, Y., Huang, L., Jia, X., Zhang, Q., Zhang, X., Tang, G., Liu, W. Cloning and characterization of the tetrocarcin A gene cluster from *Micromonospora chalcea* NRRL 11289 revealed a highly conserved strategy for tetronate biosynthesis in spirotetronate antibiotics. *J. Bacteriol.* (2008).
42. Jia, X.Y., Tian, Z. H., Shao, L., Qu, X. D., Zhao, Q. F., Tang, J., Tang, G. L., Liu, W. Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetronate antibiotic biosynthesis. *Chem. Biol.* **13**, 575-585 (2006).
43. Zhang, H., White-Phillip, J. A., Melancon, C. E., Kwon, H. J., Yu, W. L., Liu, H. W. Elucidation of the kijanimicin gene cluster: Insights into the biosynthesis of spirotetronate antibiotics and nitrosugars. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14670-14683 (2007).
44. Riedlinger, J.M. Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität (2002).
45. Fiedler, H.P. Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector. *J. Chromatogr.* **316**, 487-94 (1984).
46. Bister, B., Bischoff, D., Ströbele, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Bull, A. T., Zähner, H., Fiedler, H.-P., Süssmuth, R. D. Abyssomicin C - ein polycyclisches Antibiotikum aus einem marinen *Verrucosispora*-Stamm als Inhibitor für die p-Aminobenzoesäure/Tetrahydrofolat-Biosynthese13. *Angew. Chem.* **116**, 2628-2630 (2004).
47. Schneider, K.K., S., Wolter, F. E., Röglin, L., Beil, W., Seitz, O., Nicholson, G., Bruntner, C., Riedlinger, J., Fiedler, H.-P., Süssmuth, R.D. Proximicin A, B und C - antitumoraktive Furananaloga des Netropsins aus dem marinen Actinomyceten *Verrucosispora* induzieren die Hochregulation von p53 und des Cyclinkinase-Inhibitors p2113. *Angew. Chem.* **120**, 3302-3305 (2008).
48. Keller, S. Dissertation, Technische Universität Berlin (2007).
49. Niu, X.M., Li, S. H., Gorls, H., Schollmeyer, D., Hilliger, M., Grabley, S., Sattler, I. Abyssomicin E, a highly functionalized polycyclic metabolite from *Streptomyces species*. *Org. Lett.* (2007).
50. Mashimo, Y., Sekiyama, Y., Araya, H., Fujimoto, Y. Biosynthesis of agglomerin A: stereospecific incorporation of pro-R- and pro-S-hydrogens at sn-C-3 of glycerol into the branched C-3 moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 649-651 (2004).
51. Bulsing, J.L., ED, Leeper, FJ; Staunton, J; Davies, DH; Ritchie, GAF; Davies, A; Davies, AB; Mabelis, RP. Biosynthesis of the polyketide antibiotic ICI139603 in *Streptomyces longisporoflavus*: Assignment of the ^{13}C N.M.R. spectrum by two-dimensional methods, and determination of the origin of the carbon atoms. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1301-1305 (1984).
52. Chijiwa, S., Park, H. R., Furihata, K., Ogata, M., Endo, T., Kuzuyama, T., Hayakawa, Y., Shin-Ya, K. Biosynthetic studies of versipelostatin, a novel 17-membered alpha-tetronic acid involved macrocyclic compound isolated from *Streptomyces versipellis*. *Tetrahedron Lett.* **44**, 5897-5900 (2003).

53. Weissman, K.J., Leadlay, P. F. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 925-36 (2005).
54. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 285-295 (2003).
55. Donadio, S., Katz, L. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **111**, 51-60 (1992).
56. Weissman, K.J., Müller, R. Protein-protein interactions in multienzyme megasynthases. *ChemBioChem* **9**, 826-848 (2008).
57. Malpartida, F., Hopwood, D. A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* **309**, 462-464 (1984).
58. Moore, B.S., Hopke, J. N. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem* **2**, 35-38 (2001).
59. Hamill, R.L., Yao, R. C. Antibotic A80577 and process for its production. (Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN), United States, 1989).
60. Matsumoto, M., Kawamura, Y., Yoshimura, Y., Terui, Y., Nakai, H., Yoshida, T., Shoji, J. Isolation, characterization and structures of PA-46101 A and B. *J. Antibiot.* **43**, 739-747 (1990).
61. Igarashi, Y., Takagi, K., Kan, Y., Fujii, K., Harada, K., Furumai, T., Oki, T. Arisostatins A and B, new members of tetrocarcin class of antibiotics from micromonospora sp. TP-A0316. II. Structure determination. *J. Antibiot.* **53**, 233-240 (2000).
62. Bonjoukilan, R.M., J. S. ; Hunt, A. H. ; Deeter J. B. Structures of A88696c, A88696d and A88696f - Gastric Atpase Inhibitors (Vol 34, Pg 7857, 1993). *Tetrahedron Lett.* **36**, 332 (1995).
63. Bonjoukilan, R.M., J. S. ; Hunt, A. H. ; Deeter J. B. Structures of A88696 C, D and F - Gastric Atpase Inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **34**, 7857-7860 (1993).
64. Momose, I., Iinuma, H., Kinoshita, N., Momose, Y., Kunimoto, S., Hamada, M., Takeuchi, T. Decatromicins A and B, new antibiotics produced by *Actinomadura sp.* MK73-NF4. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* **52**, 781-786 (1999).
65. Hegde, V.R., Patel, M. G., Das, P. R., Pramanik, B., Puar, M. S. A family of novel macrocyclic lactones, the saccharocarcins produced by *Saccharothrix aerocolonigenes subsp* antibiotica .2. Physicochemical properties and structure determination. *J. Antibiot.* **50**, 126-134 (1997).
66. Jiang, Z.-D., Jensen, P. R., Fenical, W. Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2003-2006 (1999).
67. Schobert, R., Schlenk, A. Tetramic and tetronic acids: An update on new derivatives and biological aspects. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 4203-4221 (2008).
68. Kawashima, A., Nakamura, Y., Ohta, Y., Akama, T., Yamagishi, M., Hanada, K. New cholesterol biosynthesis inhibitors MC-03 ((9-Demethylchlorothricin, -032 (O-Demethylchlorothricin), -033 and -034. *J. Antibiot.* **45**, 207-212 (1991).
69. Ashton, R.J., Kenig, M. D., Luk, K., Planterose, D. N., Scott-Wood, G. MM 46115, a new antiviral antibiotic from *Actinomadura pelletieri*. *J. Antibiot.* **43**, 1387 (1990).
70. Hamaguchi, T., Sudo, T., Osada, H. RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1phase. *FEBS Lett.* **372**, 54-58 (1995).
71. Ubukata, M., Cheng, X. C., Uzawa, J., Isono, K. Biosynthesis of the dialkylmaleic anhydride-containing antibiotics, tautomycin and tautomycetin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2399-2404 (1995).
72. Tamaoki, T., Tomita, F. Biosynthesis of tetrocarcin. Incorporation of ^{14}C- and ^{13}C-labeled compounds into tetrocarcin. *J. Antibiot.* **36**, 595-8 (1983).
73. Hailes, H.J., CM; Leadlay, PF; Ley, SV; Staunton, J. Biosynthesis of tetronasin: Part 1 Introduction and investigation of the diketide and triketide intermediates bound to the polyketide synthase. *Tetrahedron Lett.* **35**, 307-310 (1994).
74. Ohtsuka, T., Kudoh, T., Shimma, N., Kotaki, H., Nakayama, N., Itezono, Y., Fujisaki, N., Watanabe, J., Yokose, K., Seto, H. Tetronothiodin, a novel cholecytokinin type-B receptor antagonist produced by *Streptomyces sp. J. Antibiot.* **45**, 140-143 (1992).
75. Tsunakawa, M., Tenmyo, O., Tomita, K., Naruse, N., Kotake, C., Miyaki, T., Konishi, M., Oki, T. Quartromicin, a complex of novel antiviral antibiotics. I. Production, isolation, physico-chemical properties and antiviral activity. *J. Antibiot.* **45**, 180-188 (1992).
76. Park, H.-R., Chijiwa, S., Furihata, K., Hayakawa,Y., Shin-ya, K. Relative and absolute configuration of versipelostatin, a down-regulator of molecular chaperone GRP78 expression. *Org. Lett.* **9**, 1457-1460 (2007).
77. Gust, B., O'Rourke, S., Bird, N., Kieser, T., Chater, K. Recombineering in *Streptomyces coelicolor* A3(2) for gene inactivation. *Manual* (2003).

78. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*, 613 (The John Innes Foundation, Norwich, 2000).
79. MacNeil DJ, G.K., Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**, 61-8 (1992).
80. Sambrook, J., Russell, D. W., Irwin, N., Janssen, K. A. *Molecular Cloning - A laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).
81. Biolabs, N.E. DNA ladder. (2009).
82. Eckhardt, T. Rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic-acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588 (1978).
83. Labes, G., Simon, R., Wohlleben, W. A rapid method for the analysis of plasmid content and copy number in various *Streptomycetes* grown on agar plates. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2197-2197 (1990).
84. Mullis K, F.F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *BioTechnology* **24**, 17-27 (1992).
85. Lee AB, C.T. Improved direct PCR screen for bacterial colonies: wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *BioTechniques* **18**, 225-6 (1995).
86. Beye, M., Poch, A., Burgtorf, C., Moritz, R. F. A., Lehrach, H. A gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): A reference library system for basic and comparative genetic studies of a hymenopteran genome. *Genomics* **49**, 317-320 (1998).
87. Burgtorf, C., Welzel, K., Hasenbank, R., Zehetner, G., Weis, S., Lehrac, H. Gridded genomic libraries of different chordate species: A reference library system for basic and comparative genetic studies of chordate genomes. *Genomics* **52**, 230-232 (1998).
88. Nizetic, D., Zehetner, G, Monaco, AP, Gellen, L, Young, BD, Lehrach, H. Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3233-7 (1991).
89. Pelzer, S., Dorsch, H., Spellig, T. A gene cluster encoding an efomycin polyketide synthase from a *Streptomycete*. in *Ger. Offen.* 40 (Germany, 2006).
90. McHardy, A.C., Goesmann, A., Puhler, A., Meyer, F. Development of joint application strategies for two microbial gene finders. *Bioinformatics* **20**, 1622-1631 (2004).
91. Delcher, A.L., Bratke, K. A., Powers, E. C., Salzberg, S. L. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**, 673-679 (2007).
92. Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., Salzberg, S. L. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4636-41 (1999).
93. Salzberg, S.L., Delcher, A. L., Kasif, S., White, O. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* **26**, 544-548 (1998).
94. Yadav, G., Gokhale, R. S., Mohanty, D. SEARCHPKS: a program for detection and analysis of polyketide synthase domains. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3654-3658 (2003).
95. Christian P. R., L., H-Y., Khosla, C. Evolution of polyketide synthases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4595-4600 (2007).
96. Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Tian, Y. Q., Bruton, C. J., Chater, K. F. λ red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 107-128 (2004).
97. Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K. F. PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1541-6 (2003).
98. Datsenko, K.A., Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640-6645 (2000).
99. Redenbach M, K.H., Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**, 77-96 (1996).
100. Matsushima, P., Broughton, M. C., Turner, J. R., Baltz, R. H. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* **146**, 39-45 (1994).
101. Bibb MJ, J.G., Ward JM. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene* **38**, 215-226 (1985).
102. Schmittjohn, T., Engels, J. W. Promoter constructions for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 493-498 (1992).
103. Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L. S., Gogarten, J. P., Alloisio, N., Bagnarol, E., Bassi, C. A., Berry, A. M., Bickhart, D. M., Choisne, N., Couloux, A., Cournoyer, B., Cruveiller, S., Daubin, V., Demange, N., Francino, M. P., Goltsman, E., Huang, Y., Kopp, O. R., Labarre, L., Lapidus, A., Lavire, C., Marechal, J., Martinez, M., Mastronunzio, J. E., Mullin, B. C., Niemann, J., Pujic, P., Rawnsley, T., Rouy, Z., Sche-

nowitz, C., Sellstedt, A., Tavares, F., Tomkins, J. P., Vallenet, D., Valverde, C., Wall, L. G., Wang, Y., Medigue, C., Benson, D. R. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia sp.* strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.* **17**, 7-15 (2007).
104. Pao, S.S., Paulsen, I. T., Saier, M. H. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1-34 (1998).
105. Higgins, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res. Microbiol.* **152**, 205-210 (2001).
106. Hosie, A.H.F., Allaway, D., Jones, M. A., Walshaw, D. L., Johnston, A. W. B., Poole, P. S. Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol. Microbiol.* **40**, 1449-1459 (2001).
107. Mendez, C., Salas, J. A. The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol.* **152**, 341-350 (2001).
108. Hill, C.W., Sandt, C. H., Vlazny, D. *Rhs* elements of *Escherichia coli*: a family of genetic composites each encoding a large mosaic protein. *Mol. Microbiol.* **12**, 865-871 (1994).
109. Feulner, G., Gray, J. A., Kirschman, J. A., Lehner, A. F., Sadosky, A. B., Vlazny, D. A., Zhang, J., Zhao, S., Hill, C. W. Structure of the *rhsA* locus from *Escherichia coli* K-12 and comparison of *rhsA* with other members of the *rhs* multigene family. *J. Bacteriol.* **172**, 446-456 (1990).
110. Minet, A.D., Rubin, B. P., Tucker, R. P., Baumgartner, S., Chiquet-Ehrismann, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 12)**, 2019-2032 (1999).
111. Nasser, W., Reverchon, S. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 381-390 (2007).
112. Wu, J.Q., Zaleski, T. J., Valenzano, C., Khosla, C., Cane, D. E. Polyketide double bond biosynthesis. Mechanistic analysis of the dehydratase-containing module 2 of the picromycin/methymycin polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 17393-17404 (2005).
113. Staunton, J.a.W., K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 360-416 (2001).
114. Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L., Reeves, C. D. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* **251**, 81-90 (2000).
115. Shao, L., Qu, X. D., Jia, X. Y., Zhao, Q. F., Tian, Z. H., Wang, M., Tang, G. L., Liu, W. Cloning and characterization of a bacterial iterative type I polyketide synthase gene encoding the 6-methylsalicyclic acid synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 133-139 (2006).
116. Sun, Y.H., Hong, H., Gillies, F., Spencer, J. B., Leadlay, P. F. Glyceryl-S-acyl carrier protein as an intermediate in the biosynthesis of tetronate antibiotics. *ChemBioChem* **9**, 150-156 (2008).
117. Dorrestein, P.C., Van Lanen, S. G., Li, W., Zhao, C., Deng, Z., Shen, B., Kelleher, N. L. The bifunctional glyceryl transferase/phosphatase OzmB belonging to the HAD superfamily that diverts 1,3-bisphosphoglycerate into polyketide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10386-10387 (2006).
118. Stocking, E.M., Williams, R. M. Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 3078-3115 (2003).
119. Kelly, W.L. Intramolecular cyclizations of polyketide biosynthesis: mining for a "Diels-Alderase"? *Org. Biomol. Chem.* **6**, 4483-4493 (2008).
120. Sugimoto, H., Shinkyo, R., Hayashi, K., Yoneda, S., Yamada, M., Kamakura, M., Ikushiro, S. I., Shiro, Y., Sakaki, T. Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochemistry* **47**, 4017-4027 (2008).
121. Rawlings, B.J. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A-erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18**, 190-227 (2001).
122. Hu, H.F., Ochi, K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1885-1892 (2001).
123. Short, J.M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., Huse, W .D. λZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600 (1988).
124. Fermentas. CloneJet Manual. (2009).
125. Hofmann, C., Boll, R., Heitmann, B., Hauser, G., Dürr, C., Frerich, A., Weitnauer, G., Glaser, S. J., Bechthold, A. Genes encoding enzymes responsible for biosynthesis of L-lyxose and attachment of eurekanate during avilamycin biosynthesis. *Chem. Biol.* **12**, 1137-1143 (2005).
126. Puk, O., Bischoff, D., Kittel, C., Pelzer, S., Weist, S., Stegmann, E., Süssmuth, R. D., Wohlleben, W. Biosynthesis of chloro-β-hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide Antibiotics. *J. Bacteriol.* **186**, 6093-6100 (2004).