

# **Ursprung und Regulation des 3-Methylglutaryl- Motivs in der Caprazamycin-Biosynthese**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
Dipl.-Pharm. Daniel Bär  
aus Reutlingen

Tübingen  
2023

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	29.03.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter/-in:	PD Dr. Bertolt Gust
2. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. Harald Groß

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Publikationen und Präsentationen .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Zusammenfassung.....	VII
Abstract.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Biosynthese der bakteriellen Zellwand .....	1
1.2 Die Translokase <i>MraY</i> .....	4
1.3 Nucleosid-Antibiotika .....	5
1.4 Liponucleosid-Antibiotika .....	9
1.5 Katabolismus der verzweigt-kettigen Aminosäuren .....	15
1.6 Ziele dieser Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien .....	20
2.2 Lösungen und Puffer .....	21
2.3 Kulturmedien .....	26
2.4 Säulen, Kits, Enzyme, Filter und gebrauchsfertige Lösungen .....	29
2.5 Primer .....	30
2.6 Synthetisches DNA-Fragment .....	33
2.7 Plasmide und Cosmide.....	34
2.8 Bakterienstämme.....	38
2.9 Mikrobiologische Methoden .....	43
2.10 Molekularbiologische Methoden .....	45
2.11 Biochemische Methoden .....	56
2.12 Chemische und analytische Methoden.....	58
3 Ergebnisse .....	60
3.1 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase <i>Cpz5</i> als möglicher Startpunkt der 3-Methylglutaryl-CoA Biosynthese.....	60
3.1.1 Bioinformatische Analyse von <i>cpz5</i> .....	60
3.1.2 Gendeletion von <i>cpz5</i> .....	61
3.2 Der Primärmetabolismus als Ursprung von 3-Methylglutaryl-CoA.....	65
3.2.1 Identifizierung des Leucin-Isovalerat-Abbauweges (Liu-Weg) in <i>S.</i> <i>coelicolor</i> M1154.....	65

3.2.2	Deletion des kompletten <i>liu</i> -Genclusters.....	69
3.2.3	Einzeldeletionen der <i>liu</i> -Gene .....	74
3.2.3.1	Deletion von <i>sco2779</i> .....	74
3.2.3.2	Fütterung von (1- <sup>13</sup> C)-3-Methylcrotonyl-SNAc.....	75
3.2.3.3	Identifikation und Deletion der Acyl-CoA Dehydrogenase <i>sco2774</i> .....	79
3.2.3.4	Deletionen von <i>sco2776</i> und <i>sco2777</i> .....	85
3.2.3.5	Deletion von <i>sco2778</i> .....	90
3.2.4	Komplementierungen der Gendeletionen .....	93
3.2.4.1	Chemische Komplementierung von <i>sco2774</i> und <i>sco2779</i> .....	93
3.2.4.2	Genetische Komplementierung von <i>sco2776</i> und <i>sco2777</i> .....	93
3.2.5	Zusammenfassung der <i>liu</i> -Gencluster Experimente .....	98
3.3	Beteiligung von Genen des Caprazamycin-Genclusters an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA .....	99
3.3.1	Identifizierung von <i>cpz2</i> , <i>cpz20</i> und <i>cpz25</i> als Kandidaten für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA .....	99
3.3.2	Gendeletionen von <i>cpz2</i> , <i>cpz20</i> und <i>cpz25</i> .....	101
3.3.2.1	Deletion von <i>cpz2</i> .....	101
3.3.2.2	Deletion von <i>cpz20</i> und <i>cpz25</i> .....	103
3.3.3	Genetische Komplementierung von <i>cpz20</i> und <i>cpz25</i> .....	103
3.3.4	Biochemische Untersuchungen von Cpz2 und Cpz25 .....	108
3.3.4.1	Isolation von Cpz2 und Cpz25 aus <i>E. coli</i> Rosetta DE3.....	108
3.3.4.2	Isolation von Cpz25 aus <i>Streptomyces lividans</i> TK24 .....	110
3.3.5	Enzymatische Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA durch Cpz2 .....	111
3.3.6	Zusammenfassung der Caprazamycin-Gencluster Experimente .....	113
3.4	Untersuchungen von möglichen Acyl-CoA Dehydratasen zur Ergänzung des Caprazamycin-Gencluster codierten Biosyntheseweges.....	115
3.4.1	Identifizierung von möglichen Acyl-CoA Dehydratasen auf dem Genom von <i>S. coelicolor</i> M1154.....	115
3.4.2	Generierung und Analyse von Mutanten mit Transposon-Inaktivierung....	116
3.5	Modell zum Ursprung von 3-Methylglutaryl-CoA für die Caprazamycin-Biosynthese .....	120
3.6	Die Rolle des Regulators <i>Sco2775</i> für die 3-Methylglutaryl-CoA Biosynthese .....	122
3.6.1	Bioinformatische Analyse des Regulators <i>sco2775</i> .....	122
3.6.2	Einfluss einer <i>sco2775</i> -Überexpression auf die Caprazamycin-Produktion.....	123

## Inhaltsverzeichnis

---

3.6.3	Einfluss einer Deletion von <i>sco2775</i> auf die Caprazamycin-Produktion ...	125
3.6.4	Erstellung eines Caprazamycin-Genclusters mit Überexpressionskassette zur Analyse des Einflusses einer Deletion von <i>sco2775</i> .....	127
3.6.5	Einfluss von L-Leucin, Isovaleryl-SNAc und 3-Methylcrotonyl-SNAc auf die Bindung des Regulators <i>Sco2775</i> .....	129
3.6.6	Zusammenfassung der Untersuchungen des Regulators <i>Sco2775</i> ....	134
4	Diskussion .....	135
4.1	Intermediate des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren für die Biosynthese von Naturstoffen.....	135
4.2	Die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA durch das Caprazamycin-Gencluster .....	142
4.3	Die Regulation des <i>liu</i> -Genclusters .....	146
5	Literaturverzeichnis .....	151
6	Abbildungsverzeichnis.....	167
7	Tabellenverzeichnis.....	172
8	Danksagung .....	174

## Publikationen und Präsentationen

### Publikationen:

**Daniel Bär**, Benjamin Konetschny, Andreas Kulik, Houchao Xu, Davide Paccagnella, Patrick Beller, Nadine Ziemert, Jeroen S Dickschat and Bertolt Gust. Origin of the 3-methylglutaryl moiety in caprazamycin biosynthesis. *Microb Cell Fact* 21, 232 (2022). DOI: 10.1186/s12934-022-01955-6.

Zhiyong Yin, **Daniel Bär**, Bertolt Gust and Jeroen S. Dickschat. The substrate scope of dehydratases in antibiotic biosynthesis and their application in kinetic resolutions. *Org Biomol Chem.* 2022;20(46):9103-7. DOI: 10.1039/D2OB01879A.

### Posterpräsentationen:

“3-Methylglutarate supply pathways for caprazamycin biosynthesis” **Daniel Bär**, Emmanuel Wemakor, Andreas Kulik, Jeroen S Dickschat, Harald Groß and Bertolt Gust. *International Antibiotic CellMAP Symposium*, Bensberg, 2021.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<i>aac(3)IV</i>	Apramycin-Resistenzgen
Apra	Apramycin
Asp	Aspartat
<i>bla</i>	Ampicillin/Carbenicillin-Resistenzgen
<i>BLAST</i>	<i>Basic local alignment search tool</i>
BCAT	Verzweigtkettige Aminosäuren Aminotransferase
BCDH	Verzweigtkettige Aminosäuren Dehydrogenase
bp	Basenpaar
C <sub>55</sub> -P	Undecaprenylphosphat
C <sub>55</sub> -PP	Undecaprenyldiphosphat
Carb	Carbenicillin
Cml	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
Cpz	Caprazamycin
D-Ala	D-Alanin
L-Ala	L-Alanin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ESI	Elektrosprayionisation
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
D-Glu	D-Glutaminsäure
L-Glu	L-Glutaminsäure
His	Histidin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie

## Abkürzungsverzeichnis

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Liu	<i>Leucine isovalerate utilization pathway</i>
<i>m</i> -DAP	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MS	Massenspektrometrie
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
MraY <sub>aa</sub>	MraY-Translokase aus <i>Aquifex aeolicus</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>N</i> -Methyl-DABA	<i>N</i> -Methyl-2,3-Diaminobuttersäure
oriT	<i>Origin of transfer</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAc	<i>N</i> -Acetylcysteamin-Thioester
<i>sp.</i>	<i>Species</i>
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tsr	Thiostrepton
U	Einheiten
UMP	Uridinmonophosphat
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett

## Zusammenfassung

Caprazamycine sind Liponucleosid-Antibiotika, die erstmals aus *Streptomyces sp.* MK730-62F2 isoliert wurden. Durch eine inhibitorische Wirkung auf die MraY-Translokase greifen sie in die Biosynthese der bakteriellen Zellwand ein. Sie zeigen Bioaktivität gegenüber grampositiven Bakterien, einschließlich dem klinisch relevanten Erreger *Mycobacterium tuberculosis*. Die Caprazamycine sind chemisch aus einem Grundgerüst bestehend aus Glycyluridin, 5-Amino-5-Deoxyribofuranose und einem permethylierten Diazepanon-Ring aufgebaut. Die Hydroxygruppe des Diazepanons trägt eine  $\beta$ -Hydroxyfettsäure. An deren  $\beta$ -Hydroxygruppe ist wiederum ein 3-Methylglutaryl-Rest verknüpft, der an der freien Carboxylgruppe eine permethylierte L-Rhamnose trägt. Die Biosynthese der Caprazamycine ist zu einem gewissen Maße untersucht, die Herkunft und Biosynthese des 3-Methylglutaryl-Motivs war bisher jedoch unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Caprazamycin-Gencluster und dem Primärmetabolismus des heterologen Produzenten *Streptomyces coelicolor* M1154 zwei Ursprünge dieses 3-Methylglutaryl-Motives identifiziert und sowohl genetisch als auch biochemisch näher charakterisiert.

Zunächst wurden Gene des Caprazamycin-Genclusters untersucht, die an einem biosynthetischen Weg hin zu 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt sein könnten. Hierfür kamen nach bioinformatischer Analyse die Gene *cpz2*, *cpz5*, *cpz20* und *cpz25* infrage. Durch Gendelektionen und genetischer Komplementierung konnte gezeigt werden, dass *cpz5*, *cpz20* und *cpz25* für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA benötigt werden. *Cpz2* konnte auch nach zusätzlichen *in-vitro*-Experimenten keine Funktion in dieser Biosynthese zugeordnet werden.

Gendelektionen sowie chemische und genetische Komplementierungen des Abbauwegs von Leucin und Isovalerat des heterologen Produzenten konnten zeigen, dass dieser Liu-Weg (*leucine isovalerate utilization pathway*) ebenfalls ein Intermediat für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA bereitstellt.

Interessanterweise sind *Cpz20* und *Cpz25* an beiden dieser Biosynthesewege beteiligt. *Cpz25* setzt das zentrale Intermediat 3-Methylglutaconyl-CoA, welches von beiden Wegen gebildet wird, zu 3-Methylglutaryl-CoA um, während *Cpz20* möglicherweise an einem Aktivierungsschritt beteiligt ist.

Zuletzt wurde der Regulator des *liu*-Genclusters auf einen möglichen Einfluss auf die Caprazamycin-Biosynthese untersucht. Eine Überexpression dieses Repressors führte zu einer verminderten Biosynthese der Caprazamycin-Aglycone, wogegen eine Gendeletion nicht zu einer Steigerung der Produktion führte. Zuletzt konnten Fütterungsexperimente mit L-Leucin, Isovaleryl-SNAc und 3-Methylcrotonyl-SNAc erste Hinweise darauf geben, dass diese als Liganden des Repressors agieren.

## Abstract

Caprazamycins are liponucleoside antibiotics first isolated from *Streptomyces sp.* MK730-62F2 targeting bacterial cell wall biosynthesis by inhibition of the MraY translocase. They show bioactivity against gram-positive bacteria, including clinically relevant *Mycobacterium tuberculosis*. Caprazamycins are built up by glycyuridine, 5-amino-5-deoxyribofuranose and a permethylated diazepanone ring. Attached to the diazepanone is a  $\beta$ -hydroxy fatty acid. The hydroxy group of this fatty acid carries a 3-methylglutaryl moiety which has a permethylated L-rhamnose attached to the free carboxyl group. Although the biosynthesis of caprazamycin is understood to some extent, the origin of the 3-methylglutaryl moiety remained unclear. During this work, both the caprazamycin gene cluster and the primary metabolism of the heterologous producer *Streptomyces coelicolor* M1154 were identified as sources for this moiety.

First, the caprazamycin gene cluster was investigated for genes possibly responsible for a biosynthetic pathway towards 3-methylglutaryl-CoA. Bioinformatic analysis revealed *cpz2*, *cpz5*, *cpz20* and *cpz25* as possible candidates. Gene deletions and genetic complementation experiments showed, that *cpz5*, *cpz20* and *cpz25* are required for supplying 3-methylglutaryl-CoA. However, even after further *in-vitro*-studies, no function could be assigned to Cpz2.

Gene deletions, chemical and genetic complementation experiments of genes responsible for degradation of leucine and isovalerate showed, that this *liu*-pathway (leucine isovalerate utilization pathway) also supplies a precursor for 3-Methylglutaryl-CoA.

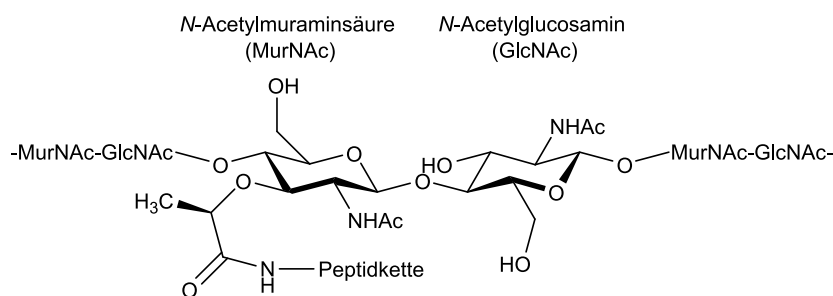
Interestingly, Cpz20 and Cpz25 are involved in both biosynthetic pathways. Cpz25 transforms the central intermediate generated by both pathways, 3-methylglutaconyl-CoA, to 3-methylglutaryl-CoA, while Cpz20 could be involved in an activation step.

Finally, the impact of the regulator of the *liu* gene cluster on caprazamycin biosynthesis was evaluated. Overexpression of this repressor led to decreased production of caprazamycin aglycons, whereas a gene deletion did not result in an increased production. Feeding studies with L-leucin, isovaleryl-SNAc and 3-methylcrotonyl-SNAc indicated, that those act as ligands on this repressor.

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Biosynthese der bakteriellen Zellwand

Die bakterielle Zellwand verleiht dem Bakterium Form und gewährleistet Stabilität gegenüber dem osmotischen Druck, den die im Zytoplasma gelösten Stoffe verursachen [1]. Die Hauptkomponente dieser Zellwand ist das Peptidoglycan [2]. Während gramnegative Bakterien nur ein bis zwei Schichten dieses Polymers aufweisen, können grampositive Bakterien ein bis zu 25-schichtiges Peptidoglycan besitzen [1]. Aufgebaut ist das Peptidoglycan aus den beiden Sacchariden *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Diese sind alternierend durch  $\beta$ -1-4-glycosidische Bindungen verknüpft und bilden hierdurch langkettige Glycanstränge (Abbildung 1) [3]. Zudem trägt der *D*-Lactoyl-Rest der *N*-Acetylmuraminsäure an der Carboxylgruppe eine kurze Peptidkette [4]. Diese Peptidkette besteht in einer Vielzahl gramnegativer Bakterien aus *L*-Alanin, *D*-Glutaminsäure, *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure und zwei Einheiten *D*-Alanin [5]. In vielen grampositiven Bakterien enthält das Peptid anstelle der *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure ein *L*-Lysin [6].



**Abbildung 1:** Chemische Struktur des Disaccharids aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) als Grundeinheit des Peptidoglycans. Der *D*-Lactoyl-Rest der *N*-Acetylmuraminsäure trägt zur Quervernetzung eine Peptidkette.

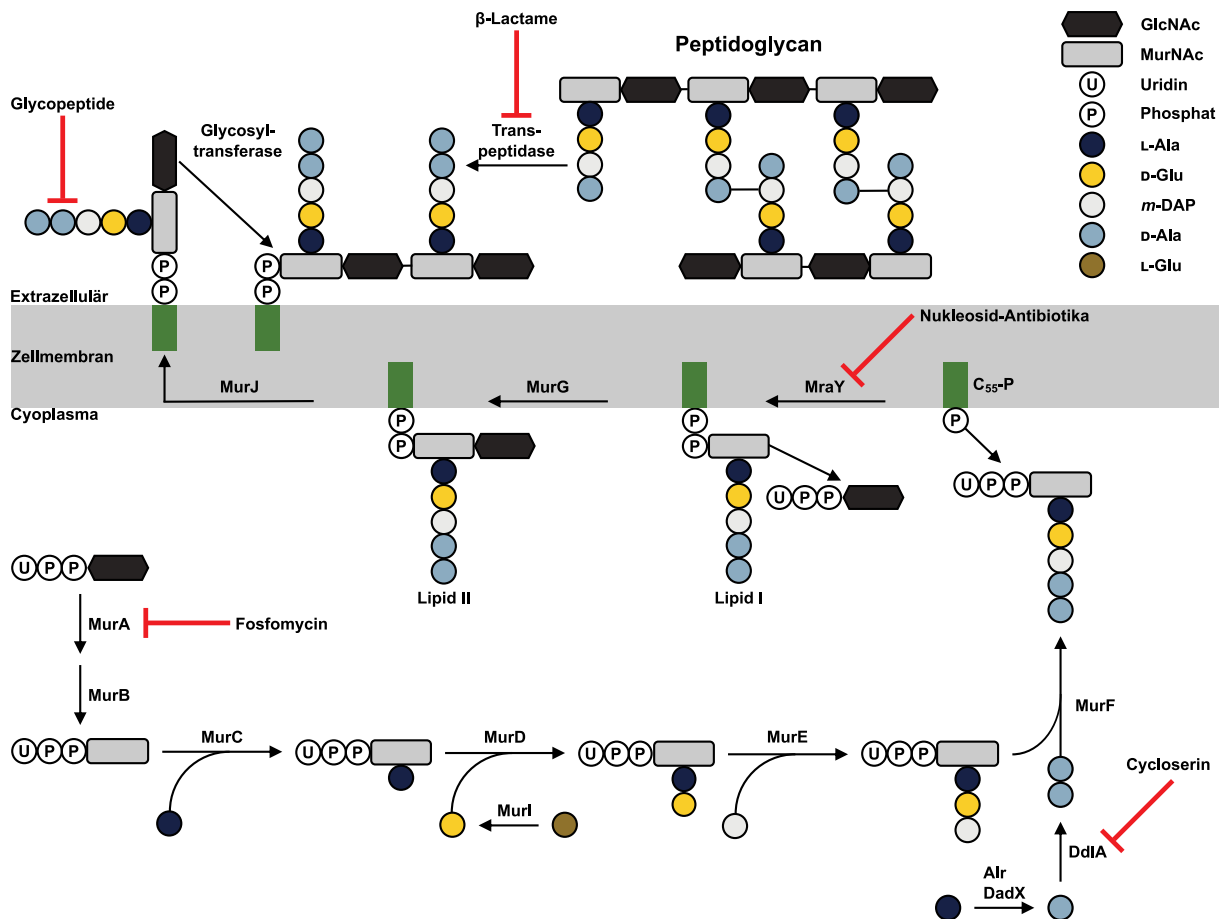
Die Funktion der Peptidkette liegt in der Quervernetzung der einzelnen Glycanstränge. Diese erfolgt in den meisten Bakterien über eine Verbindung der Aminosäuren 3 und 4 zweier Peptidketten (3-4-Quervernetzung) [7]. In gramnegativen Bakterien erfolgt diese, Transpeptidierung genannte Reaktion, direkt. Die freie Aminogruppe der

Aminosäure an Position 3 geht hierbei eine Peptidbindung mit D-Alanin an Position 4 unter Abspaltung des endständigen D-Alanins ein. In grampositiven Bakterien erfolgt die Quervernetzung indirekt über einer Peptidbrücke, die aus einer bis sieben Aminosäuren bestehen kann [6]. In *Streptomyces coelicolor* A3(2) besteht diese Brücke meist aus einem einzelnen L-Glycin [8].

Die Biosynthese des Peptidoglycans beginnt mit der Umsetzung von UDP-GlcNAc zu UDP-MurNAc durch MurA und MurB im Cytoplasma (Abbildung 2) [4]. Im nächsten Schritt erfolgt der sukzessive Aufbau der Pentapeptid-Seitenkette am D-Lactoyl-Rest des UDP-MurNAc. Bei den hieran beteiligten Enzymen MurC bis MurF handelt es sich um spezifische Aminosäure Ligasen [6]. Im Falle von MurE können diese jedoch auch eine weniger strikte Selektivität aufweisen, was zum Einbau anderer Mono- und Diaminosäuren anstelle der üblichen *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure und L-Lysin führt [6, 9, 10]. Die Racemase Murl wird benötigt, um L-Glutamin zu D-Glutamin umzuwandeln, welches dann von MurD auf Position 2 des Peptids übertragen wird [11]. Die Alanin Racemasen Alr und DadX stellen D-Alanin aus L-Alanin bereit, welches durch DdIA zunächst zum D-Ala-D-Ala-Dipeptid ligiert und anschließend von MurF auf die wachsende Peptid-Seitenkette übertragen wird [12].

Die Biosynthese verlagert sich nun vom Cytoplasma an die Zellmembran. Die membranständige Translokase MraY transferiert hier Phospho-MurNAc-Pentapeptid von UDP-MurNAc-Pentapeptid auf den in der Membran verankerten Lipidträger Undecaprenylphosphat (C<sub>55</sub>-P) [13]. Auf das hierdurch entstandene Lipid I überträgt MurG im nächsten Schritt ein Molekül GlcNAc unter Bildung von Lipid II [14]. Lipid II wird anschließend durch die Flippase MurJ von der cytoplasmatischen auf die äußere Seite der Cytoplasmamembran transportiert [15]. Hier polymerisieren Glycosyltransferasen Lipid II und einen bereits im Aufbau befindlichen Glycanstrang über eine  $\beta$ -1-4-glycosidische Bindung zwischen GlcNAc und MurNAc unter Abspaltung von Undecaprenyldiphosphat (C<sub>55</sub>-PP) [16]. Dieser Glycanstrang wird abschließend durch Transpeptidasen, zu denen auch die Penicillin-bindenden Proteine zählen, mit dem bestehenden Peptidoglycangerüst der Zellwand quervernetzt [17].

## Einleitung



**Abbildung 2:** Biosynthese des Peptidoglycans. GlcNAc: *N*-Acetylglucosamin; MurNAc, *N*-Acetylmuraminsäure; L-Ala, L-Alanin; D-Glu, D-Glutaminsäure; D-Ala, D-Alanin; *m*-DAP, *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure; Alr, Ala Racemase; DadX, Ala Racemase; DdlA, D-Ala-D-Ala Ligase A; MurY, Phospho-*N*-Acetylmuramoyl-Pentapeptid Transferase; MurA, UDP-GlcNAc-Enolpyruvyl Transferase; MurB, UDP-MurNAc Dehydrogenase; MurC, UDP-MurNAc-L-Ala Ligase; MurD, UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu Ligase; MurE, UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-*meso*-DAP Ligase; MurF, UDP-MurNAc-Tripeptid-D-Alanyl-D-Ala Ligase; MurG, Undecaprenyldiphosphomuramoyl-Pentapeptid β-*N*-Acetylglucosaminyl Transferase; Murl, Glutamat Racemase; MurJ, MOP (*multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide*) Transporter (Lipid II Flippase). Adaptiert nach Egan *et al.* 2020.

Die bakterielle Zellwandbiosynthese eignet sich gut als Ziel für die antimikrobielle Therapie [12]. Die β-Lactam-Antibiotika stellen als die weltweit am häufigsten eingesetzte Antibiotikaklasse Hemmer der bakteriellen Zellwandbiosynthese dar [18]. Mechanistisch beruht diese Hemmung auf einer irreversiblen Bindung an die Transpeptidase. Zu den β-Lactamen zählen die Penicilline, die Carbapeneme sowie die Cephalosporine. Eine weitere Antibiotikaklasse sind die Glycopeptide, zu denen Vancomycin und Teicoplanin gehören. Diese bilden einen Komplex mit der L-Lysin-D-Alanyl-D-Alanin-Seitenkette von Lipid II und hemmen somit die Quervernetzung der Zellwand [19]. Bacitracin bindet hingegen an Undecaprenyldiphosphat und verhindert,

dass dieses für die Biosynthese von Lipid I zu Verfügung steht [20]. Die aus verschiedenen *Streptomyces*-Arten gewonnenen Cycloserin und Fosfomycin greifen in die frühen Schritte der Zellwandbiosynthese ein. Cycloserin hemmt die D-Ala-D-Ala-Ligase DdlA, Fosfomycin hingegen MurA [21, 22].

### 1.2 Die Translokase MraY

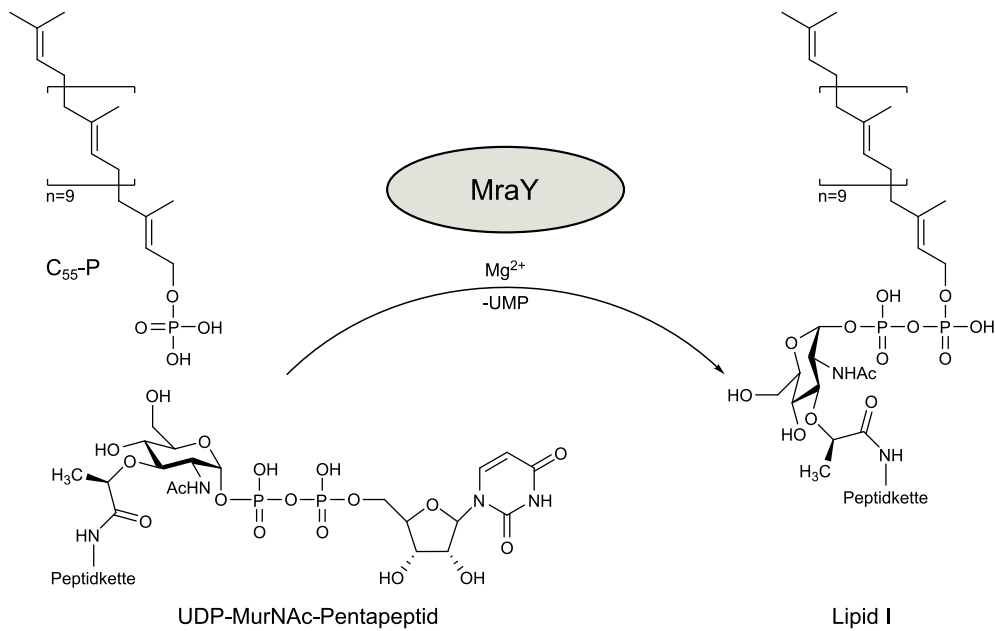
Die Phospho-*N*-Acetylmuramoyl-Pentapeptid Transferase MraY gehört zur Superfamilie der PNPTs (Polyprenylphosphat *N*-Acetylhexosamin 1-Phosphat Transferasen), welcher mit WecA, TagO, WbcO, WbpL und RgpG noch weitere prokaryotische Enzyme angehören, die an der Biosynthese von Polymeren der Zellhülle beteiligt sind [14]. Das einzige eukaryotische Paralog dieser Familie ist GPT, welches die *N*-Glycosylierung von Proteinen katalysiert.

Die erste Kristallstruktur eines aus *Aquifex aeolicus* isolierten MraY-Homologs (MraY<sub>AA</sub>) wurde 2013 publiziert [23]. Das Enzym kristallisierte als Dimer, wobei jedes Protomer zehn Transmembranhelices und fünf cytoplasmatische Schlaufen zeigte. Auf diesen Schlaufen konnten drei hochkonservierte Aspartate (Asp<sup>117</sup>, Asp<sup>118</sup> und Asp<sup>265</sup>) sowie ein Histidin (His<sup>324</sup>) lokalisiert werden, die für die Aktivität von MraY<sub>AA</sub> essentiell sind, wobei Asp<sup>265</sup> für die Bindung von Mg<sup>2+</sup> im katalytischen Zentrum benötigt wird.

Für den von MraY katalysierten Transfer des Phospho-MurNAc-Pentapeptids von UDP-MurNAc-Pentapeptid auf C<sub>55</sub>-P konnte anhand der MraY aus *Bacillus subtilis* ein Ein-Schritt-Mechanismus postuliert werden [24]. Die Aminosäure Asp<sup>98</sup>, welche Asp<sup>117</sup> der MraY aus *Aquifex aeolicus* entspricht, deprotoniert hierbei die Hydroxygruppe am Phosphat-Rest des C<sub>55</sub>-P, wodurch dieses als Nucleophil an der Phosphatgruppe des UDP-MurNAc-Pentapeptids angreifen kann [23-25]. Uridinmonophosphat (UMP) wird anschließend abgespalten, wobei das entstandene Lipid I membrangebunden zurückbleibt (Abbildung 3).

MraY ist eine Zielstruktur der bakteriellen Zellwand-Biosynthese für die Entwicklung neuer Antibiotika [26]. Die Gruppe der Nucleosid-Antibiotika zeigt eine vielversprechende antimikrobielle Aktivität, welche auf die Hemmung von MraY zurückzuführen ist. Daher sind Wirkmechanismus, Biosynthese und die chemische

Synthese neuer Derivate dieser Antibiotikagruppe Gegenstand aktueller Forschung [27-30].



**Abbildung 3:** Die von der Phospho-*N*-Acetylmuramoyl-Pentapeptid Transferase MraY katalysierte Reaktion. Das Phospho-MurNAc-Pentapeptid von UDP-MurNAc-Pentapeptid wird im Rahmen der enzymatischen Reaktion auf das membranständige Undecaprenylphosphat (C<sub>55</sub>-P) unter Abspaltung von Uridinmonophosphat (UMP) und Bildung von Lipid I übertragen.

### 1.3 Nucleosid-Antibiotika

Die Einteilung der MraY-inhibierenden Nucleosid-Antibiotika kann in fünf Gruppen erfolgen: Die Muraymycine, die Mureidomycine, die Capuramycine, die Tunicamycine und die Liposidomycine [27]. Als gemeinsame chemische Kernstruktur enthalten die Vertreter aller Gruppen eine Nukleinbase, welche an ein Saccharid gebunden ist (Abbildung 4) [30].

Die Muraymycine wurden erstmals aus *Streptomyces* sp. NRRL 30471 isoliert [31]. Das entsprechende Muraymycin-Gencluster in diesem Stamm ist ebenfalls bekannt [32]. Die Grundstruktur der 19 bekannten Muraymycine bildet ein Disaccharid, bestehend aus 5-Amino-5-Desoxyribofuranose und Glycyluridin [33]. Über eine Aminopropylverbindung ist das Glycyluridin mit einem Ureapeptid-Rest, bestehend aus L-Leucin oder L-Hydroxyleucin, L-Epicapreomycinid und L-Valin, verbunden.

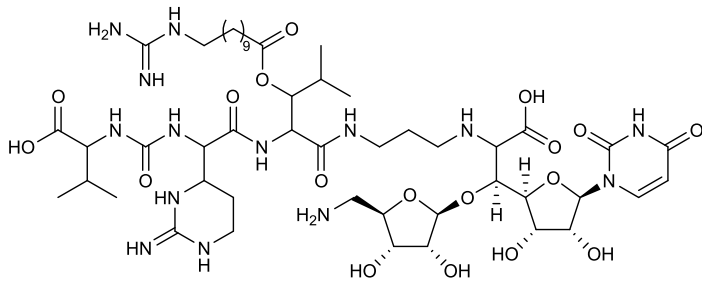
Außerdem kann die Hydroxygruppe des L-Hydroxyleucins mit einer Lipidkette verestert sein, die zusätzlich noch eine Guanidinstruktur tragen kann. Für Muraymycin A1 konnte eine gute Aktivität gegen die Gattungen *Staphylococcus* und *Enterococcus* sowie *Escherichia coli* gezeigt werden [31]. Der Wirkmechanismus der Muraymycine beruht nicht auf einer Interaktion mit dem aktiven Zentrum von MraY, sondern führt durch Bindung an anderer Stelle zu einer signifikanten Konformationsänderung des Enzyms, wie durch eine Kristallstruktur von MraY im Komplex mit Muraymycin D2 gezeigt werden konnte [34].

Die Antibiotika der Mureidomycin-Gruppe werden auch Uridylpeptid-Antibiotika genannt [28]. Zu ihnen gehören die Mureidomycine aus *Streptomyces flavidovirens* SANK 60486, die Pacidamycine aus *Streptomyces coeruleorubidus*, die Napsamycine aus *Streptomyces sp.* HIL Y-82,11372 sowie die Sansanmycine aus *Streptomyces sp.* SS [35-38]. Die Biosynthese-Gencluster der Pacidamycine, Napsamycine und Sansanmycine konnten ebenfalls identifiziert werden [39-42]. Chemisch gemein sind diesen Antibiotika ein 3-Deoxyuridin, welches über eine Enamid-Bindung mit einer *N*-Methyl-2,3-Diaminobuttersäure (*N*-Methyl-DABA) verknüpft ist. Die Stickstoffatome von *N*-Methyl-DABA tragen verschiedene Aminosäuren, welche für die Einteilung der Uridylpeptide herangezogen wird. Außerdem kann das Uracil durch ein Dihydrouracil ersetzt sein, was die Strukturvielfalt noch weiter vergrößert [27, 28]. Die Uridylpeptid-Antibiotika zeigen eine moderate bis potente Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa*, während die Sansanmycine eine zusätzliche Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* aufweisen [37, 38, 43, 44]

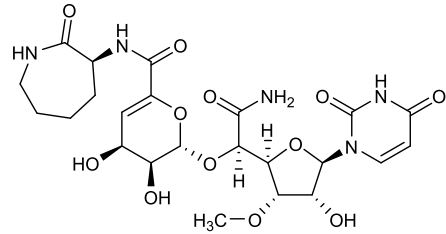
Die Gruppe der Capuramycine beinhaltet neben dem Capuramycin aus *Streptomyces griseus* 446-S3 auch weitere Derivate dieses Naturstoffs [45]. Die A-500359-Familie mit Aktivität gegen *Mycobacterium smegmatis* wurde aus *Streptomyces griseus* SANK 60196, die A-503083-Familie aus *Streptomyces sp.* SANK 62799 und A-102395 aus *Amycolatopsis sp.* SANK 60206 isoliert sowie die zugehörigen Biosynthese-Gencluster identifiziert [46-52]. Die gemeinsame chemische Struktur besteht aus einem Uridin-5'-Carboxamid, einer Hexuronsäure sowie einem L-Aminocaprolactam, wobei letzteres in A-102395 durch ein Arylamin-beinhaltenes Polyamid ersetzt wurde [28]. Beide Strukturen scheinen jedoch für die Inhibition von MraY entscheidend zu sein [46, 53]. Die Kristallstruktur des Komplexes von Capuramycin und MraY aus *Aquifex aeolicus* konnte außerdem zeigen, dass der Caprolactam-Rest eine Bindestelle an MraY<sub>AA</sub> aufweist, die unter den Nucleosid-Antibiotika einzigartig ist [54].

Die Tunicamycine wurden erstmals aus *Streptomyces lysosuperficus* und später aus *Streptomyces chartreusis* isoliert [55, 56]. In *Streptomyces chartreusis* konnte zusätzlich das Biosynthese-Gencluster identifiziert werden [57]. Als charakteristische Kernstruktur tragen die Tunicamycine die Undecodialdose Tunicamin [56]. An dieser sind ein Uracil, ein glycosidisch gebundenes D-N-Acetylglucosamin sowie ein Fettsäurerest mit variabler Länge angebracht. Die Tunicamycine zeigen insbesondere eine gute Aktivität gegenüber Stämmen der Gattung *Bacillus* [55]. Neben der Peptidoglycan-Biosynthese blockieren sie auch die Biosynthese der Teichonsäuren durch eine Hemmung von TagO, zeigen jedoch auch Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen durch Inhibierung der N-Glycosylierung von Proteinen [58, 59]. Die molekulare Bindung von Tunicamycin an MraY konnte durch Kristallisation eines MraY-Tunicamycin-Komplexes genauer beschrieben werden [60].

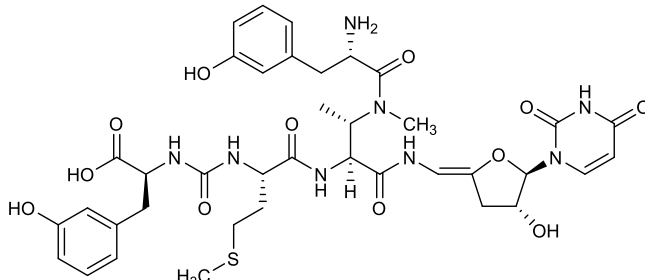
Die letzte Gruppe der Liponucleosid-Antibiotika wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.



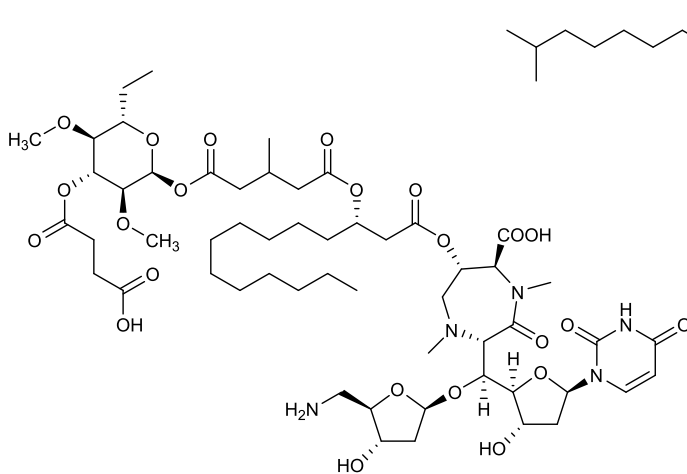
Muraymycin A2



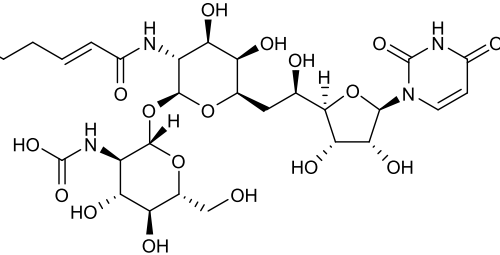
Capuramycin



Mureidomycin A



Muraminomycin F



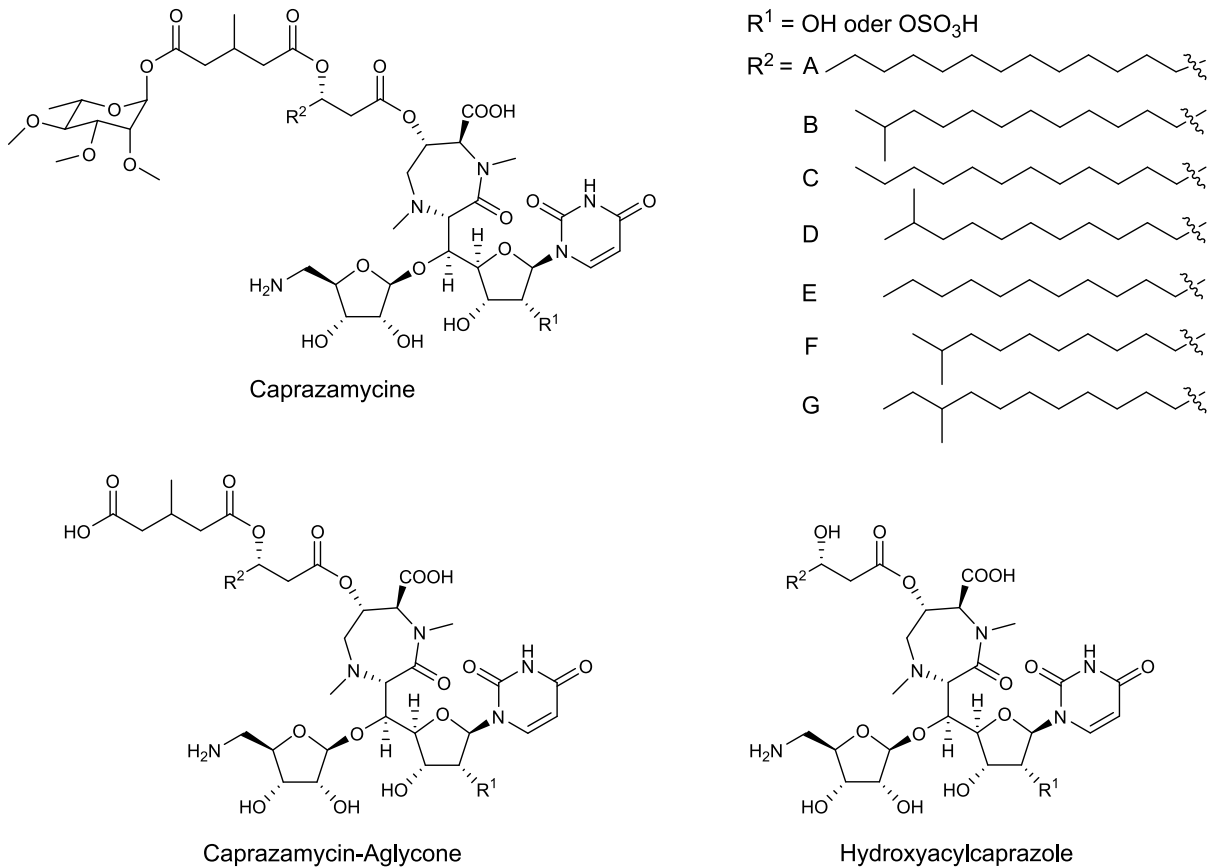
Tunicamycin I

**Abbildung 4:** Strukturformeln der Nucleosid-Antibiotika Muraymycin A2, Mureidomycin A, Muraminomycin F, Capuramycin und Tunicamycin I.

## 1.4 Liponucleosid-Antibiotika

Zur Gruppe der Liponucleosid-Antibiotika gehören zum einen die Liposidomycine, die erstmals aus *Streptomyces griseosporus* isoliert wurden und eine gute Aktivität gegenüber *Mycobacterium phlei* zeigen [61]. Das entsprechende Biosynthese-Gencluster konnte in *Streptomyces sp.* SN-1061M identifiziert werden [62]. Die Vertreter A-90289 A und B wurden aus *Streptomyces sp.* SANK 60405 isoliert und das zugehörige Biosynthese-Gencluster zeigt eine große Ähnlichkeit zum Gencluster der Caprazamycine [63, 64]. Die neun Vertreter der Muraminomycine stammen aus *Streptosporangium amethystogenes* SANK 60709 und das Biosynthese-Gencluster ist auch hier bekannt [65, 66]. Caprazamycin B wurde als erster Vertreter der Caprazamycine aus *Streptomyces sp.* MK730-62F2 isoliert [67]. Es zeigt eine vielversprechende Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien, einschließlich Stämmen der Gattung *Mycobacterium*, zu welcher auch der klinisch relevante Erreger *M. tuberculosis* gehört [67, 68].

Die Liponucleoside beinhalten als gemeinsame chemische Kernstruktur das (+)-Caprazol. Dieses setzt sich aus Glycyluridin, 5-Amino-5-Deoxyribofuranose und einem permethylierten Diazepanon-Ring zusammen (Abbildung 5) [28]. Im Falle der Muraminomycine ist an 5-Amino-5-Deoxyribofuranose und Glycyluridin jeweils eine Hydroxygruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt, während die weiteren Vertreter hier eine Sulfatgruppe aufweisen können [66]. An der Hydroxygruppe des Diazepanons ist eine  $\beta$ -Hydroxyfettsäure mit variabler Kettenlänge angebracht [28]. Aus Länge und Konstitution der Fettsäurekette resultiert die Bezeichnung der einzelnen Vertreter. Die  $\beta$ -Hydroxygruppe der Fettsäure ist wiederum mit einem 3-Methylglutaryl-Rest verestert. Dieser trägt im Falle der Caprazamycine und der A-90289-Substanzen eine permethylierte L-Rhamnose, welche bei den Liposidomycinen nicht vorhanden ist. Die Muraminomycine tragen anstelle der L-Rhamnose eine 2,4-Dimethoxy-3-Succinyl-6-Methylrhamnose [66, 69].



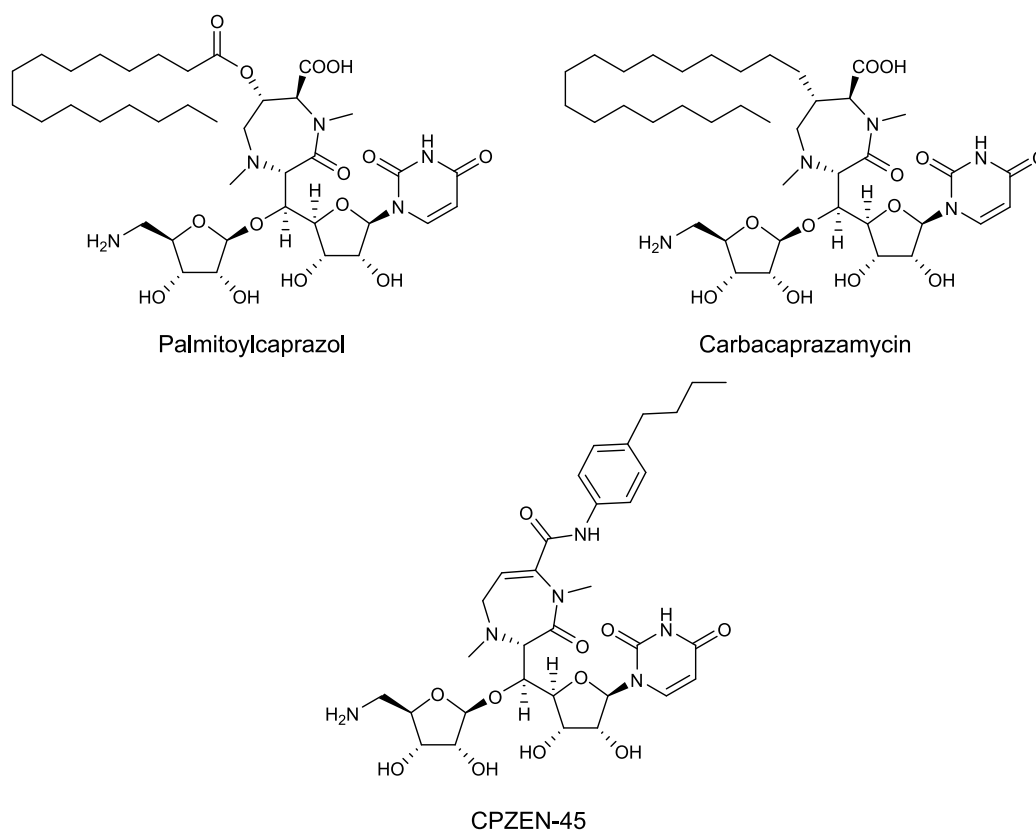
**Abbildung 5:** Strukturformeln der Caprazamycine, Caprazamycin-Aglycone und der Hydroxyacylcaprazole.

Über die Funktion des 3-Methylglutaryl-Restes ist wenig bekannt. Für die Liposidomycine konnte gezeigt werden, dass der 3-Methylglutaryl-Rest die inhibitorische Aktivität auf die Peptidoglycan-Biosynthese verbessert [70]. Bei der Entwicklung neuer Caprazamycin-Derivate wurde der Fokus jedoch auf die Verkleinerung des Moleküls gelegt, was den Verlust des 3-Methylglutaryl-Restes zur Folge hatte. In Palmitoylcaprazol wurde der  $\beta$ -Hydroxyfettsäure-Rest durch einen einfacheren Palmitoyl-Rest ersetzt, was im Vergleich zu Caprazamycin B noch immer zu einer ähnlichen Wirksamkeit gegenüber *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium tuberculosis* führte (Abbildung 6) [71, 72]. Die antimikrobielle Aktivität sinkt jedoch, wenn der  $\beta$ -Hydroxyfettsäure-Rest durch eine einfache Alkylkette ersetzt wird, wie der Vergleich von Palmitoylcaprazol mit Carbacaprazamycin zeigte [73].

Außerdem kommen diese Studien zu dem Schluss, dass die Schlüsselstruktur für die antimikrobielle Aktivität aus der Aminoribose, dem Uridin sowie der Fettsäure besteht, wohingegen der 3-Methylglutaryl-Rest, der Diazepanonring und die Rhamnose

entbehrlich waren [71, 73, 74]. Dies konnte durch den Kristallkomplex von Carbacaprazamycin und *MraY<sub>AA</sub>* noch weiter belegt werden [54]. Zum einen gehen Aminoribose und Uridin umfangreiche Interaktionen mit dem Enzym ein, während es beim Diazepanonring nur wenige sind. Zum anderen blockiert der Fettsäure-Rest eine lange, hydrophobe Furche, von der angenommen wird, dass diese als Bindestelle des C<sub>55</sub>-Ps dient.

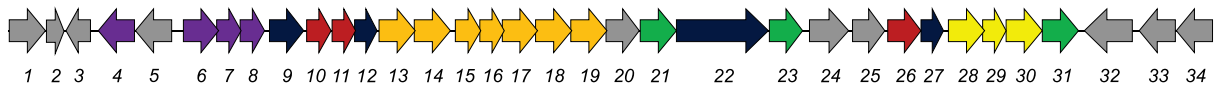
In CPZEN-45 wurde der Fettsäure-Rest durch 4-Butylanilid ersetzt, was zu einer verbesserten Aktivität bei geringerer Toxizität gegenüber den Caprazamycinen führte [68]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass die Zielstruktur dieses Moleküls in *Mycobacterium tuberculosis* von *MraY* zu *WecA* wechselte und somit anstelle des Peptidoglycans in die Biosynthese der Mycolyarabinogalactane eingreift [68, 75, 76]. Die mögliche therapeutische Bedeutung von CPZEN-45 wurde durch *in-vitro*-Studien zur Permeabilität und Cytotoxizität, die pharmazeutische-technologische Entwicklung sprühgetrockneter Partikel für die inhalative Therapie sowie einer Wirksamkeitsstudie durch Inhalation bei Meerschweinchen untermauert [77-79].



**Abbildung 6:** Strukturformeln der semisynthetischen Caprazamycin-Derivate Palmitoylcaprazol, Carbacaprazamycin und CPZEN-45.

Das Caprazamycin-Gencluster wurde im Wildtyp-Produzenten *Streptomyces sp.* MK730-62F2 identifiziert und erfolgreich in *Streptomyces coelicolor* M512 heterolog exprimiert (Abbildung 7) [80]. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Gene *cpz9-cpz31* für die Biosynthese der nicht-sulfatierten Caprazamycine essentiell sind. Die Sulfatierung der Caprazamycine erfolgt über einen PAPS-abhängigen 2-Schritt-Mechanismus unter Bildung von Sulfidinen, welche im zweiten Schritt als Sulfatgruppen-Donoren einer PAPS-unabhängigen Arylsulfat Sulfotransferase dienen [81]. Die hierfür verantwortlichen Sulfotransferasen Cpz4 und Cpz8, die Typ-III-Polyketid Synthase Cpz6 sowie die PAP 3'-Phosphatase Cpz7 erweitern das Gencluster um die für diese Enzyme codierenden Gene [81, 82]. Das Gencluster für die Biosynthese der L-Rhamnose besteht aus den Genen *cpzDI-cpzDVII* und ist an anderer Stelle des Genoms lokalisiert [83]. Die heterologe Expression des Caprazamycin-Genclusters, ohne die notwendigen Gene zur Biosynthese der L-Rhamnose, führt zu einer Akkumulation von Caprazamycin-Aglyconen anstelle der Caprazamycine.

Caprazamycin-Gencluster



L-Rhamnose-Gencluster



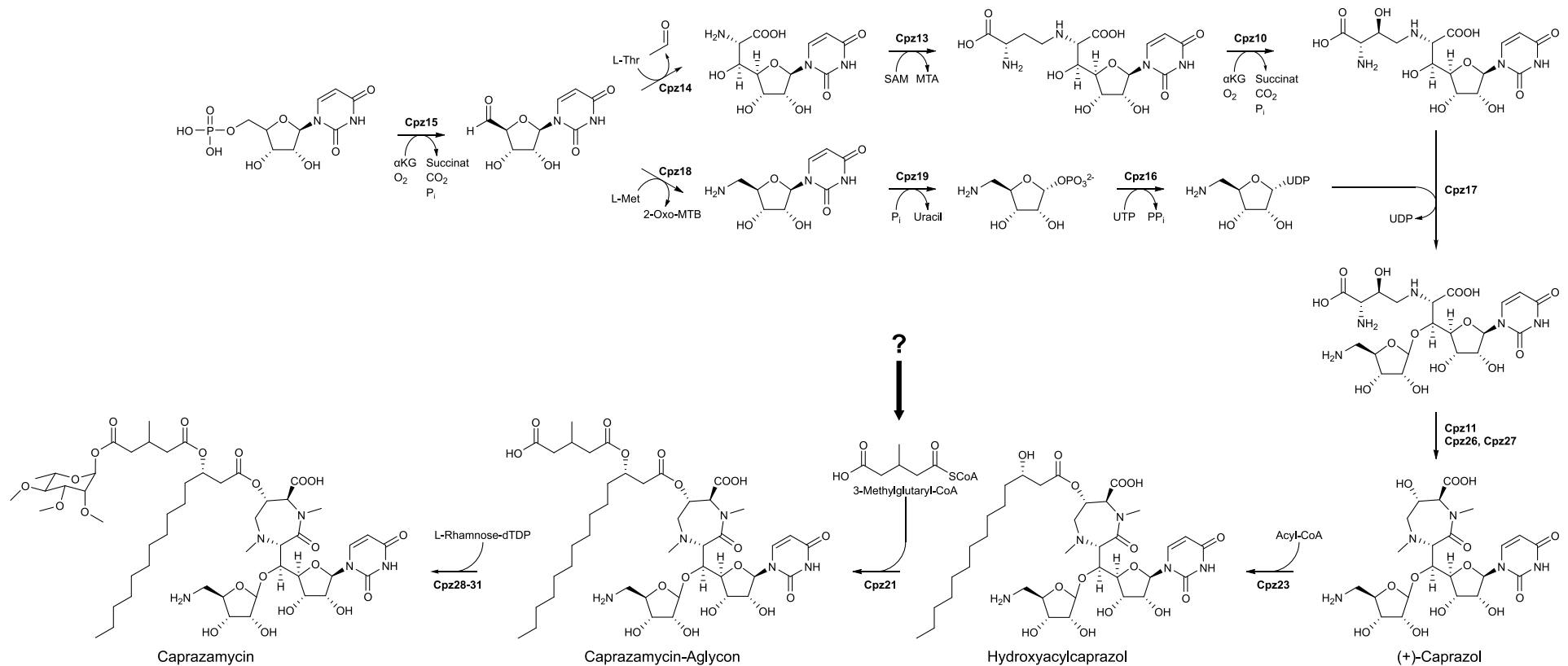
**Abbildung 7:** Caprazamycin-Gencluster sowie das für die L-Rhamnose codierende Gencluster. Beide Cluster wurden aus *Streptomyces sp.* MK730-62F2 isoliert. Die Einteilung der Gene wurde adaptiert nach McErlean *et al.* 2020.

Die Biosynthese der Caprazamycine ist zu einem gewissen Grad untersucht (Abbildung 8) [28]. Die ersten Schritte dieser Biosynthese führen ausgehend von Uridinmonophosphat zu einer Disaccharid-Struktur, bestehend aus 5-Amino-5-Deoxyribofuranose und Glycyluridin, welche neben den Caprazamycinen auch in den weiteren Nucleosid-Antibiotika Liposidomycin, Muraymycin, Muraminomycin, Sphaerimycin und A-90289 vorkommt [84]. Die Biosynthese dieses Disaccharids sowie die anschließende Kopplung der 6'-Aminogruppe mit dem 3-Amino-3-Carboxypropyl-

Rest von S-Adenosyl-L-Methionin konnte *in-vitro* mit den Enzymen LipJ-LipP des A-90289-Genclusters nachgestellt werden [85-88]. Das Caprazamycin-Gencluster codiert mit *cpz13-cpz19* für Homologe dieser Enzyme, welche derselben Biosynthese zugeschrieben werden [80]. Die Bildung von Uridin-5'-Aldehyd aus Uridinmonophosphat durch Cpz15 konnte außerdem biochemisch bestätigt werden [89]. Im nächsten Schritt erfolgt die  $\beta$ -Hydroxylierung der 3-Amino-3-Carboxypropyl-Seitenkette des 6'-N-Alkyl-5'-C-Glycyluridins, welche Cpz10 zugeschrieben wird. Neuere biochemische Untersuchungen von Cpz10 deuten jedoch darauf hin, dass die Kopplung und  $\beta$ -Hydroxylierung der 3-Amino-3-Carboxypropyl-Seitenkette stattfinden, bevor die 5-Amino-5-Deoxyribofuranose zur Bildung des Disaccharids auf das Glycyluridin übertragen wird [89]. Der anschließende Ringschluss zum Diazepanon sowie die Methylierung der beiden Stickstoffatome dieses Rings zur Bildung des (+)-Caprazols wurden bisher nicht nachgewiesen. Es wurde jedoch eine Beteiligung von Cpz11 und Cpz26 an der N-Methylierung und eine Beteiligung von Cpz27 als Aktivator für den Ringschluss diskutiert [84]. Im nächsten Schritt überträgt die Lipase Cpz23 eine  $\beta$ -Hydroxyfettsäure auf die freie Hydroxygruppe am Diazepanonring des (+)-Caprazols und bildet hierdurch die Hydroxyacylcaprazole [90]. Die freie  $\beta$ -Hydroxygruppe dieser Fettsäure wird wiederum durch die Carboxylesterase Cpz21 mit einem 3-Methylglutaryl-Rest verestert, wodurch die Caprazamycin-Aglycone entstehen [80]. Die biosynthetische Herkunft des übertragenen 3-Methylglutaryl-Restes ist bisher nicht bekannt. Die Caprazamycin-Aglycone werden im letzten Teil der Biosynthese durch Cpz28 mit einer L-Rhamnose an der freien Carbonsäuregruppe des 3-Methylglutaryl-Restes versehen. Durch Permethylierung der L-Rhamnose unter Beteiligung von Cpz29-Cpz31 entstehen die Caprazamycine [83].

Die Regulation des Caprazamycin-Genclusters wird Cpz9 zugeschrieben. Der ABC-Transporter Cpz22 und die Kinasen Cpz12 und Cpz27 könnten für den Efflux der Caprazamycine und deren Inaktivierung durch Phosphorylierung verantwortlich sein [80, 89]. Bisher unklar sind die Funktionen der Gene an beiden Rändern des Genclusters, *cpz1-3* und *cpz32-34*, sowie von *cpz5*, *cpz20*, *cpz24* und *cpz25*.

## Einleitung



**Abbildung 8:** Biosynthese der Caprazamycine anhand des Caprazamycins E. Die mögliche Sulfatierung der Caprazamycine, Caprazamycin-Aglycone und Hydroxyacylcaprazole durch Cpz4 ist nicht gezeigt.  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -Ketoglutarat;  $\text{P}_i$ : anorganisches Phosphat;  $\text{PP}_i$ : anorganisches Pyrophosphat; L-Thr: L-Threonin; L-Met: L-Methionin; 2-Oxo-MTB: 2-Oxo-4-Methylthiobutanoat; SAM: S-Adenosyl-L-Methionin; MTA: Methylthioadenosin; UTP: Uridintriphosphat; UDP: Uridindiphosphat; dTDP: Thymidindiphosphat; Cpz10:  $\beta$ -Hydroxylase; Cpz11: Methyltransferase; Cpz13: Aminotransferase; Cpz14: PLP-abhängige Aldolase; Cpz15: non-Häm Fe(II)-abhängige Dioxygenase; Cpz16: Nucleotidyltransferase; Cpz17: Glycosyltransferase; Cpz18: Aminotransferase; Cpz19: Nucleosidphosphorylase; Cpz21: Carboxylesterase; Cpz23: Acyltransferase; Cpz26: Methyltransferase; Cpz27: Kinase; Cpz28-30: Methyltransferasen; Cpz31: Rhamnosyltransferase.

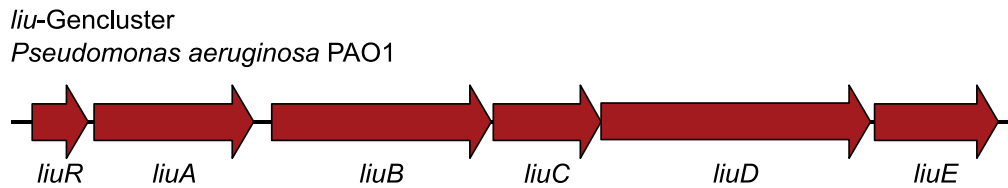
## 1.5 Katabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren

Die verzweigtkettigen Aminosäuren und deren Abbauprodukte haben eine große Bedeutung für den bakteriellen Organismus. Ihre Intermediate stellen kurzkettige Acyl-CoAs dar, die als Vorstufen für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA denkbar sind. Außerdem werden die Intermediate dieses Abbaus beispielsweise zur Biosynthese einiger verzweigtkettiger Fettsäuren benötigt [91]. In *Streptomyces coelicolor* machen diese verzweigtkettigen Fettsäuren mit etwa 84 % den größten Teil der gesamten Fettsäuren aus. Außerdem liefert der Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren Energie in Form von Acetyl-CoA [92]. In *Streptomyces* sind die Abbauprodukte dieser Aminosäuren weiterhin für die Bildung von Sekundärmetaboliten wie den Polyketiden wichtig [93].

Der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin erfolgt zunächst über einen gemeinsamen Abbauweg, welcher im späteren Verlauf in drei individuelle Abbauwege abzweigt. Der erste Schritt im gemeinsamen Abbauweg der verzweigtkettigen Aminosäuren in Bakterien wird durch die verzweigtkettige Aminosäuren Aminotransferase (BCAT) katalysiert [94]. Dieses Enzym überträgt die  $\alpha$ -Aminogruppe von Leucin, Isoleucin oder Valin auf  $\alpha$ -Ketoglutarat unter Bildung der entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren 4-Methyl-2-Oxopentansäure, 3-Methyl-2-Oxopentansäure und 3-Methyl-2-Oxobutansäure sowie L-Glutaminsäure [95]. Im zweiten Schritt werden die  $\alpha$ -Ketosäuren im Rahmen einer oxidativen Decarboxylierung zu den entsprechenden Acyl-CoA Derivaten Isovaleryl-CoA, 2-Methylbutyryl-CoA und Isobutyryl-CoA umgewandelt. Dieser Schritt wird durch den verzweigtkettige Aminosäuren Dehydrogenase Komplex (BCDH-Komplex) katalysiert [96]. Sowohl für *Streptomyces coelicolor* als auch für *Streptomyces avermitilis* sind jeweils zwei unabhängige Gencluster beschrieben worden, die als BCDH-Komplex fungieren [95, 97, 98]. Der weitere Abbau der Produkte dieses Komplexes erfolgt fortan für jedes der drei Intermediate auf einem spezifischen Abbauweg.

Der für Leucin verantwortliche Liu-Weg (*leucine isovalerate utilization pathway*) wurde bereits in *Pseudomonas putida* PpG2, *Myxococcus xanthus* DK1622 sowie *Micrococcus luteus* untersucht und ist insbesondere in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 detailliert beschrieben [96, 99-101]. Eine vergleichende genomische Studie der Regulation des Liu-Weges konnte außerdem zeigen, dass *liu*-Gencluster in der Abteilung der Proteobacteria weit verbreitet sind [102]. Das *liu*-Gencluster in

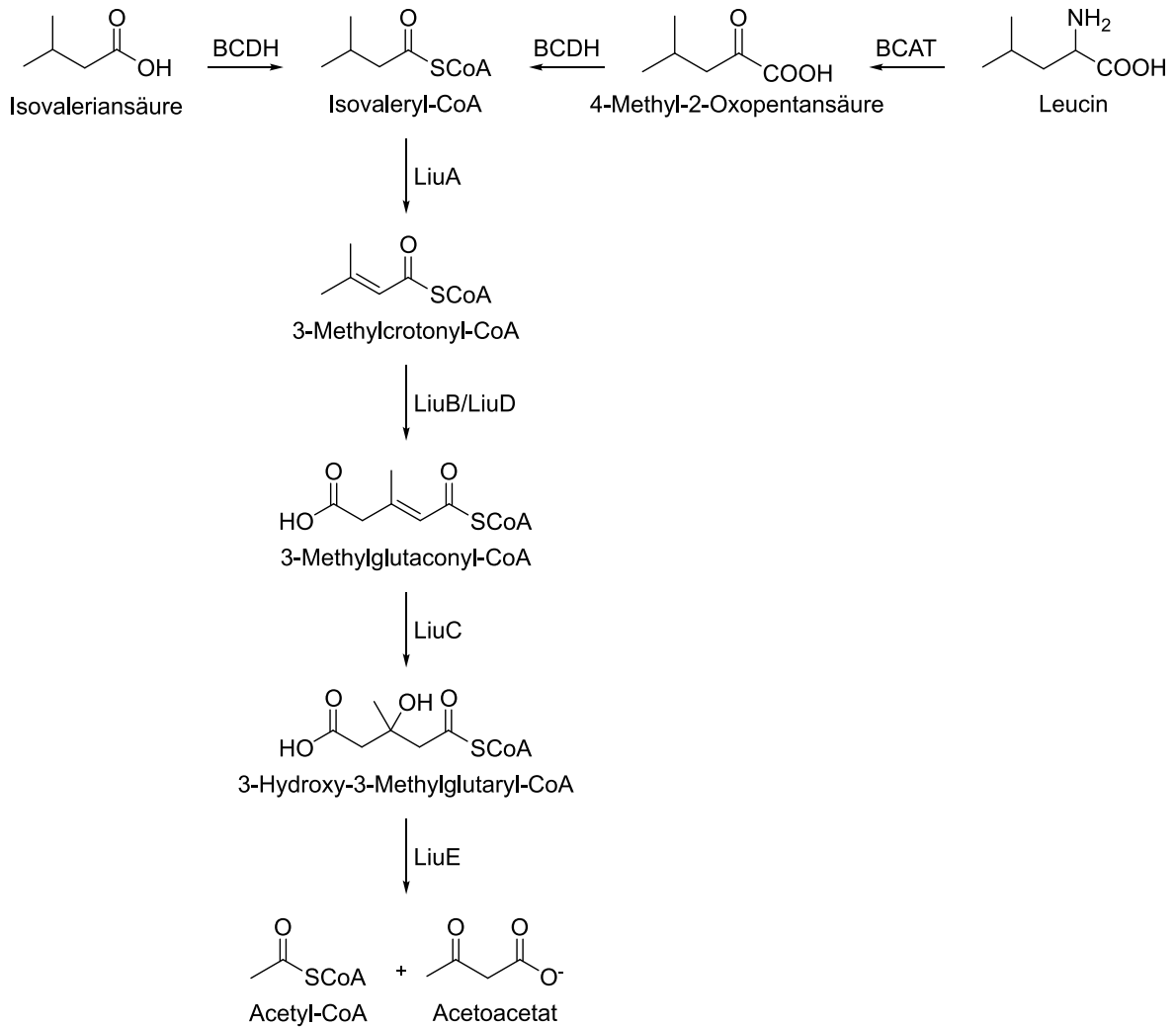
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 besteht aus fünf Genen für den Katabolismus (*liuA-liuE*) sowie einem transkriptionellen Regulator (*liuR*) (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Das *liu*-Gencluster aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *liuR*: Transkriptioneller Regulator; *liuA*: Isovaleryl-CoA Dehydrogenase; *liuB*: 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase  $\beta$ -Untereinheit; *liuC*: 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase; *liuD*: 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase  $\alpha$ -Untereinheit; *liuE*: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase.

Nachdem Leucin durch den gemeinsamen Abbauweg der verzweigt-kettigen Aminosäuren zu Isovaleryl-CoA metabolisiert wurde, wird dieses in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 anschließend im ersten Schritt des spezifischen Abbauweges durch die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase LiuA zu 3-Methylcrotonyl-CoA umgewandelt (Abbildung 10) [103]. Acyl-CoA Dehydrogenasen, die große Ähnlichkeit zu prokaryotischen und eukaryotischen Vertretern dieser Enzymklasse haben, wurden in *Streptomyces coelicolor* J802, codiert durch *acdH* (*sco2779*) und in *Streptomyces avermitilis* ATCC 31272, codiert durch *fadE4* (*SAVERM\_5275*), beschrieben [104]. *In-vitro* konnte unter anderem eine Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA für diese beiden Proteine gezeigt werden. Im nächsten Schritt wird 3-Methylcrotonyl-CoA durch den Transfer von CO<sub>2</sub> durch den 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Komplex zu 3-Methylglutaconyl-CoA umgewandelt. Dieser Komplex besteht aus der  $\alpha$ -Untereinheit LiuD und der  $\beta$ -Untereinheit LiuB [105]. Eine vergleichbare  $\alpha$ -Untereinheit wurde ebenfalls für *Streptomyces toxytricini* beschrieben [106]. Anschließend erfolgt eine Hydratisierung der C-C-Doppelbindung von 3-Methylglutaconyl-CoA unter Bildung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA. Diese Reaktion wird durch die 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase LiuC katalysiert [100]. Im letzten Schritt erfolgt eine Spaltung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase zu den Endprodukten des Liu-Weges, Acetyl-CoA und Acetoacetat [107].

## Einleitung



**Abbildung 10:** Abbau von Leucin und Isovalerat wie für *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 beschrieben. Die Schritte des gemeinsamen Abbauweges der verzweigt-kettigen Aminosäuren werden durch BCAT und BCDH katalysiert. Der spezifische Abbauweg von Leucin und Isovalerat beginnt mit der Umsetzung von Isovaleryl-CoA durch LiuA. BCAT: Verzweigt-kettige Aminosäuren Aminotransferase; BCDH: Verzweigt-kettige Aminosäuren Dehydrogenase Komplex; LiuA: Isovaleryl-CoA Dehydrogenase; LiuB: 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase  $\beta$ -Untereinheit; LiuC: 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase; LiuD: 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase  $\alpha$ -Untereinheit; LiuE: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase.

### 1.6 Ziele dieser Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, den biosynthetischen Ursprung des 3-Methylglutaryl-Motivs der Caprazamycine zu untersuchen. Obwohl die Caprazamycin-Biosynthese zu einem gewissen Umfang bekannt ist, wurde bisher nicht untersucht, wie dieser 3-Methylglutaryl-Rest entsteht. Mit dem Caprazamycin-Gencluster selbst sowie dem primären Metabolismus des heterologen Produzenten *Streptomyces coelicolor* M1154, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei mögliche Quellen dieses Motivs untersucht.

Die Untersuchung des Caprazamycin-Genclusters umfasste die Gene *cpz2*, *cpz5*, *cpz20* und *cpz25*:

- Eine bioinformatische Analyse sollte Aufschluss über die möglichen Funktionen dieser Gene geben.
- Gendeletionen der Kandidaten sollten zeigen, ob diese an der Biosynthese des 3-Methylglutaryl-Restes beteiligt sind.
- Genetische Komplementierungen sollten die Ergebnisse der Gendeletionen stützen.
- Biochemische Untersuchungen sollten die Funktionen von Cpz2 und Cpz25 *in-vitro* untersuchen.
- Zur Vervollständigung des Biosyntheseweges sollten weitere Gene außerhalb des Caprazamycin-Genclusters identifiziert werden, die ebenfalls an diesem Weg beteiligt sein könnten.

Der Katabolismus von Leucin und Isovalerat wurde als möglicher Ursprung des 3-Methylglutaryl-Motivs aus dem Primärmetabolismus ebenfalls untersucht:

- Eine bioinformatische Analyse sollte das für diesen Katabolismus verantwortliche Gencluster in *Streptomyces coelicolor* M1154 identifizieren.
- Eine komplette Gendeletion dieses Clusters sollten zeigen, ob dieses an der Biosynthese des 3-Methylglutaryl-Restes beteiligt ist.

- Gendeletionen der einzelnen Gene sollten Aufschluss darüber geben, welches Intermediat dieses Abbauweges für die Biosynthese des 3-Methylglutaryl-Motivs genutzt wird.
- Chemische und genetische Komplementierungen sollten die Ergebnisse der Gendeletionen stützen.

Auf Grundlage dieser Experimente sollte ein Biosynthesemodell des 3-Methylglutaryl-Motivs vorgeschlagen werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Regulator des *liu*-Genclusters als interessantes Ziel für weitere Untersuchungen identifiziert:

- Eine bioinformatische Analyse sollte eine erste Charakterisierung dieses Regulators ermöglichen.
- Durch Gendeletion und Überexpression sollte die Funktion des Regulators sowie dessen Einfluss auf die Caprazamycin-Biosynthese beleuchtet werden.
- Zuletzt sollten Fütterungsexperimente erste Hinweise darauf geben, ob Intermediate des Liu-Weges einen Einfluss auf die Bindung des Regulators und somit auf die Biosynthese der Caprazamycine haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

**Tabelle 1:** Verwendete Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich
Acrylamid (ROTIPHORESE NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose LE	Genaxxon
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
L-Aminosäuren	Roth
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Santa Cruz Biotechnology
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Apramycinsulfat	Genaxxon
L-Arabinose	Sigma-Aldrich
Betain	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Roth
Butan-1-ol	VWR
Carbenicillin-Dinatriumsalz	Roth
Caprazamycin-Aglycon A	Roger Castillo (Universität Tübingen)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Comassie Brilliant Blue G250	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
dNTPs	Genaxxon
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	Roth
Glucose-Monohydrat	Roth
Glycerol	Roth
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Imidazol	Sigma-Aldrich
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Isovaleryl-SNAc	Houchao Xu (Universität Bonn)
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Roth
Kupferchlorid-Dihydrat	Roth
Lösliche Stärke	Becton Dickinson
$\beta$ -Mercaptoethanol	VWR
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck
Mannitol	Roth
D-Maltose	Roth
Malzextrakt	Becton Dickinson
Methanol	Merck
3-Methylcrotonyl-SNAc	Houchao Xu (Universität Bonn)
(1- <sup>13</sup> C)-3-Methylcrotonyl-SNAc	Houchao Xu (Universität Bonn)
Nalidixinsäure	Roth

## Material und Methoden

Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich
Nickel(III)chlorid	Roth
peqGREEN	VWR
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
2-Propanol	Roth
Salzsäure	Roth
Sojamehl	SOBO Naturkost
Soyton	Becton Dickinson
Tetracyclin-Hydrochlorid	Merck
Tetramethylethyldiamin	Fluka
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Roth
Tryptic-Soja-Bouillon	Becton Dickinson
Trypton	Roth
TWEEN 20	Sigma-Aldrich
Xylencyanol FF	Roth
Zinkchlorid	Roth

### 2.2 Lösungen und Puffer

Die folgenden Lösungen wurden in dieser Arbeit verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Falls nötig, wurde eine Sterilisation durch Autoklavieren oder Sterilfiltration durchgeführt.

#### Lösung I

EDTA	10 mM
Glucose	50 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM

pH-Wert auf 8 einstellen und zur Sterilisation autoklavieren.

#### Lösung II

NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/V)

### **Lösung III**

Kaliumacetat 3 M

Mit Essigsäure auf pH 4,8 einstellen und zur Sterilisation autoklavieren.

### **TAE-Puffer (50x)**

Tris-HCl 2 M

EDTA 50 mM

Essigsäure 1 M

pH auf 7,8 einstellen. Zur Verwendung 1:50 mit H<sub>2</sub>O verdünnen.

### **Ladepuffer (6x)**

Bromphenolblau 0,03 %

Xylencyanol FF 0,03 %

Glycerol 60 % (w/V)

EDTA 60 mM

Tris-HCl pH 7,6 10 mM

### **Standard Taq-Puffer**

Kaliumchlorid 500 mM

Tris-HCl (pH 8,8) 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 15 mM

Triton X-100 1 % (w/V)

### **Spurenelemente-Lösung**

ZnCl<sub>2</sub> 40 mg/L

FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 200 mg/L

CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 10 mg/L

MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 10 mg/L

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	10 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	10 mg/L

### **Waschpuffer**

Tris-HCl	50 mM
NaCl	500 mM
Glycerol	10 % (w/V)

Zur Sterilisation autoklavieren. Anschließend wird  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 10 mM zugeben.

### **Lysepuffer**

Waschpuffer	
Lysozym (10600 U/mL)	4 mg/mL
TWEEN 20	1 %

### **Elutionspuffer**

Lysepuffer	
Imidazol	250 mM

### **Sammelgel**

Acrylamid 30 %	4 % (w/V)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 % (w/V)
Tetramethylethyldiamin	1 mL/L
Ammoniumpersulfat	0,1 % (w/V)

### **Trenngel**

Acrylamid 30 %	12 % (w/V)
Tris-HCl pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 % (w/V)
Tetramethylethyldiamin	1 mL/L
Ammoniumpersulfat	0,1 % (w/V)

### **Laufpuffer (10x)**

Tris-HCl pH 8,3	250 mM
Glycin	1920 mM
SDS	1 % (w/V)

### **Fixierlösung**

Essigsäure	10 %
Methanol	20 %

### **Färbelösung**

Essigsäure	10 %
Methanol	45 %
Coomassie Brilliant Blue	0,25 %

### **Entfärbelösung**

Essigsäure	10 %
Methanol	45 %

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung [mg/mL]</b>	<b>Endkonzentration [µg/mL]</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Apramycin	50	50	H <sub>2</sub> O
Carbenicillin	100	100	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	25	25	70 % Ethanol
Kanamycin	50	50	H <sub>2</sub> O
Nalidixinsäure	25	25	0,3 M NaOH
Tetracyclin	5	5	70 % Ethanol

<b>Substanz zur Supplementierung</b>	<b>Stammlösung [mg/mL]</b>	<b>Lösungsmittel</b>
3-Methylcrotonyl-SNAc	30	DMSO
(1- <sup>13</sup> C)-3-Methylcrotonyl-SNAc	30	DMSO
L-Leucin	40	H <sub>2</sub> O / 1M HCl (9:1)
Isovaleryl-SNAc	30	DMSO

Zur Lösung der Substanzen werden die Lösungen bei Bedarf kurzzeitig auf 70 °C erhitzt und vor Gebrauch sterilfiltriert.

**Essenzielle Aminosäuren-Lösung (10x)**

L-Arginin	230 mg/L
L-Histidin	80 mg/L
L-Lysin	190 mg/L
L-Methionin	60 mg/L
L-Phenylalanin	200 mg/L
L-Threonin	150 mg/L
L-Tryptophan	45 mg/L
L-Tyrosin	125 mg/L

### 2.3 Kulturmedien

Für die Kultivierung von *E. coli* und *Streptomyces* wurden die folgenden Kulturmedien verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Medien mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und zur Sterilisation autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min). Falls erforderlich wurden temperatursensitive Substanzen wie Antibiotika oder SNAc-Ester zum Zeitpunkt der Verwendung hinzugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei Raumtemperatur oder bei 4 °C.

#### **LB-Medium**

NaCl	10 g/L
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und zur Sterilisation autoklavieren. Zur Herstellung von LB-Agar werden 20 g/L Agar hinzugegeben.

#### **TSB-Medium**

Tryptic-Soja-Bouillon	30 g/L
-----------------------	--------

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen und zur Sterilisation autoklavieren.

#### **SOB/SOC-Medium**

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

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 7,0 einstellen und zur Sterilisation autoklavieren. Vor Verwendung wird MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 20 mM zugeben. Zur Herstellung von SOC-

Medium wird zusätzlich Glucose in einer Endkonzentration von 20 mM zugeben.

### **2xYT-Medium**

Trypton	16 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
NaCl	5 g/L

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen und zur Sterilisation autoklavieren.

### **MS-Agar**

Mannitol	20 g/L
Sojamehl	20 g/L
Agar	20 g/L

Komponenten in Leitungswasser lösen und zur Sterilisation zwei Mal bei 115 °C für 15 min autoklavieren. Zwischen den Läufen durch vorsichtiges Schwenken resuspendieren. Vor Verwendung wird dem Medium MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

### **DNA-Medium**

Difco nutrient agar	23 g/L
---------------------	--------

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen und zur Sterilisation autoklavieren.

### **P-Medium**

Soyton	20 g/L
Lösliche Stärke	20 g/L
D-Maltose	20 g/L
Spurenelemente-Lösung	5 mL

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen, pH auf 6,7 einstellen und zur Sterilisation autoklavieren.

### **YEME-Medium**

Hefeextrakt	3 g/L
Trypton	5 g/L
Malzextrakt	3 g/L
Glucose	10 g/L
Saccharose	340 g/L

Komponenten in H<sub>2</sub>O lösen und zur Sterilisation autoklavieren. Vor Verwendung wird MgCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM zugeben.

### **Regulator-Medium**

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	185 mg/L
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	150 mg/L
KCl	400 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg/L
NaHCO <sub>3</sub>	350 mg/L
NaCl	8000 mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	60 mg/L
Glucose	1 g/L

In H<sub>2</sub>O lösen, zu 180 mL aliquotieren und autoklavieren. Anschließend werden je Aliquot 200 µL MEM Vitamin Solution (100x), 200 µL MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (100x), 20 mL Essenzielle Aminosäuren-Lösung (10x) sowie 1 mL Spurenelemente-Lösung zugegeben. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei -4 °C.

## 2.4 Säulen, Kits, Enzyme, Filter und gebrauchsfertige Lösungen

**Tabelle 2:** Säulen, Kits, Enzyme, Filter und gebrauchsfertige Lösungen

Luna Omega Polar C18, 5 µm 150 x 2,1 mm	Phenomenex
HisTrap HP 5 mL	Cytiva
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	
Taq-Polymerase	<i>In-house</i> -Herstellung
Pfu-Polymerase	
T4-Ligase	New England BioLabs
Q5-Polymerase	
Cre-Rekombinase	
Restriktionsenzyme	
RNAse (120 U/mg)	Macherey-Nagel
Lysozym (45000 U/mg)	Roth
Amicon Ultra-15, $M_r$ -cutoff 10 kDa	Merck
Color Prestained Protein Standard Broad Range (10-250 kDa)	New England BioLabs
GeneRuler DNA ladder 1 kb	Thermo Scientific
Laemmli SDS-Probenpuffer, reduziert (6x)	
MEM Vitamin Solution (100x)	
MEM Lösung aus nicht essenziellen Aminosäuren (100x)	

## 2.5 Primer

**Tabelle 3:** Primer zur Amplifikation von Resistenzkassetten

Name	Sequenz 5' → 3'
sco2774_773_FW	CAAGCGCTTAGATATTCGTACCCTGGAGGTGGCGCGGTGATTC CGGGGATCCGTCGACC
sco2774_773_RV	AGGAGGGACTGGAGTGCTTCGCTCATGACCTGTGGTCTATGTA GGCTGGAGCTGCTTC
sco2775_773_FW	TAACGACCGCTAACCCGCCTGTCTAGAATCGACTTCATGATTC CGGGGATCCGTCGACC
sco2775_773_RV	CCCTCGTCACTCCCCGCCTCAGGGGAGGGGCGCCCCGCTATGT AGGCTGGAGCTGCTTC
sco2776_773_FW	ATTAAGTGGTCGACCACTGGGTGAGGGGACCGCAGGATGATT CCGGGGATCCGTCGACC
sco2776_773_RV	GCGGCGTGTCTTCGTGTTGTCCATGGGTCCCCTCCTCATGTA GGCTGGAGCTGCTTC
sco2777_773_FW	AGGGGACCCATGGACAACACGAAGGACACGCCGCGCATGATT CCGGGGATCCGTCGACC
sco2777_773_RV	CGGCCATCGGGAGGCCCGGTTCCGGGGCGTTCATGCCGTTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
sco2778_773_FW	ACCCACCGACGACGCGACGGAGGAGACGGCATGAACGCCATT CCGGGGATCCGTCGACC
sco2778_773_RV	CTTCCAGTTCGGGGGAGAGCTTGTGGTCCATGGTGTTCATGTA GGCTGGAGCTGCTTC
sco2779_773_FW	CGTACGAGCCCTCTCCACCAGGAGTCGTGAACACCATGATTC CGGGGATCCGTCGACC
sco2779_773_RV	GGCCGGTGCGGCGCCCCGCCCGCCTCGGAGCCTCATG TAGGCTGGAGCTGCTTC
cpz2_773_FW	CGTCCGTACCCGCTACGGCAAGAGCTAAGGATCCCCATGATTC CGGGGATCCGTCGACC
cpz2_773_RV	CTCGGAACGCCTTCTGGACCTGGTGCCGGCGCGACCTCATGT AGGCTGGAGCTGCTTC
cpz5_773_FW	CCGGGACAACGAGACAGCAAAGGTCGGTGTGGGACATGAT TCCGGGGATCCGTCGACC
cpz5_773_RV	GCGGACCAACACAGTCATCTCCCTCGGACGTGGACGGTCATG TAGGCTGGAGCTGCTTC
cpz20_773_FW	GTCCGCACCGACGAAACGGGGACCGTTCATGTCTGACGGGAT TCCGGGGATCCGTCGACC
cpz20_773_RV	ACAGGGACCTTCTGCCGCTCTCGGCCGTTCCGCATCAGTATGT AGGCTGGAGCTGCTTC
cpz25_773_FW	GTGGGAACGCCATCCGGCAGCCCAGGACGACGACTCATGAT TCCGGGGATCCGTCGACC
cpz25_773_RV	ATGGTCTGCATGTGCGCTCCGCGCGGGTCTGGGCCGTCATG TAGGCTGGAGCTGCTTC
bla-oriT-tet_787_FW	CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTCCGGC CAGCCTCGCAGAGCAG
bla-oriT-tet_787_RV	ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTATCAGGT CGAGGTGGCCCCGGC
PromCassette_cpz4-8_FW	GCGAATACTCCGGTTCGTCCGGTACGCCTGGAAGATCACGAA TTCGGTGAACCGATCTCCT
PromCassette_cpz4-8_RV	CTGGGGCCGCGAGCGACTCTTACCGGTACGCGGCTCACACT AGTGTCCGTACCTCCGTTG

**Tabelle 4:** Primer zur Verifizierung

sco2774_verify_FW	AGGAAGTACGCGTGCAGG
sco2774_verify_RV	CTTCGGCCTCCTGAACTCC

## Material und Methoden

sco2775_verify_FW	CTCGAACTTGTGGCTGTCC
sco2775_verify_RV	GTCGACCAGTTAATGAGCGT
sco2776_verify_FW	GGCGCCTATCTCGTGCAC
sco2776_verify_RV	CGACGGACAGATAGCTCTCC
sco2777_verify_FW	GAGGAGGAGGAGTCCTTCAA
sco2777_verify_RV	CACTTGGGGTGGACGAAG
sco2778_verify_FW	GATGAAGATGGAGCACGTCA
sco2778_verify_RV	ATGACCCATTCGTTCTGATGC
sco2779_verify_FW	GAAGACCTCGTGTGGATGCT
sco2779_verify_RV	GAGGCGTACTTCTCGACGTT
bla-oriT-tet_verify_FW	TGAGTAACTTGGTCTGACAGTT
bla-oriT-tet_verify_RV	CCGCTCATGAGACAATAACCC
sco2774_in-out_FW	CTCCTCGTACGTCTGGAAGG
sco2774_in-out_RV	TCGGCGAGGAGAACAAGG
sco2775_in-out_FW	GCTTGTAGTAGAACTCGCGC
sco2775_in-out_RV	TCATCACCCCTGCACGACC
sco2776_in-out_FW	TTCTAGACAGGCGGGTTAGC
sco2776_in-out_RV	TCATCGGGTAGTACGTGCC
sco2777_in-out_FW	CTTCCTGTGGATGTGGCCC
sco2777_in-out_RV	TCGACGGACAGATAGCTCTCC
sco2778_in-out_FW	ACAAGCGTCTGGATGGCC
sco2778_in-out_RV	ATTCGTTCTGATAGCCTCGTCC
sco2779_in-out_FW	CACTTCCACGACACCTACG
sco2779_in-out_RV	GATCTCGTACGGGAACTCG
cpz2_verify_FW	AGGACATGATCATCTCGGGC
cpz2_verify_RV	GCCAGATGATCGAGGAGACC
cpz5_verify_FW	ACGAGCAGGGCCATCAAGC
cpz5_verify_RV	ACCTCGCCGCGATCATCC
cpz20_verify_FW	CGAGGTGCTCCACGACG
cpz20_verify_RV	GGAGCTGCCAGGACATGC
cpz25_verify_FW	GTGGTGTCCGATTCTCG
cpz25_verify_RV	TTCTCGGCCAGTGTTC
pUWL_verify_FW	ATGCTAGTCGCGGTTGATCG
pUWL_verify_RV	TACCGCCTTTGAGTGAGCTG
pET_verify_FW	TAATACGACTCACTATAGGG
pET_verify_RV	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
pGM1192_verify_FW	TGTGTGGAATTGTGAGCGG

## Material und Methoden

pGM1192_verify_RV	TTCTCACTCCGCTGAAACTGT
sco1838_verify_FW	TCCTGGTACTCGGCGATGG
sco1838_verify_RV	CCTTGAAGAAGATGGTGCGC
sco4384_verify_FW	CCTCCGGCAAGATCCTCC
sco4384_verify_RV	GAACTTCAGGGTCAGCTTGC
sco4930_verify_FW	TGTCACTCGAACGGGTAAGC
sco4930_verify_RV	CTTGGCAAGGTCATGATGGG
sco6732_verify_FW	AGGACATGCTCGCCAAGG
sco6732_verify_RV	GAACTTCAGGGTCAGCTTGC
sco1838_in-gene_RV	CTGGAGGGGTGATCATGAGG
sco4384_in-gene_RV	TCACACCACCCATTCCGG
sco4930_in-gene_RV	GCCGTGAACACCAGCTCG
sco6732_in-gene_RV	CCTTCTCCTGACTCGTACGG
pMVM_verify_FW	AGCTTCTTCTTGACTCCGT
pMVM_verify_RV	TCACTCATTAGGCACCCAG
pBlue_verify_FW	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pBlue_verify_RV	AGCGGATAACAATTCACACAGG
PromKassette_cpz4-8_verify_FW	GTGAGTCCGAAGTACATGCG
PromKassette_cpz4-8_verify_RV	TTCAGCCGTCTCCAGAACC

**Tabelle 5:** Primer zur Klonierung

sco2776_pUWL_FW	AAAAAAAAGCTTATGCACGAGGCACCGGAGCTGACG
sco2776_pUWL_RV	AAAAAACTAGTTCACATCCGGAAGACGCCGAACCG
sco2777_pUWL_FW	AAAAAAAAGCTTATGTTCGACACCGTGCTCGTCGCC
sco2777_pUWL_RV	AAAAAACTAGTTCATGCCGTCTCCTCCGTGCGGTC
cpz20_pUWL_FW	AAAAAAAAGCTTATGTCTGACGGGATCACCGCCCC
cpz20_pUWL_RV	AAAAAACTAGTTCAGTAGATCCCCTCGACTACCCG
cpz25_pUWL_FW	AAAAAAAAGCTTATGAAGGCAGTGTTGCGGACCGCC
cpz25_pUWL_RV	AAAAAACTAGTTCAGGGGATCCAGACGGACATCCG
Enz_cpz2_pET_FW	AAAAAAGAATTCATGAGCATCACCGTCAACGGC
Enz_cpz2_pET_RV	AAAAAAAAGCTTTCAGGCGTAGAACCGCGACAG
Enz_cpz25_pET_FW	AAAAAAGAATTCATGAAGGCAGTGTTGCGGACC
Enz_cpz25_pET_RV	AAAAAAAAGCTTTCAGGGGATCCAGACGGACAT
Enz_cpz25_pGM_FW	AAAAACATATGCACCACCACCACCACCACCACCTGGTTC CGCGTGGTTCCATGAAGGCAGTGTTGCGGACCGCC
Enz_cpz25_pGM_RV	AAAAAAAAGCTTTCAGGGGATCCAGACGGACATCCG
sco2775_pUWL_FW	AAAAAAAAGCTTATGGCCACCAGAACCGACGCCCCC
sco2775_pUWL_RV	AAAAAACTAGTCTACGCCTCCCCACCGCCGCGAA

sco2775_pMVM_FW	AAAAAACATATGGCCACCAGAACCGACGCCCCACC
sco2775_pMVM_RV	AAAAAACTAGTCTACGCCTCCCCACCGCCGCGAA
PromCassette_cpz4-8_pBlue_FW	AAAAAAAAGAATTCGGTGAACCGATCTCCTCG
PromCassette_cpz4-8_pBlue_RV	AAAAAAAACCTAGTGTCCGTACCTCCGTTGC

## 2.6 Synthetisches DNA-Fragment

**Tabelle 6:** Synthetisches DNA-Fragment der bidirektionalen Promotorkassette

Name	Sequenz 5' → 3'
Bidirektionale Promotorkassette	<p>GAATTCGGTGAACCGATCTCCTCGTTAGGGT<b>ACACCAGACTT</b>  <b>TACAACACCGCACAGCATGTTGTCAAAGCAGAGACGGTTCGA</b>  <b>ATGTGAACAGCCACTATCATATGTGCAGTTCATAACTTCGTATA</b>  GCATACATTATACGAAGTTATGGTTCATGTGCAGCTCCATCAGC  AAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGT  GCCGTTGATCGTGCTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGA  GTGCAATGTCGTGCAATACGAATGGCGAAAAGCCGAGCTCATC  GGTCAGCTTCTCAACCTTGGGGTTACCCCCGGCGGTGTGCTG  CTGGTCCACAGCTCCTTCCGTAGCGTCCGGCCCCCTCGAAGAT  GGGCCACTTGGACTGATCGAGGCCCTGCGTGCTGCGCTGGGT  CCGGGAGGGACGCTCGTCATGCCCTCGTGGTCAGGTCTGGAC  GACGAGCCGTTGATCCTGCCACGTCGCCCGTTACACCGGAC  CTTGGAGTTGTCTCTGACACATTCTGGCGCCTGCCAAATGTAA  AGCGCAGCGCCCATCCATTTGCCTTTGCGGCAGCGGGGCCAC  AGGCAGAGCAGATCATCTCTGATCCATTGCCCTGCCACCTCA  CTCGCCTGCAAGCCCAGTCCGCCGTGTCATGAACCTCGATGG  GCAGGTA<b>CTTCTCCTCGGCGTGGGACACGATGCCAACACGAC</b>  GCTGCATCTT<b>GCCGAGTTGATGGCAAAGGTTCCCTATGGGGTG</b>  CCGAGACACTGCACCATTCTCAGGATGGCAAAGTTGGTACGCG  TCGATTATCTCGAGAATGACCACTGCTGTGAGCGCTTTGCCTT  GGCGGACAGGTGGCTCAAGGAGAAGAGCCTTCAGAAGGAAGG  TCCAGTCGGTCATGCCTTTGCTCGGTTGATCCGCTCCCGCGAC  ATTGTGGCGACAGCCCTGGGTCAACTGGGCCGAGATCCGTTG  ATCTTCTGCATCCGCCAGAGGCCGGATGCGAAGAATGCGAT  GCCGCTCGCCAGTCGATTGGCTGAATAACTTCGTATAGCATA<b>C</b>  ATTATACGAAGTTATAAGCTTTGCTCGAGT<b>GTGCGGGCTCTAA</b>  <b>CACGTCCTAGTATGGTAGGATGAGCAATCTAGTCGAGCAACG</b>  GAGGTACGGACACTAGT</p> <p>Restriktionsschnittstellen EcoRI und SpeI zu Beginn und Ende der Sequenz sind kursiv geschrieben. Die loxP-Sequenzen sind grau hinterlegt, das dazwischenliegende Apramycin-Resistenzgen ist kursiv dargestellt. Die Promotorsequenzen von <i>sp44</i> und <i>p21</i> sind fettgedruckt. Nach Baumann <i>et al.</i>, 2019.</p>

## 2.7 Plasmide und Cosmide

Tabelle 7: Plasmide und Cosmide

Plasmid/Cosmid	Beschreibung	Referenz
pIJ773	<i>aac(3)IV</i> , oriT; Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Gust <i>et al.</i> , 2003
pIJ790	λ-RED ( <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> ), <i>cat</i> , <i>araC</i> , <i>rep101<sup>ts</sup></i> ; Cml <sup>R</sup>	Gust <i>et al.</i> , 2003
pIJ787	oriT, <i>tet</i> , attP, <i>int</i> ; Tet <sup>R</sup>	Gust <i>et al.</i> , 2004
pR9406	Derivat von pUB307, <i>tra</i> , oriT; Carb <sup>R</sup> , Cml <sup>R</sup>	David Figurski
pBluescript II SK(+)	Carb <sup>R</sup>	Stratagene
pUWL-apra-oriT	pUWL201 Derivat mit <i>ermE*</i> -Promoter; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Erb <i>et al.</i> , 2009
pET28a	T7-Promoter, <i>lacI</i> , His-Tag N-terminal, Kan <sup>R</sup>	Novagen
pGM1192	<i>SF14*</i> -Promoter, Step-tagII <sub>sc</sub> , <i>mCherry</i> , <i>tsr aac(3)IV</i> , Tsr <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Muth, 2018
pMVM3100	Derivat von pRT801, attP, <i>int</i> (ΦBT1), <i>aac3(IV)</i> , Synthetische Kasette bestehend aus fd-Terminator, <i>p57</i> -Promoter, 12 Basenpaare untranslatierte Region, NdeI-Spel Klonierungsstelle, fd-Terminator; Apra <sup>R</sup>	Marta V. Mendes, (Universität Porto, Portugal)
pDB02	pGM1192 mit einer Ligation von <i>cpz25</i> in die Schnittstellen NdeI und HindIII; Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB12	pUWL-apra-oriT mit einer Ligation von <i>sco2776</i> in die Schnittstellen HindIII und SpeI; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB13	pUWL-apra-oriT mit einer Ligation von <i>sco2777</i> in die Schnittstellen HindIII und SpeI; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB15	pUWL-apra-oriT mit einer Ligation von <i>cpz20</i> in die Schnittstellen HindIII und SpeI; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB16	pUWL-apra-oriT mit einer Ligation von <i>cpz25</i> in die Schnittstellen HindIII und SpeI; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB17	pUWL-apra-oriT mit einer Ligation von <i>sco2775</i> in die Schnittstellen HindIII und SpeI; Apra <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB18	pET28a mit einer Ligation von <i>cpz2</i> in die Schnittstellen EcoRI und HindIII; Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB20	pET28a mit einer Ligation von <i>cpz25</i> in die Schnittstellen EcoRI und HindIII; Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB22	pMVM3100 mit einer Ligation von <i>sco2775</i> in die Schnittstellen NdeI und SpeI; Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pDB23	pBluescript II SK(+) mit einer Ligation des DNA-Fragments der bidirektionalen Promotorkasette in die Schnittstellen EcoRI und SpeI; Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

cpzLK09	Cosmid enthält das komplette Caprazamycin-Gencluster aus <i>Streptomyces sp.</i> MK730-62F2, oriT, tet, attP, int (ΦC31); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Kaysser <i>et al.</i> , 2009
cpzDB01	Derivat von cpzLK09, cpz5 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB02	Derivat von cpzLK09, cpz20 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB03	Derivat von cpzLK09, cpz25 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB04	Derivat von cpzDB01, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB05	Derivat von cpzDB02, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB06	Derivat von cpzDB03, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB20	Derivat von cpzLK09, cpz2 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB21	Derivat von cpzDB20, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB22	Derivat von cpzLK09, cpz4-cpz8 ersetzt durch bidirektionale Promotorkassette von pDB23; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
cpzDB23	Derivat von cpzDB22, Apramycin-Resistenzkassette durch Cre-Rekombinase entfernt; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105	Cosmid aus der geordneten Cosmidgenbank von <i>S. coelicolor</i> , trägt die Gene des <i>liu</i> -Genclusters sco2774-sco2779; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Redenbach <i>et al.</i> , 1996
StC105DB01	Derivat von StC105, sco2779 durch eine Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 ersetzt; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB02	Derivat von StC105, sco2776 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB03	Derivat von StC105, sco2777 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB04	Derivat von StC105, sco2778 ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

StC105DB05	Derivat von StC105DB01, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB06	Derivat von StC105DB02, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB07	Derivat von StC105DB03, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB08	Derivat von StC105DB04, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB09	Derivat von StC105DB05, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB10	Derivat von StC105DB06, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB11	Derivat von StC105DB07, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB12	Derivat von StC105DB08, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB13	Derivat von StC105DB10, <i>sco2776-sco2779</i> ersetzt durch Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB14	Derivat von StC105DB13, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB15	Derivat von StC105, <i>sco2775</i> durch eine Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 ersetzt; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB16	Derivat von StC105DB15, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB17	Derivat von StC105DB16, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB18	Derivat von StC105, <i>sco2774</i> durch eine Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 ersetzt; Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB19	Derivat von StC105DB18, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB20	Derivat von StC105DB09, <i>sco2774</i> durch eine Apramycin-Resistenzkassette von pIJ773 ersetzt; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

StC105DB21	Derivat von StC105DB20, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (81 bp scar-Sequenz); Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
StC105DB22	Derivat von StC105DB19, <i>bla</i> ersetzt durch oriT, <i>tet</i> von pIJ787; Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Diese Arbeit
SCI8.1.H03	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco1838</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004
2D52.2.F12	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco4384</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004
2SCK31.2.D06	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco4930</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004
SC3D11.2.H02	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco5459</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004
5F2A.2.H07	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco6732</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004
5F2A.1.D03	Cosmid aus <i>S. coelicolor</i> Transposonbibliothek, <i>sco6748</i> durch Tn5062 inaktiviert; Amp <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Bishop <i>et al.</i> , 2004

## 2.8 Bakterienstämme

Tabelle 8: Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup>	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> BW25113	<i>lacI</i> <sup>R</sup> , <i>rrnB</i> <sub>T14</sub> , $\Delta$ <i>lacZ</i> <sub>WJ16</sub> , <i>hsdR514</i> , $\Delta$ <i>rhaBAD</i> <sub>AH33</sub> , $\Delta$ <i>rhaBAD</i> <sub>LD78</sub>	Datsenko & Wanner, 2000
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> <sup>-</sup> ; Cml <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
<i>E. coli</i> BT340	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pCP20 ( <i>FLP</i> <sup>+</sup> , $\lambda$ cI857 <sup>+</sup> , $\lambda$ p <sub>R</sub> Rep <sup>ts</sup> ); Amp <sup>R</sup> , Cml <sup>R</sup>	Cherepanov & Wackernagel, 1995
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> <sub>B(rB- mB-)</sub> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pRARE; Cml <sup>R</sup>	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta DE3/pDB18	<i>E. coli</i> Rosetta DE3 mit pET28-Derivat zur Überexpression von <i>cpz2</i> ; Cml <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> Rosetta DE3/pDB20	<i>E. coli</i> Rosetta DE3 mit pET28-Derivat zur Überexpression von <i>cpz25</i> ; Cml <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154	$\Delta$ <i>act</i> , $\Delta$ <i>red</i> , $\Delta$ <i>cpk</i> , $\Delta$ <i>cda</i> , <i>rpoB</i> (C1298T), <i>rpsL</i> (A262G)	Gomez-Escribano <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>str-6</i> , SLP2 <sup>-</sup> , SLP3 <sup>-</sup>	Hopwood <i>et al.</i> , 1983
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von <i>cpz5</i> , drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB05 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von <i>cpz20</i> , drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB06 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von <i>cpz25</i> , drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ <i>sco2774</i>	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von <i>sco2774</i>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ <i>sco2775</i>	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von <i>sco2775</i>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2777	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2777	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2778	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2778	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2779	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2779	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2774 $\Delta$ sco2779	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2774 und sco2779	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco1838::Tn5062	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco1838 durch Transposoninsertion	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco4384::Tn5062	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco4384 durch Transposoninsertion	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco4930::Tn5062	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco4930 durch Transposoninsertion	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco6732::Tn5062	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco6732 durch Transposoninsertion	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco6748::Tn5062	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco6748 durch Transposoninsertion	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2774/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2774, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2774/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2774, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2775/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2775, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2775, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2777, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2777, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2778/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2778, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2778/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2778, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2779/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2779/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2774Δsco2779/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2774 und sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2774Δsco2779/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2774 und sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material und Methoden

<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/cpzDB04 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB21 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2777, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz2, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776/cpzDB04/pDB12 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, pUWL-Derivat zur Überexpression von sco2776, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB04/pDB13 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2777, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5, pUWL-Derivat zur Überexpression von sco2777, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB05/pDB15 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz20, pUWL-Derivat zur Überexpression von cpz20, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB06/pDB16 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz25, pUWL-Derivat zur Überexpression von cpz25 drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces lividans</i> TK24/pDB02	<i>S. lividans</i> TK24 mit pGM1192-Derivat zur Überexpression von cpz25; Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/sco1838::Tn5062/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco1838 durch Transposoninsertion. In das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/sco4384::Tn5062/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco4384 durch Transposoninsertion. In das	Diese Arbeit

## Material und Methoden

	Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/sco4930::Tn5062/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco4930 durch Transposoninsertion. In das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/sco6732::Tn5062/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco6732 durch Transposoninsertion. In das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2776-sco2779/sco6748::Tn5062/cpzLK09 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2776-sco2779 und einer Inaktivierung von sco6748 durch Transposoninsertion. In das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB04/pDB17 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5 sowie Plasmid zur Überexpression von sco2775, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3)	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit einer Deletion von cpz5 sowie in das Genom integriertes Plasmid zur Überexpression von sco2775, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154/cpzDB23	<i>S. coelicolor</i> M1154, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit Austausch von cpz4-cpz8 durch bidirektionale Promotorkassette, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154Δsco2775/cpzDB23	<i>S. coelicolor</i> M1154 mit einer Deletion von sco2775, in das Genom integriertes Caprazamycin-Gencluster mit Austausch von cpz4-cpz8 durch bidirektionale Promotorkassette, drei individuelle Mutanten; Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## 2.9 Mikrobiologische Methoden

### Kultivierung von *E. coli*

Kulturen von *E. coli* Stämmen wurden üblicherweise in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für DNA-Isolationen wurden 3 mL (kleiner Ansatz) oder 100 mL (großer Ansatz) mit einem Klon einer Agarplatte oder mit 10-20 µL einer Glycerol-Kultur inkubiert. Bei Bedarf wurden entsprechende Antibiotika zugegeben.

### Kultivierung von Streptomycceten

Kulturen von *Streptomyces* Stämmen wurden üblicherweise für 2-3 Tage in TSB-Medium oder für 7-14 Tage auf MS-Agarplatten bei 30 °C inkubiert. Für die Isolation genomischer DNA oder Plasmiden wurden 10-20 µL einer Sporensuspension für 2-3 Tage bei 30 °C in LB-Medium kultiviert. Bei Bedarf wurden entsprechende Antibiotika zugegeben.

### Kultivierung von Streptomycceten zur Produktion von Caprazamycin-Aglyconen

#### *Kultivierung zur qualitativen Analyse*

Zur qualitativen Analyse wurden 10-30 µL einer Sporensuspension in 3 mL TSB-Medium gegeben und für 2-3 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. 30 µL dieser Vorkultur wurden in eine 24-Well-Platte mit 3 mL P-Medium überführt und für 5-7 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Zur chemischen Komplementierung wurden der Hauptkultur 3-Methylcrotonyl-SNAc oder (1-<sup>13</sup>C)-3-Methylcrotonyl-SNAc in einer Endkonzentration von 0,8 mM zugegeben.

#### *Kultivierung zur quantitativen Analyse*

Zur quantitativen Analyse wurden 10-30 µL einer Sporensuspension in 3 mL TSB-Medium gegeben und für 2 Tage bei 30 °C und 200 rpm in einer 24-Well-Platte kultiviert. Das Mycel dieser Vorkultur wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 100 µL des Mycels wurden in eine 24-Well-Platte mit 3 mL P-Medium überführt und für 7 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert.

### Kultivierung zur quantitativen Analyse in Regulator-Medium

Zur quantitativen Analyse in Regulator-Medium wurden 20 µL einer Streptomyceten-Sporensuspension in 3 mL Regulator-Medium gegeben und für 5 Tage bei 30 °C und 200 rpm in einer 24-Well-Platte kultiviert. Das Mycel dieser Vorkultur wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. 100 µL des Mycels wurden in eine 24-Well-Platte mit 3 mL Regulator-Medium überführt und für 10 Tage bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Bei Bedarf wurden der Hauptkultur L-Leucin, Isovaleryl-SNAc oder 3-Methylcrotonyl-SNAc in einer Endkonzentration von 1 mM, 5 mM, 10 mM oder 15 mM zugegeben.

### Herstellung von Glycerolkulturen

Es wurden 1,3 mL einer *E. coli* Übernachtskultur mit 550 µL 80 % Glycerol vermischt. Die Lagerung der Glycerolkulturen erfolgte bei -80 °C.

### Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Zellen einer 100 mL *E. coli* Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (6000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 mL eiskaltem 10 % Glycerol resuspendiert, zentrifugiert (6000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das resultierende Pellet wurde in 100-1000 µL 10 % Glycerol gelöst und zu 50 µL aliquotiert. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

### Herstellung von Sporensuspensionen

Die gewünschten *Streptomyces* Stämme wurden auf MS-Agarplatten 7-14 Tage bis zur Sporulation kultiviert. Zur Ernte wurden 5 mL H<sub>2</sub>O auf die Platte gegeben und die Sporen mit einem sterilen Wattestäbchen vorsichtig gelöst. Die Flüssigkeit wurde anschließend in eine mit Watte gefüllte, sterile 20 mL Einmalspritze überführt. Die Platte wurde nochmals mit 1 mL H<sub>2</sub>O gespült und diese Flüssigkeit ebenfalls überführt. Nach Filtration in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen wurde zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 10 min) und der Überstand verworfen. Die Sporen wurden in 100-1000 mL 20 % Glycerol resuspendiert. Die Lagerung der Sporensuspensionen erfolgte bei -80 °C.

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### DNA-Isolation aus *E. coli*

#### Kleiner Ansatz

##### *Alkalische Lyse*

2 mL einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL Lösung I resuspendiert. Es wurden 200 µL Lösung II hinzugegeben und durch Inversion des Gefäßes vermischt. Anschließend wurden 150 µL eiskalte Lösung III hinzugegeben und nochmals durch Inversion vermischt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) in ein neues Gefäß überführt.

##### *Phenol-Chloroform-Aufreinigung*

Es wurden 400 µL einer Phenol-Chloroform-Lösung zum Überstand der alkalischen Lyse gegeben und durch vortexen für eine Minute vermischt. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.

##### *DNA-Präzipitation*

Es wurden 400 µL eiskaltes Isopropanol zur wässrigen Phase der Phenol-Chloroform-Aufreinigung gegeben, gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 20-50 µL einer wässrigen RNase-Lösung (20 µg/mL) gelöst.

#### Großer Ansatz

##### *Alkalische Lyse*

50 mL einer Übernachtskultur wurden für 5 min abzentrifugiert (6000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 mL Lösung I resuspendiert. Es wurden 10 ml Lösung II hinzugegeben und durch Inversion des Gefäßes vermischt. Anschließend wurden 7,5 mL eiskalte Lösung III hinzugegeben und nochmals durch

Inversion vermischt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C, 30 min) in ein neues Gefäß überführt.

### *Erste DNA-Präzipitation*

Es wurden 22,5 mL eiskaltes Isopropanol zum Überstand der alkalischen Lyse gegeben, gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 mL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 400 µL H<sub>2</sub>O gelöst.

### *Phenol-Chloroform-Aufreinigung*

Es wurden 400 µL einer Phenol-Chloroform-Lösung zum Überstand der ersten DNA-Präzipitation gegeben und durch vortexen für eine Minute vermischt. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.

### *Zweite DNA-Präzipitation*

Es wurden 400 µL eiskaltes Isopropanol und 40 µL 3 M Natriumacetat-Lösung zum Überstand der Phenol-Chloroform-Aufreinigung gegeben, gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100-500 µL einer wässrigen RNase-Lösung (20 µg/mL) gelöst.

### Isolation genomischer DNA aus Streptomycceten

3 mL einer 2-3 Tage alten Kultur wurden zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Mycel wurde in 500 µL Lösung I, versetzt mit RNase (100 µg/mL) und Lysozym (2 mg/mL), resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 µL einer SDS-Lösung (2 %, pH 8,0) hinzugefügt, gemischt und nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und 750 µL Phenol-Chloroform-Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Invertieren vermischt und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min). Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde 2-5-mal wiederholt, bis der wässrige Überstand klar war.

Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 750 µL eiskaltem Isopropanol sowie 75 µL 3 M Natriumacetat-Lösung gefällt. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 30 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 30-50 µL einer wässrigen RNase-Lösung (20 µg/mL) gelöst.

### Plasmid-Isolation aus Streptomycceten

3 mL einer 2-3 Tage alten Kultur wurden zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Mycel wurde in 500 µL Lösung I, versetzt mit RNase (100 µg/mL) und Lysozym (2 mg/mL), resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 µL Lösung II hinzugefügt, gemischt und nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 250 µL Lösung III wurde zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Es wurden 1 mL Phenol-Chloroform-Lösung hinzugegeben, gemischt und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 1 mL eiskaltes Isopropanol sowie 100 µL 3 M Natriumacetat-Lösung hinzugegeben. Nach Inkubation für 15 min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 30 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 30-50 µL einer wässrigen RNase-Lösung (20 µg/mL) gelöst.

### Transformation von *E. coli* Zellen

Zu 50 µL elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden 2-4 µL DNA-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporator transformiert (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV). Nach sofortiger Zugabe von 500 µL eiskaltem LB-Medium wurde für 1 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Danach wurden Volumina von 50-300 µL der Zellsuspension auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die mit den benötigten Antibiotika versetzt wurden. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 0,6 % bis 1,2 % Agarose (m/V) in 1x TAE-Puffer suspendiert und die Lösung gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde peqGREEN-Lösung (1µL/mL) zugegeben und das Gel zur vollständigen Polymerisation in die Gelkammer gegossen. Es wurden 6 µL (0,5 µg) des Größenmarkers verwendet. Die Proben wurden üblicherweise im Verhältnis 6:1 mit 6x Ladepuffer gemischt. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 120 V in 1x TAE-Puffer für 30-60 min durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Gel unter UV-Licht ( $\lambda = 213 \text{ nm}$ ) betrachtet.

### Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Üblicherweise wurde ein Ansatzvolumen von 20 µL verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Pipettierschema Restriktionsverdau

Komponente	Volumen [µL]
DNA	2
CutSmart-Puffer	2
Enzym	1
H <sub>2</sub> O	15
Total	20

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### *Standard-PCR*

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von Plasmiden und Cosmiden wurde eine Mischung aus *in-house* hergestellter *Taq*- und *Pfu*-Polymerase im Verhältnis 9:1 verwendet. Das Pipettierschema des Ansatzes sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Pipettierschema Standard-PCR

Komponente	Volumen [µL]
DNA	2
Primer <i>forward</i> (100 pmol/µL)	1

## Material und Methoden

Primer <i>reverse</i> (100 pmol/μL)	1
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5
dNTPs (je 2,5 mM)	5
<i>Taq/Pfu</i> -Polymerase (9:1)	2
DMSO	5
Betain (5 M)	5
H <sub>2</sub> O	24
Total	50

**Tabelle 11:** Temperaturprogramm Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	30	25 - 30
Anlagerung	50-72*	30	
Verlängerung	72	60	
Finale Verlängerung	72	120	1
Kühlung	4	∞	

\* Abhängig vom verwendeten Primer-Paar

### *Genomische DNA aus Streptomycceten*

Das Pipettierschema des Ansatzes sowie das Temperaturprogramm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von genomischer DNA aus Streptomycceten sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgeführt.

**Tabelle 12:** Pipettierschema PCR mit genomischer DNA aus Streptomycceten

Komponente	Volumen [μL]
DNA	2
Primer <i>forward</i> (100 pmol/μL)	1
Primer <i>reverse</i> (100 pmol/μL)	1
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5
dNTPs (je 2,5 mM)	5
<i>Taq/Pfu</i> -Polymerase (9:1)	2
DMSO	5
Betain (5 M)	5
H <sub>2</sub> O	24

## Material und Methoden

Total	50
-------	----

**Tabelle 13:** Temperaturprogramm PCR mit genomischer DNA aus Streptomyceten

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	30
Anlagerung	50-72*	30	
Verlängerung	72	120	
Finale Verlängerung	72	180	1
Kühlung	4	∞	

\* Abhängig vom verwendeten Primer-Paar

### Colony-PCR

Die zu analysierenden Klone wurden zunächst auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Von dieser Platte wurde je Klon etwas Zellmaterial mit einem sterilen Zahnstocher in 50 µL DMSO überführt. Diese Suspension diente als DMSO-Anteil des Pipettierschemas. Das Pipettierschema des Ansatzes sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Pipettierschema Colony-PCR

Komponente	Volumen [µL]
Primer <i>forward</i> (100 pmol/µL)	1
Primer <i>reverse</i> (100 pmol/µL)	1
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5
dNTPs (je 2,5 mM)	5
<i>Taq</i> / <i>Pfu</i> -Polymerase (9:1)	2
DMSO	6
Betain (5 M)	5
H <sub>2</sub> O	25
Total	50

**Tabelle 15:** Temperaturprogramm Colony-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	25

## Material und Methoden

Anlagerung	50-72*	30	
Verlängerung	72	60	
Finale Verlängerung	72	120	1
Kühlung	4	∞	

\* Abhängig vom verwendeten Primer-Paar

### DNA-Sequenzierung von PCR-Produkten

Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 12 µL H<sub>2</sub>O. Es wurden 5 µL der DNA mit 2 µL des Primers und 12 µL H<sub>2</sub>O vermischt und dieser Ansatz durch die Firma Eurofins Genomics sequenziert.

### Ligation von DNA

Zunächst wurde das gewünschte Insert mittels PCR amplifiziert, das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit 12 µL H<sub>2</sub>O eluiert. Im Anschluss wurde ein Restriktionsverdau des aufgereinigten PCR-Produktes sowie des Vektors durchgeführt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tabelle 16:** Pipettierschema des Restriktionsverdaus für die Ligation

Komponente	Volumen [µL]
DNA	15
CutSmart-Puffer (10x)	5
Enzyme	je 5
H <sub>2</sub> O	20
Total	50

Der Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Danach wurden nochmals je 2 µL der Restriktionsenzyme zugegeben und für weitere 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 20 µL H<sub>2</sub>O. Zur Ligation wurde der Ansatz gemäß Tabelle 17 pipettiert und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 17:** Pipettierschema für den Ligationsansatz

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Insert	6
Vektor	2
T4-Ligase	0,5
T4-Ligationspuffer (10x)	1
H <sub>2</sub> O	0,5
Total	10

Der Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen eingebracht und auf LB-Agarplatten kultiviert. Einzelne Klone dieser Platten wurden im Anschluss durch Colony-PCR auf die Anwesenheit des korrekten Plasmids überprüft.

### PCR-Targeting

#### *Isolation der Resistenzkassette*

Die gewünschte Kassette wurde mittels Restriktionsverdau gemäß des in Tabelle 18 aufgeführten Pipettierschemas aus dem Plasmid herausgeschnitten. Folgende Restriktionsenzyme wurden hierfür verwendet: pIJ773 EcoRI und HindIII; pIJ787 XmaI; pDB23 EcoRI und SpeI.

**Tabelle 18:** Pipettierschema Restriktionsverdau der Resistenzkassette

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
DNA	10
CutSmart-Puffer (10x)	10
Enzym	je 5
H <sub>2</sub> O	ad 100
Total	100

Der Restriktionsansatz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Bande der Kassette aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit gemäß den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 20-100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O.

*Verlängerung der Resistenzkassette*

Die Verlängerung der Kassette wurde mit der Q5-Polymerase durchgeführt. Der Ansatz sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 19 und Tabelle 20, die verwendeten Primer in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 19:** Pipettierschema Verlängerung der Resistenzkassette

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
DNA	0,5
Primer <i>forward</i> (100 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Primer <i>reverse</i> (100 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Q5-Puffer (5x)	10
dNTPs (je 2,5 mM)	4
Q5-Polymerase	0,5
High GC enhancer (5x)	10
H <sub>2</sub> O	24
Total	50

**Tabelle 20:** Temperaturprogramm Verlängerung der Resistenzkassette

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	30	1
Denaturierung	94	10	10
Anlagerung	50	30	
Verlängerung	72	60	
Denaturierung	94	10	15
Anlagerung	55	30	
Verlängerung	72	60	
Finale Verlängerung	72	120	1
Kühlung	4	$\infty$	

Die Bildung des korrekten PCR-Produktes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Der PCR-Ansatz wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 12  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O.

### *λ-Red Recombineering*

Das jeweilige Cosmid wurde zunächst in elektrokompetente *E. coli* BW25113/pIJ790 Zellen transformiert und bei 30 °C inkubiert. Ein Klon *E. coli* BW25113/pIJ790/Cosmid wurde in 3 mL LB-Medium mit den benötigten Antibiotika über Nacht bei 30 °C inkubiert. 30 µL der Kultur sowie 30 µL 1 M L-Arabinose wurden zu 3 mL SOB-Medium mit den benötigten Antibiotika gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 30 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden zunächst elektrokompetente Zellen hergestellt und anschließend die verlängerte Resistenzkassette mittels Elektroporation eingebracht. Die nachfolgende Inkubation wurde für 1 h bei 37 °C in SOC-Medium durchgeführt. Die Überprüfung der korrekten Gendeletion erfolgte nach DNA-Isolation durch Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung.

### *Entfernung der Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase*

Zur Entfernung der Resistenzkassette wurde das Cosmid mit eingebrachter Resistenzkassette in elektrokompetente *E. coli* BT340 Zellen transformiert. Nach Inkubation für 1 h bei 30 °C wurde der Ansatz auf LB-Agar (Chloramphenicol, Antibiotikum zur Selektion der Kassette) ausgestrichen und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Verdünnungsausstrich einzelner Klone auf LB-Agar ohne Antibiotikum. Nach Inkubation bei 42 °C über Nacht wurde DNA von Klonen isoliert, die das Resistenzgen der Kassette verloren hatten. Die erfolgreiche Entfernung der Resistenzkassette wurde mittels Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung überprüft.

### *Entfernung der Resistenzkassette durch Cre-Rekombinase*

Das Pipettierschema zur Entfernung der Resistenzkassette durch die Cre-Rekombinase ist in Tabelle 21 aufgeführt.

**Tabelle 21:** Pipettierschema Entfernung der Resistenzkassette durch Cre-Rekombinase

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µL]</b>
DNA	5
Cre-Puffer (10x)	5
Cre-Rekombinase	1
H <sub>2</sub> O	39
Total	50

Der Ansatz wurde zunächst für 30 min bei 37° C, dann für 10 min bei 70° C inkubiert. 5 µL des Ansatzes wurden mittels Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* DH5α Zellen eingebracht und auf LB-Agarplatten kultiviert. Im Anschluss wurde DNA von Klonen isoliert, die das Resistenzgen der Kasette verloren hatten. Die erfolgreiche Entfernung der Resistenzkasette wurde mittels Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung überprüft.

### Triparentale Konjugation

*E. coli* ET12567/pR9406 und *E. coli* ET12567 mit dem jeweiligen Cosmid wurden in 3 mL LB-Medium mit den benötigten Antibiotika über Nacht bei 37 °C inkubiert. 100 mL LB-Medium mit den benötigten Antibiotika wurde mit 10 % der Übernachtskultur versetzt und anschließend bei 37 °C inkubiert. Parallel hierzu wurden 500 µL 2xYT-Medium mit 10-30 µL der jeweiligen Streptomyceten-Sporensuspension versetzt, der Ansatz für 10 min bei 50 °C inkubiert und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurden die *E. coli* Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 10 mL eiskaltem LB-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt, die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL LB-Medium resuspendiert. Es wurden je 250 µL der *E. coli* Zellen zu den Sporen gegeben, der Ansatz gemischt und abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 s). 800µL des Überstand wurden verworfen und das Pellet in den verbleibenden 200 µL resuspendiert. Der Ansatz wurde in Verdünnungen von 1:1 bis 1:1000 auf MS-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit 1,5 mL einer Antibiotika-Lösung (0,625 mg/mL Nalidixinsäure, 1,25 mg/mL Kanamycin, 1,25 mg/mL Apramycin, abhängig vom konjugierten Plasmid/Cosmid) überschichtet und für weitere 7-14 Tage bei 30 °C inkubiert.

### Selektion von Streptomyceten-Mutanten mit eingebrachtem Plasmid/Cosmid

Die Sporen einzelner Klone der triparentalen Konjugation wurden erneut in Verdünnungen von 1:1 bis 1:1000 auf MS-Agarplatten (Nalidixinsäure, Antibiotikum zur Selektion des Plasmids/Cosmids) ausgestrichen und für weitere 7-14 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Sporen einzelner Klone dieser Agarplatten wurden abschließend konfluent auf MS-Agarplatten (Nalidixinsäure, Antibiotikum zur Selektion des

Plasmids/Cosmids) ausgestrichen und für weitere 7-14 Tage bei 30 °C inkubiert. Von diesen Platten erfolgte die Sporenernte.

### Selektion von Streptomyceten-Mutanten mit Deletion auf dem Genom

Die Sporen einzelner Klone der triparentalen Konjugation wurden erneut in Verdünnungen von 1:1 bis 1:1000 auf MS-Agarplatten (Nalidixinsäure) ausgestrichen und für weitere 7-14 Tage bei 30 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. MS-Agarplatten, welche etwa 10-50 Klone aufwiesen, wurden für das Screening von Kanamycin-sensitiven Mutanten mittels Replika-Plating verwendet. Hierzu wurde ein Stofftuch mit einer entsprechenden Apparatur zunächst auf die MS-Agarplatte gepresst, um die Sporen der Kolonien auf das Tuch zu übertragen. Anschließend wurde das Tuch zunächst auf eine DNA-Agar-Platte mit Kanamycin, danach auf eine DNA-Agar-Platte ohne Antibiotikum gepresst. Nach Inkubation der DNA-Agarplatten bei 30 °C für 2-3 Tage wurden Kanamycin-sensitive Klone identifiziert und konfluent auf MS-Agarplatten (Nalidixinsäure) ausgestrichen. Nach Inkubation bei 30 °C für 7-14 Tage erfolgte die Sporenernte von diesen Platten.

## **2.11 Biochemische Methoden**

### Überexpression und Aufreinigung von Proteinen

#### *Kultivierung von E. coli Rosetta DE3*

Es wurden 3 mL 2xYT-Medium mit einem Klon *E. coli* Rosetta DE3, welcher das entsprechende pET28a-Derivat enthielt, über Nacht bei 37 °C kultiviert. 100 µL dieser Kultur wurden zu 100 mL 2xYT-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf etwa 20 °C abgekühlt, 50 µL einer 1 M IPTG-Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Resuspension erfolgte in 1 mL Lysepuffer je g Pellet.

#### *Kultivierung von S. lividans TK24*

Es wurden 50 µL Sporensuspension von *S. lividans* TK24/pDB02 zu 100 mL YEME-Medium versetzt mit Apramycin gegeben und für 2-3 Tage bei 30 °C kultiviert. 20 mL dieser Vorkultur wurden zu 50 mL YEME-Medium versetzt mit Apramycin gegeben und

für weitere 2 Tage bei 30 °C kultiviert. Die Kultur wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Resuspension erfolgte in 5 mL Lysepuffer je g Pellet.

### Zellaufschluss

Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschall (Amplitude 30 %, An/Aus jeweils 5 s, 10 min; Branson Ultrasonics Sonifier SFX250) auf Eis durchgeführt. Das Lysat wurde abzentrifugiert (33000 g, 4 °C, 1 h) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die anschließende Affinitätschromatographie wurde mit einem Äkta start System mit Frac-30 Fraktionssammler (GE Healthcare) unter Verwendung einer 5 mL HisTrap HP Säule (Cytiva) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 0-100 % Elutionspuffer über 60 min. Zur Aufkonzentration wurde ein Zentrifugalfilter (Amicon Ultra-15, *Mr-cutoff* 10 kDa; Merck) verwendet und die Proteinkonzentration mittels UV-Spektrometrie (Nanodrop, ThermoFisher Scientific) unter Einbeziehung des berechneten Extinktionskoeffizienten bestimmt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80 °C.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Probenvorbereitung erfolgte in Laemmli-Probenpuffer nach Angaben des Herstellers. Die Auftrennung erfolgte in Sammelgel (4 % Acrylamid) und nachfolgendem Trenngel (30 % Acrylamid) bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA für 2-3 h. Anschließend wurde das Gel für jeweils 1 h in Fixationspuffer, Färbepuffer und Entfärbepuffer unter Schütteln inkubiert.

### Enzymatischer Assay Cpz2

Das Pipettierschema für den enzymatischen Assay ist in Tabelle 22 aufgeführt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 30 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, erfolgte im Anschluss eine Lagerung bei -80 °C.

**Tabelle 22:** Pipettierschema enzymatischer Assay Cpz2

Komponente	Volumen [ $\mu$ L]
Cpz2 (3,3 mg/mL)	2
3-HMG-CoA (9 mg/mL)	11
H <sub>2</sub> O	37
Total	50

## 2.12 Chemische und analytische Methoden

### Extraktion von Caprazamycinen

#### *Extraktion zur qualitativen Analyse*

1 mL des Überstandes einer Kultur zur qualitativen Analyse wurde mit 1 M HCl auf pH 4 angesäuert. Es wurden 1 mL n-Butanol hinzugegeben und die Lösung für 1 min gevortext. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde die butanolische Phase in ein neues Gefäß überführt und im Rotationsverdampfer (2 h, 45 °C) entfernt. Der Rückstand wurde in 500 µL Methanol gelöst.

#### *Extraktion zur quantitativen Analyse*

1 mL des Überstandes einer Kultur zur quantitativen Analyse wurde mit 1 M HCl auf pH 4 angesäuert. Die verbleibende Kultur wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Mycel wurde mit 500 µL eiskaltem Methanol versetzt und für 1 min gevortext. Nach Inkubation bei -80 °C für 30 min und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und im Rotationsverdampfer (1 h, 45 °C) entfernt. Der Rückstand wurde mit dem angesäuerten Überstand der Kultur vereinigt, 1 mL n-Butanol zugegeben und für 1 min gevortext. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde die butanolische Phase in ein neues Gefäß überführt und im Rotationsverdampfer (2 h, 45 °C) entfernt. Der Rückstand wurde in 500 µL Methanol.

### HPLC-MS/MS<sup>2</sup>-Analyse

Die HPLC-MS/MS<sup>2</sup>-Analyse wurde auf einem Agilent LC/MSD Ultra Trap XCT 6330 System mit einer Luna Omega Polar C18 Säule (5 µm, 150 x 2,1 mm) durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Zur Elution wurden 0,1 % Ameisensäure (Fließmittel A) und Acetonitril versetzt mit 0,06 % Ameisensäure (Fließmittel B) unter Verwendung des folgenden Gradienten verwendet: 0-100 % Fließmittel B über 20 min gefolgt von einem isokratischen Schritt von 100 % Fließmittel B über 3 min und einem abschließenden isokratischen Schritt von 100 % Fließmittel A für 1 min. UV-Spektren wurden mittels eines Diodenarray-Detektors im Bereich von 230-600 nm aufgenommen. Die Detektion von Massenspektren erfolgte im Bereich von 100-2200 *m/z*. Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray bei einer Spannung von 3,5 kV und einer Kapillartemperatur von 350 °C. Zur Quantifizierung von Caprazamycin-

Aglyconen wurde eine Kalibriergerade mit Caprazamycin-Aglycon A als Referenzsubstanz erstellt. Es wurden Proben mit den Konzentrationen 0,5 mg/L, 10 mg/L, 40 mg/L, 120 mg/L und 240 mg/L in Triplikaten erstellt und in aufsteigender Konzentration vermessen.

### Hochauflösende Massenspektrometrie

Die HR-MS-Analyse wurde auf einem Bruker maXis 4G HR-ESI/APCI-TOF System durchgeführt. Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray bei einer Spannung von 4,0 kV und einer Kapillartemperatur von 200 °C. Die Probenaufgabe erfolgte über eine Zeit von 2,6 min durch eine Spritzenpumpe.

### Bioinformatische Analyse mit cblaster

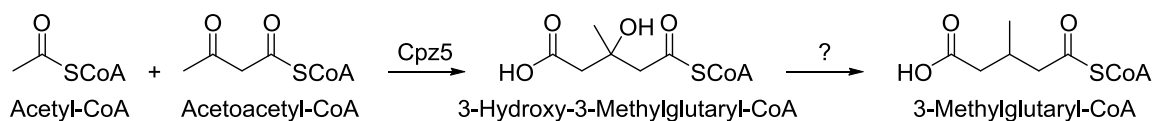
Die Bioinformatische Analyse mit cblaster wurde in Zusammenarbeit mit Davide Paccagnella (Universität Tübingen) durchgeführt. Zunächst wurde eine Datenbank aller 31598 assemblierten *Actinobacteria*-Genome der *Genome Taxonomy Database* (GTDB; zuletzt geprüft am 4. August 2022) erstellt [108]. Das cblaster Suchmodul (Standardeinstellungen) wurde verwendet, um diese Datenbank unter Verwendung der Vorlagesequenzen *sco2775-sco2779* oder *sco2774-sco2779* zu analysieren [109].

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase Cpz5 als möglicher Startpunkt der 3-Methylglutaryl-CoA Biosynthese

##### 3.1.1 Bioinformatische Analyse von *cpz5*

Der Ablauf der Caprazamycin-Biosynthese wurde bereits in gewissem Maße untersucht. Ein biosynthetischer Weg zu 3-Methylglutaryl-CoA, welches durch Cpz21 auf die Hydroxyacylcaprazole zur Bildung der Caprazamycin-Aglycone übertragen wird, wurde bisher jedoch nicht beschrieben. Basierend auf der Vermutung, dass das Caprazamycin-Gencluster selbst alle benötigten Gene für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA beinhaltet, wurde dieses Gencluster auf mögliche Kandidaten für diese Biosynthese untersucht. Hierbei wurde mit der mutmaßlichen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (HMG-CoA Synthase) Cpz5 ein vielversprechendes Enzym für den ersten Schritt dieser Biosynthese identifiziert. Im Allgemeinen katalysierten HMG-CoA Synthasen eine Claisen-Kondensation von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA [110]. Durch anschließende Elimination der 3-Hydroxygruppe dieses 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoAs könnte das gewünschte 3-Methylglutaryl-CoA entstehen (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Vermuteter Biosyntheseweg von 3-Methylglutaryl-CoA unter Beteiligung der 3-HMG-CoA Synthase Cpz5.

Eine *BLASTx*-Analyse zeigte, dass die Proteinsequenz von Cpz5 mit einer Länge von 419 Aminosäuren große Ähnlichkeit zu anderen HMG-CoA Synthasen aufweist (Tabelle 23). Die Aminosäuren 7 bis 319 zeigten einen spezifischen Treffer für initialisierende, kondensierende Enzyme (cd00827, *E-value*  $1.97e^{-31}$ ), die als

homodimere CoA-Ester umsetzen. Außerdem enthält Cpz5 eine konservierte Domäne für HMG-CoA Synthasen (TIGR01835, *E-value* 7.36e<sup>-121</sup>), die überwiegend in grampositiven Bakterien auftreten und welche den ersten Schritt des Mevalonat-Weges hin zu Isopentenylpyrophosphat (IPP) katalysieren.

**Tabelle 23:** Durch BLASTx-Analyse identifizierte homologe Proteine der HMG-CoA Synthase Cpz5.

Annotierung	Organismus	Identität [%]	Similarität [%]	Anzahl Aminosäuren
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Streptomyces sp.</i> SID7499	100	100	419
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Streptomyces massasporeus</i>	84	89	419
putative 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase	<i>Streptomyces sp.</i> SANK 60405	82	88	423
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Streptomyces asoensis</i>	83	89	391
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Streptomyces sp.</i> SLBN-115	82	89	391

Diese bioinformatische Analyse deutete stark darauf hin, dass Cpz5 tatsächlich eine HMG-CoA Synthase darstellt und somit an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt sein könnte.

### 3.1.2 Gendeletion von *cpz5*

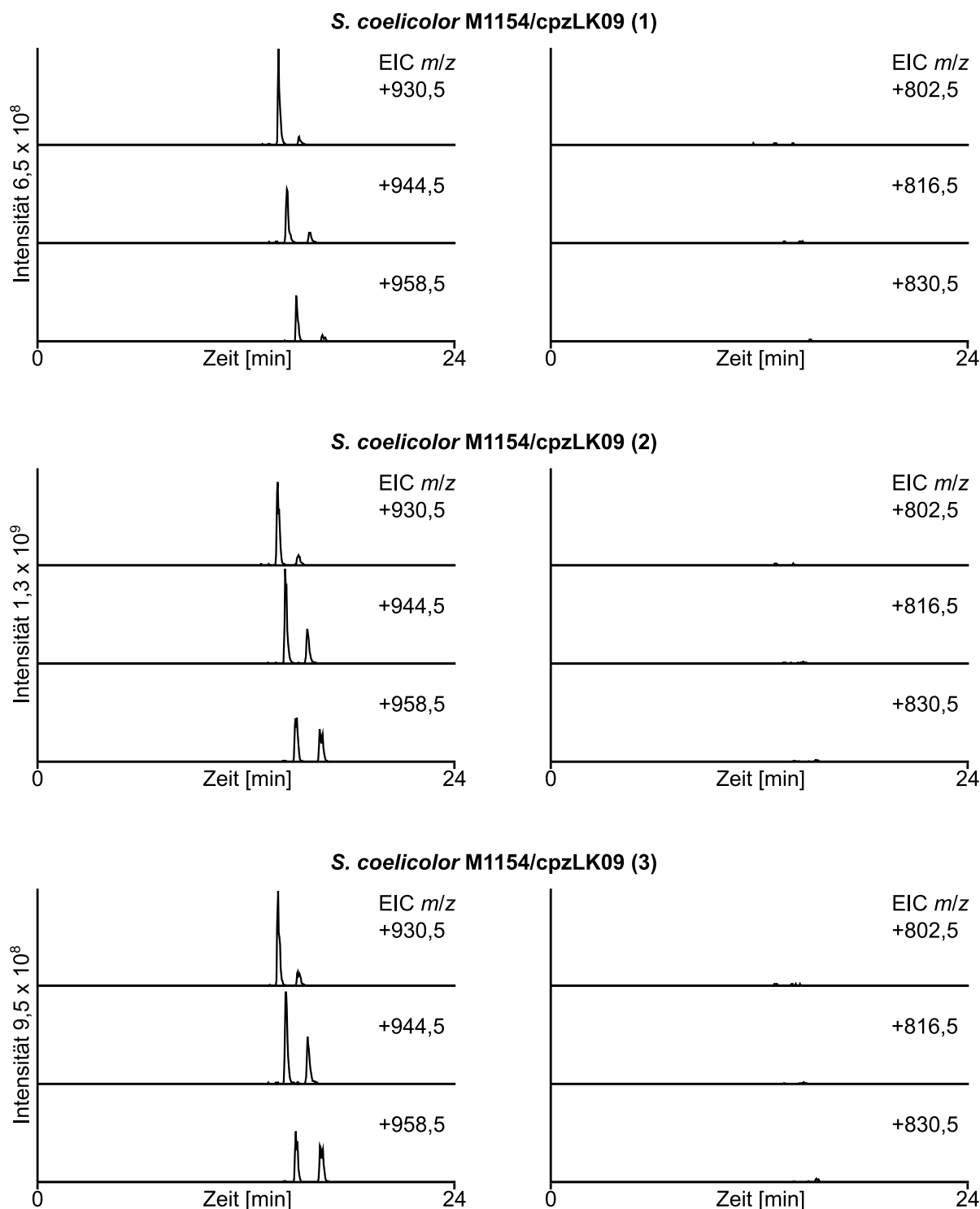
In nächsten Schritt sollte anhand der Caprazamycin-Produktion überprüft werden, ob Cpz5 den Startpunkt dieses vermuteten Biosyntheseweges hin zu 3-Methylglutaryl-CoA darstellt. Hierzu wurde *cpz5* zunächst auf Cosmid cpzLK09, welches das Caprazamycin Gencluster ohne die Gene zur Bereitstellung der L-Rhamnose enthält, mittels Red/ET-Rekombination durch eine Apramycin-Resistenzkassette ersetzt. Anschließend wurde die Resistenzkassette mittels FLP-Rekombination aus dem erhaltenen Cosmid cpzDB01 entfernt, um eine *in-frame* Deletion von *cpz5* zu erhalten. Die korrekte Deletion von *cpz5* auf dem resultierenden Cosmid cpzDB04 wurde durch PCR und Sequenzierung des PCR-Produktes überprüft. Anschließend wurde cpzDB04 in den heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 eingebracht. Drei individuelle, Kanamycin-resistente Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) wurden isoliert und die erfolgreiche Integration des Cosmids in die Integrationsstelle des Genoms nach Isolation von genomischer DNA durch PCR und Sequenzierung des

PCR-Produktes verifiziert. Nach Kultivierung und Extraktion wurde die Caprazamycin-Produktion dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert. Zum Vergleich wurden parallel drei Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1)-(3) generiert und ebenfalls analysiert.

Wie erwartet zeigten die Extrakte von *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1)-(3) im extrahierten Ionenchromatogramm (EIC) Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone A/B mit einem  $m/z$  von 958,5  $[M+H]^+$  und einer  $R_t$  von 14,9 min, Caprazamycin-Aglycone C/D/G mit einem  $m/z$  von 944,5  $[M+H]^+$  und einer  $R_t$  von 14,3 min sowie Caprazamycin-Aglycone E/F mit einem  $m/z$  von 930,5  $[M+H]^+$  und einer  $R_t$  von 13,8 min. Die Massen der Hydroxyacylcaprazole A/B mit einem  $m/z$  von 830,5  $[M+H]^+$  bei einer  $R_t$  von 14,0 min, Hydroxyacylcaprazole C/D/G mit einem  $m/z$  von 816,5  $[M+H]^+$  bei einer  $R_t$  von 13,4 min und Hydroxyacylcaprazole E/F mit einem  $m/z$  von 802,5  $[M+H]^+$  bei einer  $R_t$  von 12,9 min waren nur geringfügig vorhanden (Abbildung 12). Auch Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone A/B mit einem  $m/z$  von 958,5  $[M+H-SO_3]^+$  und einer  $R_t$  von 16,4 min, der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone C/D/G mit einem  $m/z$  von 944,5  $[M+H-SO_3]^+$  und einer  $R_t$  von 15,6 min sowie der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone E/F mit einem  $m/z$  von 930,5  $[M+H-SO_3]^+$  und einer  $R_t$  von 15,0 min waren in den jeweiligen Chromatogrammen sichtbar. Die Fragmente der entsprechenden sulfatierten Hydroxyacylcaprazole A/B mit einem  $m/z$  von 830,5  $[M+H-SO_3]^+$  bei einer  $R_t$  von 15,3 min, der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole C/D/G mit einem  $m/z$  von 816,5  $[M+H-SO_3]^+$  bei einer  $R_t$  von 14,5 min sowie der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole E/F mit einem  $m/z$  von 802,5  $[M+H-SO_3]^+$  bei einer  $R_t$  von 13,9 min waren wie auch die nicht-sulfatierten Hydroxyacylcaprazole nur geringfügig vorhanden.

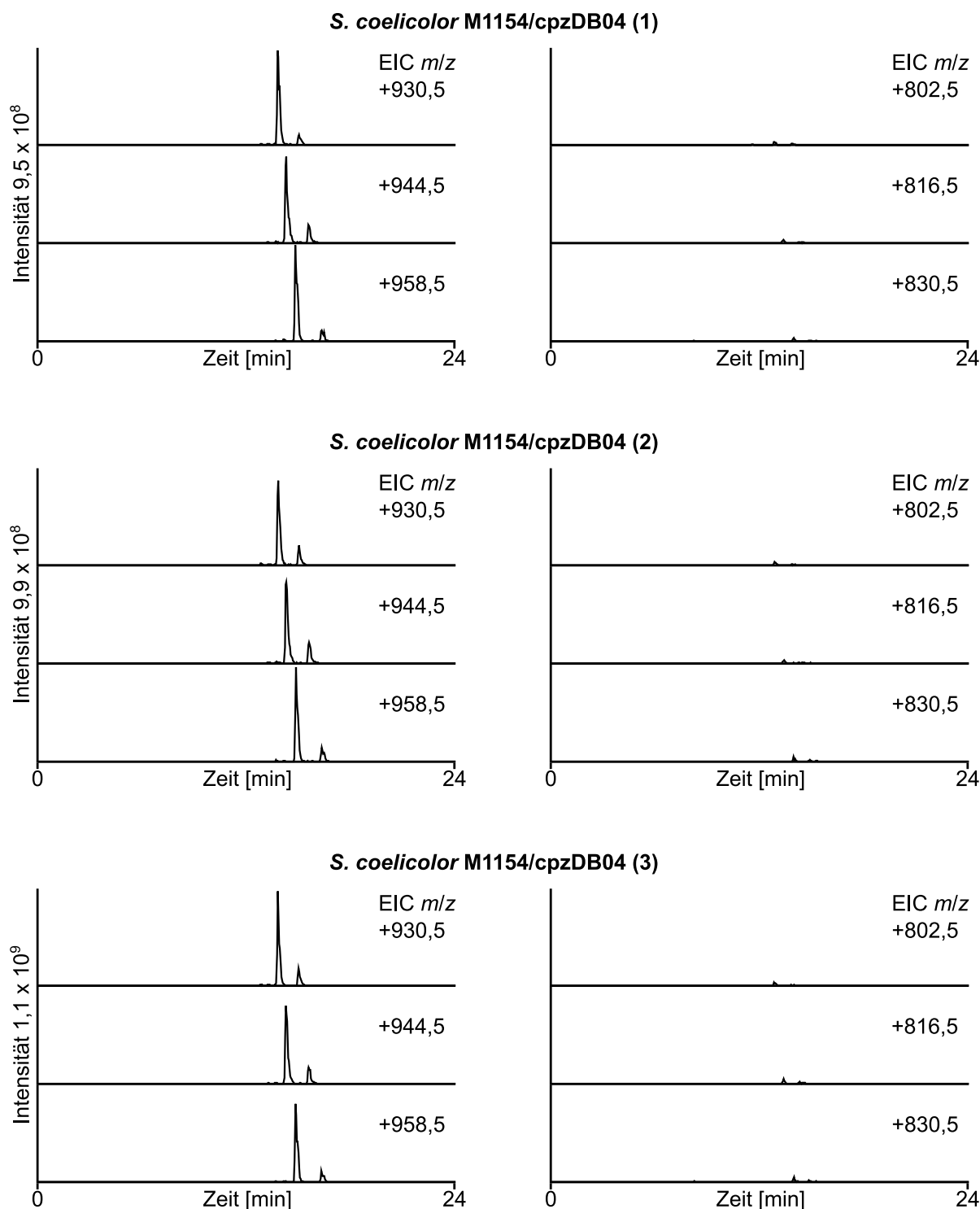
Überraschenderweise konnten auch in den Extrakten der Mutanten, die eine Deletion von *cpz5* auf dem Caprazamycin Gencluster trugen, die Caprazamycin-Aglycone weiterhin detektiert werden (Abbildung 13). Um auszuschließen, dass die Funktion von Cpz5 durch ein Gen des heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 komplementiert wird, wurde auf dessen Genom nach homologen Genen zu *cpz5* gesucht. Es konnten jedoch keine homologen HMG-CoA Synthasen gefunden werden. Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei Vermutungen ableiten: Entweder ist Cpz5 nicht an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt, oder es existieren weitere, Cpz5-unabhängige Wege für die Bereitstellung des 3-Methylglutaryl-CoAs.

## Ergebnisse



**Abbildung 12:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 13:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt.

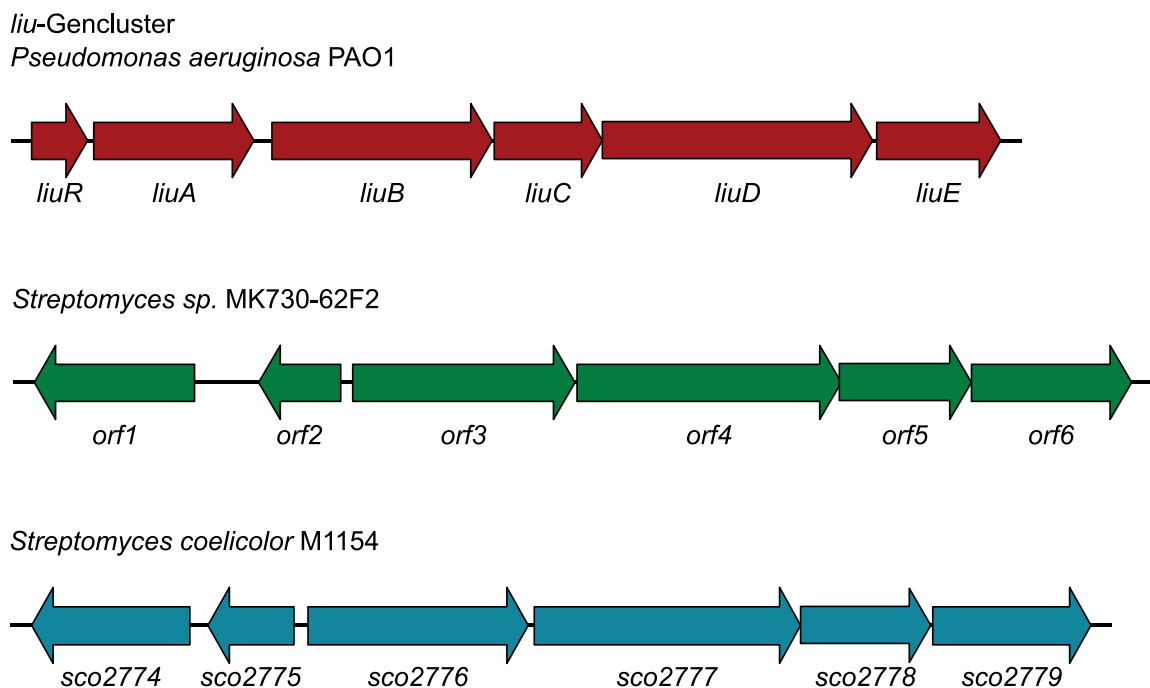
### 3.2 Der Primärmetabolismus als Ursprung von 3-Methylglutaryl-CoA

Eine Gendeletion der HMG-CoA Synthase Cpz5 konnte die Beteiligung dieses Enzyms an der Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA nicht nachweisen. Um herauszufinden, welche weiteren Biosynthesewege dieses Intermediat generieren könnten, wurde der Primärmetabolismus von *S. coelicolor* M1154 genauer untersucht. 3-Methylglutaryl-CoA wurde bisher nicht als Teil eines Primärmetabolismus-Weges beschrieben. Daher wurde nach Primärmetabolismus-Wegen gesucht, die plausible Vorstufen von 3-Methylglutaryl-CoA beinhalten, welche relativ einfach in dieses umgewandelt werden könnten. Als vielversprechende Quellen solcher Vorstufen wurden die Abbauwege der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin identifiziert. Einerseits kommen diese Abbauwege ubiquitär in Bakterien vor. Andererseits sind die Intermediate dieser Abbauwege kurzkettige Acyl-CoAs, die teilweise große Ähnlichkeit zu 3-Methylglutaryl-CoA aufweisen. Insbesondere der Abbau von Leucin beinhaltet mit 3-Methylglutaconyl-CoA und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zwei zu 3-Methylglutaryl-CoA chemisch nahezu identische Zwischenprodukte.

#### 3.2.1 Identifizierung des Leucin-Isovalerat-Abbauweges (Liu-Weg) in *S. coelicolor* M1154

Der Abbau von Leucin führt in mehreren Schritten zu den Endprodukten Acetyl-CoA und Acetoacetat und wurde in *P. aeruginosa* PAO1 detailliert untersucht. Das hierfür verantwortliche Gencluster in diesem Stamm codiert für sechs Gene: Eine Isovaleryl-CoA Dehydrogenase (*liuA/PA2015*), zwei Untereinheiten einer 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase (*liuB/PA2014* und *liuD/PA2012*), eine 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase (*liuC/PA2013*), eine 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase (*liuE/PA2011*) sowie einen transkriptionellen Regulator (*liuR/PA2016*) (Abbildung 14). Zur Identifizierung des Liu-Weges in *S. coelicolor* M1154 wurden homologe Enzyme auf Grundlage der *liu*-Gene aus *P. aeruginosa* mittels BLASTx-Analyse gesucht. Es konnte ein Gencluster codierend für Proteine homolog zu LiuA (Sco2779 37/53 % Identität/Similarität), LiuB (Sco2776 68/78 % Identität/Similarität), LiuD (Sco2777 50/63 % Identität/Similarität) und LiuE (Sco2778 48/63 % Identität/Similarität) identifiziert werden (Tabelle 24). Dieses Gencluster weist jedoch im Vergleich zu *P. aeruginosa* Unterschiede in Aufbau

und Orientierung der Gene auf: Es enthält zum einen kein Gen, das für eine 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase homolog zu LiuC codiert. Außerdem ist das Regulator-Gen des Clusters relativ zu den übrigen Genen entgegengesetzt orientiert. Während das *liu*-Cluster in *P. aeruginosa* die Reihenfolge Regulator-*liuA-liuB-liuC-liuD-liuE* aufweist, ist es in *S. coelicolor* M1154 in der Abfolge Regulator-*liuB-liuD-liuE-liuA* angeordnet. Eine Untersuchung des nativen Caprazamycin-Produzenten *S. sp.* MK730-62 zeigte, dass dieser Stamm ebenfalls ein *liu*-Cluster mit analogem Aufbau zu *S. coelicolor* M1154 enthält. Die Homologien der von diesem Cluster codierten Enzyme zu LiuA (Orf6 37/53 % Identität/Similarität), LiuB (Orf3 67/77 % Identität/Similarität), LiuD (Orf4 49/64 % Identität/Similarität) und LiuE (Orf5 46/62 % Identität/Similarität) sind außerdem nahezu identisch zu den Werten für *S. coelicolor* M1154. Dies impliziert, dass die beiden Cluster der *Streptomyces* Stämme dieselbe Funktion aufweisen und somit in beiden Stämmen für die Caprazamycin-Biosynthese von Bedeutung sein könnten.



**Abbildung 14:** Genetische Organisation des *liu*-Genclusters aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sowie der identifizierten homologen *liu*-Cluster aus *Streptomyces sp.* MK730-62F2 und *Streptomyces coelicolor* M1154.

## Ergebnisse

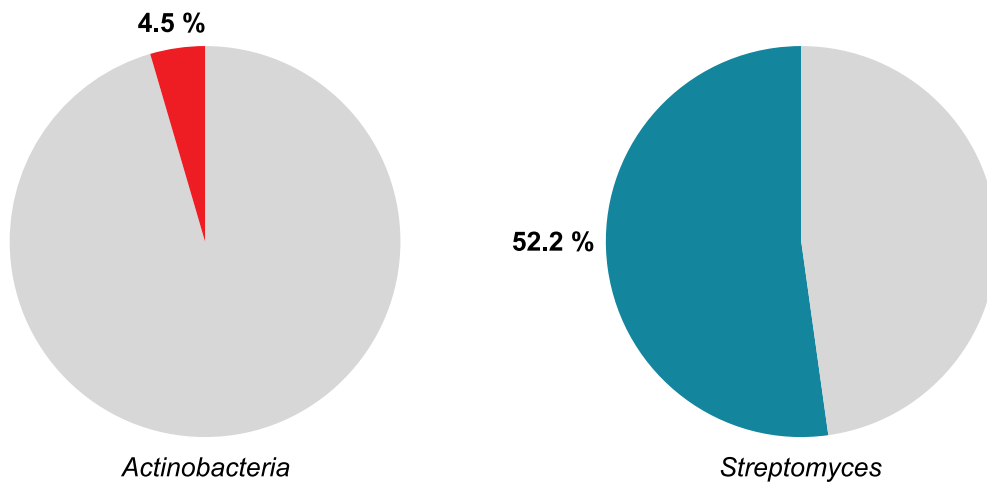
**Tabelle 24:** Annotierung und Homologie der Proteine des Abbauweges von Leucin und Isovalerat in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Streptomyces* sp. MK730-62F2 und *Streptomyces coelicolor* M1154.

Bezeichnung	Proteine (% Identität/Similarität)		
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>S. sp. MK730-62F2</i>	<i>S. coelicolor</i> M1154
Transkriptioneller Regulator	LiuR / PA2016	Orf2 (n.s.)	Sco2775 (n.s.)
Isovaleryl-CoA Dehydrogenase	LiuA / PA2015	Orf6 (37/53)	Sco2779 (37/53)
3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase $\beta$ -Untereinheit	LiuB / PA2014	Orf3 (67/77)	Sco2776 (68/78)
3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase	LiuC / PA2013	-	-
3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase $\alpha$ -Untereinheit	LiuD / PA2012	Orf4 (49/64)	Sco2777 (50/63)
3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase	LiuE / PA2011	Orf5 (46/62)	Sco2778 (48/63)
Acyl-CoA Dehydrogenase	-	Orf1	Sco2774

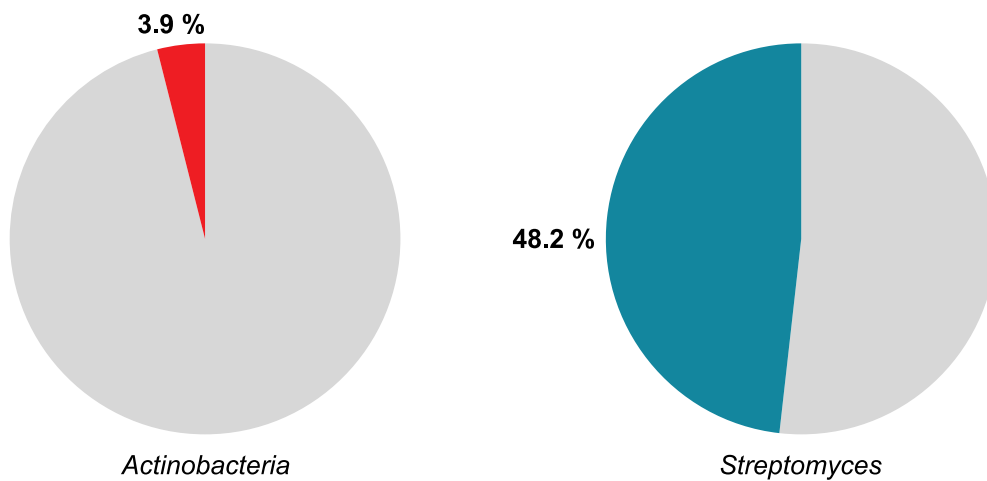
n.s. = nicht signifikant.

Um die Distribution des in diesen beiden *Streptomyces*-Arten identifizierten Clusters innerhalb der Abteilung der *Actinobacteria* als auch der Gattung *Streptomyces* genauer zu untersuchen, wurde eine bioinformatische Analyse mittels cblaster durchgeführt. Als Vorlage-Sequenz wurde das Gencluster *sco2775-sco2779* verwendet und mit den 31598 *Actinobacteria*-Genomen der *Genome Taxonomy Database* (Stand 04. August 2022) abgeglichen. Innerhalb aller *Actinobacteria* beinhalteten lediglich 1431 oder 4,5 % der untersuchten Genome ein entsprechendes *liu*-Cluster (Abbildung 15 A). Von den 2574 untersuchten *Streptomyces*-Gattungen waren es jedoch 1344 oder 52,2 %, die ein homologes *liu*-Cluster aufwiesen. Der für *S. coelicolor* M1154 identifizierte Aufbau des *liu*-Clusters scheint demnach innerhalb der *Actinobacteria* insbesondere in *Streptomyces* vorzukommen.

**A Assemblierungen mit homologem Gencluster zu *sco2775-sco2779***



**B Assemblierungen mit homologem Gencluster zu *sco2774-sco2779***



**Abbildung 15:** Verteilung von *liu*-Genclustern in *Actinobacteria* und *Streptomyces*. (A) Anteil der Assemblierungen von *Actinobacteria* bzw. *Streptomyces* aus der *Genome Taxonomy Database*, die ein homologes Gencluster zu *sco2775-sco2779* enthalten. (B) Anteil der Assemblierungen von *Actinobacteria* bzw. *Streptomyces* aus der *Genome Taxonomy Database*, die ein homologes Gencluster zu *sco2774-sco2779* enthalten.

### 3.2.2 Deletion des kompletten *liu*-Genclusters

Um herauszufinden, ob das in *S. coelicolor* M1154 identifizierte *liu*-Gencluster an der Biosynthese der Caprazamycine beteiligt ist, wurde im ersten Schritt eine Gendeletionen aller *liu*-Gene exklusive Regulator-Gen durchgeführt. Hierzu wurde zum einen eine Kasette mit dem Primerpaar bla-oriT-tet\_787\_FW und bla-oriT-tet\_787\_RV von Plasmid pIJ787 amplifiziert und das *bla*-Gen Ursprungscosmids StC105 mittels Red/ET-Rekombination durch diese ersetzt, um eine Konjugation in *Streptomyces* zu ermöglichen. Außerdem wurden die *liu*-Gene *sco2776-sco2779* durch eine Apramycin-Resistenzkasette von pIJ773 ersetzt. Im Anschluss wurde diese Resistenzkasette mittels FLP-Rekombination entfernt, um eine *in-frame* Deletion von *sco2776-sco2779* zu erhalten. Die korrekte Deletion von *sco2776-sco2779* und der Austausch des *bla*-Gens wurden durch PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. Anschließend wurde das resultierende Cosmid StC105DB14 in den heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 eingebracht und Mutanten identifiziert, welche die Wildtyp-Gene durch ein *double-crossover* verloren hatten. Die Verifizierung der Gendeletion sowie die Abwesenheit der Wildtyp-Gene erfolgte nach Isolation von genomischer DNA durch PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte. In die resultierende Mutante *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779* wurde entweder cpzLK09 mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder cpzDB04 mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779*/cpzLK09 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779*/cpzDB04 (1)-(3) isoliert. Die erfolgreiche Integration des Cosmids in die Integrationsstelle attB des Genoms erfolgte nach Isolation von genomischer DNA durch PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte.

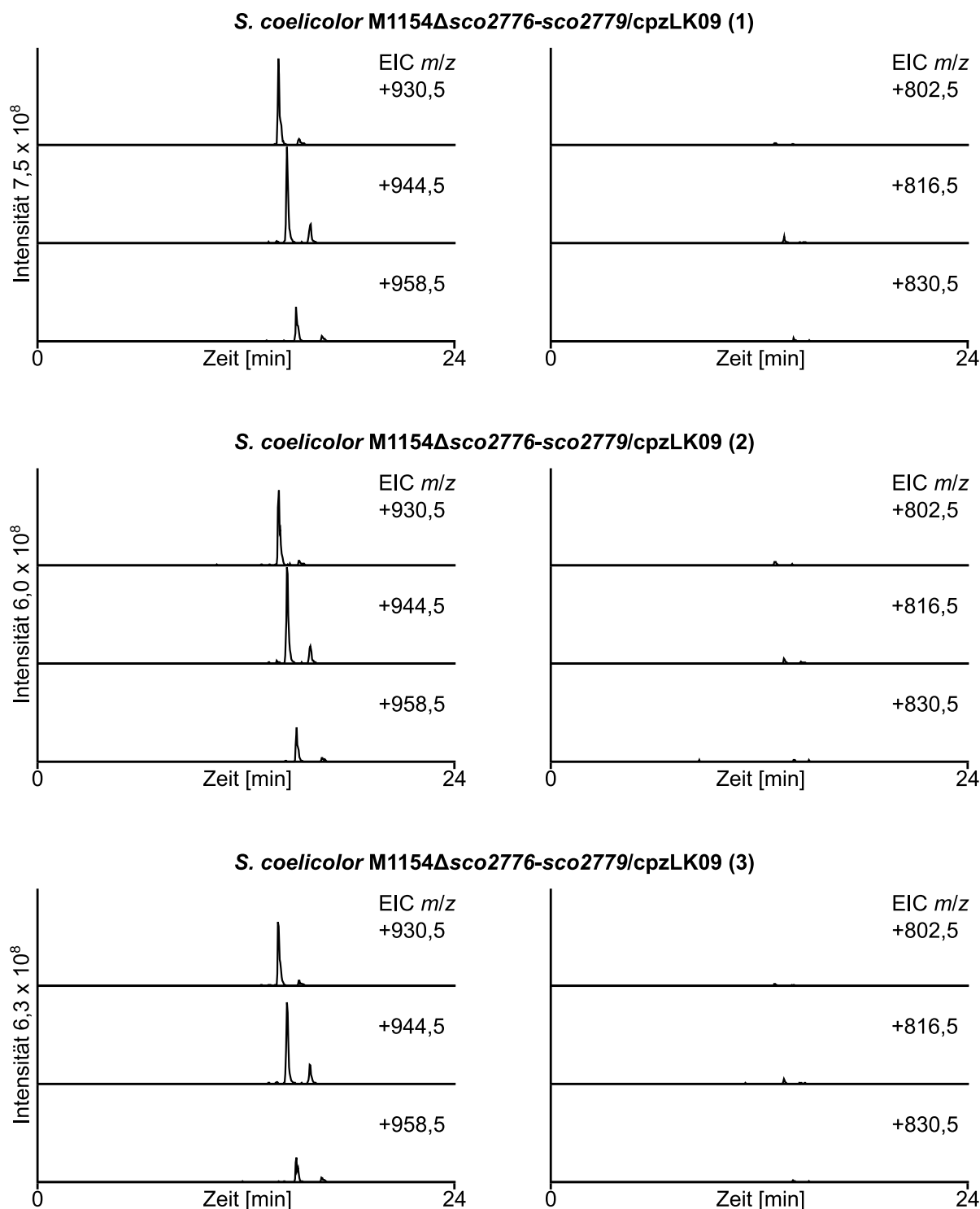
Die Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779*/cpzLK09 (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm nach wie vor Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 16). Auch die Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone konnten detektiert werden. Die Massen der Hydroxyacylcaprazole waren nur geringfügig vorhanden. Ebenso die Fragmente der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

Im Gegensatz hierzu zeigten die Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779*/cpzDB04 (1)-(3) eine Akkumulation der Hydroxyacylcaprazole, während die Caprazamycin-Aglycone nicht mehr detektiert wurden (Abbildung 17). Um

sicherzustellen, dass es sich bei den betrachteten Massen tatsächlich um die entsprechenden Caprazamycin-Aglycone und Hydroxyacylcaprazole handelte, wurden zusätzlich HPLC-MS<sup>2</sup>-Messungen durchgeführt (Abbildung 18). Die beobachteten Fragmente der Masse mit einem  $m/z$  von 930,5 bei einer  $R_t$  von 13,8 min des Extraktes von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/cpzLK09 (1) konnten den Caprazamycin-Aglyconen E/F zugeordnet werden. Das beobachtete Fragment mit einem  $m/z$  von 555,2 entstand durch Abspaltung des Aminoribosyluridins, das Fragment mit einem  $m/z$  von 687,3 entstand nach Abspaltung des Uracils sowie der Aminoribose und das Fragment mit einem  $m/z$  von 799,3 entstand nach Abspaltung der Aminoribose vom Molekül-Ion. Die beobachteten Fragmente der Masse mit einem  $m/z$  von 802,5 bei einer  $R_t$  von 12,9 min des Extraktes von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/cpzDB04 (1) konnten den Hydroxyacylcaprazolen E/F zugeordnet werden. Das Fragment mit einem  $m/z$  von 671,3 entstand durch Abspaltung der Aminoribose, das Fragment mit einem  $m/z$  von 559,2 durch Abspaltung der  $\beta$ -Hydroxyfettsäure vom Molekül-Ion. In beiden Analysen konnten außerdem die Fragmente mit einem  $m/z$  von 427,0 der Caprazol-Grundstruktur nach Abspaltung der Aminoribose und die Fragmente der Massen mit einem  $m/z$  von 315,0 bzw. 314,9 nach zusätzlicher Abspaltung des Uracils vom jeweiligen Molekül-Ion beobachtet werden. Diese Daten konnten hinreichend belegen, dass es sich bei den betrachteten Massen tatsächlich um die Caprazamycin-Aglycone und die Hydroxyacylcaprazole handelte.

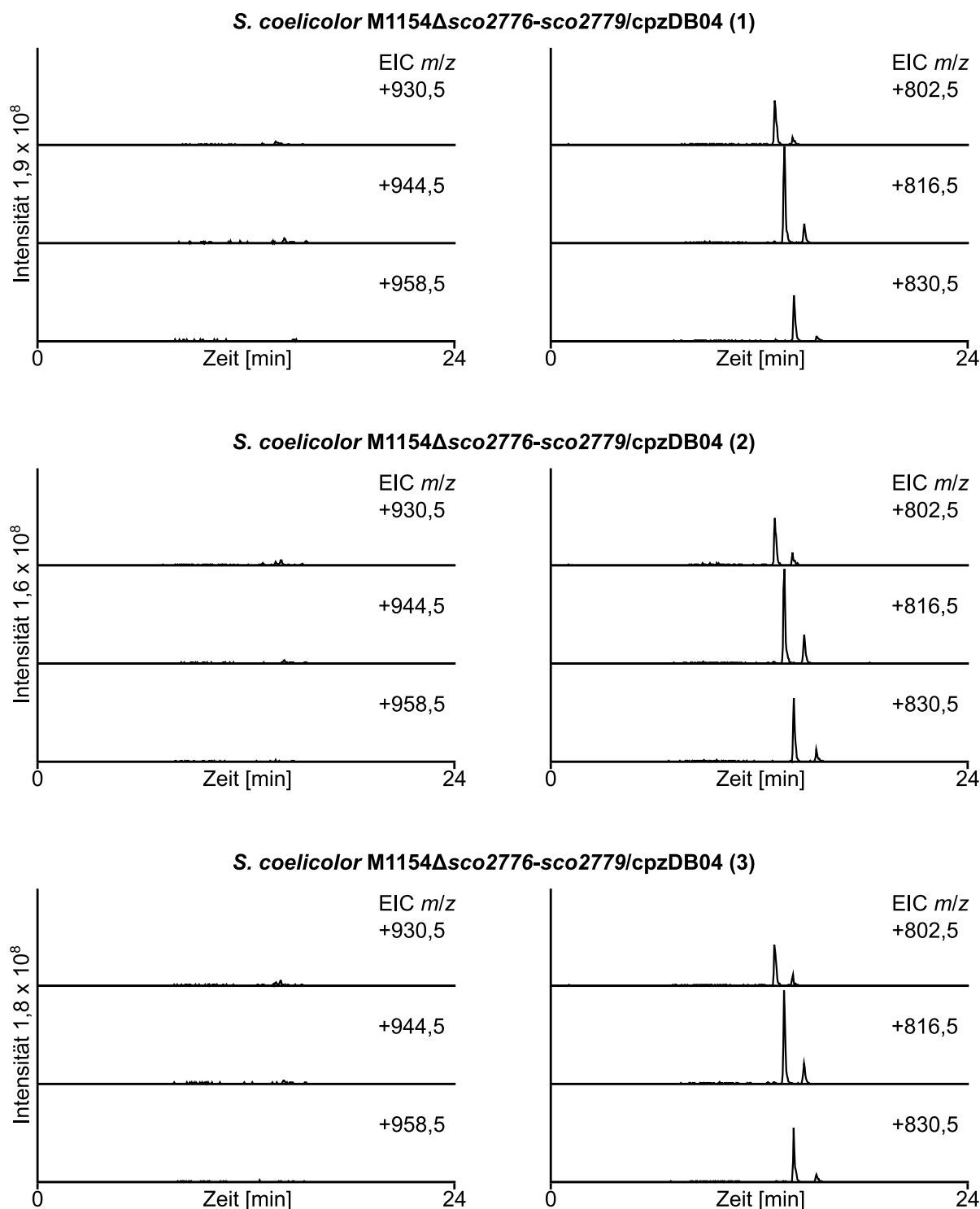
Durch die Gendeletionen konnte gezeigt werden, dass das *liu*-Cluster tatsächlich an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt ist. Da eine Deletion des *liu*-Clusters in Verbindung mit einem intakten Caprazamycin-Gencluster weiterhin zur Produktion von Caprazamycin-Aglyconen führte, eine zusätzliche Deletion von *cpz5* jedoch eine Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen zur Folge hatte, muss *cpz5* ebenfalls eine Rolle für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA spielen. Weiterhin muss es sich bei *cpz5* und dem *liu*-Cluster um zwei unabhängige Biosynthesewege hin zu 3-Methylglutaryl-CoA handeln, da die jeweiligen singulären Deletionen nicht zu einer Termination der Biosynthese von Caprazamycin-Aglyconen führte.

## Ergebnisse

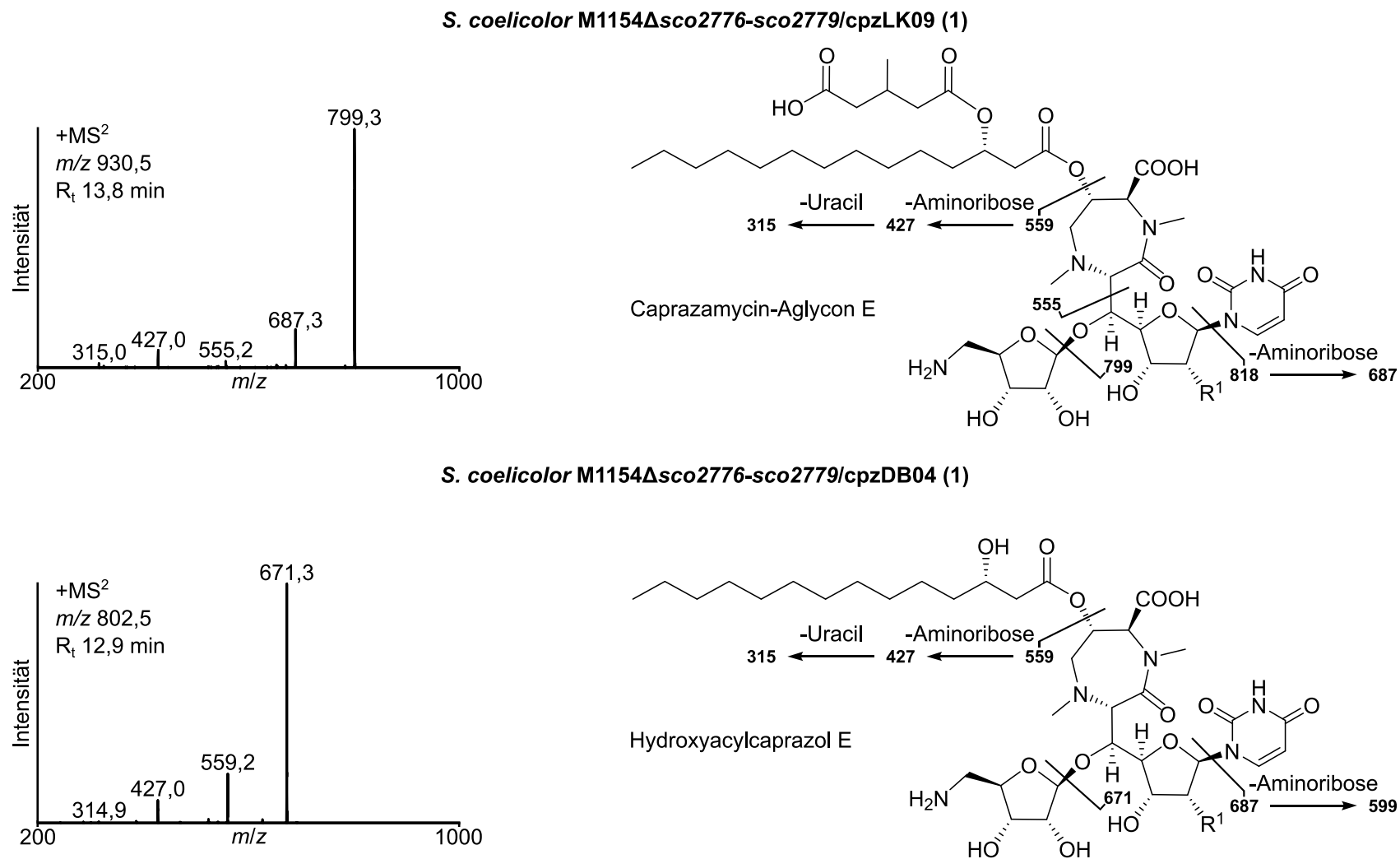


**Abbildung 16:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 17:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.



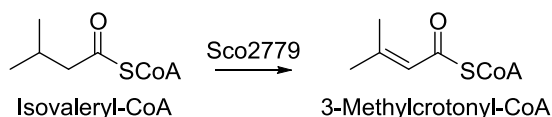
**Abbildung 18:** MS<sup>2</sup>-Massenspektren der Masse mit einem  $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei R<sub>t</sub> 13,8 min des Extraktes von *S. coelicolor* M1154Δsco2776-sco2779/cpzLK09 (1) sowie der Masse mit einem  $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei R<sub>t</sub> 12,9 min des Extraktes von *S. coelicolor* M1154Δsco2776-sco2779/cpzDB04 (1). Außerdem sind die zugehörigen Fragmentierungsschemata des Caprazamycin-Aglycons E und des Hydroxyacylcaprazols E abgebildet.

### 3.2.3 Einzeldelationen der *liu*-Gene

Das *liu*-Gencluster konnte durch eine Deletion der Gene *sco2776-sco2779* als eine Quelle von 3-Methylglutaryl-CoA identifiziert werden. Im nächsten Schritt sollte nun herausgefunden werden, welches Intermediat des Liu-Weges für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA verwendet wird. Hierzu wurden Mutanten von *S. coelicolor* M1154 wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben generiert, die Einzeldelationen der *liu*-Gene trugen. In diese Mutanten wurde entweder cpzLK09 mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder cpzDB04 mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzLK09 (1)-(3), *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzLK09 (1)-(3), *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2778*/cpzLK09 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2779*/cpzLK09 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzDB04 (1)-(3), *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzDB04 (1)-(3), *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2778*/cpzDB04 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2779*/cpzDB04 (1)-(3) isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert.

#### 3.2.3.1 Deletion von *sco2779*

Der erste Schritt im Katabolismus von Leucin und Isovalerat, der durch das identifizierte *liu*-Cluster katalysiert werden könnte, ist die Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA (Abbildung 19). Für diese Reaktion könnte die mutmaßliche Isovaleryl-CoA Dehydrogenase Sco2779 verantwortlich sein.



**Abbildung 19:** Vermutete Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA durch die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase Sco2779.

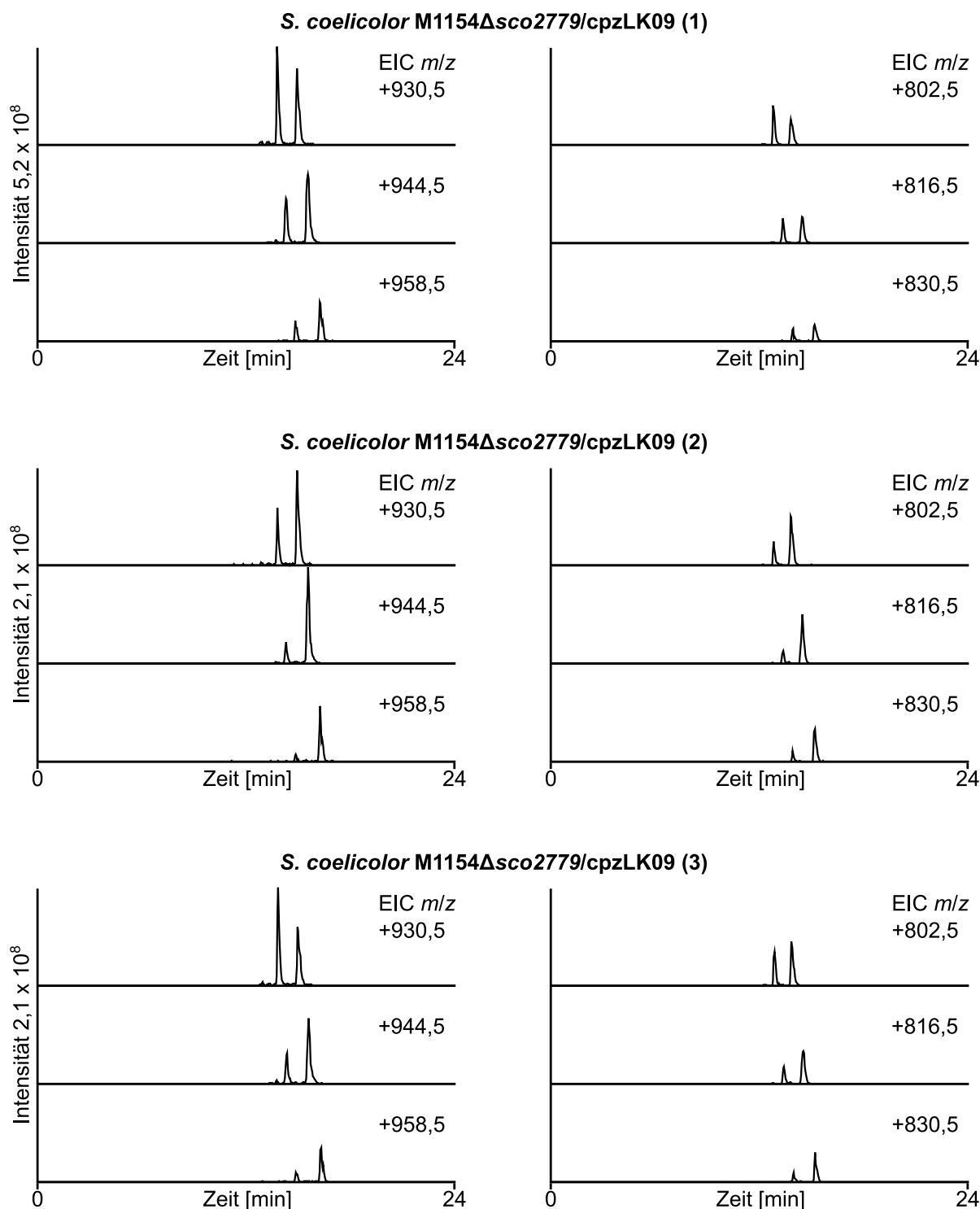
Die entsprechenden Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2779*/cpzLK09 (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm weiterhin Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 20). Da in diesen Mutanten der Biosyntheseweg für 3-Methylglutaryl-CoA über Cpz5 nach wie vor aktiv ist, war dieses Ergebnis zu erwarten. Die Massen der Hydroxyacylcaprazole konnten ebenfalls detektiert werden,

ebenso die Fragmente der entsprechenden sulfatierten Derivate. Überraschenderweise zeigten auch die Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2779/cpzDB04 (1)-(3) im extrahierten Ionenchromatogramm nach wie vor Signale für die Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 21). Wie in Kapitel 3.2.2 jedoch gezeigt werden konnte, brachte eine Deletion des gesamten *liu*-Clusters in Verbindung mit einer Deletion von *cpz5* die Produktion der Caprazamycin-Aglycone zum Erliegen. Es stellte sich daher die Frage, ob Sco2779 und dessen vermutetes Produkt 3-Methylcrotonyl-CoA, tatsächlich Teil der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA über den Liu-Weg ist.

### 3.2.3.2 Fütterung von (1-<sup>13</sup>C)-3-Methylcrotonyl-SNAc

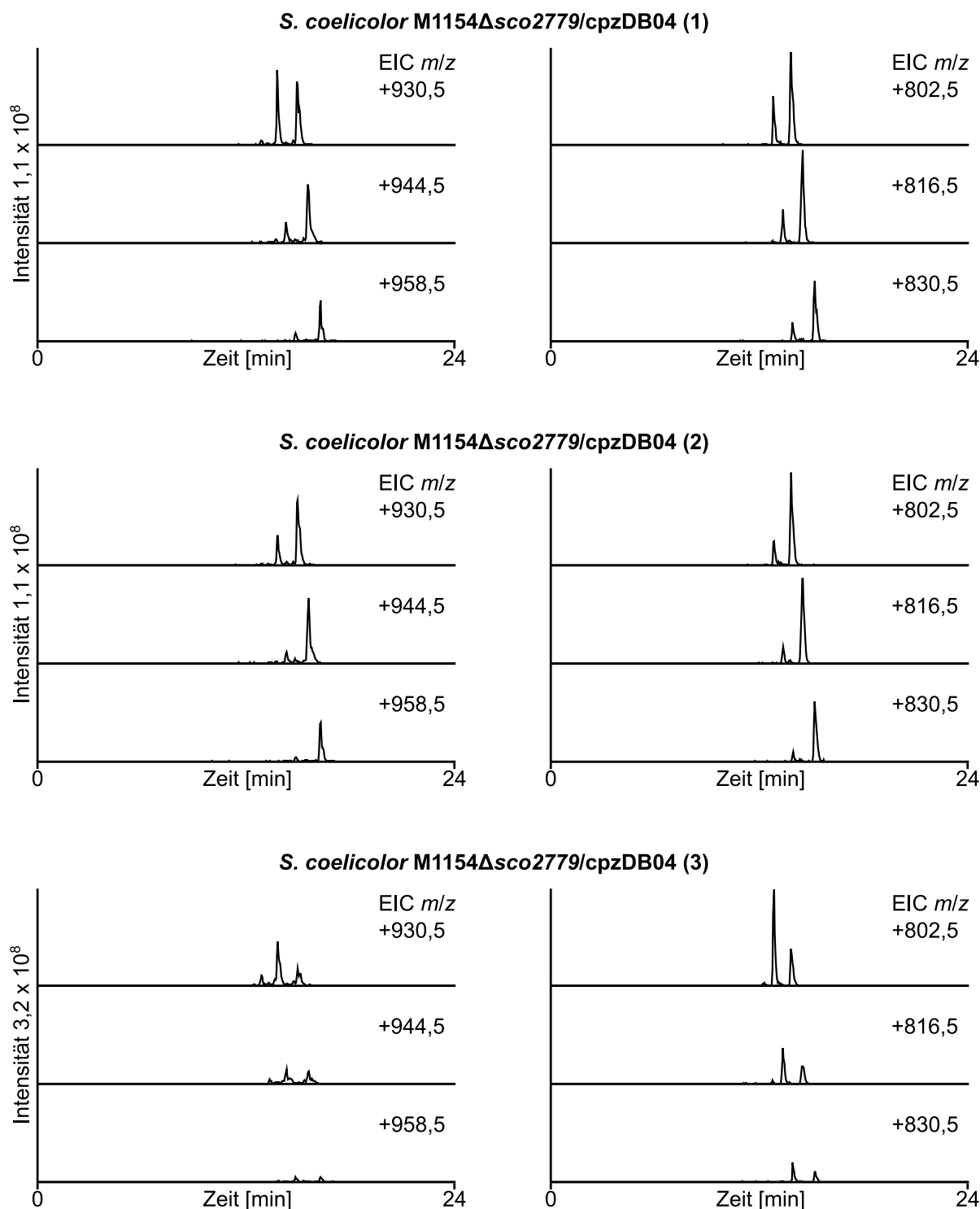
Im nächsten Schritt sollte daher herausgefunden werden, ob 3-Methylcrotonyl-CoA als mögliches Produkt von Sco2779 ein Intermediat in der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA darstellt und folglich in die Caprazamycin-Aglycone eingebaut wird. Hierzu wurde (1-<sup>13</sup>C)-3-Methylcrotonyl-SNAc synthetisiert und dem Medium einer Kultivierung der Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1) zugegeben. Der Extrakt dieser Kultivierung zeigte in der LCMS-Analyse, im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz von (1-<sup>13</sup>C)-3-Methylcrotonyl-SNAc, eine Veränderung der Isotopenverteilung der Caprazamycin-Aglycone in Richtung höherer Massen (Abbildung 22). Insbesondere die Massen +1 und +2 zeigten einen deutlichen Anstieg der Intensitäten. Dies deutete darauf hin, dass das isotopenmarkierte Substrat tatsächlich zu 3-Methylglutaryl-CoA umgewandelt und anschließend in die Caprazamycin-Aglycone eingebaut wurde.

## Ergebnisse



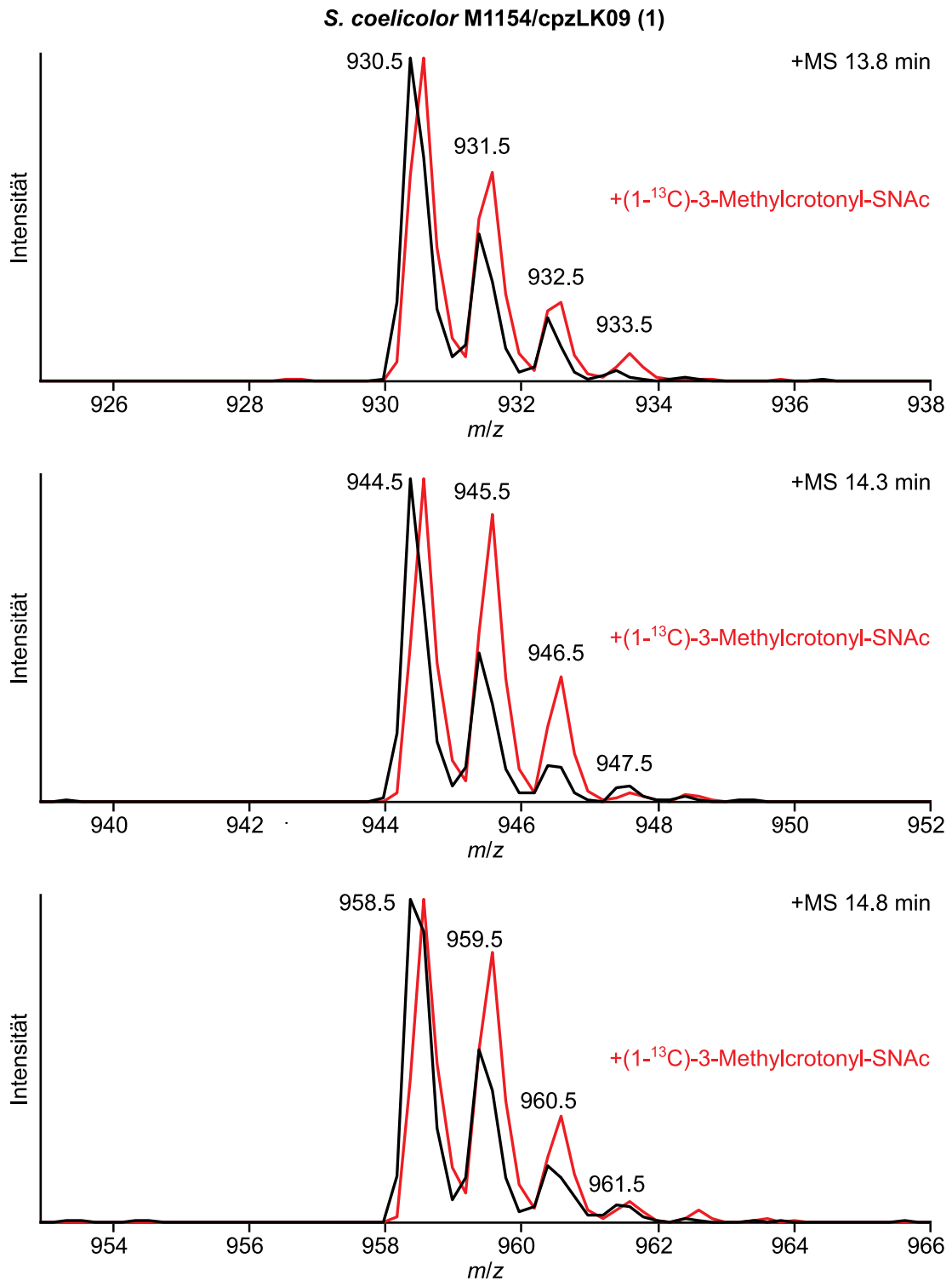
**Abbildung 20:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2779/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 21:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2779/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 22:** Massenspektren der Extrakte von *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1) mit Zusatz von  $(1-^{13}\text{C})\text{-3-Methylcrotonyl-SNAc}$  im Kulturmedium (rot) und ohne entsprechenden Zusatz (schwarz). Gezeigt sind die Isotopenverteilungen der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bei  $R_t$  14,8 min).

### 3.2.3.3 Identifikation und Deletion der Acyl-CoA Dehydrogenase *sco2774*

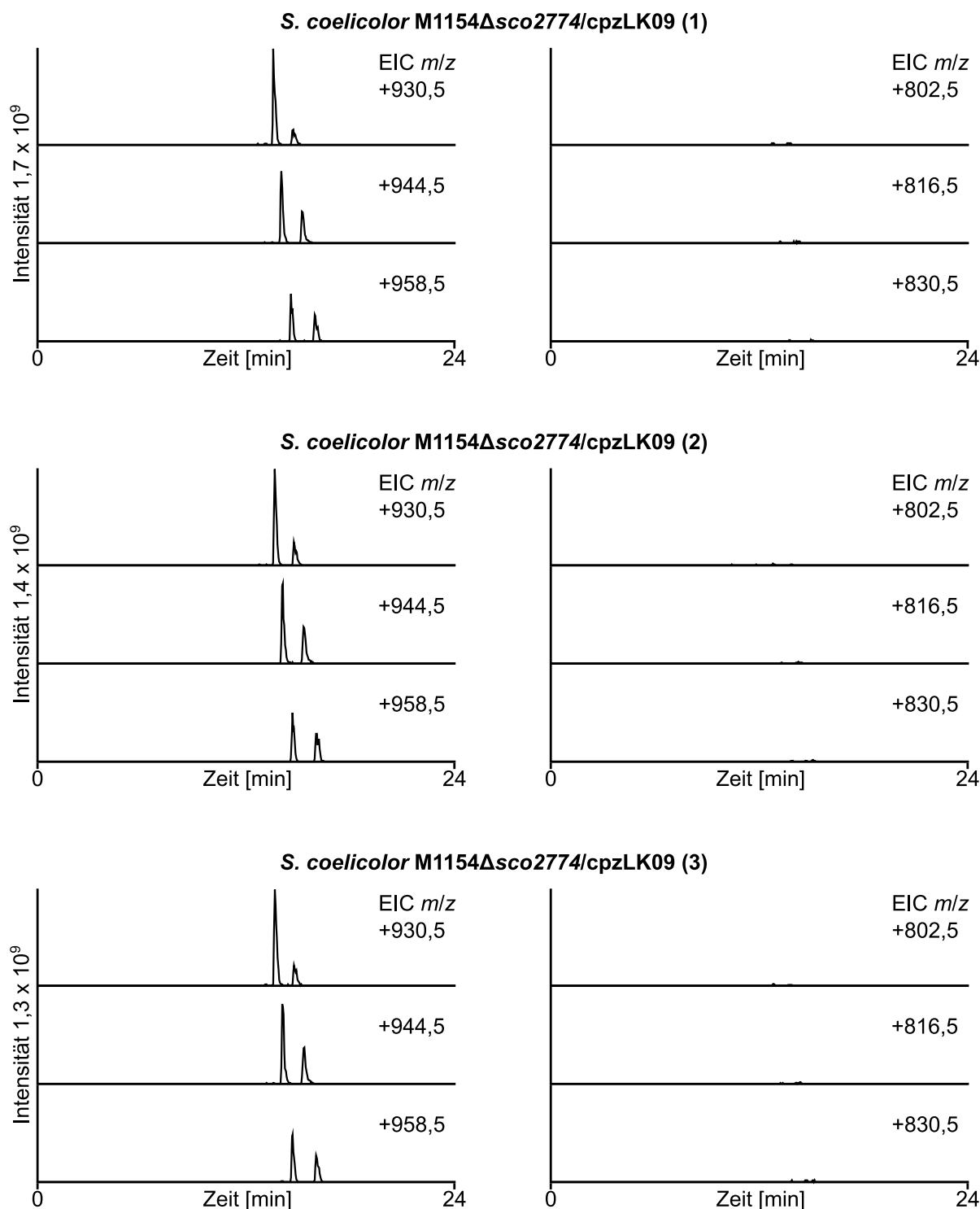
Der Einbau von (1-<sup>13</sup>C)-3-Methylcrotonyl-SNAc in die Caprazamycin-Aglycone deutete stark darauf hin, dass 3-Methylcrotonyl-CoA als natürliches Intermediat des Liu-Weges eine Rolle in der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA spielt. Eine Gendeletion der Dehydrogenase *sco2779* führte jedoch nicht zu einer Termination der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen. Aus diesen Beobachtungen konnten zwei mögliche Erklärungen abgeleitet werden: Entweder ist *Sco2779* nicht am Liu-Weg beteiligt oder der heterologe Host verfügt über Isoenzyme, die die Umwandlung von 3-Methylcrotonyl-CoA ebenfalls katalysieren können. Um diesen Vermutungen nachzugehen, wurde zunächst die StrepDB-Datenbank nach Enzymen durchsucht, die als Acyl-CoA Dehydrogenase annotiert waren (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Diese Suche lieferte 38 Ergebnisse. Außerdem wurde in der BioCyc-Datenbank nach Enzymen gesucht, die die Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA katalysieren könnten. Neben *Sco2779* wurden hierbei *Sco1428*, *Sco1701*, *Sco2774*, *Sco6767* und *Sco6469* als weitere Kandidaten identifiziert. Abschließend wurde eine *BLASTx*-Analyse mit *sco2779* als Sequenz-Vorlage durchgeführt, welche 23 homologe Enzyme mit einer Identität von etwa 20-40 % lieferte.

Die Homologie allein konnte auf Grund der großen Anzahl gefundener Enzyme nicht als Kriterium zur Eingrenzung der möglichen Kandidaten herangezogen werden. Mit dem vermutlich für eine Acyl-CoA Dehydrogenase codierenden *sco2774* wurde jedoch ein Gen identifiziert, das sowohl direkt neben dem Regulator des *liu*-Clusters lokalisiert als auch in dieselbe Richtung orientiert ist. Dies könnte bedeuten, dass *sco2774* ebenfalls Teil des *liu*-Clusters ist und unter der Kontrolle des mutmaßlichen *liu*-Regulators *sco2775* steht.

Um herauszufinden, ob *sco2774* am Liu-Weg beteiligt ist, wurden Mutanten von *S. coelicolor* M1154 wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben generiert, die entweder eine Einzeldelation von *sco2774* oder eine Doppeldelation von *sco2774* und *sco2779* trugen. In diese Mutanten wurde entweder *cpzLK09* mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder *cpzDB04* mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154Δ*sco2774*/*cpzLK09* (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154Δ*sco2774*/*cpzDB04* (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154Δ*sco2774*Δ*sco2779*/*cpzLK09* (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154Δ*sco2774*Δ*sco2779*/*cpzDB04* (1)-(3) isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert.

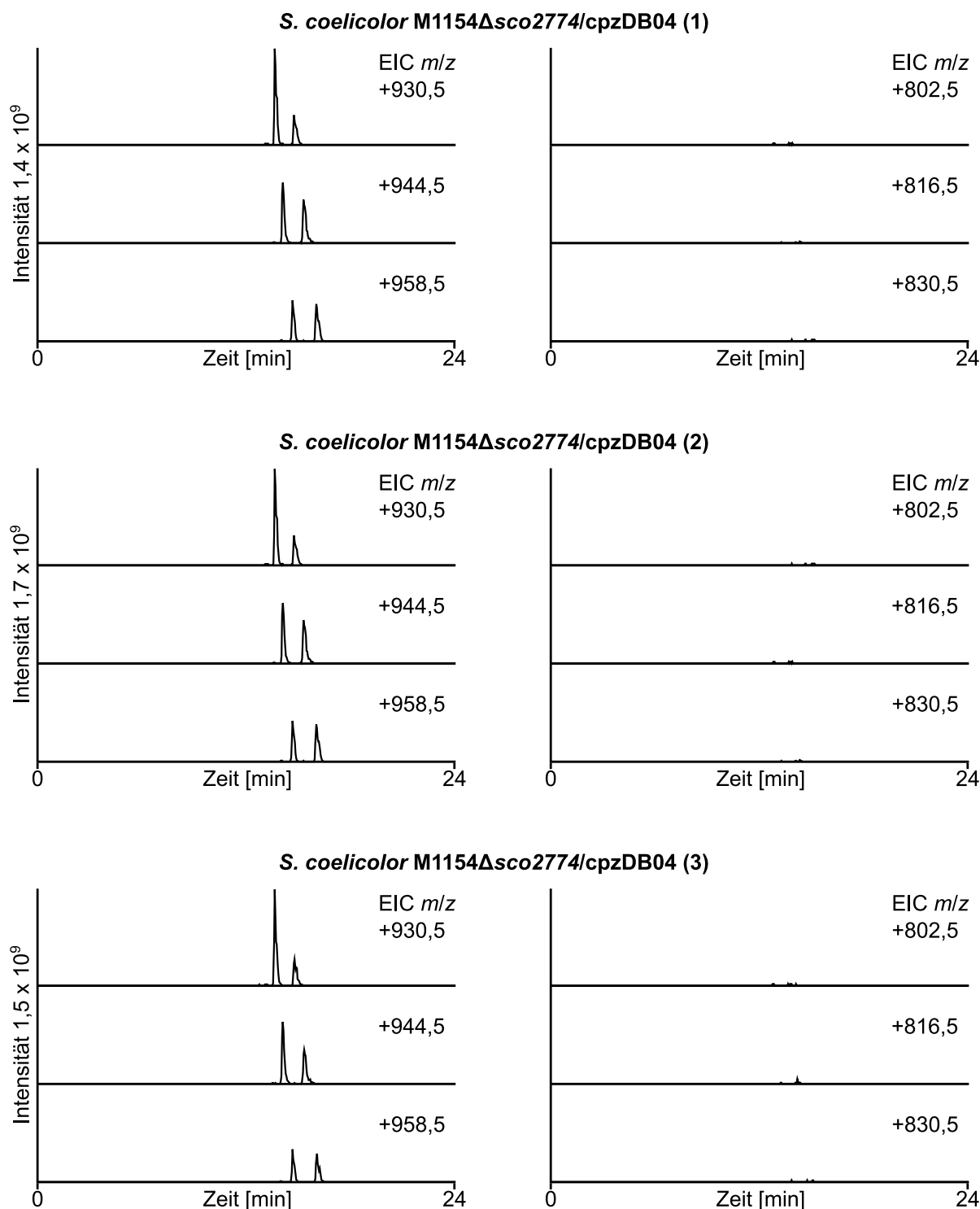
Wie erwartet war in jenen Mutanten, die das kompletten Caprazamycin-Gencluster trugen, die Biosynthese der Caprazamycin-Aglycone nicht beeinträchtigt (Abbildung 23 und Abbildung 25). Auch eine singuläre Deletion von *sco2774* in Verbindung mit einer Deletion von *cpz5* führte nicht zu einer Termination der Biosynthese der Aglycone (Abbildung 24). Im Gegensatz hierzu konnte durch die gleichzeitige Deletion von *sco2774* und *sco2779* in Verbindung mit einer Deletion von *cpz5* erreicht werden, dass Hydroxyacylcaprazole anstelle der Caprazamycin-Aglycone akkumulierten (Abbildung 26). Auch die Fragmente der entsprechenden sulfatierten Derivate konnten in allen Analysen in geringeren Mengen detektiert werden. Folglich sind sowohl *sco2774* als auch *sco2779* in der Lage, Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA umzusetzen. Das *liu*-Cluster in *S. coelicolor* M1154 kann auf Grund dieser Ergebnisse um *sco2774* erweitert werden und erstreckt sich von *sco2774* bis *sco2779* (Abbildung 14). Eine erneute Betrachtung des Genoms von *S. sp.* MK730-62F2 zeigte, dass auch dieser Stamm eine zweite Acyl-CoA Dehydrogenase mit identischer Anordnung auf dem *liu*-Cluster besitzt. Eine Wiederholung der bioinformatischen Analyse mittels cblaster und *sco2774-sco2779* als Vorlage-Sequenz konnte zeigen, dass etwa 48,2 % der betrachteten *Streptomyces* Stämme ebenfalls ein *liu*-Cluster mit zwei Acyl-CoA Dehydrogenasen besitzen (Abbildung 15 B). Dies deutet darauf hin, dass der Aufbau des *liu*-Clusters aus sechs Genen, wie in dieser Arbeit für *S. coelicolor* M1154 gezeigt, insbesondere innerhalb der Gattung *Streptomyces* weit verbreitet ist.

## Ergebnisse



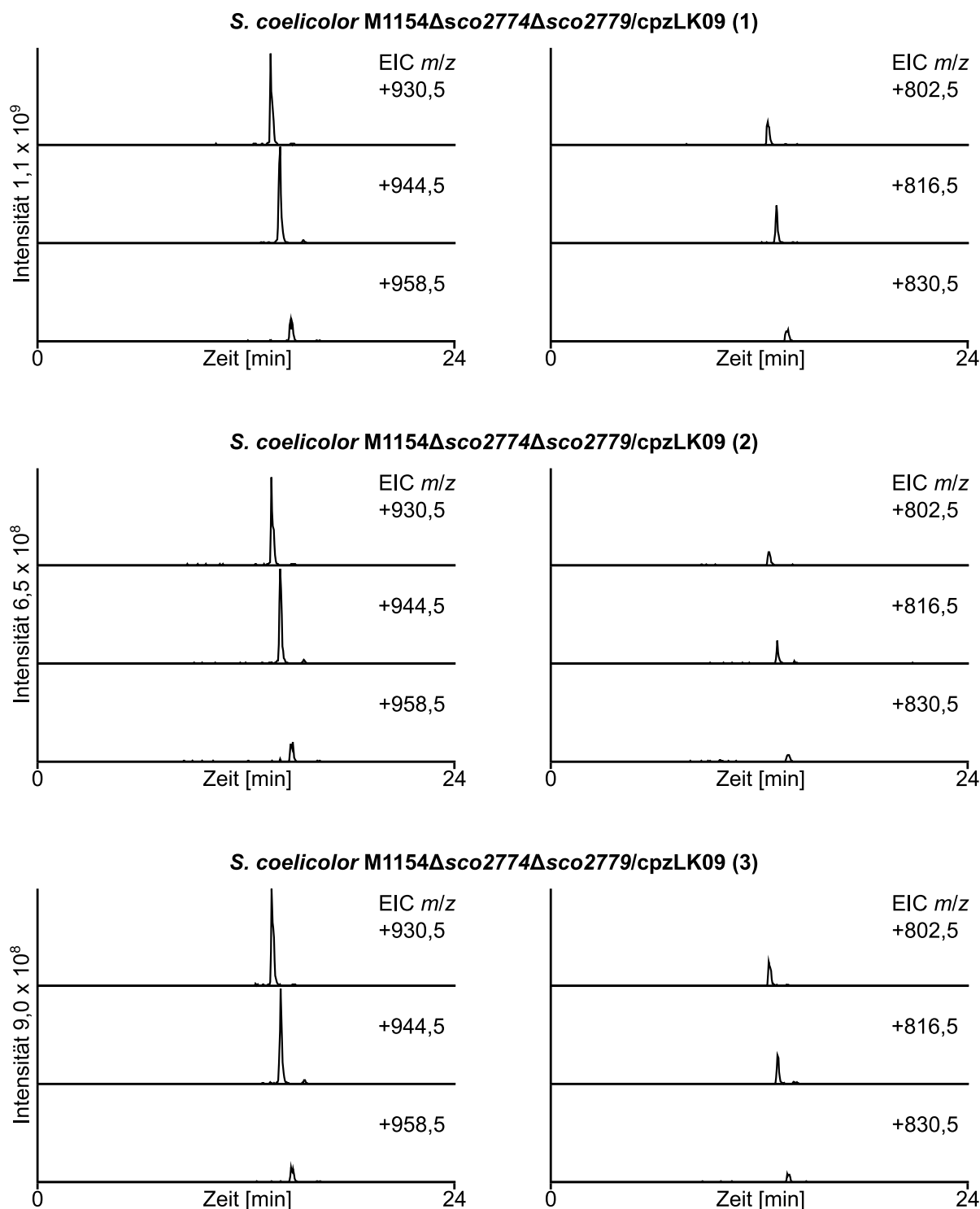
**Abbildung 23:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2774/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt.

## Ergebnisse



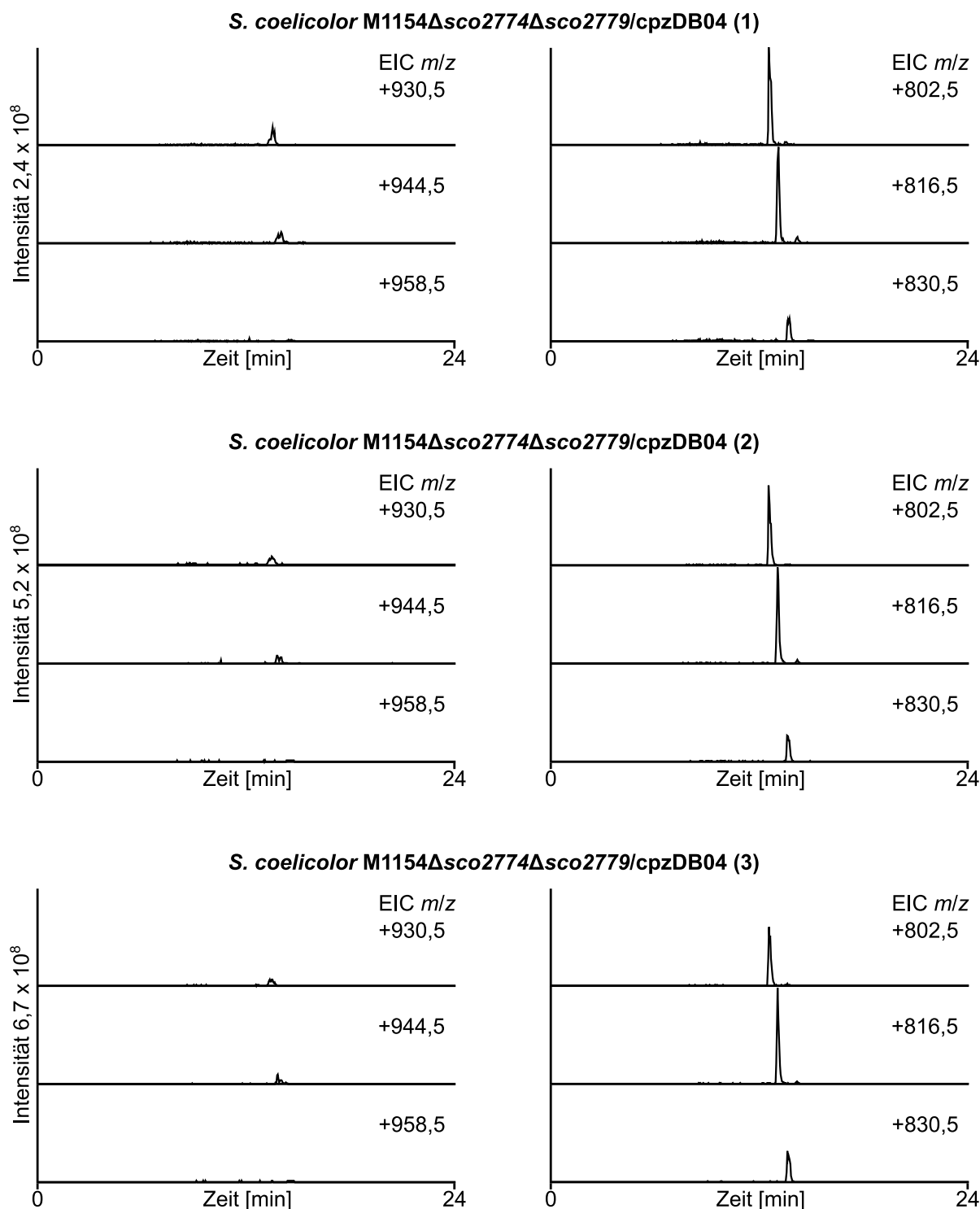
**Abbildung 24:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2774/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 25:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2774 $\Delta$ sco2779/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

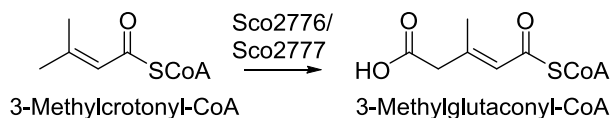
## Ergebnisse



**Abbildung 26:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2774 $\Delta$ sco2779/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

### 3.2.3.4 Deletionen von *sco2776* und *sco2777*

Die Produkte der Gene *sco2776* und *sco2777* bilden mutmaßlich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten einer 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase. Dieser Komplex überträgt im Rahmen einer Carboxylierung  $\text{CO}_2$  auf 3-Methylcrotonyl-CoA und bildet hierdurch 3-Methylglutaconyl-CoA (Abbildung 27) [111].

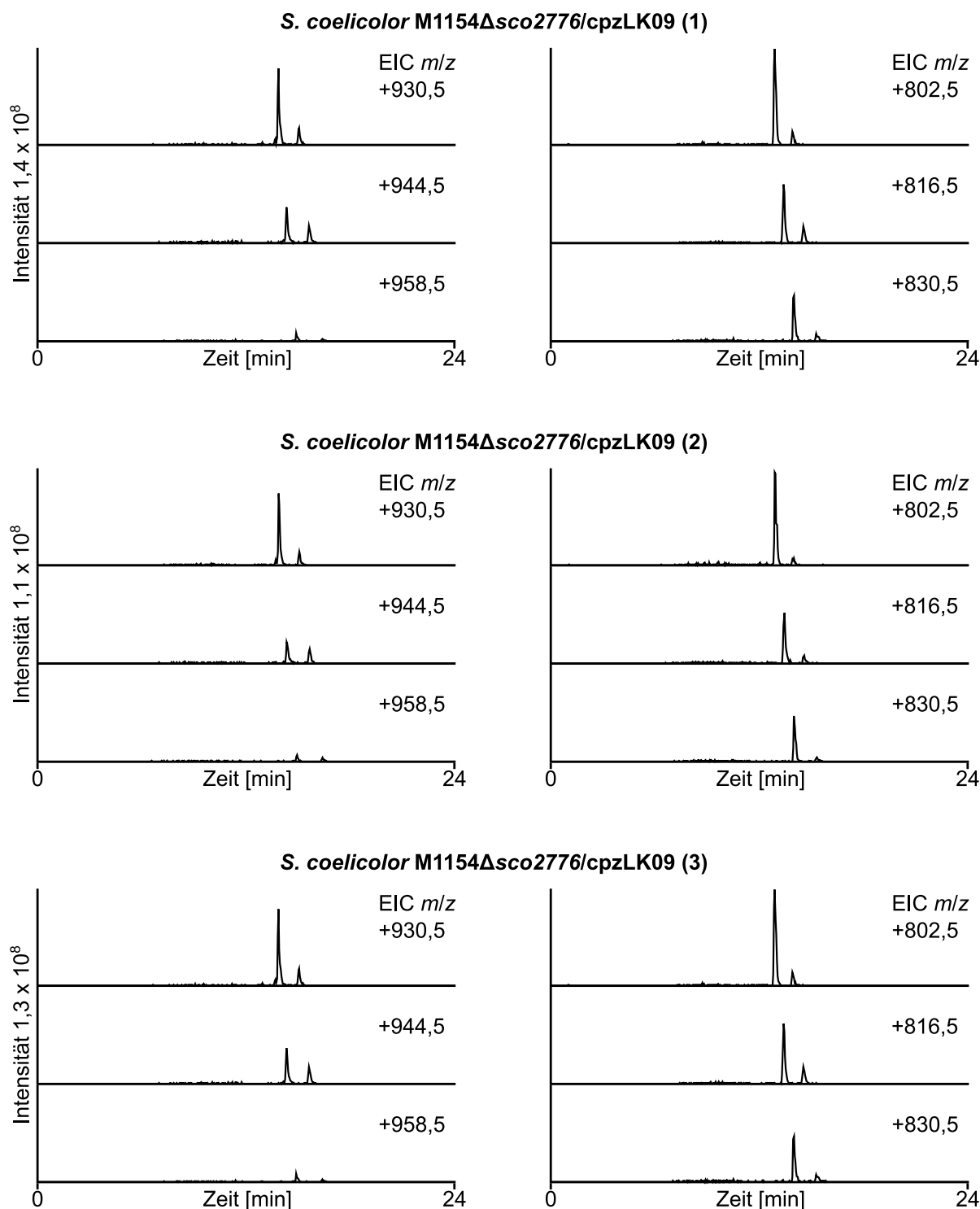


**Abbildung 27:** Vermutete Biosynthese von 3-Methylglutaconyl-CoA aus 3-Methylcrotonyl-CoA durch die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Sco2776/Sco2777.

Um herauszufinden, ob *sco2776* und *sco2777* für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA benötigt werden, wurden Mutanten von *S. coelicolor* M1154 wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben generiert, die Einzeldelationen von *sco2776* oder *sco2777* trugen. In diese Mutanten wurde entweder cpzLK09 mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder cpzDB04 mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzLK09 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzDB04 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzLK09 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzDB04 (1)-(3) isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert.

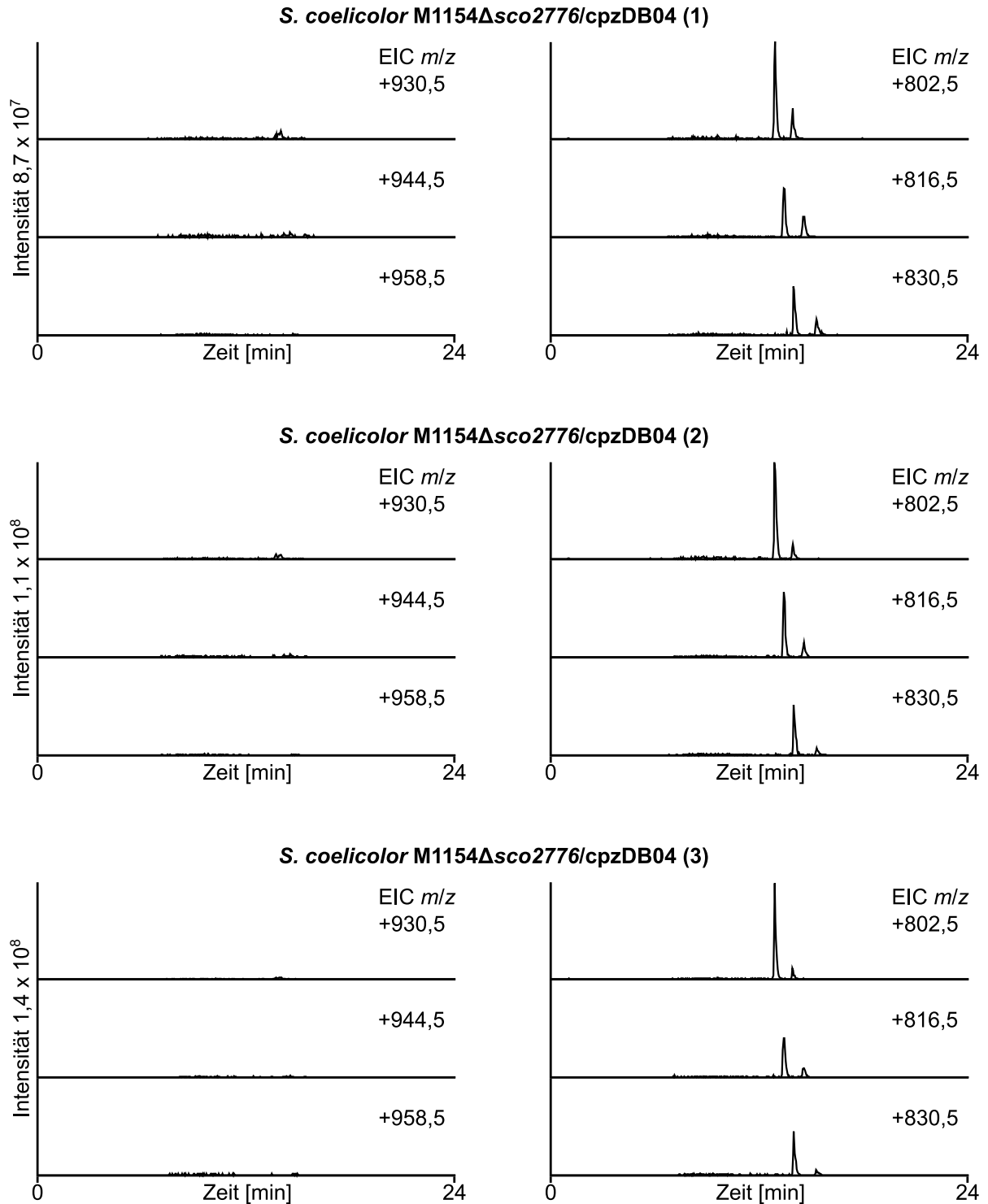
Die Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzLK09 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzLK09 (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm wie erwartet weiterhin Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 28 und Abbildung 30). Die entsprechenden Massen der Hydroxyacylcaprazole konnten ebenfalls detektiert werden. Im Gegensatz hierzu führte eine zusätzliche Gendeletion von *cpz5* in Kombination mit einer Deletion von *sco2776* oder *sco2777* zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen in den entsprechenden Extrakten von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776*/cpzDB04 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2777*/cpzDB04 (1)-(3) (Abbildung 29 und Abbildung 31). Auch die Fragmente der entsprechenden sulfatierten Derivate konnten in allen Analysen in geringeren Mengen detektiert werden.

## Ergebnisse



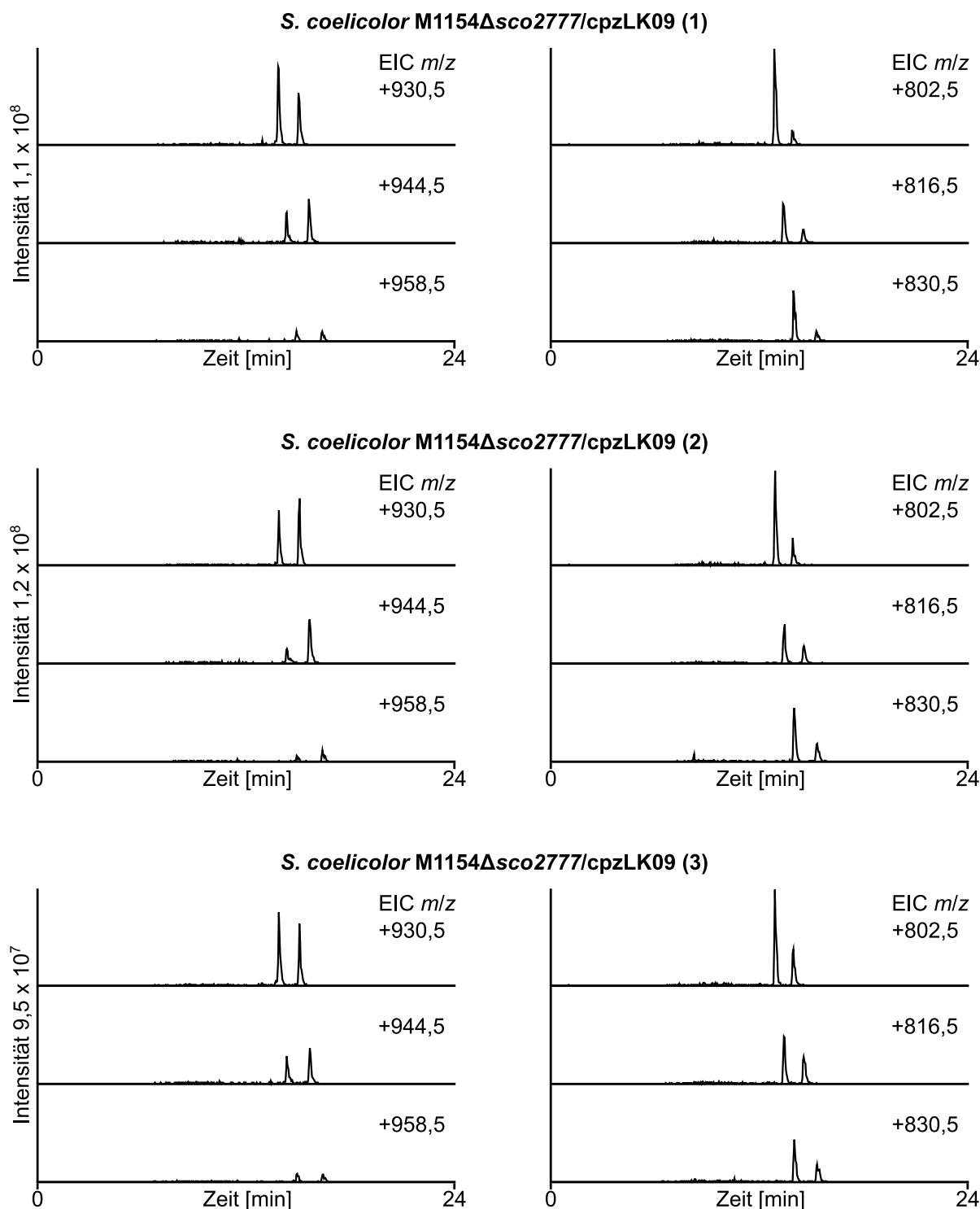
**Abbildung 28:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2776/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



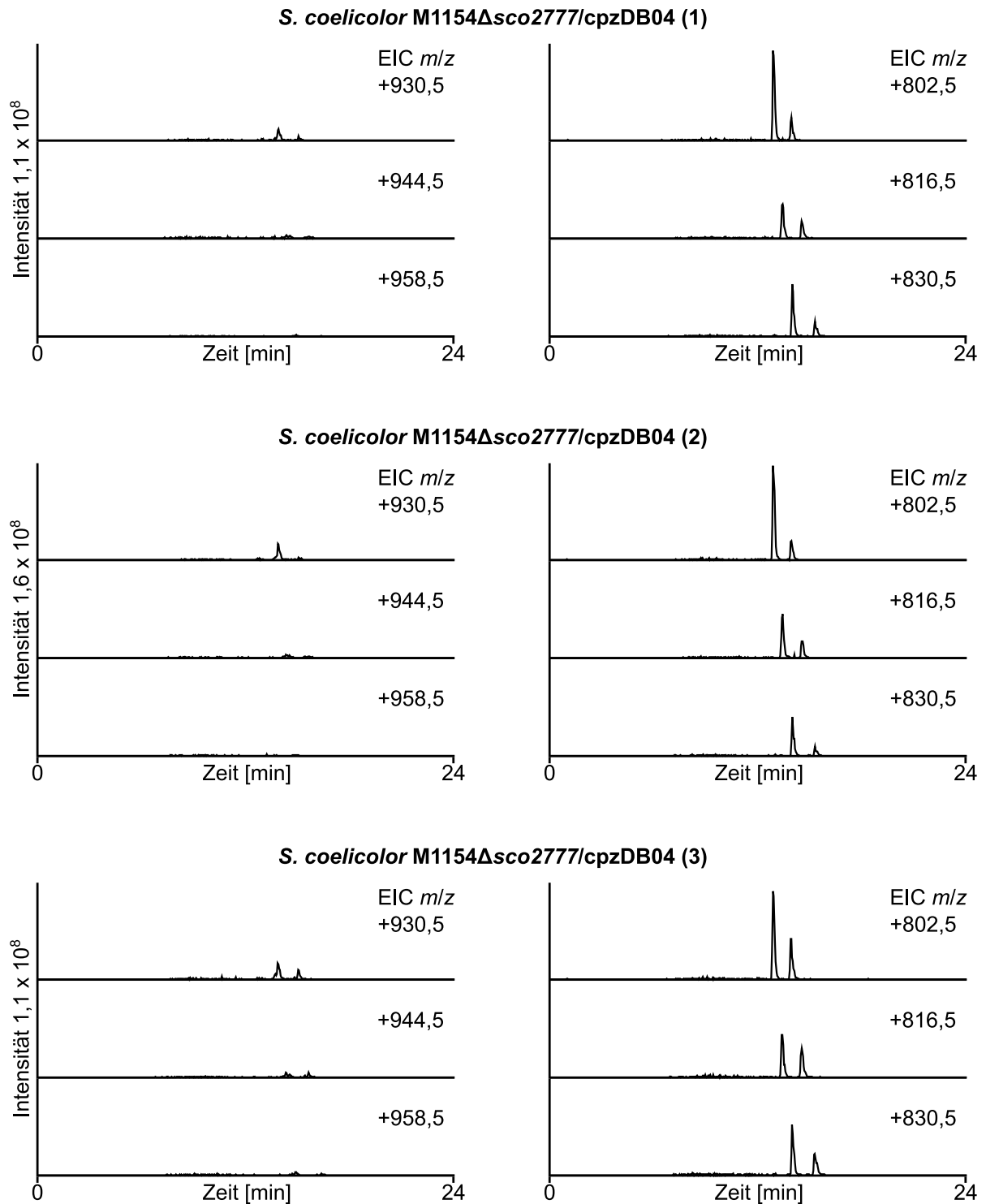
**Abbildung 29:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 30:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2777/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse

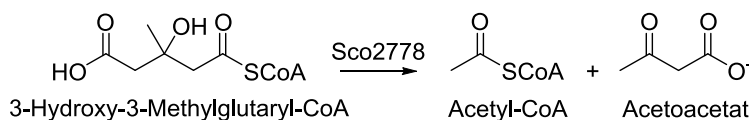


**Abbildung 31:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass 3-Methylglutaryl-CoA über den Liu-Weg nicht direkt aus Isovaleryl-CoA oder 3-Methylcrotonyl-CoA entsteht, sondern aus einem späteren Intermediat biosynthetisiert werden muss. Hierfür kommen 3-Methylglutaconyl-CoA als Produkt von Sco2776/Sco2777, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA, Acetyl-CoA und Acetoacetat infrage.

### 3.2.3.5 Deletion von *sco2778*

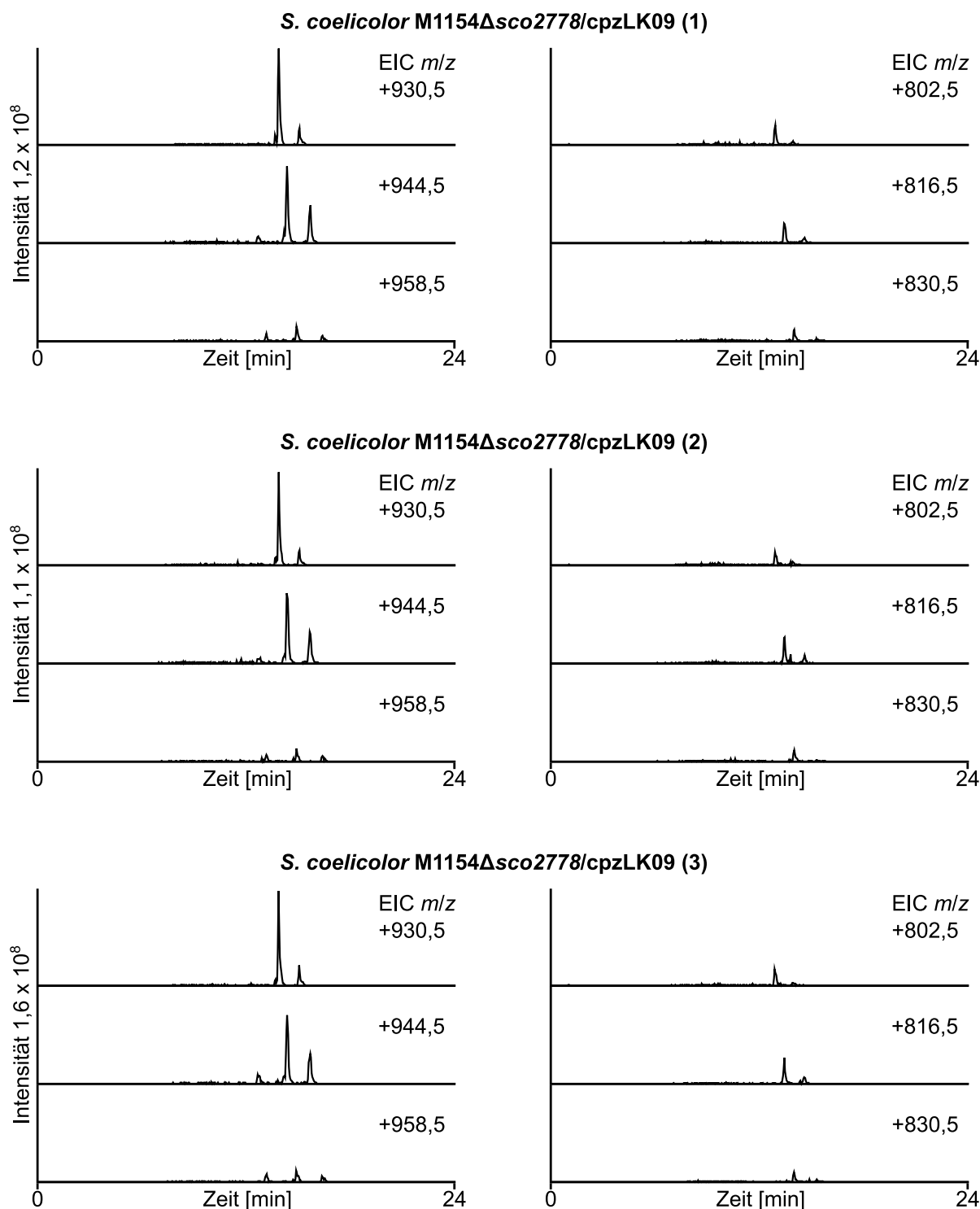
Das Gen *sco2778* codiert für eine mutmaßliche 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase. Die Funktion dieses Proteins im Rahmen des Liu-Weges ist die Spaltung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu Acetyl-CoA und Acetoacetat (Abbildung 32). Diese Reaktion bildet gleichzeitig den letzten Schritt im Katabolismus von Leucin und Isovalerat im Rahmen des Liu-Weges.



**Abbildung 32:** Vermutete Biosynthese von Acetyl-CoA und Acetoacetat aus 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase Sco2778.

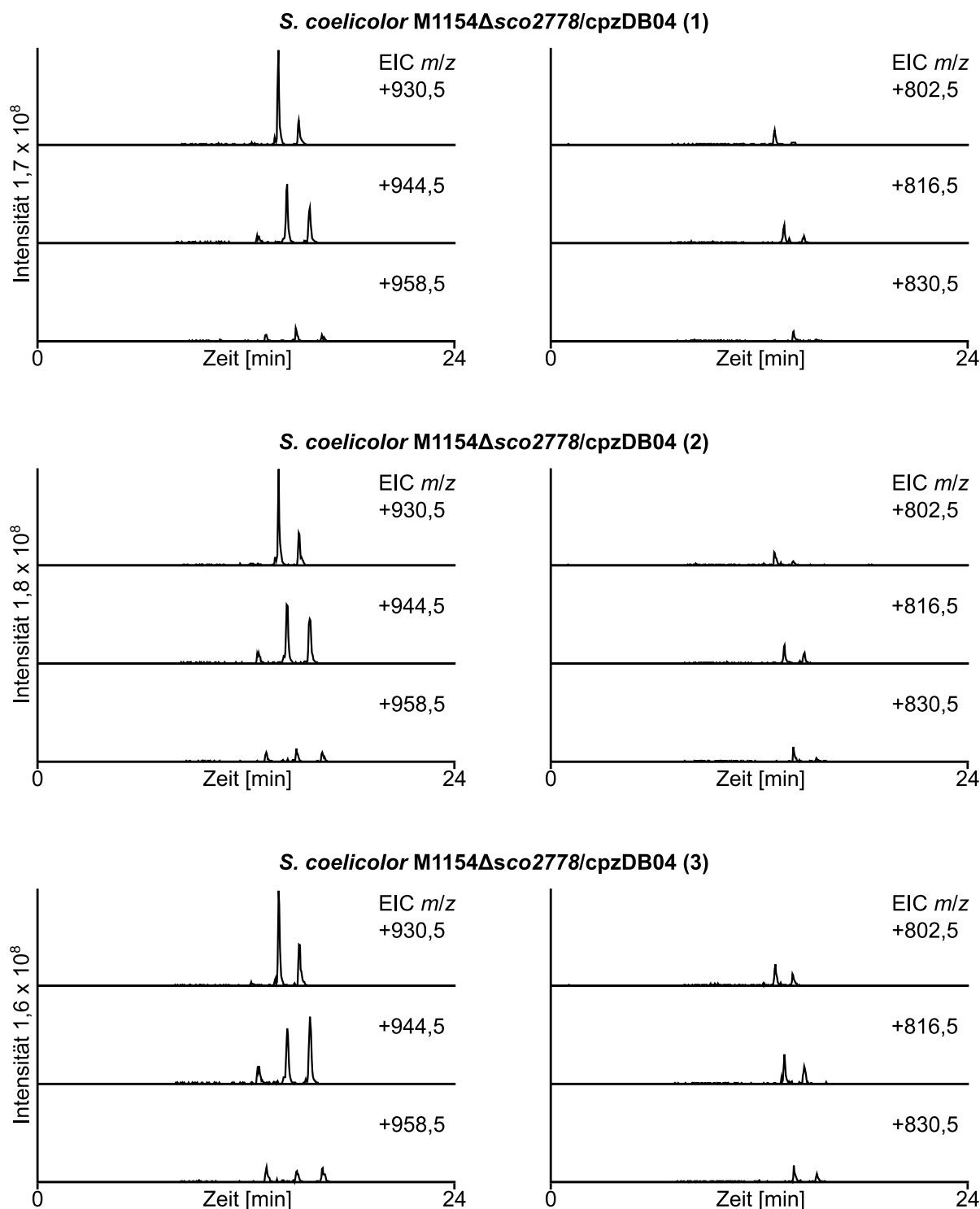
Um herauszufinden, ob *sco2778* für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA benötigt wird, wurden Mutanten von *S. coelicolor* M1154 wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben generiert, die eine Einzeldelationen dieses Gens trugen. In diese Mutanten wurde entweder cpzLK09 mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder cpzDB04 mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154Δ*sco2778*/cpzLK09 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154Δ*sco2778*/cpzDB04 (1)-(3) isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert. Sowohl die Extrakte von *S. coelicolor* M1154Δ*sco2778*/cpzLK09 (1)-(3) als auch von *S. coelicolor* M1154Δ*sco2778*/cpzDB04 (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone als auch der Hydroxyacylcaprazole (Abbildung 33 und Abbildung 34). Die entsprechenden Fragmente der sulfatierten Derivate waren ebenfalls detektierbar.

## Ergebnisse



**Abbildung 33:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2778/cpzLK09 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 34:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2778/cpzDB04 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Produkte von *Sco2778* nicht direkt zu 3-Methylglutaryl-CoA umgewandelt werden, sondern 3-Methylglutaryl-CoA aus einem früheren Intermediat des Liu-Weges entstehen muss.

### 3.2.4 Komplementierungen der Gendelektionen

Die doppelte Gendelektionen von *sco2774* und *sco2779* sowie die einzelnen Deletionen von *sco2776* und *sco2777*, jeweils in Anwesenheit eines Caprazamycin-Genclusters ohne *cpz5*, führten zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen anstelle der Caprazamycin-Aglycone. Um sicherzustellen, dass die beobachteten Phänotypen auf die Gendelektionen zurückzuführen waren, wurden Komplementierungsexperimente durchgeführt. Für die Gendelektionen von *sco2774* und *sco2779* konnte eine chemische Komplementierung mit 3-Methylcrotonyl-SNAc durchgeführt werden. Für *sco2776* und *sco2777* wurde eine genetische Komplementierung durchgeführt, da 3-Methylglutaconyl-SNAc als Komplementierungssubstanz chemisch nicht darstellbar war.

#### 3.2.4.1 Chemische Komplementierung von *sco2774* und *sco2779*

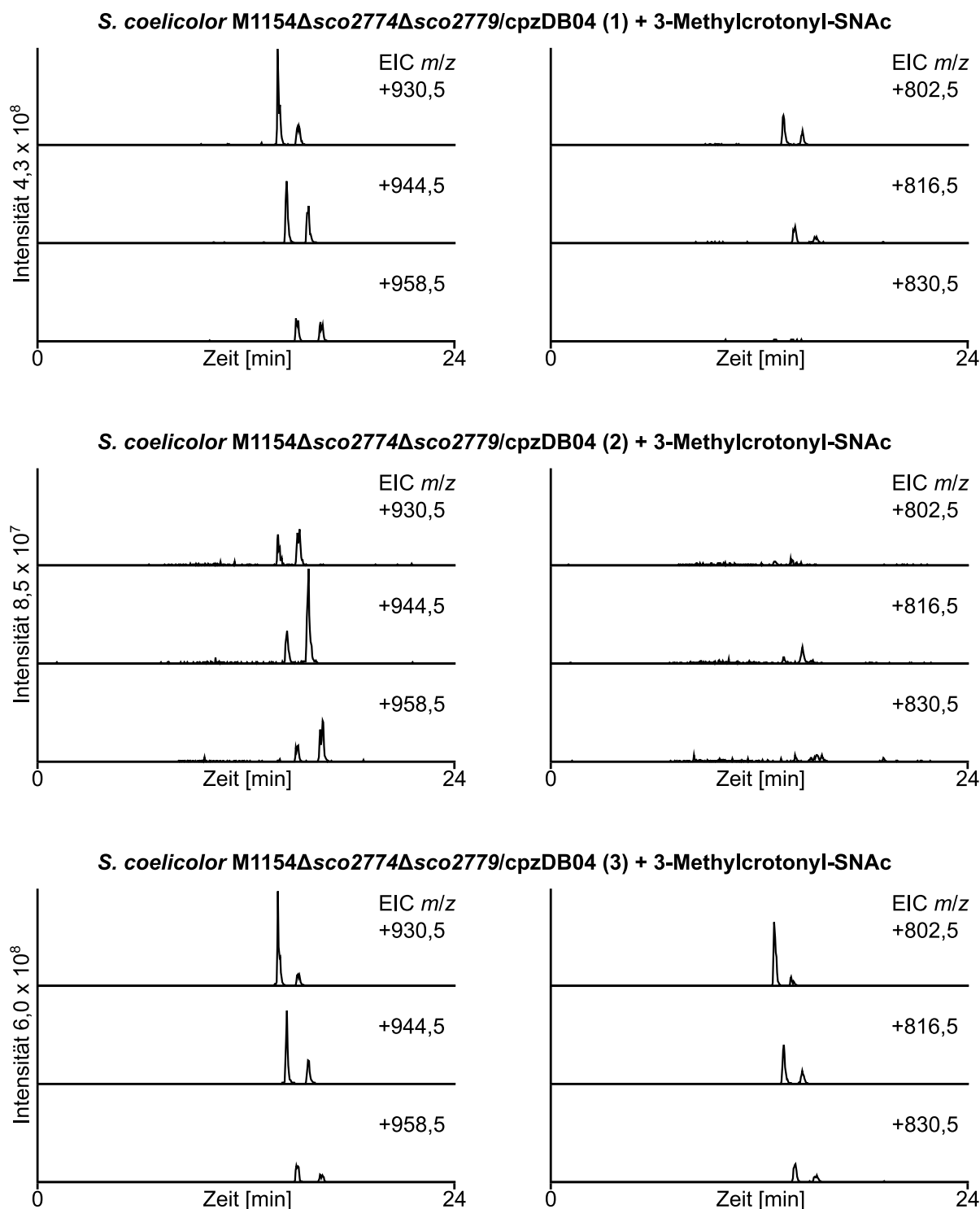
Zur chemischen Komplementierung der Doppeldeletion von *sco2774* und *sco2779* wurde dem Kulturmedium der Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2774* $\Delta$ *sco2779*/cpzDB04 (1)-(3) 3-Methylcrotonyl-SNAc in einer Endkonzentration von 0,8 mM zugesetzt. Die entsprechenden Extrakte zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm eine Wiederherstellung der Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone sowie der Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 35). Dieses Experiment bestätigte, dass *sco2774* und *sco2779* für die Biosynthese von 3-Methylcrotonyl-CoA verantwortlich sind und dieses für die Bereitstellung von 3-Methylcrotonyl-CoA benötigt wird.

#### 3.2.4.2 Genetische Komplementierung von *sco2776* und *sco2777*

Zur genetischen Komplementierung von *sco2776* und *sco2777* wurden die Gene unter Verwendung der Schnittstellen HindIII und SpeI jeweils in den pUWL-apra-oriT-Vektor kloniert. Hierdurch standen beide Gene unter der Kontrolle des konstitutiven *ermE*\*-

Promotors. Die korrekte Ligation der Plasmide pDB12 und pDB13 wurde durch Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkte bestätigt. Anschließend wurden die Plasmide mittels triparentaler Konjugation in *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776/cpzDB04 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB04 (1)-(3) eingebracht. Zur Verifizierung der resultierenden Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776/cpzDB04/pDB12 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB04/pDB13 (1)-(3) wurden die Plasmide zunächst aus diesen Mutanten isoliert und anschließend durch PCR nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde der Leervektor analog in die oben genannten Mutanten eingebracht. Die Extrakte der Kultivierung dieser Mutanten zeigten, dass die Produktion der Caprazamycin-Aglycone durch die genetische Komplementierung wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 36 und Abbildung 37). Die entsprechenden Extrakte zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm wieder Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone sowie der Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone. Die Mutanten mit Leervektor akkumulierten hingegen weiterhin die Hydroxyacylcaprazole. Diese genetischen Komplementierungen konnten bestätigen, dass *sco2776* und *sco2777* ebenfalls für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA über den Liu-Weg benötigt werden.

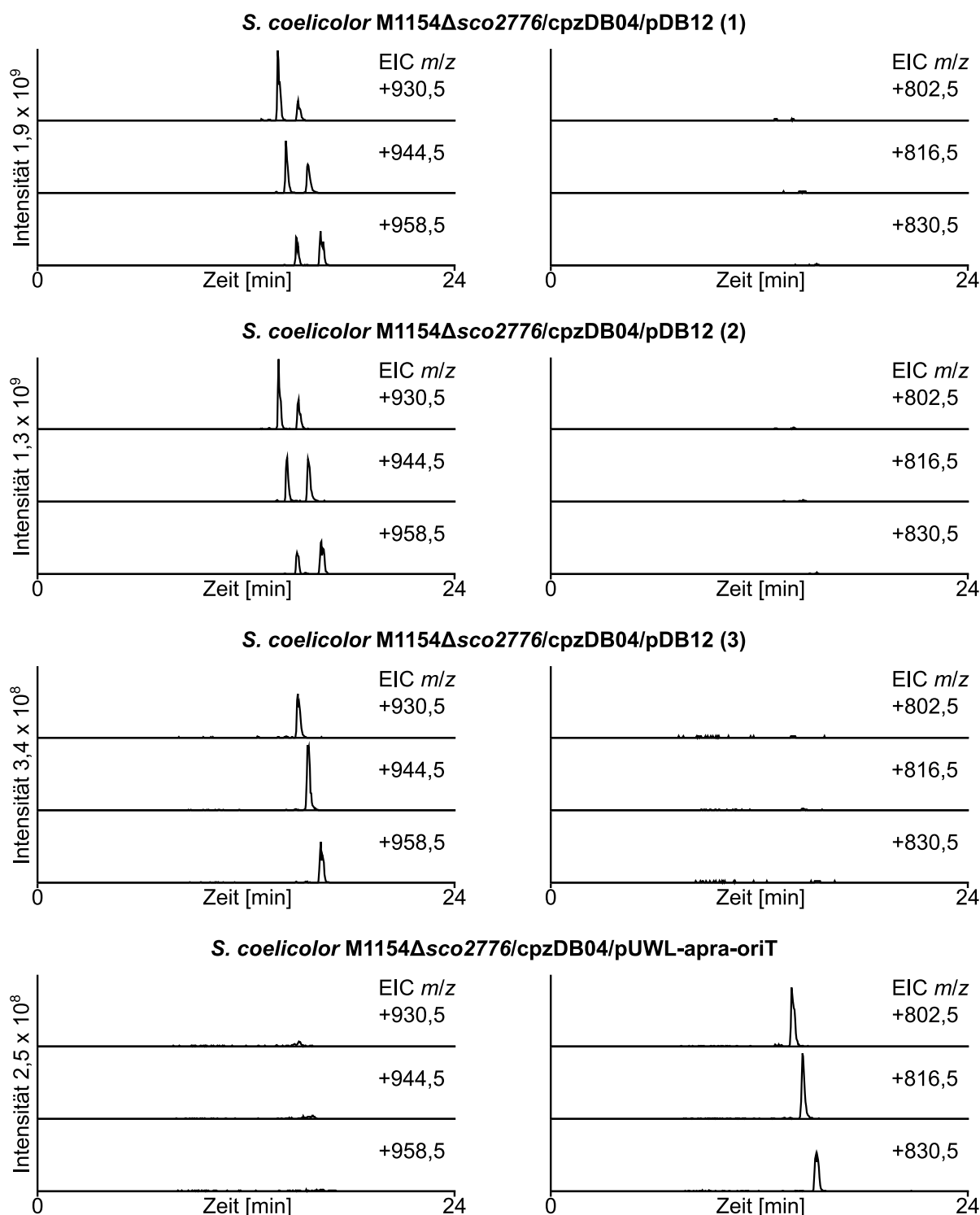
## Ergebnisse



**Abbildung 35:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2774 $\Delta$ sco2779/cpzDB04 (1)-(3) mit Zusatz von 3-Methylcrotonyl-SNAc im Kulturmedium. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min)

## Ergebnisse

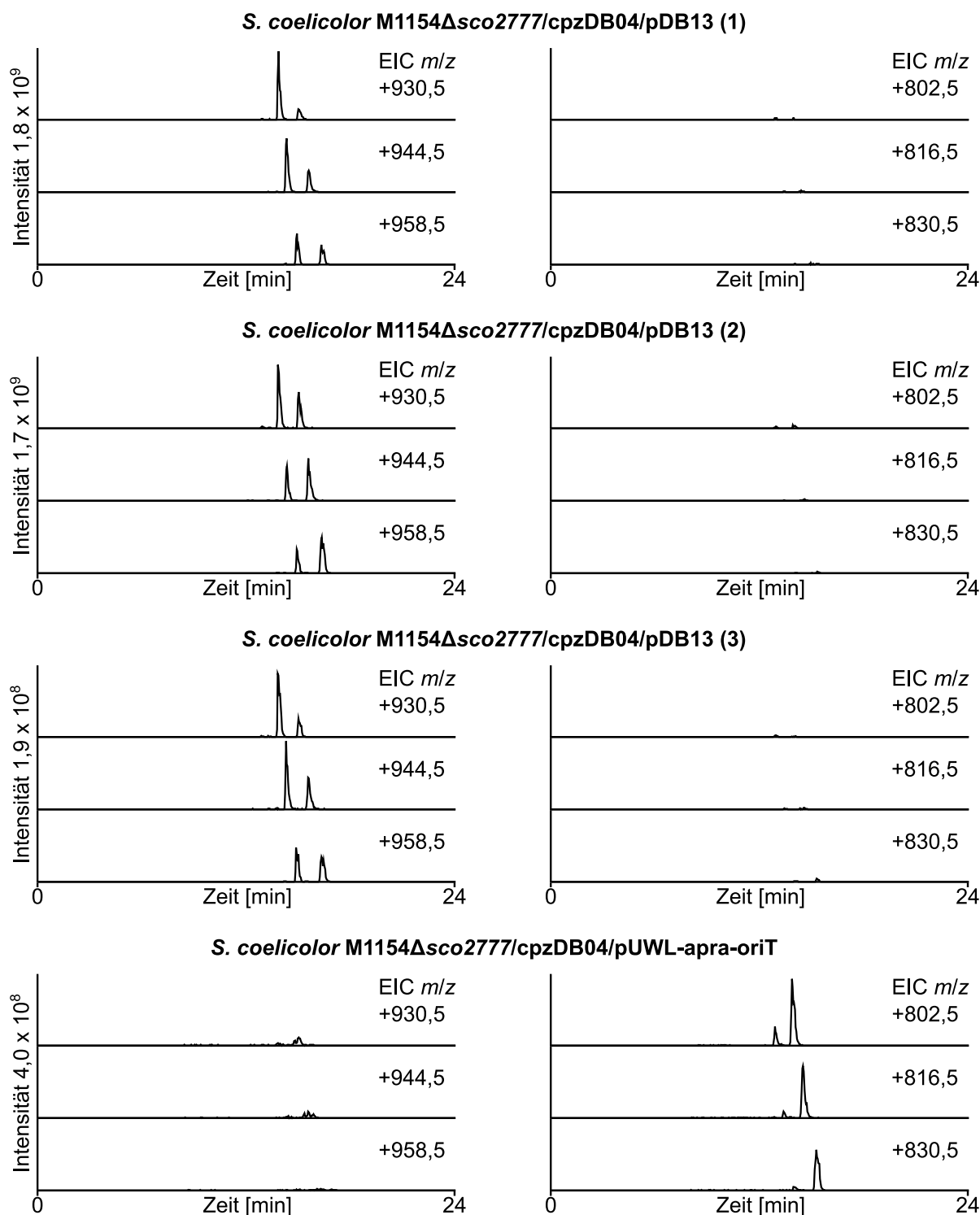
dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.



**Abbildung 36:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154Δsco2776/cpzDB04/pDB12 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154Δsco2776/cpzDB04/pUWL-apra-oriT. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch

## Ergebnisse

die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

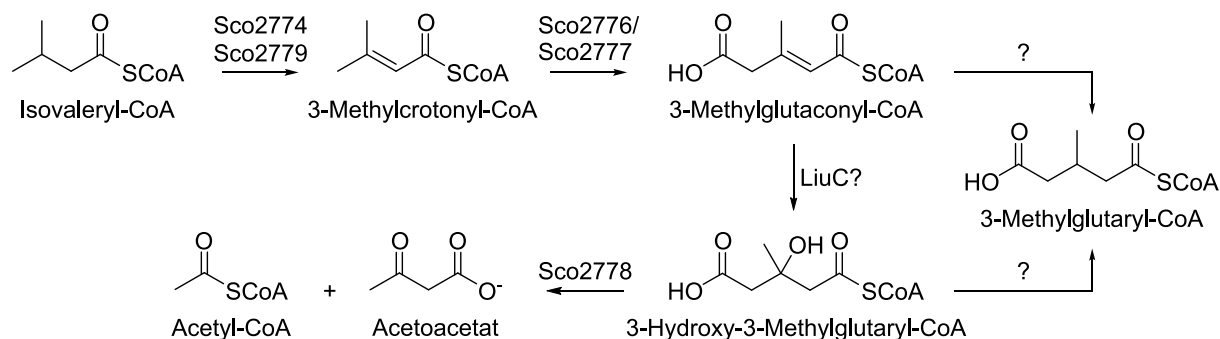


**Abbildung 37:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB04/pDB13 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB04/pUWL-apra-oriT. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-

Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

### 3.2.5 Zusammenfassung der *liu*-Gencluster Experimente

In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte der Primärmetabolismus des heterologen Caprazamycin-Produzenten *S. coelicolor* M1154 als eine Quelle für 3-Methylglutaryl-CoA nachgewiesen werden. Zunächst wurde ein entsprechendes Gencluster, das für den Abbau von Leucin und Isovalerat verantwortlich ist und aus den Genen *sco2774-sco2779* besteht, identifiziert werden. Dieses Cluster codiert mit *sco2774* und *sco2779* für zwei Acyl-CoA Dehydrogenasen, die Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA umwandeln. Innerhalb der *Actinobacteria* konnte ein *liu*-Cluster mit zwei anstelle von einer Acyl-CoA Dehydrogenase als Besonderheit der Gattung *Streptomyces* identifiziert werden. Etwa 48,2 % dieser untersuchten Gattungen enthielten diesen Aufbau, während es innerhalb der *Actinobacteria* nur etwa 3,9 % waren. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA durch das *liu*-Cluster unabhängig von Cpz5 erfolgen kann. Durch einzelne Gendelektionen konnten die Intermediate, die aus diesem Abbauweg zu 3-Methylglutaryl-CoA umgewandelt werden, auf 3-Methylglutaconyl-CoA oder 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA eingegrenzt werden (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Mögliche Intermediate des Liu-Weges zur Bildung von 3-Methylglutaryl-CoA.

### 3.3 Beteiligung von Genen des Caprazamycin-Genclusters an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA

Die Beteiligung der 3-HMG-CoA Synthase Cpz5 konnte bereits als Teil des durch das Caprazamycin-Gencluster codierten Biosyntheseweges von 3-Methylglutaryl-CoA nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt sollte nun herausgefunden werden, ob noch weitere Gene des Caprazamycin-Genclusters an diesem Biosyntheseweg beteiligt sind.

#### 3.3.1 Identifizierung von *cpz2*, *cpz20* und *cpz25* als Kandidaten für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA

Für die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaryl-CoA bedarf es zunächst einer Entfernung der 3-Hydroxygruppe. Wasserabspaltungen unter Bildung einer Doppelbindung an Hydroxyacyl-CoA-Derivaten werden typischerweise von Dehydratasen katalysiert. Das Caprazamycin-Gencluster verfügt mit *cpz2* über ein Gen, das für eine mögliche Acyl-CoA Dehydratase codiert, welche für die Katalyse dieser Reaktion infrage kommen könnte [80]. Eine *BLASTx*-Analyse von *cpz2* zeigte, dass die Proteinsequenz von Cpz2 große Ähnlichkeit zu Dehydratasen der MaoC-Familie (Monoaminoxidase Typ C) aufweist (Tabelle 25). Außerdem enthält Cpz2 eine konservierte Domäne für MaoC Dehydratasen (pfam01575, *E-value*  $5.36e^{-16}$ ).

**Tabelle 25:** Durch *BLASTx*-Analyse identifizierte homologe Proteine der Acyl-CoA Dehydratase Cpz2.

Annotierung	Organismus	Identität [%]	Similarität [%]	Anzahl Aminosäuren
MaoC family dehydratase	<i>Streptomyces sp.</i> SID7499	100	100	151
	unclassified <i>Streptomyces</i>	97	98	151
	<i>Streptomyces tuius</i>	97	98	151
	<i>Streptomyces sp.</i> WAC04114	97	98	151
	<i>Streptomyces djakartensis</i>	96	98	151

Nachdem die Hydroxygruppe des 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoAs eliminiert wurde, müsste im nächsten Schritt die C-C-Doppelbindung des entstandenen 3-Methylglutaconyl-CoAs reduziert werden, um 3-Methylglutaryl-CoA zu erhalten. Das für eine mögliche Dehydrogenase codierende Gen *cpz25* könnte eine solche

## Ergebnisse

Reduktion katalysieren. Eine *BLASTx*-Analyse von *cpz25* zeigte Homologie zu Alkohol-Dehydrogenasen und Zink-bindenden Dehydrogenasen (Tabelle 26). Außerdem wird das Enzym zur Proteinfamilie der *medium chain reductase/dehydrogenase (MDR)/zincdependent alcohol dehydrogenase-like* zugeordnet (cd05188, *E-value* 5.22e<sup>-11</sup>) und enthält eine konservierte Domäne von Enolreduktasen in Polyketidsynthesen (smart00829, *E-value* 2.15e<sup>-13</sup>).

**Tabelle 26:** Durch *BLASTx*-Analyse identifizierte homologe Proteine der Dehydrogenase Cpz25.

Annotierung	Organismus	Identität [%]	Similarität [%]	Anzahl Aminosäuren
zinc-binding dehydrogenase	<i>Streptomyces massasporeus</i>	94	96	341
dehydrogenase	<i>Streptomyces sp.</i> SN-1061M	91	95	341
zinc-binding dehydrogenase	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	92	95	339
putative alcohol dehydrogenase	<i>Streptomyces sp.</i> SANK 60405	90	95	338
zinc-binding dehydrogenase	<i>Streptomyces atratus</i>	92	95	324

Ein weiteres Gen des Caprazamycin-Genclusters, dem bisher noch keine Funktion im Rahmen der Caprazamycin-Biosynthese zugeordnet wurde, ist das für eine mögliche Acyl-CoA Synthase codierende *cpz20*. Möglichweise spielt Cpz20 durch die Übertragung eines CoA-Restes eine Rolle bei der Aktivierung von 3-Methylglutaryl-CoA oder einer Vorstufe im Rahmen von dessen Biosynthese. Eine *BLASTx*-Analyse von *cpz20* zeigte Homologie zu verschiedenen Acyl-CoA Synthasen (Tabelle 27). Außerdem wird das Enzym der *Adenylate forming domain Class I* (cl17068, *E-value* 1.10e<sup>-6</sup>) zugeordnet, welche unter anderem Acyl- und Aryl-CoA Ligasen beinhaltet.

**Tabelle 27:** Durch *BLASTx*-Analyse identifizierte homologe Proteine der Acyl-CoA Synthase Cpz20.

Annotierung	Organismus	Identität [%]	Similarität [%]	Anzahl Aminosäuren
long-chain fatty acid-CoA ligase	<i>Streptomyces sp.</i> SID7499	100	100	334
acyl-CoA synthase	<i>Streptomyces sp.</i> SN-1061M	88	91	354
putative acyl-CoA synthase	<i>Streptomyces sp.</i> SANK 60405	88	92	354
phenazine antibiotic biosynthesis protein	<i>Streptomyces massasporeus</i>	89	92	353
putative acyl-CoA synthase	<i>Streptosporangium amethystogenes</i>	87	90	354

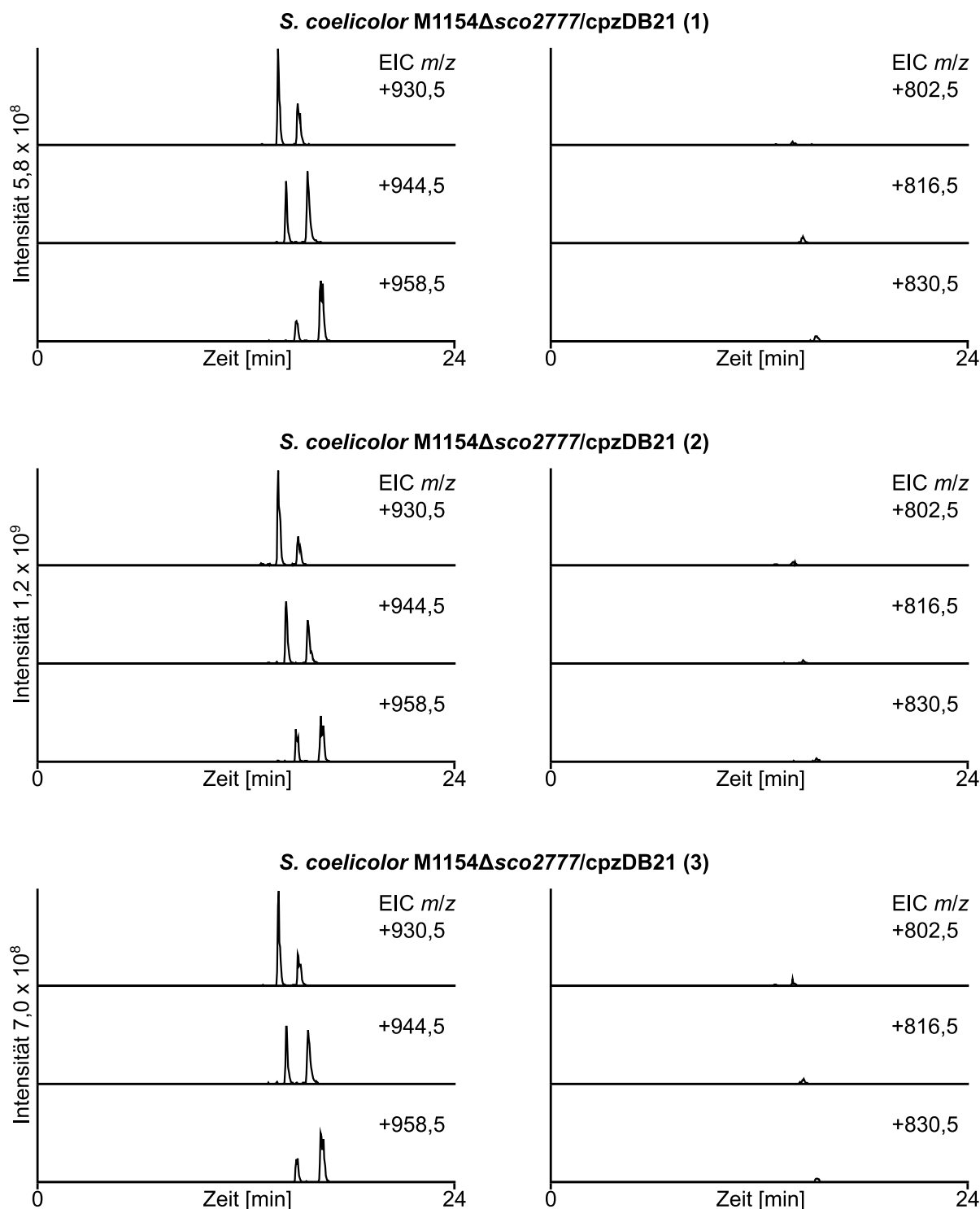
### 3.3.2 Gendeletionen von *cpz2*, *cpz20* und *cpz25*

Die Gendeletionen von *cpz2*, *cpz20* und *cpz25* wurden auf Cosmid cpzLK09 analog zur Deletion von *cpz5*, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden die Cosmide cpzDB05 mit einer Deletion von *cpz20* und cpzDB06 mit einer Deletion von *cpz25* in den heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 eingebracht. Das Cosmid cpzDB21 mit einer Deletion von *cpz2* wurde in *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777 eingebracht, um eine Herstellung des vermutlich von Cpz2 synthetisierten 3-Methylglutaconyl-CoAs durch den Liu-Weg zu blockieren. Es wurden je drei individuelle, Kanamycin-resistente Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB05 (1)-(3), *S. coelicolor* M1154/cpzDB06 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB21 (1)-(3) isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert.

#### 3.3.2.1 Deletion von *cpz2*

Die Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB21 (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm nach wie vor Signale für die Massen der Caprazamycin-Aglycone sowie der Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 39). Die Gendeletion von *cpz2* führte somit nicht zu einer Termination der Biosynthese von Caprazamycin-Aglyconen.

## Ergebnisse



**Abbildung 39:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2777/cpzDB21 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

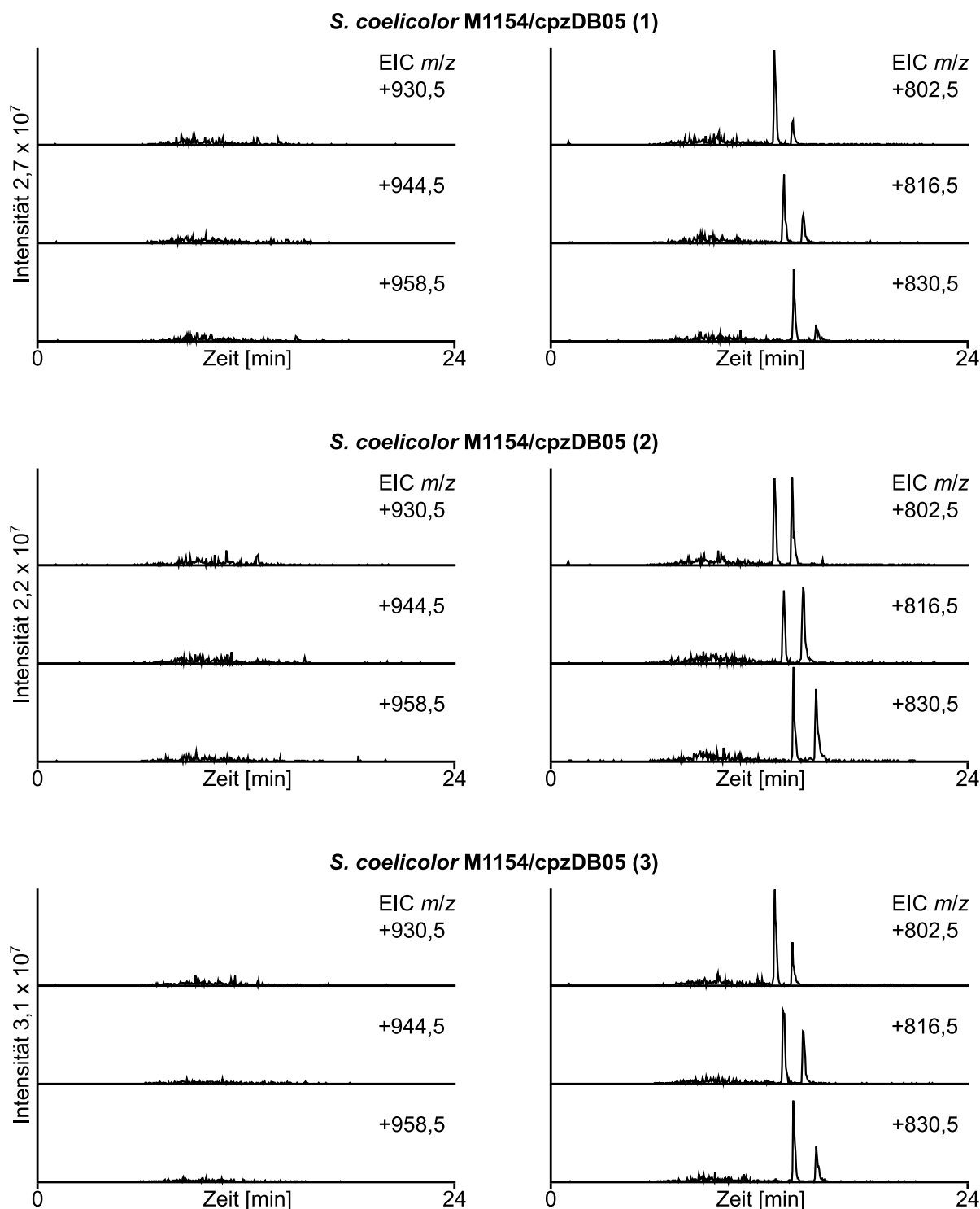
### 3.3.2.2 Deletion von *cpz20* und *cpz25*

Sowohl die Extrakte von *S. coelicolor* M1154/*cpzDB05* (1)-(3) als auch von *S. coelicolor* M1154/*cpzDB06* (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm keine Signale mehr für die Caprazamycin-Aglycone. Die entsprechenden Massen der Hydroxyacylcaprazole akkumulierten hingegen (Abbildung 40 und Abbildung 41). Beide Gene scheinen demnach für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA benötigt zu werden. Da in diesen Mutanten außerdem der Liu-Weg nach wie vor intakt war, scheinen sowohl der Liu-Weg als auch der Caprazamycin-Gencluster codierte Weg auf *Cpz20* und *Cpz25* für die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA angewiesen zu sein.

### 3.3.3 Genetische Komplementierung von *cpz20* und *cpz25*

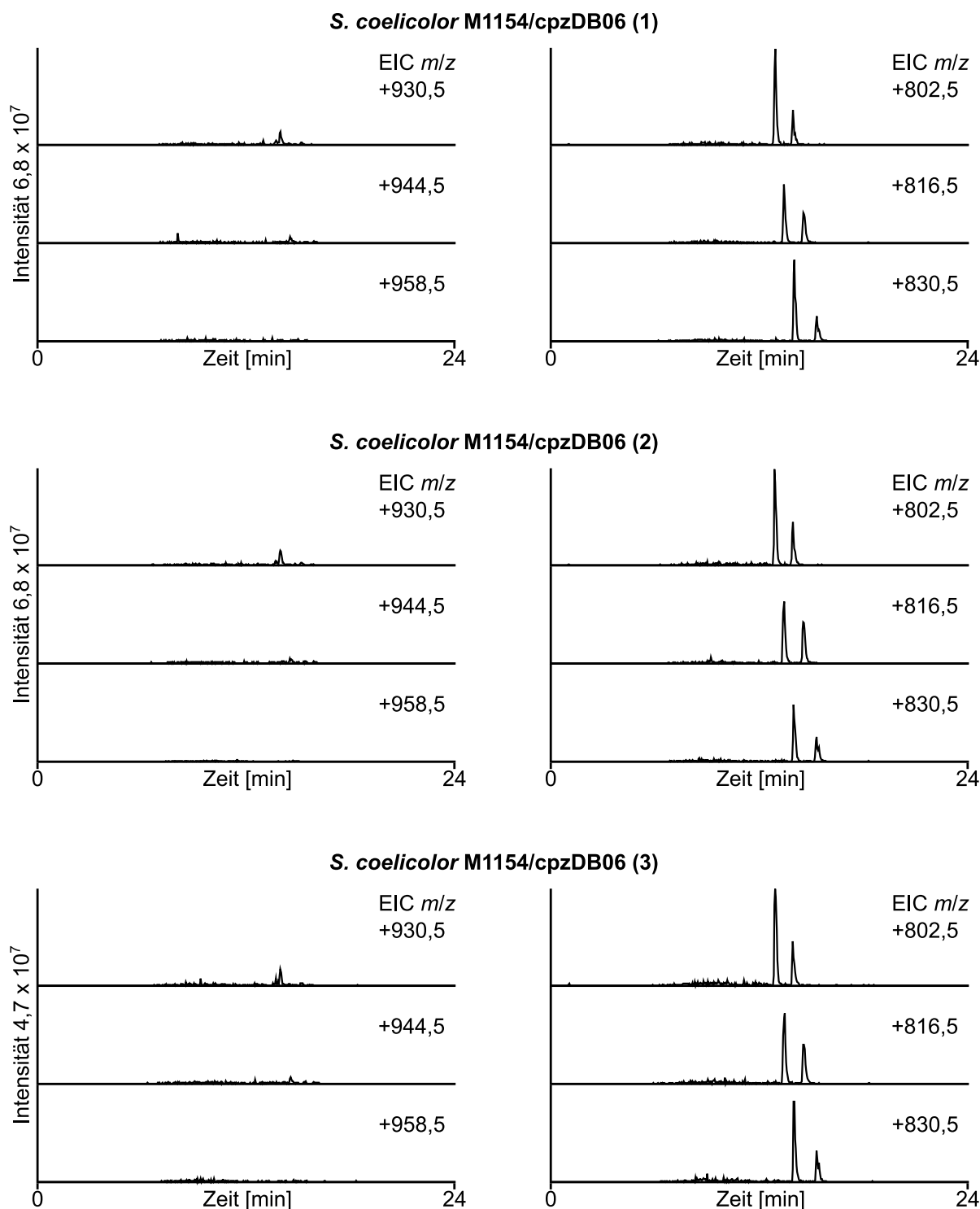
Die Komplementierung der Gendeletionen von *cpz20* und *cpz25* wurde, wie bereits in Kapitel 3.2.4.2 für *sco2776* und *sco2777* beschrieben, durch Überexpression der beiden Gene mit dem pUWL-*apra-oriT*-Vektor durchgeführt. Eine chemische Komplementierung war auch hier durch die fehlende chemische Zugänglichkeit von 3-Methylglutaconyl-SNAc als Substrat von *Cpz25* sowie 3-Methylglutaryl-SNAc als mögliches Substrat von *Cpz20* nicht durchführbar. Die Extrakte von *S. coelicolor* M1154/*cpzDB05/pDB15* (1)-(3) zeigten im extrahierten Ionenchromatogramm ausschließlich Signale für die Massen der Fragmente der sulfatierten Caprazamycin-Aglycone. Die nicht-sulfatierten Caprazamycin-Aglycone konnten nicht detektiert werden (Abbildung 42). Die Mutante mit Leervektor akkumulierten weiterhin die Hydroxyacylcaprazole, jedoch ebenfalls ausschließlich in der sulfatierten Form. Für die Extrakte der Mutanten *S. coelicolor* M1154/*cpzDB06/pDB16* (1)-(3) konnte lediglich eine geringe genetische Komplementierung erreicht werden (Abbildung 43). Die Caprazamycin-Aglycone waren nur in geringen Mengen detektierbar. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit Leervektor war jedoch eine Wiederherstellung der Produktion erkennbar. Daher wird diese Komplementierung ebenfalls als erfolgreich angesehen.

## Ergebnisse



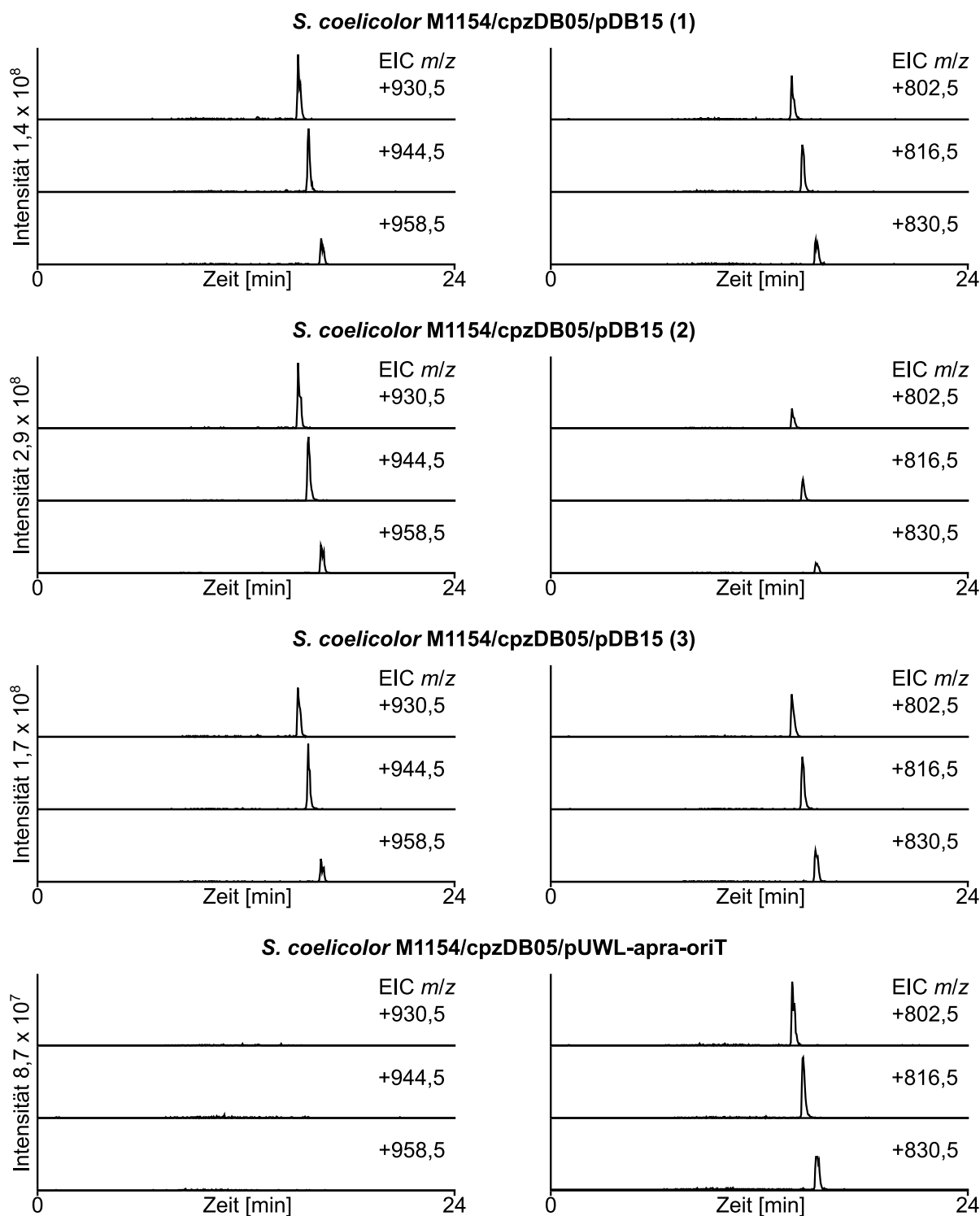
**Abbildung 40:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB05 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

## Ergebnisse



**Abbildung 41:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB06 (1)-(3). Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

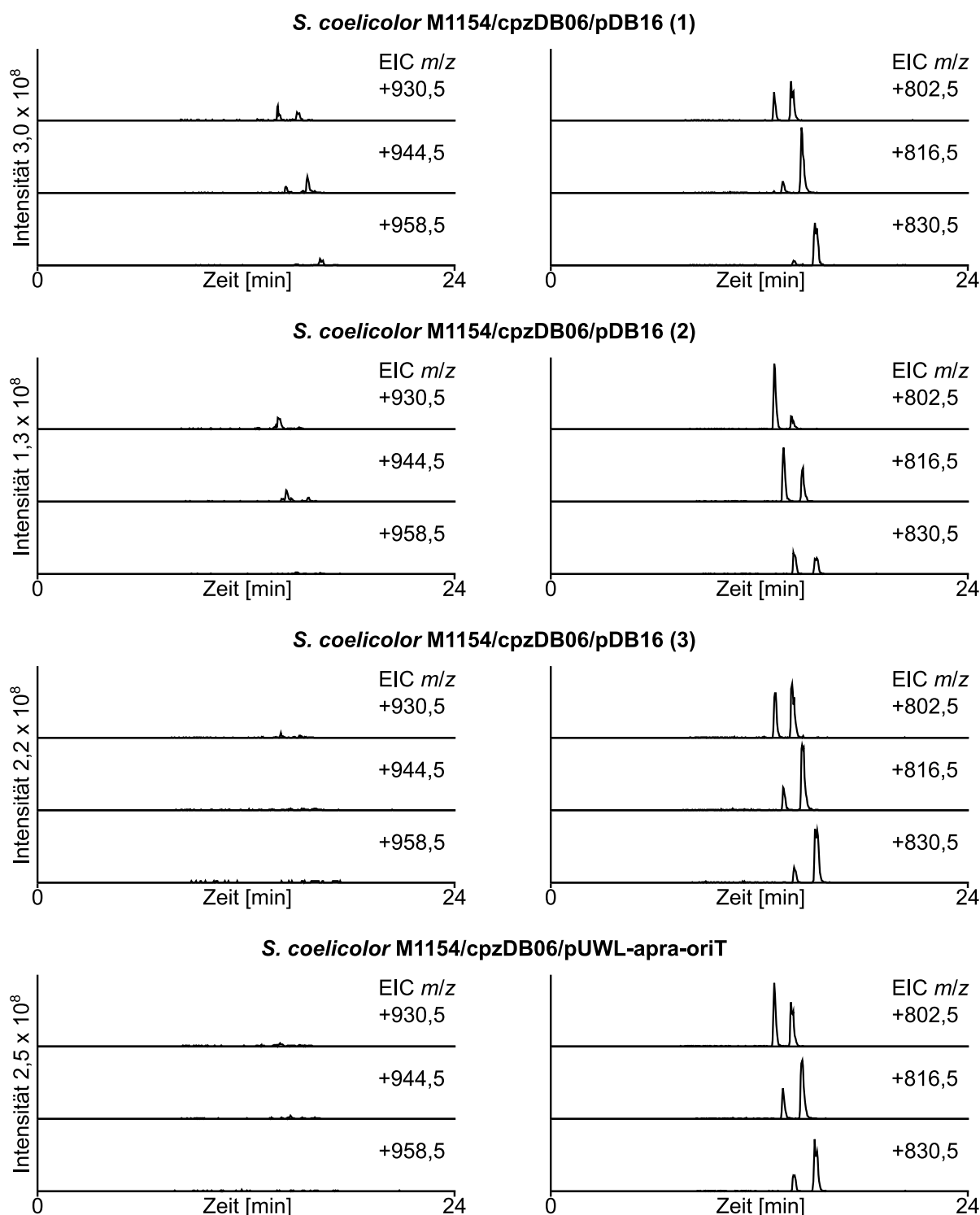
## Ergebnisse



**Abbildung 42:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB05/pDB15 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154/cpzDB05/pUWL-apra-oriT. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente [M+H-SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5 [M+H]<sup>+</sup> bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei

## Ergebnisse

$R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.



**Abbildung 43:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ /cpzDB06/pDB16 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154/cpzDB06/pUWL-apra-oriT. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F ( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Aglycone.

Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt. Die Signale bei  $R_t$  13,9 min, 14,5 min und 15,3 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Hydroxyacylcaprazole.

### 3.3.4 Biochemische Untersuchungen von Cpz2 und Cpz25

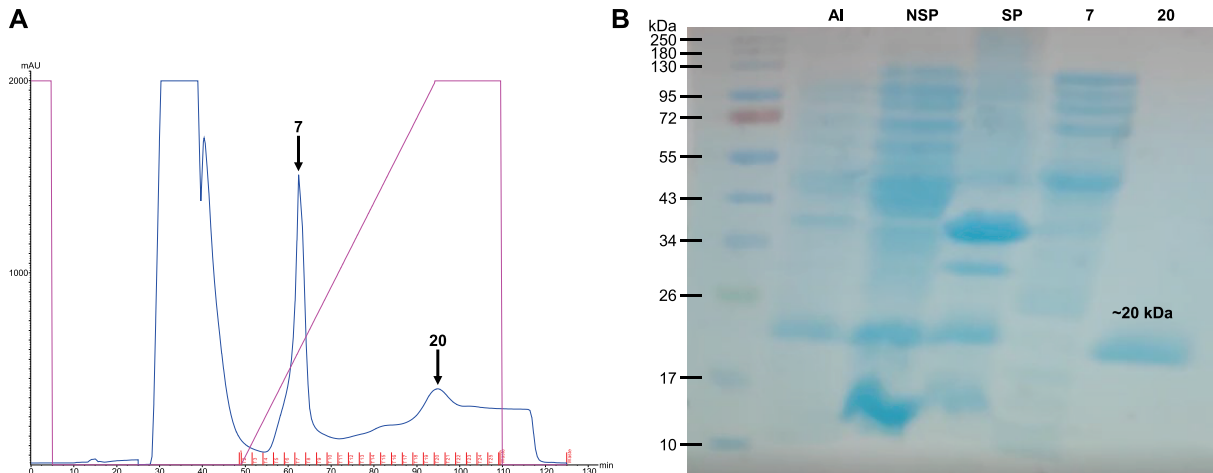
Die Gendeletion der Acyl Dehydratase Cpz2 führte nicht zur erwarteten Termination der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen. Eine Gendeletion der Dehydrogenase Cpz25 konnte die Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen herbeiführen, jedoch konnte durch die genetische Komplementierung dieser Mutanten nur eine geringe Wiederherstellung der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen erreicht werden. Zur weiteren Charakterisierung dieser beiden Enzyme sollten daher biochemische Untersuchungen durchgeführt werden.

#### 3.3.4.1 Isolation von Cpz2 und Cpz25 aus *E. coli* Rosetta DE3

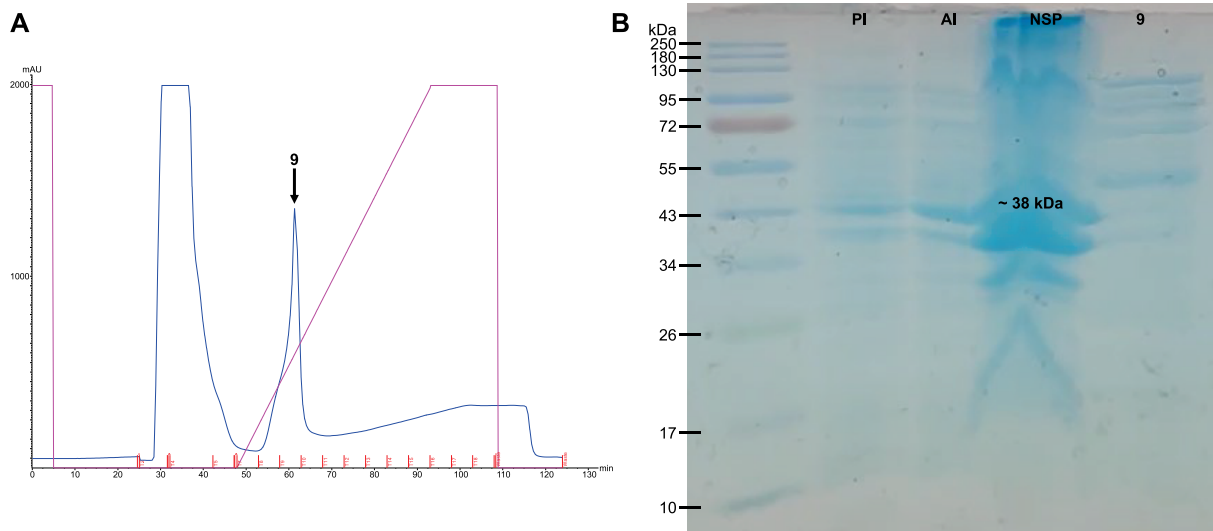
Zur biochemischen Untersuchung von Cpz2 und Cpz25 wurden die entsprechenden Gene von Cosmid cpzLK09 amplifiziert und im Anschluss unter Verwendung der Schnittstellen EcoRI und HindIII in den Expressionsvektor pET28a eingebracht. Die korrekte Ligation der resultierenden Plasmide pDB18 und pDB20 wurde durch PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. Nach Überexpression der mit einem N-terminalen His-Tag versehenen Proteine in *E. coli* Rosetta DE3 und anschließendem Zellaufschluss wurde das Lysat mittels FPLC analysiert. Für Cpz2 konnten im Chromatogramm zwei Peaks bei einer  $R_t$  von etwa 62 min sowie bei einer  $R_t$  von etwa 95 min detektiert werden (Abbildung 44 A). Eine SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen 7 und 20 zeigte, dass in Fraktion 20 ein Protein mit einer Masse von etwa 20 kDa enthalten war, welches Cpz2 mit einer berechneten Masse von etwa 20,2 kDa entsprechen könnte (Abbildung 44 B). Hingegen enthielt Fraktion 7 möglicherweise ein unspezifisch an die Säule gebundenes Protein. Die Fraktionen 19-21 wurden daraufhin vereint und aufkonzentriert. Es konnten etwa 1,3 mg Cpz2 isoliert werden. Die FPLC-Analyse des Lysates von Cpz25 zeigte hingegen lediglich ein Signal bei einer  $R_t$  von etwa 62 min. Die SDS-PAGE zeigte, dass Fraktion 9 kein Protein enthielt, dass der berechneten Masse von Cpz25 mit etwa 38,5 kDa entsprach

## Ergebnisse

(Abbildung 45 A). Jedoch konnte in der Probe der unlöslichen Proteine eine intensive Bande bei etwa 38 kDa detektiert werden, was etwa der Größe von Cpz25 entspricht (Abbildung 45 B). Eine Isolation von löslichem Cpz25 aus *E. coli* Rosetta DE3 konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden.



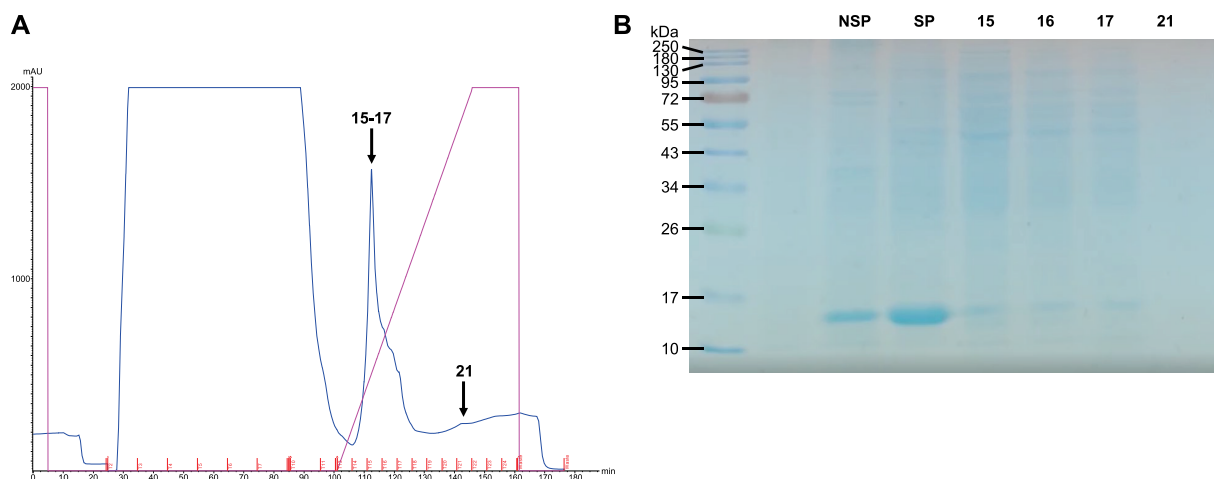
**Abbildung 44:** (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von *E. coli* Rosetta DE3/pDB18. Die markierten Fraktionen 7 und 20 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (B) SDS-PAGE mit den Fraktionen 7 und 20 der FPLC-Aufreinigung. AI: Probe nach Induktion der Zellen; NSP: Unlösliches Protein nach Ultrazentrifugation, SP: Lösliches Protein nach Ultrazentrifugation.



**Abbildung 45:** (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von *E. coli* Rosetta DE3/pDB20. Die markierte Fraktion 9 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (B) SDS-PAGE mit der Fraktion 9 der FPLC-Aufreinigung. PI: Probe vor Induktion der Zellen; AI: Probe nach Induktion der Zellen; NSP: Unlösliches Protein nach Ultrazentrifugation.

### 3.3.4.2 Isolation von Cpz25 aus *Streptomyces lividans* TK24

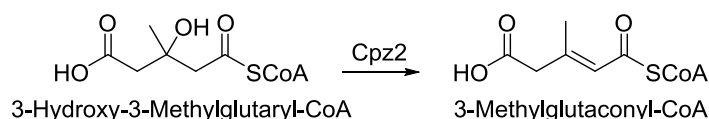
Da die Isolation von Cpz25 aus *E. coli* Rosetta DE3 nicht erfolgreich war, wurde im nächsten Schritt eine Überexpression in *S. lividans* TK24 versucht. Hierzu wurde *cpz25* von Cosmid cpzLK09 amplifiziert und im Anschluss unter Verwendung der Schnittstellen NdeI und HindIII in den Expressionsvektor pGM1192 eingebracht. Das hieraus resultierende Plasmid pDB02 wurde mittels PCR und Sequenzierung des PCR-Produktes verifiziert. Nach Konjugation in *S. lividans* TK24 wurde die resultierende Mutante *S. lividans* TK24/pDB02 durch eine Isolation des Plasmids aus dieser Mutante und anschließender PCR verifiziert. Nach Überexpression und anschließendem Zellaufschluss wurde das Lysat mittels FPLC analysiert. Das Chromatogramm zeigte einen Peak bei einer  $R_t$  von etwa 115 min mit einer Schulter bei einer  $R_t$  von etwa 118 min (Abbildung 46 A). Außerdem konnte ein schwach ausgeprägter Peak bei einer  $R_t$  von etwa 143 min detektiert werden. Die SDS-PAGE der entsprechenden Fraktionen 15, 16, 17 und 21 wies jedoch keine Bande auf, die Cpz25 zugeordnet werden konnte (Abbildung 46 B). Im Gegensatz zur Expression in *E. coli* Rosetta DE3 konnte auch in der Probe der unlöslichen Proteine keine entsprechende Bande gefunden werden. Folglich war auch die Isolation von Cpz25 aus *S. lividans* TK24 nicht erfolgreich.



**Abbildung 46:** (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von *Streptomyces lividans* TK24/pDB02. Die markierten Fraktionen 15-17 sowie 21 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (B) SDS-PAGE mit den Fraktionen 15-17 sowie 21 der FPLC-Aufreinigung. NSP: Unlösliches Protein nach Ultrazentrifugation; SP: Lösliches Protein nach Ultrazentrifugation.

### 3.3.5 Enzymatische Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA durch Cpz2

Zum Abschluss der biochemischen Untersuchung wurde überprüft, ob das isolierte Cpz2 die Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA zu katalysieren konnte (Abbildung 47).

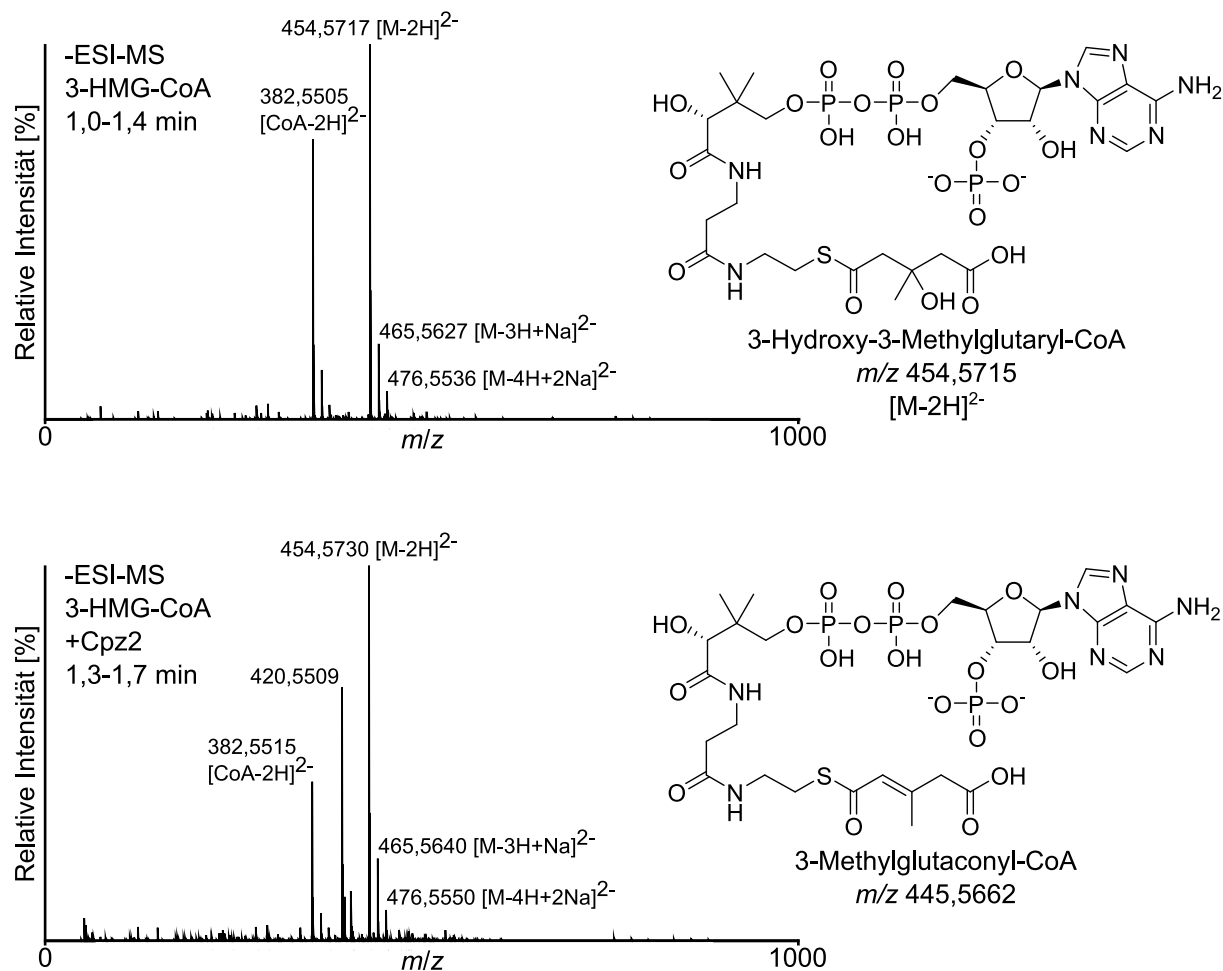


**Abbildung 47:** Vermutete Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA durch die mutmaßliche Acyl Dehydratase Cpz2.

Hierzu wurde 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zusammen mit Cpz2 in einem enzymatischen Assay inkubiert. Eine Kontrolle ohne Enzym wurde parallel angesetzt. Anschließend wurden die Ansätze mittels ESI-HR-MS analysiert. Sowohl die Probe des Assays als auch die Negativkontrolle ohne Cpz2 zeigten die Masse von HMG-CoA in Form eines zweifach negativ geladenen Molekül-Ions mit einem  $m/z$  von 454,57  $[M-2H]^{2-}$  (Abbildung 48 und Tabelle 28). Entsprechende Mono- und Dinatriumaddukte mit einem  $m/z$  von 465,56  $[M-3H+Na]^{2-}$  sowie einem  $m/z$  von 476,55  $[M-4H+2Na]^{2-}$  konnten ebenfalls detektiert werden. Durch Spaltung der Bindung zwischen dem Schwefel des CoAs und dem Carbonyl-Kohlenstoff des 3-Hydroxy-3-Methylglutarates und einem resultierenden Neutralverlust von 144 Da bildete sich ein zweifach negativ geladenes Fragment mit einem  $m/z$  von 382,55  $[CoA-2H]^{2-}$ , welches dem freien CoA zugeordnet werden konnte. Dieses Fragment war ebenfalls in beiden Massenspektren sichtbar. Ebenso die entsprechenden Mono- und Dinatriumaddukte mit einem  $m/z$  von 393,54  $[CoA-3H+Na]^{2-}$  sowie einem  $m/z$  von 404,53  $[CoA-4H+2Na]^{2-}$ . Es war zu erwarten, dass nach Umsetzung von 3-HMG-CoA durch Cpz2 ein entsprechendes Molekül-Ion des Produktes 3-Methylglutaconyl-CoA detektierbar war. Jedoch konnte im Massenspektrum der Probe des Assays kein entsprechendes Fragment mit einem erwarteten  $m/z$  von 445,57  $[M-2H]^{2-}$  detektiert werden. Auch die entsprechenden Natriumaddukte konnten nicht gefunden werden. Ein weiteres Fragment mit einem  $m/z$  von 420,55 zeigte in der Probe des Assays ein Signal mit etwa 67 % relativer Intensität. Diese Masse konnte jedoch auch mit einer bedeutend geringeren Intensität von etwa 1,1 % in der Negativkontrolle beobachtet werden. Eine Zuordnung dieser Masse war

## Ergebnisse

jedoch nicht möglich. Auch keines der weiteren Fragmente konnte 3-Methylglutaconyl-CoA zugeordnet werden. Die Funktion von Cpz2 als Dehydratase von 3-HMG-CoA konnte daher durch den durchgeführten Enzymassay nicht bestätigt werden.



**Abbildung 48:** Massenspektren der Negativkontrolle und des Cpz2-Enzymassays aufgenommen im Negativmodus. Außerdem Strukturformel und  $m/z$  des Edukts 3-HMG-CoA sowie des erwarteten Produkts 3-Methylglutaconyl-CoA. Als Molekül-Ion wurde in beiden Spektren das 3-HMG-CoA definiert.

## Ergebnisse

**Tabelle 28:** Daten der Massenspektrometrie des Cpz2-Enzymassays

Summenformel	Fragment	<i>m/z</i> <i>berechnet</i>	Negativkontrolle		Cpz2-Assay	
			<i>m/z</i> <i>beobachtet</i>	Fehler [ppm]	<i>m/z</i> <i>beobachtet</i>	Fehler [ppm]
C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub> P <sub>3</sub> S	[M-2H] <sup>2-</sup>	454,5715	454,5717	0,51	454,5730	3,41
C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>20</sub> P <sub>3</sub> S	[M-3H+Na] <sup>2-</sup>	465,5624	465,5627	0,52	465,5640	3,26
C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>20</sub> P <sub>3</sub> S	[M-4H+2Na] <sup>2-</sup>	476,5534	476,5536	0,40	476,5550	3,29
C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> N <sub>7</sub> O <sub>16</sub> P <sub>3</sub> S	[CoA-2H] <sup>2-</sup>	382,5503	382,5505	0,34	382,5515	3,08
C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>16</sub> P <sub>3</sub> S	[CoA-3H+Na] <sup>2-</sup>	393,5413	393,5414	0,30	393,5425	3,05
C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>16</sub> P <sub>3</sub> S	[CoA-4H+2Na] <sup>2-</sup>	404,5323	404,5343	5,02	404,5337	3,56

### 3.3.6 Zusammenfassung der Caprazamycin-Gencluster Experimente

In Kapitel 3.1 konnte die Umwandlung von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA durch die HMG-CoA Synthase Cpz5 bereits als möglicher Startpunkt der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA durch das Caprazamycin-Gencluster beschrieben werden. In diesem Teil der Arbeit wurden mit Cpz2, Cpz20 und Cpz25 drei Kandidaten für die weiteren Schritte dieses Biosyntheseweges identifiziert. Eine Gendeletion von *cpz2* hatte jedoch keinen Einfluss auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone. Auch konnte nicht gezeigt werden, dass isoliertes Cpz2 in einem enzymatischen Assay die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA katalysiert. Im Gegensatz hierzu führten die Gendeletionen von *cpz20* und *cpz25* zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl Cpz20 als auch Cpz25 an der Biosynthese oder Aktivierung von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt sein müssen. Diese Beobachtung konnte durch genetische Komplementierungen unterstützt werden. Eine biochemische Charakterisierung von Cpz25 war jedoch nicht möglich, da eine Isolation des Enzyms nicht erfolgreich war. Auf Grundlage der bioinformatischen Analyse von Cpz25 dient dieses Enzym jedoch höchstwahrscheinlich der Reduktion der C-C-Doppelbindung von 3-Methylglutaconyl-CoA und liefert hierdurch 3-Methylglutaryl-CoA. Cpz20 hingegen könnte an einen zusätzlichen Aktivierungsschritt von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt sein, der noch genauer untersucht werden muss. Interessanterweise wurden die Caprazamycin-Gencluster mit den Deletionen von *cpz20* und *cpz25* in *S. coelicolor* M1154 exprimiert,

welcher ein intaktes *liu*-Cluster aufwies. Dies muss bedeuten, dass beide Enzyme nicht spezifisch für einen der beiden 3-Methylglutaryl-CoA-Biosynthesewege sind, sondern für beide Wege hin zu 3-Methylglutaryl-CoA benötigt werden. Höchstwahrscheinlich bildet die Umwandlung des zentralen Intermediates 3-Methylglutaconyl-CoA durch Cpz25 den Abzweig, an dem beide Biosynthesewege auf eine gemeinsame Route zusammengeführt werden.

### 3.4 Untersuchungen von möglichen Acyl-CoA Dehydratasen zur Ergänzung des Caprazamycin-Gencluster codierten Biosyntheseweges

Die Acyl-CoA Dehydratase Cpz2 konnte weder durch Gendeletion noch durch eine biochemische Untersuchung als Teil des Caprazamycin-Gencluster codierten Biosyntheseweges für 3-Methylglutaryl-CoA nachgewiesen werden. Daher sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob stattdessen Gene des heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 für die Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA verantwortlich sind. Diese Experimente wurde im Rahmen der Masterarbeit von Benjamin Konetschny durchgeführt.

#### 3.4.1 Identifizierung von möglichen Acyl-CoA Dehydratasen auf dem Genom von *S. coelicolor* M1154

Als Grundlage für die Suche nach geeigneten Enzymen dienten *liuC/PA2013* aus *P. aeruginosa* PAO1 sowie das *liuC*-Homolog aus *Myxococcus xanthus* DK 1622 [112]. Zwar katalysiert LiuC üblicherweise die Rückreaktion der Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA, homologe Enzyme könnten diese Reaktion jedoch in beide Richtungen durchführen und somit die gesuchte Funktion als Acyl Dehydratase übernehmen. Zunächst wurden *BLASTx*-Analysen des Genoms von *S. coelicolor* M1154 mit den beiden genannten Genen als Vorlage durchgeführt (Tabelle 29 und Tabelle 30).

**Tabelle 29:** Homologe Proteine der 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase LiuC/PA2013 aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in *Streptomyces coelicolor* M1154.

LiuC-Homolog	Annotierung	Identität [%]	Similarität [%]
Sco0364	Enoyl-CoA hydratase-related protein	31	45
Sco1838	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	25	40
Sco4384	Enoyl-CoA hydratase family protein	35	51
Sco4930	Enoyl-CoA hydratase-related protein	32	41
Sco5459	Enoyl-CoA hydratase-related protein	33	47
Sco5979	Enoyl-CoA hydratase family protein	26	40
Sco6748	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	30	46

## Ergebnisse

**Tabelle 30:** Homologe Proteine der 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase LiuC aus *Myxococcus xanthus* DK 1622 in *Streptomyces coelicolor* M1154.

LiuC-Homolog	Annotierung	Identität [%]	Similarität [%]
Sco0364	Enoyl-CoA hydratase-related protein	38	53
Sco1838	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	36	50
Sco4384	Enoyl-CoA hydratase family protein	31	43
Sco4930	Enoyl-CoA hydratase-related protein	43	60
Sco5144	Enoyl-CoA hydratase-related protein	33	45
Sco5459	Enoyl-CoA hydratase-related protein	43	59
Sco6026	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase NAD-binding domain-containing protein	32	47
Sco6732	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase NAD-binding domain-containing protein	35	54
Sco6748	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	34	48

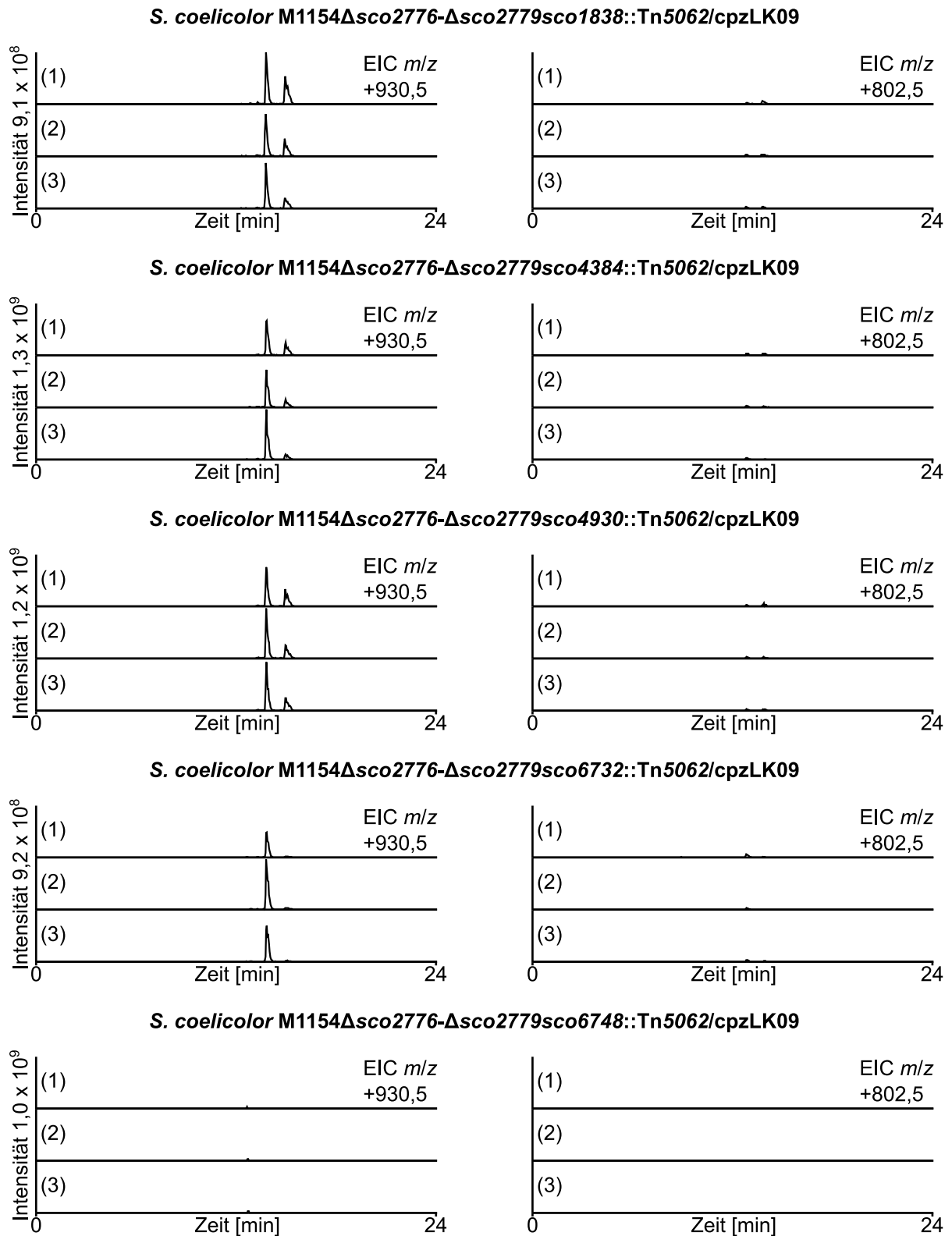
Für die weitere Untersuchung wurden diejenigen Gene ausgewählt, die in beiden *BLASTx*-Analysen als mögliche Kandidatengene aufgetreten sind. Dies waren mit *sco0364*, *sco1838*, *sco4384*, *sco4930*, *sco5459* und *sco6748* allesamt Gene, die als für Enoyl-CoA Hydratasen codierend annotiert waren. Um das Spektrum an Kandidaten zu erweitern, wurde mit *sco6732* zusätzlich ein für eine 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase codierendes Gen in die Untersuchung aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde die StrepDB-Datenbank nach Cosmiden durchsucht, die jeweils eine Insertion des Transposons Tn5062 innerhalb der ausgewählten Gene enthielten. Für *sco0364* war ein solches Cosmid nicht verfügbar, weshalb dieses Gen nicht weiter untersucht wurde. Die Cosmide SCI8.1.H03 (*sco1838*), 2D52.2.F12 (*sco4384*), 2SCK31.2.D06 (*sco4930*), SC3D11.2.H02 (*sco5459*), 5F2A.2.H07 (*sco6732*) und 5F2A.1.D03 (*sco6748*) wurden freundlicherweise von Prof. Paul Dyson (Swansea University, UK) zur Verfügung gestellt und mittels Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung des erhaltenen PCR-Produktes auf deren Integrität und korrekte Insertion des Transposons hin überprüft.

### 3.4.2 Generierung und Analyse von Mutanten mit Transposon-Inaktivierung

Im nächsten Schritt wurden die Cosmide in *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2776-sco2779* eingebracht und Mutanten identifiziert, bei denen das Wildtyp-Gen durch ein *double-*

*crossover* gegen das Transposon-inaktivierte Gen ausgetauscht wurde. Für das Gen *sco5459* konnten jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experiments keine *double-crossover*-Mutanten erhalten werden. Die weiteren Mutanten *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco1838::Tn5062*, *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco4384::Tn5062*, *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco4930::Tn5062*, *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco6732::Tn5062* und *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco6748::Tn5062* wurden auf korrekte Geninaktivierung sowie die Abwesenheit der Wildtyp-Gene nach Isolation von genomischer DNA durch PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. In diese Mutanten wurde im Anschluss cpzLK09 mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster eingebracht und jeweils drei individuelle Mutanten isoliert. Der Nachweis des Caprazamycin-Genclusters in der Mutante *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco6748::Tn5062/cpzLK09* zeigte nicht das erwartete PCR-Produkt, die Mutante wurde jedoch trotzdem kultiviert und extrahiert. Die Extrakte der resultierenden Mutanten *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco1838::Tn5062/cpzLK09*, *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco4384::Tn5062/cpzLK09*, *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco4930::Tn5062/cpzLK09* und *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco6732::Tn5062/cpzLK09* zeigten nach wie vor Signale der Massen der Caprazamycin-Aglycone (Abbildung 49). Die Mutante *S. coelicolor* M1154Δ*sco2776-sco2779/sco6748::Tn5062/cpzLK09* zeigte hingegen weder Signale für die Hydroxyacylcaprazole noch für die Caprazamycin-Aglycone, was für ein Fehlen des Caprazamycin-Genclusters in dieser Mutante spricht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass keines der Gene *sco1838*, *sco4384*, *sco4930* oder *sco6732* an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA über den Caprazamycin-Gencluster codierten Weg beteiligt ist. Andererseits könnten auch mehrere Enzyme des heterologen Produzenten die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA katalysieren.

## Ergebnisse



**Abbildung 49:** Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco1838::Tn5062/cpzLK09, *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco4384::Tn5062/cpzLK09, *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco4930::Tn5062/cpzLK09, *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco6732::Tn5062/cpzLK09 und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2776-sco2779/sco6748::Tn5062/cpzLK09. Links gezeigt sind die Signale der Caprazamycin-Aglycone E/F

## Ergebnisse

---

( $m/z$  930,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,8 min), C/D/G ( $m/z$  944,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,3 min) und A/B ( $m/z$  958,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,9 min). Die Signale bei  $R_t$  15,0 min, 15,6 min und 16,4 min entstehen durch die Fragmente  $[M+H-SO_3]^+$  der sulfatierten Aglycone. Rechts sind die Signale der Hydroxyacylcaprazole E/F ( $m/z$  802,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  12,9 min), C/D/G ( $m/z$  816,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  13,4 min) und A/B ( $m/z$  830,5  $[M+H]^+$  bei  $R_t$  14,0 min) dargestellt.

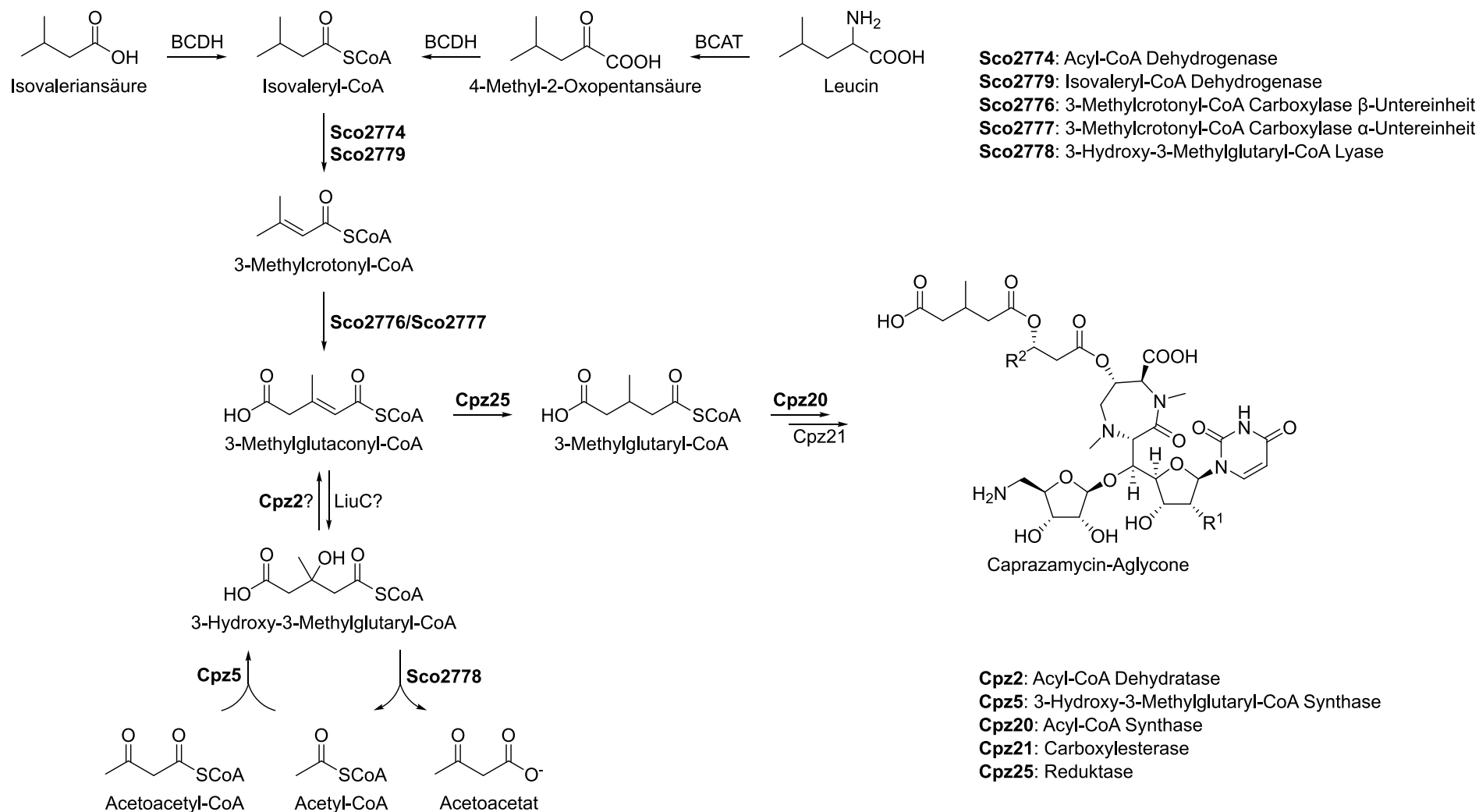
### 3.5 Modell zum Ursprung von 3-Methylglutaryl-CoA für die Caprazamycin-Biosynthese

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass sowohl Gene des Caprazamycin-Genclusters als auch Gene des Primärmetabolismus des heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154 an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA beteiligt sind.

Durch die Untersuchung der Gene des Katabolismus von Leucin und Isovalerat konnten mit 3-Methylglutaconyl-CoA und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zwei Intermediate dieses Abbauweges als mögliche Vorstufen von 3-Methylglutaryl-CoA identifiziert werden. Da das *liu*-Cluster in *S. coelicolor* M1154 jedoch kein Gen für eine 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase beinhaltet, konnten die durchgeführten Gendeletionen die tatsächliche Vorstufe nicht abschließend bestimmen.

Der Caprazamycin-Gencluster codierte Weg hin zu 3-Methylglutaryl-CoA beginnt mit der Umsetzung von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA durch Cpz5. Der letzte Schritt des Liu-Weges hingegen katalysiert mit dem Abbau von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu Acetyl-CoA und Acetoacetat durch Sco2778 die nahezu gegenläufige Reaktion. Dies zeigt, dass die beiden Biosynthesewege von 3-Methylglutaryl-CoA nicht unabhängig voneinander sind, sondern zu gewissen Teilen entgegengesetzt agieren. Interessanterweise konnte mit der Gendeletion von *cpz25* die Produktion von Caprazamycin-Aglyconen verhindert werden, auch wenn keine weiteren Gene ausgeschaltet waren. Dies lässt darauf schließen, dass Cpz25 beide Biosynthesewege vereint. Die bioinformatische Analyse von Cpz25 deutet stark darauf hin, dass dieses Enzym die Reduktion der C-C-Doppelbindung von 3-Methylglutaconyl-CoA katalysiert. Es wird daher als Reduktase deklariert. Das Intermediat 3-Methylglutaconyl-CoA stellt somit höchstwahrscheinlich die gemeinsame Vorstufe beider Biosynthesewege hin zu 3-Methylglutaryl-CoA dar. Da die Deletion von *cpz20* ebenfalls unabhängig von weiteren Gendeletionen zu einer Termination der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen führte, wird diesem Enzym eine Aktivierungsfunktion zugeschrieben, die nach der Cpz25-katalysierten Reduktion von 3-Methylglutaconyl-CoA stattfindet. Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit wird das in Abbildung 50 gezeigte Modell für den Ursprung von 3-Methylglutaryl-CoA im Rahmen der Caprazamycin-Biosynthese postuliert.

## Ergebnisse



**Abbildung 50:** Biosynthesemodell für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA für die Caprazamycin-Biosynthese im heterologen Produzenten *S. coelicolor* M1154. Fettgedruckt: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Biosyntheseschritte. BCAT: Verzweigt-kettige Aminosäuren Aminotransferase; BCDH: Verzweigt-kettige Aminosäuren Dehydrogenase Komplex.

### 3.6 Die Rolle des Regulators Sco2775 für die 3-Methylglutaryl-CoA Biosynthese

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, beinhaltet das *liu*-Cluster in *Streptomyces coelicolor* M1154 mit *sco2775* neben den Genen für den Katabolismus von Leucin und Isovalerat auch einen transkriptionellen Regulator. Der Frage, ob dieser Regulator einen Einfluss auf die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA hat, wurde in diesem Kapitel nachgegangen.

#### 3.6.1 Bioinformatische Analyse des Regulators *sco2775*

Eine *BLASTx*-Analyse von *sco2775* zeigte, dass die Proteinsequenz dieses Regulators große Ähnlichkeit zu transkriptionellen Regulatoren der TetR/AcrR-Familie aus *Streptomyces* aufweist. Einige Beispiele sind in Tabelle 31 aufgeführt. Außerdem enthält *Sco2775* eine konservierte Sequenz für DNA-bindende, transkriptionelle Regulatoren der AcrR-Familie (COG1309, *E-value*  $2.88e^{-13}$ ) sowie für bakterielle regulatorische Proteine der TetR-Familie (pfam00440, *E-value*  $9.19e^{-07}$ ).

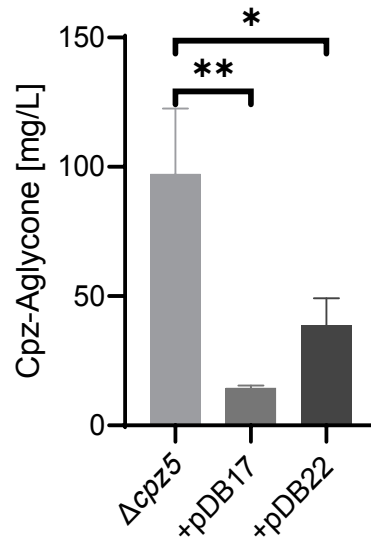
**Tabelle 31:** Durch *BLASTx*-Analyse identifizierte homologe Proteine des Regulators *Sco2775*.

Annotierung	Organismus	Identität [%]	Similarität [%]	Anzahl Aminosäuren
TetR/AcrR family transcriptional regulator	<i>Streptomyces sp.</i> 2114.2	99	99	208
	<i>Streptomyces anthocyanicus</i>	99	99	208
	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>	99	99	208
	<i>Streptomyces sp.</i> CB09001	97	97	208
	<i>Streptomyces lividans</i> 1326	96	96	208

In *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 wurde mit SAV5279 kürzlich ein zu 83 % homologes Protein zu *Sco2775* beschrieben [113]. In diesem Stamm fungiert SAV5279 als negativer transkriptioneller Regulator, welcher durch Bindung an seine Erkennungssequenz die Transkription der angrenzenden Acyl-CoA Carboxylase *AccD* reprimiert.

### 3.6.2 Einfluss einer *sco2775*-Überexpression auf die Caprazamycin-Produktion

Zunächst sollte herausgefunden werden, ob *Sco2775* analog zu *SAV5279* einen negativen regulatorischen Einfluss auf das *liu*-Cluster und somit auf die Biosynthese der Caprazamycin-Aglycone hat. Hierzu wurde *sco2775* zum einen in den pUWL-apra-oriT-Vektor kloniert, der durch den *ermE*\*-Promotor sowie der hohen Kopienzahl des Plasmids zu einer starken Überexpression des Regulators führen sollte. Zum anderen wurde *sco2775* in den pMVM3100-Vektor kloniert, der mit *p57* eine zu *ermE*\* vergleichbare Promotorstärke aufweist, durch die Integration in das Genom des heterologen Hosts jedoch zu einer geringeren Überexpression führen sollte [114]. Die korrekte Ligation der generierten Plasmide pDB17 und pDB22 wurde durch Restriktionsverdau, PCR und Sequenzierung der resultierenden PCR-Produkte bestätigt. Beide Plasmide wurden anschließend in die Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1) eingebracht. Zur Verifizierung der resultierenden Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB17 (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) wurde das Plasmid aus diesen Stämmen isoliert und anschließend durch Restriktionsverdau und PCR nachgewiesen. Die Extrakte der Kultivierung dieser Mutanten zeigten, dass die Produktion der Caprazamycin-Aglycone wie erwartet durch eine Überexpression von *sco2775* verringert wird (Abbildung 51). Die Quantifizierung erfolgte über HPLC-MS. Hierzu wurde eine Kalibriergerade mit Caprazamycin-Aglycon A als Referenzsubstanz aufgenommen. Die Produktionsmenge wurde als Summe der Peakflächen der sulfatierten und nicht-sulfatierten Caprazamycin-Aglycone A-G berechnet.



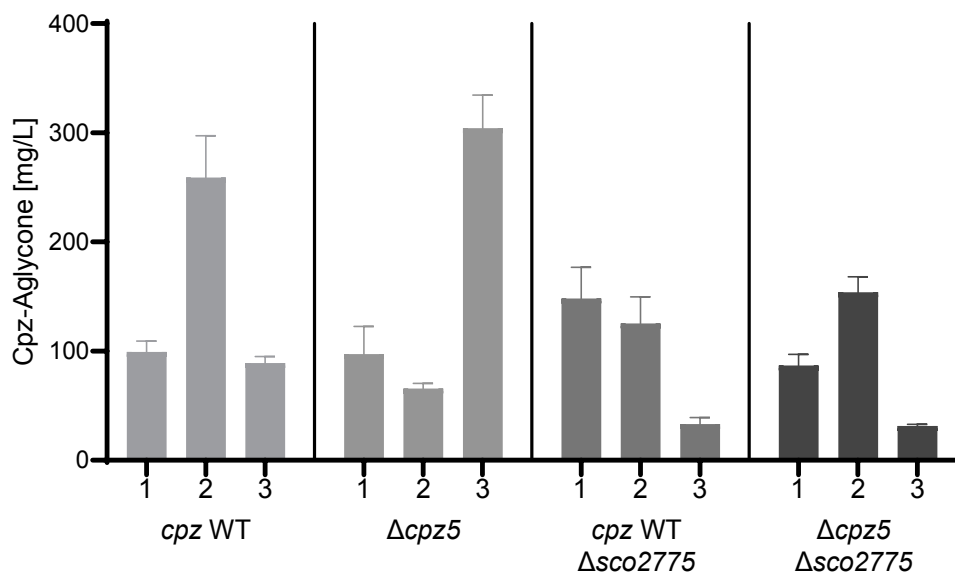
**Abbildung 51:** Einfluss einer *sco2775*-Überexpression auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone. Gezeigt sind die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1) ( $\Delta cpz5$ ; 3 Messungen), *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB17 (1)-(3) (+pDB17) mit einer Überexpression von *sco2775* durch den pUWL-apra-oriT-Vektor sowie *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) (+pDB22) mit einer Überexpression von *sco2775* durch pMVM3100. \* entspricht  $p < 0,05$ ; \*\* entspricht  $p < 0,005$ .

Während die Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1) ohne Überexpression von *sco2775* eine durchschnittliche Produktion von 97,3 mg/L zeigten, war diese für die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB17 (1)-(3) mit einer Überexpression von *sco2775* durch den pUWL-apra-oriT-Vektor mit einem durchschnittlichen Wert von 14,6 mg/L signifikant reduziert (p-Wert 0,0047). Auch eine Überexpression von *sco2775* durch den pMVM3100-Vektor führte mit einer durchschnittlichen Produktion von 38,7 mg/L zu einer signifikanten Reduktion der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen (p-Wert 0,016). Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass *Sco2775* tatsächlich ein Repressor des *liu*-Clusters ist. Da in diesem Experiment in allen Mutanten *Cpz5* durch eine Gendeletion nicht zur Verfügung stand, verblieb der *Liu*-Weg die einzige Quelle für 3-Methylglutaryl-CoA. Die erniedrigte Produktion der Caprazamycin-Aglycone kann somit durch die repressive Wirkung von *Sco2775* auf das *liu*-Cluster in Zusammenhang gebracht werden.

### 3.6.3 Einfluss einer Deletion von *sco2775* auf die Caprazamycin-Produktion

Im ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass *Sco2775* eine repressive Wirkung auf das *liu*-Cluster hat. Als nächstes sollte überprüft werden, welche Auswirkung eine Deletion von *sco2775* auf die Produktion von 3-Methylglutaryl-CoA und somit auf die Biosynthese der Caprazamycin-Aglyconen hat. Durch den fehlenden Repressor wird eine erhöhte Transkription der *liu*-Gene erwartet, welche sich positiv auf die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA auswirken sollte. Außerdem sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Produktion der Caprazamycin-Aglycone zwischen Mutanten mit und ohne *cpz5* gibt.

Es wurden zunächst Mutanten von *S. coelicolor* M1154 wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben generiert, die eine Einzeldelation von *sco2775* trugen. In diese Mutanten wurde entweder *cpzLK09* mit dem kompletten Caprazamycin-Gencluster oder *cpzDB04* mit einer Deletion von *cpz5* eingebracht. Es wurden jeweils drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2775*/*cpzLK09* (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ *sco2775*/*cpzDB04* isoliert. Nach Kultivierung wurden die Extrakte dieser Mutanten mittels HPLC-MS analysiert. Zusätzlich wurden die Mutanten *S. coelicolor* M1154/*cpzLK09* (1)-(3) sowie *S. coelicolor* M1154/*cpzDB04* (1)-(3) als Kontrolle kultiviert und analysiert.



**Abbildung 52:** Einfluss einer Deletion von *sco2775* auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone. Gezeigt sind die Mutanten *S. coelicolor* M1154/*cpzLK09* (1)-(3) mit intaktem Caprazamycin-Gencluster (*cpz* WT), *S. coelicolor* M1154/*cpzDB04* (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* ( $\Delta$ *cpz5*), *S. coelicolor*

## Ergebnisse

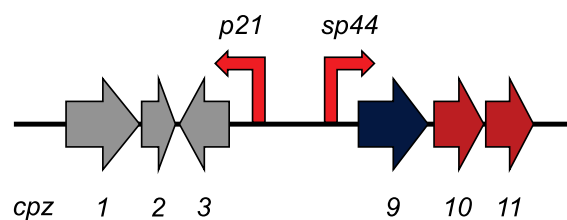
---

M1154 $\Delta$ sco2775/cpzLK09 (1)-(3) (*cpz* WT  $\Delta$ sco2775) mit intaktem Caprazamycin-Gencluster und einer Deletion von *sco2775* sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB04 (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* und *sco2775* ( $\Delta$ *cpz5*  $\Delta$ sco2775). Jede Mutante wurde in Triplikaten kultiviert und analysiert.

Zunächst konnten die Daten zeigen, dass die Produktion der Caprazamycin-Aglycone innerhalb der technischen Replikate nur wenig schwankten (Abbildung 52). Vergleicht man jedoch die drei biologischen Replikate, war die Produktionsrate sehr unterschiedlich. Während die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1) und (3) eine Produktion von etwa 95 mg/L generierten, erreichte Mutante (2) mit einer Produktion von 259 mg/L annähernd die dreifache Menge. Auch die Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (3) zeigte mit 304 mg/L eine mehr als dreifach erhöhte Produktion gegenüber den Mutanten (1) und (2) mit Werten von 97 mg/L und 66 mg/L. Die Ergebnisse dieser Messungen konnten ebenfalls zeigen, dass eine Deletion des Repressor-Gens *sco2775* nur zu einer geringen Steigerung der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen führte, jedoch nicht in allen Mutanten. Die Produktion der Mutanten *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzLK09 (1) und (2) waren mit 148 mg/L und 125 mg/L im Vergleich zu *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (1) und (3) zwar leicht erhöht, reichten aber nicht an den Wert 259 mg/L der Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (2) heran. *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzLK09 (3) fiel hingegen mit einer Produktion von 33 mg/L deutlich ab. Auch eine Deletion von *sco2775* in Verbindung mit einer Deletion von *cpz5* auf dem Caprazamycin-Gencluster führte zu keiner konsistenten Steigerung der Produktion. Lediglich die Mutante *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB04 (2) erreichte mit einer Produktion von 154 mg/L einen gegenüber den Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1) und (2) leicht erhöhten Wert, reichte aber nicht an den Wert von 304 mg/L der Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (3) heran. Während *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB04 (1) mit einer Produktion von 87 mg/L keine Steigerung erzielte, zeigte die Mutante (3) mit einem Wert von lediglich 32 mg/L sogar den niedrigsten Wert aller Messungen. Zusammengefasst konnte kein bedeutender Unterschied in der durchschnittlichen Produktion zwischen den Mutanten mit intaktem *cpz5* (149 mg/L) und Deletion von *cpz5* (156 mg/L) festgestellt werden. Auch zeigten die Mutanten mit *sco2775*-Deletion und intaktem *cpz5* (102 mg/L) sowie Doppeldeletion von *sco2775* und *cpz5* (91 mg/L) keine nennenswerten Unterschiede in der durchschnittlichen Produktion. Eine positive Wirkung einer Deletion des Regulators *sco2775* auf die Biosynthese der Caprazamycin-Aglycone konnte daher ebenfalls nicht festgestellt werden.

### 3.6.4 Erstellung eines Caprazamycin-Genclusters mit Überexpressionskassette zur Analyse des Einflusses einer Deletion von *sco2775*

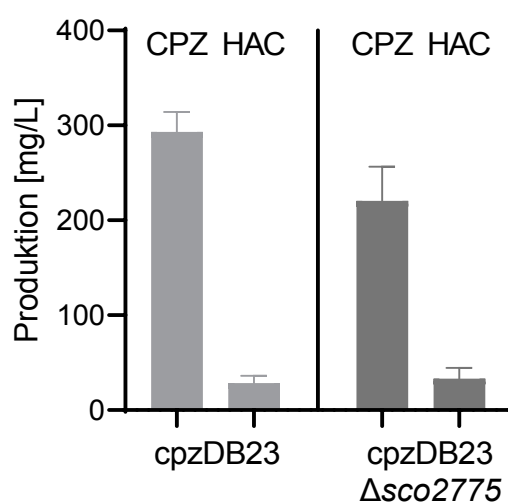
Um ein besseres Bild auf den Einfluss von *sco2775* auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone zu erhalten, sollten die in Kapitel 3.6.3 beobachteten Produktionsschwankungen minimiert werden. Hierfür sollte ein Austausch der Gene *cpz4-cpz8* mit einer bidirektionalen Promotorkassette auf Cosmid cpzLK09 erfolgen, um eine gleichbleibende, größtmögliche Produktion zu gewährleisten. Die Promotorkassette *sp44-p21*, wie von Baumann *et al.* beschrieben, wurde als synthetisches DNA-Fragment von der Firma Integrated DNA Technologies hergestellt [115]. Die FRT-Sequenzen wurden in diesem Fragment jedoch durch loxP-Sequenzen ersetzt. Das DNA-Fragment wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen EcoRI und SpeI in den Vektor pBluescript II ligiert. Das resultierende Plasmid pDB23 wurde im Anschluss für den Austausch der Gene *cpz4-cpz8* auf Cosmid cpzLK09, wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, verwendet. Die Entfernung des Apramycin-Resistenzgens erfolgte durch die Cre-Rekombinase. Das resultierende Cosmid cpzDB23 enthielt das synthetische Derivat *sp44* des starken *kasO\**-Promotors (20-fach stärkere Wirkung des *ermE\**-Promotors) vor dem Caprazamycin-Regulatorgen *cpz9* (Abbildung 53) [115, 116]. Auf der entgegengesetzten Seite wurde der Promotor *p21* (3-fach stärkere Wirkung des *ermE\**-Promotors) vor *cpz3* eingebracht [114, 117].



**Abbildung 53:** Bereich der inserierten Promotorkassette mit den Promotoren *p21* und *sp44* zwischen *cpz3* und *cpz9* des Caprazamycin-Genclusters auf Cosmid cpzDB23.

Neben der Überexpression des Caprazamycin-Genclusters und der hiermit erhofften konstanten Produktion, verhindert die Deletion von *cpz5* die Produktion von 3-Methylglutaryl-CoA durch das Gencluster. Außerdem sollten durch die Deletion der Sulfotransferasen *cpz4* und *cpz8* keine sulfatierten Caprazamycin-Aglycone mehr gebildet werden, was die Quantifizierung vereinfachen sollte.

Das Cosmid cpzDB23 wurde sowohl in *S. coelicolor* M1154 als auch in *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775 eingebracht. Drei individuelle Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB23 (1)-(3) und *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB23 (1)-(3) wurden isoliert und die Extrakte nach Kultivierung mittels HPLC-MS analysiert. Durch die Insertion der Promotorkassette konnte zunächst erreicht werden, dass die Produktionsschwankungen der jeweiligen biologischen Replikate minimiert werden konnten (Abbildung 54). Auch wurden wie erwartet keine sulfatierten Caprazamycin-Aglycone und sulfatierte Hydroxyacylcaprazole mehr produziert.



**Abbildung 54:** Einfluss der Promotorkassette zwischen *cpz3* und *cpz9* auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone (CPZ) und Hydroxyacylcaprazole (HAC). Gezeigt sind die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB23 (1)-(3) (cpzDB23) sowie *S. coelicolor* M1154 $\Delta$ sco2775/cpzDB23 (1)-(3) (cpzDB23  $\Delta$ sco2775).

Die durchschnittliche Produktion erreichte mit 293 mg/L für *S. coelicolor* M1154/cpzDB23 (1)-(3) und 221 mg/L für *S. coelicolor* M1154  $\Delta$ sco2775/cpzDB23 (1)-(3) ähnliche Werte, wie sie in Kapitel 3.6.3 für die besten Produzenten *S. coelicolor* M1154/cpzLK09 (2) mit 259 mg/L und *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (3) mit 304 mg/L beobachtet wurden. Die Werte in den Mutanten mit Promotorkassette waren zwar konstant, aber nicht höher als die der genannten Mutanten ohne diese Kassette. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die Produktion in *S. coelicolor* M1154 unter den gewählten Bedingungen nicht weiter steigern lässt oder aber die Promotorkassette nicht wie gewünscht funktioniert. Neben den Caprazamycin-Aglyconen könnte die beobachtete Akkumulation geringer Mengen Hydroxyacylcaprazolen, deren Produktion jeweils bei etwa 30 mg/L lag, eine unzureichende Umwandlung durch

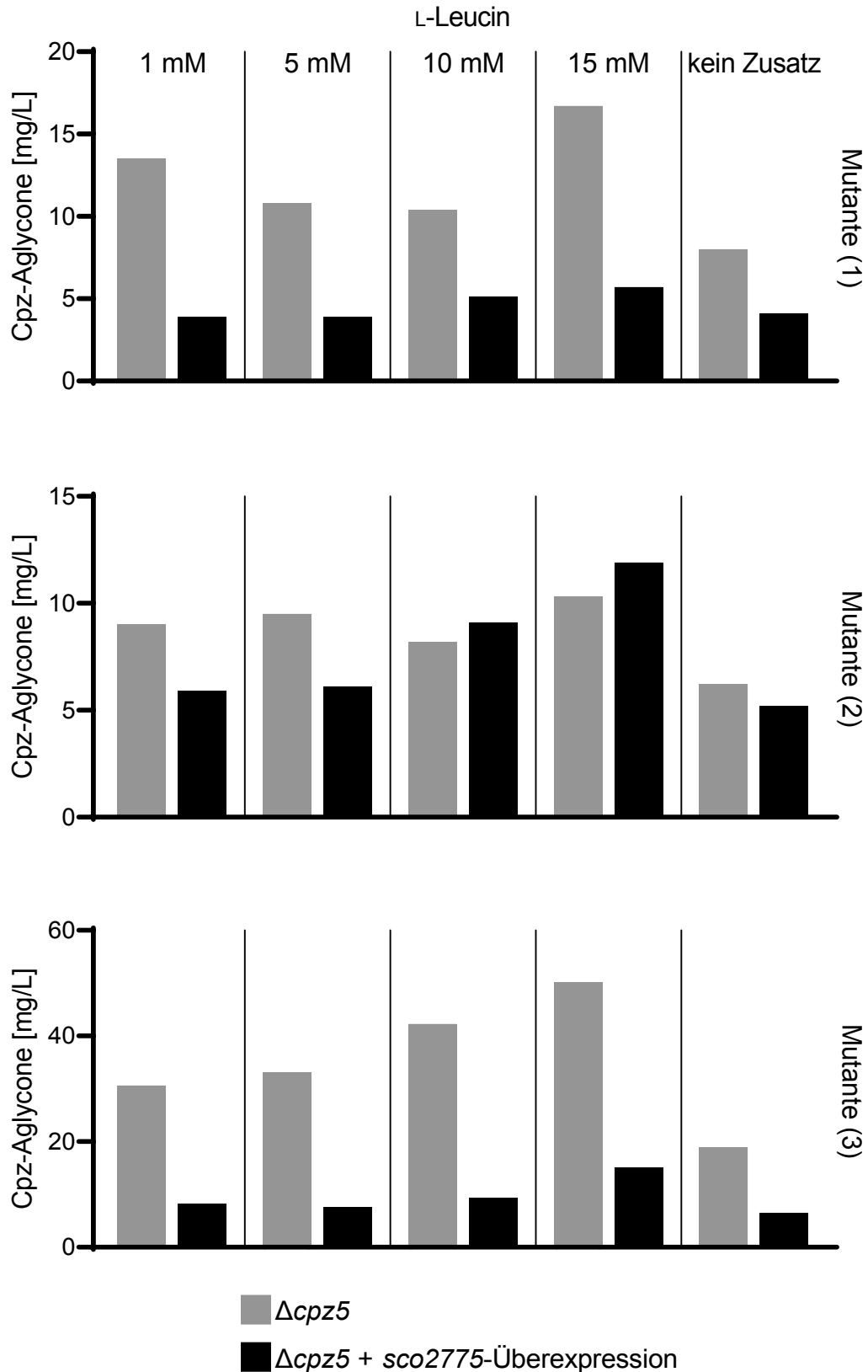
Cpz21 aufgrund von fehlendem 3-Methylglutaryl-CoA nahelegen. Dies beruht womöglich auf komplexen Wechselwirkungen des überexprimierten Liu-Weges und der 3-Methylglutaryl-CoA-Biosynthese durch Cpz20 und Cpz25. Eine signifikante Steigerung der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen scheint durch eine alleinige Deletion des Repressors *sco2775* nicht möglich zu sein.

### 3.6.5 Einfluss von L-Leucin, Isovaleryl-SNac und 3-Methylcrotonyl-SNac auf die Bindung des Regulators Sco2775

Für den bereits in Kapitel 3.6.1 beschriebenen und zu Sco2775 homologen Tet-Regulator SAV5279 konnte gezeigt werden, dass Propionyl-CoA, Acetyl-CoA und 3-Methylcrotonyl-CoA diesen als Liganden von seiner DNA-Bindestelle lösen. Außerdem erhöhte L-Leucin die Expression des von diesem Repressor regulierten Gens *aacD1A1* [113]. Für Sco2775 sollte daher überprüft werden, ob L-Leucin, Isovaleryl-SNac und 3-Methylcrotonyl-SNac Liganden dieses Repressors darstellen. Als Messgröße wurde hierfür die Produktion der Caprazamycin-Aglycone herangezogen. Das bisher zur Produktion verwendete P-Medium enthält mit dem darin enthaltenen Sojamehl eine Quelle von L-Leucin, welche die Ergebnisse dieser Experimente beeinflussen könnte. Es wurde daher auf ein definiertes, L-Leucin-freies Medium zurückgegriffen. Die Nachteile dieses Mediums bestanden jedoch in einem langsameren Wachstum der Zellen und einer Produktion, die etwa um den Faktor 10 vermindert war.

Analysiert wurden die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) sowie die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3), welche eine moderate Überexpression von *sco2775* zeigten. Dem Kulturmedium dieser Mutanten wurde zu Beginn der Kultivierung L-Leucin in einer Endkonzentration von 1 mM, 5 mM, 10 mM und 15 mM zugegeben sowie eine Kontrolle ohne Zugabe kultiviert. Die Extrakte dieser Kulturen wurden im Anschluss mittels HPLC-MS analysiert.

## Ergebnisse



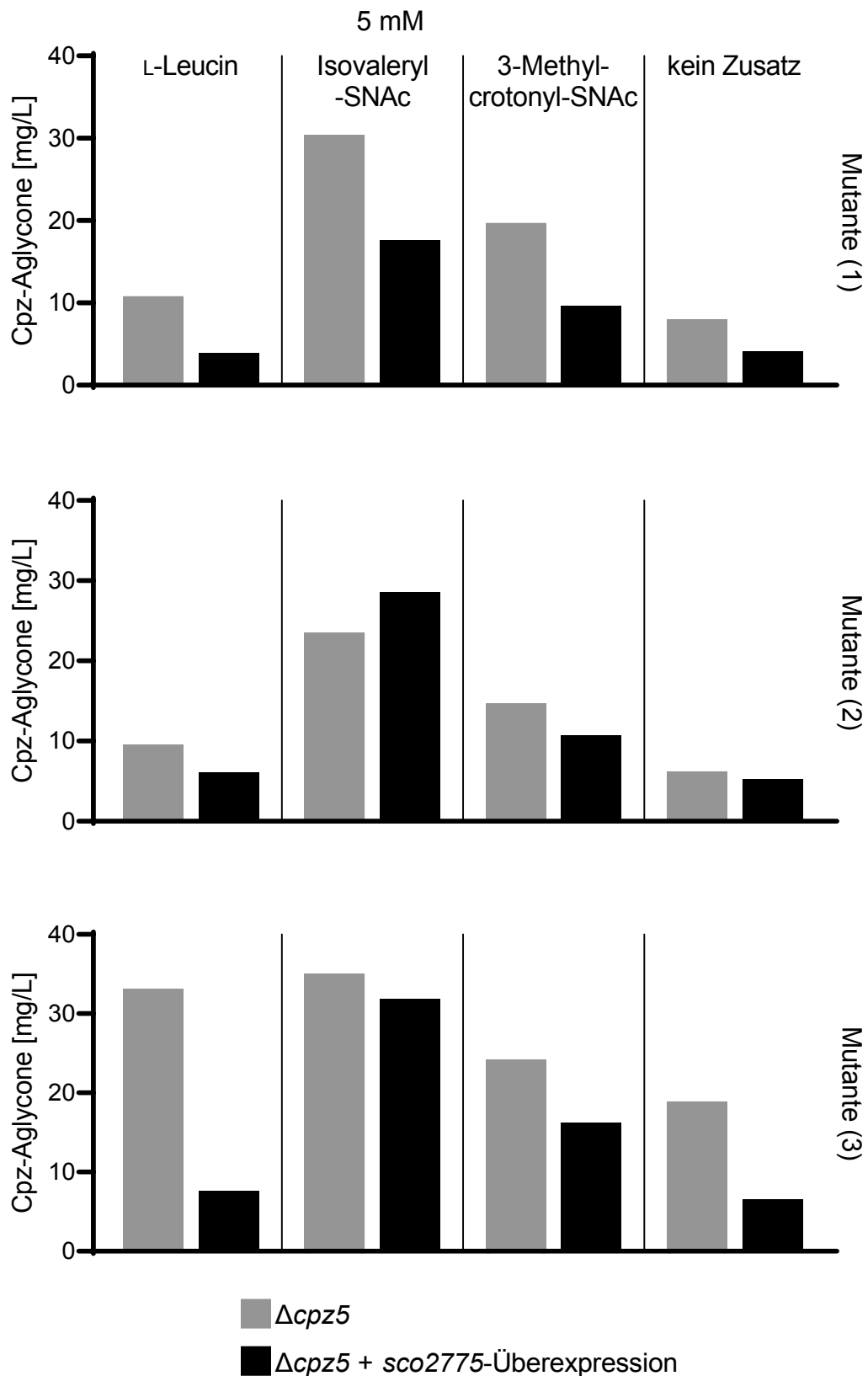
**Abbildung 55:** Produktion der Caprazamycin-Aglycone in definiertem Medium mit einer Endkonzentration von 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM L-Leucin oder ohne Zusatz. Gezeigt sind die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* und *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* und einer Überexpression von *sco2775*.

Zunächst ließ sich für alle drei Mutanten erkennen, dass das zugegebene L-Leucin zu einer Erhöhung der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen im Vergleich zur Negativkontrolle führte (Abbildung 55). Dass die Negativkontrolle selbst ebenfalls Produktion zeigte, könnte auf die endogene L-Leucin-Biosynthese zurückgeführt werden. Auch war die Produktion der Mutanten mit einer Überexpression von *sco2775*, mit Ausnahme der Mutante (2) bei 10 mM und 15 mM L-Leucin im Kulturmedium, wie erwartet geringer als derer ohne entsprechende Überexpression. Die Mutante *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (3) zeigte, wie bereits in Kapitel 3.6.3, die größte Produktion. Außerdem stieg die Produktion dieser Mutante mit der Erhöhung der L-Leucin-Konzentration im Medium weiter an, wie es in der Theorie zu erwarten war. Während 1 mM und 5 mM L-Leucin keinen nennenswerten Unterschied in der Produktion der *sco2775*-Überexpressionsmutante generierten, stieg die Produktion mit 10 mM und 15 mM in dieser Mutante kontinuierlich an. Derselbe Effekt war für die Mutanten (1) und (2) zu beobachten. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei höheren Konzentrationen genug L-Leucin in der Zelle vorhanden ist, um der Blockade des *liu*-Genclusters durch die Überexpression von *sco2775* entgegenzuwirken. Außerdem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass L-Leucin selbst oder ein Metabolit dessen ein Ligand von *Sco2775* darstellt.

Im Falle von L-Leucin konnte zwischen den Konzentrationen 5 mM und 10 mM im Medium eine beginnende Veränderung der Produktion in den *sco2775*-Überexpressionsmutanten beobachtet werden. Für die Untersuchungen der SNAC-Ester der Liu-Intermediate Isovaleryl-CoA und 3-Methylcrotonyl-CoA wurde daher eine Konzentration von 5 mM im Medium gewählt. Im Falle von Isovaleryl-SNAC zeigten die Mutanten (2) und (3) eine ähnliche Produktion, unabhängig von einer *sco2775*-Überexpression (Abbildung 56). Mutante (1) erreichte mit einer *sco2775*-Überexpression etwas mehr als die Hälfte der Produktion der entsprechenden Mutante (1) ohne Überexpression.

Durch Zugabe von 3-Methylcrotonyl-SNAC fiel die Produktion von Caprazamycin-Aglyconen insgesamt geringer aus. Die Mutanten (2) und (3) mit einer *sco2775*-Überexpression erreichten etwa zwei Drittel der Produktion der entsprechenden Mutanten ohne Überexpression. Bei Mutante (1) wurde etwa die Hälfte der Produktion erreicht.

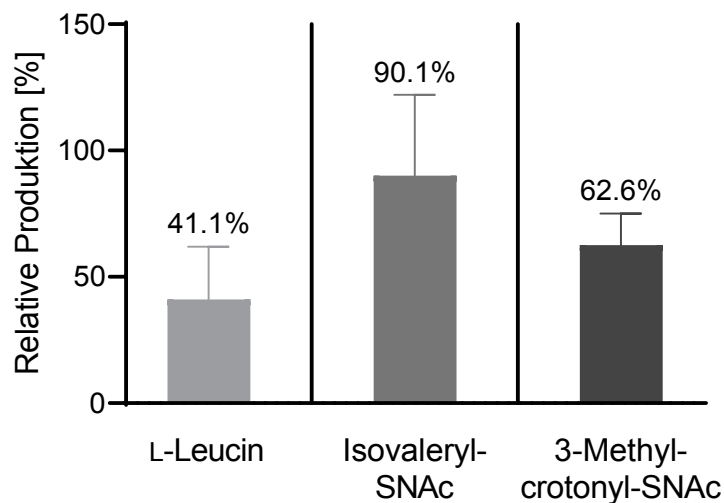
## Ergebnisse



**Abbildung 56:** Produktion der Caprazamycin-Aglycone in definiertem Medium mit einer Endkonzentration von 5 mM L-Leucin, Isovaleryl-SNAc, 3-Methylcrotonyl-SNAc oder ohne Zusatz. Gezeigt sind die Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* und *S.*

*coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) mit einer Deletion von *cpz5* und einer Überexpression von *sco2775*.

Zusammengefasst scheinen sowohl Isovaleryl-SNAc, 3-Methylcrotonyl-SNAc als auch L-Leucin in der Lage zu sein, die Repression des *liu*-Clusters durch *Sco2775* aufzuheben, jedoch in unterschiedlichem Ausmaße. Daher sollte abschließend quantifiziert werden, wie stark der durch diese drei Substanzen ausgelöste Effekt auf *Sco2775* ist. Hierzu wurde berechnet, wieviel Prozent der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen der Mutanten ohne Überexpression, von den jeweiligen Mutanten mit *sco2775*-Überexpression erreicht werden konnte (Abbildung 57). Während durch Zugabe von L-Leucin durchschnittlich 41,1 % der Produktion erreicht wurde, waren es bei 3-Methylcrotonyl-SNAc 62,6 % und bei Isovaleryl-SNAc sogar 90,1 %. Der Effekt auf *Sco2775* nimmt demnach in der Reihenfolge Isovaleryl-SNAc > 3-Methylcrotonyl-SNAc > L-Leucin ab.



**Abbildung 57:** Prozentual erreichter Anteil der Produktion der Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) mit einer Überexpression von *sco2775* von der Produktion der entsprechenden Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) ohne Überexpression. Die Mutanten wurden in Kulturmedien mit L-Leucin, Isovaleryl-SNAc oder 3-Methylcrotonyl-SNAc in einer Endkonzentration von 5 mM kultiviert.

### 3.6.6 Zusammenfassung der Untersuchungen des Regulators Sco2775

Die Ergebnisse der Untersuchung des mutmaßlichen Tet-Regulators Sco2275 kamen zunächst zu dem Schluss, dass es sich bei diesem um einen Repressor handelt. Durch Überexpression von *sco2775* konnte gezeigt werden, dass die Produktion der Caprazamycin-Aglycone vermindert wird. Zurückzuführen lässt sich dies höchstwahrscheinlich auf eine durch Sco2775 ausgelöste, verringerte Transkription des *liu*-Clusters. In Folge dieser verringerten Transkription steht Cpz25 weniger 3-Methylglutaconyl-CoA über den Liu-Weg zur Verfügung und somit auch weniger 3-Methylglutaryl-CoA für die Caprazamycin-Biosynthese.

Umgekehrt konnte durch eine Deletion von *sco2775* jedoch keine Steigerung der Produktion von Caprazamycin-Aglyconen herbeigeführt werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Produktion zwischen verschiedenen Mutanten starken Schwankungen ausgesetzt ist. Durch Insertion einer starken Promotorkassette in das Caprazamycin-Gencluster konnten diese Schwankungen zwar minimiert werden, eine erhöhte Produktion durch eine *sco2775*-Deletion war jedoch auch mit diesem Gencluster nicht zu beobachten.

Abschließend wurde untersucht, ob L-Leucin, Isovaleryl-SNAc und 3-Methylcrotonyl-SNAc als Liganden von Sco2775 fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass Isovaleryl-SNAc am besten in der Lage war, die von Sco2775 ausgelöste Verminderung der Biosynthese von Caprazamycin-Aglyconen entgegenzuwirken. Weniger stark waren die Effekte von 3-Methylcrotonyl-SNAc und L-Leucin. Dieses Experiment kann jedoch nur als erstes Indiz auf die Bindung dieser Liganden an den Regulator dienen. Zum Beweis dieser Hypothese müssen weitere Experimente erfolgen, beispielsweise eine Quantifizierung der Transkription des *liu*-Clusters oder *electrophoretic mobility shift assays*.

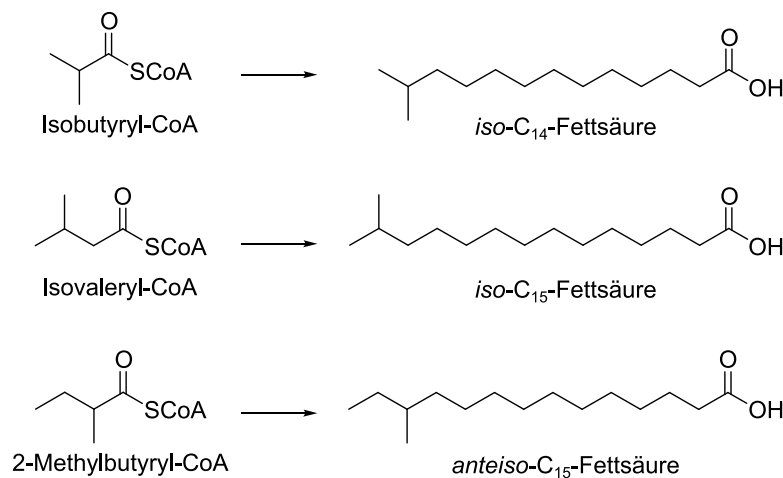
## 4 Diskussion

Caprazamycine gehören zur Gruppe der Liponucleosid-Antibiotika und sind potente Inhibitoren der bakteriellen Zellwand-Biosynthese. Ihre chemische Grundstruktur besteht aus einer Aminoribose, einem Uracil sowie einem methylierten Diazepanonring. An diesem Ring ist eine  $\beta$ -Hydroxyfettsäure verknüpft. Die Hydroxygruppe der Fettsäure ist wiederum mit einem 3-Methylglutaryl-Rest verestert, welcher an der zweiten Carbonsäuregruppe eine permethylierte L-Rhamnose trägt. Ihr komplexer chemischer Aufbau macht die Biosynthese der Caprazamycine abhängig von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Nucleotiden sowie Fettsäuren und ist somit auf unterschiedliche Primärstoffwechselwege des produzierenden Organismus angewiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Abhängigkeit vom Primärstoffwechsel noch weiter ausgeprägt ist. Obwohl die Caprazamycin-Biosynthese bereits zu einem gewissen Grad bekannt ist, wurde der Ursprung des 3-Methylglutaryl-Restes bisher nicht genauer untersucht. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Analysen, Gendeletionen und Genüberexpressionen, biologischen und chemischen Komplementierungen sowie biochemischen Untersuchungen, konnte die Biosynthese der Caprazamycine um ein Modell zur Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA erweitert werden. Dieses Modell beinhaltet zwei Wege: Zum einen tragen Gene des Caprazamycin-Genclusters zur Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA bei. Zum anderen kann aber auch der Primärstoffwechsel des heterologen Produzenten, in Form des Abbaufweges von Leucin und Isovalerat, zu dieser Biosynthese beitragen. Zuletzt wurde außerdem untersucht, welchen Einfluss die Regulation dieses Stoffwechselweges auf die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA hat.

### 4.1 Intermediate des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren für die Biosynthese von Naturstoffen

Der Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin ist eine reiche Quelle an Vorstufen für Metaboliten und Naturstoffe. Dieser Abbau beginnt mit der Transaminierung durch die verzweigt-kettigen Aminosäuren Aminotransferase

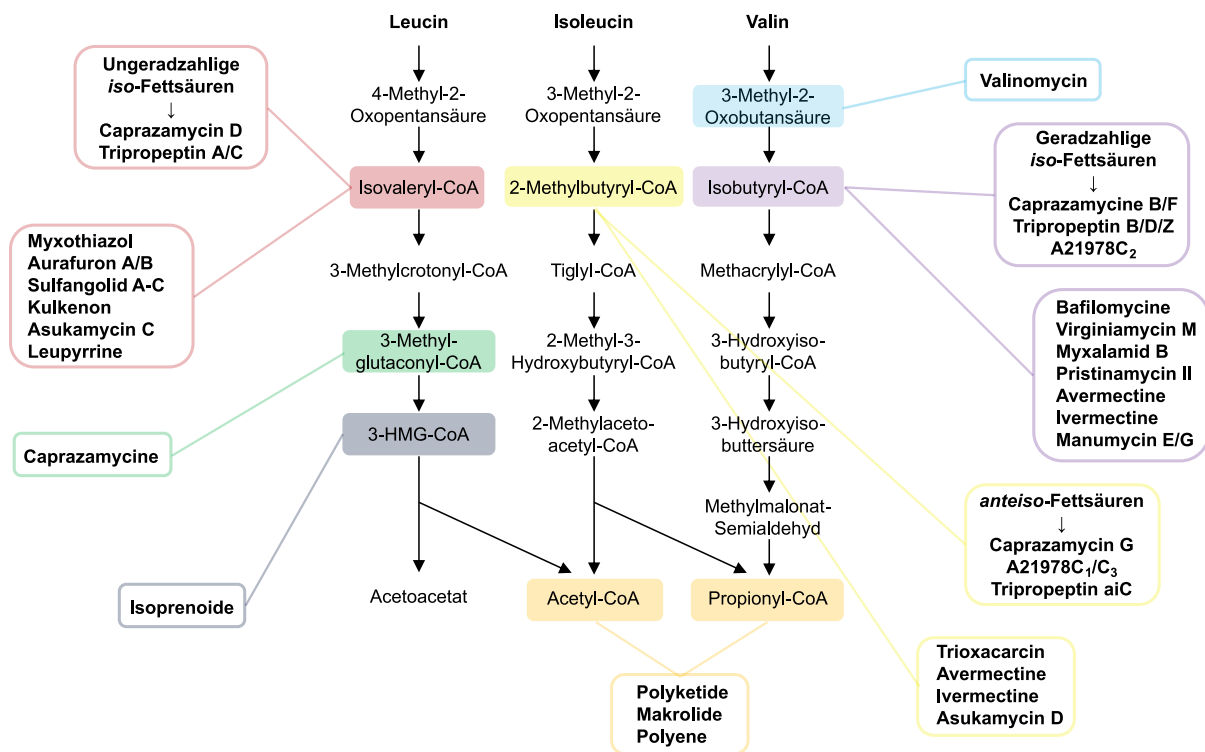
(BCAT) und der anschließenden oxidativen Decarboxylierung durch den verzweigt-kettige Aminosäuren Dehydrogenase Komplex (BCDH), unter Bildung von Isovaleryl-CoA, 2-Methylbutyryl-CoA und Isobutyryl-CoA. Diese Intermediate spielen eine entscheidende Rolle für die Biosynthese der verzweigt-kettigen Fettsäuren [91]. Beginnt der Zyklus der Fettsäure-Biosynthese mit Isovaleryl-CoA oder Isobutyryl-CoA anstelle von Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA, entstehen verzweigt-kettige *iso*-Fettsäuren (Abbildung 58). Wird hingegen 2-Methylbutyryl-CoA als Startereinheit verwendet, werden verzweigt-kettige *anteiso*-Fettsäuren gebildet.



**Abbildung 58:** Bausteine aus dem Abbauweg der verzweigt-kettigen Aminosäuren und die daraus entstehenden verzweigt-kettigen Fettsäuren, die in  $\beta$ -hydroxylierter Form in den Caprazamycinen vorkommen.

Durch den Einbau von  $\beta$ -hydroxylierten, verzweigt-kettigen *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren sind auch die Caprazamycine B, D, F und G auf diese Intermediate dieser Abbauwege angewiesen [69]. Möglichweise bieten die in dieser Arbeit generierten Gendelektionen der Isovaleryl-CoA Dehydrogenasen *sco2774* und *sco2779* einen Ansatzpunkt, um die Biosynthese von Caprazamycin D durch Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Isovaleryl-CoA zu erhöhen. In *Micrococcus luteus* *trpE16* konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil der entsprechenden verzweigt-kettigen Fettsäuren in der Zellmasse durch Zugabe von Isovaleryl-CoA, 2-Methylbutyryl-CoA und Isobutyryl-CoA erhöht [101]. Außerdem konnte durch eine Deletion des Genes, das für die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase *Mlut\_6870* kodiert, der Anteil an ungeraden *iso*-Fettsäuren von jeweils etwa 10 % auf knapp 40 % in Minimalmedium und 60 % in Komplexmedium gesteigert werden. Die Sulfatierung der Caprazamycin-Derivate ist ebenfalls von

verzweigt-kettigen Fettsäuren abhängig [81]. Die Typ III Polyketid Synthase Cpz6 verwendet als Startermolekül für die Biosynthese der Presulfidine A, B und C eine von zwei CoA- oder ACP-aktivierten *iso*- oder eine entsprechend aktivierte *anteiso*-Fettsäure. Durch die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA aus 3-Methylglutaconyl-CoA, welches im späteren Verlauf des Liu-Weges als Intermediat auftritt, ergibt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit neben den  $\beta$ -Hydroxyfettsäuren und der Sulfatierung eine dritte Abhängigkeit der Caprazamycin-Biosynthese vom Abbauweg des Leucins und Isovalerals.



**Abbildung 59:** Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin sowie von diesen Intermediaten abhängige Metaboliten und Naturstoffe.

Neben den Caprazamycinen beinhaltet auch eine Reihe weiterer Naturstoffe verzweigt-kettige Fettsäuren in ihrer chemischen Struktur. Bei A21978C handelt es sich um ein von *Streptomyces roseosporus* produziertes, komplexes Gemisch von cyclischen Lipopeptid-Antibiotika, die als Seitenkette verzweigt-kettige Fettsäuren tragen [118]. Das klinisch relevante Daptomycin wurde semisynthetisch aus A21978C abgeleitet, indem diese Seitenkette durch eine unverzweigte Fettsäure ersetzt wurde [119]. Auch in die Tripropeptine, produziert von *Lysobacter sp.* BMK333-48F3, werden verzweigt-kettige Fettsäuren eingebaut [120]. Durch Fermentation unter Zusatz von

0,8 % L-Isoleucin im Produktionsmedium konnte mit Tripropeptin aiC außerdem die Produktion eines neuen Derivates mit einer *anteiso*-Fettsäure erreicht werden [121]. Verzweigt-kettige Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffzahl spielen weiterhin eine bedeutende Rolle für die Fluidität der Zellmembran und machen etwa 75 % aller Fettsäuren in der Ordnung der *Myxobacteria* aus [122].

Neben der Biosynthese von Fettsäuren kann Isovaleryl-CoA auch direkt oder nach weiterer Modifikation für den Einbau in Naturstoffe verwendet werden. Die Biosynthese von Myxothiazol sowie Aurafuron A und B in *Stigmatella urantiaca* DW4/3-1 erfolgt durch eine Kombination aus Polyketid-Synthasen und nichtribosomalen Peptid-Synthetasen (Abbildung 60) [123-125]. Die Polyketid-Synthase verwendet hierbei als ungewöhnliche Startereinheit Isovaleryl-CoA. Dieselbe Startereinheit wird auch für die Biosynthese der Sulfangolide A-C sowie des eng verwandten Kulkenons verwendet, welche aus verschiedenen Stämmen von *Sorangium cellulosum* isoliert wurden [126]. Ebenfalls aus verschiedenen Stämmen dieses Myxobakteriums wurden die Leupyrrine isoliert [127]. Im Rahmen der Biosynthese dieser antimykotisch wirksamen Naturstoffe wird Isovaleryl-CoA zunächst in mehreren Schritten zu 2-Carboxy-3-Hydroxy-5-Methylhexanoyl-CoA umgewandelt, bevor dieses anschließend als ungewöhnliche Verlängerungseinheit durch das PKS-Modul verwendet wird [128].

Neben dem Abbau von Leucin wurde in Myxobakterien ein weiterer, alternativer Biosyntheseweg als Quelle für Isovaleryl-CoA entdeckt [129]. Das hierfür verantwortliche Operon besteht aus einem Regulator und vier Biosynthesegenen [130]. Diese Biosynthese ist der Richtung des Liu-Weges entgegengesetzt und gleicht somit der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA, die durch Enzyme des Caprazamycin-Genclusters katalysiert wird. Die erste Reaktion wird, analog zu Cpz5, durch eine 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase (MvaS) katalysiert, welche 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA aus Acetoacetyl-CoA und Acetyl-CoA synthetisiert [131]. Überraschenderweise wird der nächste Schritt dieser Reaktionskaskade, die Dehydratisierung von 3-HMG-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA, vom LiuC-Homologen von *Myxococcus xanthus* übernommen und nicht von einem Gen des Operons [130]. In diesem Stamm scheint LiuC daher darauf ausgelegt zu sein, die Richtung der katalysierten Reaktion zu ändern, abhängig von der metabolischen Lage der Zelle.

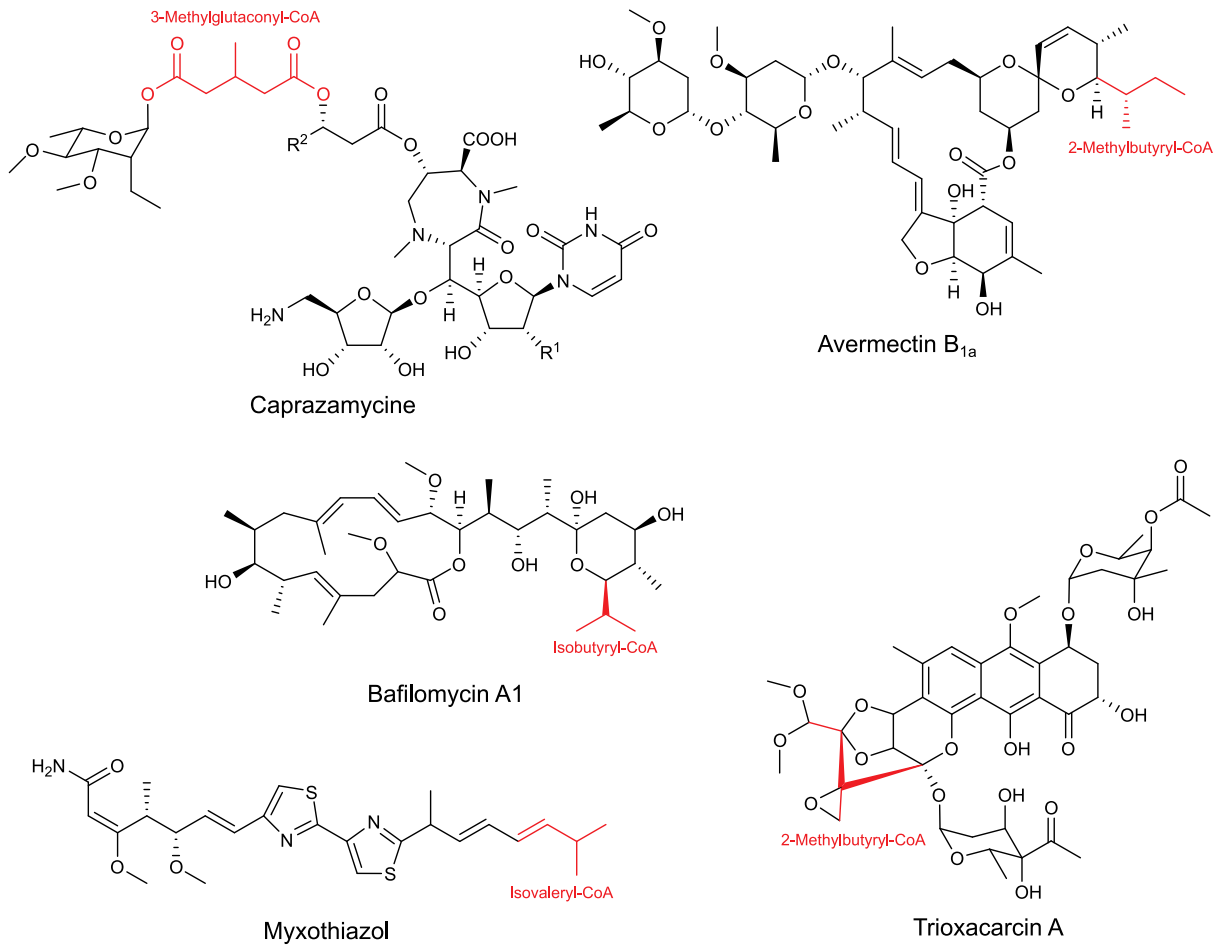
Das in dieser Arbeit in *Streptomyces coelicolor* M1154 identifizierte *liu*-Gencluster weist, analog zum Operon des alternativen Biosyntheseweges von Isovaleryl-CoA in *Myxococcus xanthus*, ebenfalls kein *liuC*-Homologes auf. Daher war *liuC* aus *Myxococcus xanthus*, neben *liuC* aus *Pseudomonas aeruginosa*, ein vielversprechender Anhaltspunkt für die Suche nach dem Homologen in *Streptomyces coelicolor*. Letzten Endes konnten von den zehn bioinformatisch identifizierten Kandidatengenen jedoch nur vier durch Gendeletionen untersucht werden. Mit *sco5144* und *sco6026* wurden außerdem zwei Gene gefunden, die nur zu *liuC* aus *Myxococcus xanthus*, nicht aber zu *liuC* aus *Pseudomonas* homolog waren. Falls dies auf die bidirektionale Funktion von LiuC in diesem Stamm zurückzuführen wäre, könnten diese beiden Gene vielversprechende Kandidaten für weitere Gendeletionen sein. Es besteht jedoch die Möglichkeit, wie nun auch für die Dehydrogenasen *sco2774* und *sco2779* gezeigt werden konnte, dass mehrere der Kandidatengene die Funktion von *liuC* übernehmen können. Um dies herauszufinden, wären arbeitsaufwendige Mehrfachdeletionen dieser Gene erforderlich. Weiterhin könnte das gesuchte Gen aber auch nicht unter den identifizierten Kandidaten sein, oder aber eine bidirektionale Funktion, wie in *Myxococcus xanthus*, ist in *Streptomyces coelicolor* nicht gegeben.

Ein weiterer, interessanter Aspekt sind geringfügige chemische Adaptionen von Intermediaten des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren, bevor diese in Naturstoffe eingebaut werden. Dies konnte in dieser Arbeit anhand der Umsetzung von 3-Methylglutaconyl-CoA zu 3-Methylglutaryl-CoA durch Cpz25 beobachtet werden. Neben den bereits erwähnten Leupyrrinen, die Isovaleryl-CoA von dem Einbau modifizieren, findet sich in *Streptomyces sp.* M10 ein weiteres Beispiel einer solchen Abwandlung. Die Biosynthese des von diesem Stamm produzierten, antimykotisch wirksamen Cyclopeptids Valinomycin benötigt D-Hydroxyisovaleriansäure. Diese wird durch Reduktion von 3-Methyl-2-Oxobutansäure, dem ersten Intermediat im Abbau von Valin, durch eine D-Hydroxyisovalerat Dehydrogenase bereitgestellt [132]. Im gleichen Stamm benötigt die Biosynthese des ebenfalls antimykotisch aktiven Bafilomycins Isobutyryl-CoA als Starteinheit, welches durch den BCDH-Komplex aus 3-Methyl-2-Oxobutansäure bereitgestellt wird und somit in Konkurrenz zur Biosynthese von Valinomycin steht [132, 133]. Isobutyryl-CoA wurde auch als Startereinheit für die Biosynthesen von Virginiamycin M in *Streptomyces virginiae*,

Myxalamid B in *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 und *Myxococcus xanthus* DK1622 sowie Pristinamycin II in *Streptomyces pristinaespiralis* vorgeschlagen [134-136]. Die Trioxacarcine wurden zunächst aus *Streptomyces bottropensis* DO-45 und später aus dem marinen Stamm *Streptomyces* sp. B8652 isoliert [137, 138]. Sie beinhalten eine chemisch ungewöhnliche Spiro-Epoxid-Struktur, die für den Wirkmechanismus durch Bindung an die DNA von Bedeutung zu sein scheint [139]. Diese Struktur entsteht aus 2-Methylbutyryl-CoA, welches wiederum aus dem Abbau von Isoleucin stammt. Die Avermectine und ihre hydrogenierten Derivate, die Ivermectine, sind gegen Parasiten wirksame Naturstoffe aus *Streptomyces avermitilis*. Als Startereinheiten für deren Biosynthese werden 2-Methylbutyryl-CoA oder Isobutyryl-CoA verwendet, was eine Einteilung in die A- und B-Unterserie ermöglicht und eine Abhängigkeit sowohl vom Isoleucin- als auch vom Valin-Abbau bedingt [140-142]. Die Familie der Manumycine verwendet hingegen sowohl Isovaleryl-CoA, 2-Methylbutyryl-CoA als auch Isobutyryl-CoA als PKS-Startereinheiten und benötigt somit Intermediate aller drei Abbauwege [93, 143].

Auch die Endprodukte der Abbauwege von Leucin, Valin und Isoleucin, Propionyl-CoA und Acetyl-CoA, sind vielfältige Startereinheiten für Naturstoffe, die durch Polyketidsynthasen synthetisiert werden. Zu diesen gehören beispielsweise die therapeutisch wichtigen, antimikrobiell wirksamen Polyketide, wie das Erythromycin und die antimykotisch wirksamen Polyene, wie das Nystatin [144-146].

Die Zelle kann Acetyl-CoA über verschiedene Metabolismus-Wege gewinnen, wobei die Glycolyse und die  $\beta$ -Oxidation zu den bedeutendsten gehören. Eine Studie in *Streptomyces coelicolor* konnte jedoch zeigen, dass der Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren mit einem Anteil von 50 % eine wichtige Quelle von Acetyl-CoA für die Biosynthese von Actinorhodin darstellt [147]. Jedoch konnte eine Überexpression der Gene des BCDH-Komplexes mit dem Ziel, die intrazelluläre Konzentration von Methylmalonyl-CoA und folglich die Biosynthese des Pikromycins zu erhöhen, diese im Stamm *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439 nur um das 1,3-fache steigern [148]. Die Überexpression des Gens der Methylmalonyl-CoA Mutase führte hingegen zu einer Steigerung der Pikromycin-Produktion auf das 1,7-fache, was auf mögliche Limitationen bei der Bereitstellung von Methylmalonyl-CoA durch den Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren hinweist.



**Abbildung 60:** Strukturformeln von ausgewählten Naturstoffen, die Intermediate des Abbaus verzweigtkettiger Aminosäuren beinhalten. In Rot dargestellt sind die Teilstrukturen, die auf diese Intermediate zurückzuführen sind.

Acetoacetat, als zusätzliches Endprodukt des Leucin-Abbaus, stellt außerdem eine weitere, mögliche Verbindung zwischen diesem Weg des Primärmetabolismus und der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA durch das Caprazamycin-Gencluster dar. Durch die Umsetzung von Acetoacetat zu Acetoacetyl-CoA könnte letzteres als Substrat von Cpz5 verwendet werden. Diese Katalyse dieser Reaktion erfolgt üblicherweise durch Acetoacetyl-CoA Synthetasen. Es konnte gezeigt werden, dass AacS in *Streptomyces lividans* TK24 für diese Reaktion verantwortlich ist [149]. Eine BLASTx-Analyse identifizierte Sco1393 als homologes Enzym zu AacS (99/99 % Identität/Similarität) in *Streptomyces coelicolor*, welches das in Abbildung 50 gezeigte Biosynthese-Modell um diese Reaktion erweitern könnte.

Sowohl die Endprodukte des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren als auch die Produkte des BCDH-Komplexes werden vielfach für die Biosynthese von Naturstoffen verwendet. Überraschend wenig ist hingegen über die Verwendung der weiteren Intermediate dieser Abbauewege für die Bildung von Sekundärmetaboliten bekannt. Der Mevalonat-Weg benötigt für die Biosynthese der großen Gruppe der Isoprenoide 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA [150]. Jedoch ist dieser Weg mit einer eigenen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase zur Bildung vom 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA ausgestattet und ist daher nicht auf den Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren angewiesen. In dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Intermediat 3-Methylglutaconyl-CoA als Vorstufe für die Biosynthese eines Naturstoffes Verwendung findet.

### **4.2 Die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA durch das Caprazamycin-Gencluster**

Das einzigartige 3-Methylglutaryl-Motiv wurde bisher in keinen anderen Naturstoffen als den Caprazamycinen, den Liposidomycinen, den Muraminomicinen, A-84830A und A-90289A gefunden [151, 152]. Das Gencluster von Liposidomycin wurde in *Streptomyces sp.* SN-1061M identifiziert. Die Liposidomycine weisen die gleiche chemische Kernstruktur wie die Caprazamycine auf, unterscheiden sich jedoch von diesen in der Konstitution des Fettsäure-Restes sowie in der Abwesenheit der L-Rhamnose [62, 83]. Daher zeigen die Gencluster beider Antibiotika eine große Homologie und eine ähnliche genetische Organisation. Der in dieser Arbeit entdeckte Biosyntheseweg hin zu 3-Methylglutaryl-CoA könnte auch mit homologen Genen des Liposidomycin-Genclusters bewerkstelligt werden. Dieses Gencluster enthält die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase LpmA (76/83 % Identität/Similarität zu Cpz5), die Acyl-CoA Synthase LpmR (88/91 % Identität/Similarität zu Cpz20) sowie die Acyl Dehydrogenase LpmW (91/95 % Identität/Similarität zu Cpz25). Auch das Gencluster von A-90289 aus *Streptomyces sp.* SANK 60405 enthält mit LipC (82/88 % Identität/Similarität zu Cpz5), LipQ (88/92 % Identität/Similarität zu Cpz20) und LipV (90/95 % Identität/Similarität zu Cpz25) entsprechende Enzyme für diesen Weg [64]. Obwohl das Gencluster der Muraminomicine mit Mra13 (87/90 % Identität/Similarität zu Cpz20) und Mra8 (84/88 % Identität/Similarität zu Cpz25) ebenfalls zwei homologe

Enzyme enthält, fehlt diesem Cluster ein Homologes zu Cpz5 [65]. Es stellt sich daher die Frage, ob die Biosynthese von 3-Methylglutaconyl-CoA als Substrat von Mra8 in diesem Stamm ausschließlich auf den Primärmetabolismus zurückzuführen ist.

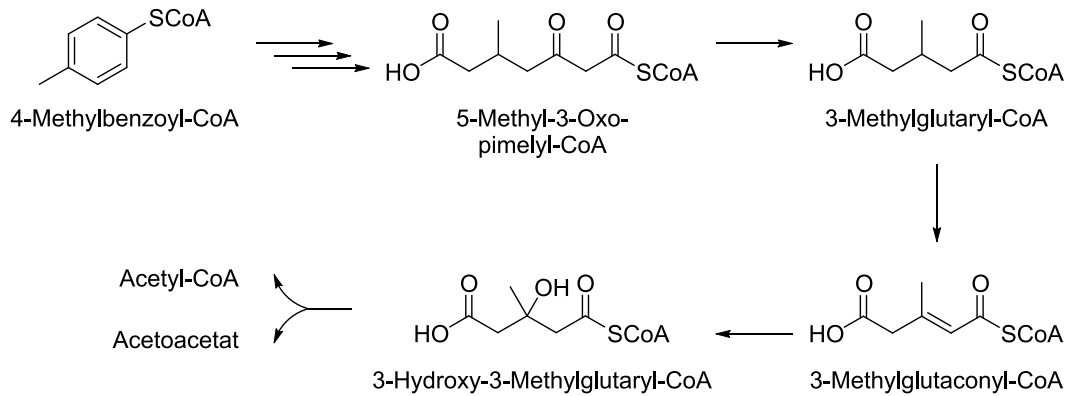
Eine Gendeletion von *cpz20* führte, unabhängig von Deletionen des *liu*-Genclusters, zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen. Als mögliche Acyl-CoA Synthase der Klasse I der Adenylat-bildenden Enzyme könnte Cpz20 eine Rolle in der Aktivierung im Rahmen der Übertragung von 3-Methylglutaryl-CoA auf die Hydroxyacylcaprazole einnehmen. Adenylat-bildende Enzyme generieren in einem 2-Schritt Mechanismus Thioester, Amide oder Ester [153]. Im ersten Schritt wird hierbei ein Adenyl-Rest auf eine freie Carboxylgruppe des Substrates übertragen. Im zweiten Schritt reagiert ein Nucleophil unter Bildung des Esters oder Amids und Abspaltung des Adenylats. Eine direkte Aktivierung von 3-Methylglutaryl-CoA scheint jedoch unwahrscheinlich, da dieses bereits als aktiviertes CoA-Substrat vorliegt. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Aktivierung der  $\beta$ -Hydroxygruppe des Fettsäure-Restes des Hydroxyacylcaprazols, welche jedoch mit dem beschriebenen Mechanismus nicht vereinbar wäre. Enzyme ähnlich zu Cpz20 werden auch von den Genclustern von Tautomycetin (TmcF 46/49 % Identität/Similarität), Tautomycin (TtmN 46/59 % Identität/Similarität) sowie Streptoseomycin (StmG; 45/48 % Identität/Similarität) codiert [154-156]. Allen drei Enzymen wird eine Beteiligung an den Biosynthesen eines Maleimids oder eines Maleinsäureanhydrids zugeschrieben, welche jeweils eine Propionsäure-Seitenkette tragen. Es ist denkbar, dass die Carboxylgruppe der Seitenketten von diesen Enzymen als CoA-Ester aktiviert wird. Die Esterasen TmcC, StmI und TtmK könnten diese aktivierten Intermediate im Anschluss auf eine freie Hydroxygruppe eines parallel synthetisierten, linearen Polyketids übertragen. Im Unterschied zur Caprazamycin-Biosynthese, in der das 3-Methylglutaryl-CoA bereits aktiviert ist, liegt das zu übertragende Intermediat in diesen Biosynthesen allerdings als freie Säure vor. Genauere Untersuchungen dieser Enzyme könnten jedoch helfen, die Funktion von Cpz20 aufzuklären, da mit Cpz20 und Cpz21 auch in der Caprazamycin-Biosynthese eine Kombination aus aktivierendem Enzym und Esterase vorkommen. Zur Klasse I der Adenylat-bildenden Enzymen gehören jedoch auch die Acyl-ACP Synthetasen [157]. Denkbar wäre ebenfalls, dass Cpz20 zunächst eine Übertragung von 3-Methylglutaconyl-CoA auf ein Acyl-Carrier-Protein katalysiert, bevor die Reduktion der Doppelbindung durch Cpz25 erfolgt.

Analog zu *cpz20* führte auch eine Gendeletion von *cpz25* zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen. Dies war ebenfalls unabhängig von Gendeletionen des *liu*-Clusters. Als mögliche Intermediate, die von Cpz25 umgesetzt werden, kommen 3-Methylglutaconyl-CoA oder 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA in Betracht. Durch das unbekanntes *liuC*-Homolog konnte durch Gendeletionen jedoch keine abschließende Bestimmung dieses Intermediates erreicht werden. Da auch die biochemische Charakterisierung von Cpz25 nicht erfolgreich war, steht ein Nachweis des tatsächlichen Substrates von Cpz25 weiterhin aus. Anhand der bioinformatischen Analyse könnte Cpz25 sowohl eine Alkohol-Dehydrogenase als auch eine Enoyl Reduktase darstellen. Die Reduktion der Hydroxygruppe von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA ist jedoch chemisch nicht möglich, da es sich bei dieser um einen tertiären Alkohol handelt. Für eine Funktion als Enoyl Reduktase spricht außerdem, dass Cpz25 Homologie zur Enoyl Reduktase MupE des Mupirocin-Genclusters aufweist [158]. Im Rahmen der Biosynthese von Mupirocin entsteht als Intermediat eine 9-Hydroxynonansäure, welche aus einer durch drei Malonyl-Einheiten verlängerten 3-Hydroxypropionat-Startereinheit entstehen könnte. Es wird diskutiert, dass MupE an dieser Biosynthese als eigenständige Enoyl Reduktase an der Hydrierung von Doppelbindungen beteiligt ist [159]. Dies entspräche der Funktion, die für Cpz25 in der vorliegenden Arbeit postuliert wurde.

Die Dehydratisierung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA ist erforderlich, um die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA durch Gene des Caprazamycin-Genclusters zu bewerkstelligen. Wie bereits beschrieben, konnten jedoch keine oder nicht alle Gene des heterologen Produzenten *Streptomyces coelicolor* M1154 gefunden werden, die für diese Umsetzung verantwortlich sind. Das Caprazamycin-Gencluster codiert mit der möglichen Dehydratase Cpz2 selbst für einen weiteren Kandidaten für diesen Schritt [80]. Die durchgeführte Gendeletion von *cpz2* in Verbindung mit einer Deletion des Liu-Weges führte allerdings nicht zu einer Akkumulation von Hydroxyacylcaprazolen. Auch konnte Cpz2 die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA *in-vitro* nicht katalysieren. Eine *BLASTx*-Analyse konnte Cpz2 zur Familie der MaoC Dehydratasen zuordnen. In *E. coli* codiert *maoC* für eine Enoyl-CoA Hydratase, die 3-Hydroxyacyl-CoAs aus Enoyl-CoAs des Fettsäureabbaus bereitstellt, welche dann für die Biosynthese von Polyhydroxyalkanoaten verwendet wird [160]. Biochemische Untersuchungen von

PhaJ, einem als MaoC-ähnlich annotiertem Enzyms aus *Bacillus cereus*, konnten dessen Katalyse der *in-vitro*-Umsetzung von Crotonyl-CoA zu 3-Hydroxybutyryl-CoA zeigen [161]. Dies lässt vermuten, dass es sich bei Cpz2 ebenfalls um eine Hydratase anstelle der gesuchten Dehydratase handeln könnte. Dem entgegen spricht, dass Cpz2 *in-vitro* in der Lage war, die Wasserabspaltung an kurzkettigen, ungesättigten 3-Hydroxyacyl-SNAC-Estern zu katalysieren [162]. Eine Analyse der Gencluster von Liposidomycinen, A-90289A und Muraminomicinen konnte jedoch keine homologen Gene zu *cpz2* aufzeigen, was ebenfalls gegen eine Beteiligung an der Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA spricht [62, 64, 65]. Ob *cpz2* Teil des Caprazamycin-Genclusters ist und welche biologische Funktion von diesem Gen codiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA ist vollständig abhängig von den Genen *cpz20* und *cpz25* des Caprazamycin-Genclusters. Die Entdeckung neuer Biosynthesewege des Primärmetabolismus, die 3-Methylglutaryl-CoA als Zwischenstufe enthalten, könnten jedoch ein vielversprechender Startpunkt für die Suche nach neuen Naturstoffen sein, die dieses ungewöhnliche Motiv enthalten. Ein Beispiel eines solchen Stoffwechselweges findet sich in *Magnetospirillum sp.* pMbN1 aus der Abteilung der Proteobacteria. Dieses ist in der Lage unter anaeroben Bedingungen 4-Methylbenzoyl-CoA abzubauen [163]. Ein Intermediat in diesem Abbauweg ist 3-Methylglutaryl-CoA, welches zunächst zu 3-Methylglutaconyl-CoA umgesetzt wird und im weiteren Verlauf, analog zum Liu-Weg, in Acetyl-CoA und Acetoacetat umgewandelt wird (Abbildung 61). Die Bildung von 3-Methylglutaryl-CoA scheint somit nicht ausschließlich auf Gencluster des Sekundärmetabolismus beschränkt zu sein.



**Abbildung 61:** Abbauweg von 4-Methylbenzoyl-CoA in *Magnetospirillum* sp. pMbn1.

### 4.3 Die Regulation des *liu*-Genclusters

Die Regulation der Transkription ist ein wichtiger Mechanismus in der Steuerung des Metabolismus. Transkriptionsfaktoren spielen hierbei eine wichtige Rolle in der Regulierung der Transkription spezifischer Gene, indem sie als Aktivatoren oder Repressoren dieser Gene agieren können [164]. Die Proteine der TetR-Familie dienen als chemische Sensoren der Zelle, die in der Lage sind, die Genexpression dynamisch an Änderungen der Wachstumsbedingungen, wie beispielsweise des Nährstoffangebots, anzupassen [165]. Sie kommen üblicherweise als Homodimere vor, wobei sich jedes Monomer in zwei Domänen einteilen lässt [166]. Die N-terminale Domäne beinhaltet ein charakteristisches *helix-turn-helix*-Motiv, welches der Bindung an die DNA dient und unter den Tet-Regulatoren signifikante Homologie aufweist. Die C-terminale Domäne dient hingegen der Dimerisierung und ist durch Variabilität in der Sequenz zur Bindung von unterschiedlichsten Liganden fähig. Die DNA-Bindestelle, auch Operator genannt, kommt meist als palindromische Sequenz vor [167]. Das Genom von *Streptomyces coelicolor* codiert für 965 regulatorische Proteine, von denen etwa 15 % auf Regulatoren der TetR-Familie entfallen [168, 169].

Die bioinformatische Analyse von *sco2775* des *liu*-Genclusters in *Streptomyces coelicolor* konnte zeigen, dass dieses Gen ebenfalls für einen möglichen Repressor der TetR-Familie codiert. Diese Repressoren können grundsätzlich in drei Typen eingeteilt werden, je nach genetischer Organisation [169]. Bei *sco2775* handelt es sich um einen Repressor des Typs I, da er in entgegengesetzter Richtung zu den von ihm regulierten Genen orientiert ist und die intergenische Region mit 97 bp unter der

festgelegten Grenze von 200 bp liegt. In *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 wurde mit SAV5279 kürzlich das homologe Protein zu Sco2775 beschrieben [113]. Es wurde außerdem gezeigt, dass die von diesem Repressor regulierten Gene, *aacA1* und *aacD1*, Homologe von *sco2777* (78 % Identität) und *sco2776* (90 % Identität) sind. Das regulierte Gencluster wird außerdem, analog zum *liu*-Gencluster in *Streptomyces coelicolor*, durch die Gene einer HMG-CoA Lyase *hmgL* und einer Isovaleryl-CoA Dehydrogenase *fadE4* vervollständigt. Die palindromische Bindestelle des Regulators wurde mit GTTAA-N6-TTAAC ebenfalls identifiziert und kommt im intergenischen Bereich zwischen *aacR* und *aacD1* vor beiden dieser Gene einmal vor. Es konnte weiter gezeigt werden, dass dieselbe Bindestelle analog auch zwischen *sco2775* und *sco2776* zweimal zu finden ist.

In anderen Bakterien erfolgt die Regulation des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren ebenfalls über Repressoren der TetR-Familie. In *Mycobacterium smegmatis* konnte gezeigt werden, dass *bkaR* (*MSMEG\_4718*) für einen Repressor der TetR-Familie codiert [170]. Zum einen führte eine Gendeletion dieses Repressors zu einer gesteigerten Expression der Gene des BCDH-Komplexes. Zum anderen stieg aber auch die Expression der angrenzenden Gene um das 10- bis 15-fache an, bei denen es sich unter anderem um die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten einer Acetyl/Propionyl-CoA Carboxylase handelte. Wenig später konnte diese Carboxylase dem Abbau von Leucin zugeschrieben werden [171]. In *Saccharopolyspora erythraea* reguliert der Repressor PccD (SACE3396) ebenfalls die Gene zweier Untereinheiten einer Propionyl-CoA Carboxylase [172]. Diese generiert Methylmalonyl-CoA aus Propionyl-CoA, welches unter anderem aus dem Abbau von Valin und Isovalerat stammt.

Neben der lokalen Regulation durch Sco2775 unterliegen die Gene des *liu*-Clusters auch dem Einfluss globaler Regulatoren. Für den Regulator Crp (*cyclic AMP receptor protein*) konnte neben einem positiven Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten auch gezeigt werden, dass er die Transkription von *sco2776* steigert [173]. Der zur ROK-Familie von Regulatoren gehörende Rok7B7 (Sco6008) scheint hingegen einen moderat negativen Einfluss auf die Proteinexpression von Sco2776, Sco2777 und Sco2779 zu haben. Diese war in einer Proteom-Analyse einer Mutante mit Gendeletion von *sco6008* im Vergleich zum Wildtyp um das 2- bis 3-fache erhöht [174].

Auch stellt sich die Frage, welche weiteren Gene von *Sco2775* reguliert werden. Die Biosynthese des Desferrioxamin-Siderophors wird von den Genen *sco2782-sco2785* codiert, während die Funktionen von *sco2780* und *sco2781* zwar mit dieser Biosynthese assoziiert werden, der Beweis aber bisher nicht erbracht wurde [175, 176]. Das direkt vor *sco2774* liegende *sco2773* codiert für eine mögliche Acyl-CoA Thioesterase. Im Rahmen des Abbaus von Valin wird 3-Hydroxyisobutyryl-CoA unter Spaltung des CoA-Thioesters zu 3-Hydroxyisobuttersäure umgesetzt [177]. Falls *sco2773* für diese Umsetzung verantwortlich wäre, könnte *Sco2775* durch Regulation dieses Gens eine erweiterte Rolle in der Regulation des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren zukommen.

Der Einfluss von *sco2775* auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Eine Gendeletion von *accR* in *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 führte zu einer Steigerung der Genexpression von *accA1* und *accD1* um das 120-fache nach zwei Tagen, sowie das über 500-fache nach sechs Tagen Kultivierung [113]. Somit könnte eine Deletion von *sco2775* in gleicher Weise dazu führen, dass mehr 3-Methylglutaconyl-CoA über den Liu-Weg bereitgestellt wird, welches dann von *Cpz25* zu 3-Methylglutaryl-CoA umgesetzt und in die Caprazamycin-Aglycone eingebaut werden kann. Es konnte jedoch keine derartige Produktionssteigerung für die Mutanten mit einer Deletion von *sco2775* beobachtet werden. Im Allgemeinen bewegten sich die in dieser Arbeit beobachteten Produktionsmengen der Caprazamycin-Aglycone in Bereichen, wie sie bereits für *Streptomyces coelicolor* M1154 mit durchschnittlich 152 mg/L publiziert wurden [178]. Durch die Einführung einer starken Promotorkassette konnte zwar eine konstante, höhere Produktion mit durchschnittlich 304 mg/L erreicht werden, welche durch eine zusätzliche Deletion von *sco2775* jedoch wieder auf 259 mg/L sank.

Die Akkumulation geringer Mengen an Hydroxyacylcaprazolen, deren Produktion in diesem Experiment bei jeweils etwa 30 mg/L lag, könnte eine unzureichende Umwandlung durch *Cpz21* dieser Hydroxyacylcaprazole aufgrund von fehlendem 3-Methylglutaryl-CoA nahelegen. Eine zu geringe Menge 3-Methylglutaryl-CoA könnte auch erklären, warum die Mutante mit einer Deletion von *sco2775* weniger Caprazamycin-Aglycone produzierte als die Mutante ohne Deletion. Die Deletion von *sco2775* sollte die Transkription aller *liu*-Gene und möglicherweise auch die des bisher unbekanntes *liuC*-Homologen steigern. Hierdurch könnte es zu einem Vermehrten Abbau von 3-Methylglutaconyl-CoA durch das *liuC*-Homolog und *sco2778* kommen,

wodurch dieses für die Umwandlung durch Cpz25 zu 3-Methylglutaryl-CoA nicht mehr zur Verfügung stände. Um diese Wechselwirkungen besser zu verstehen, wären weitere Untersuchungen von Naturstoffen nötig, die ebenfalls Intermediate des Abbaus von verzweigtkettigen Aminosäuren für ihre Biosynthese benötigen. Eine Quantifizierung der Liu-Intermediate sowie von 3-Methylglutaryl-CoA wäre ebenfalls denkbar, um die Auswirkung einer Deletion von *sco2775* auf deren Konzentrationen einschätzen zu können. Hierfür könnte eine kürzlich publizierte, massenspektrometrische Methode zur Quantifizierung von CoA-Thioestern in Mikroorganismen eingesetzt werden, die unter anderem auch für *Streptomyces albus* J1074 geeignet war [179].

Bereits publizierte Studien zielen hingegen meist darauf ab, durch Deletion des Regulators die Konzentration der Endprodukte des Abbaus der entsprechenden, verzweigtkettigen Aminosäuren zu erhöhen. Im industriell eingesetzten Stamm *Streptomyces avermitilis* A8 konnte die Produktion von Avermectin B<sub>1A</sub> durch eine Deletion des *liu*-Regulators *aacR* um 14,5 % erhöht werden [113]. Eine Deletion des Regulators *bkdR* (*XNRR2\_3053*) des BCDH-Komplexes in *Streptomyces albus* J1074/R2 konnte eine um das 4-fach erhöhte Produktion der Pamamycine erzielen, wobei sich auch das Zellwachstum, gemessen an der spezifischen Wachstumsrate, um 60 % beschleunigte [180]. Das entsprechende Homolog Sco3832 (83 % Identität) in *Streptomyces coelicolor* wäre somit ein weiterer, vielversprechender Ansatzpunkt, um die Biosynthese von 3-Methylglutaryl-CoA und somit auch der Caprazamycine weiter zu erhöhen. Andererseits könnte mit den beobachteten Produktionsmengen der Caprazamycin-Aglycone bereits eine Grenze erreicht worden sein, die bei Überschreitung eine Toxizität für den heterologen Produzenten bedeutet [181].

Die Bindung von Liganden an den Regulator des Liu-Weges wurde anhand von AccR aus *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 mittels EMSA-Studien untersucht [113]. 3-Methylcrotonyl-CoA als frühes Intermediat des Liu-Weges konnte die Bindung von AccR an die intergenische Region zwischen *accR* und *accD1* am besten aufheben, gefolgt von Propionyl-CoA. Von Acetyl-CoA waren hingegen weit höhere Konzentrationen nötig, um den gleichen Effekt zu erzielen, während Malonyl- und Methylmalonyl-CoA keine Bindung an AccR zeigten. Um herauszufinden, ob die Bindung von Sco2775 ebenfalls von Intermediaten des Liu-Weges beeinflusst wird, wurden Fütterungsexperimente durchgeführt. Neben L-Leucin und 3-Methylcrotonyl-

SNAc wurde mit Isovaleryl-SNAc ein weiteres, frühes Intermediat des Liu-Weges verwendet, welches in den EMSA-Studien von AccR nicht untersucht wurde. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten waren alle Liganden in der Lage, einer Überexpression von *sco2775* entgegenzuwirken, was durch eine Produktionssteigerung der Caprazamycin-Aglycone detektiert wurde. Der Effekt von 5 mM Isovaleryl-SNAc im Kulturmedium war hierbei am stärksten, gefolgt von 3-Methylcrotonyl-SNAc und L-Leucin. In der Literatur wurden ähnliche Fütterungsexperimente von Isobutansäure, Isovaleriansäure und 2-Methylbutansäure mit Konzentrationen von 4 mM beschrieben [101]. Isovaleryl-CoA bindet außerdem an AibR, dem Regulator des Operons, das für den alternativen Biosyntheseweg von Isovaleryl-CoA in *Myxococcus xanthus* codiert [182]. Auch bei diesem handelt es sich um einen Regulator der TetR-Familie, welcher jedoch entgegen der typischen Funktionsweise seine DNA-Bindestelle erst blockiert, wenn der Ligand gebunden hat. Die in dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsexperimente unterliegen jedoch verschiedenen Einflüssen, wie unterschiedlich effizienter Aufnahme in die Zelle, Metabolisierung durch andere Stoffwechselwege oder einer endogenen Biosynthese der Liganden. Daher wären auch für *Sco2775* EMSA-Studien nötig, um die wahren Liganden und deren Bindungsaffinität zu bestimmen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. **Fuchs G.** Allgemeine Mikrobiologie. Schlegel H-G, editor. Stuttgart: Thieme; 2007.
2. **Gautam A, Vyas R, Tewari R.** Peptidoglycan biosynthesis machinery: a rich source of drug targets. *Crit Rev Biotechnol.* 2011;31(4):295-336.
3. **Jaeger T, Mayer C.** N-acetylmuramic acid 6-phosphate lyases (MurNAc etherases): role in cell wall metabolism, distribution, structure, and mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(6):928-39.
4. **Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D.** Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):168-207.
5. **Irazoki O, Hernandez SB, Cava F.** Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Front Microbiol.* 2019;10:500.
6. **Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA.** Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):149-67.
7. **Aliashkevich A, Cava F.** LD-transpeptidases: the great unknown among the peptidoglycan cross-linkers. *FEBS J.* 2022;289(16):4718-30.
8. **van der Aart LT, Spijksma GK, Harms A, Vollmer W, Hankemeier T, van Wezel GP.** High-Resolution Analysis of the Peptidoglycan Composition in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 2018;200(20).
9. **Hammes WP, Neukam R, Kandler O.** On the specificity of the uridine diphospho-N-acetylmuramyl-alanyl-D-glutamic acid: diamino acid ligase of *Bifidobacterium globosum*. *Arch Microbiol.* 1977;115(1):95-102.
10. **Schleifer KH, Kandler O.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 1972;36(4):407-77.
11. **Barreteau H, Sosic I, Turk S, Humljan J, Tomasic T, Zidar N, et al.** MurD enzymes from different bacteria: evaluation of inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(5):625-32.
12. **Zhou J, Cai Y, Liu Y, An H, Deng K, Ashraf MA, et al.** Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy. *Front Microbiol.* 2022;13:952633.
13. **van Heijenoort J.** Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(4):620-35.

14. **Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreulx D.** The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):208-33.
15. **Sham LT, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N.** Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science.* 2014;345(6193):220-2.
16. **Huang CY, Shih HW, Lin LY, Tien YW, Cheng TJ, Cheng WC, et al.** Crystal structure of *Staphylococcus aureus* transglycosylase in complex with a lipid II analog and elucidation of peptidoglycan synthesis mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6496-501.
17. **Egan AJF, Errington J, Vollmer W.** Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(8):446-60.
18. **Bush K, Bradford PA.** beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(8).
19. **Singh M, Chang J, Coffman L, Kim SJ.** Hidden Mode of Action of Glycopeptide Antibiotics: Inhibition of Wall Teichoic Acid Biosynthesis. *J Phys Chem B.* 2017;121(16):3925-32.
20. **Stone KJ, Strominger JL.** Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C 55 -isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(12):3223-7.
21. **Kuru E, Radkov A, Meng X, Egan A, Alvarez L, Dowson A, et al.** Mechanisms of Incorporation for D-Amino Acid Probes That Target Peptidoglycan Biosynthesis. *ACS Chem Biol.* 2019;14(12):2745-56.
22. **de Oliveira MVD, Furtado RM, da Costa KS, Vakil S, Lima AH.** Advances in UDP-N-Acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) Covalent Inhibition. *Front Mol Biosci.* 2022;9:889825.
23. **Chung BC, Zhao J, Gillespie RA, Kwon DY, Guan Z, Hong J, et al.** Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis. *Science.* 2013;341(6149):1012-6.
24. **Al-Dabbagh B, Olatunji S, Crouvoisier M, El Ghachi M, Blanot D, Mengin-Lecreulx D, et al.** Catalytic mechanism of MraY and WecA, two paralogues of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily. *Biochimie.* 2016;127:249-57.
25. **Al-Dabbagh B, Henry X, El Ghachi M, Auger G, Blanot D, Parquet C, et al.** Active site mapping of MraY, a member of the polyprenyl-phosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily, catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *Biochemistry.* 2008;47(34):8919-28.

26. **Bugg TD, Lloyd AJ, Roper DI.** Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase (MraY) as a target for antibacterial agents and antibacterial proteins. *Infect Disord Drug Targets.* 2006;6(2):85-106.
27. **Bugg TDH, Kerr RV.** Mechanism of action of nucleoside antibacterial natural product antibiotics. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):865-76.
28. **McErlean M, Liu X, Cui Z, Gust B, Van Lanen SG.** Identification and characterization of enzymes involved in the biosynthesis of pyrimidine nucleoside antibiotics. *Nat Prod Rep.* 2021;38(7):1362-407.
29. **Patel B, Ryan P, Makwana V, Zunk M, Rudrawar S, Grant G.** Caprazamycins: Promising lead structures acting on a novel antibacterial target MraY. *Eur J Med Chem.* 2019;171:462-74.
30. **Shiraishi T, Kuzuyama T.** Recent advances in the biosynthesis of nucleoside antibiotics. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):913-23.
31. **McDonald LA, Barbieri LR, Carter GT, Lenoy E, Lotvin J, Petersen PJ, et al.** Structures of the muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2002;124(35):10260-1.
32. **Cheng L, Chen W, Zhai L, Xu D, Huang T, Lin S, et al.** Identification of the gene cluster involved in muraymycin biosynthesis from *Streptomyces* sp. NRRL 30471. *Mol Biosyst.* 2011;7(3):920-7.
33. **Wiegmann D, Koppermann S, Wirth M, Niro G, Leyerer K, Ducho C.** Muraymycin nucleoside-peptide antibiotics: uridine-derived natural products as lead structures for the development of novel antibacterial agents. *Beilstein J Org Chem.* 2016;12:769-95.
34. **Chung BC, Mashalidis EH, Tanino T, Kim M, Matsuda A, Hong J, et al.** Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis. *Nature.* 2016;533(7604):557-60.
35. **Chatterjee S, Nadkarni SR, Vijayakumar EK, Patel MV, Ganguli BN, Fehlhaber HW, et al.** Napsamycins, new *Pseudomonas* active antibiotics of the mureidomycin family from *Streptomyces* sp. HIL Y-82,11372. *J Antibiot (Tokyo).* 1994;47(5):595-8.
36. **Chen RH, Buko AM, Whittern DN, McAlpine JB.** Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. II. Isolation and structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo).* 1989;42(4):512-20.
37. **Inukai M, Isono F, Takahashi S, Enokita R, Sakaida Y, Haneishi T.** Mureidomycins A-D, novel peptidyl-nucleoside antibiotics with spheroplast forming activity. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiot (Tokyo).* 1989;42(5):662-6.
38. **Xie Y, Chen R, Si S, Sun C, Xu H.** A new nucleosidyl-peptide antibiotic, sansanmycin. *J Antibiot (Tokyo).* 2007;60(2):158-61.

39. **Kaysser L, Tang X, Wemakor E, Sedding K, Hennig S, Siebenberg S, et al.** Identification of a napsamycin biosynthesis gene cluster by genome mining. *Chembiochem*. 2011;12(3):477-87.
40. **Li Q, Wang L, Xie Y, Wang S, Chen R, Hong B.** SsaA, a member of a novel class of transcriptional regulators, controls sansamycin production in *Streptomyces* sp. strain SS through a feedback mechanism. *J Bacteriol*. 2013;195(10):2232-43.
41. **Rackham EJ, Gruschow S, Ragab AE, Dickens S, Goss RJ.** Pacidamycin biosynthesis: identification and heterologous expression of the first uridyl peptide antibiotic gene cluster. *Chembiochem*. 2010;11(12):1700-9.
42. **Zhang W, Ostash B, Walsh CT.** Identification of the biosynthetic gene cluster for the pacidamycin group of peptidyl nucleoside antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16828-33.
43. **Fernandes PB, Swanson RN, Hardy DJ, Hanson CW, Coen L, Rasmussen RR, et al.** Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. III. Microbiologic profile. *J Antibiot (Tokyo)*. 1989;42(4):521-6.
44. **Isono F, Katayama T, Inukai M, Haneishi T.** Mureidomycins A-D, novel peptidyl nucleoside antibiotics with spheroplast forming activity. III. Biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1989;42(5):674-9.
45. **Yamaguchi H, Sato S, Yoshida S, Takada K, Itoh M, Seto H, et al.** Capuramycin, a new nucleoside antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1986;39(8):1047-53.
46. **Cai W, Goswami A, Yang Z, Liu X, Green KD, Barnard-Britson S, et al.** The Biosynthesis of Capuramycin-type Antibiotics: IDENTIFICATION OF THE A-102395 BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER, MECHANISM OF SELF-RESISTANCE, AND FORMATION OF URIDINE-5'-CARBOXAMIDE. *J Biol Chem*. 2015;290(22):13710-24.
47. **Funabashi M, Nonaka K, Yada C, Hosobuchi M, Masuda N, Shibata T, et al.** Identification of the biosynthetic gene cluster of A-500359s in *Streptomyces griseus* SANK60196. *J Antibiot (Tokyo)*. 2009;62(6):325-32.
48. **Funabashi M, Yang Z, Nonaka K, Hosobuchi M, Fujita Y, Shibata T, et al.** An ATP-independent strategy for amide bond formation in antibiotic biosynthesis. *Nat Chem Biol*. 2010;6(8):581-6.
49. **Murakami R, Fujita Y, Kizuka M, Kagawa T, Muramatsu Y, Miyakoshi S, et al.** A-102395, a new inhibitor of bacterial translocase I, produced by *Amycolatopsis* sp. SANK 60206. *J Antibiot (Tokyo)*. 2007;60(11):690-5.

50. **Muramatsu Y, Ishii MM, Inukai M.** Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s. II. Biological activities of A-500359 A, C, D and G. *J Antibiot (Tokyo)*. 2003;56(3):253-8.
51. **Muramatsu Y, Muramatsu A, Ohnuki T, Ishii MM, Kizuka M, Enokita R, et al.** Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and structure elucidation of A-500359 A, C, D and G. *J Antibiot (Tokyo)*. 2003;56(3):243-52.
52. **Muramatsu Y, Ohnuki T, Ishii MM, Kizuka M, Enokita R, Miyakoshi S, et al.** A-503083 A, B, E and F, novel inhibitors of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 62799. *J Antibiot (Tokyo)*. 2004;57(10):639-46.
53. **Muramatsu Y, Miyakoshi S, Ogawa Y, Ohnuki T, Ishii MM, Arai M, et al.** Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s. III. Deaminocaprolactam derivatives of capuramycin: A-500359 E, F, H; M-1 and M-2. *J Antibiot (Tokyo)*. 2003;56(3):259-67.
54. **Mashalidis EH, Kaeser B, Terasawa Y, Katsuyama A, Kwon DY, Lee K, et al.** Chemical logic of MraY inhibition by antibacterial nucleoside natural products. *Nat Commun*. 2019;10(1):2917.
55. **Takatsuki A, Arima K, Tamura G.** Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1971;24(4):215-23.
56. **Yamamoto K, Ichikawa S.** Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 2019;72(12):924-33.
57. **Wyszynski FJ, Hesketh AR, Bibb MJ, Davis BG.** Dissecting tunicamycin biosynthesis by genome mining: cloning and heterologous expression of a minimal gene cluster. *Chemical Science*. 2010;1(5).
58. **Almahayni K, Spiekermann M, Fiore A, Yu G, Pedram K, Mockl L.** Small molecule inhibitors of mammalian glycosylation. *Matrix Biol Plus*. 2022;16:100108.
59. **Campbell J, Singh AK, Santa Maria JP, Jr., Kim Y, Brown S, Swoboda JG, et al.** Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol*. 2011;6(1):106-16.
60. **Hakulinen JK, Hering J, Branden G, Chen H, Snijder A, Ek M, et al.** MraY-antibiotic complex reveals details of tunicamycin mode of action. *Nat Chem Biol*. 2017;13(3):265-7.
61. **Isono K, Uramoto M, Kusakabe H, Kimura K, Isaki K, Nelson CC, et al.** Liposidomycins: novel nucleoside antibiotics which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis. *J Antibiot (Tokyo)*. 1985;38(11):1617-21.

62. **Kaysser L, Siebenberg S, Kammerer B, Gust B.** Analysis of the liposidomycin gene cluster leads to the identification of new caprazamycin derivatives. *Chembiochem.* 2010;11(2):191-6.
63. **Fujita Y, Kizuka M, Funabashi M, Ogawa Y, Ishikawa T, Nonaka K, et al.** A-90289 A and B, new inhibitors of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 60405. *J Antibiot (Tokyo).* 2011;64(7):495-501.
64. **Funabashi M, Baba S, Nonaka K, Hosobuchi M, Fujita Y, Shibata T, et al.** The biosynthesis of liposidomycin-like A-90289 antibiotics featuring a new type of sulfotransferase. *Chembiochem.* 2010;11(2):184-90.
65. **Chi X, Baba S, Tibrewal N, Funabashi M, Nonaka K, Van Lanen SG.** The muraminomycin biosynthetic gene cluster and enzymatic formation of the 2-deoxyaminoribosyl appendage. *Medchemcomm.* 2013;4(1):239-43.
66. **Fujita Y, Kagoshima Y, Masuda T, Kizuka M, Ogawa Y, Endo S, et al.** Muraminomicins, new lipo-nucleoside antibiotics from *Streptosporangium* sp. SANK 60501-structure elucidations of muraminomicins and supply of the core component for derivatization. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):943-55.
67. **Igarashi M, Nakagawa N, Doi N, Hattori S, Naganawa H, Hamada M.** Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp. *J Antibiot (Tokyo).* 2003;56(6):580-3.
68. **Ishizaki Y, Hayashi C, Inoue K, Igarashi M, Takahashi Y, Pujari V, et al.** Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30309-19.
69. **Igarashi M, Takahashi Y, Shitara T, Nakamura H, Naganawa H, Miyake T, et al.** Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. II. Structure elucidation of caprazamycins. *J Antibiot (Tokyo).* 2005;58(5):327-37.
70. **Kimura K, Ikeda Y, Kagami S, Yoshihama M, Suzuki K, Osada H, et al.** Selective inhibition of the bacterial peptidoglycan biosynthesis by the new types of liposidomycins. *J Antibiot (Tokyo).* 1998;51(12):1099-104.
71. **Hirano S, Ichikawa S, Matsuda A.** Structure-activity relationship of truncated analogs of caprazamycins as potential anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(9):5123-33.
72. **Hirano S, Ichikawa S, Matsuda A.** Synthesis of caprazamycin analogues and their structure-activity relationship for antibacterial activity. *J Org Chem.* 2008;73(2):569-77.
73. **Ichikawa S, Yamaguchi M, Hsuan LS, Kato Y, Matsuda A.** Carbaprazamycins: Chemically Stable Analogues of the Caprazamycin Nucleoside Antibiotics. *ACS Infect Dis.* 2015;1(4):151-6.

74. **Hirano S, Ichikawa S, Matsuda A.** Design and synthesis of diketopiperazine and acyclic analogs related to the caprazamycins and liposidomycins as potential antibacterial agents. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(1):428-36.
75. **Ishizaki Y, Takahashi Y, Kimura T, Inoue M, Hayashi C, Igarashi M.** Synthesis and biological activity of analogs of CPZEN-45, a novel antituberculosis drug. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):970-80.
76. **Takahashi Y, Igarashi M, Miyake T, Soutome H, Ishikawa K, Komatsuki Y, et al.** Novel semisynthetic antibiotics from caprazamycins A-G: caprazene derivatives and their antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo).* 2013;66(3):171-8.
77. **Pitner RA, Durham PG, Stewart IE, Reed SG, Cassell GH, Hickey AJ, et al.** A Spray-Dried Combination of Capreomycin and CPZEN-45 for Inhaled Tuberculosis Therapy. *J Pharm Sci.* 2019;108(10):3302-11.
78. **Salomon JJ, Galeron P, Schulte N, Morow PR, Severynse-Stevens D, Huwer H, et al.** Biopharmaceutical in vitro characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis. *Ther Deliv.* 2013;4(8):915-23.
79. **Young EF, Durham PG, Perkowski EF, Malik S, Hickey AJ, Braunstein M.** Efficacy of inhaled CPZEN-45 in treating tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis (Edinb).* 2022;135:102207.
80. **Kaysser L, Lutsch L, Siebenberg S, Wemakor E, Kammerer B, Gust B.** Identification and manipulation of the caprazamycin gene cluster lead to new simplified liponucleoside antibiotics and give insights into the biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14987-96.
81. **Tang X, Eitel K, Kaysser L, Kulik A, Grond S, Gust B.** A two-step sulfation in antibiotic biosynthesis requires a type III polyketide synthase. *Nat Chem Biol.* 2013;9(10):610-5.
82. **Kaysser L, Eitel K, Tanino T, Siebenberg S, Matsuda A, Ichikawa S, et al.** A new arylsulfate sulfotransferase involved in liponucleoside antibiotic biosynthesis in streptomycetes. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12684-94.
83. **Kaysser L, Wemakor E, Siebenberg S, Salas JA, Sohng JK, Kammerer B, et al.** Formation and attachment of the deoxysugar moiety and assembly of the gene cluster for caprazamycin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(12):4008-18.
84. **Wiker F, Hauck N, Grond S, Gust B.** Caprazamycins: Biosynthesis and structure activity relationship studies. *Int J Med Microbiol.* 2019;309(5):319-24.
85. **Barnard-Britson S, Chi X, Nonaka K, Spork AP, Tibrewal N, Goswami A, et al.** Amalgamation of nucleosides and amino acids in antibiotic biosynthesis: discovery of an L-threonine:uridine-5'-aldehyde transaldolase. *J Am Chem Soc.* 2012;134(45):18514-7.

86. **Chi X, Pahari P, Nonaka K, Van Lanen SG.** Biosynthetic origin and mechanism of formation of the aminoribosyl moiety of peptidyl nucleoside antibiotics. *J Am Chem Soc.* 2011;133(36):14452-9.
87. **Cui Z, Overbay J, Wang X, Liu X, Zhang Y, Bhardwaj M, et al.** Pyridoxal-5'-phosphate-dependent alkyl transfer in nucleoside antibiotic biosynthesis. *Nat Chem Biol.* 2020;16(8):904-11.
88. **Yang Z, Chi X, Funabashi M, Baba S, Nonaka K, Pahari P, et al.** Characterization of LipL as a non-heme, Fe(II)-dependent alpha-ketoglutarate:UMP dioxygenase that generates uridine-5'-aldehyde during A-90289 biosynthesis. *J Biol Chem.* 2011;286(10):7885-92.
89. **Zadeh SM, Chen MH, Wang ZC, Astani EK, Lo IW, Lin KH, et al.** beta-Hydroxylation of alpha-amino-beta-hydroxybutanoyl-glycyluridine catalyzed by a nonheme hydroxylase ensures the maturation of caprazamycin. *Commun Chem.* 2022;5(1):87.
90. **Shiraishi T, Hiro N, Igarashi M, Nishiyama M, Kuzuyama T.** Biosynthesis of the antituberculous agent caprazamycin: Identification of caprazol-3"-phosphate, an unprecedented caprazamycin-related metabolite. *J Gen Appl Microbiol.* 2016;62(3):164-6.
91. **Kaneda T.** Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev.* 1991;55(2):288-302.
92. **Massey LK, Conrad RS, Sokatch JR.** Regulation of leucine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 1974;118(1):112-20.
93. **Moore BS, Hertweck C.** Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat Prod Rep.* 2002;19(1):70-99.
94. **Bezudnova EY, Boyko KM, Popov VO.** Properties of Bacterial and Archaeal Branched-Chain Amino Acid Aminotransferases. *Biochemistry (Mosc).* 2017;82(13):1572-91.
95. **Denoya CD, Fedechko RW, Hafner EW, McArthur HA, Morgenstern MR, Skinner DD, et al.** A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (bkdFGH) from *Streptomyces avermitilis*: its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a bkdF mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *J Bacteriol.* 1995;177(12):3504-11.
96. **Massey LK, Sokatch JR, Conrad RS.** Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976;40(1):42-54.
97. **Skinner DD, Morgenstern MR, Fedechko RW, Denoya CD.** Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis* and the production of a functional E1 [alpha beta] component in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995;177(1):183-90.

98. **Sprusansky O, Stirrett K, Skinner D, Denoya C, Westpheling J.** The bkdR gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *J Bacteriol.* 2005;187(2):664-71.
99. **Bode HB, Ring MW, Schwar G, Altmeyer MO, Kegler C, Jose IR, et al.** Identification of additional players in the alternative biosynthesis pathway to isovaleryl-CoA in the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *Chembiochem.* 2009;10(1):128-40.
100. **Forster-Fromme K, Hoschle B, Mack C, Bott M, Armbruster W, Jendrossek D.** Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(7):4819-28.
101. **Surger MJ, Angelov A, Stier P, Ubelacker M, Liebl W.** Impact of Branched-Chain Amino Acid Catabolism on Fatty Acid and Alkene Biosynthesis in *Micrococcus luteus*. *Front Microbiol.* 2018;9:374.
102. **Kazakov AE, Rodionov DA, Alm E, Arkin AP, Dubchak I, Gelfand MS.** Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J Bacteriol.* 2009;191(1):52-64.
103. **Forster-Fromme K, Jendrossek D.** Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of liu genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;286(1):78-84.
104. **Zhang YX, Denoya CD, Skinner DD, Fedechko RW, McArthur HAI, Morgenstern MR, et al.** Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology (Reading).* 1999;145 ( Pt 9):2323-34.
105. **Hoschle B, Gnau V, Jendrossek D.** Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by liuB/liuD and atuC/atuF, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 11):3649-56.
106. **Demirev AV, Lee JS, Sedai BR, Ivanov IG, Nam DH.** Identification and characterization of acetyl-CoA carboxylase gene cluster in *Streptomyces toxytricini*. *J Microbiol.* 2009;47(4):473-8.
107. **Chavez-Aviles M, Diaz-Perez AL, Reyes-de la Cruz H, Campos-Garcia J.** The *Pseudomonas aeruginosa* liuE gene encodes the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase, involved in leucine and acyclic terpene catabolism. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;296(1):117-23.
108. **Parks DH, Chuvochina M, Rinke C, Mussig AJ, Chaumeil PA, Hugenholtz P.** GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a

- phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D785-D94.
109. **Gilchrist CLM, Booth TJ, van Wersch B, van Grieken L, Medema MH, Chooi YH.** cblaster: a remote search tool for rapid identification and visualization of homologous gene clusters. *Bioinform Adv.* 2021;1(1):vbab016.
110. **Heath RJ, Rock CO.** The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep.* 2002;19(5):581-96.
111. **Aguilar JA, Zavala AN, Diaz-Perez C, Cervantes C, Diaz-Perez AL, Campos-Garcia J.** The atu and liu clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):2070-9.
112. **Bock T, Reichelt J, Muller R, Blankenfeldt W.** The Structure of LiuC, a 3-Hydroxy-3-Methylglutaconyl CoA Dehydratase Involved in Isovaleryl-CoA Biosynthesis in *Myxococcus xanthus*, Reveals Insights into Specificity and Catalysis. *Chembiochem.* 2016;17(17):1658-64.
113. **Lyu M, Cheng Y, Han X, Wen Y, Song Y, Li J, et al.** AccR, a TetR Family Transcriptional Repressor, Coordinates Short-Chain Acyl Coenzyme A Homeostasis in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(12).
114. **Siegl T, Tokovenko B, Myronovskiy M, Luzhetskyy A.** Design, construction and characterisation of a synthetic promoter library for fine-tuned gene expression in actinomycetes. *Metab Eng.* 2013;19:98-106.
115. **Bauman KD, Li J, Murata K, Mantovani SM, Dahesh S, Nizet V, et al.** Refactoring the Cryptic Streptophenazine Biosynthetic Gene Cluster Unites Phenazine, Polyketide, and Nonribosomal Peptide Biochemistry. *Cell Chem Biol.* 2019;26(5):724-36 e7.
116. **Bai C, Zhang Y, Zhao X, Hu Y, Xiang S, Miao J, et al.** Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(39):12181-6.
117. **Myronovskiy M, Luzhetskyy A.** Native and engineered promoters in natural product discovery. *Nat Prod Rep.* 2016;33(8):1006-19.
118. **Debono M, Barnhart M, Carrell CB, Hoffmann JA, Occolowitz JL, Abbott BJ, et al.** A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40(6):761-77.
119. **Lee SK, Kim HR, Jin YY, Yang SH, Suh JW.** Improvement of daptomycin production via increased resistance to decanoic acid in *Streptomyces roseosporus*. *J Biosci Bioeng.* 2016;122(4):427-33.

120. **Hashizume H, Hirosawa S, Sawa R, Muraoka Y, Ikeda D, Naganawa H, et al.** Tripropeptins, novel antimicrobial agents produced by *Lysobacter* sp. *J Antibiot* (Tokyo). 2004;57(1):52-8.
121. **Hashizume H, Igarashi M, Sawa R, Adachi H, Nishimura Y, Akamatsu Y.** A new type of tripropeptin with anteiso-branched chain fatty acid from *Lysobacter* sp. BMK333-48F3. *J Antibiot* (Tokyo). 2008;61(9):577-82.
122. **Díaz-Pérez AL, Díaz-Pérez C, Campos-García J.** Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2015;15(1):1-29.
123. **Frank B, Wenzel SC, Bode HB, Scharfe M, Blocker H, Muller R.** From genetic diversity to metabolic unity: studies on the biosynthesis of aurafurones and aurafuron-like structures in myxobacteria and streptomycetes. *J Mol Biol*. 2007;374(1):24-38.
124. **Silakowski B, Schairer HU, Ehret H, Kunze B, Weinig S, Nordsiek G, et al.** New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37391-9.
125. **Troxitzsch-Kienast W, Wray V, Gerth K, Reichenbach H, Höfle G.** Antibiotika aus Gleitenden Bakterien, XXVIII(1) Biosynthese des Myxothiazols in *Myxococcus fulvus* Mx f16. *Liebigs Annalen der Chemie*. 1986;1986(1):93-8.
126. **Zander W, Irschik H, Augustiniak H, Herrmann M, Jansen R, Steinmetz H, et al.** Sulfangolids, macrolide sulfate esters from *Sorangium cellulosum*. *Chemistry*. 2012;18(20):6264-71.
127. **Bode HB, Irschik H, Wenzel SC, Reichenbach H, Muller R, Hofle G.** The leupyrrins: a structurally unique family of secondary metabolites from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *J Nat Prod*. 2003;66(9):1203-6.
128. **Kopp M, Irschik H, Gemperlein K, Buntin K, Meiser P, Weissman KJ, et al.** Insights into the complex biosynthesis of the leupyrrins in *Sorangium cellulosum* So ce690. *Mol Biosyst*. 2011;7(5):1549-63.
129. **Mahmud T, Bode HB, Silakowski B, Kroppenstedt RM, Xu M, Nordhoff S, et al.** A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J Biol Chem*. 2002;277(36):32768-74.
130. **Li Y, Luxenburger E, Muller R.** An alternative isovaleryl CoA biosynthetic pathway involving a previously unknown 3-methylglutaconyl CoA decarboxylase. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013;52(4):1304-8.
131. **Bode HB, Ring MW, Schwar G, Kroppenstedt RM, Kaiser D, Muller R.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (CoA) synthase is involved in biosynthesis of isovaleryl-CoA in the myxobacterium *Myxococcus xanthus* during fruiting body formation. *J Bacteriol*. 2006;188(18):6524-8.

132. **Lee DW, Ng BG, Kim BS.** Increased valinomycin production in mutants of *Streptomyces* sp. M10 defective in bafilomycin biosynthesis and branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex expression. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015;42(11):1507-17.
133. **Nara A, Hashimoto T, Komatsu M, Nishiyama M, Kuzuyama T, Ikeda H.** Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in Actinomycetales microorganisms. *J Antibiot (Tokyo).* 2017;70(5):616-24.
134. **Bode HB, Meiser P, Klefisch T, Cortina NS, Krug D, Gohring A, et al.** Mutasynthesis-derived myxalamids and origin of the isobutyryl-CoA starter unit of myxalamid B. *Chembiochem.* 2007;8(17):2139-44.
135. **Mast Y, Weber T, Gölz M, Ort-Winklbauer R, Gondran A, Wohlleben W, et al.** Characterization of the 'pristinamycin supercluster' of *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbial Biotechnology.* 2011;4(2):192-206.
136. **Pulsawat N, Kitani S, Kinoshita H, Lee CK, Nihira T.** Identification of the *bkdAB* gene cluster, a plausible source of the starter-unit for virginiamycin M production in *Streptomyces virginiae*. *Arch Microbiol.* 2007;187(6):459-66.
137. **Maskey RP, Helmke E, Kayser O, Fiebig HH, Maier A, Busche A, et al.** Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereochemistry. *J Antibiot (Tokyo).* 2004;57(12):771-9.
138. **Tamaoki T, Shirahata K, Iida T, Tomita F.** Trioxacarcins, novel antitumor antibiotics. II. Isolation, physico-chemical properties and mode of action. *J Antibiot (Tokyo).* 1981;34(12):1525-30.
139. **Zhang M, Hou XF, Qi LH, Yin Y, Li Q, Pan HX, et al.** Biosynthesis of trioxacarcin revealing a different starter unit and complex tailoring steps for type II polyketide synthase. *Chem Sci.* 2015;6(6):3440-7.
140. **Hafner EW, Holley BW, Holdom KS, Lee SE, Wax RG, Beck D, et al.** Branched-chain fatty acid requirement for avermectin production by a mutant of *Streptomyces avermitilis* lacking branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1991;44(3):349-56.
141. **Ikeda H, Omura S.** Avermectin Biosynthesis. *Chem Rev.* 1997;97(7):2591-610.
142. **Yoon YJ, Kim ES, Hwang YS, Choi CY.** Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;63(6):626-34.
143. **Pospisil S, Petrickova K, Sedmera P, Halada P, Olsovska J, Petricek M.** Effect of starter unit availability on the spectrum of manumycin-type metabolites produced by *Streptomyces nodosus* ssp. *asukaensis*. *J Appl Microbiol.* 2011;111(5):1116-28.

144. **Kong D, Lee MJ, Lin S, Kim ES.** Biosynthesis and pathway engineering of antifungal polyene macrolides in actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2013;40(6):529-43.
145. **Park SR, Han AR, Ban YH, Yoo YJ, Kim EJ, Yoon YJ.** Genetic engineering of macrolide biosynthesis: past advances, current state, and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(5):1227-39.
146. **Weissman KJ, Bycroft M, Staunton J, Leadlay PF.** Origin of starter units for erythromycin biosynthesis. *Biochemistry.* 1998;37(31):11012-7.
147. **Stirrett K, Denoya C, Westpheling J.** Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the Type II polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(1):129-37.
148. **Yi JS, Kim M, Kim EJ, Kim BG.** Production of pikromycin using branched chain amino acid catabolism in *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018;45(5):293-303.
149. **Tucker AC, Escalante-Semerena JC.** Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 2013;87(1):152-67.
150. **Dairi T.** Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo).* 2005;58(4):227-43.
151. **Ichikawa S, Yamaguchi M, Matsuda A.** Antibacterial Nucleoside Natural Products Inhibiting Phospho-MurNAc-Pentapeptide Translocase; Chemistry and Structure-Activity Relationship. *Curr Med Chem.* 2015;22(34):3951-79.
152. **Kimura KI.** Liposidomycin, the first reported nucleoside antibiotic inhibitor of peptidoglycan biosynthesis translocase I: The discovery of liposidomycin and related compounds with a perspective on their application to new antibiotics. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):877-89.
153. **Schmelz S, Naismith JH.** Adenylate-forming enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(6):666-71.
154. **Choi SS, Hur YA, Sherman DH, Kim ES.** Isolation of the biosynthetic gene cluster for tautomycetin, a linear polyketide T cell-specific immunomodulator from *Streptomyces* sp. CK4412. *Microbiology (Reading).* 2007;153(Pt 4):1095-102.
155. **Li W, Ju J, Rajski SR, Osada H, Shen B.** Characterization of the tautomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces spiroverticillatus* unveiling new insights into dialkylmaleic anhydride and polyketide biosynthesis. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28607-17.

156. **Zhang B, Wang KB, Wang W, Bi SF, Mei YN, Deng XZ, et al.** Discovery, Biosynthesis, and Heterologous Production of Streptoseomycin, an Anti-Microaerophilic Bacteria Macrodilactone. *Org Lett.* 2018;20(10):2967-71.
157. **Beld J, Finzel K, Burkart MD.** Versatility of acyl-acyl carrier protein synthetases. *Chem Biol.* 2014;21(10):1293-9.
158. **El-Sayed AK, Hothersall J, Cooper SM, Stephens E, Simpson TJ, Thomas CM.** Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Chem Biol.* 2003;10(5):419-30.
159. **Hothersall J, Wu J, Rahman AS, Shields JA, Haddock J, Johnson N, et al.** Mutational analysis reveals that all tailoring region genes are required for production of polyketide antibiotic mupirocin by *pseudomonas fluorescens*: pseudomonic acid B biosynthesis precedes pseudomonic acid A. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15451-61.
160. **Dillon SC, Bateman A.** The Hotdog fold: wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. *BMC Bioinformatics.* 2004;5:109.
161. **Kihara T, Hiroe A, Ishii-Hyakutake M, Mizuno K, Tsuge T.** *Bacillus cereus*-type polyhydroxyalkanoate biosynthetic gene cluster contains R-specific enoyl-CoA hydratase gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(8):1627-35.
162. **Yin Z, Bar D, Gust B, Dickschat JS.** The substrate scope of dehydratases in antibiotic biosynthesis and their application in kinetic resolutions. *Org Biomol Chem.* 2022;20(46):9103-7.
163. **Lahme S, Eberlein C, Jarling R, Kube M, Boll M, Wilkes H, et al.** Anaerobic degradation of 4-methylbenzoate via a specific 4-methylbenzoyl-CoA pathway. *Environ Microbiol.* 2012;14(5):1118-32.
164. **Romero-Rodriguez A, Robledo-Casados I, Sanchez S.** An overview on transcriptional regulators in *Streptomyces*. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(8):1017-39.
165. **Werten S, Waack P, Palm GJ, Virolle MJ, Hinrichs W.** Crystal structures of free and ligand-bound forms of the TetR/AcrR-like regulator SCO3201 from *Streptomyces coelicolor* suggest a novel allosteric mechanism. *FEBS J.* 2023;290(2):521-32.
166. **Deng W, Li C, Xie J.** The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal.* 2013;25(7):1608-13.
167. **Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X, et al.** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(2):326-56.
168. **Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, et al.** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 2002;417(6885):141-7.

169. **Cuthbertson L, Nodwell JR.** The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(3):440-75.
170. **Balhana RJ, Swanston SN, Coade S, Withers M, Sikder MH, Stoker NG, et al.** bkaR is a TetR-type repressor that controls an operon associated with branched-chain keto-acid metabolism in Mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;345(2):132-40.
171. **Ehebauer MT, Zimmermann M, Jakobi AJ, Noens EE, Laubitz D, Cichocki B, et al.** Characterization of the mycobacterial acyl-CoA carboxylase holo complexes reveals their functional expansion into amino acid catabolism. *PLoS Pathog.* 2015;11(2):e1004623.
172. **Xu Z, Wang M, Ye BC.** TetR Family Transcriptional Regulator PccD Negatively Controls Propionyl Coenzyme A Assimilation in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol.* 2017;199(20).
173. **Gao C, Hindra, Mulder D, Yin C, Elliot MA.** Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomycetes. *mBio.* 2012;3(6).
174. **Swiatek MA, Gubbens J, Bucca G, Song E, Yang YH, Laing E, et al.** The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in streptomycetes coelicolor. *J Bacteriol.* 2013;195(6):1236-48.
175. **Nett M, Ikeda H, Moore BS.** Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep.* 2009;26(11):1362-84.
176. **Tunca S, Barreiro C, Sola-Landa A, Coque JJ, Martin JF.** Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the desA gene. *FEBS J.* 2007;274(4):1110-22.
177. **Rendina G, Coon MJ.** Enzymatic hydrolysis of the coenzyme a thiol esters of beta-hydroxypropionic and beta-hydroxyisobutyric acids. *J Biol Chem.* 1957;225(1):523-34.
178. **Flinspach K, Westrich L, Kaysser L, Siebenberg S, Gomez-Escribano JP, Bibb M, et al.** Heterologous expression of the biosynthetic gene clusters of coumermycin A(1), clorobiocin and caprazamycins in genetically modified *Streptomyces coelicolor* strains. *Biopolymers.* 2010;93(9):823-32.
179. **Glaser L, Kuhl M, Jovanovic S, Fritz M, Vogeli B, Erb TJ, et al.** A common approach for absolute quantification of short chain CoA thioesters in prokaryotic and eukaryotic microbes. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):160.
180. **Glaser L, Kuhl M, Stegmüller J, Ruckert C, Myronovskiy M, Kalinowski J, et al.** Superior production of heavy pamamycin derivatives using a bkdR deletion mutant of *Streptomyces albus* J1074/R2. *Microb Cell Fact.* 2021;20(1):111.

181. **Hwang S, Lee Y, Kim JH, Kim G, Kim H, Kim W, et al.** Streptomyces as Microbial Chassis for Heterologous Protein Expression. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:804295.
182. **Bock T, Volz C, Hering V, Scrima A, Muller R, Blankenfeldt W.** The AibR-isovaleryl coenzyme A regulator and its DNA binding site - a model for the regulation of alternative de novo isovaleryl coenzyme A biosynthesis in *Myxococcus xanthus*. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(4):2166-78.

## 6 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Chemische Struktur des Disaccharids aus <i>N</i> -Acetylglucosamin (GlcNAc) und <i>N</i> -Acetylmuraminsäure (MurNAc) als Grundeinheit des Peptidoglycans. ....	1
<b>Abbildung 2:</b> Biosynthese des Peptidoglycans. ....	3
<b>Abbildung 3:</b> Die von der Phospho- <i>N</i> -Acetylmuramoyl-Pentapeptid Transferase MraY katalysierte Reaktion. ....	5
<b>Abbildung 4:</b> Strukturformeln der Nucleosid-Antibiotika Muraymycin A2, Mureidomycin A, Muraminomicin F, Capuramycin und Tunicamycin I. ....	8
<b>Abbildung 5:</b> Strukturformeln der Caprazamycine, Caprazamycin-Aglycone und der Hydroxyacylcaprazole. ....	10
<b>Abbildung 6:</b> Strukturformeln der semisynthetischen Caprazamycin-Derivate Palmitoylcaprazol, Carbacaprazamycin und CPZEN-45. ....	11
<b>Abbildung 7:</b> Caprazamycin-Gencluster sowie das für die L-Rhamnose codierende Gencluster. ....	12
<b>Abbildung 8:</b> Biosynthese der Caprazamycine anhand des Caprazamycins E. ....	14
<b>Abbildung 9:</b> Das <i>liu</i> -Gencluster aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1. ....	16
<b>Abbildung 10:</b> Abbau von Leucin und Isovalerat wie für <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 beschrieben. ....	17
<b>Abbildung 11:</b> Vermuteter Biosyntheseweg von 3-Methylglutaryl-CoA unter Beteiligung der 3-HMG-CoA Synthase Cpz5. ....	60
<b>Abbildung 12:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzLK09 (1)-(3). ....	63
<b>Abbildung 13:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB04 (1)-(3). ....	64
<b>Abbildung 14:</b> Genetische Organisation des <i>liu</i> -Genclusters aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 sowie der identifizierten homologen <i>liu</i> -Cluster aus <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2 und <i>Streptomyces coelicolor</i> M1154. ....	66
<b>Abbildung 15:</b> Verteilung von <i>liu</i> -Genclustern in <i>Actinobacteria</i> und <i>Streptomyces</i> . ....	68
<b>Abbildung 16:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779</i> /cpzLK09 (1)-(3). ....	71

<b>Abbildung 17:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779</i> /cpzDB04 (1)-(3) .....	72
<b>Abbildung 18:</b> MS <sup>2</sup> -Massenspektren der Masse mit einem <i>m/z</i> 930,5 [M+H] <sup>+</sup> bei R <sub>t</sub> 13,8 min des Extraktes von <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779</i> /cpzLK09 (1) sowie der Masse mit einem <i>m/z</i> 802,5 [M+H] <sup>+</sup> bei R <sub>t</sub> 13,8 min des Extraktes von <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779</i> /cpzDB04 (1). .....	73
<b>Abbildung 19:</b> Vermutete Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu 3-Methylcrotonyl-CoA durch die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase <i>Sco2779</i> . .....	74
<b>Abbildung 20:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2779</i> /cpzLK09 (1)-(3).....	76
<b>Abbildung 21:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2779</i> /cpzDB04 (1)-(3).....	77
<b>Abbildung 22:</b> Massenspektren der Extrakte von <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzLK09 (1) mit Zusatz von (1- <sup>13</sup> C)-3-Methylcrotonyl-SNAc im Kulturmedium (rot) und ohne entsprechenden Zusatz (schwarz).....	78
<b>Abbildung 23:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2774</i> /cpzLK09 (1)-(3).....	81
<b>Abbildung 24:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2774</i> /cpzDB04 (1)-(3).....	82
<b>Abbildung 25:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2774</i> Δ <i>sco2779</i> /cpzLK09 (1)-(3).....	83
<b>Abbildung 26:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2774</i> Δ <i>sco2779</i> /cpzDB04 (1)-(3).....	84
<b>Abbildung 27:</b> Vermutete Biosynthese von 3-Methylglutaconyl-CoA aus 3-Methylcrotonyl-CoA durch die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase <i>Sco2776/Sco2777</i> . .....	85
<b>Abbildung 28:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776</i> /cpzLK09 (1)-(3).....	86
<b>Abbildung 29:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776</i> /cpzDB04 (1)-(3).....	87
<b>Abbildung 30:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2777</i> /cpzLK09 (1)-(3).....	88
<b>Abbildung 31:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2777</i> /cpzDB04 (1)-(3).....	89

<b>Abbildung 32:</b> Vermutete Biosynthese von Acetyl-CoA und Acetoacetat aus 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Lyase Sco2778. ....	90
<b>Abbildung 33:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2778/cpzLK09 (1)-(3).....	91
<b>Abbildung 34:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2778/cpzDB04 (1)-(3).....	92
<b>Abbildung 35:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2774Δsco2779/cpzDB04 (1)-(3) mit Zusatz von 3-Methylcrotonyl-SNAc im Kulturmedium. ....	95
<b>Abbildung 36:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2776/cpzDB04/pDB12 (1)-(3) sowie <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2776/cpzDB04/pUWL-apra-oriT.....	96
<b>Abbildung 37:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB04/pDB13 (1)-(3) sowie <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB04/pUWL-apra-oriT.....	97
<b>Abbildung 38:</b> Mögliche Intermediate des Liu-Weges zur Bildung von 3-Methylglutaryl-CoA. ....	98
<b>Abbildung 39:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δsco2777/cpzDB21 (1)-(3).....	102
<b>Abbildung 40:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB05 (1)-(3).....	104
<b>Abbildung 41:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB06 (1)-(3).....	105
<b>Abbildung 42:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB05/pDB15 (1)-(3) sowie <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB05/pUWL-apra-oriT. ....	106
<b>Abbildung 43:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von drei individuellen Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154Δ/cpzDB06/pDB16 (1)-(3) sowie <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB06/pUWL-apra-oriT. ....	107
<b>Abbildung 44:</b> (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von <i>E. coli</i> Rosetta DE3/pDB18. Die markierten Fraktionen 7 und 20 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (B) SDS-PAGE mit den Fraktionen 7 und 20 der FPLC-Aufreinigung...	109

<b>Abbildung 45:</b> (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von <i>E. coli</i> Rosetta DE3/pDB20. Die markierte Fraktion 9 wurden mittels SDS-PAGE analysiert.....	109
<b>Abbildung 46:</b> (A) FPLC-Chromatogramm des Lysats von <i>Streptomyces lividans</i> TK24/pDB02. Die markierten Fraktionen 15-17 sowie 21 wurden mittels SDS-PAGE analysiert. ....	110
<b>Abbildung 47:</b> Vermutete Umsetzung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA durch die mutmaßliche Acyl Dehydratase Cpz2. ....	111
<b>Abbildung 48:</b> Massenspektren der Negativkontrolle und des Cpz2-Enzymassays aufgenommen im Negativmodus. ....	112
<b>Abbildung 49:</b> Extrahierte Ionenchromatogramme der Extrakte von <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779/sco1838</i> ::Tn5062/cpzLK09, <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779/sco4384</i> ::Tn5062 /cpzLK09, <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779/sco4930</i> ::Tn5062/cpzLK09, <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779/sco6732</i> ::Tn5062/cpzLK09 und <i>S. coelicolor</i> M1154Δ <i>sco2776-sco2779/sco6748</i> ::Tn5062/cpzLK09. ....	118
<b>Abbildung 50:</b> Biosynthesemodell für die Bereitstellung von 3-Methylglutaryl-CoA für die Caprazamycin-Biosynthese im heterologen Produzenten <i>S. coelicolor</i> M1154. ....	121
<b>Abbildung 51:</b> Einfluss einer <i>sco2775</i> -Überexpression auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone.....	124
<b>Abbildung 52:</b> Einfluss einer Deletion von <i>sco2775</i> auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone.....	125
<b>Abbildung 53:</b> Bereich der inserierten Promotorkassette mit den Promotoren <i>p21</i> und <i>sp44</i> zwischen <i>cpz3</i> und <i>cpz9</i> des Caprazamycin-Genclusters auf Cosmid cpzDB23.....	127
<b>Abbildung 54:</b> Einfluss der Promotorkassette zwischen <i>cpz3</i> und <i>cpz9</i> auf die Produktion der Caprazamycin-Aglycone (CPZ) und Hydroxyacylcaprazole (HAC). ....	128
<b>Abbildung 55:</b> Produktion der Caprazamycin-Aglycone in definiertem Medium mit einer Endkonzentration von 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM L-Leucin oder ohne Zusatz. ....	130
<b>Abbildung 56:</b> Produktion der Caprazamycin-Aglycone in definiertem Medium mit einer Endkonzentration von 5 mM L-Leucin, Isovaleryl-SNAc, 3-Methylcrotonyl-SNAc oder ohne Zusatz.....	132
<b>Abbildung 57:</b> Prozentual erreichter Anteil der Produktion der Mutanten <i>S. coelicolor</i> M1154/cpzDB04/pDB22 (1)-(3) mit einer Überexpression von <i>sco2775</i> von der	

Produktion der entsprechenden Mutanten *S. coelicolor* M1154/cpzDB04 (1)-(3) ohne Überexpression. .... 133

**Abbildung 58:** Bausteine aus dem Abbauweg der verzweigt-kettigen Aminosäuren und die daraus entstehenden verzweigt-kettigen Fettsäuren, die in  $\beta$ -hydroxylierter Form in den Caprazamycinen vorkommen. .... 136

**Abbildung 59:** Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin sowie von diesen Intermediaten abhängige Metaboliten und Naturstoffe. .... 137

**Abbildung 60:** Strukturformeln von ausgewählten Naturstoffen, die Intermediate des Abbaus verzweigt-kettiger Aminosäuren beinhalten. .... 141

**Abbildung 61:** Abbauweg von 4-Methylbenzoyl-CoA in *Magnetospirillum* sp. pMbN1. .... 146

## 7 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien .....	20
<b>Tabelle 2:</b> Säulen, Kits, Enzyme, Filter und gebrauchsfertige Lösungen.....	29
<b>Tabelle 3:</b> Primer zur Amplifikation von Resistenzkassetten.....	30
<b>Tabelle 4:</b> Primer zur Verifizierung.....	30
<b>Tabelle 5:</b> Primer zur Klonierung .....	32
<b>Tabelle 6:</b> Synthetisches DNA-Fragment der bidirektionalen Promotorkassette.....	33
<b>Tabelle 7:</b> Plasmide und Cosmide .....	34
<b>Tabelle 8:</b> Bakterienstämme .....	38
<b>Tabelle 9:</b> Pipettierschema Restriktionsverdau.....	48
<b>Tabelle 10:</b> Pipettierschema Standard-PCR .....	48
<b>Tabelle 11:</b> Temperaturprogramm Standard-PCR.....	49
<b>Tabelle 12:</b> Pipettierschema PCR mit genomischer DNA aus Streptomycceten .....	49
<b>Tabelle 13:</b> Temperaturprogramm PCR mit genomischer DNA aus Streptomycceten .....	50
<b>Tabelle 14:</b> Pipettierschema Colony-PCR.....	50
<b>Tabelle 15:</b> Temperaturprogramm Colony-PCR .....	50
<b>Tabelle 16:</b> Pipettierschema des Restriktionsverdaus für die Ligation.....	51
<b>Tabelle 17:</b> Pipettierschema für den Ligationsansatz .....	52
<b>Tabelle 18:</b> Pipettierschema Restriktionsverdau der Resistenzkassette.....	52
<b>Tabelle 19:</b> Pipettierschema Verlängerung der Resistenzkassette.....	53
<b>Tabelle 20:</b> Temperaturprogramm Verlängerung der Resistenzkassette.....	53
<b>Tabelle 21:</b> Pipettierschema Entfernung der Resistenzkassette durch Cre- Rekombinase.....	54
<b>Tabelle 22:</b> Pipettierschema enzymatischer Assay Cpz2 .....	57
<b>Tabelle 23:</b> Durch <i>BLASTx</i> -Analyse identifizierte homologe Proteine der HMG-CoA Synthase Cpz5. ....	61
<b>Tabelle 24:</b> Annotierung und Homologie der Proteine des Abbauweges von Leucin und Isovalerat in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, <i>Streptomyces sp.</i> MK730-62F2 und <i>Streptomyces coelicolor</i> M1154.....	67
<b>Tabelle 25:</b> Durch <i>BLASTx</i> -Analyse identifizierte homologe Proteine der Acyl-CoA Dehydratase Cpz2.....	99

<b>Tabelle 26:</b> Durch <i>BLASTx</i> -Analyse identifizierte homologe Proteine der Dehydrogenase Cpz25. ....	100
<b>Tabelle 27:</b> Durch <i>BLASTx</i> -Analyse identifizierte homologe Proteine der Acyl-CoA Synthase Cpz20. ....	100
<b>Tabelle 28:</b> Daten der Massenspektrometrie des Cpz2-Enzymassays .....	113
<b>Tabelle 29:</b> Homologe Proteine der 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase LiuC/PA2013 aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 in <i>Streptomyces coelicolor</i> M1154. ....	115
<b>Tabelle 30:</b> Homologe Proteine der 3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase LiuC aus <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622 in <i>Streptomyces coelicolor</i> M1154. ....	116
<b>Tabelle 31:</b> Durch <i>BLASTx</i> -Analyse identifizierte homologe Proteine des Regulators Sco2775. ....	122

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte den nachstehenden Personen meine Dankbarkeit aussprechen. Sie alle haben einen wesentlichen Teil zur Entstehung dieser Dissertationsschrift beigetragen.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Bertolt Gust für die Möglichkeit, an diesem Projekt arbeiten zu dürfen. Ich bin dankbar für seine herausragende Betreuung, seine durchgehende Unterstützung und die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Harald Groß für seine wissenschaftlichen Ratschläge und seine Hilfestellung in analytischen Fragen während dieses Projektes sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenfalls danken möchte ich Prof Dr. Stephanie Grond und JProf. Dr. Silja Mordhorst für die Teilnahme als Prüferinnen an der Disputation.

Großer Dank gilt Andreas Kulik für die wertvolle Hilfestellung in der MS-Analytik und die unzähligen vermessenen Proben. Ich bedanke mich bei Prof. Joeren Dickschat und Houchao Xu für die Bereitstellung der SNAc-Ester, bei Prof. Dr. Nadine Ziemert und Davide Paccagnella für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung sowie bei Dr. Norbert Grzegorzek und Claudia Krause für die Durchführung der HR-MS-Messungen. Vielen Dank an Melanie Zimmermann und Benjamin Konetschny für die großartige Arbeit im Rahmen ihrer Masterarbeiten.

Ich bin sehr dankbar für alle Kollegen und Freunde der 6. und 9. Ebene, für die herzliche Atmosphäre im Labor und die unzähligen Kaffeepausen. Ein besonderes Dankeschön an meine lieben Freunde aus dem Nordlabor, ohne die ich weder Griechisch gelernt noch musikalisch auf dem aktuellen Stand geblieben wäre. Ich werde die Zeit sehr vermissen.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, insbesondere meiner wunderbaren Frau Hanna, für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Motivation und Liebe.