

Vorläuferdirigierte Biosynthese und Mutasynthese in  
Actinomyceten zur gezielten Darstellung von  
modifizierten Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
**Stefan Dausend-Werner**

Saarbrücken 2015

Tag des Kolloquiums: 21. 06. 2016

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Müller

Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Vorsitz: Prof. Dr. Volkhard Helms

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Angelika Ullrich

*O varium Fortune lubricum,  
dans dubium tribunal iudicum,  
non modicum paras huic premium,  
quem colere tua vult gratia  
et petere rote sublimia,  
dans dubia tamen, prepostere  
de stercore pauperem erigens,  
de rhetore consulem eligens.*

*Edificat Fortuna, diruit;  
nunc abdicat, quos prius coluit;*

aus *Carmina Burana* (ca. 1230)

## **Aus dieser Arbeit ist hervorgegangen**

### **Patent:**

#### **Method for Producing Recombinant 11-De-O-Methyltomaymycin**

Abstract: The present invention provides a tomaymycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* species FH6421, and its use for producing 11-de-O-methyltomaymycin.

Patent-Anmelder: Sanofi

Inventors: Claus Lattemann, Mark Brönstrup, Stefan Werner, Rolf Müller, Kirsten Harmrolfs

2013

### **Manuskript in Vorbereitung:**

Dausend-Werner, Stefan; Harmrolfs, Kirsten *et al.*

**Engineering the Tomaymycin biosynthetic gene cluster: Substantial increase of production rates and highly adaptable knock out mutants**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Natürliche Wirkstoffe und ihre Produzenten .....	11
1.2	Das Phylum Actinobacteria .....	14
1.2.1	Einfluss des Lebenszyklus der Streptomyceten auf Morphologie und Physiologie .....	15
1.3	Sekundärmetabolite .....	17
1.4	Pyrrlobenzodiazepine.....	18
1.4.1	Chemische Struktur .....	18
1.4.2	Biosynthese der Pyrrlobenzodiazepine mittels Nichtribosomaler Peptidsynthetasen .....	22
1.4.3	Wirkmechanismus der Pyrrlobenzodiazepine.....	26
1.4.4	Verwendung der Pyrrlobenzodiazepine.....	28
1.5	Die heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern.....	32
1.6	Vorläufergesteuerte Biosynthese und Mutasyntese .....	35
1.7	Das Potential kombinierter biologischer und chemischer Synthesen .....	38
1.8	Ziele und Fragestellung der Arbeit .....	42
2	Material.....	44
2.1	Chemikalien.....	44
2.2	Proteine, Enzyme, Säulen und „Kits“ .....	45
2.3	Puffer und Stammlösungen .....	46
2.4	Kulturmedien .....	47
2.5	Antibiotika.....	49
2.6	Bakterienstämme .....	50
2.7	Primer.....	52
2.8	Plasmide .....	56
2.9	Geräte und Zubehör .....	59
3	Methoden.....	61
3.1	Gentechnische Methoden .....	61
3.1.1	Polymerasekettenreaktion .....	61
3.1.2	SOE-PCR .....	61
3.1.3	Erstellung der FH6421 Cosmid-Bibliothek.....	61

3.1.4	Identifikation des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters innerhalb der FH6421 Cosmid-Bibliothek .....	63
3.1.5	Klonierung mittels Red/ET .....	64
3.1.6	Klonierung mittels Restriktion und Ligation .....	64
3.1.7	Transformation mittels Elektroporation .....	65
3.1.8	Intergenerische, biparentale Konjugation .....	65
3.1.9	Isolierung genomischer <i>Streptomyces</i> DNA .....	65
3.1.10	Plasmid-Aufreinigung .....	66
3.2	Proteinbiochemie.....	67
3.2.1	Expression von TomA und TomB .....	67
3.2.2	Zellyse mittels Ultraschall .....	68
3.2.3	Abtrennen des 6 x His-tags via Sumo Protease .....	68
3.2.4	TomA/TomB- <i>in vitro</i> -Aktivitäts-Assay .....	69
3.3	Mutasynthesen und vorläufergesteuerte Biosynthese.....	70
3.3.1	Mutasynthese von Tomaymycin-Analoga im analytischen Maßstab .....	70
3.3.2	Mutasynthese und erste Aufarbeitung von Tomaymycin-Analoga im präparativen Maßstab.....	70
3.3.3	Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga im analytischen Maßstab.....	71
3.3.4	Vorläufergesteuerte Biosynthese und erste Aufarbeitung von Sibiromycin-Analoga im präparativen Maßstab .....	71
3.4	Chromatographische und massenspektrometrische Methoden .....	73
3.4.1	FPLC Ni-His-Trap Proteinaufreinigung .....	73
3.4.2	Vorbereitung von MALDI-MS Proben .....	73
3.4.3	Analytische HPLC-MS .....	74
3.4.4	Quantifizierung von der Tomaymycinproduktion.....	74
3.4.5	Semipräparative HPLC-MS .....	75
3.4.6	NMR-spektrometrische Analysen .....	75
3.5	Chemische und Partialsynthesen .....	76
3.5.1	Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure .....	76
3.5.2	Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen 4-Propargylanthranilsäure und 1,5-Diazido-3-oxapentan .....	78
3.5.3	Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Rohextrakt .....	79

3.5.4	Dimerisierung von DOPOS via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition im analytischen Maßstab .....	79
4	Ergebnisse.....	81
4.1	Aufklärung Biosyntheseweg Tomaymycin.....	81
4.1.1	Native Tomaymycinproduktion in <i>Streptomyces spec.</i> FH6421.....	81
4.1.2	Sequenzierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters.....	82
4.1.3	Erstellung der <i>Streptomyces spec.</i> FH6421 Cosmid-Bibliothek.....	83
4.1.4	Lokalisierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters.....	86
4.1.5	Heterologe Expression des unmodifizierten Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters .....	88
4.1.6	Transfer des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters in den replikativen Shuttle-Vektor pOJ446 .....	90
4.1.7	Erstellung des replikativen Shuttlevektors pStW102 auf Basis von pOJ446.....	92
4.1.8	Klonierung des Expressionsvektors pStW102tc .....	94
4.1.9	Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters via pStW102tc.....	94
4.2	Mutasynthese Tomaymycin A-Ring.....	95
4.2.1	Erstellung des Knock-outs von <i>tomG</i> bis <i>tomC</i> im Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster durch Insertion des Zeocin Resistenz-Gens <i>Sh ble</i> via Red/ET .....	95
4.2.2	Mutasyntheseversuch neuer Tomaymycin-Analoga mittels pStW102tc.re103.....	96
4.2.3	Entfernung des Zeocin Resistenz-Gens <i>Sh ble</i> aus dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster auf pStW102tc.re103.....	97
4.2.4	Mutasynthese von Tomaymycin-Analoga in <i>Streptomyces Streptomyces albus</i> J1074 /pStW102tc $\Delta$ C-G.....	98
4.2.5	Quantifizierung der Tomaymycinproduktion sowie erhaltener Tomaymycin-Analoga am Beispiel von 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin.....	100
4.2.6	Knock-out von <i>tomO</i> in pStW102tc $\Delta$ C-G.....	101
4.2.7	Auswirkung des <i>tomO</i> Knock-outs auf die Oxidation des Pyrrolbenzodiazepins zum Amid .....	103

4.2.8	Auswirkung des <i>tomO</i> Knock-outs auf die Hydroxylierung des Pyrrolbenzodiazepines an Position 7.....	105
4.2.9	Mutasyntese von Tomaymycinanaloga mit unterschiedlich substituiertem A-Ring .....	107
4.2.10	NMR-Strukturanalyse von Tomaymycinanaloga.....	115
4.3	Mutasyntese Tomaymycin C-Ring.....	116
4.3.1	Erstellung des <i>tomN</i> Knock-outs .....	116
4.3.2	Testexpression von pStW102tc.re132 in <i>Streptomyces lividans</i> TK24 und <i>Streptomyces albus</i> J1074 .....	117
4.3.3	Erstellung des <i>tomH</i> , <i>tomI</i> Knock-outs im Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster durch Insertion des Tetracyclin Resistenz-Gens <i>tetA</i> via Red/ET .....	118
4.3.4	Expression von pStW102tcΔHI in <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	119
4.4	Heterologe Expression der NRPS TomA und TomB.....	124
4.4.1	Zielsetzung und Strategie .....	124
4.4.2	Konstruktion des Expressionsvektors pStW42 .....	124
4.4.3	Erstellung der Expressionsvektoren pStW42tomA und pStW42tomB .	127
4.4.4	Expressionsstrategie .....	128
4.4.5	Aufreinigungsstrategie .....	129
4.4.6	<i>In vitro</i> Assay zur Pyrrolbenzodiazepin-Assemblierung mittels TomA und TomB.....	131
4.5	Sibiromycin.....	135
4.5.1	Mutasyntese-strategie für die Darstellung nicht-nativer Sibiromycinanaloga .....	135
4.5.2	Erstellung des Suizidvektors pStW102Si.....	135
4.5.3	Erstellung des <i>single crossover</i> Knock-out-Vectors pStW102SiXsibC	137
4.5.4	Knock-out der Kynurenin-3-Monooxygenase <i>sibC</i> im nativen Sibiromycin-Biosynthese-Gencluster und phänotypische Verifikation.....	138
4.5.5	Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycinanaloga.....	140
4.5.6	Synthese von 4-Propargyloxyanthranilsäure .....	145
4.5.7	Dimerisierung von Amino-4-propargyloxy-benzoesäure mittels 1,5-Diazido-3-oxapentan-Linker via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition .....	150

4.5.8	Vorläufergesteuerte Biosynthese von DOPOS im analytischen Maßstab 152	
4.5.9	Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Rohextrakt .....	153
4.5.10	Vorläufergesteuerte Biosynthese und Aufreinigung von DOPOS .....	156
4.5.11	Dimerisierung von DOPOS via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin- Cycloaddition .....	157
5	Diskussion .....	162
5.1	Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters .....	163
5.1.1	Die Tomaymycin Biosynthese .....	163
5.1.2	Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters ...	164
5.1.3	Mutasyntese von Tomaymycin-Analoga durch Austausch des A-Rings 167	
5.1.4	Mutasyntese von Tomaymycin-Analoga durch Austausch des C-Rings 168	
5.1.5	Knock-out-Studien am Tomaymycin-Biosyntheseweg.....	169
5.1.6	Oxidation von Tomaymycin zu Oxotomaymycin und Reduktion als alternativer Modifikationsweg .....	170
5.2	Heterologe Expression von TomA und TomB .....	173
5.3	Mutasyntese und vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin- Analoga.....	177
5.3.1	Mutayntese von Sibiromycin Analoga.....	177
5.3.2	Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga .....	178
5.3.3	Vergleich der Inkorporationsmuster bei der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga und der Mutasyntese von Tomaymycinanaloga .....	179
5.3.4	<i>In vivo</i> -Glykosylierung von Sibiromycin-Analoga .....	182
5.3.5	Sibiromycin-Analoga in semisynthetischen Dimerisierungs-reaktionen	183
5.4	Ausblick.....	191
6	Zusammenfassung.....	193
7	Anhang .....	195
	Lebenslauf.....	228
	Danksagung .....	229

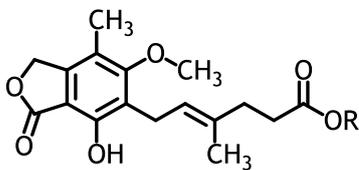
## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acids</i>
BP	<i>base peak</i>
BPC	<i>base peak chromatogram</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	<i>cyclic adenosine 3',5' monophosphate</i>
cos	<i>cohesive site</i>
CuAAC	<i>Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>
Diboc	Di-tert-butyldicarbonat
DOPOS	9-Desoxy-8-propargyloxy-sibiromycin
DTT	Dithiothreitol
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i>
GI <sub>50</sub>	<i>average concentration for 50% growth inhibition</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kb	<i>kilobase</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRP	Nichtribosomale Peptide
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
PCD	<i>programmed bacterial cell death</i>
PKS	Polyketid-Synthetase
PBD	Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOE	<i>splicing by overlapping extension</i>
SUMO	small ubiquitin-related modifier
vgl.	vergleiche

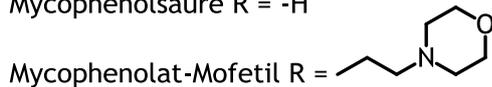
# 1 Einleitung

## 1.1 Natürliche Wirkstoffe und ihre Produzenten

Naturstoffe sind eine essentielle und überaus vielseitige Quelle neuer medizinischer Wirkstoffe und neuer Leitstrukturen für Pharmazeutika. Beispiele wissenschaftlicher Beschreibungen von Naturstoffen mit antibakterieller Wirkung finden sich bereits im späten 19. Jahrhundert mit Bartolomeo Gosios Beschreibung der Mycophenolsäure und der Beobachtung, dass sie das Wachstum von *Bacillus anthracis* hemmt [1], [2]. Mycophenolsäure selbst fand als Antibiotikum keinen Einsatz, wird jedoch zur Behandlung von Schuppenflechte eingesetzt [3]. 1995 erhielt Mycophenolat-Mofetil, ein Ester, welcher als *prodrug* für Mycophenolsäure eingesetzt wird, die Zulassung als Immunsuppressivum bei allogenen Nieren-, Herz- oder Lebertransplantation [4].



Mycophenolsäure R = -H



Das von Fleming 1928 in einer spontanen *Penicillium notatum*-Kultur entdeckte Penicillin [5] fand zunächst kaum Beachtung in der Fachwelt. Erst mit dem Ausbruch des zweiten Weltkriegs und dem damit verbundenen Engpass in der Versorgung mit Sulfonamiden, welche im Deutschen Reich durch die I.G. Farben patentiert waren und produziert wurden [6], begann das U.S.-amerikanische Militär mit einem umfassenden Programm, Penicillin als Alternative zu den Sulfonamiden zu etablieren [7]. Wenige Jahre später, 1943, folgte die Entdeckung von Streptomycin, isoliert aus *Streptomyces griseus*, dem ersten Antibiotikum gegen Tuberkulose [8]. Die folgenden Jahrzehnte gelten aufgrund der Vielzahl an entdeckten Strukturen als goldenes Zeitalter der Antibiotika. Actinomyceten allgemein und unter ihnen insbesondere Streptomyceten stellen hierbei eine der ergiebigsten Quellen für

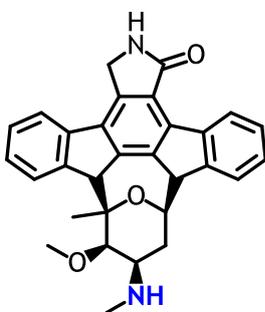
## 1 Einleitung

---

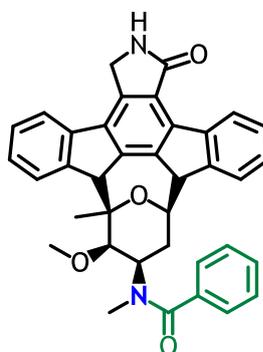
biologisch aktive Sekundärmetabolite. In den vierziger und fünfziger Jahren wurden zahlreiche medizinisch bedeutende Substanzen isoliert [9] zum Beispiel Cephalosporin (*S. clavuligerus*, 1945), Chloramphenicol (*S. venezuelae*, 1949), Neomycin (*S. fradiae*, 1949), Tetracyclin (*S. aureofaciens*, 1950), Erythromycin (*Saccharopolyspora erythraea*, 1952), Lincomycin (*S. lincolnensis*, 1952), Vancomycin (*S. orientalis*, 1958), Rifamycin (*Amycolatopsis mediterranei*, 1957), Kanamycin (*S. kanamyceticus*, 1957).

Eine weitere Möglichkeit parallel zu Screenings neue Leitstrukturen für Medikamente zu finden, ist - wie für Mycophenolsäure bereits beschrieben - die Reevaluation bekannter Substanzen. Das bereits 1975 entdeckte Rapamycin [10] sollte zuerst als Antimykotikum eingesetzt werden, erhielt 1999 jedoch die Zulassung als Immunsuppressivum, das überwiegend nach Nierentransplantationen eingesetzt wird [11].

Bekannte Strukturen, deren Nutzung im klinischen Rahmen aufgrund geringer Löslichkeit, geringer Selektivität oder anderer adverser Effekte ausgeschlossen ist, können zudem als Leitstruktur für neue Wirkstoffe dienen. Ein Beispiel hierfür ist die erfolgreiche Etablierung von Midostaurin. Der zugrundeliegende Naturstoff Staurosporin wurde bereits 1977 aus *Streptomyces staurosporeus*-Kulturen isoliert und beschrieben [12]. Unmodifiziert ist er ein potenter Protein-Kinase C Inhibitor, der aufgrund seiner geringen Selektivität jedoch nicht klinisch einsetzbar ist. Zwölf Jahre später wurde mit Midostaurin ein semisynthetisches Staurosporin-Derivat etabliert [13], welches inzwischen in einer Kombination mit Daunorubicin und Cytarabin in der dritten Phase der klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie steht [14].



Staurosporin

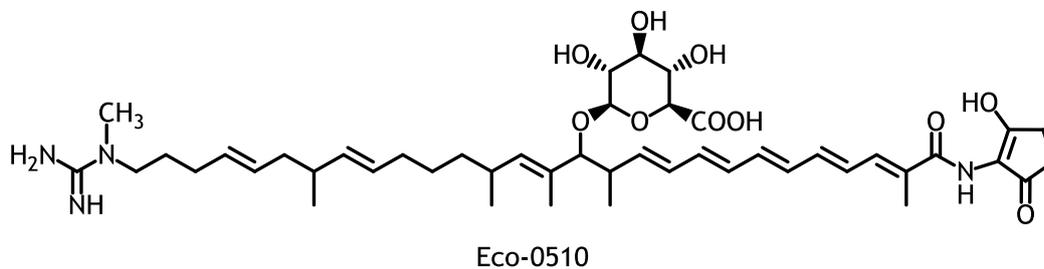


Midostaurin  
(CGP 41 251)

## 1 Einleitung

---

Auch über Genomscreenings und nachfolgende Kulturanalysen können neue Sekundärmetabolite entdeckt werden. Banskota *et al.* fanden im Vancomycin-Produzenten *Amycolatopsis orientalis* ATCC 43491 die Genloci für die Produktion von mindestens 10 weiteren Sekundärmetaboliten. Für einen der Loci stellten sie eine Hypothese für die Biosynthese auf und konnten anhand der vorhergesagten physikochemischen Eigenschaften die Substanz im Kulturüberstand identifizieren und isolieren. ECO-0501 ist ein lineares Polyen-Antibiotikum und zeigt eine starke antibakterielle Aktivität gegen zahlreiche grampositive Pathogene, unter anderem gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente *Enterococcus*-Stämme.



Mit diesen Möglichkeiten - dem verstärkten Screening, der Reevaluation und der Variation bekannter Strukturen sowie dem Genomscreening nach Genclustern für Sekundärmetabolite - bieten die Produzenten natürlicher oder von der Natur inspirierter Wirkstoffe auch in Zukunft eine bedeutsame Quelle für neue Pharmazeutika.

### 1.2 Das Phylum Actinobacteria

Das Phylum Actinobacteria bildet zusammen mit Firmicutes die Gram-positiven Bakterien. Actinobacteria ist eines der vielfältigsten Phyla mit einer hohen Verbreitung im Boden und in Gewässern. Sie stellen beispielsweise mit *Frankia alni* als Stickstofffixierer in Aktinorrhiza einen wichtigen Pflanzensymbionten, treten aber auch als Pflanzenpathogene auf. Zum Beispiel führt ein *Streptomyces scabies*-Befall der Wurzel der Kartoffelpflanze zum sogenannten ertragsmindernden Kartoffelschorf. Auch unter den Säugerpathogenen finden sich zahlreiche Aktinobakterien, zum Beispiel *Mycobacterium bovis*, der Erreger der Rinder-Tuberkulose, welche als Zoonose auch beim Menschen auftreten kann. Unter den humanen Erkrankungen werden zum Beispiel Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriae*) und Lepra (*Mycobacterium leprae*) von Aktinobakterien ausgelöst. Streptomyceten wurden bisher nur in seltenen Fällen als Humanpathogene beschrieben, meist als Opportunisten bei immungeschwächten Patienten [15]. Industriell werden Aktinobakterien unter anderem eingesetzt, um Aminosäuren, Vitamine (*Corynebacterium glutamicum* in der Produktion von Glutamin, Lysin, Threonin, Isoleucin, Pantothenensäure, etc.) oder industriell genutzte Enzymen herzustellen; die kommerziell genutzte Glucose-Isomerase zur Herstellung von Fructose-Glucose-Sirup wird aus verschiedenen Streptomyceten, zum Beispiel *Streptomyces olivochromogenes* gewonnen [16].

Aktinobakterien produzieren häufig eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten. Der überwiegende Teil der in antimikrobiellen und antineoplastischen Chemotherapien genutzten Naturstoffe wurde in Stämmen dieses Phylums entdeckt. Allein der Modellorganismus *Streptomyces coelicolor* A3(2) produziert unter Laborbedingungen fünf unterschiedliche Antibiotika. Aus genomischen Analysen geht hervor, dass mindestens 29 Biosynthese-Gencluster im *S. coelicolor* A3(2)-Genom vorhanden sind, welche mögliche Sekundärmetaboliten-Produktionswege codieren [17]. Die Produkte dieser Gencluster könnten physiologisch, entwicklungsbiologisch oder als biologische Abwehrstoffe eine Rolle spielen und als Siderophore, Signalstoffe, Sporen-Pigmente, Antibiotika sowie in zahlreichen anderen Funktionen auftreten.

### 1.2.1 Einfluss des Lebenszyklus der Streptomyceten auf Morphologie und Physiologie

Streptomyceten sind saprotrophe, obligat mesophile, aerob wachsende Boden- oder Gewässerbakterien. Sie weisen eine komplexe Morphologie auf, deren unterschiedliche Stadien eng mit spezifischen primären und sekundären physiologischen Abläufen verknüpft sind.

Unter Laborbedingungen, also hohen Zelldichten, hohen Temperaturen von 28° - 30° C und ausgesprochen mineral- und nährstoffreichen Medien durchlaufen Streptomyceten ihren Lebenszyklus in wenigen Tagen. Die Keimung der Sporen setzt günstige Außenbedingungen mit hoher Feuchtigkeit und der Anwesenheit von Nährstoffen voraus. Sie wird durch einen cAMP Peak begleitet [18]. Aus dem Sporenkörper treten ein bis zwei Hyphen aus, welche das Substratmyzel ausbilden. Das Wachstum erfolgt hauptsächlich an den Spitzen der Hyphen durch Einlagerung von neuem Zellwandmaterial [19].

Der vollständige Lebenszyklus der Streptomyceten konnte über lange Zeit nur auf Agarplatten studiert werden, da die meisten *Streptomyces* Stämme in Flüssigkulturen keine Sporen ausbilden. Erst mit umfassenden Arbeiten an *S. venezuelae*, einem industriell genutzten Chloramphenicol-Produzenten der in den vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben wurde [20], konnte ein Modellorganismus für die Sporulation in Flüssigkulturen etabliert werden. *S. venezuelae* sporuliert in Flüssigkulturen zuverlässig in weniger als 20 Stunden und zeigt eine Transformationsrate von > 90% der Myzel-Biomasse zu Sporen [21], [22].

In ihrem natürlichen Umfeld treffen Streptomyceten in der Regel auf bedeutend schlechtere Wachstumsbedingungen als unter Laborbedingungen. Wachstumsversuche von Manteca und Sanchez (2009) zeigen, dass *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891 und *Streptomyces coelicolor* M145 auf Bodenproben aus einem Eichenwald deutlich verlangsamte Wachstumskinetiken im Vergleich zum Wachstum auf einem klassischen nährstoffreichen Agar aufweisen. Die Sporulation setzte statt in den ersten 24 Stunden erst nach sieben Tagen ein und verlief asynchron bis ca. Tag 21. Während die Sporulation auf dem nährstoffreichen Medium bereits nach zwei Tagen begann, war das Wachstum auf der Bodenprobe diskontinuierlich und die Kulturen wuchsen im Beobachtungszeitraum von einem Monat zu einem losen Substratmyzel, welches das kompartimentalisierte Stadium

## 1 Einleitung

---

nicht verließ. Im Gegensatz zu natürlichen Bedingungen hatten diese Kulturen vorteilhafte Wachstumsbedingungen von regelmäßiger Befeuchtung des Bodens und einer stabilen Temperatur von 30° C.

Im Labor und der industriellen Anwendung spielt die Sporulation eine Rolle für technisch einfach zu konservierende Dauerkulturen. Des Weiteren ist die Konjugation mit Donorstämmen bei frisch sporulierenden Stämmen häufig am einfachsten zu erreichen. Zusammen mit der Sporulation setzt die Antibiotikaproduktion für gewöhnlich zum Ende des Lebenszyklus einer *Streptomyces*-Kolonie ein [24], unter Laborbedingungen entsprechend mit dem Aufbrauchen der Nährstoffe im Medium.

### 1.3 Sekundärmetabolite

Sekundärmetabolite sind von Bakterien, Pilzen und Pflanzen synthetisierte Substanzen, die in der Regel vom Produzenten in die Umgebung abgegeben werden. Sekundärmetaboliten werden funktionell von Primärmetaboliten dadurch abgegrenzt, dass Primärmetabolite im Organismus überlebensnotwendige Funktionen bei Stoffwechsel, Strukturaufbau und Vermehrung übernehmen, während Sekundärmetabolite Stoffwechselprodukte darstellen, denen keine essentielle Aufgabe zukommt. Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten bedeutet für den Produzenten einen zusätzlichen Energie- und Ressourcenaufwand. Daher lässt sich die bei Bakterien, Pilzen und Pflanzen weite Verbreitung der Fähigkeit Sekundärmetabolite zu synthetisieren nur durch einen Selektionsvorteil in ihrer natürlichen Umgebung erklären.

Die Funktionen von Sekundärmetaboliten sind sehr weit gefächert [25]: Sie spielen eine Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen (z.B. bei bakterieller Sporulation, Samenreifung oder -keimung), bei der Signaltransduktion innerhalb eines Organismus, zwischen unterschiedlichen Individuen innerhalb einer Spezies (z.B. Quorum-Sensing [26]) oder bei Symbiosen über Speziesgrenzen hinweg (z.B. in der Signalgebung bei Pflanzen als Reaktion auf stickstofffixierende Knöllchenbakterien [27]). Sekundärmetabolite können auch eine zentrale Komponente zur Metallkomplexierung und -aufnahme (z.B. Eisenchelator Myxochelin aus Myxobakterien [28]) stellen. Als biochemische Waffen liefern sie einen entscheidenden Selektionsvorteil im Konkurrenzkampf [29] zwischen Nahrungskonkurrenten im gleichen Habitat (z.B. Actinomyceten und Pilze) und in Räuber-Beute-Beziehungen (z.B. Myxobakterien und Streptomyceten) [30]. Die antibiotische Wirkung von Sekundärmetaboliten bietet ein vielfältiges Potential zur industriellen und medizinischen Nutzung. Eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten sowie deren chemisch modifizierte Varianten werden bereits in der Human- und Veterinärmedizin als antibakterielle, antimycotische, antiparasitäre und antineoplastische Wirkstoffe eingesetzt oder befinden sich in klinischen Studien [31], [32].

## 1.4 Pyrrolobenzodiazepine

Pyrrolobenzodiazepine sind eine Klasse trizyklischer Sekundärmetabolite mit breiter antibiotischer Wirkung. Als erstes Pyrrolobenzodiazepin wurde Anthramycin (1) 1963 von Tendler *et al.* entdeckt, 1965 von Leimgruber *et al.* aus *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* NRLL B3167 isoliert, die zytotoxische Wirkung beschrieben und die Struktur aufgeklärt [33]–[35]. 1968 etablierten Leimgruber *et al.* die Vollsynthese von Anthramycin und damit erstmalig die Vollsynthese eines PBD [36]. Die Entdeckung von Sibiromycin (3) und Tomaymycin (2) folgten 1969 bzw. 1972 im Rahmen klassischer Screenings [37], [38].

### 1.4.1 Chemische Struktur

Die Grundstruktur der Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine ist ein trizyklisches Ringsystem bestehend aus einem zentralen siebengliedrigen Ring, dem 1,4-Diazepin-5-on (B-Ring), an welchem ein Benzolring (A-Ring) und ein Pyrrolidinring (C-Ring) anelliert sind (siehe Abbildung 1). Bei den natürlich vorkommenden Pyrrolobenzodiazepinen (siehe Abbildung 2) tritt nur das 11aS Epimer auf [39].

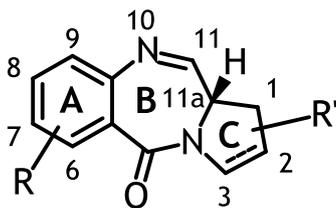
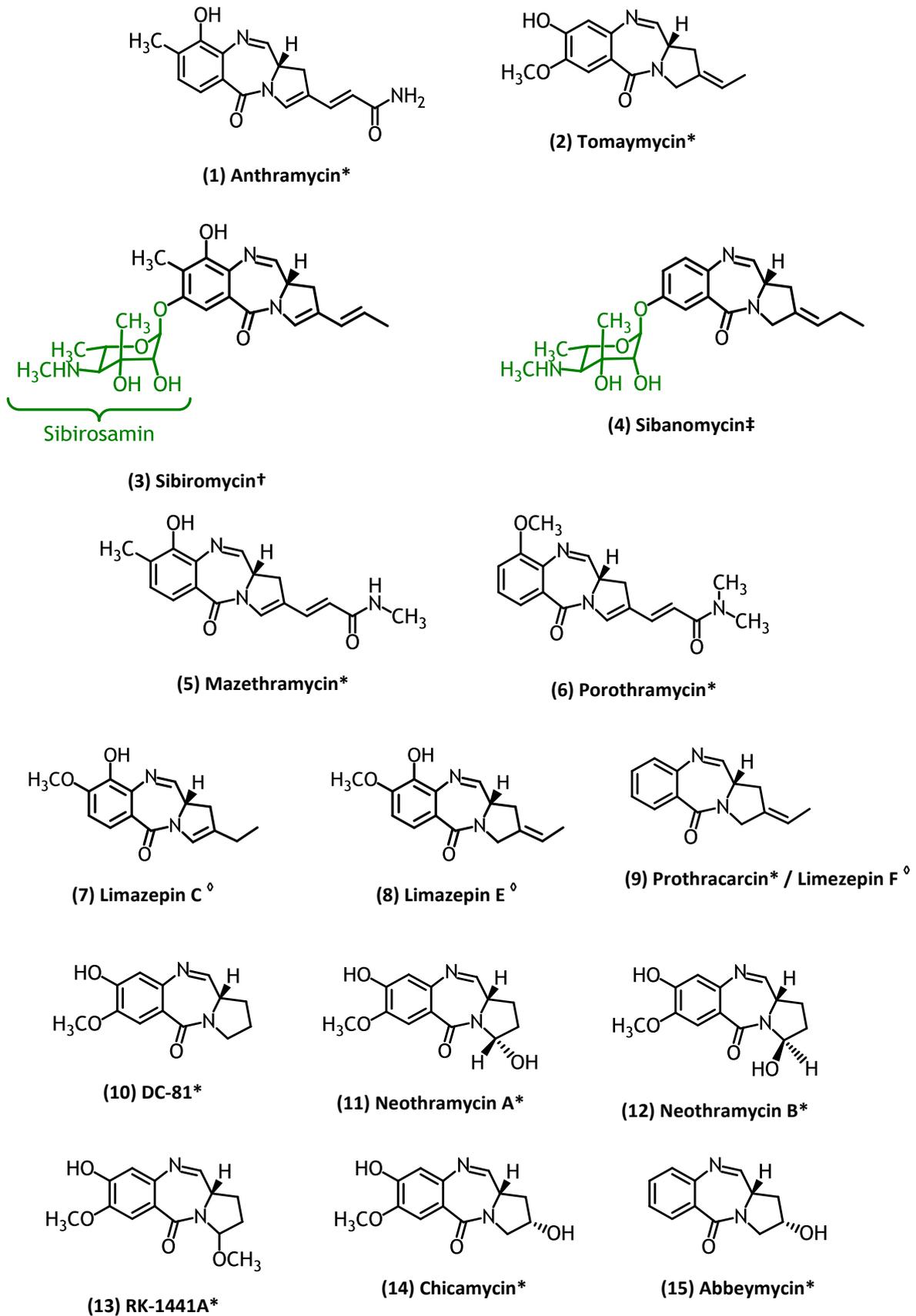


Abbildung 1: Grundstruktur der Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine.

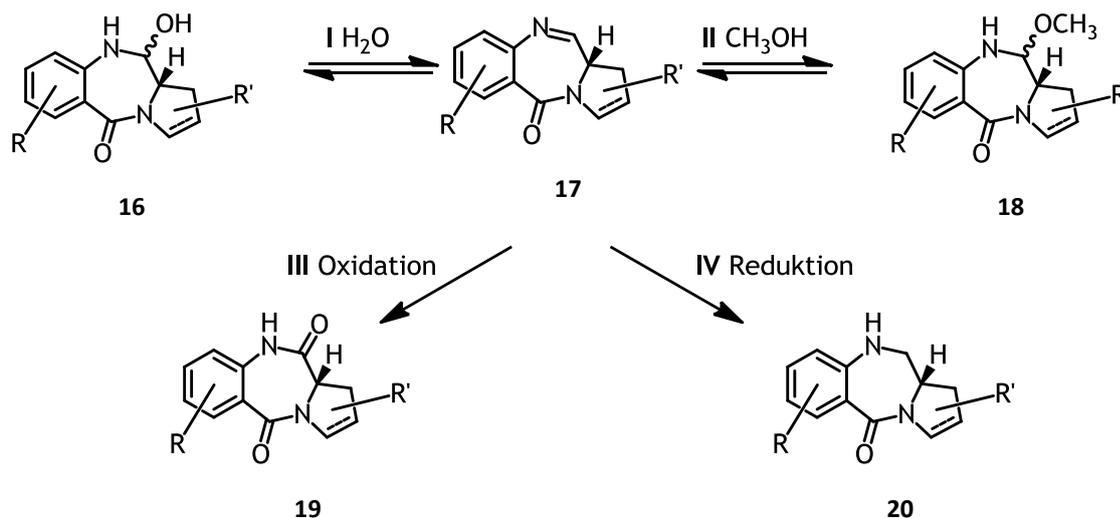
# 1 Einleitung



**Abbildung 2:** Natürlich vorkommende, bioaktive Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine. Die in der Literatur beschriebenen Produzenten stammen aus den Gattungen \*) *Streptomyces*, †) *Streptosporangium*, ‡) *Micromonospora* und <sup>o</sup>) *Micrococcus* [39].

# 1 Einleitung

Biologisch aktive PBD verfügen über eine N10–C11 Imin-/Carbinolamin-Funktionalität. In protischen Lösungsmitteln führt die Anlagerung des deprotonierten Lösemittelrests am C11 zur Ausbildung eines Racemats. Aus dem Imin (**17**) bildet sich in Wasser das Carbinolamin (**16**) und in Methanol der Methylether (**18**) (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Die reversible Anlagerung von I) H<sub>2</sub>O oder II) Methanol an PBD führt zur Ausbildung eines Racemats. In biologischen Systemen wurden Modifikationen am aktiven Zentrum wie die III) Oxidation oder IV) Reduktion (diese Arbeit) beobachtet.

Die entstehenden Epimere können je nach PBD unterschiedlich stabil sein, sodass sie analytisch z.B. über NMR oder HPLC klar voneinander zu unterscheiden sind. So wurde Anthramycin zum Beispiel als Carbinolamin aus dem Kulturüberstand isoliert, in Methanol in Form von Methoxyanthramycin auskristallisiert und durch Erwärmen in Acetonitril in die Imin-Form überführt [40].

In wässrigen Medien wie Kultivierungsmedien oder Laufmitteln für HPLC-MS liegen PBD in einem Gleichgewicht zwischen Imin- und Carbinolamin-Form vor. Die unterschiedlichen Formen können als Strukturäquivalente betrachtet werden.

Abhängig von den eingesetzten Aufreinigungsmethoden und benutzten Lösemitteln wurden natürliche PBD in unterschiedlichen äquivalenten Strukturen beschrieben. So wurde zum Beispiel Tomaymycin als Methylether [37] beschrieben, das Imin hingegen hat später als Pretomaymycin oder 11-Demethyltomaymycin Eingang in die Literatur gefunden [41]. Im Fall von Chicamycin wurde der Methylether als A, das Imin als B deklariert [42]. Um der grundlegenden Struktur der PBD zu entsprechen,

## 1 Einleitung

wird innerhalb dieser Arbeit die von Gerratana [39] vorgeschlagene Nomenklatur verwendet. Das Imin wird als Grundform abgebildet, ohne die möglichen reversiblen Anlagerungen von Nucleophilen einzubeziehen.

Im Gegensatz dazu ist die Oxidation an N10-C11 zum sekundären Amid (**19**) mit der Ausbildung des Pyrrolbenzodiazepin-11-ons oder die in dieser Arbeit beschriebene Reduktion zum sekundären Amin an N10-C11 (**20**) mit der Ausbildung des 10,11-DihydroPyrrolbenzodiazepins irreversibel. Die Oxidation von PBDs wurde bisher in vier natürlichen Produzenten beobachtet. Die erste oxidative Umsetzung eines PBD wurde für Tomaymycin (**2**) zu Oxotomaymycin (**21**) in *Streptomyces achromogenes* beschrieben [43]. Weitere oxidative Umsetzungen sind bei RK-1441A (**13**) zu RK-1441B (**22**) in *Streptomyces* sp. RK-1441 [44] sowie bei Limazepine C (**7**) zu Limazepine A (**23**) in *Micrococcus* sp. strain ICBB 8177 bekannt. Der marine *Streptomyces* sp. M10946 produziert Oxoprothracarcin (**24**) [45] (siehe Abbildung 4). Dass in diesem Produzenten kein PBD mit N10-C11 Iminfunktionalität gefunden wurde, kann auf die ungewöhnlich lange Kultivierungsdauer von 14 Tagen auf Agarplatten, während der das PBD komplett oxidiert wurde, zurückgeführt werden.

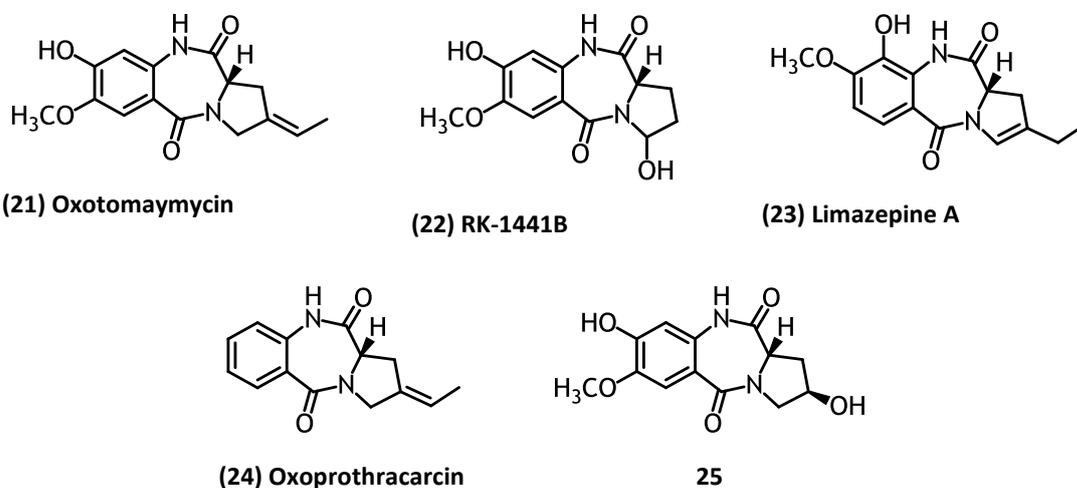


Abbildung 4: Pyrrolo[2, 1-c] [1, 4]benzodiazepin-5, 11-dione

Die Umsetzung zum Oxid führt zum Verlust der Bioaktivität des PBDs und dient wahrscheinlich als Eigenresistenzmechanismus des jeweiligen Stammes [39]. Trotz des Verlusts der Fähigkeit zu DNA-Alkylierung bleiben die interkalierenden Eigenschaften auch für das Dilactam erhalten [43], [46]. Jones *et al.* konnten zeigen, dass das Oxo-PBD **25** durch Interkalation zu Schmelzpunkterhöhungen und Fluoreszenzlöschung bei DNA führt.

Bisher wurden insgesamt 14 distinkte, bioaktive PBD-Strukturen aus natürlichen Produzenten beschrieben, welche sich durch ihre Substitutionsmuster am A- und C-Ring unterscheiden (siehe Abbildung 2). Eine gute Übersicht über die natürlichen PBD und die verfügbare Literatur bietet der Artikel von B. Gerratana [39]. Die Anzahl der chemisch synthetisierten PBD ist aufgrund einer Vielzahl unterschiedlicher Substituenten weitaus größer; Antonow und Thurston [40] geben einen guten Überblick über die möglichen PBD-Synthesewege sowie die damit erreichbaren Substituierungsmuster.

### 1.4.2 Biosynthese der Pyrrolbenzodiazepine mittels Nichtribosomaler Peptidsynthetasen

Der primäre Biosyntheseweg für Peptide ist die Ribosomale Proteinbiosynthese. Als direkte Informationsgrundlage dient ihr ein RNA-Strang. Sie greift auf 20  $\alpha$ -Aminosäuren der L-Form, die sogenannten proteinogenen Aminosäuren, zurück. Um eine höhere strukturelle und funktionelle Vielfalt zu erhalten, müssen diese Peptide posttranslational modifiziert werden [47]. Die Aminosäuren werden im Vorfeld von unabhängigen Aminoacyl-Transferasen aktiviert, indem sie zuerst über ATP-Hydrolyse einen AMP-Aminosäurekomplex bilden, der anschließend unter AMP-Abspaltung mit einer entsprechenden *transfer RNA* (tRNA) zu einer Aminoacyl-tRNA reagiert. Die Produkte der ribosomalen Proteinbiosynthese können sehr große Kettenlängen, bis zu mehreren zehntausend Aminosäuren, erreichen [48].

Ein weiterer Weg der Peptidsynthese stellt die nicht-ribosomale Peptidsynthese dar. Hierbei werden die Aminosäuren in der Regel direkt vom selben Protein aktiviert und in die Peptidkette inkorporiert. Die Produkte der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) sind kurz im Vergleich zu Proteinen, in der Regel handelt es sich um Aminosäurezahlen im einstelligen oder niedrigen zweistelligen Bereich. Trotz der relativ geringen Länge tritt eine große Vielfalt an nicht-ribosomalen Peptiden (NRP) durch eine hohe Anzahl unterschiedlichster Aminosäuren auf. Neben zahlreichen auch nicht proteinogenen L- $\alpha$ -Aminosäuren sind D-Aminosäuren,  $\beta$ -Aminosäuren, glykosylierte, methylierte, halogenierte Aminosäuren, heterocyclische und aromatische Aminosäuren in nicht-ribosomalen Peptiden beschrieben. Diese alternativen Aminosäuren werden zum Teil presynthetisiert und direkt in das Peptid inkorporiert, zum Teil während der laufenden Synthese aus anderen Aminosäuren

gebildet oder können nach der Ablösung modifiziert werden. Auch Mischformen aus Peptid und Ketid können aus Kombinationen der NRPS mit Polyketidsynthasen (PKS) hervorgehen [49].

NRPS sind in Modulen organisiert, wobei jedes Modul einen Elongationsschritt des Peptids katalysiert. Die Information über die Reihenfolge der Assemblierung und *cis*-Modifikation der Aminosäuren ist durch die Reihenfolge der Module definiert. Die Synthese kann entweder linear über alle Module verlaufen, wobei jedes Modul genau einen Schritt in der Elongation vornimmt oder iterativ wenn das NRP aus mehreren identischen Untereinheiten besteht, welche wie zum Beispiel beim Trilacton-Siderophor Bacillibactin konsekutiv synthetisiert und über eine TE-Domäne assembliert werden [50].

Jedes Modul innerhalb einer NRPS führt mehrere katalytische Einzelschritte aus. Den meisten dieser Schritte lässt sich innerhalb des Moduls eine spezifische Domäne zuordnen. In der Regel findet die erste Interaktion einer Aminosäure mit der Adenylierungs-Domäne (A) statt. Sie hat die Funktion der Selektion der jeweils spezifischen Aminosäure. Sie katalysiert die Bildung eines reaktiven Aminoacyl-Adenylat-Intermediats durch die Hydrolyse von ATP.

Der Aminosäurebaustein wird anschließend unter der Abspaltung von AMP auf die Phosphopantetheinyl-Gruppe (PPan) des stromabwärts gelegenen Peptidyl-Carrier-Proteins (PCP) übertragen. Die Prothetische Gruppe PPan hält das Edukt kovalent mittels einer energiereichen Thioester-Brücke gebunden und erlaubt durch seine Länge von ca. 20 Å gleichzeitig die Bewegung zu anderen katalytischen Zentren. In der Synthese der NRPS muss die PPan-Gruppe zur Ausbildung des Holoenzym posttranslational über eine Phosphopantetheinyl-Transferase an das Apoenzym gebunden werden [51].

Die eigentliche Elongation des NRP wird von Kondensations-Domänen katalysiert. Die Aminogruppe des stromabwärts gelegenen PCP-gebundenen Aminosäure-Intermediats greift das Carbonyl-C-Atom des Thioesters des stromaufwärts gelegenen Aminosäure- oder Peptidyl-Intermediats nukleophil an. Das entstehende Peptidyl-Intermediat steht dann für einen weiteren Elongationsschritt auf das nächste stromabwärts gelegene PCP oder zur Ablösung von der NRPS zur Verfügung, während das stromaufwärts gelegene PCP mit einer Aminosäure neu beladen werden kann.

## 1 Einleitung

---

Die Ablösung des NRP von der Synthetase im finalen Schritt erfolgt meist über eine Thioesterase-Domäne im C-terminalen Modul. Das Peptid wird vom P-Pan der letzten PCP-Domäne auf des Serin der TE-Domäne übertragen, wobei ein Acyl-O-TE-Komplex gebildet wird. Durch Hydrolyse kann die Ablösung des linearen NRP erfolgen. Über einen intramolekularen Ringschluss können je nach NRPS auch Lactame, Lactone oder Thiolactone gebildet werden. In iterativen Systemen zum Beispiel übernimmt die TE sowohl die Oligomerisation der einzelnen Bausteine als auch die Zyklisierung des finalen Peptids [49].

Die Terminierung der NRP-Synthese kann statt über eine TE alternativ über eine NAD(P)H-abhängige Reduktase-Domäne (RE) ablaufen. Die Ablösung des Peptidyl-S-PCP-Substrats mittels Zwei-Elektronen-Reduktion führt zu einem transienten Aldehyd, welcher intramolekular zu einem zyklischen Imin oder Hemiaminal abreagiert [50]. Eine weitere Möglichkeit der Ablösung des Peptidyls von der NRPS ist die vier-Elektronen-Reduktion. Sie führt zum primären Alkohol am C-Terminus des NRP und tritt zum Beispiel beim linearen Gramicidin auf [52]. Bei Myxochelin B erfolgt die vier-Elektronen-Reduktion in einer Sequenz beginnend mit einer Aldehydformation gefolgt von einer reduktiven Transaminierung zum primären Amin [53].

In die Sequenz der Assemblierung der Peptide durch die NRPS können zusätzliche modifizierende Zwischenschritte *in cis* eingefügt sein. Zyklisierungsdomänen können zusätzlich zur Ausbildung der Peptidbindung die Bildung eines Thiazolin- oder Oxazolinrings katalysieren. So wird zum Beispiel bei der Biosynthese von Yersiniabactin durch HMWP1 ein Cystein zum Thiazolin zyklisiert [54].

Epimerisierungsdomänen, welche stromabwärts der PCP-Domäne lokalisiert sein können, katalysieren die Umlagerung einer L-konfigurierten Aminosäure zur D-Konfiguration. Die *in situ* Epimerisierung des C $\alpha$ -Zentrums vom L- zum D-Aminoacyl während der Peptidketten-Elongation ist für das Initiationsmodul PheATE von Gramicidin S beschrieben [55].

Die Methylierung eines NRP während der Synthese kann durch N- oder C-Methyltransferasen erfolgen. N-Methyltransferasedomänen liegen stromabwärts von A-Domänen; die Methylierungsreaktion erfolgt während das NRP an den Phosphopantetheinylarm gebunden ist am freien Amin der an den P-pant-Arm gebundenen Peptidgruppe. N-Methylierungen treten zum Beispiel bei Cyclosporin A aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* auf [56], [57].

## 1 Einleitung

---

C-Methylierungen treten an C $\alpha$ -Atomen von Heterocyclen auf; die entsprechenden C-Methyltransferasedomänen liegen im Regelfall stromabwärts der jeweiligen PCP. Die C $\alpha$ -Methylierung im Anschluss an die Thiazolin-Bildung aus Cystein tritt zum Beispiel bei Yersiniabactin auf [54]. Methyl donor ist bei der N-Methylierung von Cyclosporin A wie bei der C-Methylierung von Yersiniabactin S-Adenosylmethionin. Eine *cis*-Modifikation, die mit der Initiation der Reaktion verbunden ist, ist die Formylierung der ersten Aminosäure des NRP. Hierbei ist im ersten Modul eine Formylierungsdomäne lokalisiert, welche den Formyl-Transfer von einem Donor, z.B. 10-Formyltetrahydrofolat, auf den N-Terminus der ersten Aminosäure katalysiert. Ein Beispiel für die Formylierung ist die Biosynthese der linearen Gramicidine A bis C [55].

Die Biosynthese von Anthramycin beinhaltet das für eine NRPS notwendige Minimalset an Domänen. Der Start erfolgt über eine A-PCP Didomäne; das Elongationsmodul enthält neben den notwendigen Domänen für Kondensation, Adenylierung und der PCP-Domäne eine N-terminale Domäne zur Ablösung des NRP von der NRPS, in diesem Fall eine Reduktase-Domäne. Besonderheiten gegenüber der Proteinbiosynthese sind der Einbau nicht proteinogener Aminosäuren. Die Startereinheit, welche den A-Ring im Anthramycin bildet, ist eine 3-hydroxylierte, 4-methylierte Anthranilsäure (**27**), eine aromatische  $\beta$ -Aminosäure, bei welcher die Carboxyl- sowie die Aminogruppe direkt am aromatischen Ring anelliert sind. Die Terminationseinheit ist ein Prolinderivat, welches den C-Ring im Anthramycin bildet, mit einer C4-C5 positionierten Doppelbindung im Ring, sowie einer (*E*)-3-Acrylamid-Gruppe an Position 3 des Rings (**26**).

Die zweite Besonderheit ist die reduktive Ablösung des Dipeptids mittels NADH-anhängiger Zwei-Elektronen-Reduktion. Das entstehende transiente Aldehyd am Prolinderivat reagiert dann mit dem Amin des Anthranilsäurederivats zum 1,4-Diazepin-5-on ab; damit wird postsynthetisch der B-Ring geschlossen und Anthramycin final ausgebildet (siehe Abbildung 5).

# 1 Einleitung

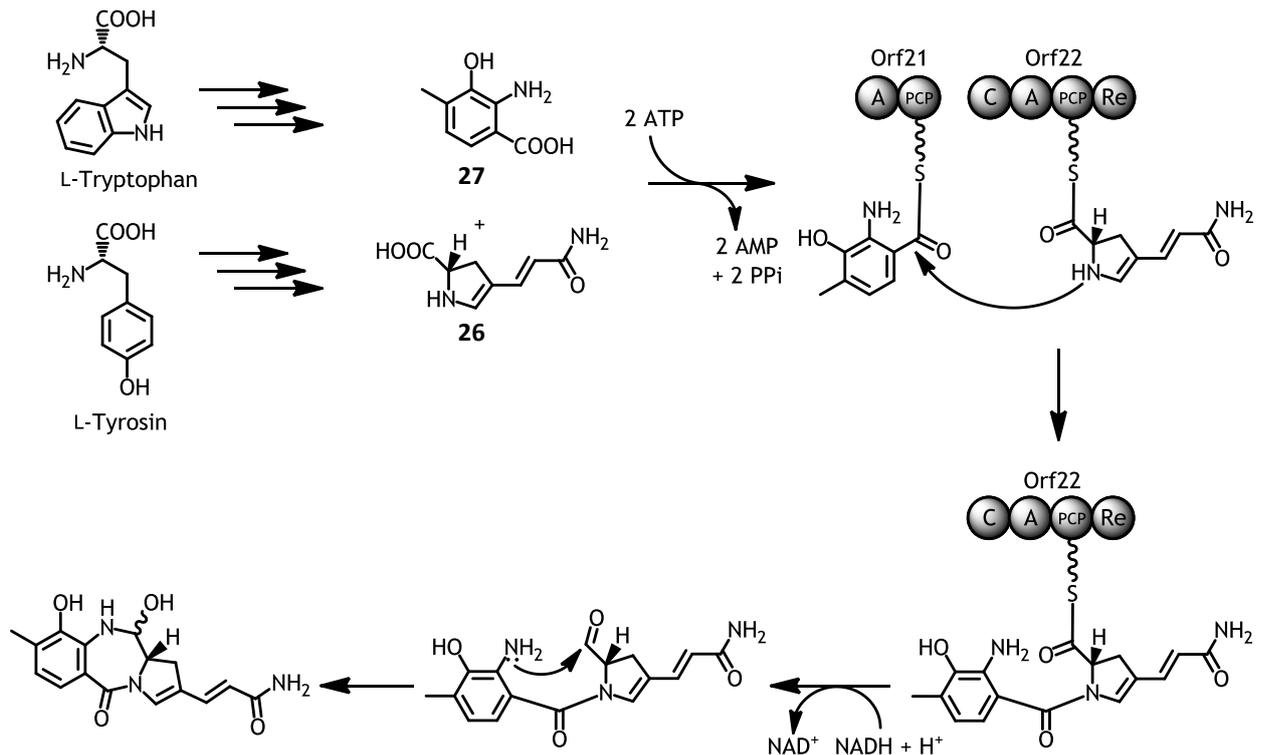


Abbildung 5: Nichtribosomale Biosynthese von Anthramycin (nach Bachmann *et al.* [58])

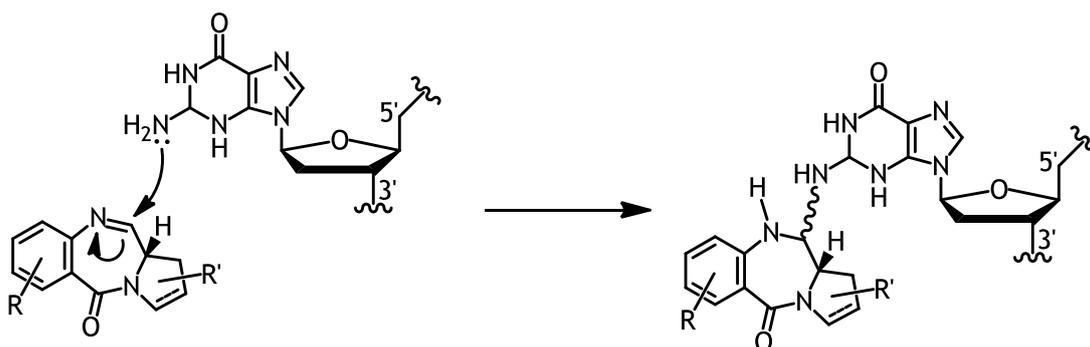
## 1.4.3 Wirkmechanismus der Pyrrolbenzodiazepine

Die DNA-Helix ist in ihrer Struktur nicht uniform. Die Watson-Crick-Basenpaarungen führen zu zwei unterschiedlichen Abständen der Ribose-Phosphat-Rückgratstränge in der Helix. Die Bereiche zwischen den Rückgratsträngen - als große Furche und kleine Furche bezeichnet - stehen in einem Größenverhältnis von 22 Å zu 12 Å Öffnungsweite [59]. Durch die Basenpaaranordnung sind für jede Base spezifische Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren und -Donoren je Furche exponiert. Diese Struktur ermöglicht die sequenzspezifische Bindung von niedermolekularen Substanzen und die Interaktion von Proteinen mit der DNA, welche maßgeblich mit der großen Furche wechselwirken [60]. Pyrrolbenzodiazepine interkalieren in der kleinen Furche und gehen eine kovalente Bindung mit Guanin ein. Natürliche PBD weisen durch die Chiralität an der C11a-Position eine leicht gedrehte Struktur auf, welche der Drehung der kleinen Furche entspricht und die Interkalation begünstigt. Substituenden an A- und C-Ring können die Bindungsaffinität des Moleküls weiter erhöhen, indem sie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen zu den DNA-Basen

## 1 Einleitung

ausbilden. PBDs zeigen eine Präferenz für die Anlagerung mit dem A-Ring in 3'-Richtung des alkylierten Strangs, wobei der C6-Kohlenstoff des A-Rings aus der kleinen Furche heraus orientiert ist [61]. Anthramycin, Tomaymycin und Sibiromycin binden sequenzspezifisch, mit der höchsten Affinität zu Guaninen mit 5' und 3' flankierendem Purin. Diese Spezifität resultiert nicht aus der Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen, sondern aus der geringeren Verwindung der B-DNA-Helix bei sukzessiven Purin-Purin Schritten, welche der Verwindung des PBD-Gerüsts entspricht [62], [63]. Struktur-Untersuchungen von PBD-DNA Addukten weisen auf eine direkte Reaktion zwischen Guanin und der N10-C11 Imin-Funktionalität hin.

Die kovalente Bindung wird hierbei durch einen direkten nukleophilen Angriff des Stickstoffs der C2-NH<sub>2</sub>-Gruppe des Guanin auf den C11 Kohlenstoff gebildet [64], [65] (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Ausbildung des Guanin-Pyrrolobenzodiazepin-Addukts durch nukleophilen Angriff der C2 ständigen Aminogruppe des Guanins auf das C11 der Imin-Funktionalität des PBD.

Die innere Verwindung natürlicher PBDs führt zu einer Anlagerung des Moleküls in die kleine Furche, die nahezu ohne Verformung der DNA-Helix abläuft. Vermutlich bewirkt diese Passgenauigkeit, dass zelleigene Reparaturmechanismen die Modifikation durch PBD nur schlecht erkennen und darauf reagieren können [66]. Für synthetische PBD konnte gezeigt werden, dass die kovalente Modifikation durch Maskierung von regulatorischen Elementen die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindert oder innerhalb codierender Sequenzen zum Abbruch der Transkription führt [67]–[69]. Bei Untersuchungen an Anthramycin konnten zudem Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden, die durch zelleigene DNA-Exzisionsmechanismen ausgelöst wurden [70]. Die durch PBD-Dimere hervorgerufenen, wenige Basenpaare überspannenden Inter- und

## 1 Einleitung

Intrastrang-Crosslinking sind für zelleigene Reparaturmechanismen deutlich schwieriger zu reparieren als die Bindung eines monomeren PBD [40]. Zudem weisen Dimere eine deutlich höhere Sequenzspezifität als Monomere auf, die sich durch Länge und Art des Linkers beeinflussen lässt. Die daraus resultierende Spezifität für bestimmte Krebszelllinien macht die Dimere zu hochinteressanten Kandidaten für die Krebstherapie [71], [72] (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Cytotoxizitäten und minimale Hemmkonzentrationen (MIC) ausgewählter PBD (verändert nach Gerratana 2010 [39])

PBD	IC50 $\mu$ M			MIC g/l	
	L1210	ADJ/PC6	CH1	<i>Staph. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
<b>Anthramycin</b>	0.022	0.0028	0.32	0.1-5	0.1-5
<b>DC-81</b>	0.38	0.33	0.10		
<b>Tomaymycin</b>	0.0037	0.0018	0.00013	6	12.5
<b>Sibiromycin</b>	0.0029	0.000017	0.040	1	0.3

	A2780	CH1 <sup>cisR</sup>	CH1
<b>SJG-136</b> (Dimer)	0.000022	0.00012	0.0006

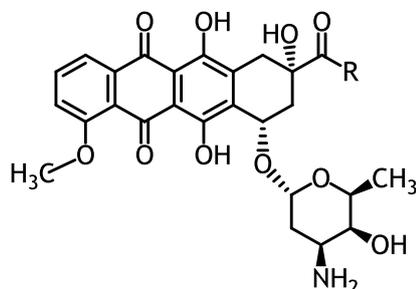
### 1.4.4 Verwendung der Pyrrolbenzodiazepine

Aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität rückten PBD bereits kurz nach ihrer Entdeckung in den Fokus klinischer Untersuchungen. Erste Tierversuche sowie klinische Studien wurden mit Anthramycin bereits in den sechziger Jahren durchgeführt. Ähnliche Versuche in der Anwendung von Sibiromycin folgten in den siebziger Jahren. Trotz anfänglicher Erfolge wurden frühe klinische Studien wieder eingestellt, da sowohl Anthramycin als auch Sibiromycin kardiotoxische Effekte in Tierversuchen zeigten [73]–[75].

Diese kardiotoxischen Effekte sind denen der Anthracycline Doxorubicin und Daunomycin (**28**) sehr ähnlich. Vermutlich basiert die zu den Anthracyclinen analoge Toxizität der PBD auf der Bildung von *ortho*-Chinoniminen, für deren Bildung eine spontane Umlagerung (Abbildung 7, I) oder Oxidation (Abbildung 7, II) postuliert wird.

# 1 Einleitung

Gerade die Möglichkeit der Oxidation ist im Muskelgewebe des Herzens aufgrund der guten Verfügbarkeit von Sauerstoff und der hohen Konzentration von katalytisch aktivem Eisen sehr wahrscheinlich [76], [77].



(28) Doxorubicin, Daunorubicin

Doxorubicin R = -CH<sub>2</sub>OH  
Daunorubicin R = -CH<sub>3</sub>

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass bei Anthramycin-Gabe die Komedikation von Ubichinon-10 oder alpha-Tocopherol oder eine Kombination von beiden Substanzen einen analogen Effekt - die deutliche Abmilderung der kardiotoxischen Effekte - wie bei Anthracyclinen zeigt [75].

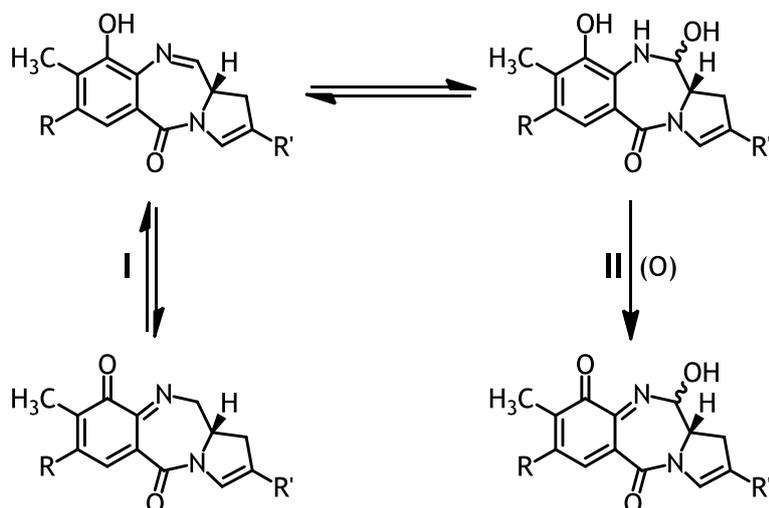
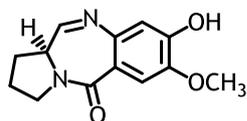


Abbildung 7: Mögliche Ausbildung von *ortho*-Chinoniminen bei PBD mit einer 9-OH Gruppe, durch I) spontane Umlagerung oder II) unter Einfluss von Sauerstoff.

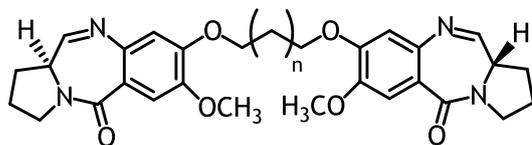
Im Gegensatz dazu konnten weder bei Tomaymycin noch bei Neothramycin A (11) und B (12) - welche jeweils keine funktionale Gruppe an C9 und eine Hydroxylierung an C8 aufweisen - kardiotoxische Effekte gezeigt werden [78]. Weiter unterstützt wird

## 1 Einleitung

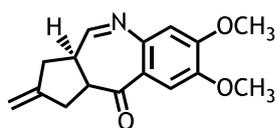
diese These durch Versuche mit Sibiromycin. Yonemoto *et al.* [79] konnten in *Streptosporangium sibiricum* durch einen Knock-out des Methyltransferase-Gens *sibL* einen für Mutasynthese-Experimente zugänglichen Stamm erzeugen. Bei Fütterung mit 4-Methyl-Anthranilsäure produzierte der Stamm 9-Desoxysibiromycin. In einem Kardiotoxizitätsassay mit der humanen Kardiomyozyten-Zelllinie AC16 konnte eine fünffach verminderte Toxizität von 9-Desoxysibiromycin verglichen mit nativem Sibiromycin gezeigt werden. Überraschenderweise zeigte 9-Desoxysibiromycin im NCI *cancer screen* ([http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common\\_files/cell\\_list.html](http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html)) einen durchschnittlich fünffach höheren GI<sub>50</sub>-Wert als Sibiromycin sowie ein verändertes Wirkungsspektrum bei unterschiedlichen Krebszelllinien [80].



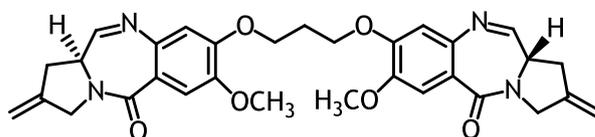
(29) DC-81



(30) DSB-120



31



(32) SJG-136

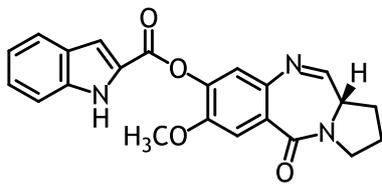
**Abbildung 8:** Monomere synthetischer Pyrrolobenzodiazepine und ihre korrespondierenden Dimere.

Die Dimerisierung von Pyrrolobenzodiazepinen führt zu erhöhter Zytotoxizität und Monomer/Linker-abhängiger Sequenzspezifität. Während das DC-81 Dimer DSB-120 noch nicht klinisch nutzbar war, befindet sich die Nachfolgestruktur SJG-136 in

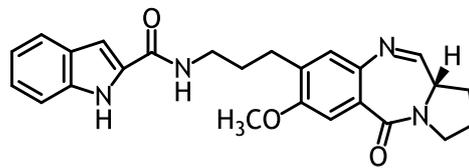
## 1 Einleitung

---

klinischen Studien der Phase II (siehe Abbildung 8). Neben homodimeren wurden auch PBD-Heterodimere und in hybriden Strukturen Verknüpfungen von PBD mit anderen Pharmakophoren synthetisiert und charakterisiert. So erreichten zum Beispiel die DC-81-indolcarbonyl-Derivate **33** und **34** eine sehr hohe Sequenzspezifität [81]. Ein weiterer Ansatz ist die Synthese von biologisch inaktiven *prodrugs*, welche erst im Tumor enzymatisch zur aktiven Form umgesetzt werden. Eine gute Übersicht über Heterodimere, hybride Strukturen und *prodrugs* bieten Cipolla *et al.* (2009).



33



34

Es gibt experimentelle Ansätze PBDs antimikrobiell einzusetzen. Die besten Ergebnisse wurden bisher mit PBD-biaryl-Addukten erreicht. Die hohe Zytotoxizität von PBDs und die geringe Erfahrung mit den *in vivo* Effekten von Modifikationen ließen bisher jedoch keine Etablierung als Antibiotika zu [83], [84].

### 1.5 Die heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern

Die Expression von Biosynthese-Genclustern für Sekundärmetabolite führt unter Laborbedingungen im Wildtyp-Stamm häufig nur zu geringer Produktion. In manchen Fällen, bei sogenannten kryptischen Clustern, unterbleibt die Produktion vollständig [85]. Zudem sind Wildtyp-Stämme häufig mit Standard-Protokollen genetisch bedeutend schlechter zugänglich als etablierte Laborstämme. Um mit diesen Stämmen arbeiten zu können, sind aufwändige und langwierige Versuche zur Anpassung von Standardprotokollen notwendig [86], [87]. Zeigt der Stamm keine Produktion, ist die phänotypische Kontrolle des Erfolgs von Versuchen zur genetischen Modifikation nicht möglich. Lassen sich Vektoren trotz wiederholter Optimierungsschritte nicht erfolgreich in den Wildtyp-Stamm einbringen, bleibt die heterologe Expression als Möglichkeit, das Biosynthese-Gencluster für Modifikationen und Produktionsstudien zugänglich zu machen [88].

Der Erfolg der heterologen Expression eines Biosynthese-Genclusters wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Bei sequenzierten Organismen bietet sich die Isolation von Genombereichen mittels *direct cloning* an [89], der klassische Weg ist noch immer die Erstellung einer Cosmid-Bank, in welcher die DNA des Produzentenstamms in 35 bis 40 kb langen Fragmenten in einer Vielzahl von Vektoren mit zum Teil überlappenden Sequenzbereichen des Genoms verfügbar gemacht wird [90].

Bei Pflanzen liegen die Gene der Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten meist über das Genom verteilt vor [91]. Im Gegensatz dazu besteht ein großer Vorteil in der Arbeit mit Bakterien darin, dass die Gene für die Biosynthese eines Sekundärmetaboliten häufig in Form von Clustern vorliegen, das heißt in unmittelbarer Nähe zueinander auf einem relativ kurzen, definierten Bereich des Genoms [92].

Der erste Schritt in der gezielten heterologen Expression eines Genclusters ist seine Lokalisierung. Wird phänotypisch die Produktion eines Sekundärmetaboliten in einem Wildtypstamm festgestellt, dessen Sequenzdaten nicht vorliegen, können Cluster über die Homologie zu bekannten Gensequenzen identifiziert werden. In einem retrobiosynthetischen Ansatz können aus der Struktur einer Substanz Rückschlüsse

auf die Biosynthese gezogen werden. Den hypothetischen Reaktionsschritten können dann Funktionalitäten und damit Gensequenzen aus bekannten, möglicherweise homologen Biosynthesewegen zugeordnet werden. Basierend auf diesen Genen können DNA-Sonden entworfen werden. In Blotting-Versuchen werden diese Sonden genutzt, um Cosmide mit verwandten Genen zu identifizieren, welche das gesamte oder zumindest Teile des Genclusters tragen.

In den letzten Jahren ist die Sequenzierung ganzer Genome effizienter und wirtschaftlicher geworden. Diese Methode ermöglicht die *in silico*-Identifizierung von Genclustern. Basierend auf der bekannten genomischen Sequenz können gezielt Sonden für das identifizierte Cluster entworfen werden.

Nach der Isolierung des Clusters muss eine geeignete Kombination aus Vektor und Wirtstamm ausgewählt werden. Bei der Auswahl des Wirtstamms für die heterologe Expression muss die jeweilige Codon usage berücksichtigt werden. *Rare codons* können an relevanten Positionen die Translation verlangsamen und somit die korrekte Faltung des Proteins begünstigen [93]. Eine stark abweichende Codon Usage kann die Translation insgesamt nachteilig beeinträchtigen. Diese Problematik wird insbesondere in der synthetischen Biologie intensiv adressiert; so können Proteinexpressionslevel eines Gens bei synonymem Codon-Usage zwischen nicht detektierbar und 30 % des Zellgesamtproteins differieren [94].

Auch bezüglich der Promotoren-Auswahl sind ggf. Anpassungen an der Sequenz des Genclusters notwendig, um bei der späteren Produktion Einbußen durch ineffizientes Ablesen der nativen Promotoren des Cluster-Donors im Wirtstamm zu vermeiden [95].

Ein weiterer Flaschenhals in der Produktion kann die Verfügbarkeit von Edukten der Biosynthese sein. Stellt der Wirtstamm die Edukte nicht selbst zur Verfügung, kann eine Komplementierung des Biosynthesewegs über Fütterung oder über die Integration zusätzlicher Biosynthesegene für die fehlenden Vorläufer notwendig sein. Nach der Translation liegen NRPS in der Apo-Form vor und müssen durch die Addition eines Phosphopantetheinylarms zum Holoenzym aktiviert werden [49]. Die hierfür notwendigen Transferasen liegen häufig nicht im Cluster selbst vor. Eine Komplementierung wird immer dann notwendig, wenn sich herausstellt, dass die jeweiligen Transferasen des Wirtstamms keine ausreichend breite Spezifität aufweisen.

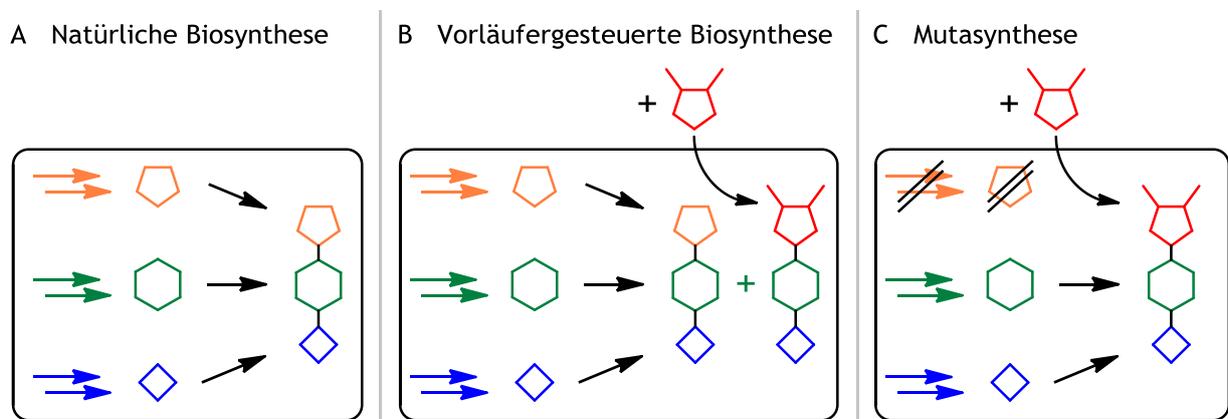
## 1 Einleitung

---

Diese Faktoren - Codon usage, Promotoreffizienz, Verfügbarkeit von Vorläufern sowie Aktivierung von Enzymen - sind abhängig vom Verwandtschaftsgrad des Wirtsstammes zum nativen Stamm. Je ähnlicher beide Stämme sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass Biosynthese-Prozesse auf gleiche Weise ablaufen und daher nicht durch zusätzliche aufwändige Optimierungsschritte die Expressionsstrategie genetisch angepasst werden muss.

## 1.6 Vorläufergesteuerte Biosynthese und Mutasyntese

Die Vorläufergesteuerte Biosynthese ist die grundlegendste und einfachste Form in die Biosynthese eines Sekundärmetaboliten einzugreifen. Versuche können direkt mit dem produzierenden Wildtypstamm ausgeführt werden und es werden keine genetischen Modifikationen vorausgesetzt. Bei der vorläufergesteuerten Biosynthese wird ein synthetischer Baustein zugefüttert, welcher einem der natürlichen Edukte ähnelt und es in der Biosynthese verdrängen soll (siehe Abbildung 9) [96].



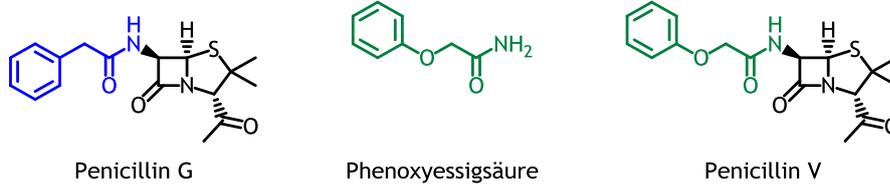
**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der natürlichen Biosynthese, der vorläufergesteuerten Biosynthese und der Mutasyntese. **A)** In der natürlichen Biosynthese stammen alle Edukte aus Biosynthesewegen des Produzenten selbst. Es entsteht das native Produkt. **B)** In der vorläufergesteuerten Biosynthese wird ein strukturell verwandter synthetischer Baustein, zugefüttert. Es entsteht eine Mischung aus dem nativen und dem veränderten Produkt. **C)** In der Mutasyntese ist der Biosyntheseweg eines nativen Edukts inaktiviert, wodurch bei Fütterung des synthetischen Bausteins nur das veränderte Produkt gebildet wird.

Bereits in den fünfziger Jahren wurde bei der Fütterung von Phenoxyessigsäure zu *Penicillium chrysogenum* Penicillin V - die erste peroral verabreichbare Penicillinvariante - entdeckt, welche Penicillin G stark ähnelt und zusätzlich zu den natürlichen Penicillinen gebildet wurde [97]. Problematisch an der vorläufergesteuerten Biosynthese ist zum einen die Mischung aus dem Zielprodukt und natürlichen „Nebenprodukten“, was die Aufreinigung aufgrund der physikalischen Ähnlichkeit der Produkte deutlich erschweren kann. Zum anderen muss das gefütterte synthetische Edukt mit dem natürlichen Vorläufer konkurrieren und in der Lage sein

## 1 Einleitung

---

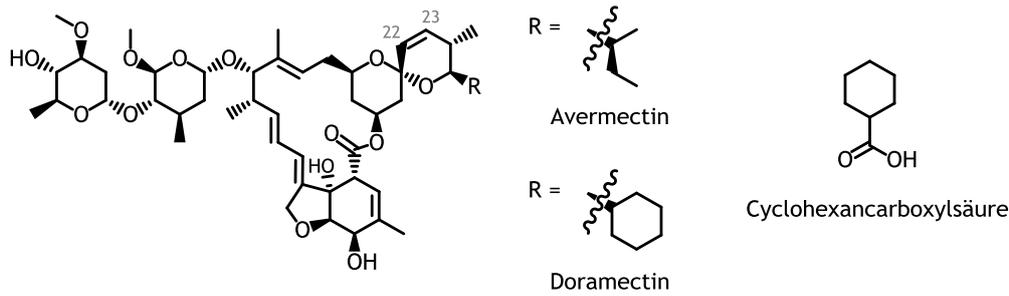
diesen zu verdrängen, was die Fütterung großer Mengen erforderlich macht und häufig nur ein schmales Spektrum an inkorporierten Edukten zulässt.



Bei der Mutasynthese wird die Biosynthese eines Vorläufers des Sekundärmetaboliten unterbrochen. In den meisten Fällen verliert der so modifizierte Stamm die Fähigkeit den Sekundärmetaboliten ohne eine externe Komplementierung des Vorläufers zu synthetisieren. Durch den Wegfall des natürlichen Edukts geht nur der gefütterte synthetische Baustein, das Mutasynton, in die Biosynthese ein und die häufig verlustreiche Konkurrenzsituation zweier Bausteine entfällt. Durch den Wegfall einer Produktmischung wird häufig die Aufreinigung leichter, die Ausbeute steigt und die Inkorporation eines breiteren Spektrums an synthetischen Edukten wird möglich [96].

Das kommerziell in der Veterinärmedizin als Antiparasitikum genutzte Avermectinderivat Doramectin wird über Mutasynthese in *Streptomyces avermitilis* produziert. Der *branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase* defiziente *S. avermitilis* Stamm wurde über *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-Mutagenese und anschließendes Screening erstellt und war nicht mehr in der Lage Avermectin zu synthetisieren. Mit der Fütterung von R(-)-2-Methylbuttersäure konnte die Fähigkeit des Stamms zur Inkorporation von Mutasynton nach der Mutagenese demonstriert werden [9]. In anschließenden systematischen Fütterungen von über vierzig unterschiedlichen Startereinheiten wurde mit der Fütterung von Cyclohexancarboxylsäure Doramectin entdeckt [98].

# 1 Einleitung



**Abbildung 10:** Struktur von Avermectin und dem durch Fütterung von Cyclohexancarboxylsäure mutasynthetisch gewonnenem Derivat Doramectin.

Während frühe Mutasyntesen vorangehende aufwändige Mutageneseversuche voraussetzten, wurden mit den immer einfacher und günstiger werdenden Möglichkeiten der DNA-Sequenzierung und dem wachsenden Verständnis für die genetisch-biochemischen Zusammenhänge gezielte Modifikationen der Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten möglich.

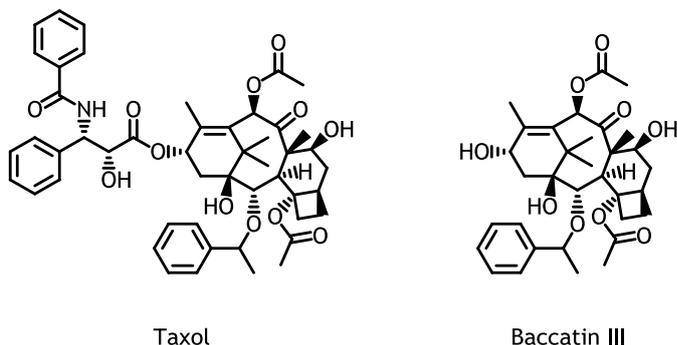
Das Reserveantibiotikum Vancomycin ist eines der letzten zu Verfügung stehenden Mittel bei Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* [99]. Das Heptapeptid Vancomycin wird über NRPS assembliert, glykosyliert, über drei Bindungen intramolekular quervernetzt und dichloriert.

Das von *Amycolatopsis balhimycina* (früher *A. mediterranei* [100]) produzierte Vancomycin-Typ Antibiotikum Balhimycin beinhaltet wie Vancomycin C-terminal die nichtproteinogene, seltene Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG). Nach der gezielten Deletion von *dpgA* war *A. balhimycina* nicht mehr in der Lage DHPG zu synthetisieren, die Balhimycin-Produktion blieb aus und konnte mit DHPG Fütterung wieder hergestellt werden [101]. In anschließenden Fütterung von 3,5-Dimethoxyphenylglycin konnte ein sterisch anspruchsvollerer Baustein erfolgreich inkorporiert werden und mit weiteren di- und monosubstituierten Phenylglycinen neue antibiotisch aktive Balhimycinderivate mit unterschiedlichen Glykosylierungsmustern mutasynthetisch dargestellt werden [100].

Mittels Mutasynthese können so auch komplexe vollsynthetisch kaum zugängliche Sekundärmetabolite verändert werden. Die Mutasynthese erreicht ihre natürlichen Grenzen aber bei der Toleranz der nativen Biosynthesewege gegenüber den gefütterten synthetischen Bausteinen. Die Änderung der Spezifität von NRPS über Mutationen innerhalb der A-Domänen ist bereits gezeigt worden, aber bisherige Versuche lassen noch keine zuverlässigen Vorhersagen oder gezielte Änderungen zu [102].

### 1.7 Das Potential kombinierter biologischer und chemischer Synthesen

In Semisynthesen werden natürliche Vorläufer als Edukte genutzt und modifiziert. Dieses Vorgehen wird bei der großtechnischen Herstellung von Taxol genutzt, welches aus natürlichen Quellen schlecht verfügbar und vollsynthetisch nur sehr aufwändig darstellbar ist. Taxol wird erfolgreich in der Tumorthherapie zum Beispiel bei Eierstockkrebs und metastasierendem Brustkrebs genutzt [103]. Es kommt in geringer Konzentration in der Rinde der langsam wachsenden Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) vor, welche aufgrund ihrer Seltenheit und ihres langsamen Wachstums als Quelle jedoch weder wirtschaftlich interessant noch ökologisch akzeptabel ist. Erst durch die Semisynthese von Taxol aus Baccatin III, welches aus den Nadeln der gut kultivierbaren Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) gewonnen werden kann der weltweite Taxolbedarfs gedeckt werden [104].



Zusätzlich zur wirtschaftlichen Gewinnung von schlecht verfügbaren natürlichen Substanzen aus anderen natürlichen Vorläufern kann die Semisynthese genutzt werden, um natürliche Strukturen so zu modifizieren, dass z.B. ihre Stabilität erhöht oder ihr Wirkungsspektrum modifiziert wird. Bereits in den fünfziger Jahren konnte mit der Semisynthese von Dihydrostreptomycin eine stabilere Variante von Streptomycin synthetisiert werden [105] (siehe Abbildung 11).

# 1 Einleitung

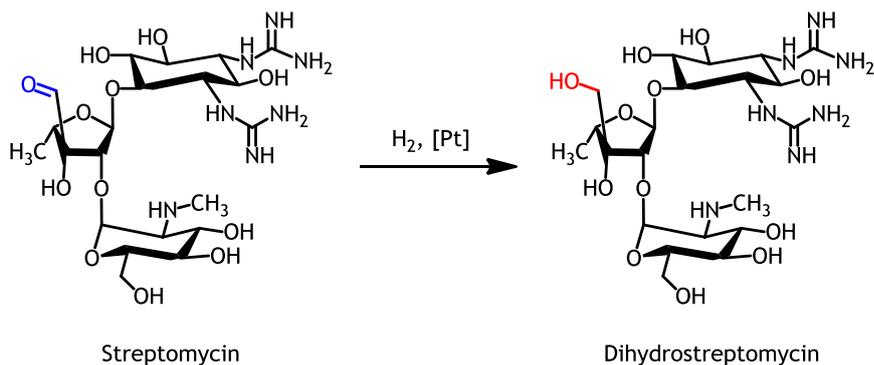
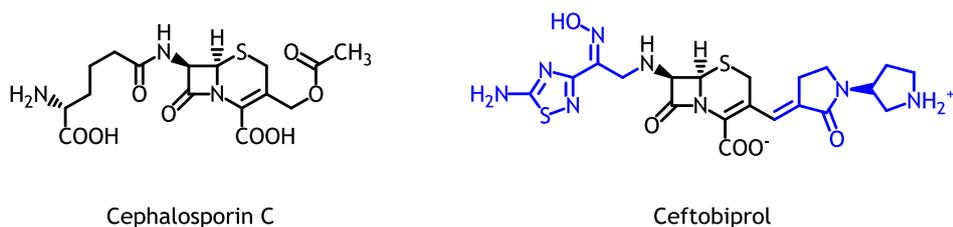


Abbildung 11: Semisynthese von Dihydrostreptomycin.

Eine kontinuierliche Erfolgsgeschichte ist die Semisynthese immer neuer Cephalosporinderivate. Beginnend mit der Semisynthese von 7-Aminocephalosporansäure aus Cephalosporin C mit Aktivität gegen Gram-positive Bakterien [106] geht die Wirkstoffklasse mit dem Breitbandantibiotikum Ceftobiprol in die „fünfte Generation“ [107].



Wie Doramectin basiert auch das gegen Flussblindheit und Elephantiasis beim Menschen eingesetzte Antiparasitikum Ivermectin auf Avermectin (siehe Abbildung 10). Durch Hydrierung mittels Wilkinson-Katalysator  $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$  wird 22,23-Dihydroavermectin gebildet. In einem Mischungsverhältnis aus  $< 80\%$  22,23-Dihydroavermectin  $\text{B}_{1a}$  und  $> 20\%$  22,23-Dihydroavermectin  $\text{B}_{1b}$  wird es unter dem Namen Ivermectin geführt [108], [109]. Für die Entwicklung von Ivermectin wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2015 an Satoshi Ōmura und William C. Campbell verliehen.

Die strukturelle Komplexität vieler natürlicher Leitstrukturen kann jedoch dazu führen, dass selbst einfache chemische Modifikationen sehr kompliziert werden. Eine Möglichkeit, die chemische Zugänglichkeit von Naturstoffen zu erhöhen, ist das Einbringen einer funktionalen Gruppe über vorläufergesteuerte Biosynthese oder Mutasyntese mit anschließender Semisynthese. Eine solche Funktionalisierung eines natürlichen Wirkstoffs kann über die Integration einer Propargylgruppe und

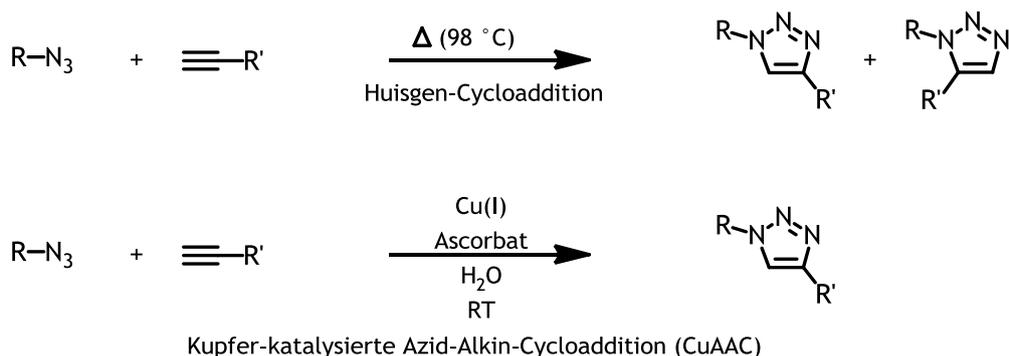
anschließende Kopplung mit einem Azid erfolgen. Über die relaxierte Substratspezifität der Startereinheit konnte so mittels vorläufergesteuer Biosynthese 15-Propargylerythromycin A synthetisiert werden [110]. Bei den Ansamitocinen konnte über die Fütterung Alkyn-funktionalisierter 3-Aminobenzoessäuren eine Bibliothek aus Ansamitocinderivaten mit zum Teil sehr hohen antineoplastischen Eigenschaften generiert werden [111].

Die strukturelle Komplexität vieler Sekundärmetabolite führt dazu, dass selbst einfache chemische Modifikationen unerwünschte Nebenreaktionen und damit den Verlust der funktionellen Struktur zur Folge haben können. Um dieser Problematik Rechnung zu tragen, sind - wie in den vorangehenden Beispielen - Reaktionen aus der sogenannten Click-Chemie ideal, um einen chemischen Angriffspunkt für die Semisynthese in Naturstoffe einzubringen.

Der Begriff der Click-Chemie wurde von Kolb *et al.* 2001 geprägt und beinhaltet den Anspruch der *„Entwicklung leistungsfähiger, gut funktionierender und selektiver Reaktionen für die effiziente Synthese neuartiger nützlicher Verbindungen sowie kombinatorischer Bibliotheken mittels Heteroatomverknüpfungen (C-X-C)“* (Kolb, Finn, & Sharpless). Die Click-Chemie spielt eine Rolle bei der Markierung von Biomolekülen die zu instabil für andere Reaktionsmechanismen sind oder sogar *in vivo* z.B. mit Fluoreszenzmarkern verbunden werden sollen. Peptid-Oligonucleotid-Konjugate können mittels Click-Chemie erstellt werden, sowie Biomoleküle auf Festphasen immobilisiert werden [113].

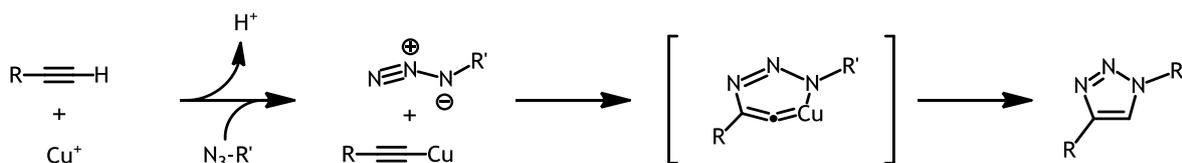
Die vier Jahre nach der Definition des Begriffs Click-Chemie von Himo *et al.* etablierte Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) gilt als Prototyp der Click-Chemie. Der Einsatz von Cu(I) als Katalysator und Ascorbat als Reduktionsmittel zur Stabilisierung des Kupfers ermöglicht die Cycloaddition in Wasser bei Raumtemperatur [114], Reaktionsbedingungen welche gerade bei temperaturempfindlichen Naturstoffen zwingend sein können. Naturstoffe können bei den harten Reaktionsbedingungen der konventionellen Huisgen-Cycloaddition leicht zersetzt werden. Ein weiterer großer Vorteil der CuAAC ist die strikte Stereoselektivität der 1-3 dipolaren Cycloaddition (siehe Abbildung 12).

# 1 Einleitung



**Abbildung 12:** Vergleich der konventionellen Huisgen Cycloaddition mit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition.

Durch die hohe Spezifität der Reaktion und die Seltenheit der reaktiven Gruppen in der Natur werden Verluste des Edukts an Nebenprodukte vermieden und die Aufreinigung deutlich vereinfacht. Natürliche Alkine sind relativ selten, sie werden in Sekundärmetaboliten, häufig Abwehrstoffen bei Bakterien, Pilzen, Schwämmen und Pflanzen - zum Beispiel Carotatoxin bei Möhren [115] oder Cicutoxin bei Wasserschierling [116] - gefunden. Da in der Natur hauptsächlich sekundäre Alkine auftreten, in der CuAAC jedoch ein primäres Alkin benötigt wird, um die Koordination von Kupfer(I) an das Alkin zu ermöglichen [114], würden auch diese Sekundärmetabolite die Reaktion nicht störend beeinflussen (siehe Abbildung 22). Da Azide nicht natürlich auftreten, ist auch unter hochgradig unreinen Reaktionsbedingungen - wie zum Beispiel bei Überständen von Bakterienkulturen - nicht mit der Ausbildung von Nebenprodukten zu rechnen.



**Abbildung 13:** Reaktionsmechanismus der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (verändert nach Himo *et al.* [114]).

Für Semisynthesen ist die CuAAC interessant, da Alkine für gewöhnlich biologisch inert sind und von Bakterien gut in Fütterung aufgenommen werden. So konnten zum Beispiel zahlreiche neue Ansamitocin-Derivate über die Fütterung von Propargylaminobenzoesäuren erstellt werden, welche mit anschließender CuAAC unterschiedlich derivatisiert wurden [111].

### 1.8 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Die Totalsynthese von PBD ist aufgrund des Zusammentreffens der chemisch sensitiven N10-C11-Imin-Gruppe, dem Stereozentrum an der Position 11a, dem Verlust der ungesättigten Bindungen im C-Ring bei reduktiver Zyklisierung, und dem Einfluss der A-Ring Substituenten auf die Zyklisierung des Diazepines sehr anspruchsvoll [117], [118].

Natürliche PBDs auf der anderen Seite liegen nur in begrenzter Anzahl und fest definierten Strukturen vor, welche mitunter schwerwiegende Nachteile für eine mögliche Anwendung mit sich bringen [39], zum Beispiel die kardiotoxische Wirkung von PBDs mit einer C9-Hydroxyl-Gruppe [73]. Auch die oft sehr geringe Ausbeute und die daraus folgende Notwendigkeit großer Kulturvolumina und aufwändiger Aufreinigungsprozesse limitiert die wissenschaftliche und in noch stärkerem Maß die wirtschaftliche Zugänglichkeit der meisten Sekundärmetabolite.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Biosynthesemechanismus von Tomaymycin aufgeklärt und basierend auf diesen Erkenntnissen eine Ertragssteigerung im Industriestamm *Streptomyces spec.* FH6421 erreicht werden. Zur Charakterisierung der Biosynthese sollten die Vorgänge auf genetischer, metabolischer und Proteinebene untersucht werden. Zunächst sollte das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster identifiziert und annotiert werden. Anhand der identifizierten Gene sollte anschließend eine Theorie für die Biosynthese aufgestellt werden. Anschließend sollte die Produktion durch Fütterung möglicher Vorläufer sowie durch einen Optimierungsansatz verschiedener Kultivierungsbedingungen gesteigert werden. Zur näheren Beschreibung der Assemblierung von Tomaymycin sollten zudem die Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) exprimiert, aufgereinigt und funktionell charakterisiert werden. Durch die im Verlauf der Arbeit gewonnen Erkenntnisse und erstellten Systeme ließ sich die Fragestellung auf die Herstellung und Beschreibung neuer PBD erweitern.

Hierbei wurde zuerst die Mutasyntese und Charakterisierung neuer Tomaymycinderivate durchgeführt. Anschließend wurden die Möglichkeiten zur vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Derivaten untersucht, welche insbesondere für die Deletion der C9-Hydroxylgruppe von Interesse waren. Die

## 1 Einleitung

---

Arbeiten am Sibiromycin-Produzenten wurden anschließend auf die Etablierung eines Systems zur Synthese eines Sibiromycin-basierten PBD-Homodimers ausgeweitet. Hierfür musste zuerst ein Mutasynton entwickelt werden, welches in der vorläufergesteuerten Biosynthese aufgenommen wird und einen chemischen Angriffspunkt bietet. Die anschließende chemische Reaktion sollte die Dimerisierung des PBD bei hoher Ausbeute in der Umsetzung, freier Linkerwahl und milden Reaktionsbedingungen ermöglichen. Hierfür wurde auf die Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zurückgegriffen.

## 2 Material

Aufgrund der eingesetzten HPLC-MS Analyse-Software *Qual Browser version 2.0.7* (Thermo Fisher Scientific Inc.) wird als Dezimaltrennzeichen der international verwendete Punkt, statt des in Deutschland üblichen Kommas verwendet. Diese Schreibweise wird in der gesamten Arbeit eingesetzt.

### 2.1 Chemikalien

Aceton	Becton Dickinson and Co., USA
Acetonitril	Becton Dickinson and Co., USA
Ammoniumacetat	Fluka
Bacto-Agar	Sigma Aldrich
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Casiton	Sigma Aldrich
CDP-Star	Sigma Aldrich
Chloroform	Becton Dickinson and Co., USA
cOmplete, EDTA-free	Roche Diagnostics
Coomassie Brilliantblue 250R	ROTH
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	ROTH
EDTA	Fluka
Essigsäure	Merck
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromide-Lösung (1%)	ROTH
Ethylacetat	Fluka
Glucose	Merck
Glyzerin	Merck
Hefeextrakt	Sigma Aldrich
Hexan	Becton Dickinson and Co., USA
Isopropanol	Becton Dickinson and Co., USA

## 2 Material

---

Kaliumacetat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
KOH	Fluka
Malz-Extrakt	Sigma Aldrich
Methanol	Fluka
MgCl	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Fluka
MgSO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Fluka
NaOH	Merck
Natriumchlorid	Merck
Peptone	Sigma Aldrich
Rotiphorese®Gel 30	ROTH
<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS)</i>	ROTH
TEMED	ROTH
Triton X-100	ROTH
Trypton	Sigma Aldrich
Trypsin, <i>sequencing grade</i>	Promega Mannheim

### 2.2 Proteine, Enzyme, Säulen und „Kits“

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche Diagnostics
DIG-High Prime	Roche Diagnostics
Gigapack III Gold packaging extract kit	Agilent Technologies
HisTrapHP, 1ml	GE Healthcare
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Fermentas
SUMO-Protease	LifeSensors
T4-DNA-Ligase	Fermentas

### 2.3 Puffer und Stammlösungen

#### Ni-IMAC Bindepuffer

Imidazol	20	mM
NaCl	500	mM
NaHPO <sub>4</sub>	200	mM
pH 7.4 ± 0.1 bei 25°C		

#### Ni-IMAC Elutionspuffer

Imidazol	500	mM
NaCl	500	mM
NaHPO <sub>4</sub>	200	mM
pH 7.4 ± 0.1 bei 25°C		

#### Proteinpuffer

Tris/HCl	25	mM
NaCl	50	mM
EDTA	0.1	mM
DTT	1	mM
pH 8.0 ± 0.1 bei 25°C		

#### SET-Puffer

Tris-HCl	20	mM
NaCl	75	mM
EDTA	25	mM
pH 8.0 ± 0.1 bei 25°C		

#### SM-Puffer

NaCl	5.8	g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0	g
1 M Tris-HCl (pH 7.5)	50	ml
2% (w/v) Gelatine-Lösung	5	ml
ad 1 l		

### Trypsin-Verdau-Puffer

Ammoniumhydrogencarbonat	40	mM
Trypsin, sequencing grade	5	mg/l

aliquotiert bei - 20 °C gelagert

## 2.4 Kulturmedien

Alle Kulturmedien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung von entsprechenden Festmedien wurde dem Medium 20 g Agar pro Liter zugesetzt.

### 2YT-Medium

Trypton	20	g/l
Hefe-Extrakt	10	g/l
NaCl	5	g/l

### BG-Medium

Hefeextrakt	4	g/l
Malzextrakt	10	g/l
D-Glucose	10	g/l
CaCO <sub>3</sub>	2	g/l

pH 7.3 ± 0.1 bei 25°C

### HA-Medium

Glukose	4	g/l
Hefeextrakt	4	g/l
Malzextrakt	10	g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.15	g/l

pH 7.4 ± 0.2 bei 25°C

## 2 Material

---

### ISP2-Medium

Hefeextrakt	4	g/l
Malzextrakt	10	g/l
D-Glucose	10	g/l

pH 7.3 ± 0.1 bei 25°C

### LB-Medium

Trypton	10	g/l
Hefe-Extrakt	5	g/l
NaCl		

### SCU-Medium

Sojamehl	15	g/l
Corn Steep Solid	5	g/l
Glukose	15	g/l
NaCl	5	g/l
CaCO <sub>3</sub>	2.56	g/l

pH 7.0 ± 0.2 bei 25°C

### SCY-Medium

Sojamehl	20	g/l
Corn Steep Solid	10	g/l
Glyzerin	20	g/l
NaCl	7.5	g/l
CaCO <sub>3</sub>	2	g/l

pH 7.0 ± 0.2 bei 25°C

### SM-Medium

Sojamehl, fettarm	20	g/l
Mannitol	20	g/l

pH 7.0 ± 0.2 bei 25°C

### SMM-Medium

Mannitol	20	g/l
Sojamehl	20	g/l
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2	g/l

pH 7.0 ± 0.2 bei 25°C

## 2 Material

### TSB-Medium

Casein-Peptide (pancreatic)	17	g/l
Soja-Peptide (papain digest.)	3	g/l
NaCl	5	g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	g/l
Glucose	2.5	g/l
pH 7.3 ± 0.2 bei 25°C		

### YEME-Medium

Hefe-Extrakt	3	g/l
Bacto-Peptone	5	g/l
Oxoid Malz-Extrakt	5	g/l
Glucose	10	g/l
Sucrose	340	g/l

## 2.5 Antibiotika

Antibiotika wurden in Stocklösungen bei -20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden vor der Nutzung durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.2 µm sterilfiltriert. Kulturmedien und Weichagar wurden nach dem Autoklavieren auf eine Temperatur unter 55°C abkühlen gelassen, anschließend wurde das benötigte Antibiotikum mit der angegebenen Endkonzentration eingesetzt; Details siehe Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Stocklösungen und eingesetzte Konzentration der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Stocklösung	Arbeitskonzentration*
<b>Ampicillin</b>	100 mg/l in Wasser	100 µg/l
<b>Apramycin</b>	60 mg/l in Wasser	60 µg/l
<b>Chloramphenicol</b>	25 mg/l in Ethanol	25 µg/l
<b>Kanamycin</b>	50 mg/l in Wasser	50 µg/l
<b>Nalidixinsäure</b>	25 mg/l in 150 mM NaOH	25 µg/l
<b>Spectinomycin</b>	25 mg/l in Wasser	100 µg/l
<b>Zeocin</b>	100 mg/l in Wasser	50 µg/l
<b>Tetracyclin</b>	12.5 mg/l in 70% Ethanol	12.5 µg/l

\*) Für low-copy Plasmide wurde die halbe Endkonzentration eingesetzt.

## 2.6 Bakterienstämme

Stamm	Verwendung	Beschreibung / Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) [119]	Proteinexpression	B F <sup>-</sup> <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 [120]	intergenerische, biparentale Konjugation	F <sup>-</sup> , <i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR, zij-202 ::Tn10, recF143, galK2, GalT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, tonA31, rpsL136, HisG4, tsx-78, mtl-1, glnV44, pUZ8002</i> [19]
<i>E. coli</i> GB2005 [121]	Red/ET-Klonierung	HS996, <i>ΔrecET, ΔybcC</i>
<i>E. coli</i> GB2005-red (GeneBridges)	Red/ET-Klonierung	entspricht GB2005 mit Insertion des <i>pBAD recE recT γ recA</i> Operons ins Genom
<i>E. coli</i> HS996 (Handelsname: GeneHogs®, Invitrogen)	Klonierung	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/lacZΔM15 Δlac74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG λ<sup>-</sup> fhuA::IS2</i>
<i>E. coli</i> SURE (Stratagene)	Klonierung von problematischen DNA-Sequenzen	e14-(McrA-) <i>Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)].
<i>Streptomyces albus</i> J1074 [122]	heterologe Cluster-Expression	wildtypischer Stamm

## 2 Material

---

<i>Streptomyces</i> A3(2)	<i>coelicolor</i>	heterologe Cluster- Expression	wildtypischer Stamm
<i>Streptomyces</i> M512	<i>coelicolor</i>		$\Delta redD$ $\Delta actII$ -ORF4 SCP1- SCP2-
<i>Streptomyces lividans</i> [123]	TK24	heterologe Cluster- Expression	<i>S. lividans</i> 66 <i>str-6</i> SLP2- SLP3-
<i>Streptomyces</i> spec. (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH)	FH6421		wildtypischer, nativer Tomaymycin-Produzent
<i>Streptosporangium</i> [38]	<i>sibiricum</i>		wildtypischer, nativer Sibiromycin- Produzent

---

### 2.7 Primer

In den Beschreibungen dieser Arbeit werden hauptsächlich die Nummern der Primerpaare verwendet. So werden zum Beispiel die Primer pr156f\_[D]tomHI und pr156r\_[D]tomHI der Einfachheit halber als Primerpaar pr156 aufgeführt. Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben.

Primer zur Amplifikation und anschließenden Sequenzierung einer bei der Sequenzierung verbliebenen Lücke im Tomaymycin-Bioynthese-Gencluster

pr028f_tomP_NNNseq	CCCTGGTGTGCGGCGCTCGCAA
pr028r_tomP_NNNseq	CCGACGGGGGCGTTGCCAGTA

Primer zur Erstellung von DIG-gelabelten Sonden zur Detektion des Tomaymycin Biosynthese Genclusters

STTM010f	AGGTCCGGTGGGTGCGGATA
STTM010r	GTACCGCCCCACCCGGATAC
pr026f2_probe_pre-tomA	AGTGGCCCTCCAGGCCGGACA
pr026r_pre-tomA	CTCCGTGAGCACACGTGCTCCTTG
pr035f_probe_tomB	GCCGAGGACCTCACCACCGAT
pr035r_probe_tomB	TGTCGGGGCAGGAGCTCGTT
pr036f _probe_tomM_N	CGCCGACTACAGCCTGAGCAA
pr036r _probe_tomM_N	CATGGCGTGGATCTCGGTCAT
pr037f_probe_3'ins	GCACGTGCGTCTGCGTGACCT
pr037r_probe_3'ins	CCAGGCGGCTCCGGACTTCTT
pr038f_probe_3'outs	TCCGGAGCCGCCTGGACGAT
pr038r_probe_3'outs	TGCCACCGTGAGCCTGTCA

Primer zur Sequenzierung der äußeren Sequenzen des Insert in pOJ436

pr010T3	TCCGGAGCCGCCTGGACGAT
pr010T7	TGCCACCGTGAGCCTGTCA

Primer zur Erstellung des Expressions-Plasmids pStW42

pr039A2_pStW39_pGEX_outs	GATCTTCCTGAGGCCGATACTGTGCG
--------------------------	----------------------------

## 2 Material

---

pr039B_pStW39_pGEX_ins	CGTGATGATGATGGTGTGATGACCCATATG TACTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG CTCA
pr039Y_pStW39+SUMO_ins	TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA CAGTACATATGGGTCATCACCATCATCA TCACG
pr039Z_pStW39+SUMO_outs	GGATCCTCTAGACTAGTTAATTAAGCTTA AGTATAGCGCTGCTGGAACACGTGCAT GG
pr042f_kan	GACGTCAAAGCAGGTAGCTTGCAGTG
pr042r_kan	TTTAAATTCAATTCAGAAGAAGCTCGTCAA G

---

### Primer zur Erstellung des Expressionskonstrukts pStW42tomA

pr008f2_tomA-pStW39	GTTTAAACGGGAGGTATGCTCACGGAG AATGCATCAGG
STTM008r	CGAGAATTTCGACGCCTACTGGGTCTGT GCG

---

### Primer zur Erstellung des Expressionskonstrukts pStW42tomB

pr009f2_tomB-pStW39	GTTTAAACGGGAGGTATGAACTCCCCC TCCGAACCAC
STTM009r2	CGCGAATTCTCAGTCGTCGGCCAGTTCT CC

---

### Primer zur Erstellung von pStW102tc und dessen Derivate:

Red/ET Primer zur Amplifikation der Spectinomycin-Resistenz-Genkassette aus pCR2.1-TOPO-Spec#2 und zur Erstellung von pStW101 aus pOJ446

pr101f_spec->pStW101	GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAA CGCCAGCAACGCGGCCCAATTGCGCGT ATCGATTTTCGTTCCG
pr101r_spec->pStW101	CTACGCCTGGCCTGGCTTGAGCGACGC GGCGGCGGCCCGGGCGCTAGCCGCGT CCAATTAGAATGAATAATTCC

---

## 2 Material

---

Primer zur Erstellung einer MCS zur Insertion in pStW101

pr102f_MCS	AATTGAGGCCTAAGCTTCATATGTTAATT AAACTAGTCCTGCAGGTCTAGACTTAAG AATATTG
pr102r_MCS	CTAGCAATATTCTTAAGTCTAGACCTGC AGGACTAGTTTAATTAACATATGAAGCTT AGGCCTC

---

Red/ET-Primer zur Erstellung der Expressionsvektoren pStW102tc.re130 und pStW102tc $\Delta$ C-G

pr130f_[D]tomC-G_zeo	CCGACCATCCACCACACGGCAATCGCC GAAGCGGTCGCCGGACACCGAAAGCCT AGGGCGAGGAAGCGGTGATCACAC
pr130r_[D]tomC-G_zeo	GCAACCATGGAACAAGAGCGATGGAAC AGTGTGACGTCTACTTCAGCTCTCTAG ATTGATAAGCTTGGCGTAATGGATCTG

---

Red/ET-Primer zur Erstellung der Expressionsvektoren pStW102tc.re132

pr132f_[D]tomN_zeo	CGCACACCGGCCGGTGTCTGGCCGAGG ACCTCGCCGCACACGGTCACCTCTGA CCTAGG GCGAGGAAGCGGTGATCACAC
pr132r_[D]tomN_zeo	CGAGACGCCGCCACGAACCAGTGCTC GGGCGGGCATGCGTCCACCGTCATCTA GA TTGATAAGCTTGGCGTAATGGATCTG

---

Red/ET-Primer zur Erstellung der Expressionsvektoren pStW102tc.re120 und pStW102tc $\Delta$ Q

pr120f_[D]tomQ	TGGCCGGCATCAGGGAAGTGTGCCCA TCTCGGGAAGGATGTAGGCGCCTT AATATT CGCATCGTGACTIONGACTGACG
pr120r_[D]tomQ	GCAGCCCGACGTGTCCTCATGGACAT CCGCATGCCGGGCACGAACGGCA AATATT CTCACGTTAAGGGATTTTGGTC

---

## 2 Material

---

Red/ET-Primer zur Erstellung der Expressionsvektoren pStW102tc.re156 und pStW102tcΔHI

pr156f_[D]tomHI	GAAAAAGCCTGTCCCGGATAGGAGTGT CATTTCATGCGAGAAGACTCGGCCGTC CCTAGG CCTGAAGTCAGCCCCATACG
pr156r_[D]tomHI	CCTCGGGCAGTGCGGCGTCCTCCTGCG CGGTCAGCCCCGGGGTACAGCCCGTT TCTAGA CTTCCATTTCAGGTCGAGGTG

---

Red/ET-Primer zur Erstellung der Expressionsvektoren pStW102tc.re156 und pStW102tcΔHI

pr155f_[D]tomO	TCAGGCCGCGTCCGCGAACCGCCGGC GGATCCGCCCGACGTGCTCCGGGTC CCTAGG CCTGAAGTCAGCCCCATACG
pr155r_[D]tomO	TGACCACCAGATCATTCTCTTCGGATA GCATTTACTGGTCTCTGCACGTC TCTAGA CTTCCATTTCAGGTCGAGGTG
pr164f_XsibC	GCATCGAAGCTTCACTAGAAGAACGGG ACGATGGTGTG
pr164r_XsibC	ACCTGACTGCAGTGATAGTCAGCAACGC CACCCAAAG

---

## 2.8 Plasmide

Plasmid	Verwendung / Merkmale	Quelle
pCR2.1-TOPO-Spec#2	Klonierungsvektor auf Basis von pCR2.1-TOPO <i>aad9</i>	
pCRII-TOPO	Klonierungsvektor <i>rep(pUC) ori LacZ<math>\alpha</math> bla (Amp<sup>R</sup>) aph (Kan<sup>R</sup>)</i>	Invitrogen
pGEX-6P-1	Glutathione S-Transferase Fusions-Vektor zur Proteinexpression <i>Amp<sup>R</sup> lacI<sup>Q</sup></i>	GE Healthcare
pOJ436	<i>Streptomyes / E. coli</i> Shuttle [19] Cosmid, integrativ in <i>Streptomyes</i> <i>aac(3)IV oriT RK2, <math>\lambda</math>cos attP <math>\Phi</math>C31 rep(pUC)</i>	
pOJ446	<i>Streptomyes / E. coli</i> Shuttle [19] Cosmid, replikativ in <i>Streptomyes</i> <i>aac(3)IV ori SCP2* oriT RK2 rep(pUC)</i>	
pOJ436tomaCluster	Cosmid 2-G7 aus der FH6421-Cosmid Library, welches das gesamte Tomaymycin-Biosynthese-Cluster trägt	diese Arbeit
pJET1.2 /blunt	<i>bla (Amp<sup>R</sup>) eco47IR(blunt-end unterbrochen) P<sub>lacUV5</sub> rep(pMB1)</i>	Thermo Scientific
pL1SL2	Helferplasmid zur Expression <i>groEL1 groEL2 groES bla</i>	[124]

## 2 Material

---

pStW39n	6 x His, Sumo-Tag fusions-Vektor zur Proteinexpression <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ) <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	diese Arbeit pGEX-6P-1 Derivat
pStW42	6 x His, Sumo-Tag fusions-Vektor zur Proteinexpression <i>aph</i> (Kan <sup>R</sup> ) <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	diese Arbeit pStW39n Derivat
pStW42tomA	Expressionskonstrukt heterologen Expresison TomA in <i>E. coli</i>	zur diese Arbeit von pStW42 Derivat
pStW42tomB	Expressionskonstrukt heterologen Expression TomB in <i>E. coli</i>	zur diese Arbeit von pStW42 Derivat
pStW101	<i>Streptomyes</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, replikativ in <i>Streptomyes</i> <i>aac(3)IV ori SCP2* oriT RK2</i> Vorläufer von pStW102, ohne MCS	diese Arbeit pOJ446-Derivat
pStW102	<i>Streptomyes</i> / <i>E. coli</i> Shuttle Vektor, replikativ in <i>Streptomyes</i> <i>aac(3)IV ori SCP2* oriT RK2</i>	diese Arbeit pOJ446-Derivat
pStW102Si	Suizidvektor, nicht replizierend in <i>Streptomyes</i> <i>aac(3)IV oriT RK2</i>	diese Arbeit <i>Nhel/Cfr42I</i> -Fragment von pStW102
pStW102SiXsibC	Suizidvektor zum <i>crossover</i> -Knock-out von <i>sibC</i> <i>aac(3)IV oriT RK2</i>	diese Arbeit pStW102Si-Derivat
pStW102tc	Vektor zur heterologen Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Clusterd	diese Arbeit pStW102, pOJ436tomaCluster Derivat

## 2 Material

---

pStW102tc.re103	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen $\Delta tomC - tomG$ <i>Sh ble</i> (zeo <sup>R</sup> )	von diese Arbeit pStW102tc Derivat
pStW102tc.re132	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen $\Delta tomH$ <i>Sh ble</i> (zeo <sup>R</sup> )	von diese Arbeit pStW102tc Derivat
pStW102tc $\Delta$ C-G	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen $\Delta tomC - tomG$ entspricht pStW102tc.re103 $\Delta Sh ble$	von diese Arbeit pStW102tc.re103 Derivat
pStW102tc $\Delta$ C-G,O	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen, experimentelle Bestimmung der Funktion von <i>tomO</i> entspricht pStW102TC $\Delta$ C-G.re155 $\Delta tetA$	von diese Arbeit pStW102TC $\Delta$ C-G.re155 Derivat
pStW102tc $\Delta$ C-G.re155	Vorläufervektor pStW102tc $\Delta$ C-G,O <i>tetA</i> $\Delta tomO$	von diese Arbeit pStW102TC $\Delta$ C-G Derivat
pStW102tc $\Delta$ HI	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen	von diese Arbeit pStW102tc $\Delta$ C-G Derivat
pStW102tc $\Delta$ N	Vektor zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analogen	von diese Arbeit pStW102tomaCluster Derivat
pSUmtaA	Vektor zur Koexpression der Phosphopantetheinyltransferase <i>MtaA</i> aus <i>Stigmatella aurantiaca</i>	[125]

## 2.9 Geräte und Zubehör

Agilent 110 series HPLC system	Agilent
Äkta Prime system	GEHealthcare
ÄKTAprime plus	GE Healthcare
Bruker Advance 500	Bruker
Bruker HCTplus	Bruker
Centrifuge Avanti JE	Beckmann Coulter
Cool centrifugee 5805R	Eppendorf
DAD-coupled HPLC	Dionex
Electrophoresis chamber MINI-SUB-CELL® GT	Biorad
Electrophoresis chamber SUB-CELL® GT	Biorad
Electroporation cuvette 0.1 cm	Biorad
Enhanced AirOtop Seal for 2.5L	Thomson Instrument Company
French Press	SLM Aminco
Gene pulser XCell	Biorad
Helios Epsilon Spectrophotometer	Thermo
Hera Safe	Kendro
HeraeusLaminAir®	Kendro
Hybridization oven APT Line Series BFED	Binder
Incubator Series BD	Binder
LTQ-Orbitrap	Thermo Finnigan
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Membrane filter 0.22 µm	Millipore
Milli-Q water purification system	Millipore
Multitron Shakers	Infors
Nylon membrane, positively charged	Roche
PCR Sprint Thermocycler	Thermo Electron Corp
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
QPix2 Colony Picker	Genetix
SIL G Alugram TLC-Platten	Macherey & Nagel
Sonarex Ultraschallbad	Bandelin
System VX-150 Autoclav	Systemec

## 2 Material

---

Tabletop centrifuge 5415D	Eppendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultra Yield Flask 2.5L	Thomson Instrument Company
Ultrasonic disintegrator USD 30	Emich Ultraschall
454 Sequencing technology, GS FLX titanium-series	Seq-IT, Kaiserslautern

# 3 Methoden

## 3.1 Gentechnische Methoden

### 3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR, von polymerase chain reaction) wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. PCR für Sequenzierung und Kontrollreaktionen wurden mit T4-DNA-Polymerase (EP0061) von Thermo-Fisher durchgeführt. Amplifikationen für Klonierungen wurden mit Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (F-530L) durchgeführt. Bei besonders GC-reichen Sequenzen, die unter normalen PCR-Bedingungen keine Amplifikation ermöglichten wurde ein Temperatur- und DMSO-Gradient nach Herstellerangaben genutzt.

### 3.1.2 SOE-PCR

Mithilfe der *splicing by overlapping extension* PCR können zwei DNA-Sequenzbereiche *in vitro* miteinander verbinden werden, ohnedass Restriktion und Ligation benötigt werden. Mittels SOE-PCR können Teilbereiche einer Sequenz deletiert oder unabhängige Sequenzen ligiert werden. In einer ersten PCR werden Primer eingesetzt, welche neben dem alignenden Bereich einen ca. 30 bp langen Bereich am 5' Ende tragen, welcher mit dem anderen Fragment identisch ist. In einer zweiten PCR werden beide Fragmente in einer PCR vereinigt, in welcher die überlappenden Fragmente aufgrund der identischen Bereiche selbst als Primer dienen und zur Amplifikation des Gesamtkonstrukts führen. Für die SOE-PCR wurde Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nach Angaben des Herstellers benutzt.

### 3.1.3 Erstellung der FH6421 Cosmid-Bibliothek

Genomische DNA von *Streptomyces* FH6421 wurde mit *Sau3AI* partiell verdaut bis eine durchschnittliche Fragmentgröße zwischen 35 und 45 kb erreicht war. Das Restriktionsenzym wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgefällt und die

### 3 Methoden

---

DNA mit Isopropanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde anschließend nach Herstellerangaben mittels SAP dephosphoryliert und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgefällt und mit Isopropanol präzipitiert. Parallel zur Vorbereitung der genomische DNA wurde das Cosmid pOJ436 mit *Bam*HI und *Pvu*II verdaut und anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgefällt und mit Isopropanol präzipitiert. Genomische und Cosmid-DNA wurden gelöst, und mittels T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben ligiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend via Gigapack III Gold packaging extract kit nach Herstellerangaben *in vitro* verpackt.

Die Bestimmung des Phagen-Titers wurde abweichend von der Herstellerbeschreibung durchgeführt. Der Wirtstamm *E. coli* SURE wurde in LB-Medium mit 10 mM Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis zu einer O.D. von 0.7 angezogen. Anschließend wurden Phagen und Wirtstamm wie folgt vereinigt:

25 µl *E. coli* SURE-Kultur + 2 µl Phagenlösung + 23 µl SM-Puffer

25 µl *E. coli* SURE-Kultur + 5 µl Phagenlösung + 20 µl SM-Puffer

25 µl *E. coli* SURE-Kultur + 10 µl Phagenlösung + 15 µl SM-Puffer

Um eine Anhaftung der Phagen an die Bakterienoberfläche zu ermöglichen wurden die resultierenden Kulturen zuerst ruhend bei 37 °C für 30 min und nach Zugabe von 200 µl weitere 2 h bei 150 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf LB-Agarplatten mit 60 µg/ml Apramycin ausplattiert. Nach 18 h Inkubation der Platten bei 37 °C konnte der Titer der Phagenlösung anhand der Zahl der gewachsenen Kolonien bestimmt werden.

Um sicherzustellen, dass die Cosmid-Bibliothek eine ausreichend hohe Divergenz der Cosmide aufweist wurden 48 Klone der Titerbestimmung analysiert. Von einer Platte wurden 48 Kolonien in je 1.5 ml LB Medium mit 60 µg/ml Apramycin in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit gelochtem Deckel angeimpft und 37 °C und 1000 U/min auf einem Schüttler (Eppendorf) inkubiert. Die erhaltenen Kulturen wurden alkalisch lysiert und die erhaltenen Plasmide nach Herstellerangaben DNA mit *Bam*HI verdaut. Die Produkte der Restriktion wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die auftretenden Restriktionsmuster verglichen. Identische Restriktionsmuster zweier Proben werden als gleiche Inserts im Cosmid unterschiedlicher Klone gewertet. Bei bis zu zwei Duplikaten in 48 Proben wird der Ansatz mit den etablierten Bedingungen weiter bearbeitet. Eine höhere Anzahl an Duplikaten oder eins oder mehrere Triplikate weisen auf eine hohe Dominanz einzelner Cosmide und damit auf

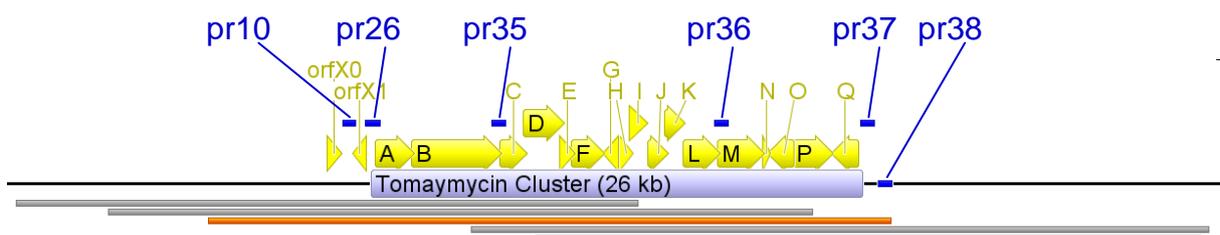
eine mögliche unvollständige Abdeckung des Genoms in der Bibliothek hin. In einem solchen Fall müssen die Reaktionsbedingungen optimiert werden.

Aufgrund der zufälligen Verteilung der Sequenzen der genomischen DNA bei der Herstellung einer Cosmid-Bibliothek ist für die komplette Abdeckung des Genoms eine Redundanz in der Bibliothek zwingend notwendig. Für FH6421 wurden sechs 384-Well Mikrotiterplatten eingesetzt was bei einer Genomgröße von ca. 10 kb und einer mittleren Insertgröße von 40 kb genomischer DNA pro Cosmid einer theoretischen neunfachen Abdeckung des Genoms entspricht.

Um die Notwendige Anzahl an Kolonien zu erhalten wurden 10 µl Phagenlösung eingesetzt und die resultierende Kulturlösung auf 4 22 x 22 cm LB-Agarplatten mit 60 µg/ml Apramycin ausplattiert.

#### 3.1.4 Identifikation des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters innerhalb der FH6421 Cosmid-Bibliothek

Zur Identifikation des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters innerhalb der FH6421 Cosmidbibliothek wurden DIG-markierte Sonden eingesetzt. Als Grundlage der Sonden wurden 6 über das Gencluster verteilte *templates* von ca. 500 bp via PCR erstellt. Die Lage der *templates* ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Lage der *templates* zur Erstellung DIG-markierter Sonden auf dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster.

Jedes *template* wurde mittels PCR amplifiziert, anschließend aufgereinigt und 1 µg der amplifizierten DNA eingesetzt. Zur Erstellung der Sonden wurde das DIG-High-Prime Kit von Roche (nach Herstellerangaben) eingesetzt. Die Inkubationszeit für die Polymerase-Reaktion lag bei 18 h. Zur die Detektion der gelabelten Sonden nach dem Hybridisierung auf der hochdichten Kolonie-Membran wurden mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente und anschließend

CDP- Star als chemiluminiszendes Substrat (jeweils nach Herstellerangaben) eingesetzt. Der Belichtungszeitraum für die Membranen wurde je nach Signalstärke zwischen 5 und 30 min gewählt.

#### 3.1.5 Klonierung mittels Red/ET

Zur Klonierung mittels Red/ET wurde das Akzeptorplasmid via Elektroporation in kompetente GB2005-red Zellen eingebracht und die Zellen auf LB-Agarplatten mit einem dem Akzeptorplasmid entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Eine Vorkultur GB2005-red/Akzeptorplasmid wurde in LB mit einem dem Akzeptorplasmid entsprechenden Antibiotikum inkubiert und bei 30 °C - um ein Überwachsen zu vermeiden - und 180 U/min für 16 h bis 20 h kultiviert. Am nächsten morgen wurden 1.4 ml Reaktionsgefäße mit gelochtem Deckel und 1 ml LB mit einem dem Akzeptorplasmid entsprechenden Antibiotikum 1:100 angeimpft. Für jeden Ansatz wurden zwei Reaktionsgefäße sowie ein weiteres Reaktionsgefäß für OD<sub>600</sub>-Messungen inkubiert. Die Kulturen wurden bei 37° C und 1000 U/min kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von 0.2 erreicht war. Anschließend wurde die Expression des Red/ET-Systems mit Zugabe von 20 µl 10 %iger Arabinose-Lösung induziert. Die Zellen wurden mit 0.3 µg linearer DNA bei der Elektroporation eingesetzt. Um monoklonale Plasmide zu erhalten wurden die erhaltenen Kulturen mit 2ml Wasser von der Platte gewaschen, pelettiert und alkalisch lysiert. Bei sehr dicht gewachsenen Kulturen, wurde nur ein Teil des erhaltenen Pellets weiter geführt. Die erhaltene DNA wurde in via Elektroporation in HS996 eingebracht und die erhaltenen Klone entsprechend kultiviert und alkalisch lysiert. Die erhaltene DNA wurde mittels Kontrollrestriktionen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

#### 3.1.6 Klonierung mittels Restriktion und Ligation

Restriktions- und Ligationsreaktionen wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben von Fermentas und NEB durchgeführt.

### 3.1.7 Transformation mittels Elektroporation

Mittels Elektroporation kann Plasmid-DNA hocheffektiv in *E. coli*-Zellen eingebracht werden. Durch ein elektrisches Feld wird die Porenbildung in der Zellmembran induziert. Durch diese Poren kann DNA in die Zelle aufgenommen werden [126], [127].

Der elektrokompetente *E. coli*-Stamm wurde beim Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{600}$  0.35 - 0.4 zweimal mit sterilem, deionisiertem Wasser gewaschen und in 50  $\mu$ l sterilem Wasser aufgenommen; diese Schritte erfolgten in gekühlter Zentrifuge (2° C) und auf Eis. Für die anschließende Transformation wurden 0.5  $\mu$ g Vektor-DNA zugegeben und in einer 1 mm Küvette bei 1350 V, 10  $\mu$ F, 600  $\Omega$  elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 70 min bei 37 °C und 1000 U/min kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar ausplattiert. Wurde eine Resistenz durch die Integration hinzugefügt wurde dem LB-Agar ein entsprechendes Antibiotikum zugefügt. Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.8 Intergenerische, biparentale Konjugation

Die intergenerische biparentale Konjugation wurde nach Hopwood *et al.* [19] durchgeführt.

### 3.1.9 Isolierung genomischer *Streptomyces* DNA

Genomische DNA aus Streptomyceten wurde durch Aussalzen gefällt [19]. Hierfür wurde das Myzel einer exponentiell wachsenden 30 ml Kultur durch Zentrifugation bei 5000 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml SET-Puffer resuspendiert. Es wurden 100  $\mu$ l Lysozymlösung (1 mg/ml in 10 mM TrisHCl pH 7.0) zugegeben und die Lösung bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 140  $\mu$ l Proteinase K Lösung (20 mg/ml in 10 mM TrisHCl pH 7.0) zugegeben, der Ansatz durch invertieren gemischt und bei 55° C für weitere zwei Stunden inkubiert. Die Lyse der Zellen ist durch die Ausbildung einer viskosen, größtenteils klaren

Flüssigkeit erkennbar. Zum Ausfällen von Proteinen wurde nach dem Abkühlen der Lösung 2 ml 5 M NaCl und 5 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) zugefügt und die Lösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf dem Rotierer durch ständiges invertieren gemischt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 3000 rpm wurden organische und wässrige Phase getrennt wobei denaturierte Proteine sich in einer Interphase sammeln. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 0.6 Volumina Isopropanol hinzugefügt und die Lösung durch invertieren gemischt. Genomische DNA fällt als gut sichtbare weiße Fäden aus und kann mit einer über dem Bunsenbrenner geschlossenen Pasteurpipette aufgewickelt werden. Die DNA wurde in 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 55° C in deionisiertem Wasser gelöst.

#### **3.1.10 Plasmid-Aufreinigung**

Plasmid- und Cosmidisolierung durch Alkalische Lyse wurden nach Birnboim und Doly [128] oder mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt.

### 3.2 Proteinbiochemie

#### 3.2.1 Expression von TomA und TomB

Zur Expression der NRPS TomA und TomB wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eingesetzt [119]. Um die Löslichkeit der exprimierten Proteine zu erhöhen wurden die Chaperone GroEL1, GroEL2 und GroES koexprimiert. Hierzu wurde das Plasmid pL1SL2 [124] in den Expressionsstamm eingebracht. Um die Phosphopantetheinylierung der heterologen Proteine zu gewährleisten wurde zusätzlich das Plasmid pSUMtaA [125] welches das Gen der PPTase MtaA trägt in den Expressionsstamm eingebracht. Die so erhaltenen Expressionsstämme waren *E. coli* BL21(DE3)/pL1SL2/pStW42tomA/pSUMtaA und *E. coli* BL21(DE3)/pL1SL2/pStW42tomB/pSUMtaA. Die Expression von TomA und TomB ist methodisch identisch.

Für den Expressionsstamm wurde das Medium, Flüssigmedium sowie Agar, mit Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml) und 0.2 % Glucose versetzt. Der Expressionsstamm wurde auf LB-Agar ausplattiert und 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Vorkultur in 30 ml LB-Medium angeimpft und bei 30 °C und 180 U/min über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde am nächsten Morgen abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml LB-Medium resuspendiert und 1 l LB-Medium im 5 l-Kolben 1:100 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 180 U/min inkubiert bis die Kultur auf eine Zelldichte O.D. 600 von 0.6 bis 0.8 angewachsen war. Die Kultur wurde dann auf 16 °C umgestellt und bei 180 U/min eine weitere halbe Stunde inkubiert um abzukühlen. Anschließend wurde die Expression durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 0.1 mM induziert und die Kultur bei gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellwachstum durch Zugabe von Chloramphenicol auf eine Endkonzentration von 250 µg/l gestoppt und die Zellen zwei weitere Stunden bei gleichen Bedingungen geschüttelt um eine Faltung fehlgefalteter Proteine durch die Chaperone ohne parallele Proteinexpression zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit Ni-IMAC Bindepuffer gewaschen und in 25 ml mit cComplete, EDTA-free (Verwendung nach Herstellerangaben) versetztem

Ni-IMAC Bindepuffer resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend via Ultraschall lysiert.

#### 3.2.2 Zellyse mittels Ultraschall

Das in cOmplete, EDTA-free / Ni-IMAC Bindepuffer resuspendierte *E. coli* Zellpellet wurde auf Eiswasser platziert um die bestmögliche Kühlung zu gewährleisten. Am Ultraschall-Lysator wurde mit die für das jeweilige Reaktionsgefäß größtmöglichen Sonde montiert. Das Programm wurde auf 70% Intensität, 2 min 30 s Gesamtpulsdauer, 10 s Pulsintervall mit 30 s Pausen zwischen den Intervallen eingestellt. Nach der Lyse wurde die Probe mit maximaler Geschwindigkeit in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (1 h bei 30.000 g im 50 ml Falcon bei 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und weiterverwendet, das Pellet wurde in Vorversuchen in 10 %iger SDS-Lösung aufgenommen und in der SDS-PAGE zur Veranschaulichung des Anteils unlöslichen Proteins aufgetrennt, anderenfalls verworfen.

#### 3.2.3 Abtrennen des 6 x His-tags via Sumo Protease

Um die Abtrennung des 6 x His-Tags in den verwendeten Expressionskonstrukten zu ermöglichen, liegt die Sequenz der SUMO-Protease-Schnittstelle zwischen dem Tag und dem Zielprotein. Statt der empfohlenen Menge von 10 - 100 u SUMO-Protease pro 100 µg Zielprotein wurden - um Enzym einzusparen - 0.125 u pro 100 µg eingesetzt und die Reaktion wurde statt 1 h bei 30 °C bei 12 h bei 4 °C und ständiger langsamer Durchmischung durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz 1:1 mit Ni-IMAC Bindepuffer versetzt und über eine HisTrapHP, 1ml aufgereinigt. Hierbei werden die SUMO-Protease - welche selbst mit dem 6 x His-tag versehen ist -, nicht geschnittene Proteine, abgetrennte His-Tags und großteils auch Protein welche der Ni-Affinitätschromatographi unspezifisch gebunden haben auf der Säule gebunden. Der Durchlauf wurde fraktioniert und die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Fraktionen welche mit deutlicher Absorption wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden gepoolt, aufkonzentriert und via PD-10 Desalting Columns auf Proteinpuffer umgepuffert.

#### 3.2.4 TomA/TomB-*in vitro*-Aktivitäts-Assay

Aktivitätsassays wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tris pH 8,0	75	mM
NaCl	100	mM
MgCl <sub>2</sub>	10	mM
(d)ATP	2	mM
Anthranilsäurederivat	2	mM
Prolinderivat	2	mM
NAD(P)H	4	mM
TomA	0.2	µM
TomB	0.2	µM
Reaktionsvolumen	500	µl

Die Reaktion lief über 18 h bei 30 °C ab. Der Reaktionsansatz wurde anschließend *in vacuo* getrocknet, in 50 µl 1:2 Azetonitril:Wasser gelöst, abzentrifugiert und der Überstand zur HPLC-MS Analyse eingesetzt. Die 1:2 teilige Azetonitril-Wasser-Mischung ist notwendig um eine salzbedingte Phasenbildung zu vermeiden.

### 3.3 Mutasynthesen und vorläufergesteuerte Biosynthese

#### 3.3.1 Mutasynthese von Tomaymycin-Analoga im analytischen Maßstab

Um die grundsätzliche Möglichkeit der Mutasynthese untersuchen zu können und die Einbauten beurteilen zu können wurde die Fütterung der Substanzen einer Bibliothek von Anthranilsäure- und Prolinderivaten im Testmaßstab vorgenommen. Hierzu wurde 30 ml TSB-Medium - mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt - in einem mit einer Spiralfeder ausgelegten 300 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Für die *Streptomyces*-Stämmen wurde 1 cm<sup>2</sup> einer sporulierten Kultur von einer dicht bewachsenen SM-Agarplatte eingesetzt, die Platten konnten bis zu 4 Wochen gelagert werden. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 150 U/min inkubiert. Als Testkultur wurden 500 µl SCY-Medium - mit einem dem Stamm entsprechenden Antibiotikum - mit 25 µl Vorkultur angeimpft und im 2 ml Reaktionsgefäßen mit gelochtem Deckel bei 30 °C und 1000 U/min (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Nach 24 h wurde das 100 mM in DMSO gelöste Anthranilsäure- oder Prolinderivat zugegeben um eine Endkonzentration von 0.25 mM im Kulturmedium zu erreichen. Die Testkultur wurde weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Kultur abgenommen, mit 100 µl Azetonitril versetzt, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur HPLC-MS-Messung eingesetzt.

#### 3.3.2 Mutasynthese und erste Aufarbeitung von Tomaymycin-Analoga im präparativen Maßstab

Die Vorläuferkulturen für die vorläufergesteuerte Biosynthese von Tomaymycin-Analoga im präparativen Maßstab wurden identisch zu den Vorläuferkulturen für analytische Ansätze kultiviert. Für die Produktionskultur selbst wurden 500 ml SCY-Medium in 2.5 l *Ultra Yield Flasks* mit *Enhanced AirOtop Seal* mit 5 % dicht bewachsener Vorkultur des jeweiligen Produktionsstamms angeimpft und bei 30 °C und 150 rpm kultiviert. 2.5 ml des 100 mM in DMSO gelösten Anthranilsäurederivats wurden nach 24 h bis zu einer Endkonzentration von 0.5 mM zugegeben. Nach 48 h wurden die Zellen abzentrifugiert, 1/10 Volumen 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7

zugegeben und der pH-Wert des Überstands auf  $\text{pH } 7 \pm 0.1$  eingestellt. Der Überstand wurde zweimal mit je einem Volumen *n*-Hexan ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Anschließend wurde zweimal mit je einem Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen wurde vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Der rohe Extrakt wurde direkt weiter verwendet oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.3.3 Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga im analytischen Maßstab**

Für die vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga wurde *Streptosporangium sibiricum* auf BG-Agar-Platten ausplattiert, 2 Tage bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend ca.  $1\text{ cm}^2$  dicht gewachsenes Myzel zum Animpfen der Vorkultur genutzt. Die Platten konnten nicht länger als 5 Tage verwendet werden, da *S. sibiricum* auf BG-Agar keine Sporenbildung zeigte. Die Vorkultur wurde in einem mit einer Spiralfeder ausgelegten 300 ml Erlenmeyerkolben in 30 ml BG-Medium angeimpft und 2 Tage bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 150 U/min inkubiert. Für die Produktionskulturen wurden 500  $\mu\text{l}$  ISP2-Medium im 2 ml Reaktionsgefäß mit gelochtem Deckel mit 25  $\mu\text{l}$  Vorkultur angeimpft und bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1000 U/min inkubiert. Nach 24 h, 48 h 72 h wurden je 1.25  $\mu\text{l}$  des 100 mM in DMSO gelöste Anthranilsäure- oder Prolinderivatderivats bis zu einer Endkonzentration von 0.75 mM nach 72 h zugegeben. Nach 96 h wurden 100  $\mu\text{l}$  Kultur abgenommen, mit 100  $\mu\text{l}$  Azetonitril versetzt, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur HPLC-MS-Messung eingesetzt.

#### **3.3.4 Vorläufergesteuerte Biosynthese und erste Aufarbeitung von Sibiromycin-Analoga im präparativen Maßstab**

Die Vorläuferkulturen für die vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga im präparativen Maßstab wurden identisch zu den Vorläuferkulturen für analytische Ansätze kultiviert. Für die Produktionskultur selbst wurden 500 ml ISP2-Medium in 2.5 l *Ultra Yield Flasks* mit *Enhanced AirOtop Seal* mit 5 % dicht bewachsener Vorkultur angeimpft und bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 150 rpm kultiviert. 1.25  $\mu\text{l}$  des

### 3 Methoden

---

100 mM in DMSO gelösten Anthranilsäurederivats wurden nach 24 h, 48 h, 72h bis zu einer Endkonzentration von 0.75 mM zugegeben. Nach 96 h wurden die Zellen abzentrifugiert, 1/10 Volumen 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7 zugegeben und der pH-Wert des Überstands auf pH 7 ± 0.1 eingestellt. Der Überstand wurde zweimal mit je einem Volumen *n*-Hexan ausgeschüttelt und die organische Phase verworfen. Anschließend wurde zweimal mit je einem Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen wurde vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Der rohe Extrakt wurde direkt weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert.

## 3.4 Chromatographische und massenspektrometrische Methoden

### 3.4.1 FPLC Ni-His-Trap Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung 6 x His-markierter Proteine wurde eine HisTrap HP Ni-Sepharose-Säule mit einem Volumen von 1 ml in Verbindung mit einer ÄKTAprime plus eingesetzt. Die Flussrate betrug bei allen Schritten 1 ml/min. Das Gesamtlysate der heterologen Expression (siehe 3.2.2) wurde mit Hilfe eines Superloops oder speziellen Probenpumpe auf die Säule aufgebracht. Anschließend wurde die Säule mit Ni-IMAC Bindepuffer gespült bis nicht bindendes Protein von der Säule gewaschen und die Absorption bei 280 nm wieder das Ausgangsniveau vor dem Auftragen des Lysats erreicht hatte. Anschließend wurde über 20 min der Anteil des Ni-IMAC Elutionspuffers linear auf 100% erhöht um gebundene Proteine zu eluieren. Während des Gradientenlaufs wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1ml gesammelt. Fraktionen welche im Gradientenlauf eine deutliche Absorption bei 280 nm gezeigt haben wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Traten Banden mit der erwarteten Größe auf, wurden diese ausgeschnitten und mittels MALDI-MS analysiert.

### 3.4.2 Vorbereitung von MALDI-MS Proben

Zur Identifikation eines exprimierten Proteins wurde das Zelllysate, bzw. die aufgereinigte Fraktion mittels SDS-PAGE getrennt um die ungefähre Größe des Proteins zu bestätigen und das Zielprotein für die Analyse anzureichern. Die entsprechende Bande wurde aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Das Gelstück wurde mit einer 50 %igen Azetonitrillösung entfärbt und getrocknet; der Entfärbungsschritt wurde gegebenenfalls wiederholt bis das Gelstück farblos war. Anschließend wurde es mit reinem Azetonitril gewaschen und getrocknet. Zum Verdau der Probe wurde das Gelstück mit 20 µl Trypsin-Verdau-Puffer versetzt und die Reaktion verlief über

30 min bei 37 °C. Anschließend wurden 10 µl bis 20 µl 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben, damit das Gelstück vollkommen mit Flüssig überschichtet ist und die Reaktion bei 37 °C über Nacht fortgesetzt. Der Verdau wurde mit 0.5 µl einer 1 % TFA Lösung gestoppt und der Überstand der Reaktion abgenommen und das Gelstück verworfen. Ggf. wurde der Überstand bei -20 °C bis zur MALDI-MS Messung gelagert. Die in den Messungen erhaltenen Ergebnisse wurden als *peptid-mass-fingerprint* mit den theoretisch auftretenden Massen abgeglichen um die Identität des Proteins zu bestätigen.

#### 3.4.3 Analytische HPLC-MS

Analysen von Kulturextrakten, aus Kulturextrakten aufgereinigten Komponenten und *de novo* synthetisierten Komponenten wurde via HPLC-MS vorgenommen. Die Messungen wurden an einem mit einem DAD ausgestatteten Dionex-RSLC3000-System vorgenommen. Die chromatographische Auftrennung wurde in einem Wasser / Acetonitril Lösemittelsystem vorgenommen; beide Lösemittel waren mit 0,1 % Ameisensäure versetzt. Die Auftrennung erfolgte über einen Gradienten von 5 % auf 95 % Azetonitril über 18 min auf einer BEH C18 Säule (Phenomenex; 2.1 x 100 mm; Partikelgröße 1.7 µm) bei einer Flussrate von 0.6 ml/min bei 45 °C. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden folgende Systeme eingesetzt: entweder ein im positiven Ionisationsmodus operierendes maXis 4G System (Bruker Daltonics) oder ein LTQ Orbitrap-System (ThermoScientific), welches von einer TriVersa NanoMate nanoESI-Quelle (Advion) gespeist wurde. Daten wurden massenspektrometrisch in einem Bereich von 200 *m/z* – 2000 *m/z* und UV-Spektren in einem Bereich von 200 nm – 600 nm aufgezeichnet.

#### 3.4.4 Quantifizierung von der Tomaymycinproduktion

Zur Quantifizierung der Tomaymycinproduktion lag ein Tomaymycinstandard mit einer Reinheit > 95 % vor. Für Tomaymycin-Analoga wurde das in der Mutasyntese gewonnene Produkt auf eine Reinheit > 95 % aufgereinigt und als Standard eingesetzt. Eichreihen wurden mit einer Konzentrationen von 100 mg/l in einem

1:1 Wasser:Acetonitril-Gemisch als Lösungsmittel angesetzt und 1:1 mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt, die eingesetzten Konzentrationen sind:

100.0	mg/l
50.0	mg/l
25.0	mg/l
12.5	mg/l
6.25	mg/l
3.13	mg/l
1.56	mg/l
0.78	mg/l
0.39	mg/l

In der Auswertung der HPLC-MS-Chromatogramme wurden in den EIC für die Masse des jeweiligen Standards ( $\pm 5$  ppm) die Peakflächen integriert. Jeder Probe wurde zweimal gemessen und der gemittelte Wert der Peakfläche gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen. Der lineare Bereich der Messkurve wurde zur Ermittlung der Konzentration genutzt, höher konzentrierte Kulturproben wurden gegebenenfalls mit 1:1 Wasser:Acetonitril verdünnt.

#### 3.4.5 Semipräparative HPLC-MS

Aufreinigungen via semipräparativer HPLC-MS wurden analytischen Läufen entsprechend skaliert. Als Säule wurde eine Luna 5u C18(2) 100A, 250 x 10 mm bei einem Gradienten von 10 % H<sub>3</sub>CCN, 90 % H<sub>2</sub>O bis 100 % H<sub>3</sub>CCN in 35 min und einem Fluss vom 5 ml/min genutzt. Die Elution wurde via UV-Absorption bei 220 nm verfolgt. Proben wurden manuell gesammelt.

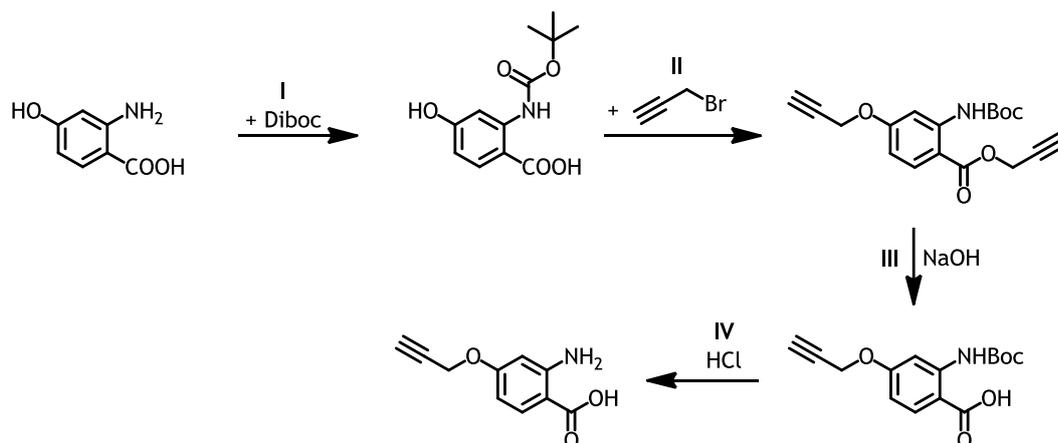
#### 3.4.6 NMR-spektrometrische Analysen

NMR Spektren wurden mit einem 500 MHz Avance III Spektrometer (UltraShield, Bruker BioSpin GmbH) oder mit einem 700 MHz Avance III Spektrometer (Ascend, Bruker BioSpin GmbH) aufgenommen. Beide Geräte waren mit einer Kryoplattform ausgestattet und Messungen wurden - wenn nicht anders angegeben - bei 298 K vorgenommen.

## 3.5 Chemische und Partialsynthesen

### 3.5.1 Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoessäure

Die Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoessäure (**59**) aus 2-Amino-4-hydroxy-benzoessäure (**55**) erfolgte in vier Schritten (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Chemische Synthese von 4-Propargyloxy-Anthranilsäure aus 4-Methoxy-Anthranilsäure und Propargylbromid in vier Schritten.

#### Schritt I

Die Amino-Gruppe der 2-Amino-4-hydroxy-benzoessäure wird Boc-geschützt. Vilaivan beschreibt, dass elektronendefiziente aromatische Amine unter milden Reaktionsbedingungen, wie sie zum Beispiel bei aliphatischen Aminen genügen, nicht reagieren [129], weshalb für 2-Amino-4-hydroxy-benzoessäure wie von Vilaivan beschrieben härtere Bedingungen gewählt wurden.

Eingesetzte Mengen:

2-Amino-4-hydroxy-benzoessäure	4.34 mmol
Di-tert-butylidicarbonat	21.7 mmol
Lösungsmittel: absoluter Ethanol	8.7 ml

Versuchsablauf:

Der Ansatz wird bei 50 °C in einem geschlossenen Kolben für 48 h gerührt. Anschließend wird die Lösung mit HCl angesäuert und 3-mal mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden gesammelt und im Rotationsverdampfer das Lösungsmittel abgezogen. Zur Entfernung des in der

### 3 Methoden

---

organischen Phase angereicherten Di-tert-butyldicarbonat wird das erhaltene Produkt in 1 N NaOH gelöst und 3-mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wird anschließend mit 1 N HCl neutralisiert. Aufgrund der geringen Mengen ist ein wäres Abfiltrieren der ausgefallenen weißen Kristalle schwierig; das Produkt wird 3-mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und das organische Lösungsmittel anschließend im Rotationsverdampfer abgezogen. Die laufende Reaktion und die Aufreinigungsschritte können mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-MS verfolgt werden.

#### Schritt II

Im zweiten Schritt erfolgt die Propargylierung von 2-(N-Boc-amino)-4-hydroxybenzoesäure.

Eingesetzte Mengen:

2-(N-Boc-amino)-4-hydroxybenzoesäure	75 µmol
Propargylbromid (80 Gew.% - Lösung in Toluol)	187 µmol
NaOH	300 µmol
KI	Spatelspitze
H <sub>2</sub> O:EtOH 1:10	500 µl

Versuchsablauf:

Der Ansatz wird bei 80 °C für 18 h im Luftdicht verschlossenen Mikrowellenröhrchen gerührt. Anschließend wird der Ansatz in 25 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal gegen 25 ml 0.1 N NaOH ausgeschüttelt. Das verbliebene Edukt wird von der wässrigen Phase aufgenommen und kann sauer gefällt und wieder verwendet werden. Das organische Lösungsmittel wird abschließend im Rotationsverdampfer abgezogen.

#### Schritt III

Durch Verseifung wird die Propargylierung am der Carboxylrest entfernt.

Zum Produkt aus Schritt zwei werden folgende Mengen zugesetzt:

Ethanol	7.5 ml
1N NaOH	5.0 ml

Versuchsablauf:

Der Ansatz wird bei 60 °C zwei Stunden gerührt. Das Ethanol wird, soweit möglich, im Rotationsverdampfer abgezogen und die Lösung mit 1N HCl neutralisiert bis das

### 3 Methoden

---

Produkt ausfällt. Anschließend wird der Ansatz gegen das gleiche Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt und die abgetrennte organische Phase im Rotationsverdampfer eingetrocknet.

#### Schritt IV

Im vierten Schritt erfolgt die Entfernung der Boc-Schutzgruppe von 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-benzoesäure.

Eingesetzte Mengen:

2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-benzoesäure	40 µmol
Ethylacetat	2 ml
12 N HCl	3 ml

Versuchsablauf:

Die Lösung wird 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, hierbei fällt das Produkt in weißen Kristallen aus. Anschließend werden 3 ml 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7 zugegeben und der Ansatz auf Eis 10 N NaOH vorsichtig neutralisiert. Anschließend wird das Produkt dreimal gegen das gleiche Volumen Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase im Rotationsverdampfer getrocknet.

#### **3.5.2 Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen 4-Propargylanthranilsäure und 1,5-Diazido-3-oxapentan**

Um vor der Fütterung des Edukts die Möglichkeit der Dimerbildung testen zu können wurde die Kopplung mit der Vorstufe und dem Linker getestet.

Eingesetzte Mengen:

4-Propargyloxyanthranilsäure	0.2 mg
Wasser	20 µl
EtOH	20 µl
CuSO <sub>4</sub>	15 mM
L-Ascorbinsäure	30 mM
1,5-Diazido-3-oxapentan	0.5 µM

(1 %ige 1,5-Diazido-3-oxapentan Lösung in 50 % Ethanol / 50 % Wasser)

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C geschüttelt. Nach 15 min, 4 h, und 24 h wurden 10 µl des Ansatzes mit 40 µl Azetonitril versetzt, abzentrifugiert und bis zur HPLC-MS Messung bei -20 °C gelagert.

#### **3.5.3 Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Rohextrakt**

Um die Reaktion zwischen DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan möglichst direkt testen zu können wurde ein Vorversuch angesetzt, in welchem die Addition direkt im Kulturüberstand ablaufen sollte. Hierfür wurde eine mit Amino-4-propargyloxybenzoesäure gefütterte, vier Tage alte Testkultur abzentrifugiert und der Kulturüberstand weiterverwendet.

Eingesetzte Mengen:

Kulturüberstand	150 µl
EtOH	150 µl
CuSO <sub>4</sub>	15 mM
L-Ascorbinsäure	30 mM
1,5-Diazido-3-oxapentan	100 µM

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C geschüttelt. Nach 15 min, 4 h, und 24 h wurden 10 µl des Ansatzes mit 40 µl Azetonitril versetzt, abzentrifugiert und bis zur HPLC-MS Messung bei -20 °C gelagert.

#### **3.5.4 Dimerisierung von DOPOS via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition im analytischen Maßstab**

Ziel der Synthese von DOPOS war die Dimerisierung durch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. Als Linker wurde 1,5-Diazido-3-oxapentan eingesetzt. DOPOS wurde in einem vierfachen Überschuss verglichen mit dem Linker angesetzt, um die Bildung von vollständigen Dimeren zu begünstigen.

Reaktionsansatz:

DOPOS	0.1	mg
absoluter Ethanol	20	µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	20	µl

### 3 Methoden

---

1M CuSO<sub>4</sub> 0.6 µl

1M L-Asc 1.2 µl

1 %ige 1,5-Diazido-3-oxapentan Lösung in

50 % Ethanol / 50 % Wasser 2.6 µl

Reaktionsbedingungen: 37 °C bei ständigem Schütteln, 4 h

Nach einer Stunde wurde der Reaktionsansatz auf -20 °C bis zur HPLC-MS-Analyse gelagert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aufklärung Biosyntheseweg Tomaymycin

#### 4.1.1 Native Tomaymycinproduktion in *Streptomyces spec. FH6421*

Ziel dieser Arbeit war eine Steigerung der Tomaymycinproduktion ausgehend von den Produktionsraten des Wildtyp-Stammes. Die Tomaymycinproduktion im nativen *Streptomyces FH6421 spec.* setzt im Flüssigmedium je nach Kultivierungsbedingungen zwischen Tag eins und Tag drei ein. Unter guter Durchlüftung im entsprechenden Produktionsmedium (SCY) können Produktionstiter von bis zu 50 mg/l Tomaymycin erreicht werden, die höchste Tomaymycinkonzentration wird zwischen dem dritten und vierten Tag erreicht. Mit dem Einsetzen der Produktion beginnt mit zeitlich verzögertem Verlauf auch die Umsetzung von Tomaymycin zum inaktiven Oxotomaymycin (siehe Abbildung 16). Vermutlich dient die Oxidation als Resistenzmechanismus des Stammes gegen das selbstsynthetisierte Tomaymycin [130].

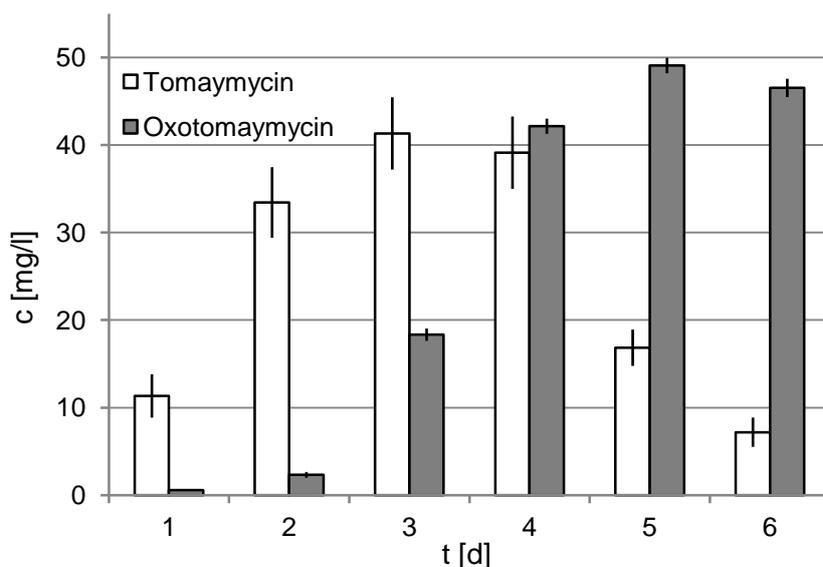
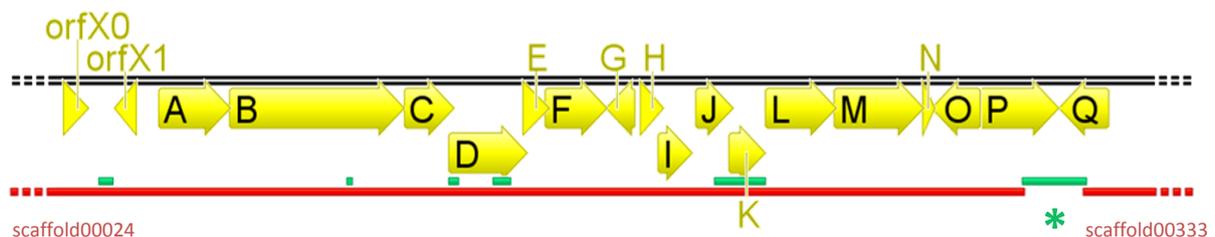


Abbildung 16: Exemplarische Tomaymycin / Oxotomaymycin Produktionskurve für *Streptomyces spec. FH6421*.

#### 4.1.2 Sequenzierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters

Zu Beginn dieser Arbeit war die Gensequenz des Tomaymycin-Biosynthese-Clusters nicht bekannt. Um über Sequenzhomologien einzelne Gene suchen, ihrer postulierten Funktion im Biosyntheseweg zuordnen und damit das Cluster identifizieren zu können, wurde das Genom des Stamms *Streptomyces spec.* FH6421 sequenziert. Bakterien des Phylum Actinobacteria weisen einen sehr hohen GC-Gehalt im Genom auf, was molekularbiologisches Arbeiten deutlich erschwert. Der GC-Gehalt im Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster ist mit 72 % vergleichbar mit dem GC-Gehalt des *Streptomyces coelicolor* A3(2)-Genoms [131] bzw. allgemein dem GC-Gehalt in *Streptomyces* [132] und kann lokal - zum Beispiel in der intergenischen Region zwischen orfX0 und orfX1 - bis zu 80 % erreichen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die ersten Sequenzen noch mit dem Anthramycin Biosynthese-Gencluster verglichen [58], mit der Verfügbarkeit der Sequenzen des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters aus *Streptomyces achromogenes* [133] konnten die Cluster direkt miteinander verglichen werden. Das Cluster wurde in den Sequenzierungsdaten auf zwei *scaffolds* gefunden. Mittels des Primerpaars pr028 wurde die unbekannte Sequenz mittels PCR amplifiziert und das Amplifikat sequenziert. Mit den erhaltenen Daten konnte die *scaffolds* schlüssig verbunden werden. In fünf weiteren Bereichen wurden unvollständige Sequenzdaten analog komplettiert (siehe Abbildung 17). Das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster weist in *Streptomyces spec.* FH6421 die gleiche Organisation wie in *S. achromogenes* auf.



**Abbildung 17:** Vervollständigung der Sequenzdaten des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters. Die Abdeckung der bei der Sequenzierung erhaltenen Daten ist in rot dargestellt. Grün dargestellte Sequenzen wurden aufgrund unvollständiger Daten innerhalb der *scaffolds* oder zum schließen einer Sequenzlücke zwischen *scaffold* 24 und 333 (\*) amplifiziert und sequenziert.

Die Identität/Ähnlichkeit der Proteinsequenzen beider Clustern liegt zwischen 53 % / 63% für TomP und 89 % / 94 % für TomF (siehe Tabelle 3).

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 3:** Ähnlichkeit der Proteinsequenzen des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters in *Streptomyces spec.* FH6421 verglichen mit dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster in *Streptomyces achromogenes* [133].

Gen	Funktion des Proteins	Länge des Proteins	Ähnlichkeit zum Protein in <i>S. achromogenes</i> : Identität, Ähnlichkeit, Lücken, Länge in <i>S. a.</i>	GenBank (oder PDB)
tomA	nichtribosomale Peptidsynthetase, Inkorporation A-Ring	611 aa	62 %, 72%, 4%, 634 aa	ACN39014.1
tomB	nichtribosomale Peptidsynthetase, Inkorporation C-Ring, 2-Elektronen-Reduktion	1536 aa	64 %, 74%, 0%, 1542 aa	ACN39015.1
tomC	Synthese A-Ring, 3-Desoxy-d-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat- Synthase	407 aa	68 %, 78%, 0%, 406 aa	ACN39016.1
tomD	Synthese A-Ring	661 aa	62 %, 71%, 1%, 677 aa	ACN39017.1
tomE	Synthese A-Ring	200 aa	63 %, 72%, 3%, 206 aa	ACN39018.1
tomF	Synthese A-Ring	524 aa	89 %, 94%, 0%, 533 aa	ACN39019.1
tomG	Synthese A-Ring	222 aa	70 %, 81%, 0%, 234 aa	ACN39020.1
tomH	Synthese C-Ring	167 aa	74 %, 82%, 0%, 145 aa	ACN39021.1
tomI	Synthese C-Ring	268 aa	68 %, 75%, 0%, 318 aa	ACN39022.1
tomJ	Synthese C-Ring	300 aa	75 %, 84%, 0%, 319 aa	ACN39023.1
tomK	Synthese C-Ring	292 aa	65 %, 73%, 0%, 287 aa	ACN39024.1
tomL	Synthese C-Ring	597 aa	77 %, 84%, 0%, 577 aa	ACN39025.1
tomM	putatives Resistenzgen	770 aa	76 %, 85%, 0%, 783 aa	ACN39026.1
tomN	Synthese C-Ring	68 aa	64 %, 78%, 0%, 66 aa	PDB: 3RY0_A / B
tomO	Synthese A-Ring	400 aa	65 %, 74%, 0%, 394 aa	ACN39028.1
tomP	Synthese A-Ring	805 aa	53 %, 63%, 4%, 637 aa	ACN39029.1
tomQ	nicht zugeordnet, Knock-out führt zum Produktionsverlust (siehe XXX)	482 aa	74 %, 83%, 0%, 482 aa	ACN39030.1

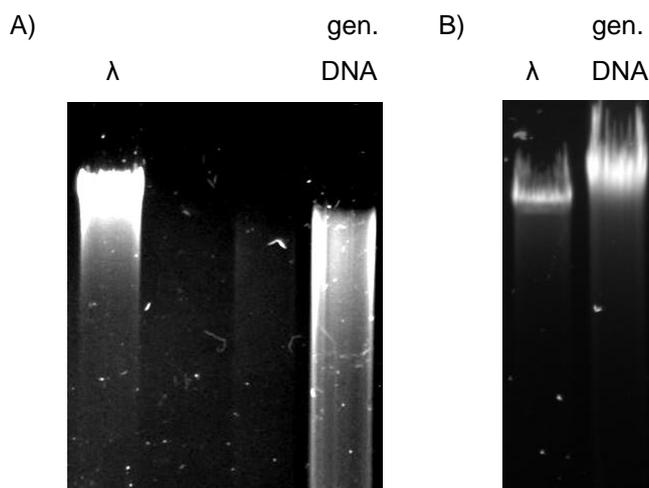
### 4.1.3 Erstellung der *Streptomyces spec.* FH6421 Cosmid-Bibliothek

Der Wildtyp-Stamm *Streptomyces spec.* FH6421 war schlecht zugänglich für genetische Arbeiten. *Single cross-over* Knock-out Versuche oder Versuche

integrative wie replikative Plasmide über biparentale Konjugation in den Stamm einzubringen ergaben keine stabilen Exkonjuganten. Bei Knock-out Versuchen kam erschwerend hinzu, dass die so erhaltenen Stämme ein stark verlangsamtes Wachstum und eine veränderte Morphologie zeigten. Die einzelnen Zellfäden bildeten statt des für *Streptomyces* typischen stark verzweigten Mycels nur noch wenige Abzweigungen aus.

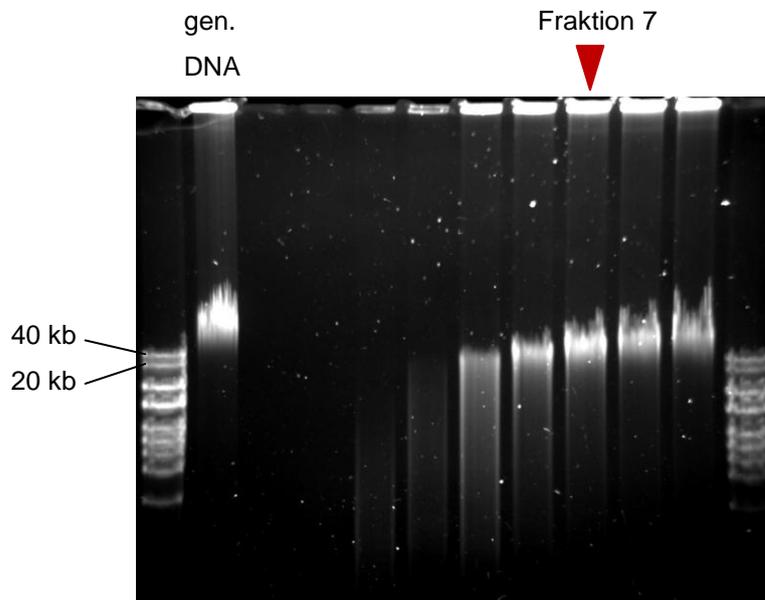
Um das Cluster trotz dieser Problematik gezielt molekularbiologisch modifizieren zu können wurde die Klonierung für eine spätere heterologe Expression in einem definierten Wirtstamm notwendig. Hierfür wurde eine Cosmidbibliothek erstellt.

Die Isolation genomischer DNA war beim Wildtyp-Stamm *Streptomyces* spec. FH6421 problematisch. Für die Nutzung bei der Erstellung einer Cosmid-Bibliothek ist nicht nur relevant, dass die isolierte DNA eine hohe Reinheit aufweist; die DNA-Stränge müssen hochmolekular vorliegen um im *Sau3AI*-Verdau Fragmente gleichmäßiger Länge und beidseitigem CTAG 5'-Überhang zu ergeben. Zahlreiche Versuche mit unterschiedlichen Medien (HA-Medium, SM-Medium, SMM-Medium, BG-Medium, TSB-Medium, ISP2-Medium, YEME-Medium) und unterschiedlichen Kultivierungsdauern (12 h, 24 h, 36 h) waren notwendig, um geeignete Bedingungen zu ermitteln. Die besten Ergebnisse ergab die Kultivierung in YEME-Medium für 24 h, wobei die Kultur aus einer über Nacht gezogenen, von Platte angeimpften HA-Vorkultur angeimpft wurde. Andere Medien als YEME ergaben Isolate mit einem hohen Anteil gescherter niedrigmolekularer DNA-Fragmente (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** DNA-Agarose Gelelektrophorese von genomischer *S. spec.* FH6421 DNA extrahiert aus Stämmen die in unterschiedlichen Flüssigmedien kultiviert wurden, das  $\lambda$ -Phagengenom (48.5 kbp) wurde als Größenreferenz aufgetragen. Die Kultivierung des Stammes erfolgte in **A)** HA-Medium oder **B)** YEME-Medium

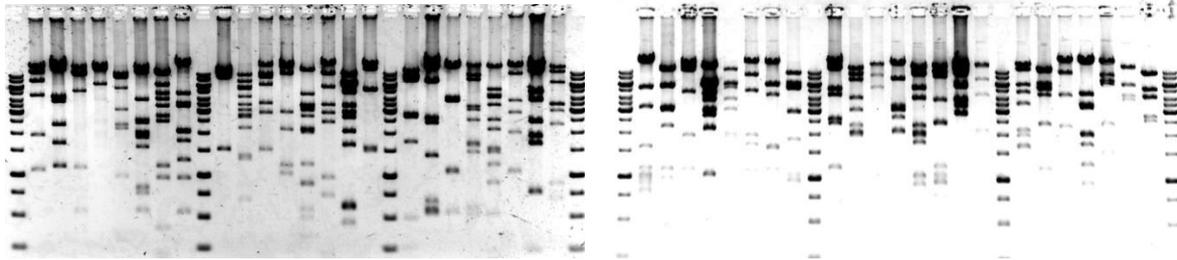
Die Restriktion der genomischen DNA wurde mit steigenden Konzentrationen des Restriktionsenzym *Sau3AI* durchgeführt und sollte eine mittlere Fragmentgröße von ~ 40 kb erzeugen. Fraktion 7 wurde für die Ligationsreaktion ausgewählt (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19:** DNA-Agarose Gelelektrophorese des *Sau3AI* Verdau hochmolekularer genomischer *Streptomyces spec. FH6421* DNA. Der Verdau der verschiedenen Proben wurde mit unterschiedlich hohen Konzentration des Restriktionsenzym ange setzt. Die Probe der rot markierten Spur wurde für die weitergehenden Versuche genutzt.

Nach der Verpackung der Plasmide in Phagen erfolgte die Erstellung der Cosmid-Bibliothek in *E.coli*. Für die Nutzbarkeit einer Cosmid-Bibliothek ist eine möglichst hohe Abdeckung des Gesamtgenoms wichtig, die nur gegeben ist, wenn bei der Infektionsreaktion des *E. coli* durch die Phagen eine möglichst große Vielzahl unterschiedlicher Fragmente in die Bakterien eingebracht wird. Um die Heterogenität der Fragmente zu testen, wurden 48 Kolonien der Bibliothek angeimpft, die Plasmid-DNA isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 20). In der Auswertung wurden die Restriktionsmuster der Plasmide verglichen und auf Duplikate geprüft. Das Vorkommen von mehreren Duplikaten gibt einen klaren Hinweis auf eine geringe Vielfalt an übertragenen Fragmenten der genomischen DNA und macht eine Wiederholung der vorangehenden Schritte erforderlich. Für die Cosmid-Bibliothek von *Streptomyces spec. FH6421* konnten keine doppelten Restriktionsmuster gefunden werden. Die erstellten Cosmide weisen eine hohe

Diversität der insertierten Fragmente auf. Im nächsten Schritt sollte das Tomaymycin-Biosynthesecluster in der Cosmid-Bibliothek lokalisiert werden.



**Abbildung 20:** *Bam*HI-Restriktion von 48 willkürlich ausgewählten Klonen aus der FH6421 Cosmid-Bibliothek, Spuren 1, 10, 19 und 28, sowie 29, 38, 47 und 56 enthalten jeweils den Größenstandard (Fragmentgrößen in kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3.5; 3; 2.5; 2; 1.5; 1; 0.75; 0.5; 0.25)

### 4.1.4 Lokalisierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters

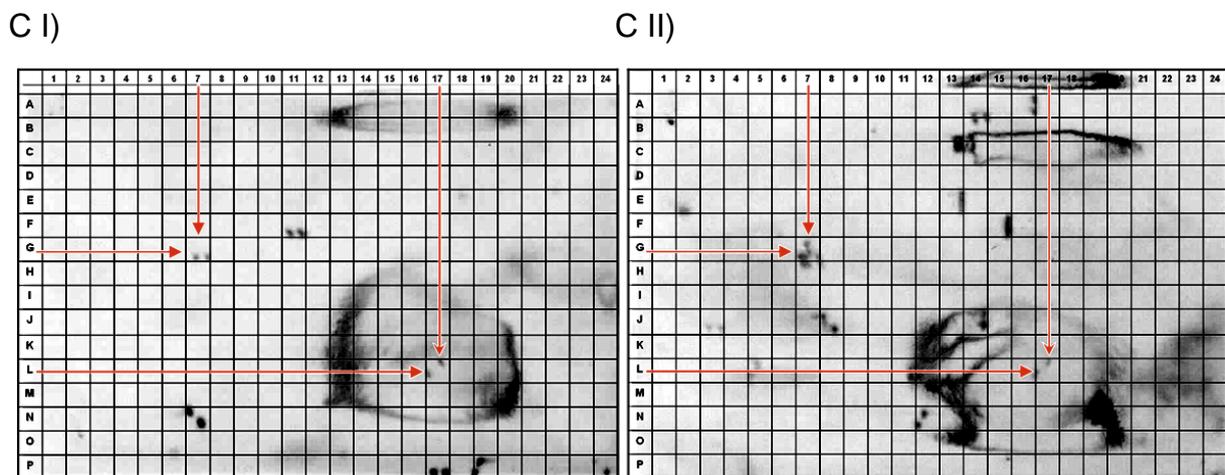
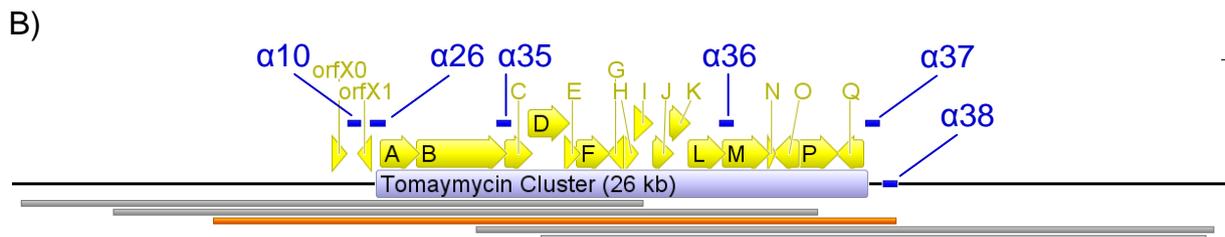
Mit den vorliegenden DNA-Sequenzen aus der Sequenzierung des *Streptomyces* spec. FH6421 Genoms und der Lokalisierung des Clusters durch Vergleich mit dem Anthramycin-Biosynthese-Gencluster [58], sowie dem Tomaymycin-Biosynthese-gencluster aus *Streptomyces achromogenes* [133] konnten gezielt Sonden für die Lokalisierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters in der Cosmid-Bibliothek entworfen werden. Es wurden zwei Sonden auf beiden Seiten außerhalb des Clusters, zwei Sonden welche das jeweils äußerste Gen endständig überlappen und zwei Sonden innerhalb des Clusters entworfen (siehe Abbildung 21). Die Länge der Sonden lag zwischen 500 und 560 bp. Diese Länge ermöglicht eine schnelle Bindung an die fixierte genomische DNA als auch stringente Bedingungen beim Waschen der Membran um unspezifisch gebundene Sonden wieder entfernen zu können. Auf einer Membran wurden die *E. coli*-Kulturen der sechs 384 well-Platten aufgetragen. Um positive Signale später der jeweiligen Platte zuordnen zu können wurde jede Probe doppelt mit einem für die Platte spezifischen Versatz der zwei Proben aufgetragen, das genutzte Muster ist Abbildung 21 A dargestellt. Mit sechs Platten und damit 2304 Kulturen wird bei einer durchschnittlichen Insertgröße der Cosmide von 40 kb und einer Genomgröße von geschätzt 9 Mb eine rechnerisch zehnfache Abdeckung des Genoms erreicht. Ziel der Lokalisierung war es innerhalb der Cosmid-Bibliothek ein Cosmid zu finden, welches das vollständige Tomaymycin

## 4 Ergebnisse

Biosynthese-Gencluster beinhaltet oder, wenn jeweils nur Teile des Clusters gefunden werden, das Cluster aus überlappenden Fragmenten des Clusters zu assemblieren. Bei der Hybridisierung der Sonden stellte sich heraus, dass  $\alpha 26$  und  $\alpha 37$  deutliche Signale in der Färbung ergaben, während sich die anderen Sonden nur schlecht aus dem Rauschen abhoben. Da  $\alpha 26$  und  $\alpha 37$  an entgegengesetzten Enden des Clusters lokalisiert waren, konnten über den Vergleich der positiven Kolonien zwei Cosmide, 2-G7 und 5-L17, bestimmt werden, die das gesamte Cluster trugen (siehe Abbildung 21).

A)

4		5	1
6	3		
5	4		1
3	2	6	2



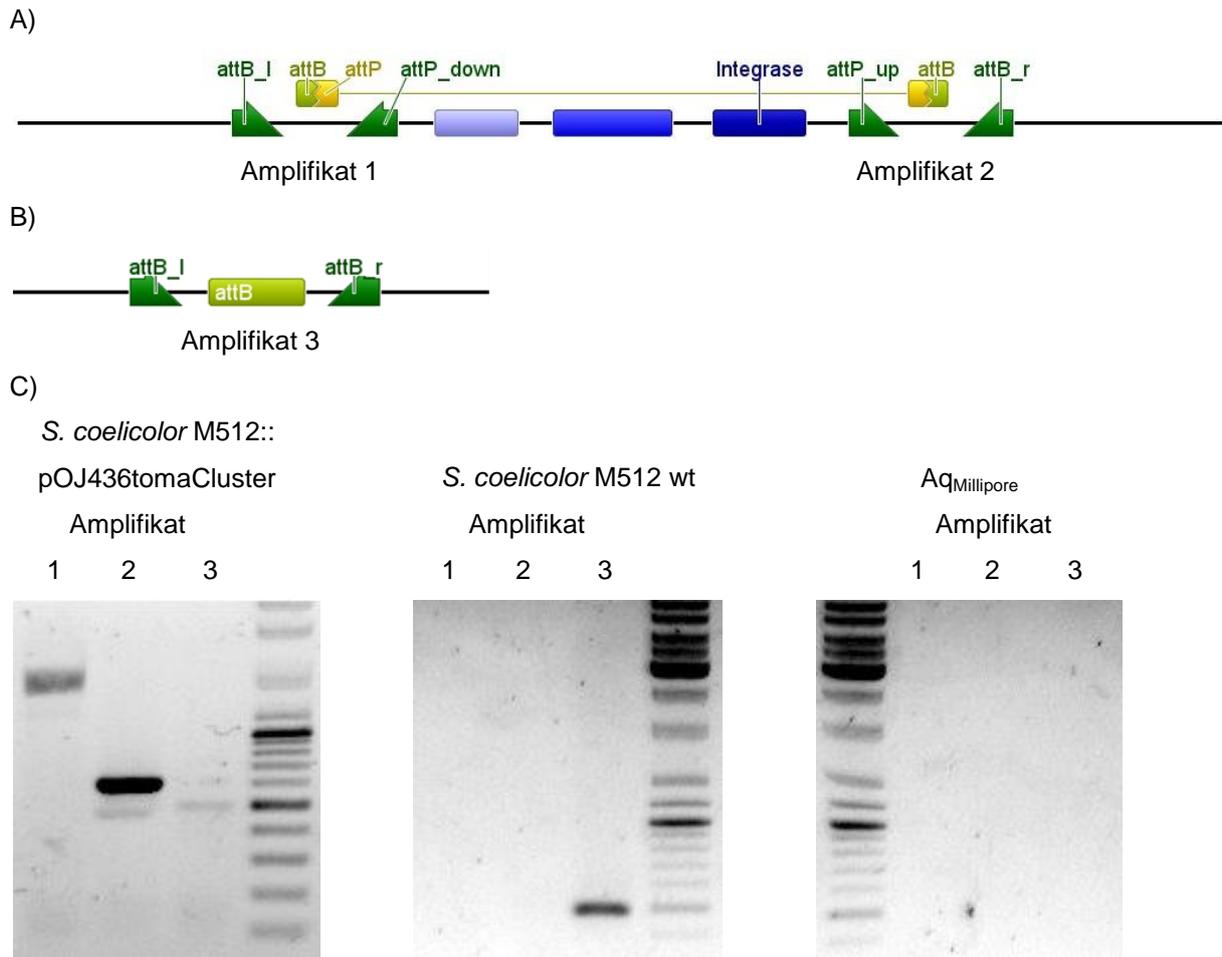
**Abbildung 21:** Erstellung der *Streptomyces spec.* FH6421 Cosmid-Bank-Membranen und Identifikation eines Cosmids, welches das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster vollständig beinhaltet. **A)** Blotting Muster zur Herstellung der hochdichten Kultivierungs-Membranen der Cosmid-Bibliothek **B)** Die Lage der relevanten verwendeten Sonden auf dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster ist in blau gezeigt, unter dem Cluster sind die hypothetischen Abdeckungen der gefundenen Cosmide in grau gezeigt, die Lage des weiterverwendeten Cosmids 2-G7 ist in orange hervorgehoben **C)** Hybridisierung der Sonden **I)**  $\alpha 26$  und **II)**  $\alpha 37$  mit den hochdichten Kultivierungs-Membranen der Cosmid-Bibliothek

Um zu bestätigen, dass das Cosmid 2-G7 aus der Cosmid-Bibliothek das Cluster trägt, wurde zuerst eine Kontrollrestriktion mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und anschließend eine Sequenzierung der Enden der im Cosmid der integrierten genomischen Sequenz durchgeführt. Hierfür wurden Sequenzierungsprimer pr010T4 und pr010T7 genutzt. Die Sequenzierung ergab, dass in 2-G7 das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster vorlag; zwischen T3-seitigen Ende von pOJ436 und *tomA* lagen 3.0 kb, zwischen dem T7-seitigen Ende von pOJ436 und *tomQ* lagen 1.7 kb. Mit dem Cosmid 2-G7 war die Grundlage die heterologe Expression des Clusters und gezielte molekularbiologische Modifikationen am Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster gelegt, es wurde unter der Bezeichnung pOJ436tomaCluster weiterverwendet.

### **4.1.5 Heterologe Expression des unmodifizierten Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters**

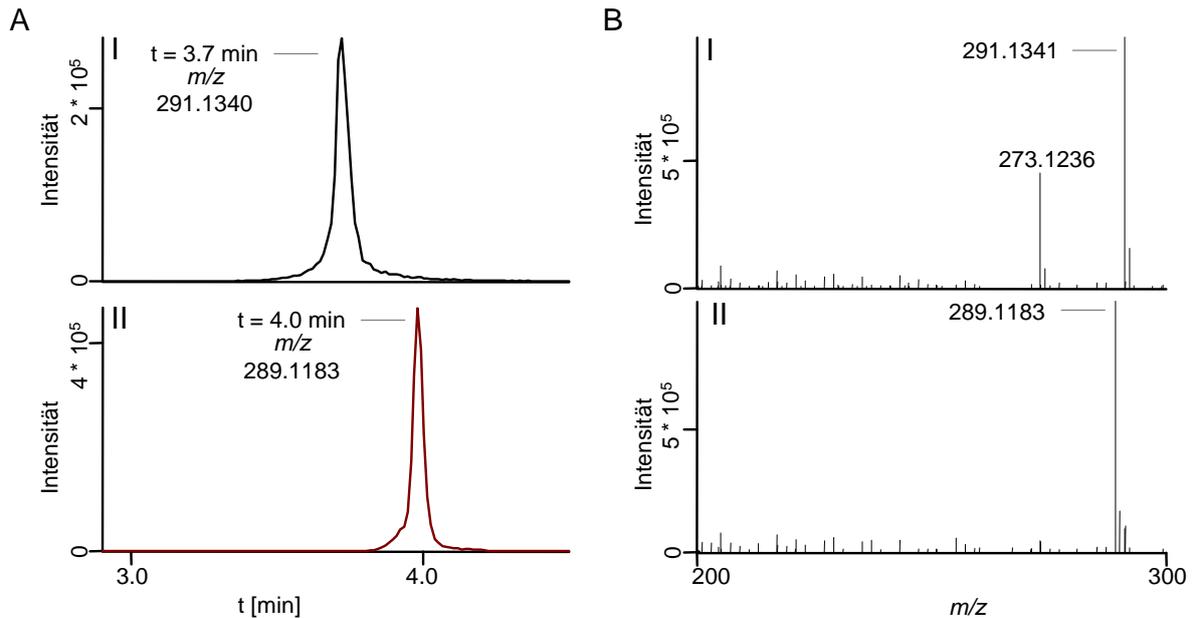
Um die Funktionalität des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters zu testen, wurde pOJ446tomaCluster mittels biparentaler Konjugation via ET12567/pUZ8002 die *Streptomyces* Stämme *S. coelicolor* A3(2) und *S. lividans* TK24 eingebracht. Die Integration in die genomische  $\Phi$ C31 Phagen Attachment-Site wurde mittels spezifischer Primer über PCR verifiziert (siehe Abbildung 22).

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 22:** Nachweis der Integration von pOJ436tomaCluster in *S. coelicolor* A3(2) via PCR; **A)** nach der Insertion eines pOJ436 basierten Vektors liegen die Primerpaare attB\_I und attP\_down sowie attP\_up und attB\_r einander gegenüber und ergeben ein Amplifikat; **B)** in der Kontrolle mit wildtypischen Locus flankieren attB\_I und attB\_r die attB-Sequenz; **C)** Agarose-gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Nachweisreaktionen für eine Integration von pOJ436tomaCluster, Ladder: Fermetas GeneRuler 1kb plus

Bei den verwendeten Stämmen konnte die Tomaymycinproduktion über HPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23). Unverändert trat auch bei heterologer Expression des Clusters in beiden eingesetzten Stämmen die Oxidation von Tomaymycin zu Oxotomaymycin auf. Es konnte die für Tomaymycin charakteristische Abspaltung von Wasser sehr gut beobachtet werden, welche neben der Masse von 291 u die um 18 u verminderte Masse von 273 u im Massespektrum hervorbringt. Die Abweichungen der gemessenen Massen von den theoretischen Massen lagen für Tomaymycin, Tomaymycin - H<sub>2</sub>O und Oxotomaymycin unter 0.2 ppm, die Retentionszeiten entsprachen denen der Reinsubstanzen.



**Abbildung 23:** HPLC-MS Analyse der heterologen Tomaymycin-Produktion in *S. lividans* TK24::pOJ436tomaCluster. **A)** HPLC-MS BPC für die Massen von **I)** Tomaymycin ( $[M + H^+]$   $291.1339 \pm 5$  ppm) und **II)** Oxotomaymycin ( $[M + H^+]$   $289.1183 \pm 5$  ppm); **B)** Massenspektrum für den Zeitraum von **I)** 3.6 - 3.8 min und **II)** 3.8 - 4.0 min.

#### 4.1.6 Transfer des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters in den replikativen Shuttle-Vektor pOJ446

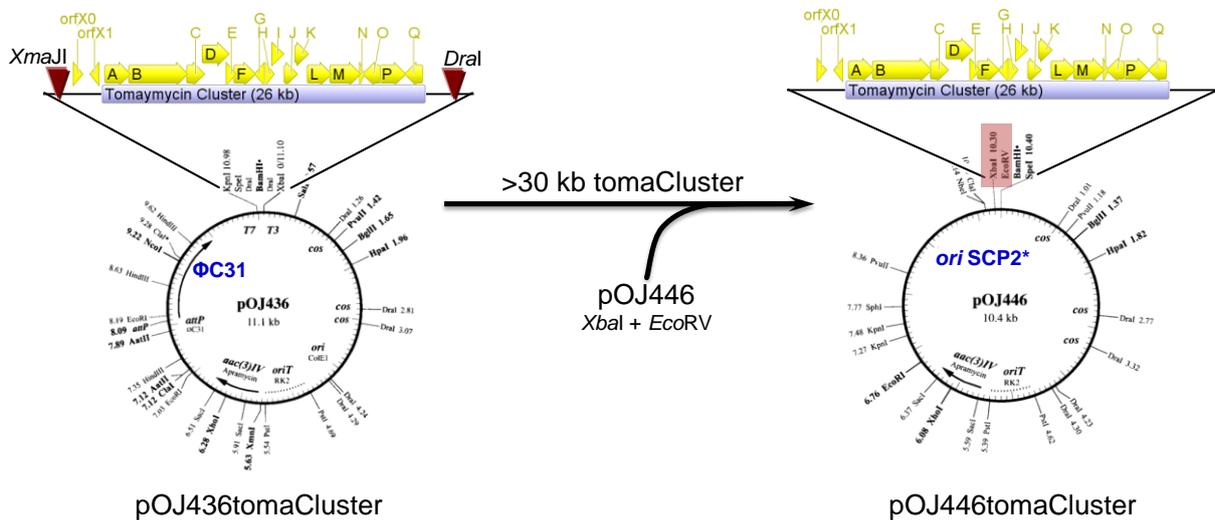
Auf SCP2\* beruhende Plasmide wie das Cosmid pOJ446 liegen in geringer Kopienzahl von ein bis zwei Kopien pro Chromosom in *Streptomyces* Stämmen vor. Ein Wechsel des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters vom  $\Phi$ C31-abgeleiteten integrativen Cosmid pOJ436 zum replikativen pOJ446 bewirkt also eine moderate Erhöhung der Kopienzahl. Diese Erhöhung der Gen-Kopienzahl kann zu einer höheren Proteinexpression während der Tomaymycinproduktion führen. Für den Fall, dass nicht die zur Verfügung stehenden Edukte limitierend sind, sondern der enzymatische Umsatz der Edukte ein Flaschenhals in der Biosynthese ist, kann damit die Tomaymycin-Gesamtproduktion erhöht werden.

Das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster wurde in einer konventionellen Klonierung vom integrativen Vektor pOJ436 in den replikativen Vektor pOJ446 überführt (siehe Abbildung 24). Hierfür wurde das Cluster mittel *Xma*I und *Dra*I aus pOJ436tomaCluster ausgeschnitten, die Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das ca. 30 kb Cluster-Fragment aufgereinigt.

## 4 Ergebnisse

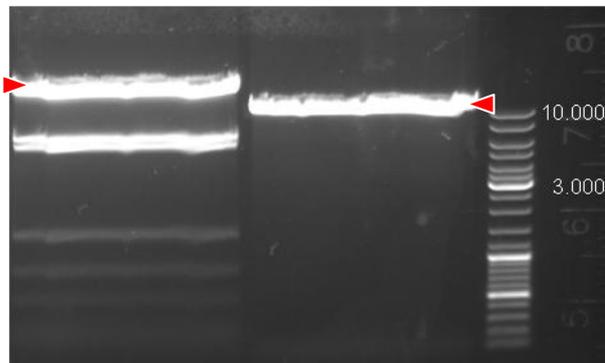
pOJ446 wurde mit *Xba*I und *Eco*RV linearisiert, was eine Ligation der kompatiblen Überhänge von *Xma*II und *Xba*I sowie der *blunt-ends* des *Dra*I und des *Xba*I Schnitts ermöglicht.

A



B

pOJ436tomaCluster + *Xma*II / *Dra*I      pOJ446 + *Xba*I / *Eco*RV      L



**Abbildung 24:** Klonierung von pOJ446tomaCluster. **A)** Klonierungsstrategie für die Überführung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters aus dem in *Streptomyces* integrativen Shuttle-Cosmid in das in *Streptomyces* replikative Shuttle-Cosmid pOJ446 unter Nutzung von Schnittstellen mit kompatiblen Überhängen (*Xma*II / *Xba*I) und *blunt-end* Schnittstellen (*Dra*I / *Eco*RV); **B)** Agarose-Gelelektrophoretische Auftrennung der geschnittenen Cosmide, die mit roten Pfeilen markierten Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und zu pOJ446tomaCluster ligiert.

Der Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in *E. coli* HS996 eingebracht und erhaltene monoklonale Plasmide mittels Restriktionsverdau verifiziert. Das erhaltene Plasmid wurde als pOJ446tc weiterverwendet.

Nach der biparentalen Konjugation via ET12567/pUZ8002 in die Stämme *S. coelicolor* A3(2), *S. coelicolor* M512 und *S. lividans* TK24 wurden die Tomaymycin-Produktionstiter ermittelt. Den höchsten Produktionstiter zeigte *S. lividans* TK24/pOJ446tc mit  $40 \pm 10$  mg/l Tomaymycin, was bereits an die Produktivität des Wildtyp-Stamms von  $50 \pm 10$  mg/l Tomaymycin heranreicht.

Bei späteren Optimierungsversuchen wurde zusätzlich der Stamm *S. albus* J1074/pOJ446tc getestet womit eine weitere Produktionssteigerung auf einen einen Produktionstiter von  $120 \pm 10$  mg/l Tomaymycin erzielt werden konnte.

### 4.1.7 Erstellung des replikativen Shuttlevektors pStW102 auf Basis von pOJ446

Trotz seiner häufigen Nutzung als Cosmid und Shuttle-Vector ist pOJ446 [90] nur unvollständig dokumentiert. Eine vollständige und umfassend annotierte Sequenz des Vektors war zur Zeit der Arbeiten mit dem Tomaymycin-Biosynthese-Cluster nicht verfügbar. Die geringe Zahl an beschriebenen Schnittstellen ließ nur relativ beschränkte Planungen für molekulare Arbeiten zu und das Vektor-Rückgrat war aufgrund der fehlenden Sequenzinformationen für Red/ET nicht zugänglich. Red/ET-Klonierungen im Insert waren nicht durchführbar, da aufgrund fehlender Sequenzinformationen keine geeigneten Primer konstruiert werden konnten. Zudem ist pOJ446 mit 10.4 kb relativ groß für einen Klonierungsvektor, was die ohnehin empfindlichen molekularbiologischen Versuche zusätzlich erschwert.

Um einen neuen, reduzierten Vektor aufzusetzen, wurde das Rückgrat teilweise sequenziert und die für den geplanten replikativen *E. coli* / *Streptomyces* Shuttlevektor essentiellen Sequenzen identifiziert. Im ersten Schritt benötigt der Shuttlevektor die Replikation in *E. coli*, im zweiten Schritt die Mobilisierung in der biparentalen Konjugation und damit den Transfer von *E. coli* zu *Streptomyces* und im dritten Schritt die Replikation in *Streptomyces*. Hierfür wurden die Genbereiche des pUC *origins*, des *oriT* und des SCP2\* *origins* im Plasmid belassen. Als Selektionsmarker wurde das Apramycinresistenzgen *aac(3)IV* im Vektor beibehalten. Entfernt wurde eine ca. 4 kb lange Sequenz mit den *cos*-Sequenzen, dem T3- und dem T7-Promotor sowie die *XbaI*, *EcoRV*, *BamHI*, *SpeI* MCS.

Die Modifikation des Plasmids wurde in zwei Stufen durchgeführt (siehe Abbildung 25). In der ersten Stufe wurde mit dem Primerpaar pr101 die Aminoglycosid-

O-nukleotidyl-Transferase *aad9* von pCR2.1-TOPO-Spec#2 amplifiziert und via Red/ET in pOJ446 inseriert. Mit diesem Schritt wurden die 4 kb Cosmid-Sequenz entfernt. Erhaltene Klone konnten auf Spectinomycin selektiert werden und die resultierenden Plasmide wurden per Kontrollverdau verifiziert, das Plasmid wurde unter der Bezeichnung pStW101 weiterverwendet.



**Abbildung 25:** Klonierungsstrategie für die Erstellung des replikativen *E. coli* - *Streptomyces* Shuttle-Vektors pStW102 auf Basis von pOJ446 [90].

In der zweiten Stufe wurde das Spectinomycin-Resistenz-Gen gegen eine MCS ausgetauscht. Die inserierte Sequenz war aufgrund des in der ersten Stufe gewählten Primerpaars pr101 von den Restriktions-Enzym-Schnittstellen *MunI/NheI* flankiert und wurde mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen geschnitten. Das Oligonukleotidpaar pr102f und pr102r wurde in einem gemeinsamen Ansatz auf 95 °C erhitzt und bei langsamer Abkühlung zum Doppelstrang vereinigt. Die entstandene Sequenz verfügte über die entsprechenden Überhänge um eine direkte Ligation mit dem linearisierten pStW101 *MunI/NheI*-Produkt zu ermöglichen. Erhaltene Klone konnten auf Apramycin selektiert werden und die resultierenden Plasmide wurden per Kontrollverdau verifiziert, das Plasmid wurde unter der Bezeichnung pStW102 weiterverwendet. Durch diese Modifikation wurde eine vielfältige MCS mit den Restriktionsschnittstellen *NheI*, *SspI*, *BspTI*, *XbaI*, *SdaI*, *PstI*, *SpeI*, *PacI*, *NdeI*, *HindIII*, *Eco147I* und *MunI* im Shuttlevektor pStW102 zur Verfügung gestellt.

### 4.1.8 Klonierung des Expressionsvektors pStW102tc

Aufgrund des hohen Homologiegrads zwischen pOJ436tomaCluster und pStW102 - beide beinhalten zum Beispiel *aac(3)/IV* und *rep(pUC)* - wären bei einer Red/ET-Klonierung unspezifische Rekombinationen aufgetreten und aufgrund des gleichen Resistenzgens wäre eine Selektion auf den Zielvektor über ein Antibiotikum ausgeschlossen. Daher wurde in einer konventionellen Klonierung das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster mit den Restriktionsenzymen *Xma*II und *Dra*I aus pOJ436tomaCluster ausgeschnitten und pStW102 mit *Xba*I und *Eco*RV linearisiert. Hierbei formen *Xma*II und *Xba*I kompatible Überhänge; *Dra*I und *Xba*I sind *blunt cutter*. Dies ermöglicht eine Ligation der beiden Fragmente. Eine Religation des ursprünglichen Vektors pOJ436tomaCluster war nicht zu erwarten, da die gewählten Restriktionsenzyme das pOJ436 Vektor-Rückgrat in zahlreiche Unterfragmente zerschneiden. Der erhaltene Vektor wurde mittels Kontrollrestriktionen verifiziert und unter der Bezeichnung pStW102tc weiterverwendet.

### 4.1.9 Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters via pStW102tc

Nach der Klonierung von pStW102tc wurde der Vektor mittels biparentaler Konjugation via ET12567/pUZ8002 in *S.coelicolor* A3(2), *S. coelicolor* M512, *S. lividans* TK24 und *S. albus* J1074 eingebracht. Bei der heterologen Expression des Genclusters mittels des Vektors pStW102tc zeigte *S. albus* J1074 den höchsten Produktionstiter mit einer Ausbeute von  $340 \pm 10$  mg/l Tomaymycin.

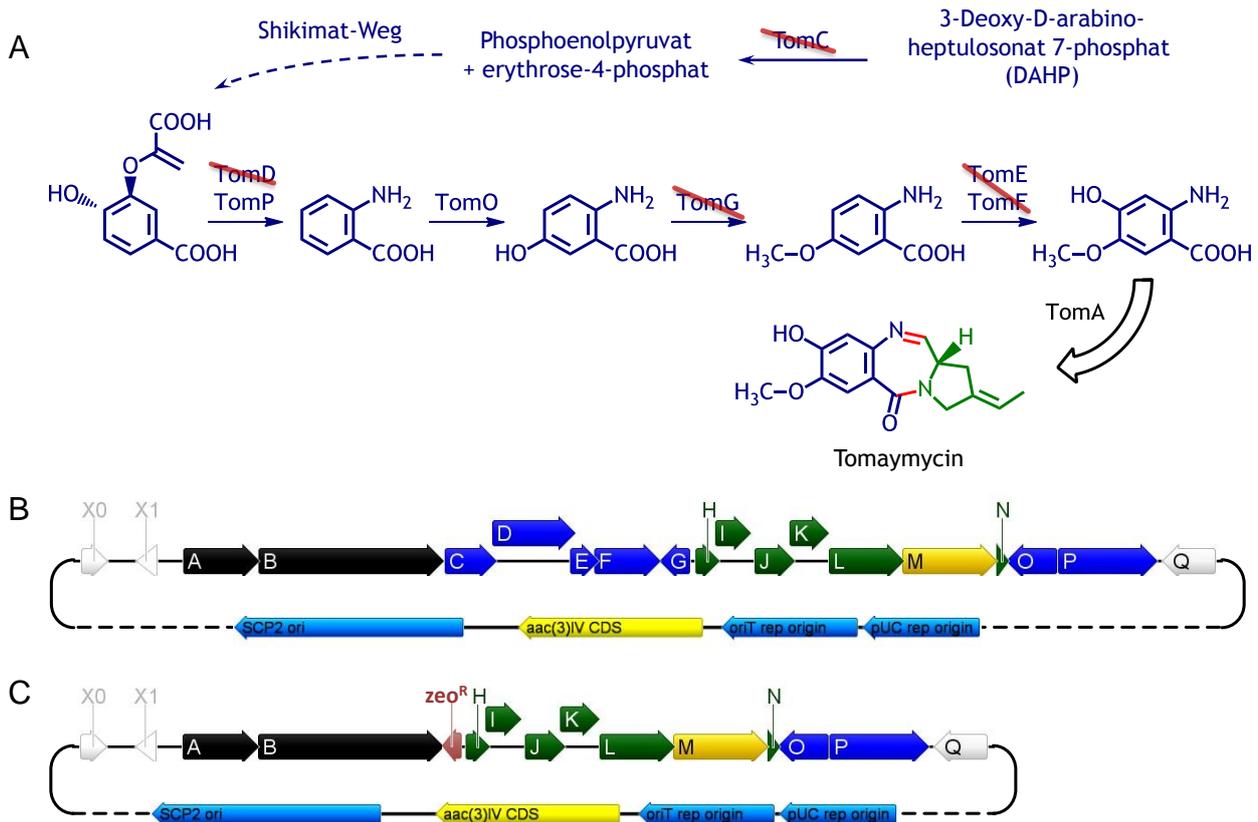
## 4.2 Mutasynthese Tomaymycin A-Ring

### 4.2.1 Erstellung des Knock-outs von *tomG* bis *tomC* im Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster durch Insertion des Zeocin Resistenz-Gens *Sh ble* via Red/ET

Versuche mittels vorläufergesteuerter Biosynthese gezielt in die Tomaymycinproduktion einzugreifen zeigten keine veränderten Biosyntheseprodukte. Zudem war *Streptomyces spec.* FH6421 genetisch schwer zugänglich. Zahlreiche unterscheidliche Knock-out Versuche mittels biparentaler Konjugation oder Spärenblastentransformation ergaben entweder keine oder nur extrem schlecht wachsende Exkonjuganten bzw. Transformanden.

Mit der Verfügbarkeit des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters auf *E. coli*-gängigen Plasmiden, einem etabliertem Konjugationsprotokoll sowie einem Protokoll für Produktionskulturen für verschiedene *Streptomyces* Spezies, war es möglich, genetische Modifikationen im Cluster zu etablieren. Um den assemblierenden NRPS ein alternatives Anthranilsäurederivat zur Verfügung zu stellen, war es notwendig den Biosyntheseweg des A-Rings zu unterbrechen. Die Gene *tomC* bis *tomG*, sowie *tomO* und *tomP* wurden von Li et al. [133] aufgrund ihrer Homologien der Synthese des A-Rings zugeordnet (siehe Abbildung 26). Die Clusterung von *tomC* bis *tomG* erlaubte hierbei den Knock-out von fünf der sieben Gene, welche dem Biosyntheseweg des A-Rings von Tomaymycin zugeordnet sind. Hierfür wurde das Zeocin Resistenz-Gen *Sh ble* vom Plasmid pCK\_T7A1\_βgal\_att mit dem Primerpaar pr103 amplifiziert, welches auch die für die Red/ET-Rekombination notwendigen Homologie-Sequenzen enthielt. Die Red/ET Rekombination wurde in GB2005-Zellen durchgeführt. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tc.re103 in den weiteren Arbeiten der Mutasynthese weiterverwendet.

## 4 Ergebnisse



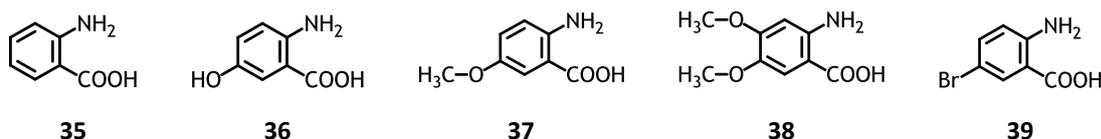
**Abbildung 26:** Eingriff in die Tomaymycin-Biosynthese um die Mutasynthese neuer Tomaymycin Analoga zu ermöglichen; **A**) möglicher Biosyntheseweg des Tomaymycin A-Rings [133], in pStW102tc.re103 (**C**) durch Deletionen fehlende Proteine sind rot ausgestrichen; **B**) das unmodifizierte Tomaymycin-Biosynthesegencluster auf dem Vektor pStW102tc **C**) Deletion von *tomC* bis *tomG* durch Insertion des Zeocin-Resistenzgens im Vektor pStW102.re103

### 4.2.2 Mutasyntheseversuch neuer Tomaymycin-Analoga mittels pStW102tc.re103

Nach der erfolgreichen heterologen Expression von Tomaymycin sollte das etablierte Expressionssystem zur Mutasynthese genutzt werden um damit neue, nicht natürliche Pyrrolbenzodiazepine darzustellen. Hierzu wurde pStW102tc.re103 mittels biparentaler Konjugation via ET12567/pUZ8002 in *S. lividans* TK24 und *S. albus* J1074 eingebracht. Je drei Exkonjuganten wurden in den anschließenden Mutasyntheseversuchen weiterverwendet. Die Produktion von Tomaymycin oder Oxtomaymycin konnte nach der Deletion von *tomC* bis *tomG* nicht mehr beobachtet werden. Für die Fütterung wurde Anthranilsäure (**35**) und aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem Tomaymycin-A-Ring 2-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**36**), 2-Amino-

5-methoxybenzoesäure (**37**) und 2-Amino-4,5-dimethoxybenzoesäure (**38**) eingesetzt. 2-Amino-5-brombenzoesäure (**39**) wurde im Mutasynteseversuch aufgrund der guten massenspektrometrischen Nachweisbarkeit von Brom mit dem typischen  $M^+/M^{+2}$  Isotopenmuster gewählt. Die Fütterung erfolgte nach 24 h Kultivierungsdauer, Proben wurden nach 48 h, 72 h und 96 h genommen. Für jeden Exkonjuganten wurde parallel eine Kontrolle ohne Fütterung angesetzt.

In den HPLC-MS Chromatogrammen traten für keinen der angegebenen Zeitpunkte die Masse für Tomaymycin noch die erwarteten Massen für einen Einbau der Anthranilsäurederivate auf. Mögliche Metabolisierungen im finalen Produkt wie Oxidation an Position 11, (Di-) Hydroxylierung an den Positionen 7 und / oder 8, Methoxylierung an Position 7 oder Kombinationen der angegebenen Modifikationen wurden berücksichtigt. Eine Mutasyntese war mit den generierten Stämmen dementsprechend nicht möglich.



#### 4.2.3 Entfernung des Zeocin Resistenz-Gens *Sh ble* aus dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster auf pStW102tc.re103

Das vollständige Fehlen von Tomaymycin-Analoga in Fütterungsversuchen von unterschiedlichen *Streptomyces* Stämmen, welche das Plasmid pStW102tc.re103 trugen, war überraschend. Eine mögliche Erklärung ist die Integration von *Sh ble* antiparallel direkt hinter *tomB*. Die starke Aktivität des *Sh ble*-Promotors kann zu einer beständigen Transkription über das Ende von *Sh ble* führen und somit die Transkription von *tomB* unterbinden. Um diesen Hypothese zu überprüfen war es notwendig, *Sh ble* aus pStW102tc.re103 zu entfernen.

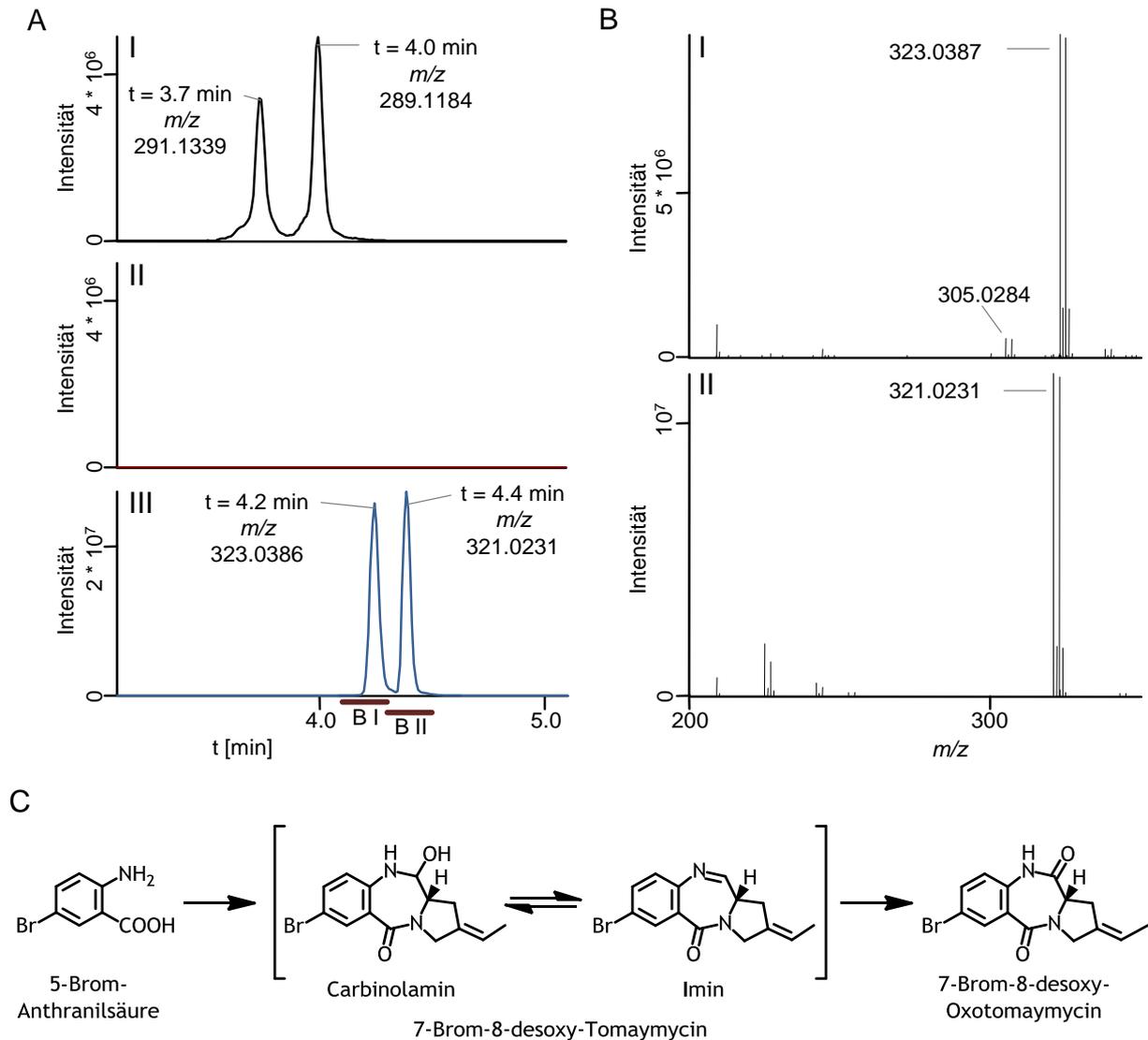
In der Planung des Primerpaars pr103 waren bereits die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *XmaI* integriert worden um spätere molekularbiologische Arbeiten zu ermöglichen. *Sh ble* wurde in einer *XbaI/XmaI*-Restriktion aus pStW102tc.re103 ausgeschnitten, der Restriktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das ca. 31 kb große Vektorfragment isoliert und aufgereinigt. Nach der

Zirkularisierung des Fragments durch Ligation wurde der Ansatz in *E. coli* HS996 transformiert. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tcΔC-G weiterverwendet.

### **4.2.4 Mutasynthese von Tomaymycin-Analoga in *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G**

Nach der Entfernung des Zeocin-Resistenzgens wurde der neu erhaltene Vektor pStW102tcΔCG via ET12567/pUZ8002 in *S. albus* J1074 eingebracht, um die Mutasynthese mittels des angepassten Genclusters zu testen. Wie bei pStW102tc.re130 konnte bei der heterologen Expression keine Tomaymycin- oder Oxotomaymycinproduktion beobachtet werden. Im Gegensatz zum Vorgängerkonstrukt wurde das gefütterten Mutasynton 5-Brom-Anthranilsäure sehr gut inkorporiert und das Carbinolamin, das Imin von 7-Brom-8-desoxy-Tomaymycin sowie 7-Brom-8-desoxy-Oxotomaymycin konnten in der HPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27). Die gemessenen Massen wichen weniger als 0.4 ppm von den theoretischen Massen ab und zeigten im Massenspektrum das für Brom typische  $[M + H]^+ / [M + 2 + H]^+$  - Muster, welches aus dem etwa gleichen Isotopenverhältnis von  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  resultiert. Mit der erfolgreichen Inkorporation des Mutasyntons 5-Brom-Anthranilsäure in ein Pyrrolbenzodiazepin konnte das grundlegende System für weitere Mutasynthese-Experimente etabliert werden.

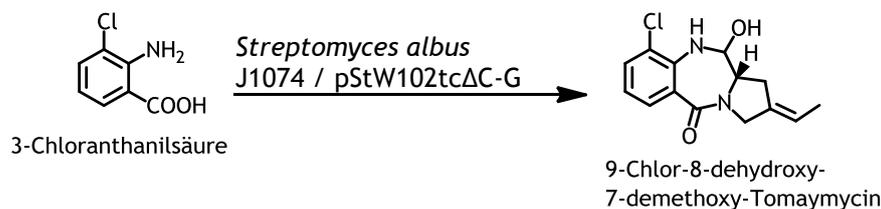
## 4 Ergebnisse



**Abbildung 27:** Vergleichende HPLC-MS-Analyse der heterologen Expression des Tomaymycin-Biosynthesegenclusters in *Streptomyces albus* J1074/pStW102tc, und des modifizierten Clusters mit der Deletion von *tomC* bis *tomG* in *S. albus* J1074/pStW102tcΔC-G, mit folgender Mutasyntese eines bromierten Tomaymycin-Analogons in *S. albus* J1074/pStW102tcΔC-G. **A)** HPLC-MS Chromatogramme für **I)** *Streptomyces albus* J1074/pStW102tc, BPC für die Massen von Tomaymycin und Oxotomaymycin ( $[M + H^+]$  291.1339 ± 5 ppm und  $[M + H^+]$  289.1183 ± 5 ppm); **II)** *S. albus* J1074/pStW102tcΔC-G ohne Fütterung, BPC wie I); **III)** *S. albus* J1074/pStW102tcΔC-G mit Fütterung von 5-Brom-Anthranilsäure, BPC für die Massen von 7-Brom-8-desoxy-Tomaymycin und 7-Brom-8-desoxy-Oxotomaymycin ( $[M + H^+]$  323.0390 ± 5 ppm und  $[M + H^+]$  321.0233 ± 5 ppm); **B)** Massenspektren aus dem Chromatogramm A III für den Zeitraum von **I)** 4.1 - 4.3 min und **II)** 4.3 - 4.5 min; **C)** Reaktionsschema der Mutasyntese von 7-Brom-8-desoxy-Tomaymycin und 7-Brom-8-desoxy-Oxotomaymycin aus 5-Brom-Anthranilsäure in *S. albus* J1074/pStW102tcΔC-G.

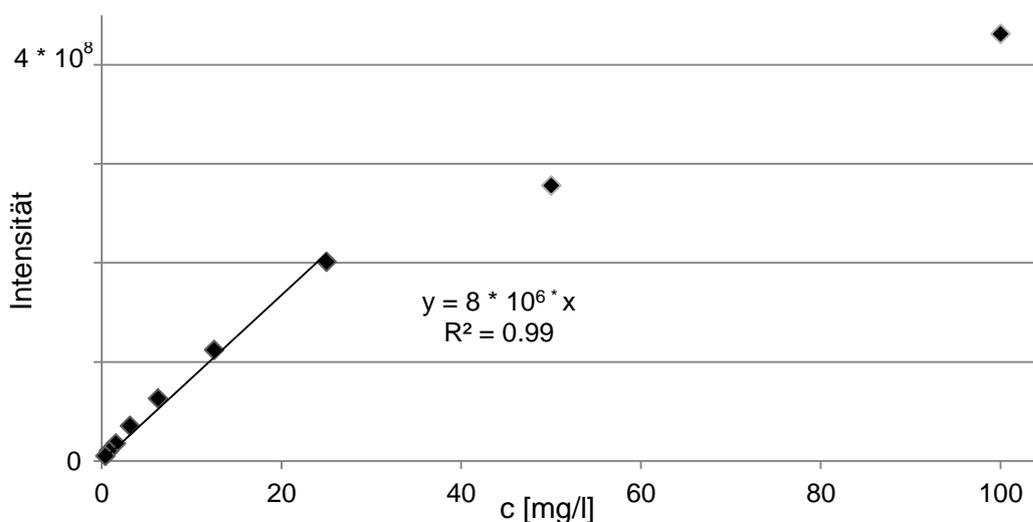
#### 4.2.5 Quantifizierung der Tomaymycinproduktion sowie erhaltener Tomaymycin-Analoga am Beispiel von 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin

Nach der Aufreinigung von 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin aus der 3-Chloranthanilsäure-Fütterung (siehe Abbildung 28) wurde die Substanz als Standard für die Quantifizierung des Produktionstiters in weiteren Fütterungsversuchen mit 3-Chlorantranilsäure genutzt.



**Abbildung 28:** Mutasyntese von 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin in *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G.

Die Kalibriergerade für 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin in der HPLC-MS-Analyse ergab einen linearen Messbereich von 0.39 bis 25.0 mg/l (siehe Abbildung 29). HPLC-MS Quantifizierungen für andere nativ wie mutasyntetisch gewonnen Pyrrolbenzodiazepine wurden analog ausgeführt.



**Abbildung 29:** HPLC-MS-Eichgerade für die Quantifizierung von 9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxy-Tomaymycin.

#### 4.2.6 Knock-out von *tomO* in pStW102tcΔC-G

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war die Steigerung der Tomaymycinproduktion. Neben allgemeinen Ansätzen wie dem Austesten verschiedener Medien, Kultivierungsbedingungen, Plasmide und Wirtsstämme bietet sich bei Tomaymycin die Untersuchung des Oxidationsvorgangs an. Tomaymycin wird im Verlauf der Kultivierung zu Oxotomaymycin umgesetzt, womit es seine DNA-alkylierende Wirkung verliert. Zusätzlich zum Verlust der Reaktivität erhöht Oxotomaymycin in erheblichem Maße den Aufwand bei der Aufreinigung von Tomaymycin.

Nach dem Transfer des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters konnte in allen eingesetzten *Streptomyces*-Stämmen (*S. lividans* TK24, *S. coelicolor* A3(2), *S. coelicolor* M512, *S. albus* J1074) die Oxidation beobachtet werden. Hierfür kam entweder ein allgemeiner *Streptomyces*-eigener Abbauweg in Frage oder ein auf dem Cluster codiertes Protein. Da Tomaymycin bereits in geringen Konzentrationen stark wachstumshemmend auf Streptomyceten wirkt und Tomaymycin über längere Zeiträume autooxidiert, gestaltete sich die Untersuchung bezüglich des Mechanismus schwierig.

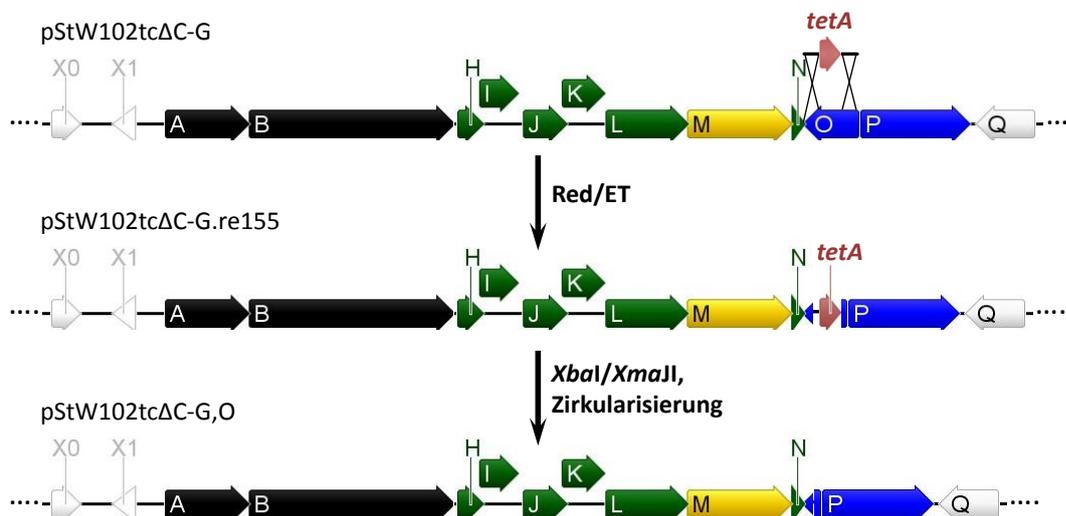
Mit den umfangreichen Knock-out Studien im Rahmen dieser Arbeit konnte für zahlreiche Gene innerhalb des Clusters ein Zusammenhang mit der Oxidation ausgeschlossen werden. Für die Deletion von *tomC* bis *tomG* konnte bei heterologen Mutasyntheseversuchen mit Anthranilsäurederivaten, für die Deletion von *tomH* und *tomI* bei heterologen Mutasyntheseversuchen mit Prolinderivaten die Umsetzung der Produkte zu den jeweiligen Oxiden klar beobachtet werden. Eine Deletion von *tomN* im Cluster zeigte keinen Einfluss auf die Produktion Tomaymycin und Oxotomaymycin.

Als mögliches Ziel für einen Knock-out kam *tomQ* in Frage, welches für eine Flavin-enthaltende Amin-Oxidase kodiert und dem keine klare Funktion in der Biosynthese zugeordnet werden kann. Eine Deletion von *tomQ* führte allerdings zum kompletten Verlust der Tomaymycin-Produktion. Die Deletion von *tomQ* wurde nicht weiter verfolgt.

*tomO* kodiert für ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu NADH-abhängige Flavin-Oxidoreduktasen. Li *et al.* vermuten dass TomO in der Tomaymycin-Biosynthese für die Hydroxylierung an Position 7 verantwortlich ist [133]. Eine experimentelle Bestätigung der Rolle von *tomO* stand jedoch aus.

Mittels des Primerpaars pr155, welches auch die für die Red/ET-Rekombination notwendigen Homologie-Sequenzen enthielt, wurde das Tetracyclin-Resistenzgen *tetA* am Vektor pACYC\_5364\_ko\_1 amplifiziert. Das Amplifikat wurde genutzt, um via Red/ET-Rekombination *tomO* größtenteils zu deletieren. Um die Expression von *tomP* nicht zu verändern, wurden von den insgesamt 1200 bp kodierender Sequenz von *tomO* 5'-seitig 14 bp erhalten. Um mögliche *read-through*-Effekte des weiterhin bestehenden Promotors zu vermeiden, wurden auf der 3'-Seite 49 kodierende bp erhalten.

Klone aus der Red/ET-klonierung wurden aus Apramycin und Tetracyclin selektiert und mittels Kontrollrestriktion verifiziert. Aus dem erhaltenen Plasmid pStW102tcΔC-G.re155 wurde mittels *XbaI/XmaI*-Restriktion das Tetracyclin-Resistenzgen *tetA* ausgeschnitten, der Restriktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das ca. 30 kb große Vektorfragment isoliert und aufgereinigt. Nach der Zirkularisierung des Fragments durch Ligation der kompatiblen Enden wurde der Ansatz in *E. coli* HS996 transformiert und auf Apramycin selektiert. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tcΔC-G,O weiterverwendet (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Klonierungsstrategie für die Deletion von *tomO* aus dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster. Zur Deletion von *tomO* wurde im ersten Schritt das Tetracyclin-Resistenzgen *tetA* via Red/ET inseriert und 1137 bp der 1200 codierenden bp entfernt. Im Zweiten Schritt wurde *tetA* über die im Red/ET Schritt eingebrachten Restriktionsschnittstellen *XbaI/XmaI* entfernt und das Plasmid anschließend religiert.

pStW102TCΔC-G,O wurde mittels biparentaler Konjugation via ET12567/pUZ8002 in *S. albus* J1074 eingebracht. Aus den erhaltenen Exkonjuganten wurden via Mutasynteseversuchen heterolog produzierende Klone ausgesucht und für anschließende Versuche weiterverwendet.

### 4.2.7 Auswirkung des *tomO* Knock-outs auf die Oxidation des Pyrrolobenzodiazepins zum Amid

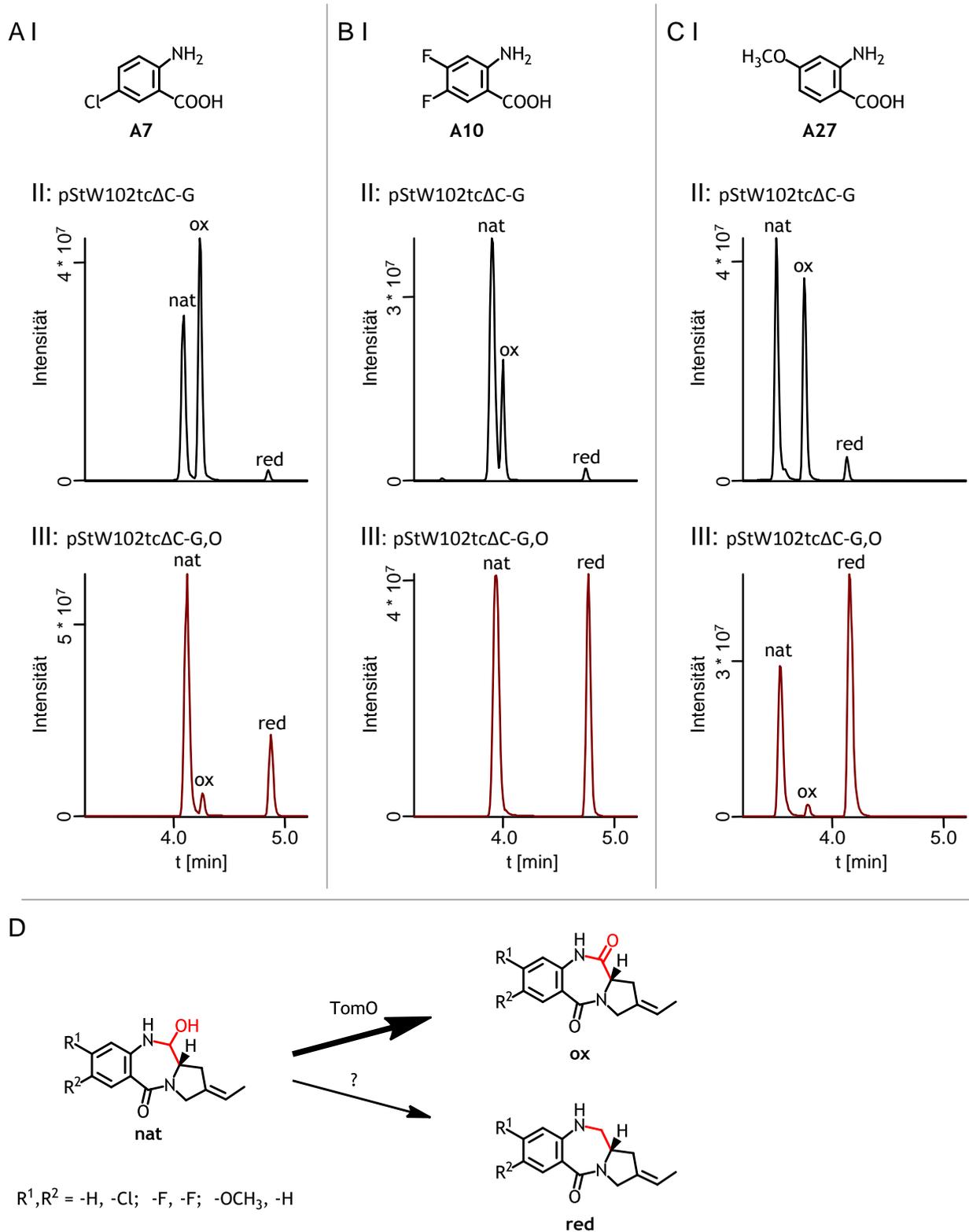
Ein maßgebliches Ziel dieser Arbeit war es, einen Tomaymycinproduzenten mit einer hohen Tomaymycinausbeute für die industrielle Nutzung zu etablieren. Deutliche Einbußen in der Tomaymycinausbeute entstehen aus der Verstoffwechslung von Tomaymycin zu Oxotomaymycin. Da die Oxidation von Tomaymycin auch nach dem Transfer des Biosynthese-Genclusters in andere Wirte auftritt, besteht die Möglichkeit, dass das Gen, welches die für entsprechende Oxidase codiert auf dem Vektor mit transferiert wurde. *tomC* bis *tomG*, *tomH*, *tomI* und *tomN* sind in Knock-out Versuchen bereits deletiert worden, das oxidierte Produkt wurde weiterhin gebildet. Als Gen mit putativ oxidativer Funktion lag *tomO* vor.

Die Deletion von *tomO* aus dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster verminderte den Anteil an Oxotomaymycin erheblich. Während bei Mutasynteseversuchen mit dem heterologen Produzenten *S. albus* J1074 / pStW102TCΔC-G im Verlauf der Kultivierung das Mutasynteseprodukt noch zum Amid oxidiert, tritt bei *S. albus* J1074 / pStW102TCΔC-G,O als heterologem Produzenten das Amid nur noch in sehr geringen Mengen auf.

Überraschenderweise tritt zusätzlich zum bisher beschriebenen Carbinolamin und dem Amid eine weitere Masse auf, die um 16 u unter dem Carbinolamin liegt. Strukturaufklärung via NMR zeigte, dass es sich bei dieser Masse um die reduzierte Form, das Amin handelt. Die Verhältnisse der gebildeten Mutasynteseprodukte nach Zufütterung von Chloranthranilsäure, 4,5-Difluoranthranilsäure und 4-Methoxyanthranilsäure sind in Abbildung 31 dargestellt.

Die biologische Aktivität der Pyrrolobenzodiazepine beruht auf der DNA -Alkylierung und der damit verbundenen Hemmung von Transkriptionsfaktoren und -vorgängen. Mit der Umsetzung zum Amin geht das reaktive Zentrum des Pyrrobenzodiazepins verloren.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 31:** HPLC-MS analytischer Vergleich der Mutasynthese-Produkte der Fütterung unterschiedlicher Mutasynthone **A**) 5-Chloranthranilsäure (**A7**); **B**) 4,5-Difluoroanthranilsäure (**A10**); **C**) 4-Methoxyanthranilsäure (**A27**) in **II**) *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G und **III**) *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G,O. Die Chromatogramme zeigen jeweils das kombinierte EIC für das native Pyrrolobenzodiazepin (nat), das Oxidationsprodukt (ox) und das Reduktionsprodukt (red). **D**) Umsetzung von heterolog produzierten nativem Pyrrolobenzodiazepin via Oxidation oder Reduktion in *Streptomyces albus* J1074/pStW102tcΔC-G.

Der verbleibende geringe Anteil an Oxotomaymycin basiert wahrscheinlich auf einer Autoxidation von Tomaymycin, welche unter Einfluss von Luftsauerstoff abläuft (siehe Abbildung 32).

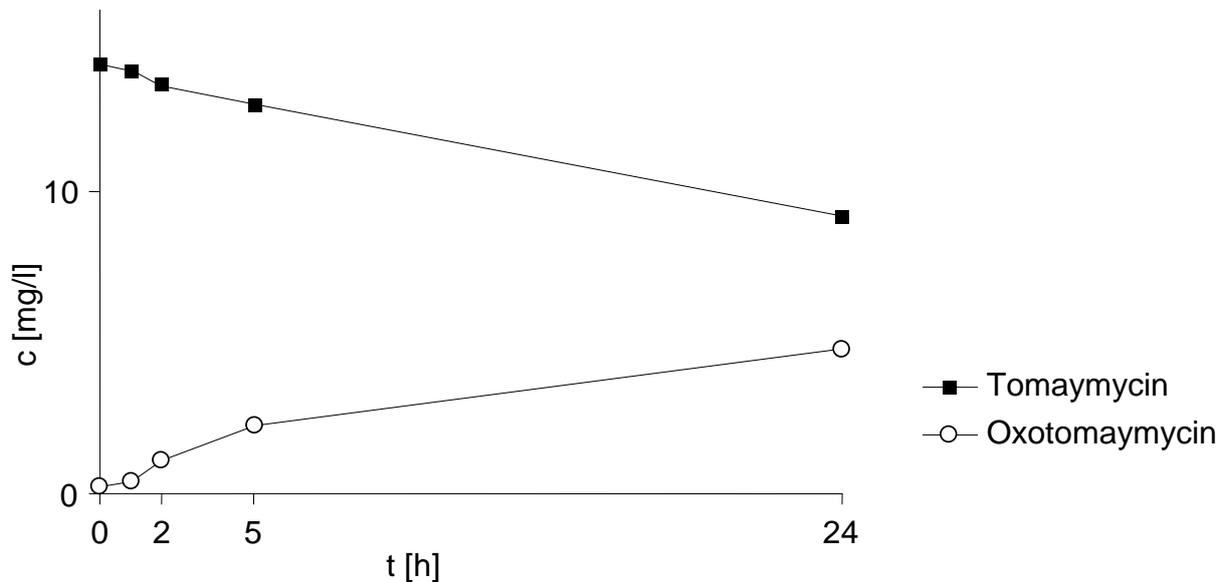
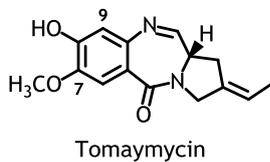


Abbildung 32: Autoxidation von Tomaymycin in deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur.

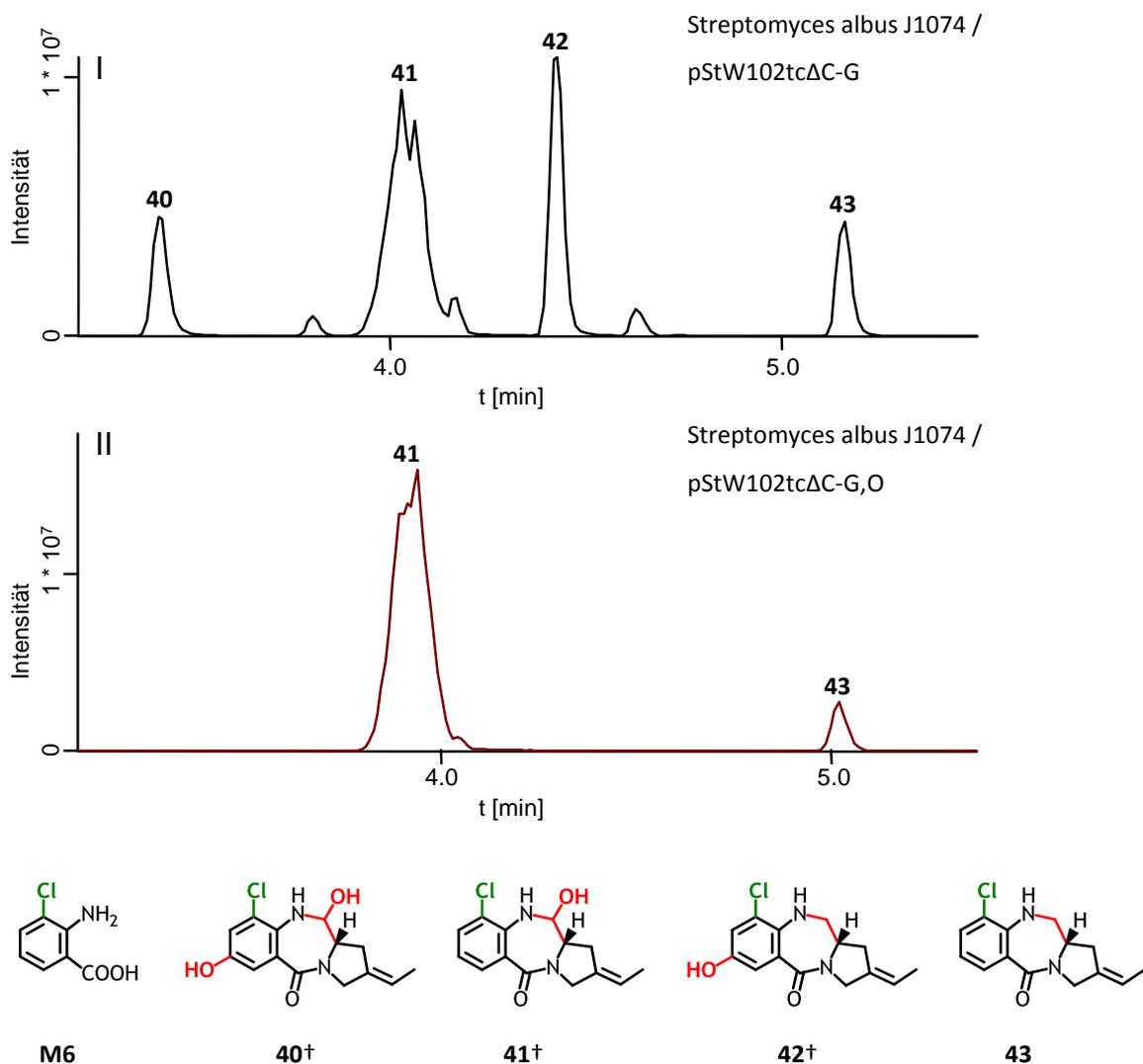
#### 4.2.8 Auswirkung des *tomO* Knock-outs auf die Hydroxylierung des Pyrrolobenzodiazepines an Position 7



Die von Li *et al.* [133] postulierte Funktion für TomO ist die Hydroxylierung von Tomaymycin an Position 7. Diese Hydroxylierung der in der Mutasyntese hergestellten PBD kann für Produkte aus *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G, z.B. bei der Fütterung von 3-Chloranthranilsäure (**M6**) für die Produkte **40** und **42** mittels NMR nachgewiesen werden. In Kultivierungen des *tomO* Knock-outs *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G,O können die an Position 7

## 4 Ergebnisse

hydroxylierten PBD nicht mehr via HPLC-MS nachgewiesen werden, während die nicht hydroxylierten PBD weiterhin auftreten. Bei der Fütterung von 3-Chloranthranilsäure (**M6**) treten die Produkte **40** und **42** nicht mehr auf, während die auch vorher gebildeten, nicht hydroxylierten Produkte **41** und **43** weiterhin im Kulturüberstand vorhanden sind. Die HPLC-MS-Analyse vergleichender Mutasynthese-Versuche ist in Abbildung 33 dargestellt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass TomO für die Hydroxylierung von Tomaymycin an Position 7 essentiell ist.

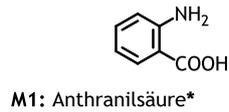


**Abbildung 33:** HPLC-MS analytischer Vergleich der Mutasynthese-Produkte der Fütterung von 3-Chloranthranilsäure (**M6**) zu **I)** *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G und **II)** *Streptomyces albus* J1074 / pStW102tcΔC-G,O. Die Chromatogramme zeigen jeweils das kombinierte EIC für [**40** + H<sup>+</sup>], [**41** + H<sup>+</sup>], [**42** + H<sup>+</sup>], [**43** + H<sup>+</sup>]. Die mit †) markierten Strukturen wurden via NMR verifiziert.

### **4.2.9 Mutasynthese von Tomaymycinanaloga mit unterschiedlich substituiertem A-Ring**

Die A-Domänen der NRPS erkennen das Substrat der Biosynthesereaktion und aktivieren es durch die Ausbildung eines Substrat-Adenylat-Aminoacylestere. Durch diese Selektion wird bestimmt, welches Substratspektrum in der Biosynthesereaktion akzeptiert wird [102]. Um die Substrat-Toleranz von TomA im Tomaymycin-NRPS-System gegenüber unterschiedlich modifizierten Anthranilsäuren näher zu charakterisieren, wurde ein breites Spektrum an verfügbaren Derivaten in Mutasyntheseversuchen mit *S. albus* J1074/ pStW102tc $\Delta$ C-G,O eingesetzt (siehe Abbildung 34). Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC-MS analysiert. Im Massenspektrum vorhandene Peaks wurden mit der Nullkontrolle, welcher nur DMSO zugesetzt wurde, abgeglichen, um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können.

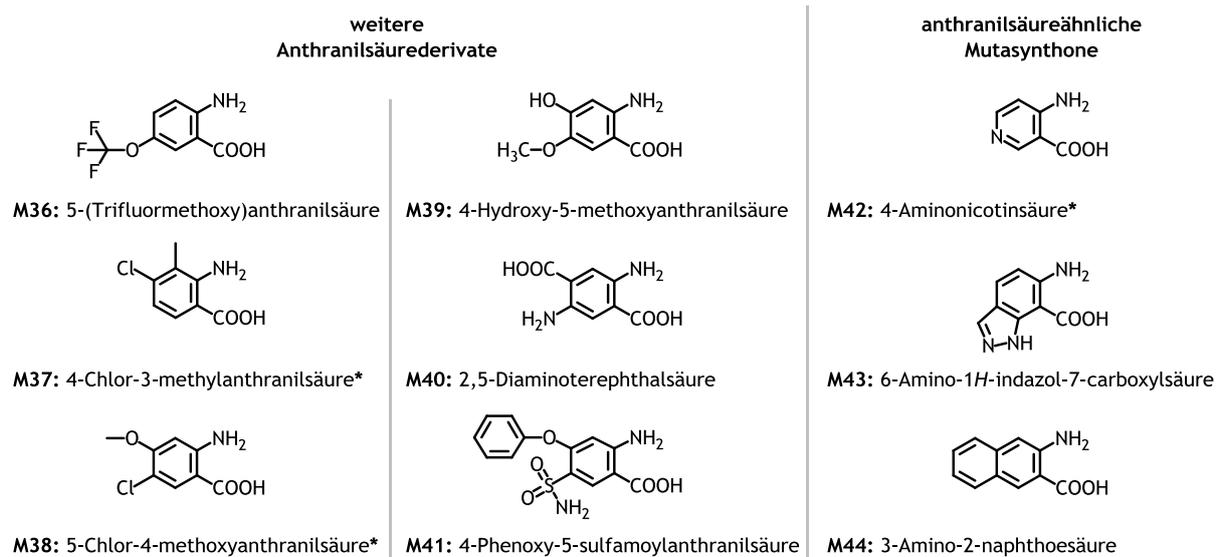
## 4 Ergebnisse



Fluorderivate	Chlorderivate	Bromderivate	Iodderivate
<p><b>M2: 3-Fluoranthranilsäure*</b></p>	<p><b>M6: 3-Chloranthranilsäure*</b></p>	<p><b>M11: 3-Bromanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M16: 5-Iodanthranilsäure</b></p>
<p><b>M3: 5-Fluoranthranilsäure*</b></p>	<p><b>M7: 4-Chloranthranilsäure*</b></p>	<p><b>M12: 4-Bromanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M17: 3,5-Diiodanthranilsäure</b></p>
<p><b>M5: 4,5-Difluoranthranilsäure*</b></p>	<p><b>M10: 4,6-Dichloranthranilsäure</b></p>	<p><b>M15: 3,5-Dibromanthranilsäure</b></p>	
hydroxylierte Anthranilsäuren	methoxylierte Anthranilsäuren	alkylierte Anthranilsäuren	trifluor-methylierte Anthranilsäuren
<p><b>M18: 4-Hydroxyanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M20: 3-Methoxyanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M28: 3-Methylanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M32: 3-(Trifluormethyl)-anthranilsäure*</b></p>
<p><b>M19: 5-Hydroxyanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M21: 4-Methoxyanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M29: 4-Methylanthranilsäure*</b></p>	<p><b>M33: 4-(Trifluormethyl)-anthranilsäure*</b></p>
	<p><b>M24: 3,5-Dimethoxyanthranilsäure</b></p>	<p><b>M30: 3,4-Dimethylanthranilsäure*</b></p>	<hr/> <p style="text-align: center;"><b>aminierte Anthranilsäuren</b></p> <p><b>M34: 3-Aminoanthranilsäure*</b></p>
	<p><b>M25: 4,5-Dimethoxyanthranilsäure</b></p>	<p><b>M31: 5-tert-Butylanthranilsäure</b></p>	<p><b>M35: 4-Aminoanthranilsäure*</b></p>
	<p><b>M26: 4,6-Dimethoxyanthranilsäure</b></p>		
	<p><b>M27: 3,4,5-Trimethoxyanthranilsäure</b></p>		

**Abbildung 34 (Teil I):** In Mutasynteseversuchen mit *Streptomyces albus* J1074/pStW102tcΔC-G,O eingesetzte Anthranilsäurederivate, für Anthranilsäurederivate die mit \*) gekennzeichnet sind konnte in der HPLC-MS-Analyse die Masse eines entsprechenden Pyrrolbenzodiazepines nachgewiesen werden

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 34 (Teil II)**

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse der Mutasynteseversuche. Die Analyse zeigt, dass 24 der 44 eingesetzten, unterschiedlich derivatisierten Anthranilsäuren zu einem PBD prozessiert wurden. Die angegebene Peakfläche vermittelt einen Eindruck der Größenordnung des Umsatzes des jeweiligen Edukts. Zusätzlich zur Masse der jeweiligen Carbinolamine ist auch gezeigt, ob das entsprechende Amid und Amin gebildet wurde.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4 (Teil I):** Auswertung der HPLC-MS-Analyse der Mutasynthese von Tomaymycinanaloga in *Streptomyces albus* J1074/pStW102tcΔC-G,O.

Edukt	Produkt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse <i>m/z</i>	gemessene Masse <i>m/z</i>	Δ ppm
<b>M1: Anthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.3	1.1E+08	245.1285	245.1283	0.8
	Amid	3.5	7.5E+06	243.1128	243.1128	0.2
	Amin	3.9	2.6E+08	229.1335	229.1333	1.0
<b>Fluorderivate</b>						
<b>M2: 3-Fluoranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.6	1.3E+08	263.1190	263.1189	0.6
	Amid	3.6	2.0E+06	261.1034	261.1035	0.3
	Amin	4.5	2.2E+08	247.1241	247.1239	0.2
<b>M3: 5-Fluoranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.6	1.6E+08	263.1190	263.1188	0.8
	Amid	3.7	5.8E+06	261.1034	261.1035	0.3
	Amin	4.2	3.1E+08	247.1241	247.1239	0.9
<b>M4: 6-Fluoranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.2	7.4E+07	263.1190	263.1189	0.6
	Amid	3.5	8.2E+05	261.1034	261.1034	0.2
	Amin	3.9	1.2E+08	247.1241	247.1240	0.4
<b>M5: 4,5-Difluoranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.9	1.6E+08	281.1096	281.1094	0.9
	Amid	4.0	2.6E+06	279.0940	279.0941	0.6
	Amin	4.8	1.1E+08	265.1147	265.1145	0.7

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4 (Teil II)**

Edukt	Produkt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse m/z	gemessene Masse m/z	Δ ppm
<b>Chlorderivate</b>						
<b>M6: 3-Chloranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.9	1.0E+08	279.0895	279.0895	0.0
	Amid	4.0	2.1E+06	277.0738	277.0740	0.1
	Amin	5.0	7.9E+06	263.0946	263.0946	0.0
<b>M7: 4-Chloranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.1	2.0E+08	279.0895	279.0889	2.1
	Amid	4.2	7.1E+06	277.0738	277.0739	0.4
	Amin	4.9	2.9E+08	263.0946	263.0943	0.9
<b>M8: 5-Chloranthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.1	1.6E+08	279.0895	279.0888	0.7
	Amid	4.3	7.1E+06	277.0738	277.0736	0.2
	Amin	4.9	3.7E+07	263.0946	263.0943	0.3
<b>M9: 6-Chloranthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M10: 4,6-Dichloranthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>Bromderivate</b>						
<b>M11: 3-Bromanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.0	1.3E+08	323.0390	323.0388	0.5
	Amid	4.2	2.8E+06	321.0233	321.0235	0.7
	Amin	5.2	5.8E+06	307.0441	307.0441	0.2
<b>M12: 4-Bromanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.2	1.2E+08	323.0390	323.0388	0.6
	Amid	4.3	6.8E+06	321.0233	321.0234	0.2
	Amin	5.1	1.3E+08	307.0441	307.0438	0.7
<b>M13: 5-Bromanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.3	8.8E+07	323.0390	323.0388	0.6
	Amid	4.4	6.2E+06	321.0233	321.0235	0.5
	Amin	5.0	3.9E+07	307.0441	307.0440	0.1
<b>M14: 6-Bromanthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M15: 3,5-Dibromanthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4 (Teil III)**

Edukt	Produkt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse m/z	gemessene Masse m/z	$\Delta$ ppm
<b>Iodderivate</b>						
<b>M16:</b> 5-Iodanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>M17:</b> 3,5-Diiodanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>Hydroxylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M18:</b> 4-Hydroxyanthranilsäure						
	Carbinolamin	2.9	3.9E+07	261.1234	261.1232	0.1
	Amid	3.2	4.6E+06	259.1077	259.1077	0.0
	Amin	3.4	7.2E+07	245.1285	245.1283	0.2
<b>M19:</b> 5-Hydroxyanthranilsäure						
	Carbinolamin	2.8	3.2E+07	261.1234	261.1233	0.3
	Amid	3.1	3.0E+06	259.1077	259.1077	0.0
	Amin	3.3	3.5E+07	245.1285	245.1283	0.6
<b>methoxylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M20:</b> 3-Methoxyanthranilsäure						
	Carbinolamin	3.6	2.9E+08	275.1390	275.1388	0.2
	Amid	3.8	2.0E+07	273.1234	273.1233	0.0
	Amin	4.5	2.6E+08	259.1441	259.1439	0.2
<b>M21:</b> 4-Methoxyanthranilsäure						
	Carbinolamin	3.5	1.6E+08	275.1390	275.1388	0.2
	Amid	3.8	1.1E+07	273.1234	273.1234	0.0
	Amin	4.2	2.6E+08	259.1441	259.1439	0.2
<b>M22:</b> 5-Methoxyanthranilsäure						
	Carbinolamin	3.5	1.7E+07	275.1390	275.1390	0.2
	Amid	3.8	2.1E+06	273.1234	273.1235	0.3
	Amin	3.5	5.4E+07	259.1441	259.1440	0.4
<b>M23:</b> 6-Methoxyanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>M24:</b> 3,5-Dimethoxyanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>M25:</b> 4,5-Dimethoxyanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>M26:</b> 4,6-Dimethoxyanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			
<b>M27:</b> 3,4,5-Trimethoxyanthranilsäure			kein Produkt detektierbar			

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 4 (Teil IV)**

Edukt	Produkt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse m/z	gemessene Masse m/z	Δ ppm
<b>alkylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M28: 3-Methylantranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.7	3.2E+07	259.1441	259.1440	0.1
	Amid	3.9	2.9E+06	257.1285	257.1285	0.1
	Amin	4.5	9.1E+07	243.1492	243.1490	0.2
<b>M29: 4-Methylantranilsäure</b>						
	Carbinolamin	3.8	7.8E+07	259.1441	259.1440	0.1
	Amid	3.9	7.3E+06	257.1285	257.1285	0.1
	Amin	4.4	5.6E+08	243.1492	243.1489	0.3
<b>M30: 3,4-Dimethylantranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.2	1.3E+07	273.1598	273.1598	0.1
	Amid	4.3	2.7E+06	271.1441	271.1442	0.1
	Amin	4.8	1.9E+08	257.1648	257.1646	0.2
<b>M31: 5-tert-Butylantranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>Trifluormethylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M32: 3-(Trifluormethyl)anthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.4	5.9E+08	313.1158	313.1154	1.5
	Amid	4.5	1.6E+06	311.1002	311.1003	0.4
	Amin	5.4	1.4E+06	297.1209	297.1209	0.2
<b>M33: 4-(Trifluormethyl)anthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.1	2.8E+08	313.1158	313.1156	0.9
	Amid	4.7	7.2E+06	311.1002	311.1003	0.3
	Amin	5.4	2.8E+07	297.1209	297.1209	0.0

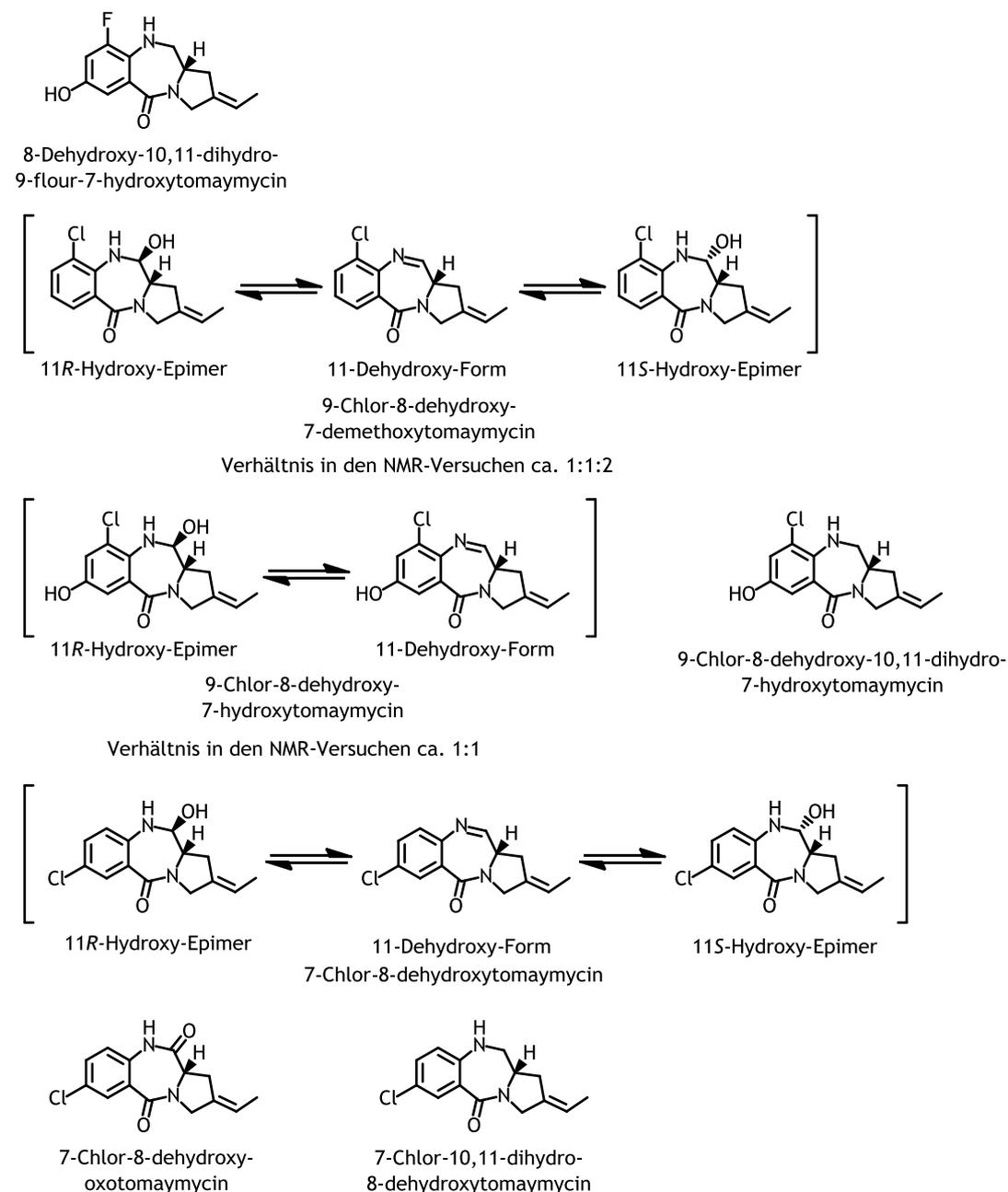
## 4 Ergebnisse

Tabelle 4 (Teil V)

Edukt	Produkt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse <i>m/z</i>	gemessene Masse <i>m/z</i>	$\Delta$ ppm
<b>Aminierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M34: 3-Aminoanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	-	-	-	-	-
	Amid	-	-	-	-	-
	Amin	2.9	5.3E+06	244.1444	244.1445	0.1
<b>M35: 4-Aminoanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	2.5	5.6E+06	260.1394	260.1394	0.1
	Amid	3.0	2.2E+06	258.1237	258.1237	0.1
	Amin	2.8	7.6E+07	244.1444	244.1443	0.7
<b>weitere Anthranilsäurederivate</b>						
<b>M36: 5-(Trifluormethoxy)anthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M37: 4-Chlor-3-methylantranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.5	9.4E+07	293.1051	293.1049	0.7
	Amid	4.6	1.6E+06	291.0895	291.0897	0.7
	Amin	5.4	1.8E+08	277.1102	277.1103	0.2
<b>M38: 5-Chlor-4-methoxyanthranilsäure</b>						
	Carbinolamin	4.2	6.4E+07	309.1001	309.1000	0.0
	Amid	4.4	5.1E+06	307.0844	307.0845	0.1
	Amin	4.8	1.1E+08	293.1051	293.1050	0.2
<b>M39: 4-Hydroxy-5-methoxyanthranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M40: 2,5-Diaminoterephthalsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M41: 4-Phenoxy-5-sulfamoylantranilsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>andere Mutasyntnone</b>						
<b>M42: 4-Aminonicotinsäure</b>						
	Carbinolamin	1.3	2.5E+07	246.1237	246.1237	0.0
	Amid	-	-	-	-	-
	Amin	-	-	-	-	-
<b>M43: 6-Amino-1H-indazol-7-carboxylsäure</b>			kein Produkt detektierbar			
<b>M44: 3-Amino-2-naphthoesäure</b>			kein Produkt detektierbar			

## 4.2.10 NMR-Strukturanalyse von Tomaymycinanaloga

Die Strukturanalysen der über Mutasyntese dargestellten Pyrrolobenzodiazepine mittels 2D-NMR-Spektroskopie wurden von Dr. Kirsten Harmrolfs durchgeführt. Die aufgereinigten Proben wurden in DMSO-*d*<sub>6</sub> oder MeCN-*d*<sub>4</sub> (Details siehe Anhang) gelöst. Die anschließenden Messungen und Auswertungen der <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H-COSY- und <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-HMBC-Experimente führte zur Aufklärung der in Abbildung 35 dargestellten Strukturen. Die detaillierten Ergebnisse der Messungen sind im Anhang dargestellt.

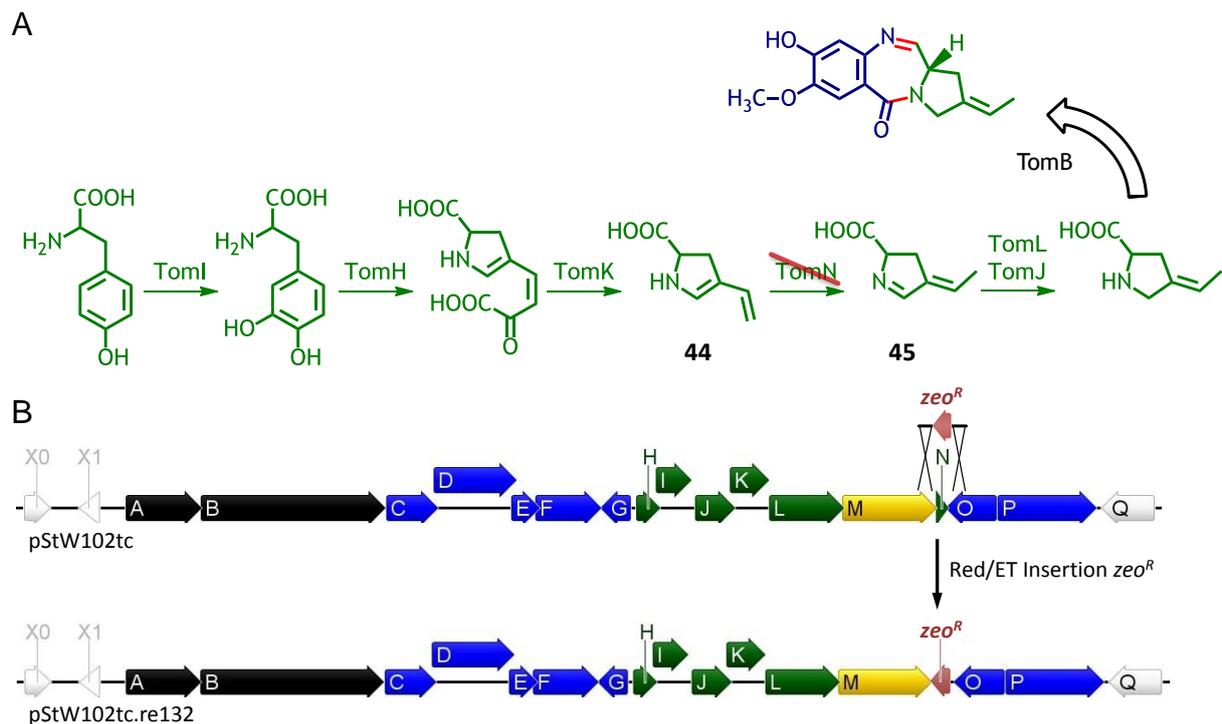


**Abbildung 35:** Strukturen von mutasynthetisch gewonnen Tomaymycinanaloga die mittels NMR aufgeklärt wurden.

## 4.3 Mutasynthese Tomaymycin C-Ring

### 4.3.1 Erstellung des *tomN* Knock-outs

Um den C-Ring des Tomaymycin in einer Mutasynthese auszutauschen, war es notwendig den Biosyntheseweg des nativen Prolinderivates zu unterbrechen. Die putativen Gene des C-Ring-Biosyntheseweges liegen in zwei Gruppen vor. Zum einen *tomH* bis *tomL*, zum anderen das einzelne Gen *tomN* (siehe Abbildung 36).



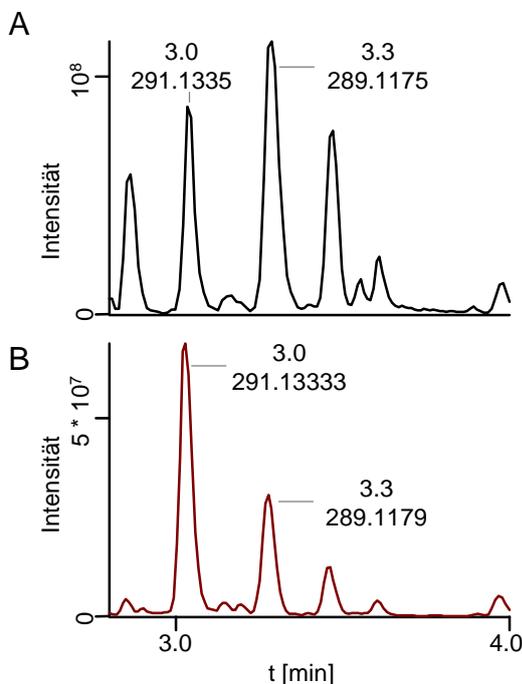
**Abbildung 36:** Eingriff in die Tomaymycin-Biosynthese um die Mutasynthese neuer Tomaymycin Analoga zu ermöglichen; **A)** möglicher Biosyntheseweg des Tomaymycin C-Rings [133], durch Deletionen fehlende Proteine sind rot ausgestrichen; **B)** Tomaymycin-Biosynthese Gencluster im Vektor pStW102tc, die Deletion von *tomN* durch die Insertion des Zeocin-Resistenzgens mittels Red/ET ergibt den Vektor pStW102tc.re132

Da der größere Block mit fünf Genen direkt vom potentiellen Resistenz-Gen *tomM* gefolgt wird, welches möglicherweise mit einem gemeinsamen Promotor in einem Operon mit den vorangehenden Genen organisiert ist, wurde die potentielle Oxalocrotoate-Tautomerase *tomN* als Ziel des Knock-outs ausgewählt. Hierfür wurde das Ampicillin Resistenz-Gen *bla* vom Plasmid pStW39 mit dem Primerpaar pr132 amplifiziert, welches auch die für die Red/ET-Rekombination notwendigen Homologie-Sequenzen enthielt. Die Red/ET Rekombination wurde in GB2005-Zellen

durchgeführt. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tc.re132 weiterverwendet.

#### 4.3.2 Testexpression von pStW102tc.re132 in *Streptomyces lividans* TK24 und *Streptomyces albus* J1074

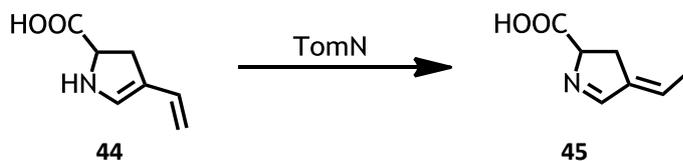
Um die Unterbrechung der Tomaymycin-Biosynthese zu verifizieren, wurden zuerst Testkulturen ohne Fütterung von Prolinderivaten aufgesetzt. Hierfür wurde pStW102tc.re132 über biparentale Konjugation mit *E. coli* ET12567/pUZ8002 als Donor in die Stämme *Streptomyces lividans* TK24 und *Streptomyces albus* J1074 eingebracht. Von den erhaltenen Exkonjuganten wurden Produktionskulturen wie beschrieben angesetzt. Überraschenderweise wurde Tomaymycin in den erhaltenen Stämmen normal produziert (Abbildung 37). Da die Tomaymycin Biosynthese weiterhin abläuft, waren die erzeugten Stämme nicht für die Mutasyntese geeignet, das gefütterte Mutasython hätte, wie beim nativen Produzenten, die biosynthetisierten Bausteine nicht verdrängen können.



**Abbildung 37:** Vergleichende HPLC-MS Analyse der Kultivierung von **A)** *Streptomyces lividans* TK24/pStW102tc und **B)** *Streptomyces lividans* TK24/pStW102tc $\Delta$ N; in den gezeigten BPC sind die Peaks von Tomaymycin (theoretische Masse  $[M + H]^+$  291.1339) und Oxotomaymycin (theoretische Masse  $[M + H]^+$  289.1183) mit ihren Retentionszeiten und jeweils mittleren gemessenen Massen gekennzeichnet.

### 4.3.3 Erstellung des *tomH*, *tomI* Knock-outs im Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster durch Insertion des Tetracyclin Resistenz-Gens *tetA* via Red/ET

Die trotz des Knock-outs von *tomN* unverändert fortlaufende Produktion von Tomaymycin in *S. albus* J1074/pStW102tc.re132 und *S. lividans* TK24/pStW102tc.re132 weist auf eine mögliche äquivalente Funktionalität in den Wirtsstämmen oder eine spontane Umlagerung der Zwischenstufe **44** zur Zwischenstufe **45** hin (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Funktion von TomN nach Li *et al.* [133].

Um den C-Ring für Mutasyntesen zugänglich zu machen, war es notwendig die Biosynthese des Prolinderivats an einer anderen Stelle zu unterbrechen. Als Ziel wurden die Gene *tomH* und *tomI* ausgewählt, da sie den Schritt vom Tyrosin zum ersten Prolinderivat und damit den Einstieg in die Biosynthese des C-Rings katalysieren.

Das potentielle Operon, von *tomH* bis *tomN* beinhaltet auch das putative Resistenzgen *tomM*. Da eine Unterbrechung der Transkription somit möglicherweise einen Verlust der Eigenresistenz zur Folge gehabt hätte, sollten die Gene *tomH* und *tomI* nur teilweise deletiert werden. Mit dem Primerpaar pr156 wurde das Tetracyclin Resistenz-Gen vom Primer pACYC\_5364\_ko\_1 amplifiziert und das aufgereinigte Amplifikat in der Red/ET Klonierung in GB2005/pStW102tc-Zellen eingesetzt. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tc.re156 weiterverwendet. *tetA* wurde anschließend im isolierten Plasmid in einer *Xma*II/*Xba*I-Restriktion entfernt, das linearierte Produkt aufgereinigt, religiert und in *E. coli* HS996 transformiert. Erhaltene Plasmide wurden mittels Kontrollrestriktionen überprüft und das verifizierte Plasmid unter der Bezeichnung pStW102tcΔHI weiterverwendet. In pStW102tcΔHI lag ein stark trunkiertes Fusionsprodukt von 21 bp von *tomH* ab Startcodon, sechs bp der ligierten Sequenz von *Xma*II/*Xba*I und 21 bp vom *tomI* bis zum Stopcodon vor.

Bei diesem Konstrukt war eine Funktionalität der Enzyme nicht mehr zu erwarten, der verbleibende Teil des Operon sollte aber unbeeinträchtigt geblieben sein.

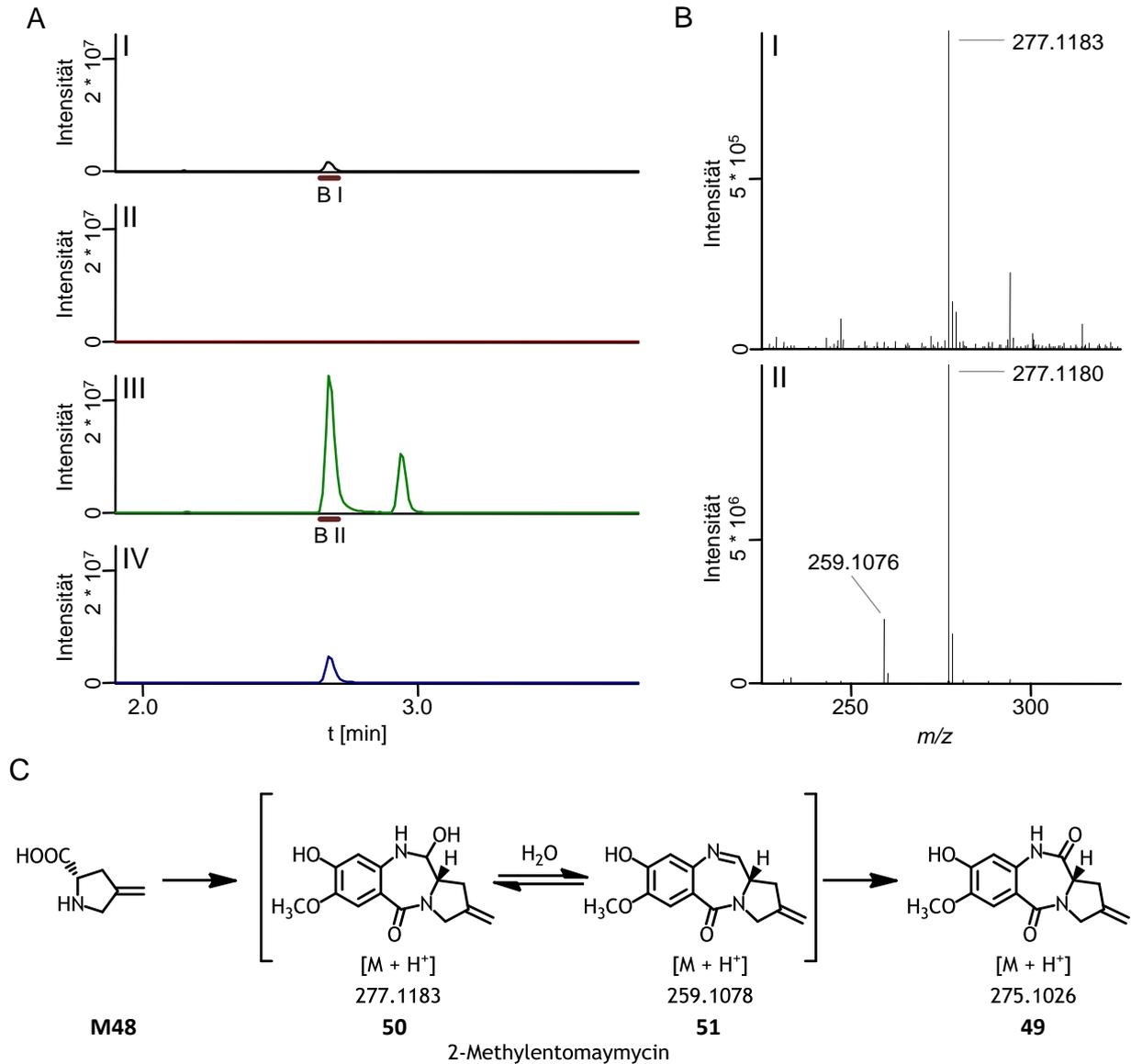
### 4.3.4 Expression von pStW102tcΔHI in *Streptomyces lividans* TK24

Die heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters mit der Deletion der Gene *tomH* und *tomI* in *Streptomyces lividans* TK24 zeigte keine Tomaymycin- oder Oxotomaymycinproduktion. Die Substitution des nativen C-Rings des Tomaymycins durch ein artifizielles Prolinderivat in einem Mutasynteseansatz mit *Streptomyces lividans* TK24/pStW102tcΔHI konnte für (2S,4S)-4-Methylprolin (**M47**) und (S)-4-Methylenprolin (**M48**) gezeigt werden. In der HPLC-MS Analyse des Überstands der Produktionskultur tritt bei der Fütterung mit (2S,4S)-4-Methylprolin die Masse des erwarteten Pyrrolobenzodiazepins (S)-2-Methyltomaymycin (**46**) zusammen mit der Masse des bei Wasserverlust entstehenden Imins (**47**) auf. Die Masse des oxidierten PBDs, des Amids (**48**) ist klar nachweisbar. Es tritt in der Negativkontrolle zwar eine identische Masse von 277 u auf, die Retentionszeiten differieren allerdings klar, das heißt es handelt sich dabei um eine nativ gebildete andere Substanz. Die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse sind in Abbildung 39 dargestellt.



## 4 Ergebnisse

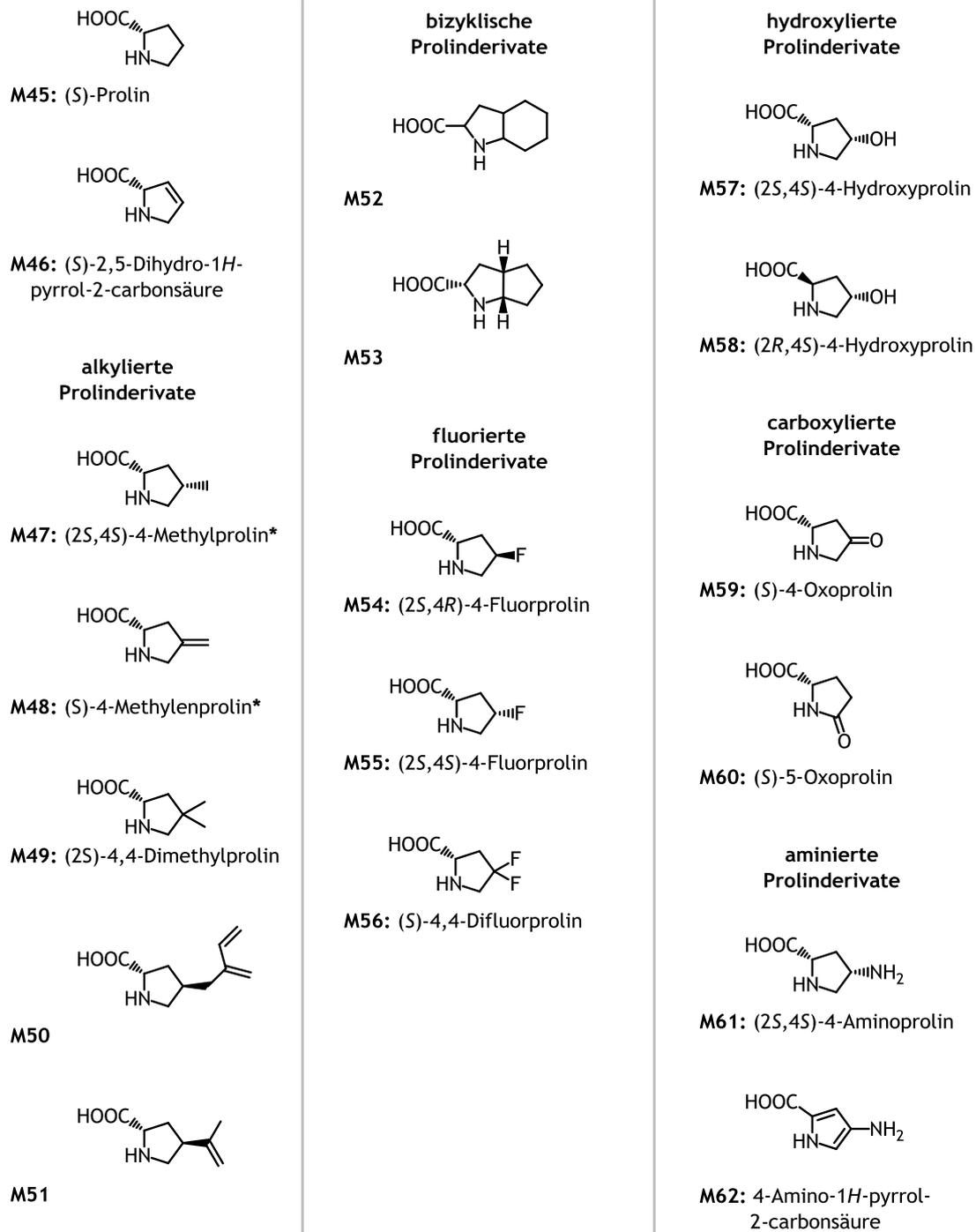
2-Methylentomaymycin, welche nur in der gefütterten Kultur, nicht aber in der Negativkontrolle auftritt. Die detaillierten Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse sind in Abbildung 40 dargestellt.



**Abbildung 40:** HPLC-MS Analyse der Mutasyntese von 2-Methylentomaymycin mittels Fütterung von (S)-4-Methylenprolin (**M48**) in *Streptomyces lividans* TK24/pStW102tcΔHI. **A I)** BPC der Massen von 2-Methylentomaymycin (**50**) und 2-Methyloxotomaymycin (**49**) der ausschließlich mit DMSO gefütterten Negativkontrolle **II)** BPC der Masse des 2-Methylentomaymycin-Imins (**51**) in der ausschließlich mit DMSO gefütterten Negativkontrolle; **III)** BPC der Massen von 2-Methylentomaymycin und 2-Methyloxotomaymycin im Mutasynteseansatz mit 4S-Methylprolin; **IV)** BPC der Massen der Imin-Form von 2-Methylentomaymycin (**51**); **B)** Massenspektrum für das Mutasyntetsierte 2-Methyltomaymycin im Zeitraum t = 2.7 min bis 2.8 min aus A II für **I)** die Negativkontrolle und **II)** die mit (S)-4-Methylprolin gefütterte Kultur; **C)** Reaktionsschema der Mutasyntese von 2-Methyltomaymycin und der Umsetzung zu 2-Methyloxotomaymycin.

Im Gegensatz zur Mutasyntese mit Anthranilsäurederivaten wurde bei den Prolinderivaten nur ein geringer Teil der eingesetzten Mutasyntase akzeptiert. Nur für die zwei bereits beschriebenen einfachen Prolinderivate konnte ein Einbau nachgewiesen werden. Während die Monosubstitution mit einer Methyl- oder Methylengruppe an Position 2 des Prolins noch inkorporiert wird, wird das dimethylierte Prolin bereits nicht mehr in nachweisbaren Mengen umgesetzt. Auch größere Reste, Fluorierungen, eine Hydroxyl-, Amin- oder Ketogruppe an Position 2 führen dazu, dass das entsprechende PBD nicht gebildet wird. Der Wegfall der Substitution an Position 2 führt ebenso dazu, dass kein Einbau stattfindet. Die getesteten Prolinderivate sind in Abbildung 41 dargestellt.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 41:** In Mutasyntheseversuchen mit *Streptomyces lividans* TK24/pStW102tcΔHI eingesetzte Prolinderivate. Für gekennzeichnete Verbindungen (\*) konnte im Überstand der Mutasynthesekultur in der HPLC-MS-Analyse die Masse eines entsprechenden Pyrrolobenzodiazepins detektiert werden.

## 4.4 Heterologe Expression der NRPS TomA und TomB

### 4.4.1 Zielsetzung und Strategie

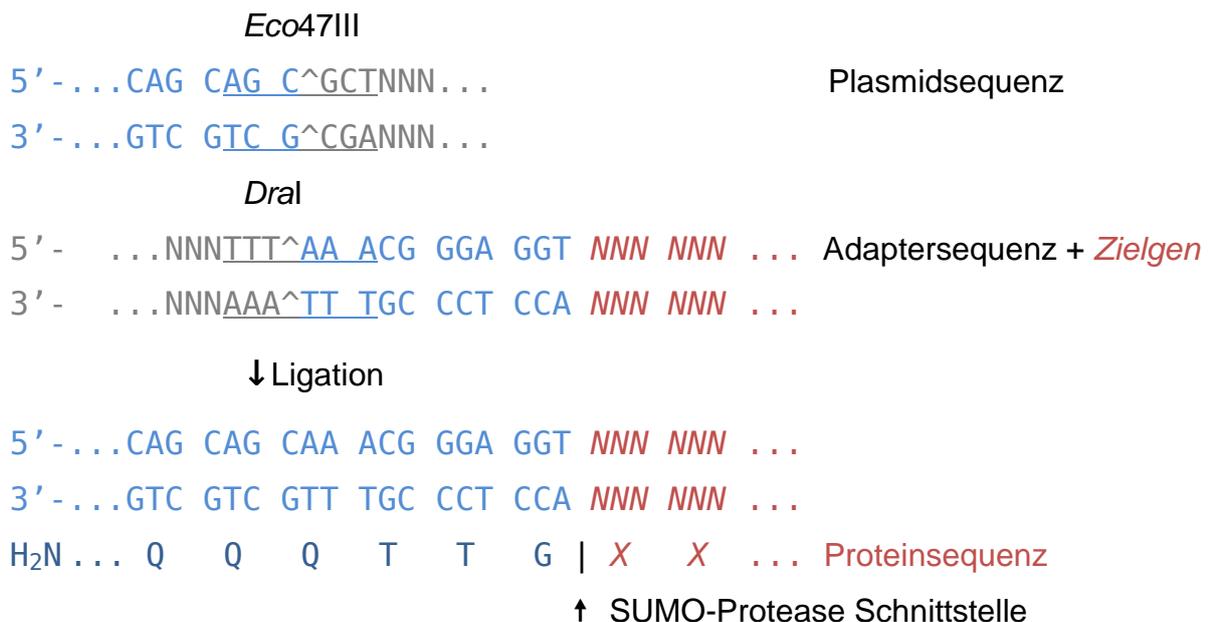
Um die Assemblierung eines Pyrrolobenzodiazepins durch die NRPS TomA und TomB isoliert studieren zu können, wurde eine Expressions- und Aufreinigungs- und Assaystrategie aufgesetzt, welche eine *in vitro*-Reaktion ermöglichen sollte. Für die Durchführung des *in vitro*-Assay musste eine Reihe von Anforderungen an die vorherige Protein-Expression und Aufreinigung erfüllt werden. Der gewählte Stamm muss eine ausreichend hohe Menge Protein exprimieren. Das Protein muss dabei richtig gefaltet werden und löslich bleiben und sollte nicht in *inclusion bodies* ausfallen.

Zusammen mit den NRPS muss eine Phosphopantetheinyl-Transferase koexprimiert werden, welche die NRPS durch den Transfer eines Phosphopantetheinyl-Restes auf ein spezifisches Serin aktiviert. Zur Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie muss ein geeigneter Tag an den NRPS vorhanden sein, welcher idealerweise während der Aufreinigung möglichst komplett entfernt werden kann um ausschließen zu können, dass dieser Tag die Aktivität der Enzyme stört.

### 4.4.2 Konstruktion des Expressionsvektors pStW42

Die Auswahl an Proteasen, die in der Proteinaufreinigung einsetzbar sind und es ermöglichen, einen in der Affinitätschromatographie eingesetzten Tag vom exprimierten Protein spezifisch abzutrennen, ohne dass ein Rest der Zielsequenz der Schnittstelle verbleibt, ist sehr begrenzt. Die Wahl für die Expression von TomA und TomB fiel auf die SUMO-Protease [134]. Im Gegensatz zu anderen Proteasen erkennt sie das Zielprotein nicht, wie zum Beispiel die TEV-Protease [135], an einem linearen „Epitop“ sondern an der tertiär-Struktur des Ziels, dem SUMO-Protein. Der folgende Schnitt erfolgt C-Terminal und trennt das N-terminale SUMO-Protein vom Fusionspartner, ohne dass weitere Reste verbleiben. Was das SUMO-Protein speziell für die Klonierung von *Streptomyces*-Proteinen interessant macht, ist die C-terminale Sequenz QQQTGG. Sie ermöglicht es, die Klonierungsstrategie aufseiten

des Zielgens 5'-seitig auf dem Restriktionsenzym *DraI* oder einem Isoschizomer aufzubauen. Aufgrund des allgemein hohen GC-Gehalts in Streptomyceten-Genomen tritt die Erkennungssequenz von *DraI* 5' -TTTAAA-3' kaum auf. 5'-seitig müssen an die Sequenz des Zielproteins als Adaptersequenz die Restriktionsschnittstelle und die Basen 5' -CGGGAGGT-3' hinzugefügt werden um das SUMO-Gen zu komplettieren. Aufseiten des SUMO-Gens kann für die 3' seitige Restriktion *Eco47III* oder eines seiner Isoschizomere genutzt werden. Die Ligation der beiden stumpfen Enden führt dann zur Ausbildung des vollständigen SUMO-Gens mit direkt angehängtem Zielgen; die Schnittstelle im Protein liegt zwischen letzter Aminosäure von SUMO und erster Aminosäure des Zielgens (siehe Abbildung 42). Auf der 3'-Seite des trunkierten SUMO-Gens wurde im Plasmid eine vielseitig einsetzbare MCS mit den Schnittstellen *BspTI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PacI*, *SalI*, *SpeI*, *XbaI*, *XhoI* eingeplant.



**Abbildung 42:** Klonierungs- und Expressionsstrategie der Expressionsplasmide pStW39n und pStW42. Die Nutzung der Schnittstellen *Eco47III* aufseiten des Expressionsplasmids und *DraI* aufseiten des zu exprimierenden Proteins ermöglicht die Platzierung der verwendeten Restriktionsschnittstellen im SUMO3-Tag. Die Klonierungsstrategie wird damit für alle Zielproteine stark vereinheitlicht und im Verlauf der Klonierung müssen auf DNA-Ebene keine neuen Basen für Restriktionsschnittstellen eingefügt werden, welche in der Folge das Zielprotein verändern.

Als Basis für den Expressionsvektor diente pGEX-6-P1. In einer SOE-PCR wurde im ersten Schritt das SUMO3-Protein von pSUMO3\_ck4 mittels des Primerpaars pr039Y\_pStW39+SUMO\_ins / pr039Z\_pStW39+SUMO\_outs amplifiziert. Im Basisvektor pGEX-6-P1 sollte die GST-codierende Sequenz gegen SUMO3 ausgetauscht werden, es lag jedoch keine geeignete Schnittstelle zwischen Promotor und codierender Sequenz vor. Um die stromaufwärts der GST-Sequenz liegende *Eco81I*-Schnittstelle nutzen zu können wurde mit dem Primerpaar pr039A2\_pStW39\_pGEX\_outs / pr039B\_pStW39\_pGEX\_ins eine 0.5 kb lange, unveränderte Extendersequenz von pGEX-6-P1 amplifiziert, die am *Eco81I* fernen Ende eine 28 bp lange Sequenz enthielt, die ein Annealing mit dem pr039Y\_pStW39+SUMO\_ins / pr039Z\_pStW39+SUMO\_outs-Amplifikat sicherstellte. Im zweiten Schritt der SOE-PCR wurden die Amplifikate mittels der terminalen Primer pr039A2\_pStW39\_pGEX\_outs / pr039Z\_pStW39+SUMO\_outs zusammengefügt. Das Amplifikat konnte, wie der Vektor, mit *Eco81I* / *Bam*HI geschnitten werden und das aufgereinigte Vektorrückgrat mit dem SUMO3-Insert ligiert werden. Der erhaltene Vektor wurde als pStW39n weitergeführt.

Vom Vorgängervektor pGEX-6-P1 hat pStW39n das Ampicillin-Resistenzgen *bla* übernommen. Ein Nachteil des Resistenzmechanismus der verwendeten  $\beta$ -Lactamase für die Verwendung im Labor, ist die Abgabe des Proteins an das Außenmedium. Die daraus folgende Hydrolyse des Antibiotikums im Medium führt auf Kulturplatten zu sogenannten Satellitenkolonien, Kolonien von nicht resistenten Zellen, die aufgrund des Antibiotikaabbaus um die resistenten Zellen anwachsen können. Auch im Flüssigmedium können nicht resistente Zellen wachsen, wenn das Antibiotikum weit genug abgebaut ist. Um diese Problematik zu umgehen wurde *bla* durch das Neomycin-Resistenzgen *aph* ersetzt. Hierfür wurde mit dem Primerpaar pr042f\_kan / pr042r\_kan eine 1 kb lange Sequenz mit *aph* vom Plasmid pCRII-TOPO amplifiziert und über die Restriktion mittels *Aat*II / *Dra*I gegen die Ampicillin-Resistenz ausgetauscht. Nach der Ligation wurde der Vektor in *E. coli* HS996 transformiert und die monoklonalen DNA-Isolate via Restriktionsverdau verifiziert. Der erhaltene Vektor wurde unter der Bezeichnung pStW42 weiterverwendet (siehe Abbildung 43).

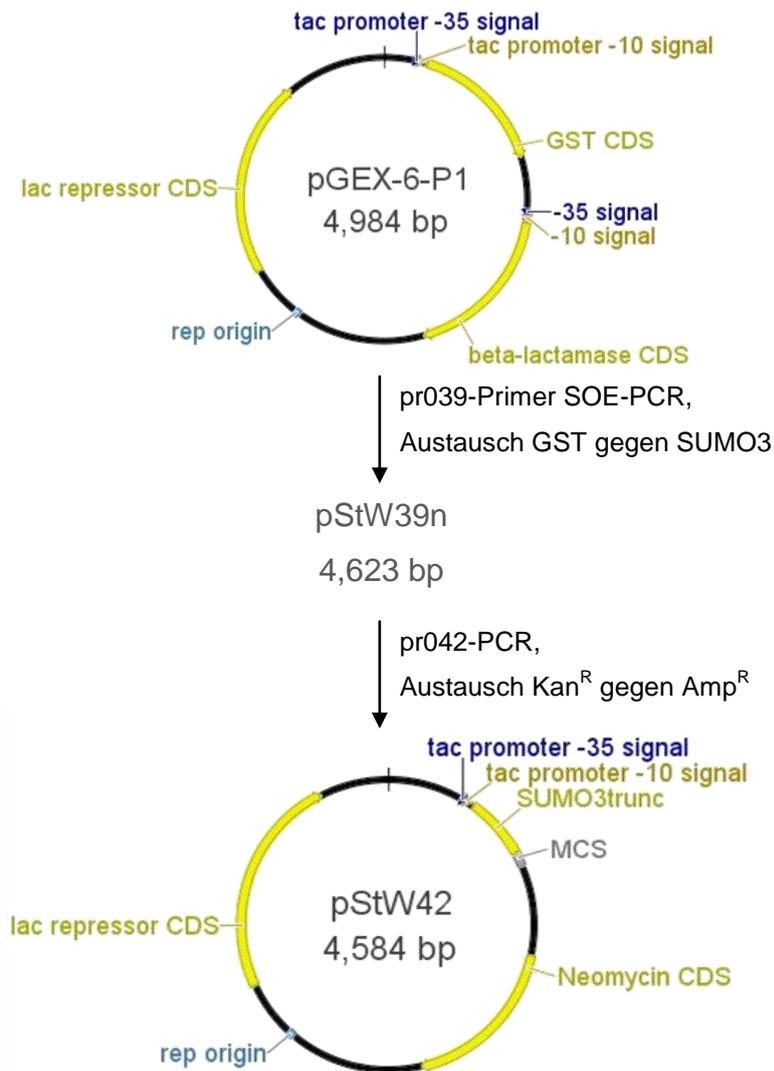


Abbildung 43: Erstellung des Expressionsvektors pStW42.

#### 4.4.3 Erstellung der Expressionsvektoren pStW42tomA und pStW42tomB

Zur Erstellung des Konstruktionsvektors pStW42tomA wurden das Gene *tomA* von genomischer DNA aus *Streptomyces spec.* FH6421 mit dem Primerpaar pr008f2\_tomA-pStW39 / STTM008r amplifiziert. Das Insert wurde mittels *DraI* / *EcoRI*, das Plasmid pStW42 mittels *Eco47III* / *EcoRI* geschnitten. Nach der Ligation wurde der Vektor in *E. coli* HS996 transformiert und die monoklonalen DNA-Isolate via Restriktionsverdau verifiziert. Der erhaltene Vektor wurde unter der Bezeichnung pStW42tomA weiterverwendet.

Das Vorgehen für *tomB* war analog; als Primerpaar wurde pr009f2\_tomB-pStW39 /

STTM009r2 verwendet, das erhaltene Plasmid wurde unter der Bezeichnung pStW42tomB weiterverwendet.

#### 4.4.4 Expressionsstrategie

Um den Anteil korrekt gefalteten, löslichen Proteins in der Expression zu erhöhen, wurden drei maßgebliche Faktoren der Expression angepasst. Als erster Punkt wurde der SUMO3-Tag gewählt, welcher neben der hoch präzisen, hoch spezifischen Entfernung durch die SUMO-Protease die Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöht [134], [136], [137]. Als zweiter Faktor wurden Kombinationen kooperierender Chaperone koexprimiert, um die native korrekte Faltung der exprimierten Proteine zu beschleunigen und damit das Ausfallen in inclusion bodies zu vermindern [138]–[140]. Das getestete System ist in Tabelle 5 gezeigt.

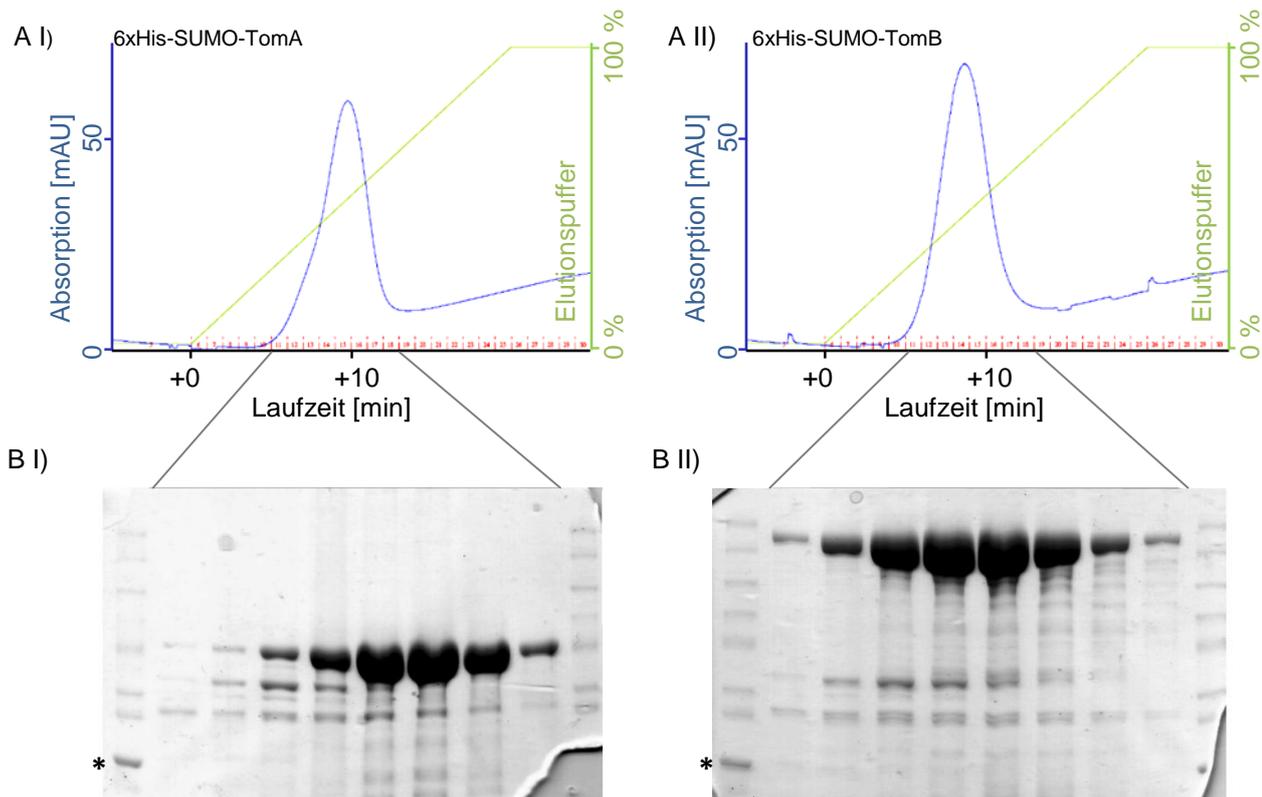
**Tabelle 5:** Chaperone Plasmid Set (verändert nach TaKaRa, Cat. # 3340, v201405).

Plasmid	Chaperone	Promoter	Inducer	Resistant Marker
pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB</i> <i>Pzt1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm
pGro7	groES-groEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	Cm
pTf16	tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm

In einer Testexpression wurden die fünf Plasmide nach Herstellerangaben in *E. coli* BL21(DE3)/pStW42tomA/pSUMtaA und *E. coli* BL21(DE3)/pStW42tomB/ pSUMtaA getestet und das Lysat per SDS-PAGE aufgetrennt. Auf dem Gel traten bei beiden Proteinen die stärksten Proteinbanden innerhalb der löslichen Fraktion für die Koexpression mit groES-groEL mittels pGro7 auf. Die Identität der Proteinbanden wurde mittel MALDI-MS verifiziert. pGro7 wurde für alle späteren Chaperonin-Koexpressionen eingesetzt.

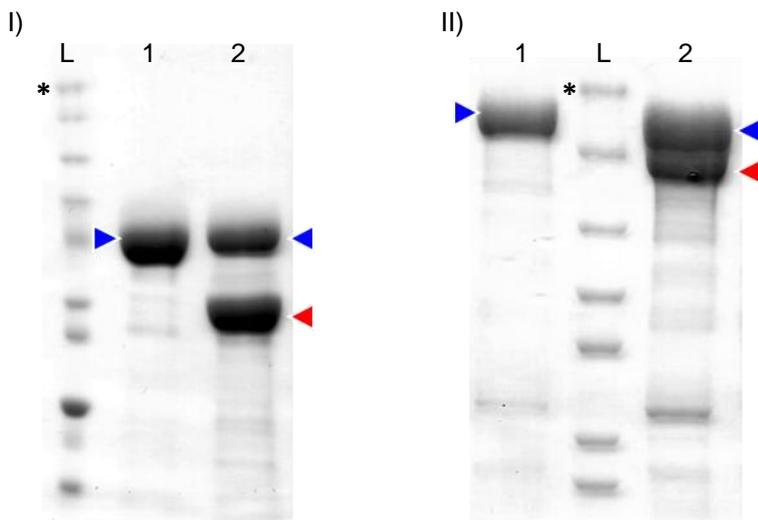
#### 4.4.5 Aufreinigungsstrategie

Die Aufreinigungsstrategie sah drei Schritte bis zum Erreichen des reinen Proteins vor. Der N-ständige 6xHis-tag am SUMO3-Fusionspartner von TomA und TomB wurde für die Aufreinigung über eine Ni-Sepharose-Säule genutzt. Hierbei konnten die Zielproteine vom größten Anteil des allgemeinen Zellproteins abgetrennt werden. Im Eluat nach dem ersten Aufreinigungsschritt bildeten die Zielproteine SUMO3-TomA und SUMO3-TomB bereits jeweils den stärksten Protein-Anteil innerhalb der erhaltenen Fraktionen (siehe Abbildung 44). Jeweils fünf Fraktionen, welche die stärksten Proteinbanden im Gel zeigten wurden vereinigt und weiter verwendet. Die Konzentration in den erhaltenen Proteinlösungen wurde mittels Bradford bestimmt; die Ausbeute lag für SUMO3-TomA und SUMO3-TomB über 10 mg/l.



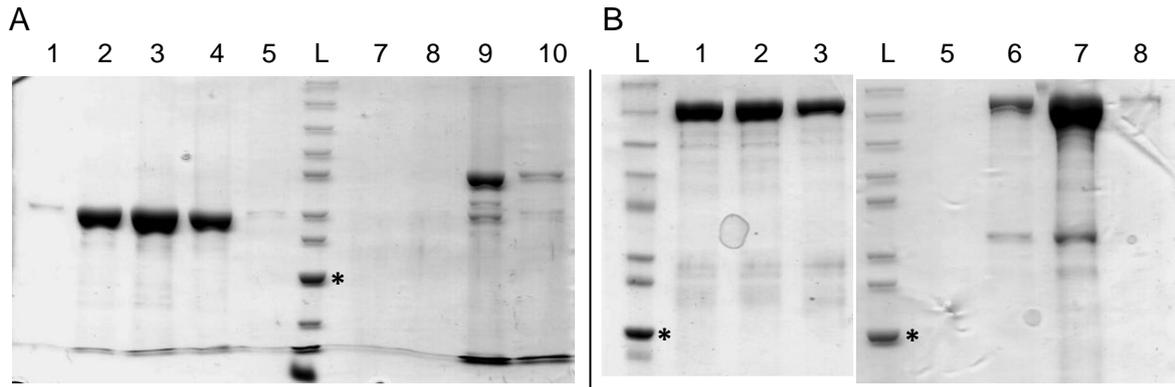
**Abbildung 44:** Ni-IMAC basierte Aufreinigung von 6xHis-SUMO-TomA und 6xHis-SUMO-TomB. **A)** Chromatogramm der Auftrennung mit Absorptionsmessung bei 280 nm (blau) und Anteil des Elutionspuffers (grün) **I)** 6xHis-SUMO-TomA; **II)** 6xHis-SUMO-TomB; **B)** SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen, die Lage der Fraktionen ist durch graue Linien zum Chromatogramm dargestellt, die äußeren Spuren zeigen den Größenstandard; **I)** 6xHis-SUMO-TomA; **II)** 6xHis-SUMO-TomB; (Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder: 200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50\*; [...])

Im zweiten Schritt der Aufreinigung wurde die erhaltene Proteinlösung umgepuffert und die Proteine mit SUMO-Protease verdaut. Um eine Denaturierung des Proteins bei höheren Temperaturen zu verhindern erfolgte die Spaltung bei 4 °C über 16 h. Nach der Reaktionszeit wurde der Verdau mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 45). Der Verdau war nach den angegebenen 16 h bei der eingesetzten Konzentration an SUMO-Protease nur teilweise erfolgt. Aufgrund der hohen Ausbeute in der Proteinexpression war ein Verlust eines Teils des exprimierten Proteins in diesem Schritt jedoch unproblematisch.



**Abbildung 45:** SDS-PAGE des SUMO-Protease-Verdau der Fusionsproteine **I)** 6xHis-SUMO-TomA und **II)** 6xHis-SUMO-TomB, 1 Kontrolle ohne Restriktionsenzym, 2 Verdau, L: Größenstandard (Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder: 200\*; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; [...]); das unverdaute Fusions-Protein ist mit einem blauen Pfeil, das verdaute Fragment ohne 6xHis-SUMO-Tag mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Der dritte Schritt der Aufreinigung erfolgte wieder mittels Ni-Sepharose-Affinitätschromatographie. Im Gegensatz zum ersten Schritt jedoch mit „umgedrehten Vorzeichen“. Da mit der Abspaltung von SUMO3 auch der 6-His-Tag vom Zielprotein entfernt worden war, passierten die Zielproteine die Säule ohne zu binden, während ungeschnittene Proteine auf der Säule zurückgehalten wurden. Zusätzlich wurde auch der größte Teil des im ersten Laufs nicht spezifisch an die Ni-Sepharose gebunden Proteins erneut gebunden und ebenso zurückgehalten. Damit wurde im Durchlauf eine Fraktion von TomA bzw. TomB mit sehr hohem Reinheitsgrad erhalten (siehe Abbildung 46).



**Abbildung 46:** SDS-PAGE-Chromatographie des Durchlaufs der SUMO-Protease geschnittenen Proteine. **A)** Spuren 1-5: Durchlauf der Ni-Sepharose Säule, entspricht geschnittenem TomA (65 kDa), Spuren 7-10: Eluat bei hoher Imidazol-Konzentration, entspricht ungeschnittenem sowie unspezifisch gebundenem Protein. **B)** Linkes Gel, Spuren 1-3: Durchlauf der Ni-Sepharose Säule, entspricht geschnittenem TomB (167 kDa), Rechtes Gel, Spuren 5-8: Eluat bei hoher Imidazol-Konzentration, entspricht ungeschnittenem sowie unspezifisch gebundenem Protein. L: Größenstandard (Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder: 200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50\*; [...])

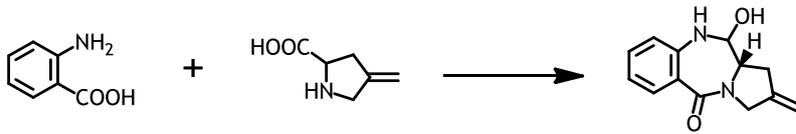
Die erhaltenen Fraktionen für die geschnittenen, gereinigten Proteine wurden auf Proteinpuffer umgepuffert und bis zur weiteren Nutzung im *in vitro*-Assay auf +4 °C gelagert.

#### 4.4.6 *In vitro* Assay zur Pyrrolobenzodiazepin-Assemblierung mittels TomA und TomB

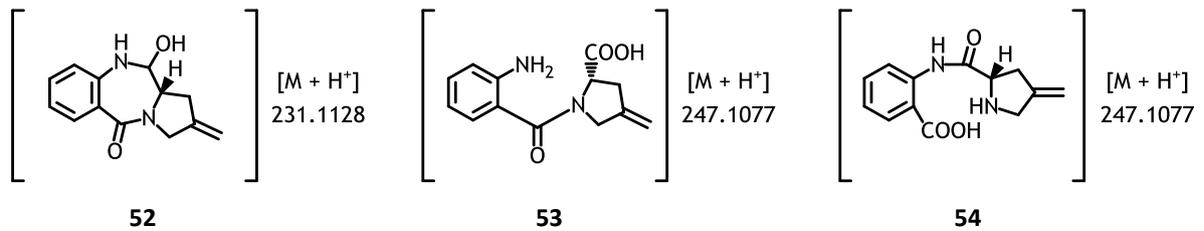
Zunächst sollte die Funktionalität der aufgereinigten Proteine TomA und TomB *in vitro* verifiziert werden. Im *in vitro*-Assay wurden beide Proteine zusammengeführt. Unter Zugabe von ATP als Energieträger für den Schritt der Adenylierung, NAD(P)H als Elektronendonator und den Edukten Anthranilsäure und 4-Methylenprolin wurde die Pyrrolobenzodiazepin-Synthese gestartet. In der HPLC-MS Analyse zeigten sich statt des erwarteten Peaks von 231 u für das PBD zwei Peaks mit einer Masse von 247 u und ein Peak von 201 u. Die Peaks mit der Masse von 247 u entsprachen mit einer Abweichung < 0.4 ppm der Masse des Dimers aus Anthranilsäure und 4-Methylenprolin. Die Masse des Pyrrolobenzodiazepines konnte in der Analyse gefunden werden, lag in ihrer Intensität aber zwei Größenordnungen unter den Massen des Dipeptids (siehe Abbildung 47).

## 4 Ergebnisse

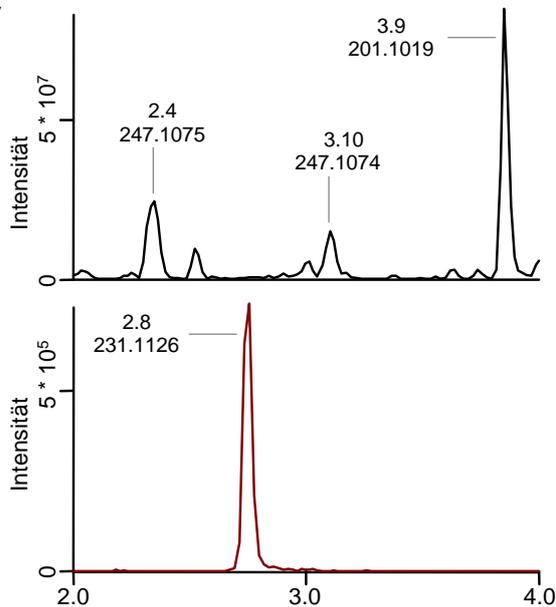
A



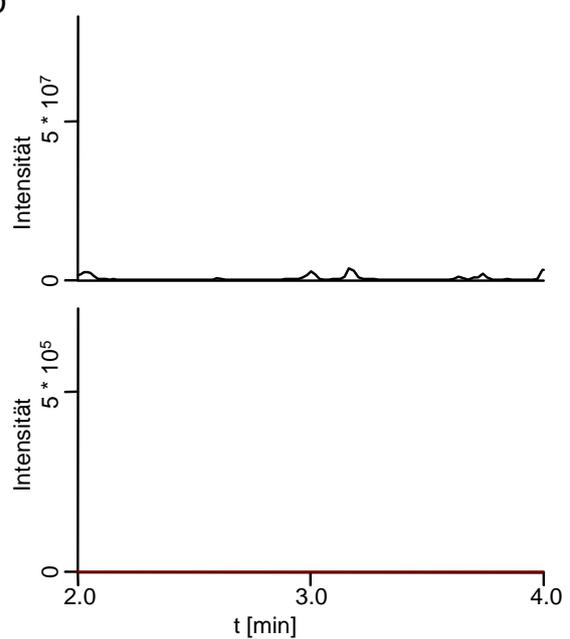
B



C



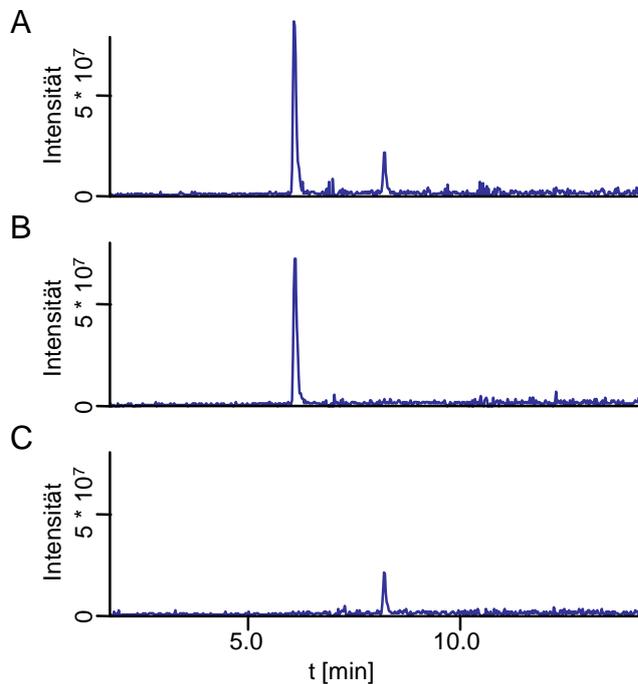
D



**Abbildung 47:** *In vitro* Enzym-Assay der NRPS TomA und TomB mit den Edukten Anthranilsäure und 4-Methylenprolin. **A)** Reaktionsschema der *in vitro* Reaktion. **B)** Mögliche in der HPLC-MS Analytik auftretende Dipeptid-Strukturen; **C)** HPLC-MS Analytik der *in vitro* Reaktion; **I)** BPC; **II)** EIC für das entstehende Pyrrolobenzodiazepin **52**  $[M + H]^+ \pm 5$  ppm; **D)** Analytik des Kontrollansatzes mit 10 min bei 90 °C hitzeinaktiviertem Protein (Darstellung analog C)

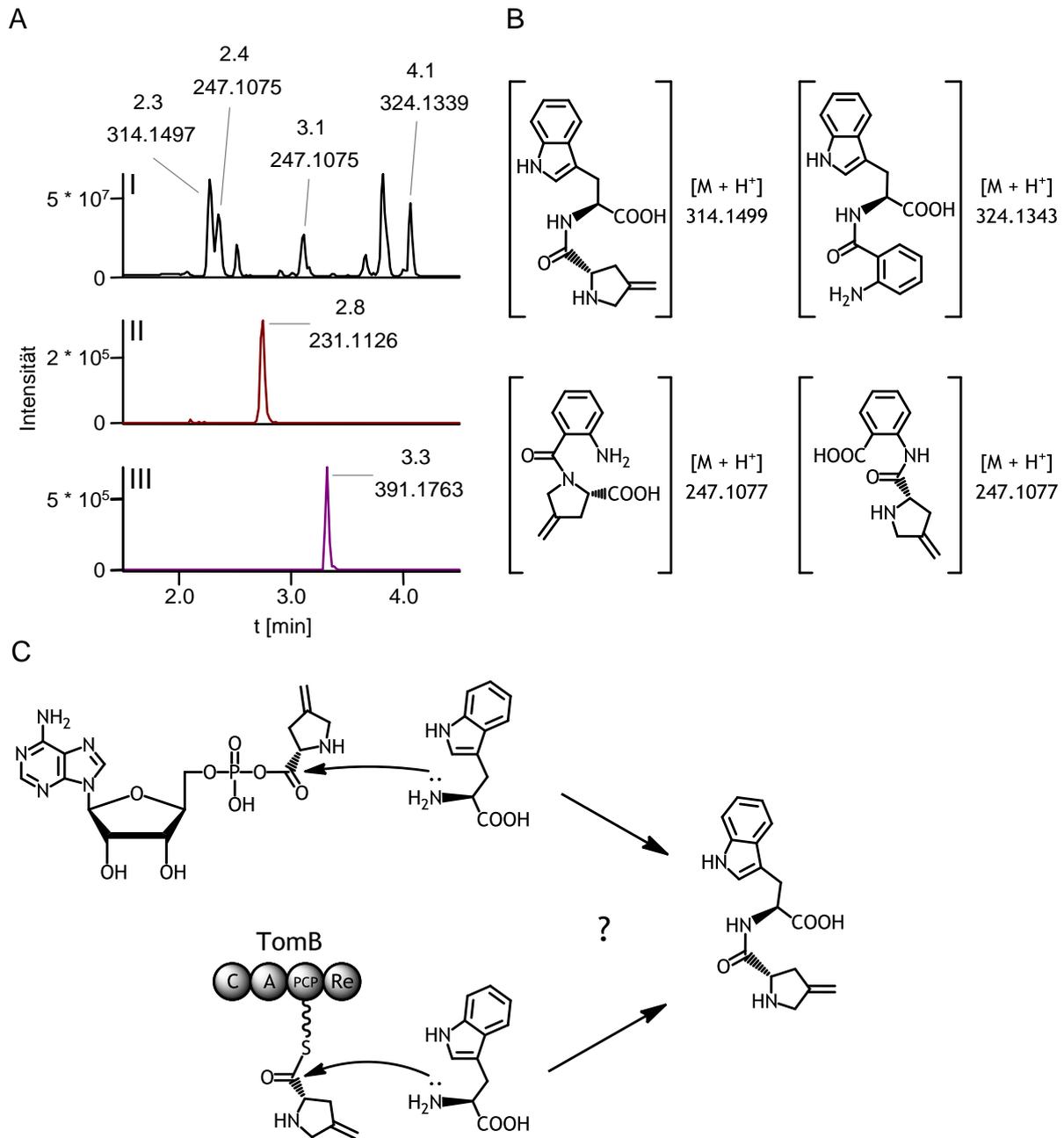
In einer Folgeuntersuchung sollte bestimmt werden wie der Zusammenhang zwischen den NRPS und den zwei entstehenden Dipeptid-Massen ist. Jeweils nur eine NRPS wurde in einem unmodifizierten Ansatz zur Reaktions eingesetzt. Diese Modifikation führte im Vergleich zum Gesamtansatz dazu, dass jeweils nur eine der beiden 247 u Massen gebildet wurde. Bei TomA wurde die Masse mit der geringeren

und bei TomB die Masse mit der höheren Retentionszeit ausgebildet (siehe Abbildung 48).



**Abbildung 48:** HPLC-Analyse der Kondensation der Aminosäuren Anthranilsäure und 4-Methylenprolin durch TomA und TomB. Gezeigt sind die BPC für die molekulare Masse (247.11 u) der möglichen Anthranilsäure-4-Methylenprolin Kondensate **53** und **54**. **A)** Reaktionsansatz mit TomA und TomB; **B)** Reaktionsansatz mit TomA; **C)** Reaktionsansatz mit TomB;

Aus diesen Versuchsergebnissen ließ sich nicht klar ableiten ob die Bildung des Dipeptids spezifisch zwischen Anthranilsäure und 4-Methylenprolin abläuft, oder es sich um unspezifisch gebildete Nebenprodukte handelt. Daher wurde im Anschluß ein vollständiger *in vitro*-Assay mit Tryptophan, einer Aminosäure die strukturell nicht mit Anthranilsäure oder 4-Methylenprolin verwandt ist, versetzt. In der HPLC-MS-Analyse wurden zwei Massen, von 314 u und 324 u, mit vergleichbarer Intensität zu den Anthranilsäure/4-Methylenprolin Dipeptidmassen, detektiert, welche zum Tryptophan-4-Methylenprolin-Dipeptid und zum Tryptophan-Anthranilsäure-Dipeptid passen. Die Abweichungen der gemessenen von den theoretischen Massen lagen unter 0.4 ppm (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49:** HPLC-MS-Analyse des *in vitro* Enzym-Assay der NRPS TomA und TomB mit den Edukten Anthranilsäure und 4-Methylenprolin und zusätzlicher Zugabe von Tryptophan. **A)** HPLC-MS Analytik der *in vitro* Reaktion; **I)** BPC; **II)** EIC für das entstehende Pyrrolbenzodiazepin **52**  $[M + H]^+ \pm 5$  ppm; **III)** EIC für die Masse des Tryptophan-Dipeptids  $[M + H]^+ \pm 5$  (391.1765); **B)** Mögliche Strukturen für die in der MS-Analyse auftretenden Massen; **C)** Beispiel für mögliche Reaktionswege für die unspezifische Dipeptidbildung: Reaktion zwischen Methylenprolin-Aminoacyladenylat und Tryptophan, alternativ TomB beladen mit 4-Methylenprolin und Tryptophan

## 4.5 Sibiromycin

Nachdem die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien an Tomaymycin bestätigten, dass die Synthese neuer Pyrrolobenzodiazepine über Mutasyntese möglich ist und eine Vielzahl von Anthranilsäurederivaten als Grundbaustein für den A-Ring akzeptiert werden, war es naheliegend, parallele Untersuchungen an einem weiteren natürlichen Pyrrobenzodiazepin durchzuführen. Nach einer Reihe von Vorversuchen mit Mazethramycin, Porothramycin und Sibiromycin erwies sich letzteres aufgrund der guten Kultivierbarkeit und der guten genetischen Zugänglichkeit des entsprechenden Stammes, der Besonderheit der Glykosylierung sowie hoher Sibiromycin-Produktionstiter als vielversprechend.

### 4.5.1 Mutasyntesestrategie für die Darstellung nicht-nativer Sibiromycinanaloga

Li *et al.* beschreiben für das Sibiromycin-Biosynthese-Gencluster [141], dass Knock-outs von *sibA*, *sibC* oder *sibE* die Sibiromycin-Produktion unterbinden. Mit der Fütterung von 3-Hydroxy-4-methylantranilsäure (Knock-out von *sibA*), von 3-Hydroxyanthranilsäure (Knock-out von *sibC*) oder von 3-Hydroxykynurenin (Knock-out von *sibE*) konnte anschließend die wildtypische Produktion wiederhergestellt werden. Mutasynteseexperimente an Sibiromycin waren zu Anfang der vorliegenden Arbeiten nicht beschrieben.

Da die Stämme von Li *et al.* nicht verfügbar waren, wurde ein Knock-out geplant, der die Biosynthese des A-Rings unterbinden sollte. Der für *sibC* beschriebene Knock-out ließ die Rettung des Phänotyps über Fütterung der Vorläufer-Substanzen zu, was auch die Möglichkeit der Mutasyntese wahrscheinlich erscheinen ließ. Zudem ist *sibC* mit 1431 bp ausreichend groß für einen Knock-out mittels *single crossover*.

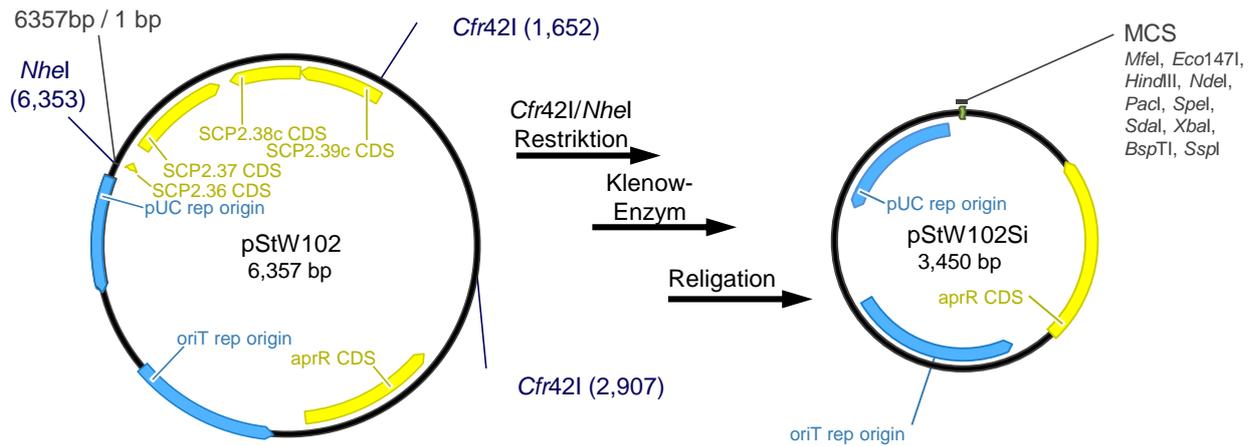
### 4.5.2 Erstellung des Suizidvektors pStW102Si

Um auf DNA-Ebene *cross over*-Reaktionen zwischen einem in *Streptomyces* inserierten Vektor und der genomischen DNA zu forcieren, werden sogenannte

Suizidvektoren eingesetzt. Diese verfügen über einen *origin of replication* des bakteriellen Wirts (meist *E. coli*), der für Vervielfältigung und Klonierung genutzt wird, in der Zielspezies jedoch nicht aktiv ist. Nach dem Einbringen des Vektors in die Zielspezies führt das Fehlen des *origin of replication* dazu, dass nur Zellen bei welchen der Vektor in das Genom integriert wurde die Resistenz des Vektors weiter vervielfältigen können und die folgende Antibiotikumselektion überleben [19], [142].

Mit dem Einsatz des für *Streptomyces* etablierten Suizidvektors pKC1132 [90] konnten in Knock-out-Versuchen für *sibC* keine Exkonjuganten erzielt werden. Daher wurde ein neuer auf pStW102 basierender Knock-out Vektor konstruiert. pStW102 ist ein vollständig sequenzierter, molekularbiologisch gut zu bearbeitender Shuttlevektor, der sich unmodifiziert, wie auch mit großen Inserts (bis zu 40 kb) in *E. coli* und in den verwendeten *Streptomyces* stabil verhält. Er enthält eine MCS, die sich mit einer Vielzahl unterschiedlicher, in Streptomyceten seltenen Restriktionsenzymen schneiden lässt und erzielte solide Ergebnisse bei klassischen molekularen sowie bei Red/ET Klonierungen. In der biparentalen Konjugation ergab er zuverlässig Exkonjuganten bei allen verwendeten *Streptomyces* Stämmen.

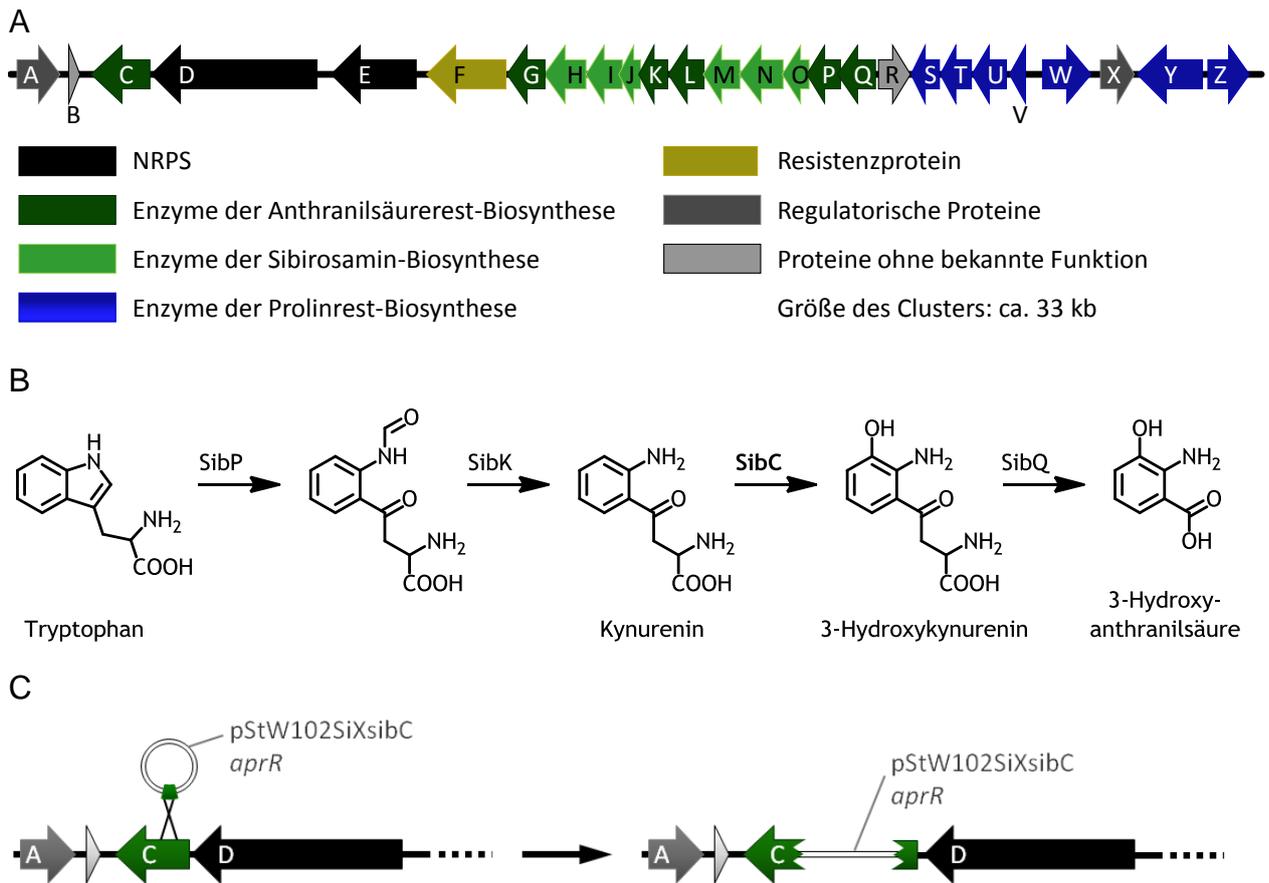
Durch eine einfache *Cfr42I/NheI* Restriktion/Ligation lässt sich der SCP2\* *ori* - bei Erhalt aller anderen Funktionalitäten - aus pStW102 entfernen und der Vektor zu einem Suizidvektor reduzieren. *Cfr42I* und *NheI* erzeugen keine kompatiblen Enden; daher wurde als Zwischenschritt ein Abverdau beziehungsweise eine Auffüllung via Klenow-Enzym zwischengeschaltet. Nach der Ligation wurde der Vektor in *E. coli* HS996 transformiert und die monoklonalen DNA-Isolate via Restriktionsverdau verifiziert. Der erhaltene Vektor wurde unter der Bezeichnung pStW102Si weiterverwendet (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Erstellung des Suizid-Vektors pStW102Si. Nach der *Cfr42I/NheI*-Restriktion wurden die entstandenen Überhänge mittels Klenow-Enzym abverdaut, bzw. aufgefüllt und das Fragment welches den pUC ori, oriT und das Apramycin-Resistenzgen enthält zu pStW102Si ligiert.

#### 4.5.3 Erstellung des *single crossover* Knock-out-Vektors pStW102SiXsibC

Für die Erstellung des *sibC* Knock-out-Konstrukts wurden die 945 5'-seitigen bp von *sibC* mittels des Primerpaars pr164 amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 ligiert. Nach der Ligation wurde der Vektor in *E. coli* HS996 transformiert und die monoklonalen DNA-Isolate via Restriktionsverdau verifiziert. Anschließend wurde die trunkierte *sibC*-Sequenz mittels *HindIII/XbaI* ausgeschnitten und in den analog linearisierten Vektor pStW102Si inseriert (siehe Abbildung 51). Nach der Ligation wurde der Vektor in *E. coli* HS996 transformiert und die monoklonalen DNA-Isolate via Restriktionsverdau verifiziert. Der erhaltene Vektor wurde unter der Bezeichnung pStW102SiXsibC weiterverwendet.



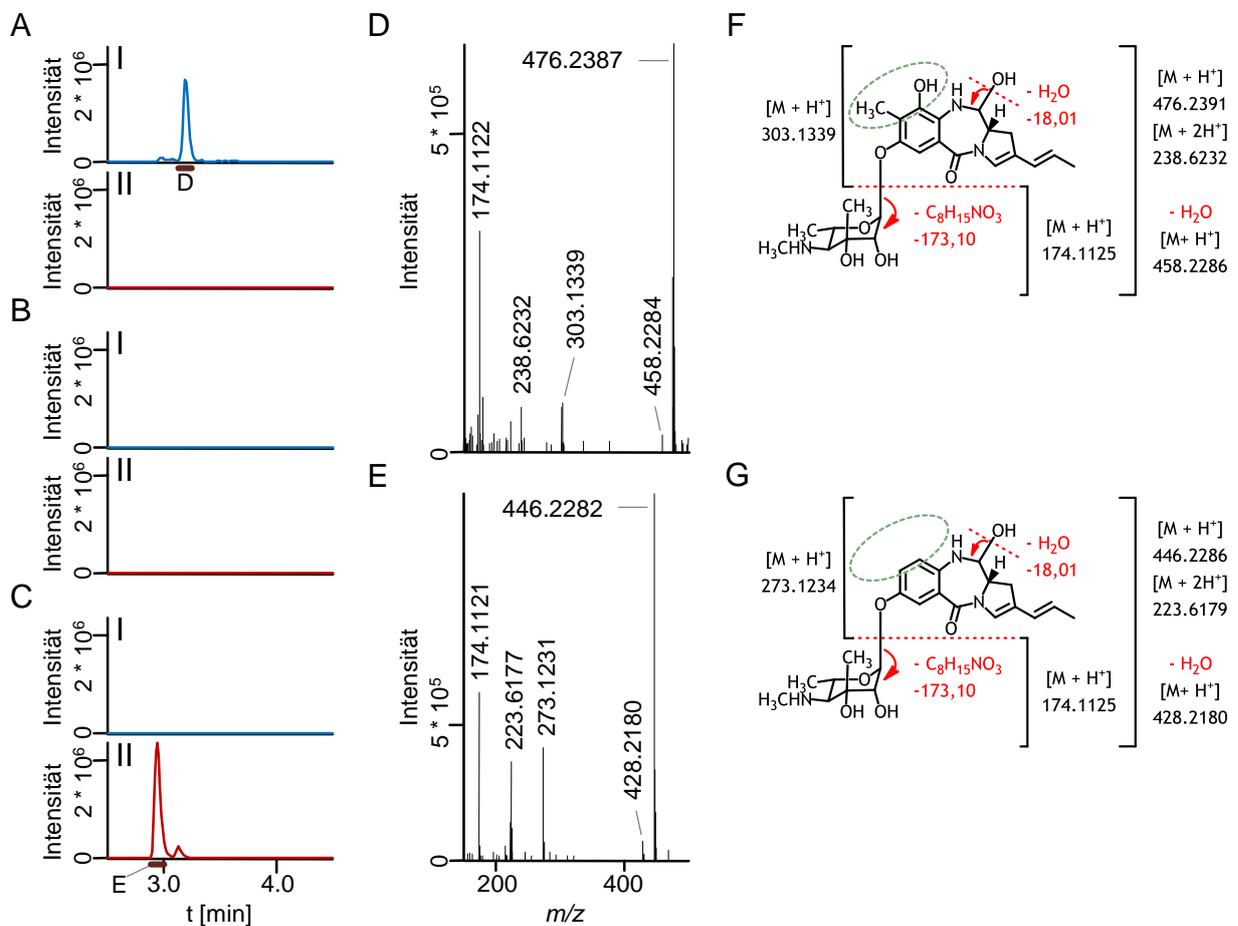
**Abbildung 51:** Knock-out der Kynurenin-3-Monooxygenase *sibC*. **A)** Organisation des Sibiromycin-Biosynthese-Genclusters in *Streptosporangium sibiricum* (nach Li *et al.* [141]); **B)** hypothetischer Biosyntheseweg von 3-Hydroxyanthranilsäure in *S. sibiricum*; **C)** Inaktivierung von *sibC* durch *single-crossover*-Integration des Suizidvektors pStW102SiXsibC.

#### 4.5.4 Knock-out der Kynurenin-3-Monooxygenase *sibC* im nativen Sibiromycin-Biosynthese-Gencluster und phänotypische Verifikation

Um den für die Mutasynthese des Sibiromycin A-Rings notwendigen *sibC*-Knock-out-Stamm *Streptosporangium sibiricum*::pStW102SiXsibC zu erstellen, wurde das *single crossover* Konstrukt pStW102SiXsibC mittels biparentaler Konjugation über den Zwischenwirt *E. coli* ET12567/pUZ8002/pStW102SiXsibC in den Wildtyp-Stamm *Streptosporangium sibiricum* eingebracht. Erhaltene Exkonjuganten wurden auf apramycinhaltigen Agarplatten selektiert. Die erhaltenen Stämme wurden in Produktionskulturen angezogen und der Kulturüberstand auf Sibiromycin untersucht. Nicht produzierende Stämme wurden erneut kultiviert und das Produktionsmedium

## 4 Ergebnisse

mit dem Mutasynton Anthranilsäure komplementiert. Der Kulturüberstand wurde auf mögliche Sibiromycinanaloga untersucht; 9-Dehydroxy-8-demethylsibiromycin konnte in der HPLC-MS-Analyse mit höherer Peak-Intensität als Sibiromycin im Wildtypstamm nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Masse der gesamten Struktur von 446 u konnten die Massen für das für Pyrrolbenzodiazepine charakteristische Abspaltungsprodukt von Wasser, das für Sibiromycin charakteristische ausgebildete Aglycon, sowie die Masse des abgespaltenen Zuckers Sibirosamin nachgewiesen werden. Alle Massenabweichungen lagen unter 2 ppm (siehe Abbildung 52).



**Abbildung 52:** HPLC-MS-Analyse vergleichender Kulturen von *Streptomyces sibiricum* wt und *S. sibiricum*::pStW102SiXsibC. **A)** *Streptomyces sibiricum* wt Kultur; **B)** *S. sibiricum*::pStW102SiXsibC ohne Fütterung; **C)** *S. sibiricum*::pStW102SiXsibC mit Anthranilsäure gefüttert; gezeigt sind jeweils die BPC für die Massen von  $[M + H]^+$  von **I)** Sibiromycin (blau) und **II)** 9-Dehydroxy-8-demethylsibiromycin (rot). **D)** integriertes Massenspektrum für den Zeitraum 3.1 bis 3.2 min aus Chromatogramm A; **E)** integriertes Massenspektrum für den Zeitraum 2.9 bis 3.0 min aus Chromatogramm C; **F)** mögliches Fragmentierungsmuster von Sibiromycin im MS/MS; **G)** mögliches Fragmentierungsmuster von 9-Dehydroxy-8-demethylsibiromycin im MS/MS

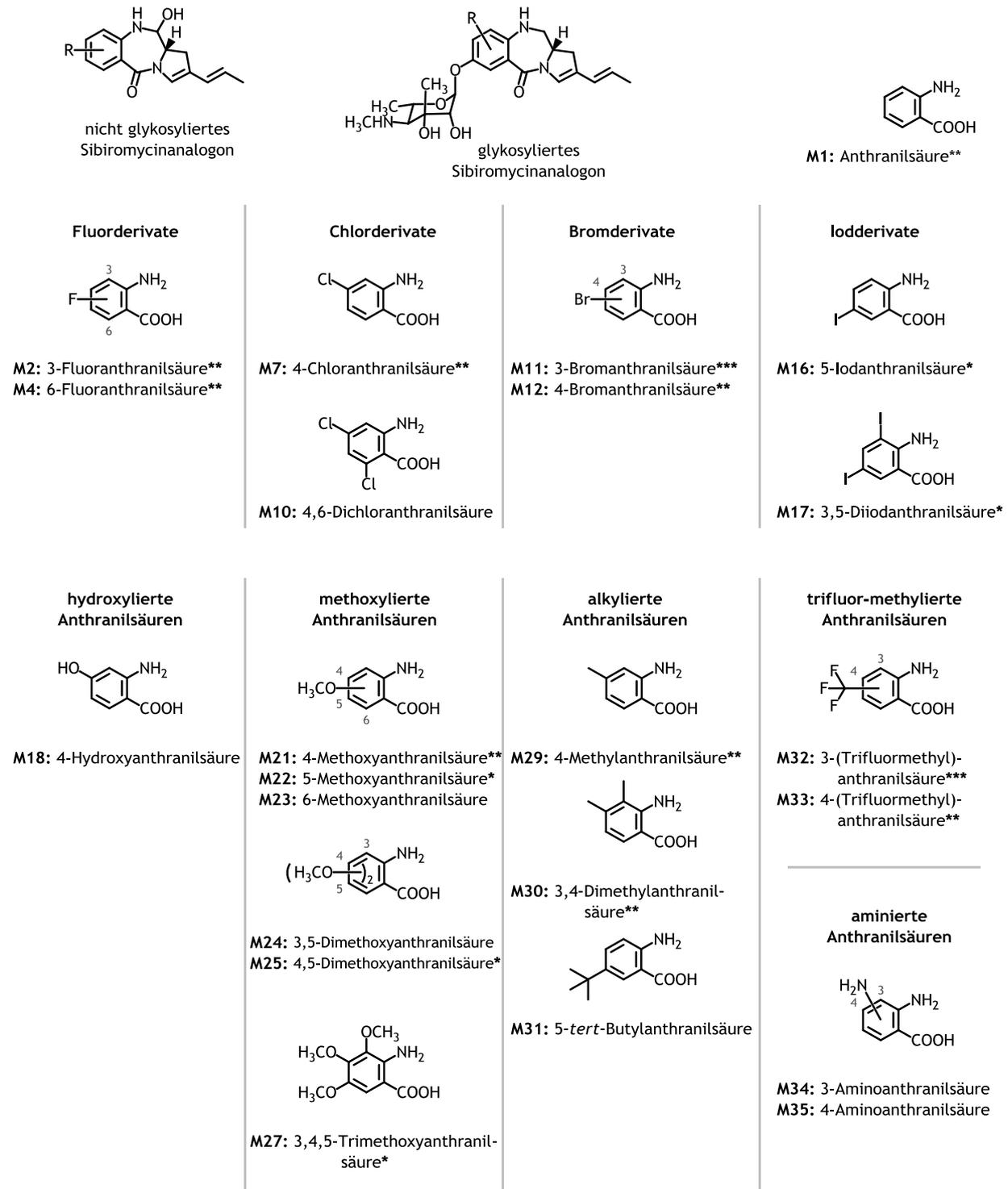
#### 4.5.5 Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycinanaloga

Mit dem *sibC*-Knock-out-Stamm *Streptosporangium sibiricum*::pStW102SiXsibC konnte ein System zur Mutasynthese von Sibiromycinanaloga erfolgreich etabliert werden. Dieser K.O.-Stamm zeigte jedoch sowohl auf Agarplatten als auch in der Flüssigkultur ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber dem Wildtypstamm und es konnte keine stabile langfristige Kultivierung erreicht werden. In der Erstellung des K.O.-Stammes hatte sich gezeigt, dass genetische Modifikationen zwar möglich, aber die Ausbeute an erhaltenen Exkonjuganten sehr gering ist.

In einem alternativen Ansatz wurden geprüft, ob die Synthese von Sibiromycinvarianten mittels vorläufergesteuerter Biosynthese auch im Wildtypstamm möglich ist. In ersten Fütterungsversuchen zeigte sich, dass zugefütterte Anthranilsäure von den NRPS akzeptiert und in ein Sibiromycin-Analogon eingebaut wurde. Überraschenderweise verdrängte das gefütterte Syntheton den originalen Baustein weitestgehend, sodass hauptsächlich Dehydroxy-8-demethylsibiromycin anstatt wildtypischem Sibiromycin im Überstand der Produktionskultur nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der deutlich besseren Kultivierbarkeit und hohen Einbauraten gefütterter Synthone bei der vorläufergesteuerten Biosynthese wurden alle weiteren Versuche Sibiromycinanaloga zu erstellen mit dem Wildtypstamm *Streptosporangium sibiricum* durchgeführt.

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse des Kulturüberstandes der vorläufergesteuerten Biosynthese am Wildtyp-Stamm. Die Analyse zeigt, dass 18 der 31 eingesetzten unterschiedlich derivatisierten Anthranilsäuren in ein PBD inkorporiert wurden. Die angegebene Peakfläche vermittelt einen Eindruck der Größenordnung des Umsatzes des jeweiligen Edukts. Zusätzlich ist angegeben ob eine Hydroxylierung und anschließende Glykosylierung des Produkts an Position 7 stattgefunden hat. Die Strukturen der eingesetzten Anthranilsäurederivate sind in Abbildung 53 dargestellt.

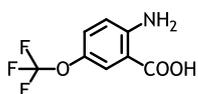
## 4 Ergebnisse



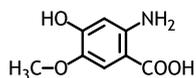
**Abbildung 53 (Teil I):** In vorläufig gesteuerten Biosyntheseversuchen mit *Streptosporangium sibiricum* eingesetzte Anthranilsäurederivate. Als erstes sind die Strukturen möglicher Produkte, das nicht glykosylierte und das glykosylierte Sibiromycin-Analogon, gezeigt. Für gekennzeichnete Anthranilsäurederivate konnte in der HPLC-MS-Analyse die Masse eines entsprechenden Pyrrolobenzodiazepines detektiert werden. \*) der Einbau des Vorläufers erfolgte, eine Glykosylierung war aufgrund der Derivatisierung an Position 5 der Anthranilsäure jedoch nicht möglich; \*\*) der Einbau des Vorläufers erfolgte, die Glykosylierung konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden; \*\*\*) der Einbau des Vorläufers erfolgte, die Glykosylierung war trotz nicht derivatisierter Position 5 nicht nachweisbar, es wurde auch keine Hydroxylierung gefunden.

## 4 Ergebnisse

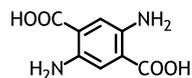
### weitere Anthranilsäurederivate



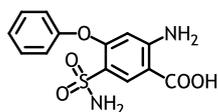
M36: 5-(Trifluormethoxy)anthranilsäure



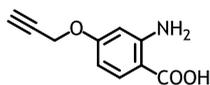
M39: 4-Hydroxy-5-methoxyanthranilsäure



M40: 2,5-Diaminoterephthalsäure

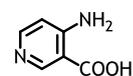


M41: 4-Phenoxy-5-sulfamoylanthranilsäure

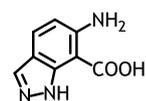


4-Propargylanthranilsäure\*\*

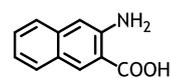
### anthranilsäureähnliche Mutasyntone



M42: 4-Aminonicotinsäure



M43: 6-Amino-1H-indazol-7-carboxylsäure



M44: 3-Amino-2-naphthoesäure\*

Abbildung 53 (Teil II)

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 6 (Teil I):** Auswertung der HPLC-MS-Analyse der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga in *Streptosporangium sibiricum*.

Edukt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse <i>m/z</i>	gemessene Masse <i>m/z</i>	$\Delta$ ppm	Glyko- sylierung detektierbar
wildtypische Sibiromycinproduktion						
	3.2	2.9E+07	476.2391	476.2384	1.6	Ja
<b>M1:</b> Anthranilsäure						
	3.0	1.1E+07	446.2286	446.2283	0.7	Ja
<b>Fluorderivate</b>						
<b>M2:</b> 3-Fluoranthranilsäure						
	3.1	1.9E+07	464.2191	464.2184	1.6	Ja
<b>M4:</b> 6-Fluoranthranilsäure						
	2.9	3.7E+05	464.2191	464.2192	0.2	Ja
<b>Chlorderivate</b>						
<b>M7:</b> 4-Chloranthranilsäure						
	3.3	6.7E+07	480.1896	480.1884	2.4	Ja
<b>M10:</b> 4,6-Dichloranthranilsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>Bromderivate</b>						
<b>M11:</b> 3-Bromanthranilsäure						
	4.9	3.8E+05	335.0390	335.0392	0.8	<b>Nein</b>
<b>M12:</b> 4-Bromanthranilsäure						
	3.4	4.2E+07	524.1391	524.1379	2.3	Ja
<b>Iodderivate</b>						
<b>M16:</b> 5-Iodanthranilsäure						
	5.3	2.1E+06	383.0251	383.0251	0.1	nicht möglich
<b>M17:</b> 3,5-Diiodanthranilsäure						
	6.2	6.7E+06	508.9217	508.9212	1.1	Ja
<b>Hydroxylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M18:</b> 4-Hydroxyanthranilsäure				kein Produkt detektierbar		

## 4 Ergebnisse

Tabelle 6 (Teil II)

Edukt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse m/z	gemessene Masse m/z	$\Delta$ ppm	Glyko- sylierung detektierbar
<b>Methoxylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M21: 4-Methoxyanthranilsäure*</b>						
	3.1	1.4E+08	476.2391	476.2387	1.0	Ja
<b>M22: 5-Methoxyanthranilsäure</b>						
	4.3	2.7E+06	287.1390	287.1390	0.1	nicht möglich
<b>M23: 6-Methoxyanthranilsäure</b>						
						kein Produkt detektierbar
<b>M24: 3,5-Dimethoxyanthranilsäure</b>						
						kein Produkt detektierbar
<b>M25: 4,5-Dimethoxyanthranilsäure</b>						
	4.3	7.8E+06	317.1496	317.1497	0.3	nicht möglich
<b>M27: 3,4,5-Trimethoxyanthranilsäure</b>						
	4.5	4.8E+06	347.1602	347.1603	0.3	nicht möglich
<b>alkylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M29: 4-Methylantranilsäure</b>						
	3.2	2.4E+07	460.2442	460.2438	1.0	Ja
<b>M30: 3,4-Dimethylantranilsäure</b>						
	3.5	1.3E+07	474.2599	474.2593	1.2	Ja
<b>M31: 5-tert-Butylantranilsäure</b>						
						kein Produkt detektierbar
<b>Trifluormethylierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M32: 3-(Trifluormethyl)anthranilsäure</b>						
	5.1	3.7E+06	325.1158	325.1161	0.9	<b>Nein</b>
<b>M33: 4-(Trifluormethyl)anthranilsäure</b>						
	3.6	1.5E+07	514.2160	514.2155	0.8	Ja
<b>Aminierte Anthranilsäuren</b>						
<b>M34: 3-Aminoanthranilsäure</b>						
						kein Produkt detektierbar
<b>M35: 4-Aminoanthranilsäure</b>						
						kein Produkt detektierbar

Tabelle 6 (Teil III)

Edukt	Retentions- zeit [min]	Peakfläche (Mess- Ereignisse)	theoretische Masse <i>m/z</i>	gemessene Masse <i>m/z</i>	$\Delta$ ppm	Glyko- sylierung detektierbar
<b>weitere Anthranilsäurederivate</b>						
<b>M36:</b> 5-(Trifluormethoxy)anthranilsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>M39:</b> 4-Hydroxy-5-methoxyanthranilsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>M40:</b> 2,5-Diaminoterephthalsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>M41:</b> 4-Phenoxy-5-sulfamoylanthranilsäure				kein Produkt detektierbar		
4-Propargylanthranilsäure						
	3.3	1.2E+07	500.2391	500.2384	1.5	Ja
<b>anthranilsäureähnliche Mutasyntnone</b>						
<b>M42:</b> 4-Aminonicotinsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>M43:</b> 6-Amino-1H-indazol-7-carboxylsäure				kein Produkt detektierbar		
<b>M44:</b> 3-Amino-2-naphthoesäure						
	4.9	2.6E+07	307.1441	307.1440	0.5	nicht möglich

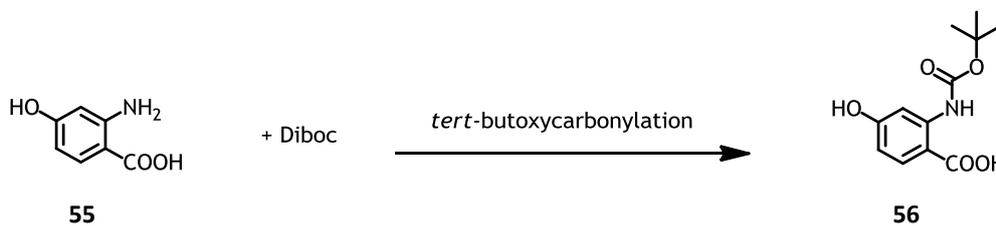
#### 4.5.6 Synthese von 4-Propargyloxyanthranilsäure

Versuche mit synthetischen Pyrrolobenzodiazepinen belegen eindrucksvoll, dass die Toxizität dieser Substanzklasse durch Dimerisierung deutlich gesteigert werden kann [82], [143]. Um eine Dimerisierung eines Sibiromycin-Analogons durchzuführen musste durch die Fütterung eine Reaktive Gruppe im Molekül verankert werden, die es später zulässt, das Monomer an einen Linker zu koppeln. Für die Kopplung kommen nur verhältnismäßig milde Reaktionsbedingungen in Frage, da das reaktive Zentrum der Pyrrobenzodiazepine - die N10-C11 Imin-Funktionalität - erhalten bleiben muss. Hierfür wurde die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, eine Musterreaktion der Click-Chemie, gewählt. Um die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition nutzen zu können war es notwendig ein terminales Alkin im Sibiromycin-Analogon verfügbar zu machen. Der ideale Ansatzpunkt für über den A-Ring verknüpfte Pyrrolobenzodiazepin-Dimere ist Position 8 im Pyrrolobenzodiazepin, wie sie zum Beispiel auch in SJG-136 genutzt wird [143]. Für Sibiromycin-Analoga hat diese Position außerdem den Vorteil, dass im Gegensatz

zur Positionierung des Linkers an Position 7 oder 9 die Glykosylierung erhalten bleibt; welche auch bei der vorläufergesteuerten Biosynthese an Position 8 substituierter Sibiromycin-Analoga auftritt.

Erste Versuche einen geeigneten Rest über palladiumkatalysierte Additionen von Borverbindungen in 4-Hydroxy-Anthranilsäure einzubringen, ergaben keine nutzbaren Produkte.

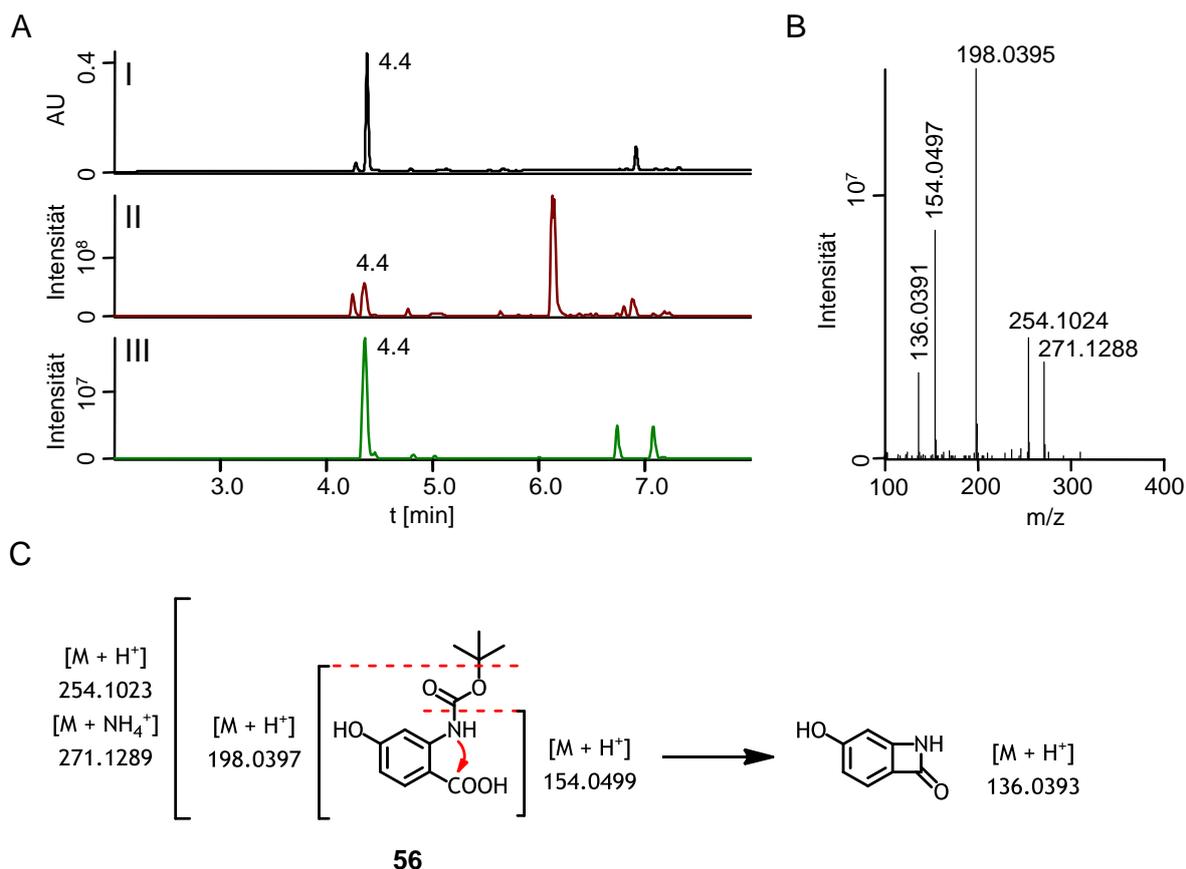
Daher wurde die Addition von Propargyl über nukleophile Substitution von Brom aus Propargylbromid durch die Hydroxyl-Gruppe in 4-Hydroxy-Anthranilsäure getestet. Aufgrund der der Reaktivität der Carboxylgruppe war es notwendig diese zuerst zu schützen (siehe Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Schützen Amino-Gruppe der 2-Amino-4-hydroxy-benzoessäure durch tert-Butyloxycarbonyl (Boc).

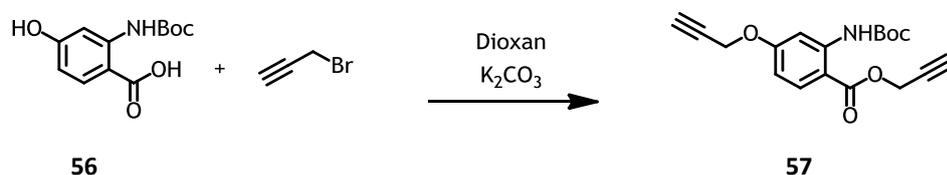
Im Spektrum der HPLC-UV-VIS Analyse der Boc-Addition tritt das Produkt als deutlich größter Peak auf (siehe Abbildung 55). Bei der Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoessäure wurde eine Umsetzung von 68 % des Edukts erreicht.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 55:** HPLC-MS Analyse der synthetisierten, aufgereinigten 2-(N-Boc-amino)-4-hydroxy-benzoesäure. **A I)** UV-VIS 190 - 500 nm; **II)** TIC; **III)** EIC der Masse 254.1023 ± 5 ppm; **B)** MS/MS Spektrum im Zeitraum t = 4.30 min - 4.50 min; **C)** putative MS/MS Fragmentierung von 2-(N-Boc-amino)-4-hydroxy-benzoesäure

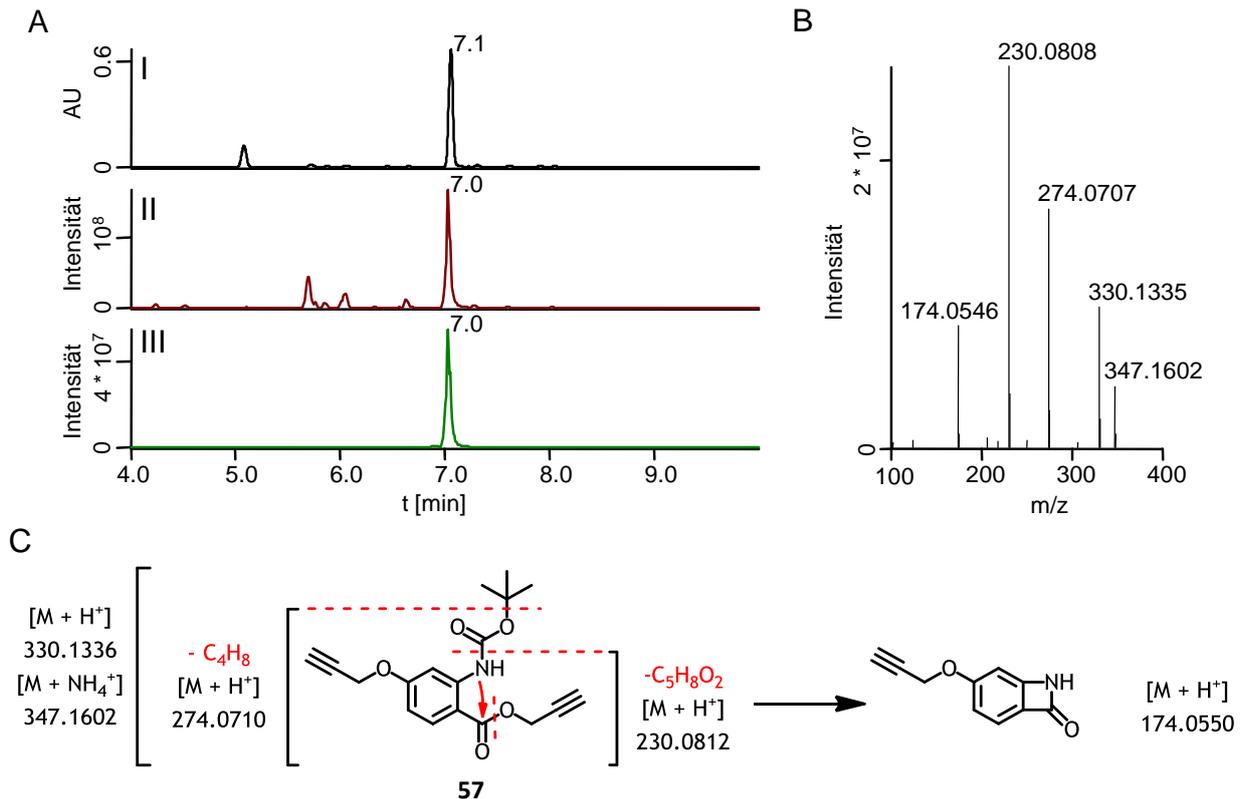
Im zweiten Schritt wurde die im ersten Schritt erhaltene 2-(N-Boc-amino)-4-hydroxy-benzoesäure (**56**) mit Propargylbromid zu 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-propargylbenzoat (**57**) umgesetzt (siehe Abbildung 56).



**Abbildung 56:** Propargylierung von 2-(N-Boc-amino)-4-hydroxy-benzoesäure mittels Propargylbromid.

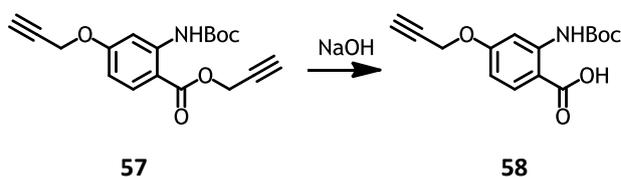
Nach der Extraktion des Produkts aus dem Reaktionsansatz ist das Produkt in der HPLC-UV-VIS Analyse als deutlich stärkster Anteil vertreten (siehe Abbildung 57), es wurde eine Umsetzung von 35 % des Edukts erreicht.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 57:** HPLC-MS Analyse des synthetisierten, aufgereinigten 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-propargylbenzoats. **A I)** UV-VIS 190 - 500 nm; **II)** TIC; **III)** EIC der Masse von **57** ( $330.1336 \pm 5$  ppm); **B)** MS/MS Spektrum im Zeitraum  $t = 7.00$  min - 7.10 min; **C)** putative MS/MS Fragmentierung von 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-propargylbenzoat.

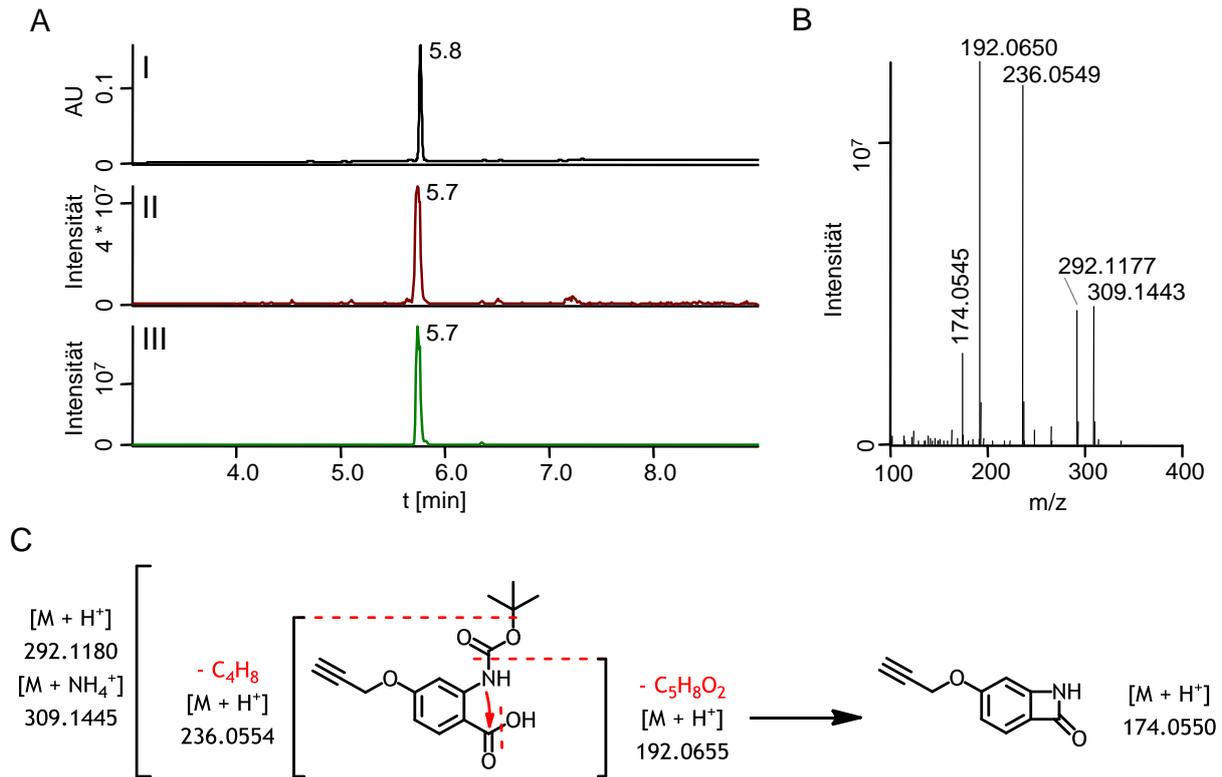
Im dritten Schritt wurde Propargylbromid zu 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-propargylbenzoat (**57**) mittels NaOH zu 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-benzoesäure (**58**) verseift (siehe Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Verseifen von 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-propargylbenzoat.

Nach der Extraktion von 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxy-benzoesäure lag das Produkt als einziger Peak im HPLC-UV-VIS Chromatogramm vor. Es wurden 93 % des Edukts umgesetzt (siehe Abbildung 59).

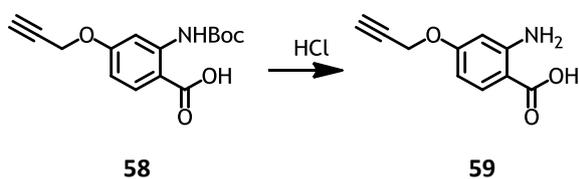
## 4 Ergebnisse



58

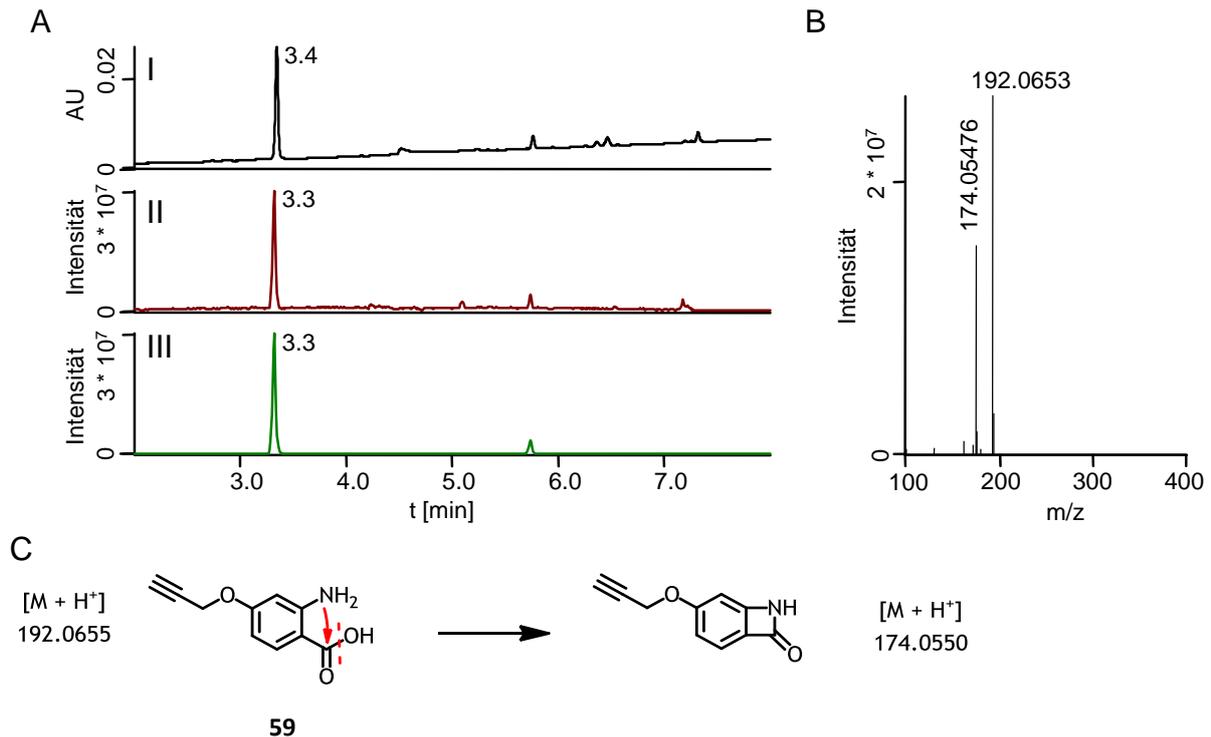
**Abbildung 59:** HPLC-MS Analyse der synthetisierten, aufgereinigten 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxybenzoesäure. **A I)** UV-VIS 190 - 500 nm; **II)** TIC; **III)** EIC der Masse  $292.1180 \pm 5$  ppm; **B)** MS/MS Spektrum im Zeitraum  $t = 5.60$  min -  $5.80$  min; **C)** putative MS/MS Fragmentierung 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxybenzoesäure.

Im vierten und letzten Schritt wurde 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxybenzoesäure (**58**) durch saure Entfernung der Boc-Gruppe entschützt und damit das Endprodukt 2-Amino-4-propargyloxybenzoesäure (**59**) erreicht (siehe Abbildung 60).



**Abbildung 60:** Entschützen von 2-(N-Boc-amino)-4-propargyloxybenzoesäure.

Im HPLC-MS-UV-VIS Chromatogramm stellt das Produkt den einzigen relevanten Peak (siehe Abbildung 61). Bei der Umsetzung wurden 89 % des Edukts umgesetzt.



**Abbildung 61:** HPLC-MS Analyse des synthetisierten, aufgereinigten 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure. **A I)** UV-VIS 190 - 500 nm; **II)** TIC; **III)** EIC der Masse  $192.0655 \pm 5$  ppm; **B)** MS/MS Spektrum im Zeitraum  $t = 3.20$  min -  $3.40$  min; **C)** putative MS/MS Fragmentierung 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure.

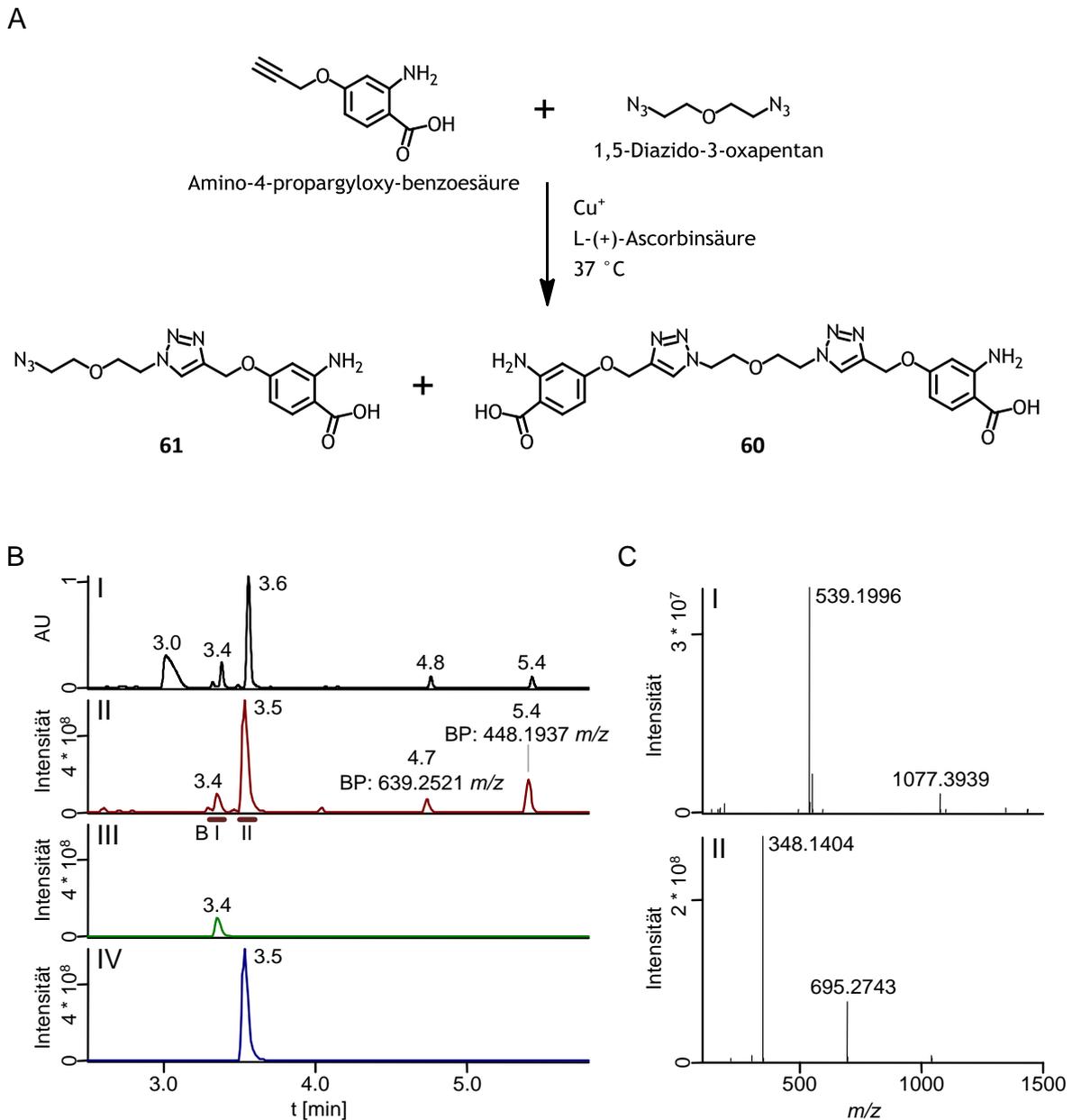
Die Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure lieferte eine ausreichend hohe Produktausbeute um Fütterungsversuche durchführen zu können. Über alle vier Schritte wurden 20 % des Edukts umgesetzt. Von den vier Schritten zeigte die Propargylierung mit einer Umsetzungsrate von 35 % des Edukts die geringste Effektivität. Wahrscheinlich liegen in diesem Schritt die größten Optimierungsmöglichkeiten, in der Literatur sind Umsetzungsraten von  $> 90$  % für die Propargylierung von Hydroxylgruppen an aromatischen Systemen beschrieben [144].

#### 4.5.7 Dimerisierung von Amino-4-propargyloxy-benzoesäure mittels 1,5-Diazido-3-oxapentan-Linker via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition

Da die Fütterung von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure mit der anschließenden Aufreinigung des Sibiromycin-Analogons recht aufwändig ist, wurde zuerst die Dimerisierung der Vorstufe 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure mittels 1,5-Diazido-3-oxapentan im analytischen Maßstab durchgeführt. Für die Reaktion wurde 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure und der Linker im Verhältnis 1:2 eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

In der HPLC-MS Analyse wurden die Massen für die vollständige Dimerisierung (**60**) (erwartet Masse  $[M + H]^+$  539.1997, gemessene Masse 539.1996) sowie für den einseitigen Ablauf der Reaktion (**61**) (erwartet Masse  $[M + H]^+$  348.1415, gemessene Masse 348.1404) gefunden (siehe Abbildung 62).



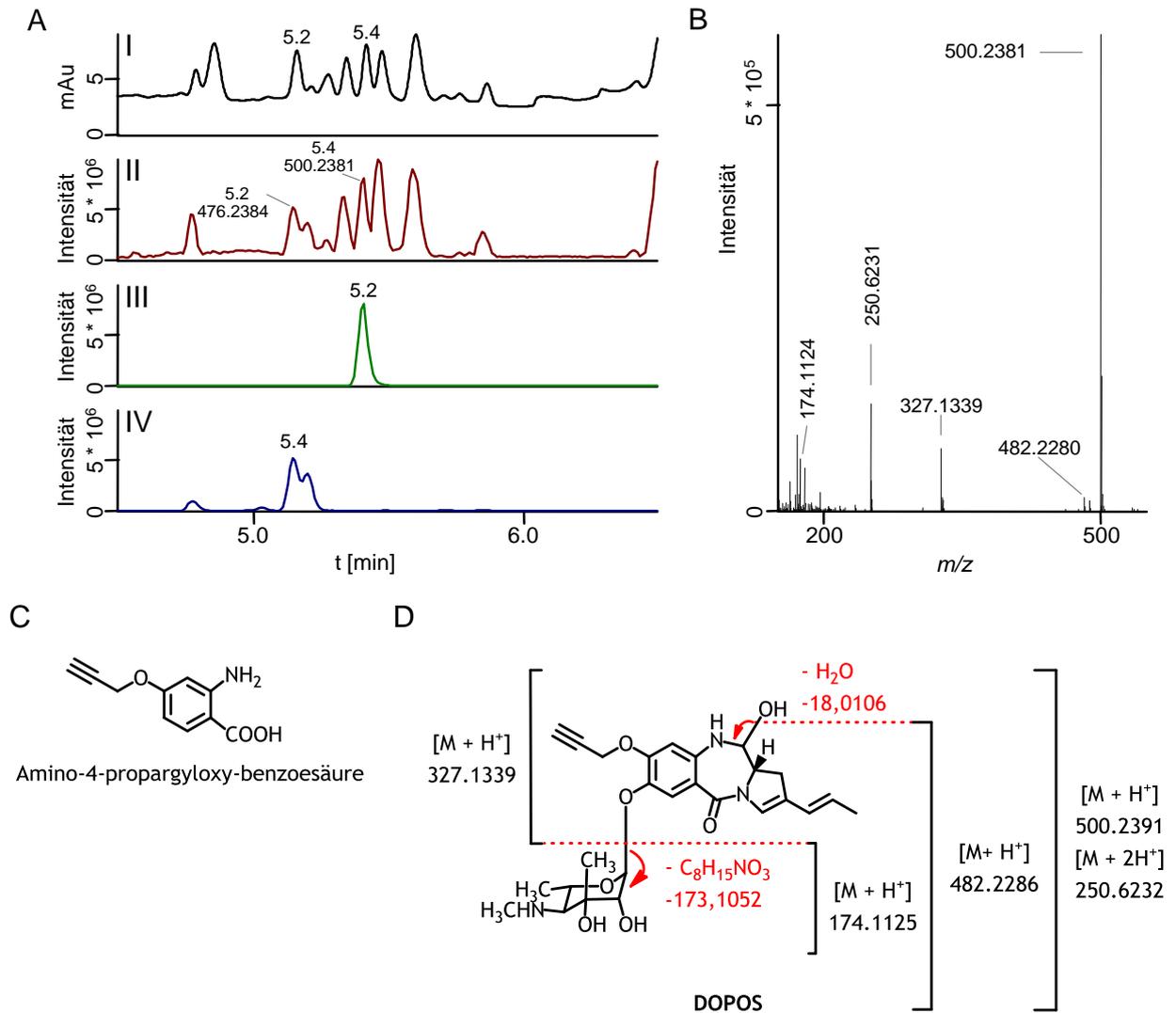
**Abbildung 62:** Dimerisierung von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure mittels 1,5-Diazido-3-oxapentan-Linker via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition; **A**) Reaktionsschema der Dimerisierung mit teilweiser (**61**) und vollständig abgelaufener Reaktion (**60**); **B**) HPLC-MS Chromatogramm des Reaktionsansatzes; **B I**) UVVIS; **B II**) BPC; **B III**) EIC (**61**)  $[M + H]^+ \pm 10$  ppm; **B IV**) EIC (**60**)  $[M + H]^+ \pm 10$  ppm; **C**) Integration der MS/MS Spektren im Zeitraum von **I**) 3.30 - 3.40 min und **II**) 3.50 - 3.60 min

Erwartungsgemäß trat das Produkt der einseitigen Reaktion beim verwendeten Eduktverhältnis von Monomer zu Linker von 1:2 als stärkste Fraktion auf. Deutlich ist im UV bei einer Retentionszeit von 3.02 der 1,5-Diazido-3-oxapentan-Peak sichtbar. Als Nebenprodukte traten zwei Massen mit  $m/z = 639.2521$  und  $m/z = 448.1937$  auf, welche jeweils eine Massenverschiebung von ca. + 100.05 zu den Hauptprodukten zeigen. Da der Gesamtanteil der Nebenprodukte gering war, wurden sie nicht weiter untersucht.

### **4.5.8 Vorläufergesteuerte Biosynthese von DOPOS im analytischen Maßstab**

Mit der Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure steht ein Mutasynton zur Verfügung, welches die Möglichkeit zur Dimerisierung mittels Click-Chemie bietet (siehe Abbildung 62). Die Fütterung vom 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure zur Produktionskultur von *Streptosporangium sibiricum* sollte zur Produktion von von 9-Desoxy-8-propargyloxy-sibiromycin (DOPOS) genutzt werden. In der HPLC-MS-Analyse der Produktionskultur konnte die Masse von DOPOS und seiner möglichen MS/MS-Zerfallsprodukte klar gezeigt werden (siehe Abbildung 63). Das deutliche Auftreten des DOPOS-Peaks im HPLC-UV-VIS-Chromatogramm zeigte klar auf, dass die Ausbeute der vorläufergesteuerte Biosynthese ausreichend hoch war, um im nächsten Schritt die Produktion von DOPOS in einer größeren Produktionskultur zu wiederholen und das Produkt aufzureinigen.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 63:** HPLC-MS-Analyse des Kulturüberstands der vorläufergesteuerten Biosynthese von DOPOS; **A I)** HPLC-UV-VIS Chromatogramm; **II)** BPC; **III)** EIC für die Masse von DOPOS  $[M + H^+] \pm 5$  ppm; **IV)** EIC für die Masse von Sibiromycin  $[M + H^+] \pm 5$  ppm; Über den Chromatogrammen in A sind die Retentionszeiten der Peaks von Sibiromycin und DOPOS in Minuten angegeben; in II ist zusätzlich unter der Retentionszeit die gemessene Masse ( $m/z$ ) der Hauptsubstanz des Peaks angegeben. **B)** Integration der MS/MS Spektren im Zeitraum von 4.9 bis 5.1 min; **C)** Struktur der gefütterten Vorläuferstruktur; **D)** putative MS/MS Fragmentierung von DOPOS

### 4.5.9 Vorversuch zur Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Rohextrakt

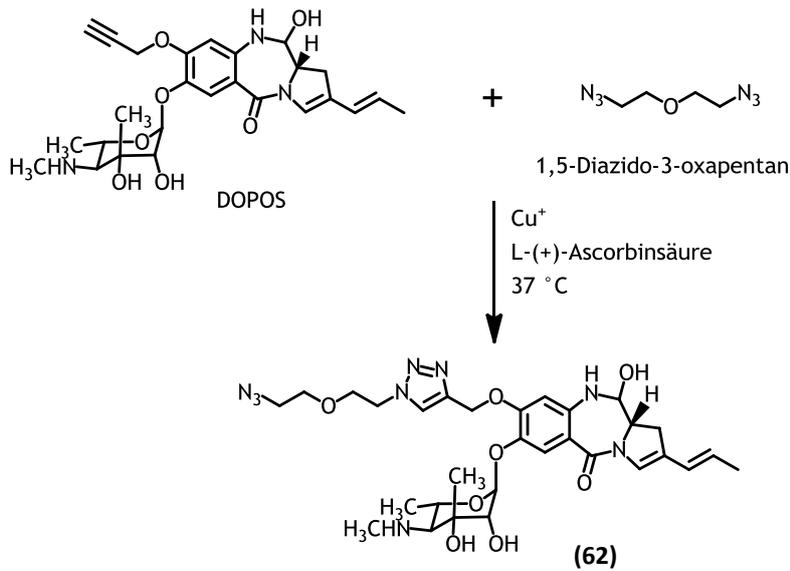
Die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition wurde von Rostovtsev *et al.* mit den einleitenden Worten *By simply stirring in water* vorgestellt [145]. Sie ist hoch spezifisch, stellt mit wässrigem Medium und Raumtemperatur geringe Anforderungen

an die Reaktionsbedingungen und ist wenig anfällig gegenüber Verunreinigungen im Ansatz. Diese Vorteile sollten genutzt werden, um bereits mit dem Kulturüberstand der 500 µl Kultur zur DOPOS-Produktion erste Tests zur Dimerisierung durchzuführen. Das letztendliche Ziel der Linker-Kopplungs-Reaktion ist die Ausbildung eines DOPOS-Dimers. Da noch keine Referenzsubstanz zur Konzentrationsbestimmung vorlag und das erhaltene Material nicht weiter genutzt werden sollte, wurde 1,5-Diazido-3-oxapentan im deutlichen Überschuss zugesetzt um die Kopplungs-Reaktion zum Monoaddukt zu begünstigen.

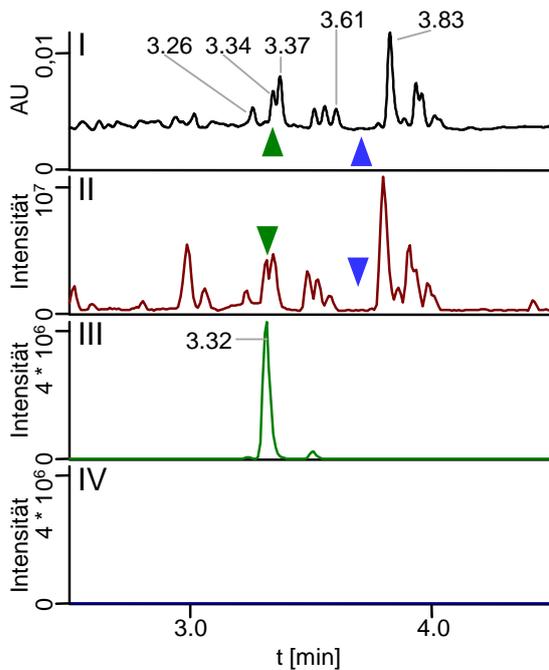
Aus dem Versuchsansatz zur Dimerisierung wurden nach 15 min, 4 h und 24 h Proben entnommen. Nach 15 min war noch keine Umsetzung von DOPOS zu **(62)** erkennbar. Nach 4 h trat eine deutliche Verminderung des DOPOS-Peaks im HPLC-MS-Chromatogramm auf und die Masse für das DOPOS 1,5-Diazido-3-oxapentane Addukt **(62)** konnte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 64). Das Diaddukt konnte nicht nachgewiesen werden.

## 4 Ergebnisse

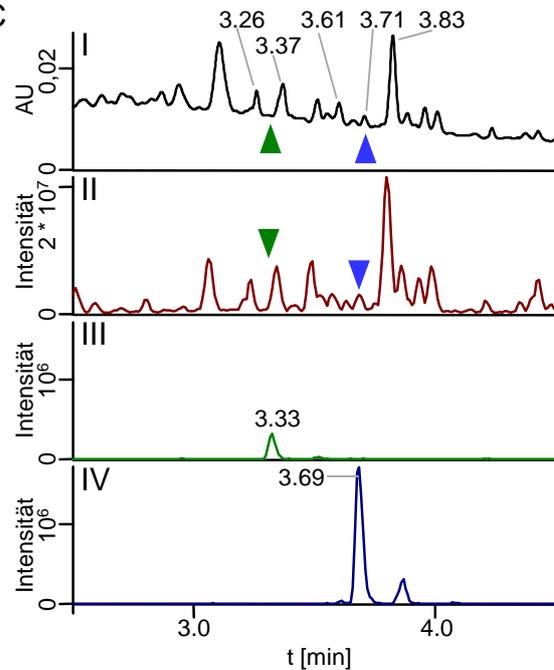
A



B



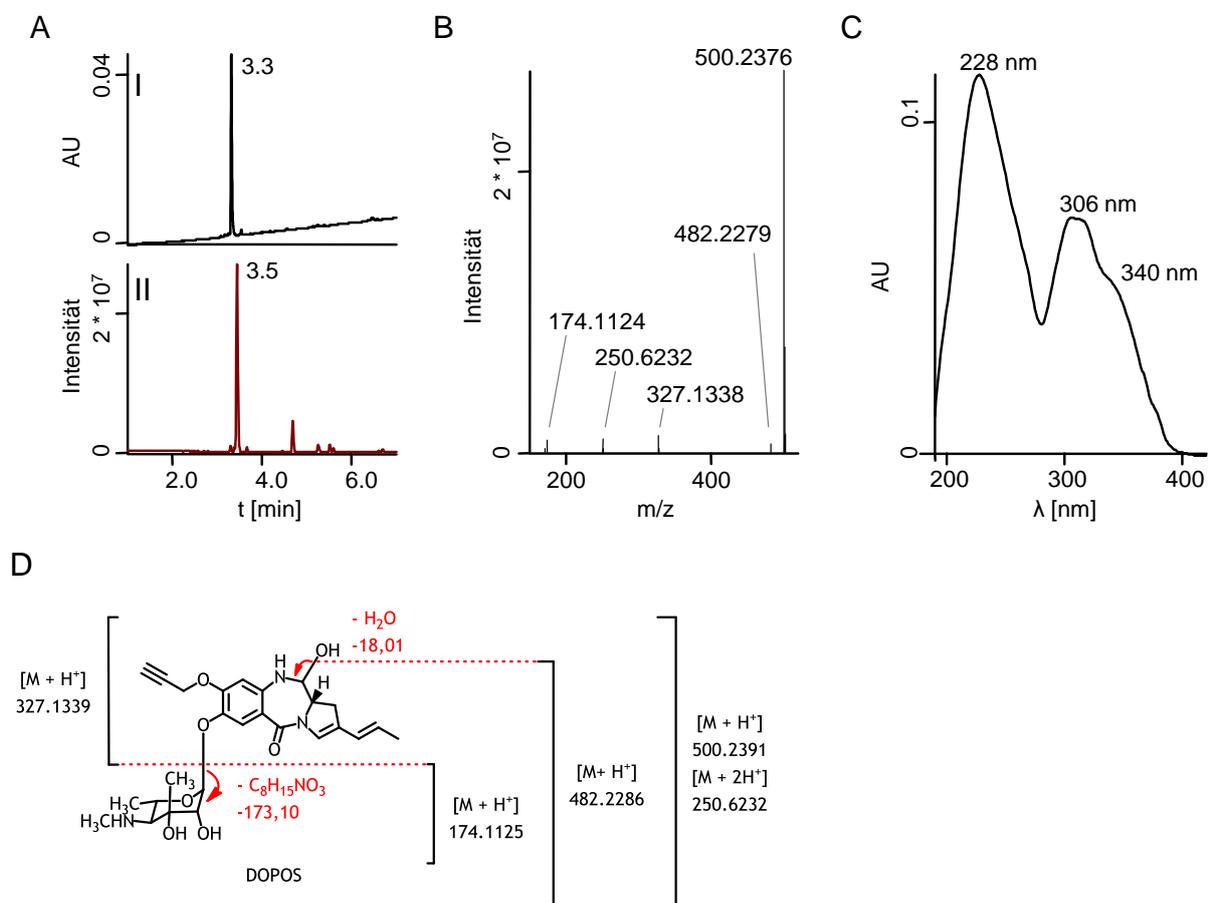
C



**Abbildung 64:** Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition von DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Kulturüberstand; **A)** Reaktionsschema; **B)** HPLC-MS Chromatogramm des Kulturüberstandes einer mit 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure (**59**) gefütterten *Streptosporangium sibiricum* Kultur vor dem Reaktionsansatz; **I)** UVVIS; **II)** BPC; **III)** EIC für DOPOS  $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 5$  ppm; **IV)** EIC für 1,5-Diazido-3-oxapentan-DOPOS-Monoaddukt (**62**)  $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 5$  ppm; **C)** HPLC-MS Chromatogramm des Reaktionsansatz mit Kulturüberstand, EtOH, L-(+)-Ascorbinsäure,  $\text{Cu}^+$  und 1,5-Diazido-3-oxapentan; **C I** bis **C IV** analog **B I** bis **B IV**

#### 4.5.10 Vorläufergesteuerte Biosynthese und Aufreinigung von DOPOS

Die Synthese von 2-Amino-4-propargyloxy-benzoesäure und die Etablierung der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga erlaubte den Ansatz von Produktionskulturen für DOPOS. Produktion und Aufreinigung verliefen erwartungsgemäß und es wurde eine Ausbeute von 6.4 mg/l Kulturvolumen erzielt. Im HPLC-UV-VIS Chromatogramms des Produkts sind nach der Aufreinigung keine weiteren Peaks von Verunreinigungen zu erkennen (siehe Abbildung 65).



**Abbildung 65:** HPLC-MS Chromatogramm aufgereinigten DOPOS. **A I)** UV-VIS; **II)** BPC; **B)** MS/MS Spektrum zum Zeitpunkt  $t = 3.45$  min; **C)** UV-VIS Spektrum zum Zeitpunkt  $t = 3.32$  min; **D)** putative MS/MS Fragmentierung von DOPOS

Das UV-Spektrum ist vergleichbar mit dem UV-Spektrum von Sibiromycin in wässrigem Medium mit einem Maximum bei ca. 300 nm und einer Schulter bei ca. 340 nm. Die erhaltenen Massen im MS/MS-Spektrum stimmen mit denen der erwarteten Fragmente überein (siehe Tabelle 7).

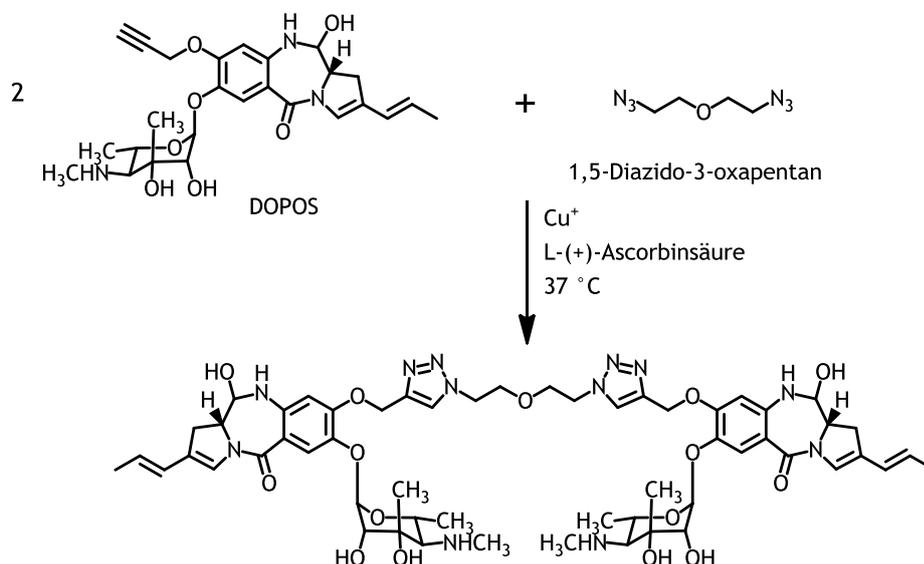
## 4 Ergebnisse

**Tabelle 7:** Putative MS/MS Fragmente von DOPOS und Abweichung der gemessenen von der theoretischen Masse

	Summenformel	theoretische Masse [M + H <sup>+</sup> ]	gemessene Masse	Δ ppm
DOPOS	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	500.2391	500.2376	-1.5
DOPOS - H <sub>2</sub> O	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	482.2286	482.2279	-0.6
DOPOS Aglycon	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	327.1339	327.1338	-0.1
Sibirosamin Fragment	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	174.1125	174.1124	-0.1
		theoretische Masse [M + 2 H <sup>+</sup> ]	gemessene Masse	Δ ppm
DOPOS	C <sub>26</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> <sup>2+</sup>	250.6232	250.6232	0.0

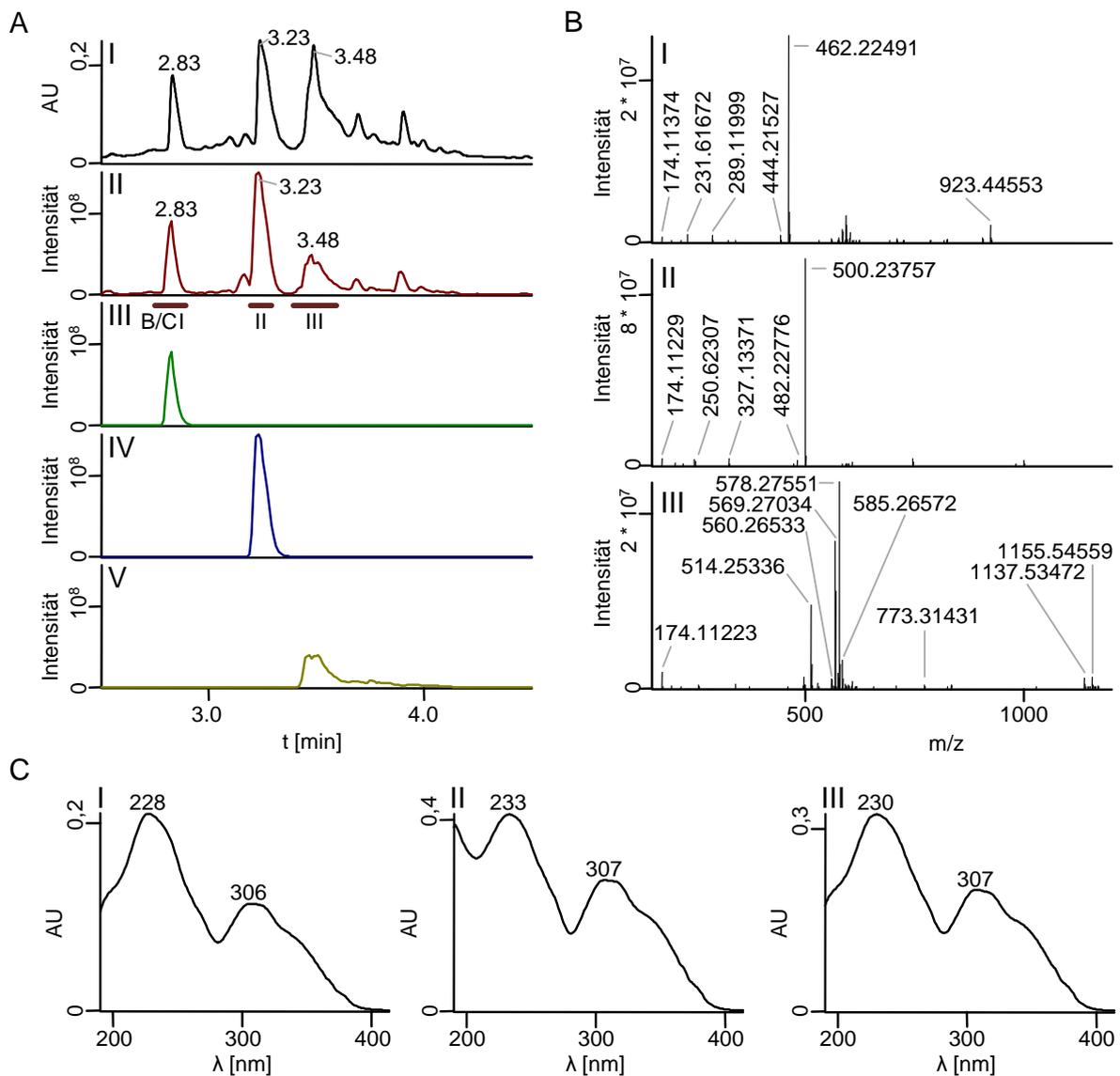
### 4.5.11 Dimerisierung von DOPOS via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition

In der ersten Kopplungsreaktion von DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan im Kulturüberstand war der Linker im deutlichen Überschuss verwendet worden, um den Verlust des Linkers in Nebenreaktionen auszugleichen und damit den Ablauf der Reaktion zu begünstigen. Dieser Überschuss hatte zur Folge, dass ausschließlich das Monoaddukt nachgewiesen werden konnte. In der Kopplung von Reinstoffen wurde DOPOS in einem vierfachen Überschuss verglichen mit dem Linker angesetzt, um die Ausbildung von vollständigen Dimeren zu begünstigen (siehe Abbildung 66).

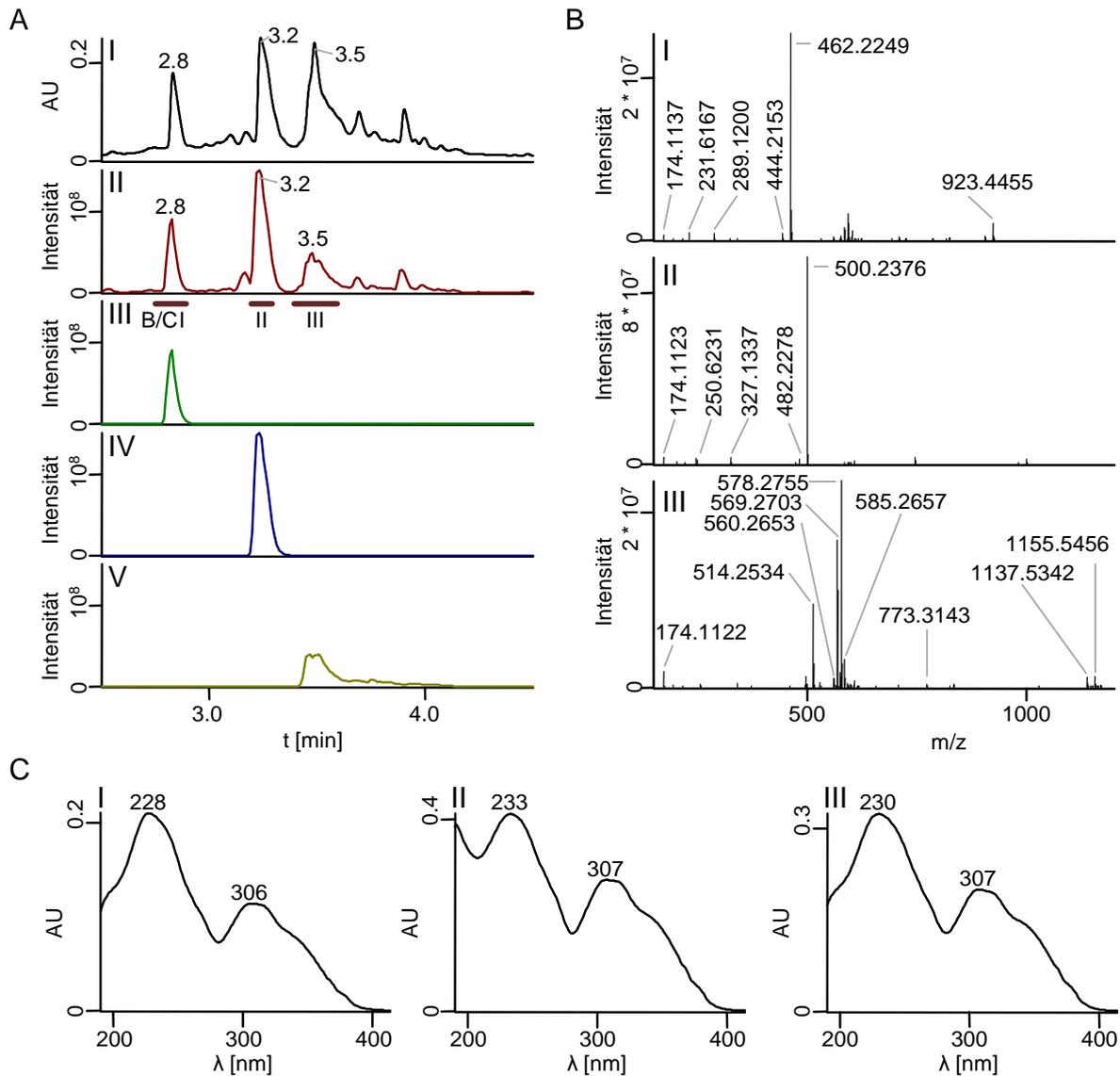


**Abbildung 66:** Reaktionsschema der Dimerisierung von DOPOS über 1,5-Diazido-3-oxapentan als Linker zu **63** via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition.

Im HPLC-UV-VIS/MS Chromatogramm der Analyse der Reaktion zeigten sich drei Hauptpeaks (siehe Abbildung 67). Der zweite Peak bei einer Retentionszeit von 3.2 min, mit einer Masse von 500 zeigt einen deutlichen Anteil erwartungsgemäß unveränderten DOPOS im Reaktionsansatz. Der dritte Peak bei einer Retentionszeit von 3.4 min zeigte die erwartete Masse von Struktur **63**. Im MS/MS-Spektrum entsprechen die auftretenden Massen dem schrittweisen Verlust von H<sub>2</sub>O und Sibiriosamin bis hin zum Aglycon mit zwei Imin-Funktionalitäten an N10-C11.



## 4 Ergebnisse



**Abbildung 67:** HPLC-MS Analyse der Synthese von Struktur **63** via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition von DOPOS und 1,5-Diazido-3-oxapentan; **A**) HPLC-UVVIS/MS Chromatogramm des Reaktionsansatzes; **I**) UVVIS Chromatogramm; **II**) BPC; **III**) EIC für 9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin (**64**) [ $M + H^+$ ]  $\pm$  10 ppm; **IV**) EIC für DOPOS [ $M + H^+$ ]  $\pm$  10 ppm; **V**) EIC für **63** [ $M + 2 H^+$ ]  $\pm$  10 ppm; **B**) Integrierte Massenspektren für die Zeiträume; **I**) 2.75 min bis 2.90 min, entsprechend dem Retentionszeitraum von 9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin (**64**); **II**) 3.20 min bis 3.30 min, entsprechend dem Retentionszeitraum von DOPOS (**64**); **III**) 3.40 min bis 3.60 min, entsprechend dem Retentionszeitraum von **63**; **C**) Integrierte UV-VIS-Spektren analog B I bis B III

Von den vollständig glycosylierten Dimeren wurde jeweils auch die doppelt geladene Masse [ $M + 2H$ ]<sup>2+</sup> gefunden, alle einfach geladenen Massen hatten hierbei eine Abweichung von der theoretischen Masse < 2 ppm (siehe Abbildung 68 und Tabelle 8).

## 4 Ergebnisse

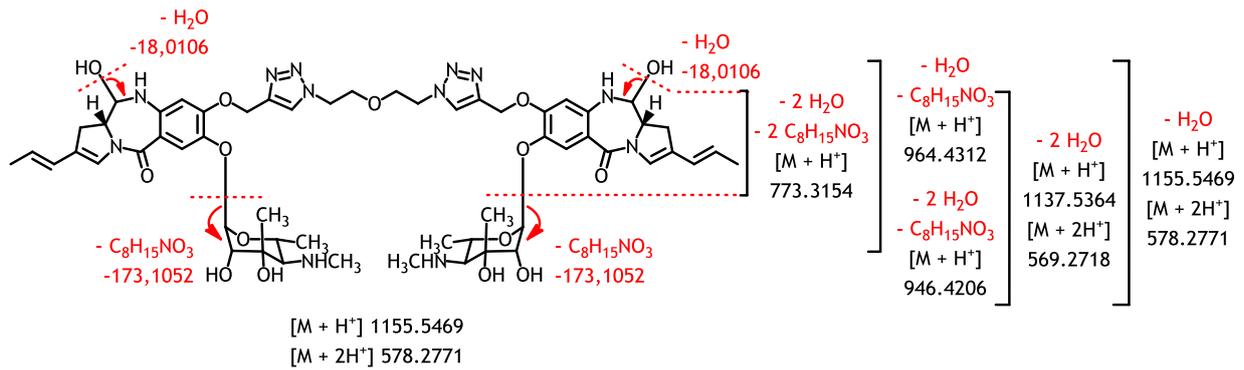


Abbildung 68: Putative MS/MS Fragmentbildung von Struktur 63.

Der erste Peak bei einer Retentionszeit von 2.8 min war überraschend und eine Zuordnung der Masse und der Zerfallsschritte im MS/MS legt einen Verlust des Propargyls von DOPOS zu 9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin nahe (siehe Abbildung 69 und Tabelle 8). Die Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion von DOPOS mit 1,5-Diazido-3-oxapentanon erfolgreich zur Dimerisierung geführt hat. Das in der Reaktion auftretende Nebenprodukt mit der Masse von 9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin (65) verringert den Umsatz zum Dimer ist für sich genommen aber eine weitere Struktur mit interessanten Möglichkeiten für die Dimerisierung.

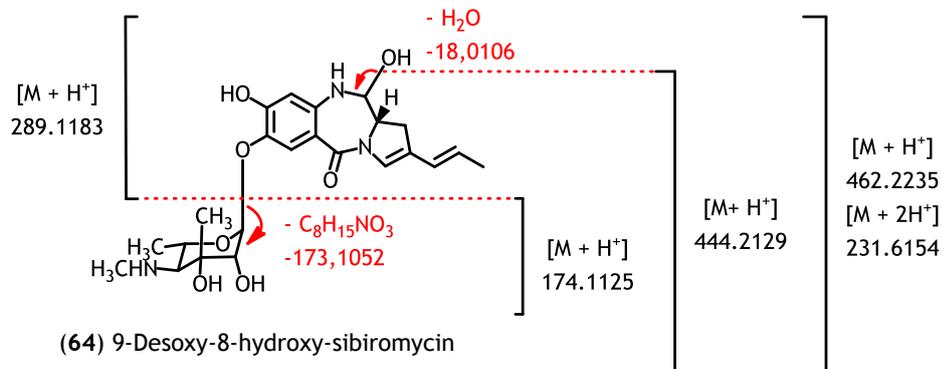


Abbildung 69: Putative MS/MS Fragmentbildung von 9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 8:** HPLC-MS-Analyse des abschließenden Schrittes der Partialsynthese von Struktur **63**, der Dimerisierung von DOPOS mit 1,5-Diazido-3-oxapentan via Kupfer-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition.

Substanz MS/MS-Fragment	Summen- formel	theoretische Masse [M + H <sup>+</sup> ]	gemessene Masse	Δ ppm	Signal- Intensität
<b>Struktur 63</b>					
unmodifiziert	C <sub>56</sub> H <sub>75</sub> N <sub>12</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	1155.5469	1155.5454	-1.3	7.3 * 10 <sup>7</sup>
- H <sub>2</sub> O	C <sub>56</sub> H <sub>73</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	1137.5364	1137.5344	-1.7	8.3 * 10 <sup>7</sup>
- Sibirosamin - H <sub>2</sub> O	C <sub>48</sub> H <sub>58</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	964.4312	964.4296	-1.6	3.5 * 10 <sup>6</sup>
- Sibirosamin - 2 H <sub>2</sub> O	C <sub>48</sub> H <sub>56</sub> N <sub>11</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	946.4206	946.4196	-1.1	3.1 * 10 <sup>6</sup>
Aglycon - 2 H <sub>2</sub> O	C <sub>40</sub> H <sub>41</sub> N <sub>10</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	773.3154	773.3141	-1.7	1.6 * 10 <sup>7</sup>
Sibirosamin Fragment	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	174.1125	174.1122	-1.8	5.5 * 10 <sup>7</sup>
[M + 2 H <sup>+</sup> ]					
unmodifiziert	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>15</sub> <sup>2+</sup>	578.2771	578.2753	-3.2	1.3 * 10 <sup>9</sup>
- H <sub>2</sub> O	C <sub>56</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> <sup>2+</sup>	569.2719	569.2701	-3.0	1.2 * 10 <sup>9</sup>
- 2 H <sub>2</sub> O	C <sub>56</sub> H <sub>72</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> <sup>2+</sup>	560.2665	560.2652	-2.4	7.3 * 10 <sup>7</sup>
	Summen- formel	theoretische Masse [M + H <sup>+</sup> ]	gemessene Masse	Δ ppm	Signal- Intensität
<b>9-Desoxy-8-hydroxy-sibiromycin (64)</b>					
unmodifiziert	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	462.2235	462.2204	-6.7	6.8 * 10 <sup>8</sup>
- H <sub>2</sub> O	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	444.2129	444.2105	-5.5	1.4 * 10 <sup>7</sup>
Aglycon	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	289.1183	289.1168	-5.1	1.8 * 10 <sup>7</sup>

## 5 Diskussion

Pyrrrolbenodiazepine versprechen aufgrund ihrer cytotoxischen Wirkung seit ihrer Entdeckung in den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts eine neuartige Möglichkeit in der Tumortherapie mit großem Potential. Frühe Versuche scheiterten jedoch am kardiotoxischen Verhalten oder der geringen therapeutischen Breite der PBD [73]–[75]. Erst mit der Entwicklung des an Tomaymycin angelehnten vollsynthetischen PBD-Dimers SJG-136 (**32**) [143] konnte ein PBD bis zu klinischen Studien vorgebracht werden [146]–[148]. Parallel zu den bisherigen Arbeiten mit vollsynthetischen Verbindungen rücken inzwischen auch die natürlichen PBD in den Fokus der industriellen Anwendung.

Ziel dieser Arbeit war zum einen die wirtschaftliche Einsetzbarkeit der Tomaymycin-Biosynthese zu verbessern. Hierzu sollte ein industriell nutzbarer Stamm mit einer höheren Produktionsrate, einer kürzeren Kultivierungsdauer und einer verminderten Umsetzung von Tomaymycin (**2**) zu Oxotomaymycin (**21**) konstruiert werden. Zum anderen sollte das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster identifiziert und darauf aufbauend eine Möglichkeit der Biosynthese neuer Tomaymycin-analoger Strukturen eröffnet werden.

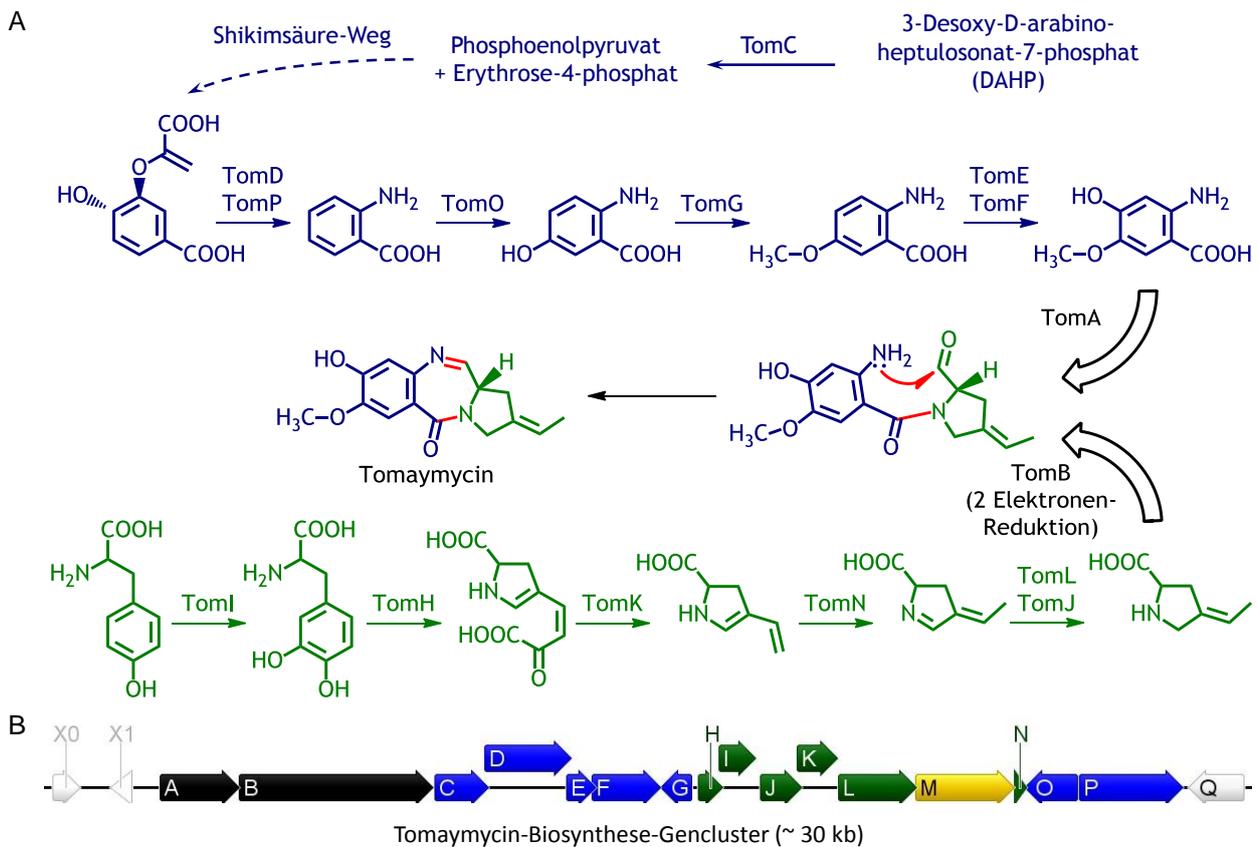
## 5.1 Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters

### 5.1.1 Die Tomaymycin Biosynthese

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Sequenzierung des *Streptomyces* spec. FH6421-Genoms ermöglichte die Lokalisierung der Tomaymycin-Biosynthese-Gene basierend auf den Annahmen, dass a) Biosynthese-Gene von Sekundärmetaboliten in Actinomyceten auf dem Genom allgemein in direkter Abfolge zueinander lokalisiert in sogenannten Clustern vorliegen [149] und b) die im Cluster vorhandenen funktionalen Gene eine hohe Ähnlichkeit zu Genen aus dem Anthramycin Biosynthese-Gencluster zeigen [58].

Eine erste erfolgreiche Annotation des Clusters und ein darauf basierender Ablauf der Biosynthese war bereits formuliert, als die Publikation des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters aus *Streptomyces achromogenes* durch Li *et al.* [133] den Abgleich mit Daten aus einem anderen *Streptomyces*-Stamm zuließ. In anschließenden Sequenzanalysen wurde das Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster mit dem korrespondierenden Cluster aus *S. achromogenes* verglichen. Es zeigte sich, dass beide Cluster in identischer Abfolge und Ausrichtung der Gene organisiert vorliegen. Die Identität/Ähnlichkeit der kodierten Proteinsequenzen beider Cluster liegt zwischen 53 % / 63 % für TomP und 89 % / 94 % für TomF.

Da zum einen die Ähnlichkeit der einander entsprechenden Proteine hoch ist und zum anderen die Cluster eine identische Organisation aufweisen, kann man von einem einheitlichen Biosyntheseweg in beiden *Streptomyces*-Stämmen ausgehen (siehe Abbildung 70).



**Abbildung 70:** Tomaymycin-Biosynthese; A) möglicher Biosyntheseweg (nach Li *et. al.* [133]); B) Tomaymycin-Biosynthese Gencluster in *Streptomyces spec.* FH6421 mit den Genen *orfX0*, *orfX1* und *tomA* bis *tomQ*

### 5.1.2 Heterologe Expression des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters

Als Grundlage für die genetischen Arbeiten am Tomaymycin-Biosynthese-Cluster und für die spätere Produktionsoptimierung auf genetischer Ebene musste zunächst ein geeigneter Stamm ausgewählt werden. In der vorliegenden Arbeit erwies sich der Wildtyp-Stamm *Streptomyces spec.* FH6421 als genetisch nicht zugänglich. Konjugationsreaktionen erbrachten kaum Exkonjuganten, welche zudem deutliche Wachstumsdefizite zeigten. Sie wuchsen sehr langsam, bildeten kein verzweigtes Myzel, kein Luftmyzel und keine Sporen mehr aus. Im Gegensatz zu etablierten, optimierten Laborstämmen treten solche Einschränkungen bei Wildtyp-Stämmen sehr häufig auf [87], [150].

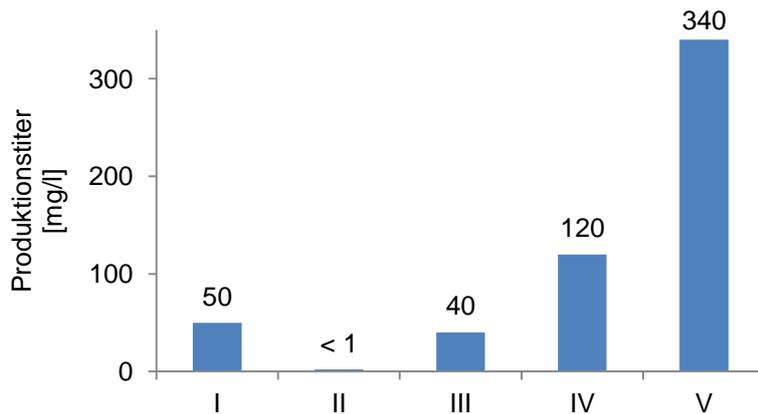
Eine Alternative zur nativen Expression des Clusters und zur genetischen Modifikation im Wildtyp-Stamm stellt die Isolierung des Clusters dar. Ein isoliertes Cluster kann über Klonierungen z.B. in spezialisierte *E. coli*-Stämme eingebracht

werden und ist dort deutlich leichter zugänglich für genetische Manipulationen [151]. Darüber hinaus eröffnet die Isolierung des Clusters bei der folgenden, heterologen Expression die Möglichkeit mit einer Vielzahl unterschiedlicher Vektoren und Laborstämmen den Produktionstiter optimieren zu können [152].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Optimierung der Tomaymycin-Expression die *Streptomyces*-Stämme *S. coelicolor* A3(2), *S. coelicolor* M512, *S. albus* J1074 und *S. lividans* TK24 getestet. Bei diesen Stämmen handelt es sich um gut etablierte Laborstämmen [19], [131], [153]. *S. coelicolor* M512 ist eine Variante von *S. coelicolor* M145, bei welcher die Biosynthese-Gencluster für Prodiginin und Actinorhodin deletiert wurden, um konkurrierende Biosynthesewege in der heterologen Expression von Sekundärmetaboliten auszuschalten. *S. albus* J1074 wurde aus *S. albus* G1 durch Mutagenese und Screening auf Verlust des *Sal*GI Restriktions-Modifikationssystem gewonnen [122]. Unter den sequenzierten *Streptomyces*-Stämmen trägt er das kleinste Genom und ist aufgrund seiner guten Produktionseigenschaften ein häufig genutzter Stamm für die heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern [152].

Als *E. coli*/*Streptomyces*-Shuttle-Plasmide für die Expression wurden das integrative Cosmid pOJ436, das replikative Cosmid pOJ446 [90] und das im Rahmen dieser Arbeit von pOJ446 abgeleitete replikative Plasmid pStW102 eingesetzt. Verschiedene Kombinationen von Stämmen und Plasmiden wurden getestet und mit der Expression des Wildtyps (50 mg Tomaymycin pro Liter Kulturmedium) verglichen. Die Integration des Tomaymycin Biosynthese-Genclusters in die  $\Phi$ C31 Phagen-Attachment-Site des Genoms von *S. coelicolor* A3(2) oder *S. lividans* TK24 führte zu einer nachweisbaren heterologen Expression, deren Ausbeute (1 mg/l) aber deutlich unter der des Wildtyps lag. Diese stark verminderte Ausbeute lässt sich z.B. durch Positionseffekte im Genom erklären. Der Transfer des Biosynthese-Genclusters in den replikativen *low copy*-Shuttlevektor pOJ446 mit dem SCP2\* ori stellte die Ausbeute in *S. coelicolor* A3(2) oder *S. lividans* TK24 auf wildtypisches Niveau wieder her (40 mg/l). Eine Verdreifachung der Ausbeute (120 mg/l) ließ sich durch die Verwendung von pOJ446 in *S. albus* J1074 als Wirtstamm erzielen. Für die gewählte Expressionsstrategie über die nativen Promotoren der Biosynthesegene im Gencluster selbst waren die Plasmid-eigenen Promotoren (T3 und T7) nicht notwendig. Diese beiden Promotoren bewirken die konstitutive Expression des Inserts von beiden Insertionsseiten aus, was im konkreten Fall die gewünschte

Expression negativ beeinflussen kann. Um das gewählte Expressionsplasmid zu optimieren, wurde ein 4 kb großes Plasmidfragment mit T3- und T7-Promotor entfernt. Mit dem erhaltenen Plasmid pStW102 konnte in *S. albus* J1074 eine weitere Produktionssteigerung nahezu um den Faktor 3 erzielt werden (340 mg/l). Abschließend konnte die Produktion mit allen Optimierungsschritten gegenüber dem Wildtypstamm auf das siebenfache erhöht werden (siehe Abbildung 71).



**Abbildung 71:** Optimierung der Tomaymycinproduktion durch heterologe Expression des Tomaymycinclusters und Vektor/Stamm-Optimierungen.

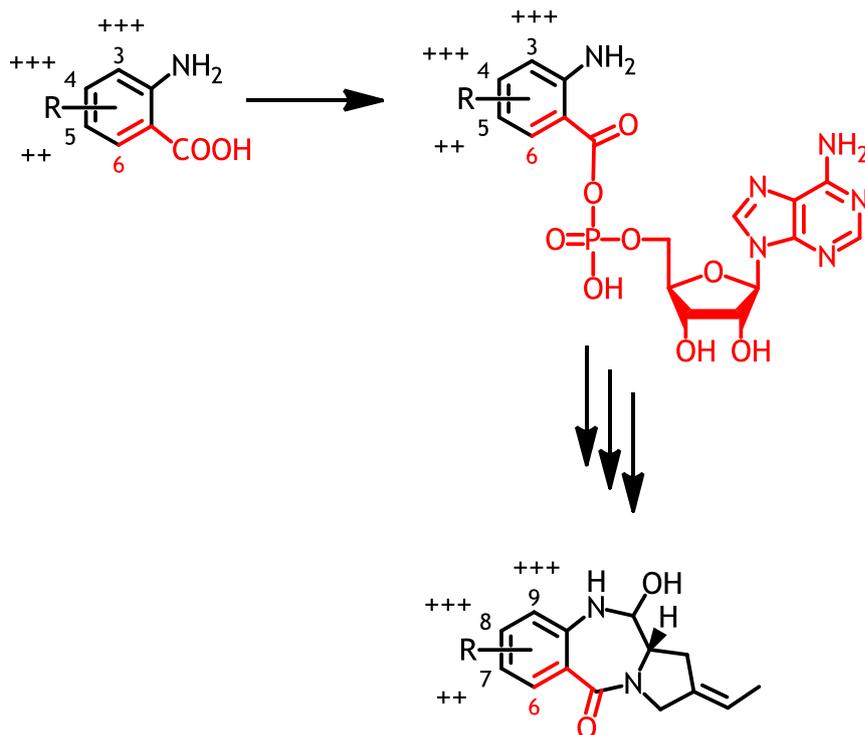
- I) *Streptomyces* spec. FH6421 (wt)
- II) *S. lividans* TK24::pOJ436tomaCluster
- III) *S. lividans* TK24 / pOJ446tomaCluster
- IV) *S. albus* J1074 / pOJ446tomaCluster
- V) *S. albus* J1074 / pStW102tc

Im Vergleich zum Wildtypstamm wächst *S. albus* J1074 deutlich schneller, wodurch der Höhepunkt der Produktionskurve bereits am zweiten Tag erreicht wird, welcher beim Wildtyp zwischen Tag drei und vier liegt. Mit der Kombination aus *S. albus* J1074 und dem optimierten Vektor pStW102 konnte somit im Rahmen dieser Arbeit ein stabiler, schnell wachsender, Produzentenstamm mit deutlich erhöhter und früher erreichter maximaler Tomaymycin-Ausbeute konstruiert werden [154].

### 5.1.3 Mutasyntese von Tomaymycin-Analoga durch Austausch des A-Rings

In NRPS werden Aminosäuren von den Adenylierungsdomänen selektiert und durch die Bildung eines Aminoacyl-AMP-Esters aktiviert. Die Selektivität bzw. Toleranz dieses Prozesses bestimmt die Bandbreite an akzeptierten Aminosäuren während der NRP-Synthese. So konnten Stachelhaus *et al.* [102] zeigen, dass der Austausch von Aminosäuren innerhalb der Phenylalanin-bindenden Tasche der A-Domäne von PheA aus der Gramacidin S-Biosynthese die Spezifität der Substraterkennung relaxiert oder ändert.

Durch Fütterung unterschiedlich derivatisierter Anthranilsäuren konnte im Verlauf dieser Arbeit ein Bild der Selektivität der A-Domäne vom TomA gewonnen werden. Entscheidend sind Größe und Position der Anthranilsäure-Substituenten. An den Positionen 3, 4 oder 5 können zugefütterte Anthranilsäuren mit relativ großen Substituenten versehen sein (z.B. Bromierung oder Methoxylierung) und werden mit hohen Ausbeuten in das Pyrrolobenzodiazepin inkorporiert. Dies gilt jedoch nur, wenn nur eine einzelne Derivatisierung vorliegt. Bei Doppel- oder Dreifachsubstitutionen (z.B. **M15**: 3,5-Dibromanthranilsäure oder **M24-M26**: Dimethoxyanthranilsäuren) findet kein Einbau mehr statt. Ab einer gewissen Größe werden auch Einzelsubstituenten nicht mehr inkorporiert (z.B.: **M16**: 5-Iodanthranilsäure oder **M31**: 5-*tert*-Butylanthranilsäure). Position 6 innerhalb der Anthranilsäure ist kritisch für den Einbau in das Pyrrolobenzodiazepin. Substituenten, die an Position 3 bis 5 akzeptiert werden (z.B. Chlorierung oder Methoxylierung), verhindern an Position 6 den Einbau der Anthranilsäure in ein Pyrrolobenzodiazepin. Die Adenylierung der Anthranilsäurederivate erfolgt an der Carboxylgruppe in unmittelbarer Nähe zur Position 6. Die Ergebnisse der Mutasynteseversuche legen nahe, dass Substitutionen an Position 6 dazu führt, dass die A-Domäne die Anthranilsäure nicht mehr als Substrat erkennt oder dass die Adenylierung sterisch blockiert ist (vgl. Abbildung 72). Die Elektronegativität der Substituenten scheint keinen negativen Einfluss auf die Biosynthese zu haben, da zum Beispiel 4,5-Difluoranthranilsäure sehr gute Einbauraten zeigt.



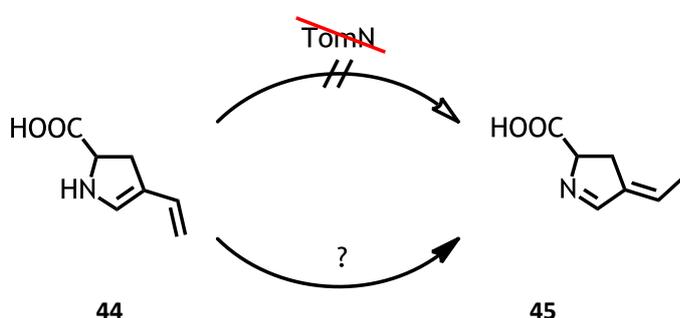
**Abbildung 72:** Toleranz der A-Domäne von TomA gegenüber Modifikationen des Substrats Anthranilsäure bei Mutaysynthese im heterolog exprimierten Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster. Position 6 der Anthranilsäure im rot markierten Bereich stellt die kritische Position bei der Erkennung des Substrats durch die A-Domäne dar. Die Toleranz gegenüber Substitutionen ist hervorgehoben (++/+++).

Überraschend war, dass 4-Hydroxy-5-methoxyanthranilsäure, welche genau dem Substituierungsmuster von Tomaymycin entspricht, nicht inkorporiert wurde. Dies kann daran liegen, dass dieses Derivat nicht in den heterologen Wirtstamm aufgenommen wird, oder kann ein Hinweis darauf sein, dass die Modifikationen des A-Rings erst nach der Assemblierung des Pyrrolbenzodiazepins ablaufen, da TomA die bereits vollständig modifizierte Anthranilsäure nicht akzeptiert. Der in dieser Arbeit etablierte *in vitro*-Assay der NRPS TomA und TomB bietet hierbei eine gute Möglichkeit in weiterführenden Studien die Toleranz von TomA gegenüber 4-Hydroxy-5-methoxyanthranilsäure zu testen.

#### 5.1.4 Mutaysynthese von Tomaymycin-Analoga durch Austausch des C-Rings

Um die Mutaysynthese des C-Rings zu ermöglichen, und damit die Toleranz der A-Domäne von TomB gegenüber unterschiedlichen unnatürlichen Substraten zu

testen, wurde *tomN* aus dem Cluster deletiert. Dieser Knock-out hatte jedoch keine Änderung im Produktionsprofil zur Folge; Tomaymycin und Oxotomaymycin wurden weiterhin unverändert gebildet. Es gibt drei Möglichkeiten diese Beobachtung zu erklären. Die inzwischen von Li *et al.* [133] annotierte Tautomerase-Aktivität (siehe Abbildung 73) wurde einzig von Sequenzvergleichen abgeleitet. Daher besteht die Möglichkeit, dass in der Tomaymycin-Biosynthese nicht *TomN* selbst diese Funktion übernimmt. Denkbar ist auch, dass eine native Tautomerase des Wirtsstammes die Umsetzung in der Abwesenheit von *TomN* katalysiert. Eine dritte Möglichkeit ist die spontane Umlagerung in Form einer Imin-Enamin-Tautomerie [155].



**Abbildung 73:** Die Umlagerung von Struktur **44** zu Struktur **45** läuft trotz des Knock-out von *tomN* ab.

Da mit der *tomN*-Deletion die Mutasynthese nicht ermöglicht werden konnte, wurden *tomH* und *tomI* deletiert. Dieser Knock-out führte wie erwartet zum Verlust der Tomaymycin Produktion im heterologen Stamm. Über die Fütterung von 4-Methylprolin oder 4-Methylenprolin, die strukturell sehr ähnlich zum nativen C-Ring sind, konnte die Produktion eines Pyrrolobenzodiazepins wiederhergestellt werden. Andere Prolinderivate wurden nicht akzeptiert. Dies spricht für eine hohe Spezifität der A-Domäne von TomB.

### 5.1.5 Knock-out-Studien am Tomaymycin-Biosyntheseweg

Um die native Produktion von Tomaymycin zu unterbinden und die Möglichkeit zur Mutasynthese zu etablieren, wurden aus dem Tomaymycin-Biosynthese-Gencluster die Gene *tomC* bis *tomG* deletiert. Die erhaltenen Produkte der heterologen Mutasynthese in *S. albus* J1074 zeigten als einzige verbleibende Modifikation des A-Rings die Hydroxylierung an Position 7. Die Hydroxylierung an Position 8 sowie die

Methylierung der Hydroxylgruppe an Position 7 konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass die O-Methyltransferasefunktion sowie die Hydroxylierungsfunktion im deletierten Genbereich kodiert werden. Mit dem *single* Knock-out von *tomO* entfiel auch die Hydroxylierung an Position 7, sodass bei Fütterung von Anthranilsäure der A-Ring des entstandenen Pyrrolbenzodiazepins vollständig unmodifiziert blieb. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien stehen im Einklang mit den zeitgleich von Li *et al.* [133] durchgeführten Versuchen und dem postulierten Biosyntheseweg (siehe Abbildung 70).

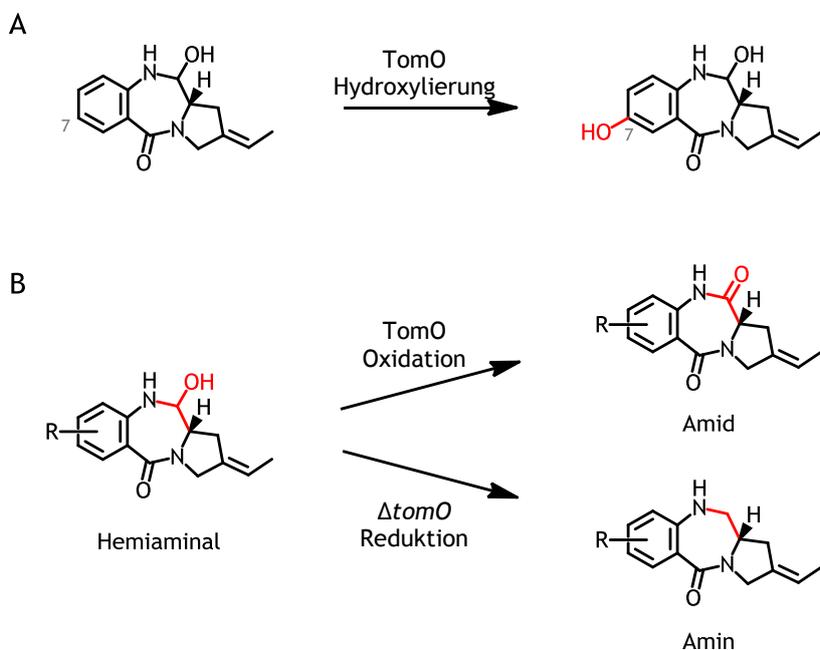
### 5.1.6 Oxidation von Tomaymycin zu Oxotomaymycin und Reduktion als alternativer Modifikationsweg

In der industriellen Produktion von Naturstoffen wirkt sich der native Abbau des Zielprodukts negativ auf die Ausbeute aus. Bei Tomaymycin tritt im Wildtyp-Stamm ein hoher Verlust durch Oxidation auf. Oxidiertes Tomaymycin verliert die Fähigkeit DNA zu alkylieren, den Hauptwirkungsmechanismus seiner Toxizität. Vermutlich handelt es sich bei der Oxidation um einen Resistenzmechanismus, welcher den Stamm vor zu hohen Konzentrationen seines eigenen Antibiotikums schützt [39].

In industriellen Prozessen ist Oxotomaymycin problematisch, da es sich aufgrund der hohen physikalischen Ähnlichkeit mit Tomaymycin nur schwer von diesem trennen lässt. Bei chemischen Prozessen zur Produktmodifikation stellt verbliebenes Oxotomaymycin eine störende reaktive Verunreinigung dar.

Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Oxidationsmechanismus zu identifizieren und nach Möglichkeit auszuschalten. Die Oxidation trat auch bei der heterologen Expression des Clusters in unterschiedlichen *Streptomyces* Stämmen auf. Entweder handelt es sich um eine Funktionalität, welche wildtypisch in allen eingesetzten Stämmen genomisch vorliegt oder die verantwortliche Oxidase wird über ein Gen auf dem heterolog eingebrachten Cluster kodiert. Da die Oxidation jedoch nur bei bestimmten natürlichen Pyrrolbenzodiazepinen beobachtet wird (Oxotomaymycin, RK-1441B, Limazepine A und Oxoprothracarcin) [39], lag die Vermutung nahe, dass es sich um einen spezifischen Mechanismus bestimmter Produzenten handelt. Über *in silico*-Sequenzvergleiche konnte für *tomO* eine hohe

Ähnlichkeit zu Oxidasen festgestellt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Deletion von *tomO* führte zum Verlust der Oxidation von Tomaymycin in der heterologen Mutasyntese (zum Beispiel mit dem Mutasynton Anthramycin). Überraschenderweise nahm der Produktionstiter des erwarteten Pyrrolobenzodiazepins im Verlauf der Mutasyntese nicht kontinuierlich zu, sondern fiel, ähnlich wie vor dem *tomO*-Knock-out, nach dem zweiten oder dritten Tag der Kultivierung wieder ab. Über NMR-Analyse konnte bei einem der isolierten Produkte die Reduktion des Hemiaminals zum Amin festgestellt werden. Diese Reduktion stellt vermutlich einen zweiten, zur Oxidation alternativen Resistenzmechanismus dar, der die DNA-alkylierende Funktion des Pyrrolobenzodiazepins zerstört. Weitere Versuche zeigten, dass die Reduktion im sehr geringen Maße auch in einem Stamm mit wildtypischer Oxidationsfunktionalität auftritt, nach *tomO* Knock-out jedoch deutlich verstärkt ist. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass die Oxidation den vorrangigen Resistenzmechanismus des Produzenten gegen sehr hohe Konzentrationen seines eigenen Antibiotikums darstellt, dass den *Streptomyces* Stämmen mit der Reduktion aber ein zweiter, alternativer Resistenzmechanismus zur Verfügung steht (siehe Abbildung 74).



**Abbildung 74:** Doppelfunktion von TomO: **A)** In der nativen Tomaymycin-Biosynthese hydroxyliert TomO das Pyrrolobenzodiazepin an Position C7; **B)** In der Anwesenheit von TomO erfolgt die Inaktivierung des Pyrrolobenzodiazepines über die Oxidation des N10-C11 Hemiaminals zum Amid, nach der Deletion von *tomO* wird das Hemiaminal zum Amin reduziert.

Diese Reduktionsfunktion kann über ein genomisch kodiertes *Streptomyces*-eigenes Enzym bewerkstelligt sein. Es kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt auch nicht ausgeschlossen werden, dass im Tomaymycin-Cluster selbst eine Reduktase kodiert ist.

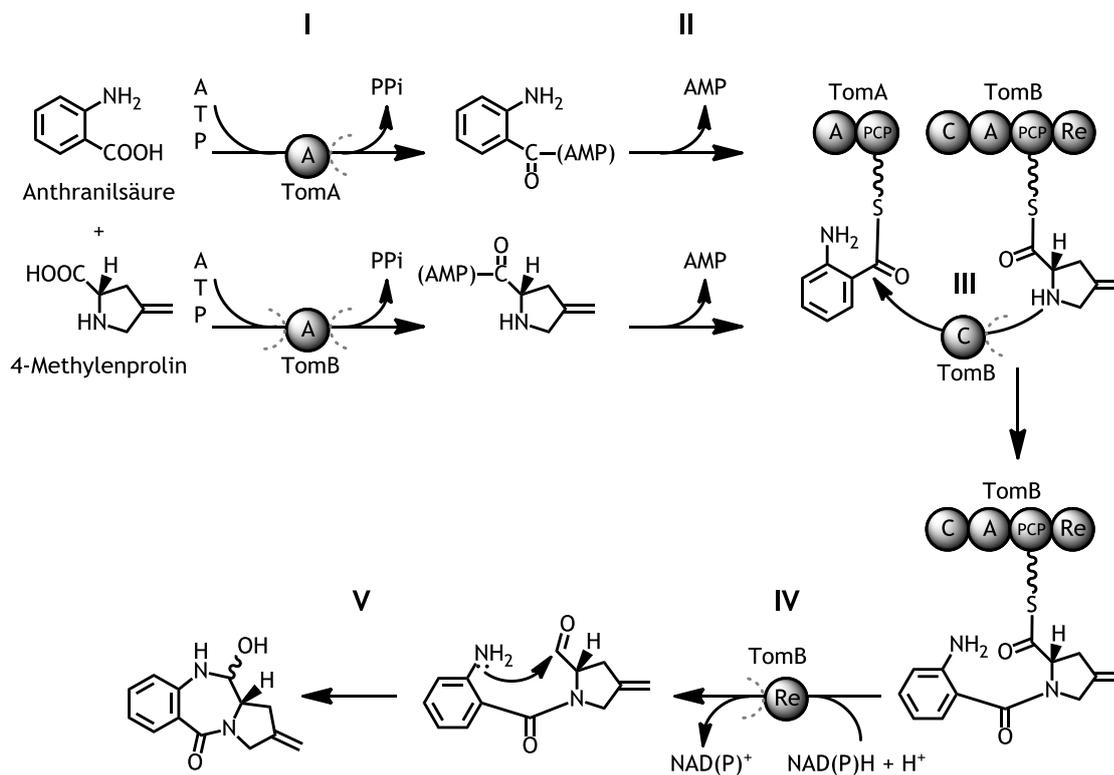
Die Doppelfunktion von TomO und die Redundanz in der inaktivierenden Modifikation von Tomaymycin lassen keine direkte biotechnologische Möglichkeit, das Problem der Oxotomaymycinproduktion zu lösen. Zum einen führt der Knock-out von *tomO* dazu, dass kein vollständiges Tomaymycin mehr synthetisiert wird, zum anderen wirft das im Fall eines *tomO* Knock-outs auftretende reduzierte Tomaymycin als Nebenprodukt mit ebenfalls hoher Ähnlichkeit zum Zielprodukt vergleichbare Probleme wie die oxidierte Form auf.

## 5.2 Heterologe Expression von TomA und TomB

Als zweites Thema dieser Arbeit wurde die Tomaymycin-Assemblierung *in vitro* durch die exprimierten NRPS TomA und TomB bearbeitet. Die Beobachtung enzymatischer Prozesse unter definierten Bedingungen in einem auf ein Minimum an Komponenten reduzierten System bietet die Möglichkeit, die Funktionalitäten einer Biosynthese zu isolieren, sie klar einzelnen Enzymen zuzuordnen und sie detailliert zu untersuchen.

Die heterolog exprimierten NRPS liegen zuerst als Apoenzyme vor. Die Aktivierung zum Holoenzym erfolgt über den Transfer einer Phosphopantetheinyl-Gruppe (PPan). Die verwendete Phosphopantetheinyltransferase MtaA entstammt dem Myxothiazol-Biosynthese-Gencluster aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 [125]. Trotz des hohen verwandschaftlichen Abstandes zwischen *Streptomyces* spec. FH6421 und *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 ist das heterolog koexprimierte MtaA aufgrund seiner relaxierten Substratspezifität in der Lage, die NRPS TomA und TomB zu aktivieren.

Die heterologe Expression und Aktivierung von TomA und TomB ermöglichte die *in vitro*-Rekonstitution der Pyrrolobenzodiazepin-Assemblierung aus Anthranilsäure und Methylenprolin. Dies bedeutet, dass im etablierten *in vitro*-System folgende Schritte ablaufen: (I) die Anthranilsäure und das 4-Methylenprolin werden von den A Domänen der Peptidsynthetasen TomA und TomB erkannt und unter Abspaltung jeweils eines Diphosphats von ATP adenyliert. (II) Die PCP von TomA und TomB werden unter AMP-Abspaltung beladen. (III) Die C-Domäne von TomB katalysiert die Kondensation der zwei Aminosäuren. (IV) Das so entstandene, aber noch an die PCP von TomB gebundene Dipeptid wird, katalysiert durch die Re-Domäne von TomB, unter Aufwendung von NADH in einer Zwei-Elektronen-Reduktion abgelöst. (V) Nach der Freisetzung von der Peptidsynthetase reagiert das entstandene transiente Aldehyd intramolekular zu einem Hemiaminal ab und das Diazepin, der B Ring, wird ausgebildet [50] (vergleiche Abbildung 75). Die Reduktive Ablösung von der NRPS mit anschließender spontaner intramolekularer Ringbildung kann neben den Pyrrolobenzodiazepinen so zum Beispiel auch bei Saframycin [156] und Nostocyclopeptid [157] beobachtet werden, deren Biosynthese-Systeme ebenfalls beinhalten terminale Re-Domänen beinhalten.



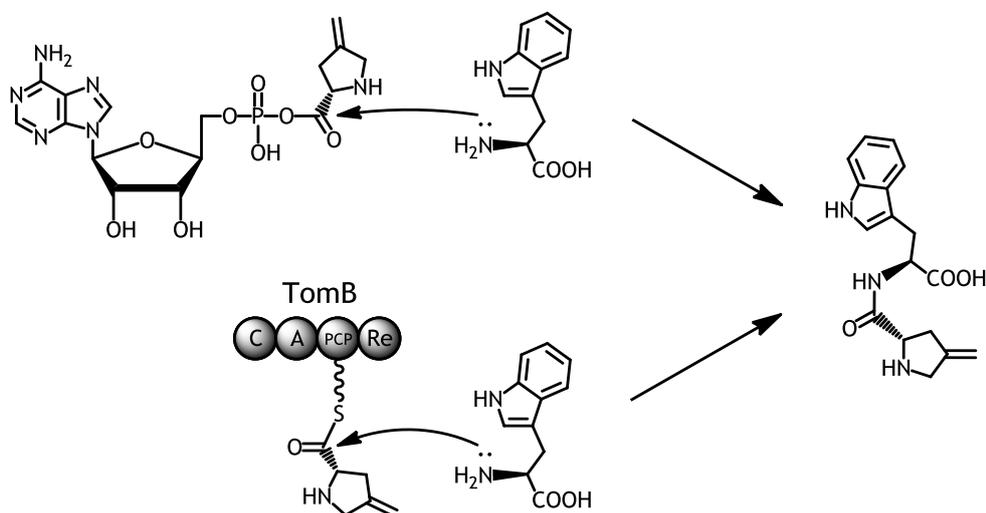
**Abbildung 75:** *In vitro*-Assemblierung von Anthranilsäure und 4-Methylenprolin zu einem Pyrrolobenzodiazepin mittels TomA und TomB. Die jeweils enzymatisch aktiven Domänen sind zur Verdeutlichung an den Reaktionspfeilen aufgeführt. **I)** Bildung des Aminoacyl-Adenylat-Intermediats durch die jeweilige A-Domäne; **II)** Beladung der jeweiligen PCP mit einer Aminosäure unter Ausbildung eines Thioesters und Abspaltung von AMP; **III)** Kondensation zum Dipeptid **IV)** Ablösung des Dipeptids in einer zwei-Elektronen-Reduktion unter Aufwendung von NAD(P)H; **V)** intramolekulare Ringbildung zwischen terminalem Aldehyd und Amin.

Die erfolgreiche Umsetzung der unnatürlichen Substrate zum Pyrrolobenzodiazepin konnte mittels HPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden, erfolgte jedoch nur mit geringer Ausbeute. Da keine Referenzsubstanz vorlag, war eine exakte Quantifizierung des Produkts nicht möglich.

Zusätzlich zum erwarteten Produkt wurden zwei deutlich stärkere Peaks unterschiedlicher Retentionszeit mit der Masse der beiden möglichen Dipeptide aus Anthranilsäure und Methylenprolin gefunden. In einem Folgeexperiment wurden die beiden NRPS TomA oder TomB einzeln eingesetzt, wobei für jeden NRPS-Ansatz in der HPLC-MS-Analyse nur einer der beiden Peaks auftrat. Diese Versuche lassen vermuten, dass eine isolierte NRPS in der Lage ist, eines der beiden möglichen Dipeptide zu bilden.

Die Ausbildung dieser Dipeptide lässt sich durch das Auftreten einer reaktiven Zwischenstufe, entweder im Verlauf der Adenylierung oder der Beladung der

PCP-Domäne erklären, die mit einer freien Aminosäure zum Dipeptid abreagiert. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine dritte, strukturell nicht verwandte Aminosäure, Tryptophan, dem Versuchsansatz im Überschuss zugesetzt. Dies führte zur Ausbildung der Massen eines Dipeptids aus Tryptophan und Anthranilsäure, sowie eines Dipeptids aus Tryptophan und Methylenprolin. Jede dieser beiden Massen konnte nur einmal detektiert werden, was den Rückschluss zulässt, dass die Richtung des Peptidschlusses festgelegt ist. Aus den Versuchen lässt sich nicht ableiten, zu welchem Zeitpunkt in der Beladung der NRPS eine reaktive Spezies auftritt, welche den vermuteten nukleophilen Angriff der freien Aminosäure und damit die Kondensationsreaktion zum Dipeptid ermöglicht. Sie kann direkt nach der Aktivierung des Edukts durch die A-Domäne zwischen der freien Aminosäure und dem Aminoacyladenylat ablaufen, nach der Beladung der PCP-Domäne am Thioester (siehe Abbildung 76) oder während einer der ablaufenden Reaktionen. Eine Klärung dieser Frage wäre durch die Expression einer isolierten A-Domäne möglich. Im Fall einer Reaktion während der Aminoacyladenylat-Bildung oder zwischen der freien Aminosäure und dem Aminoacyladenylat selbst könnte die Ausbildung des Dipeptids dann bereits beobachtet werden.



**Abbildung 76:** Mögliche Reaktionswege der Dipeptidbildung im TomA/TomB *in vitro*-Assay mit zugesetztem Tryptophan am Beispiel von TomB mit 4-Methylenprolin.

In zahlreichen NRPS- oder PKS-Biosynthesegenclustern werden Typ II-Thioesterasen (TEII) kodiert, solitäre hydrolytisch aktive Enzyme. Sie unterscheiden sich von den Typ I-Thioesterasen, die Teil der Megasyntase sind, durch ihr Auftreten als einzelnes Modul pro Protein. TEII sind meist nicht essentiell für ihren jeweiligen

Biosyntheseweg, ihr Verlust führt jedoch häufig zu einer deutlichen Verringerung der Produktionsrate [158]. Für TEII wurde beschrieben, dass sie eine Rolle in der Substratselektion spielen, die Produktfreisetzung katalysieren und falsche oder falsch prozessierte, an die Megasyntase gebundene Substrate entfernen können, welche die Funktion der Biosynthesemaschinerie hemmen [159]. Schwarzer *et al.* konnten zeigen, dass die TEII der Bacitracin- und des Surfactin-Biosynthese-Gencluster in der Lage sind, Aminoacyl- und Peptidyl-PCPs zu hydrolysieren [160]. Yeh *et al.* konnten in Versuchen mit der TEII TycF aus *Brevibacillus brevis* belegen, dass diese in der Lage ist, blockierende Substrate von der PCP-Domäne zu hydrolysieren [161]. Im Tomaymycincluster wurde keine TEII gefunden und die hohen Erträge in heterologen Wirten legen nahe, dass für die Tomaymycin-Biosynthese keine spezifische TEII notwendig ist. Würden falsch aktivierte und gebundene Substrate in Abwesenheit einer TEII unter Einfluss einer zweiten, beliebigen Aminosäure abreagieren, würde dies das Fehlen der TEII kompensieren. Bei den beobachteten, unspezifisch gebildeten Nebenprodukten könnte es sich also um das Produkt einer NRPS-eigenen Korrekturfunktion handeln, die entweder aufgrund der nicht passenden Substrate oder zellferner, suboptimaler Reaktionsbedingungen den Großteil der Edukte umsetzt und sowohl bei TomA und TomB auftritt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass ein funktionales *in vitro*-System etabliert wurde, welches die Bildung von Pyrrolbenzodiazepinen katalysiert. Die unerwartete Ausbildung von Dipeptiden lässt den Rückschluss auf eine reaktive Spezies im Ablauf der Biosynthese zu.

## 5.3 Mutasynthese und vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga

Nach der Produktionsoptimierung und Etablierung der Mutasynthese zur Darstellung neuer Pyrrolbenzodiazepine auf Basis der Tomaymycin-Biosynthese wurde im Verlauf dieser Arbeit die Fragestellung, neue modifizierte Verbindungen zu entwickeln, auf Sibiromycin erweitert. Sibiromycin ist unter den Pyrrolbenzodiazepinen von besonderem Interesse, da es der potenteste Vertreter der natürlich auftretenden Stofffamilie ist. Problematisch bei Sibiromycin ist die Kardiotoxizität, welche bei Pyrrolbenzodiazepinen mit Hydroxylierung an Position 9 beobachtet wird [73], [75], [78]. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines modifizierten Biosynthese-Wegs, welcher den Zugang zu Sibiromycin-Analoga ohne Hydroxylierung an C9 erschließt.

Es konnte bereits für zahlreiche Verbindungen gezeigt werden, dass die Dimerisierung von Pyrrolbenzodiazepinen zu Wirkstoffen führt, deren Sequenzselektivität und Toxizität gegenüber dem Monomer deutlich erhöht sind [39], [82], [83]. Ein weiterführendes Ziel der Biosynthese-Studien an Sibiromycin war daher die Entwicklung eines Semisynthese-Wegs zur Darstellung von Sibiromycin-Dimeren. Um im Rahmen einer Partialsynthese post-biosynthetische Modifikationen zu ermöglichen, wurde als Vorläuferstufe ein Anthranilsäurederivat für eine gerichtete Biosynthese entworfen und synthetisiert, welches eine regioselektive Kopplung eines breiten Spektrum an Edukten zulässt. Nach Fütterung des Vorläufers und Aufreinigung des Produkts wurde ein Protokoll zur Dimerisierung der Untereinheiten grundlegend etabliert.

### 5.3.1 Mutasynthese von Sibiromycin Analoga

Li *et al.* [141] konnten 2009 zeigen, dass bei einem Knock-out von *sibC* im Sibiromycin-Biosynthese-Gencluster die Sibiromycin-Produktion nicht mehr abläuft. Der Phänotyp kann aber durch die Fütterung von 3-Hydroxy-4-methylantranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure oder 3-Hydroxykynurenin wiederhergestellt werden. Da die Stämme aus diesen Studien für die vorliegende Arbeit nicht verfügbar waren, wurde

in einem eigenen Ansatz ein Knock-out von *sibC* mittels single-crossover durchgeführt. Der inzwischen über Jahrzehnte gut etablierte Vektor pKC1132 [90] erwies sich in den vorliegenden Studien an *Streptosporangium sibiricum* als ungeeignet. Erst die Modifikation des replikativen Shuttlevektors pStW102 zum nicht replikativen Suizidvektor durch die Entfernung des SCP2\* ori - resultierend im Vektor pStW102Si - ermöglichte den phänotypisch verifizierbaren Knock-out von *sibC*.

Die anschließenden Fütterungsversuche zeigten, dass, vergleichbar mit der Tomaymycin Mutasynthese, Anthranilsäure gut inkorporiert und sogar außerhalb der NRPS-Mechanismen enzymatisch weiter modifiziert wird. HPLC-MS-Analysen nach der Fütterung von Anthranilsäure bestätigten die Produktion von 9-Dehydroxy-8-demethylsibiromycin.

Interessant ist hierbei, dass die Glykosylierung mit Sibirosamin weiterhin abläuft. Sibiromycin zeigt die höchste DNA-Bindungsaffinität und Toxizität unter den natürlich vorkommenden Pyrrolobenzodiazepinen. Jackson *et al.* haben mit Simulationen und Bindungsstudien zeigen können, dass der Zucker Sibirosamin nicht an der DNA-Bindung beteiligt ist, sondern als sterisch hinderndes Element die Anbindung von DNA-bindenden Proteinen unterbindet und damit ein kritischer Faktor für die Toxizität des Pyrrolobenzodiazepins darstellt [162].

Der verwendete Stamm *Streptosporangium sibiricum*::pStW102SiXsibC zeigte jedoch ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Dieses Defizit des Stammes machte es notwendig, eine andere Produktionsmöglichkeit für Sibiromycin-Analoga zu etablieren.

### 5.3.2 Vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga

Obwohl Sibiromycin seit den 1970er Jahren bekannt ist [38] und bereits in frühen klinischen Studien und Tierversuchen eingesetzt wurde [73], finden sich in der Literatur keine Hinweise auf Versuche zur vorläufergesteuerten Biosynthese mit *Streptosporangium sibiricum*. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Fütterung von alternativen Vorläufern des A-Rings von Tomaymycin führte bei *Streptomyces spec.* FH6421 nicht zur Produktion modifizierter Pyrrolobenzodiazepine.

Fütterungsversuche mit dem Wildtyp-Stamm *Streptosporangium sibiricum* ergaben jedoch bereits in ersten Vorversuchen überraschend hohe Inkorporationsraten. Das

zugefütterte Anthranilsäurederivat verdrängte den natürlichen Vorläufer weitgehend, sodass überwiegend das modifizierte Pyrrolbenzodiazepin synthetisiert wurde. Beim Mechanismus dieser Verdrängung könnte es sich um eine Feedbackhemmung handeln, bei der die durch die Fütterung im Überschuss zur Verfügung gestellte Anthranilsäurederivate, unabhängig von deren Modifikationen, den natürlichen Syntheseweg des nativen A-Ring-Vorläufers hemmt.

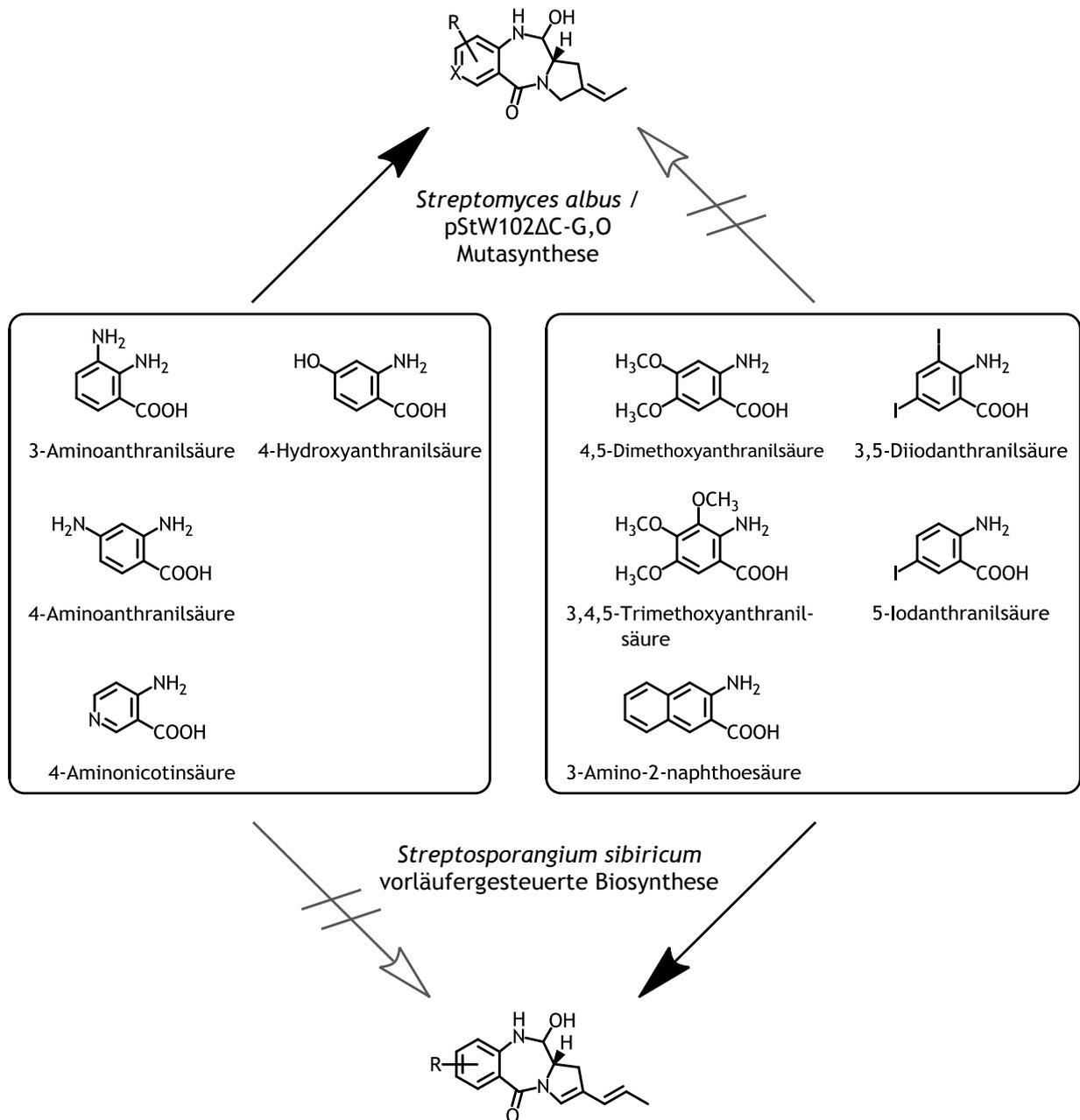
Diese unterschiedlichen Ergebnisse bei Tomaymycin und Sibiromycin lassen sich wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Biosynthesewege erklären. Während bei Tomaymycin die Biosynthese des A-Rings auf dem Shikimsäure-Weg basiert [133] startet die Synthese des A-Rings von Sibiromycin mit Tryptophan [141]. Der Biosyntheseweg des A-Rings von Anthramycin verläuft beginnend mit Tryptophan über 3-Hydroxykynurenin analog zum Sibiromycin. Für strukturell verwandte Pyrrolbenzodiazepine mit der Hydroxylierung an Position 9 (z.B. Mazethramycin, Porothramycin und Limazepin), deren Biosynthesewege zwar noch nicht beschrieben sind, kann dennoch dieser Startschritt der Biosynthese angenommen werden. Für künftige Studien wäre es daher sehr interessant zu untersuchen, ob bei Fütterungen von A-Ring-Vorläufern derselbe Feedbackmechanismus zum Tragen kommt. Derartige Studien könnten den Zugang zu einer großen Vielzahl weiterer neuer Pyrrolbenzodiazepine über die vorläufergesteuerte Biosynthese eröffnen.

### **5.3.3 Vergleich der Inkorporationsmuster bei der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga und der Mutasyntese von Tomaymycinanaloga**

Nach der Erstellung des *sibC* Knock-outs *S. sibiricum*::pStW102SiXsibC und erfolgreicher Mutasyntese wurde schnell deutlich, dass der modifizierte Stamm schlecht auf Kulturplatten anwächst, in Flüssigkultur verlangsamtes oder zum Teil gar kein Wachstum zeigt und auf längere Sicht keine stabile Kultivierung zulässt. Ein Fütterungs-Versuch einer Wildtyp-Kultur zeigte nicht nur eine sehr gute Inkorporation der zugegebenen Anthranilsäure sondern auch eine nahezu vollständige Verdrängung des unmodifizierten Sibiromycins.

Beim Vergleich der Substitutionsmuster der inkorporierten Anthranilsäurederivate bei der vorläufergesteuerten Sibiromycin-Biosynthese und der Tomaymycin-

Mutasynthese fällt auf, dass auch SibE - das funktionale Analogon zu TomA in der Sibiromycin-Biosynthese - ein breites Substratspektrum akzeptiert. Auch die Limitierungen sind ähnlich; wie bei Tomaymycin verhindern Substituenten an Position C6 (**M10**: 4,6-Dichloranthranilsäure, **M23**: 6-Methoxyanthranilsäure) der Anthranilsäure die Inkorporation. Auch räumlich große Substituenten an Position C5 (**M31**: 5-*tert*-Butylanthranilsäure, **M36**: 5-(Trifluormethoxy)anthranilsäure) können den Einbau verhindern. Im Gegensatz zur Mutasynthese von Tomaymycin-Analoga werden bei der vorläufergesteuerten Sibiromycin-Biosynthese auch stärker substituierte Anthranilsäuren und selbst ein Naphthoesäurederivat akzeptiert (**M16**: 5-Iodanthranilsäure, **M17**: 3,5-Diiodanthranilsäure, **M25**: 4,5-Dimethoxyanthranilsäure, **M27**: 3,4,5-Trimethoxyanthranilsäure, **M44**: 3-Amino-2-naphthoesäure). Im Gegensatz dazu werden in der Tomaymycin- Mutasynthese Aminogruppen und ein Nicotinsäurederivat inkorporiert (**M34**: 3-Aminoanthranilsäure, **M35**: 4-Aminoanthranilsäure, **M42**: 4-Aminonicotinsäure), für welche bei der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga kein Einbau beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 77).



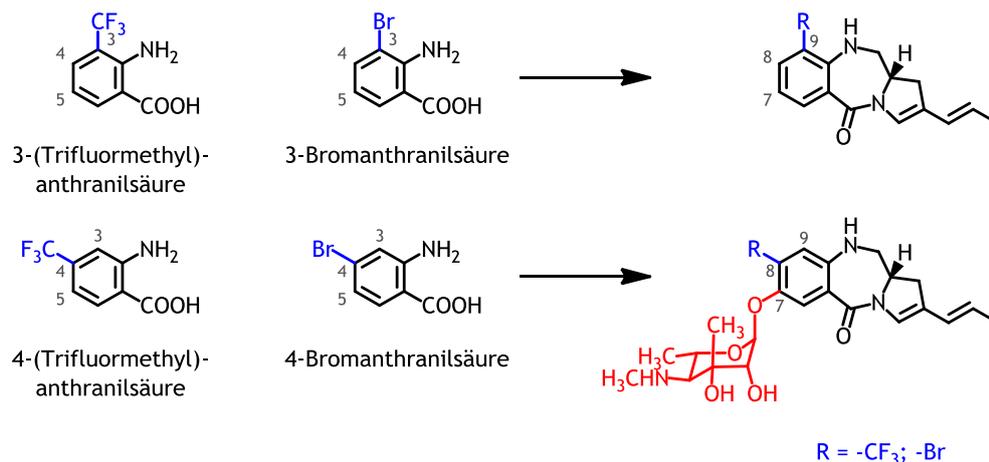
**Abbildung 77:** Unterschiede in der Mutasynthontoleranz bei der Mutasynthese mit *Streptomyces albus* / pStW102TCΔC-G,O und der vorläufergesteuerten Biosynthese mit *Streptosporangium sibiricum*.

Mit diesen Studien steht eine robuste Biosynthese-Möglichkeit für eine Vielzahl an Sibiromycin-Varianten zur Verfügung, an denen die Auswirkungen der Modifikation im Vergleich zu nativen Substanz in Zytotoxizitätsstudien untersucht werden könnten.

### 5.3.4 *In vivo*-Glykosylierung von Sibiromycin-Analoga

Sibiromycin ist strukturell sehr ähnlich zu Anthramycin und Mazethramycin. Der C-Ring von Anthramycin und Mazethramycin weist im Gegensatz zur terminalen Methylgruppe von Sibiromycin ein Amid- bzw. Methyramidrest auf [163], [35], [164]. Der entscheidende Unterschied zwischen den Strukturen ist jedoch die Glykosylierung am C7 von Sibiromycin. Diese bewirkt, dass Sibiromycin die höchste Toxizität unter den natürlichen Pyrrolobenzodiazepinen aufweist. Mit einer Kombination aus Struktursimulationen und DNA-Bindungsversuchen mit dem GAL4 Transkriptionsfaktor konnten Jackson *et al.* die These untermauern, dass die Glykosylierung nicht die DNA-Affinität von Sibiromycin erhöht, sondern als sterisch hindernde Gruppe die Anbindung von Proteinen an die betroffene DNA unterbindet [162].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung der Sibiromycin-Analoga mit Sibirosamin am C7 des Pyrrolobenzodiazepins mit hoher Zuverlässigkeit auch in der vorläufergesteuerten Biosynthese abläuft (vgl. Tabelle 6, Abbildung 53). Voraussetzung hierfür ist, dass die Position C5 der Anthranilsäure nicht derivatisiert ist. Überraschend war, dass die Substitution der Position C3 in der Anthranilsäure mit einem räumlich großen Substituenten wie Brom oder Trifluormethyl zum Ausbleiben der Glykosylierung führt. Die gleichen Substitutionen an Position C4 der Anthranilsäure, im Pyrrolobenzodiazepin direkt neben der Glykosylierung gelegen, verhindern die Glykosylierung nicht (siehe Abbildung 78). Dieses Verhalten lässt einen ersten Rückschluss auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkung während der Glykosylierung zu. Im Sibiromycin ist die Position 9 im Pyrrolobenzodiazepin hydroxyliert. Diese Hydroxylierung ist jedoch nicht maßgeblich für die Glykosylierung (siehe Abbildung 78). Während der Hydroxylierung an Position C7 durch SibG, welche der Glykosylierung vorangeht [141], muss eine grundlegende Interaktion zwischen Enzym und Pyrrolobenzodiazepin stattfinden, bei welcher der C9-Substituent sterisch hindernd wirkt.



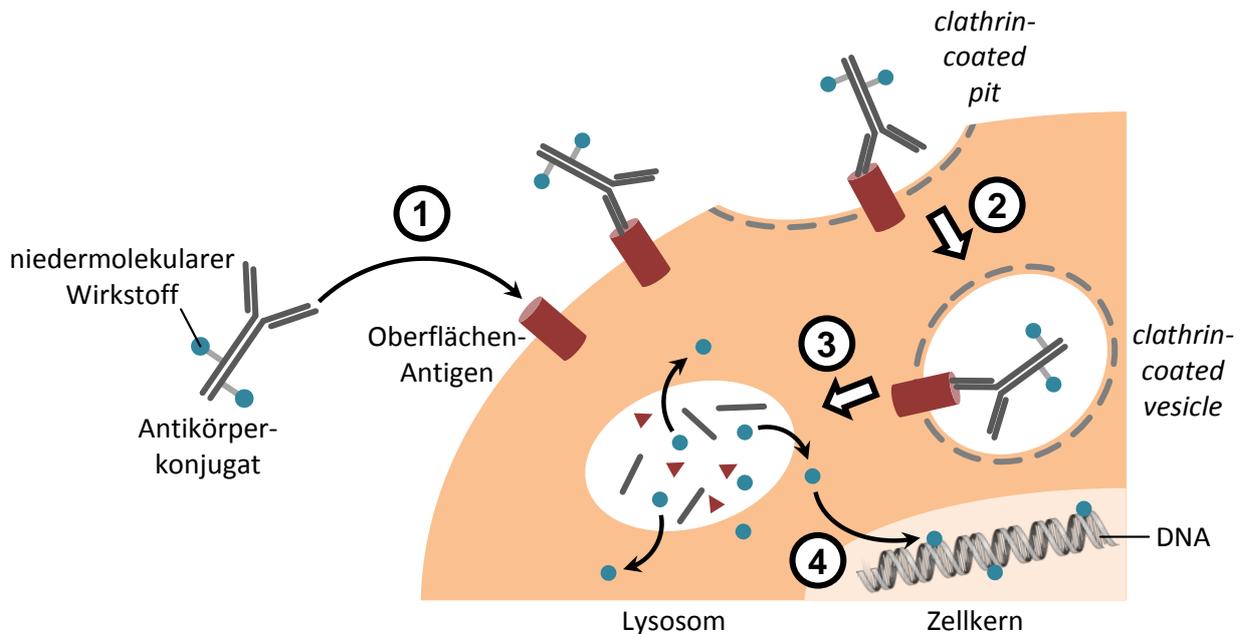
**Abbildung 78:** Substitution der Anthranilsäure mit räumlich großen Gruppen an Position C3 führt in der vorläufergesteuerten Biosynthese zum Ausbleiben der Glykosylierung des Sibiromycin-Analogons. Bei identischen Substitutionen an Position C4 der Anthranilsäure kann die Glykosylierung des Sibiromycin-Analogons beobachtet werden.

### 5.3.5 Sibiromycin-Analoga in semisynthetischen Dimerisierungsreaktionen

In der Krebstherapie spielen Operationen und Bestrahlungen eine zentrale Rolle bei der Behandlung lokal begrenzter Tumore. Spätestens mit der Ausbildung von Metastasen wird jedoch eine Chemotherapie notwendig, um unspezifisch sämtliche Gewebe therapeutisch erreichen zu können. Die meisten antineoplastischen Antibiotika wirken jedoch nicht spezifisch gegen eine bestimmte Tumorzelllinie, sondern zielen allgemein auf schnell proliferierende Zellen ab. Dieser Ansatz bietet meist eine sehr geringe therapeutische Breite und führt durch die Beeinträchtigung aller schnell proliferierenden oder allgemein empfindlicher Gewebe in der Regel zu schweren unerwünschten Wirkungen [165], [166].

Eine Möglichkeit, die systemischen Effekte von antineoplastischen Antibiotika zu reduzieren, ist die kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs im Tumor selbst. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, bei welchen mehrere Wirkstoffmoleküle über einen Linker an einen Antikörper gebunden sind, stellen eine Möglichkeit dar, selbst gestreute Tumore gezielt zu therapieren. Die Spezifität des monoklonalen Antikörpers, der spezifisch an ein Antigen bindet, welches im Idealfall nur auf entarteten Zellen exponiert ist, bewirkt die zielgerichtete Wirksamkeit. Nach der Aufnahme des Antikörpers in die Zelle erfolgt die Spaltung des Linkers, entweder

durch den Wechsel vom neutralen extrazellulären pH (7.3 - 7.5) zum sauren intrazellulären pH (4.5 - 6.5), dem Wechsel vom eher oxidativen extrazellulären zu reduktiven intrazellulären Milieu, welches insbesondere in Tumorzellen ausgeprägt ist oder durch spezifische intrazelluläre Enzyme (siehe Abbildung 79).



**Abbildung 79:** Schema der Aufnahme eines „bewaffneten Antikörpers“ [167] und der Wirkstofffreisetzung in der Zelle. **1)** Die Anbindung des Antikörperkonjugats erfolgt am Epitop eines tumorspezifischen, extrazellulär auftretenden Antigens. **2)** Die Aufnahme gebundener Antikörper erfolgt überwiegend über die Ausbildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln. **3)** Das Vesikel wird anschließend zum Lysosom transportiert und verschmilzt mit diesem. **4)** Das Antikörperkonjugat wird im Lysosom abgebaut und abhängig von der Art des Antikörper-Wirkstoff-Linkers wird dieser entweder durch die Ansäuerung des Mediums oder den Wechsel ins intrazelluläre reduktive Milieu gespalten. Nach dieser gerichteten Freisetzung in der Tumorzelle diffundiert der niedermolekulare Wirkstoff ins Zellinnere und kann am jeweiligen Ziel seine Wirkung entfalten (verändert nach Schrama *et al.* [168]).

Durch die Freisetzung entfaltet die toxische Komponente ihre Wirksamkeit gezielt innerhalb der Krebszelle, was die therapeutische Breite gegenüber dem Einsatz des solitären Wirkstoffs um den Faktor 100 bis 1000 erhöht [165]. Da nur eine begrenzte Anzahl, meist zwei bis vier Wirkstoffmoleküle, an einen Antikörper gebunden werden können, bevor die Beladung sich negativ auf die Pharmakokinetik auswirkt, sollte das Wirkstoffmolekül eine möglichst hohe Zytotoxizität - idealerweise im subnanomolaren  $IC_{50}$  - aufweisen [169], [170]. Substanzen, welche für sich allein stehend zu toxisch

für den klinischen Einsatz sind, können somit interessante Leitstrukturen für Antikörper-Wirkstoff-konjugierte *prodrugs* stellen.

Erste klinische Studien mit Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten scheiterten wie bei BR96-doxorubicin (siehe Abbildung 81) trotz vielversprechender präklinischer Aktivität an der zu geringen Toxizität des gekoppelten Wirkstoffs mit  $IC_{50}$  0.1 - 0.2  $\mu$ M für humane Carcinomzelllinien [171]. Mit einer Zytotoxizität von  $IC_{50}$ -Werten von 3 - 20 nM [79] (siehe Tabelle 9) bildet 9-Desoxysibiromycin eine gute Leitstruktur für die Dimerisationstrategie.

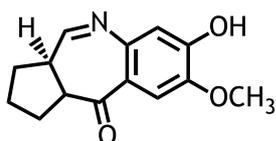
**Tabelle 9:** Zytotoxizität von 9-Desoxysibiromycin auf ausgewählte Zelllinien des NCI 60 Cell Line Screens [79], [172].

Zelllinie	Tumorzelltyp	9-Desoxysibiromycin
		$IC_{50}$ [nM]
SR	Leukämie	3.2
NCI-H522	Lunge	7.6
OVCAR-8	Ovarium	17.8
MCF7	Brust	8.5
SK-MEL-5	Melanom	14.1

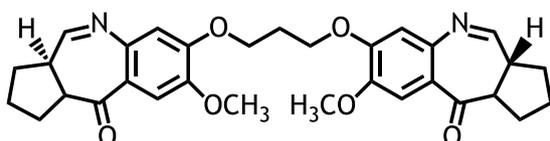
Pyrrrolbenzodiazepine zeigen dimerisiert, abhängig von Ausgangsmolekül und Linker eine deutlich erhöhte Zytotoxizität. Bei der Dimerisierung von DC-81 zu DSB-120 liegt der Effekt bei einer Verringerung der  $IC_{50}$  von 30 bis über 600fach [173], [174]. Bei der Dimerisierung des SJG-136 Vorläufers **65** sinkt die  $IC_{50}$  um den Faktor 100 bis 700 (siehe Tabelle 10, Abbildung 80) [175], [143].

**Tabelle 10:** Änderung der Zytotoxizität ( $IC_{50}$ ) von Pyrollobenzodiazepinen durch 8,8'-Dimerisierung über einen 1,3-Dioxypropanyl-Linker.

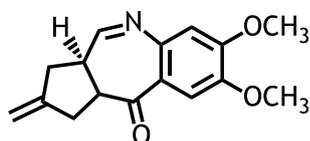
Zelllinie	Tumorzelltyp	DC-81	DSB-120
		(Monomer)	(Dimer)
L1210	Leukämie	380 nM	10 nM
ADJ/PC6	Plasmazytom	330 nM	0.5 nM
OVCAR-8	Ovarium	100 nM	3 nM
		65	SJG136
		(Monomer)	(Dimer)
CH1 <sup>cisR</sup>	Ovarium	84 nM	0.12 nM
CH1	Ovarium	66 nM	0.6 nM



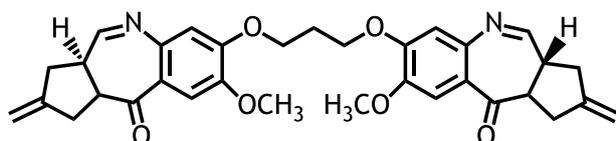
DC-81



DSB-120



65



SJG-136

**Abbildung 80:** Monomere synthetischer Pyrollobenzodiazepine und ihre korrespondierenden Dimere.

Bisher etablierte dimere Strukturen basieren wie DSB-120 und SJG-136 nahezu ausschließlich auf synthetischen Vorläufer-Monomeren. Während die Vollsynthese einen guten Zugang zu Derivatisierung sowie Homo- und Heterodimerisierung bietet, sind komplexe chirale Strukturen wie der Aminozucker Sibirosamin im Sibiromycin nur schwer in die Synthese einzubringen. Sibiromycin weist die höchste DNA-Affinität der monomeren PBD auf und ist damit eine interessante Leitstruktur für antineoplastische Arzneimittel [39]. Aufgrund der Methylierung an Position C8 des nativen Sibiromycins ist es umodifiziert für die Dimerisierung nicht geeignet, da die Methylgruppe keinen chemischen Angriffspunkt bietet.

Mit der vorläufergesteuerten Biosynthese von Sibiromycin-Analoga wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Schlüsselverfahren zur Modifikation der Gruppen im A-Ring des Sibiromycins etabliert. Zusätzlich zur Entfernung des 8-Hydroxyls, für welches die kardiotoxische Wirkung Sibiromycins postuliert wird [73][79], ist jetzt ein leistungsfähiges Test- und Produktionssystem verfügbar, um eine Vielzahl neuartiger, *in vivo* nicht verfügbarer synthetischer Funktionalitäten in Sibiromycin einzubringen. Zur Dimerisierung sollte ein Linker zum Einsatz kommen, der *in vitro* unter milden Reaktionsbedingungen zwischen die Monomere geschaltet werden kann, um später die Möglichkeit zu haben, mit Linkerlängen und -arten, welche die Toxizität stark beeinflussen [176],[118], frei variieren zu können. Dies ermöglicht ohne größere Umstellungen im System auch den Einsatz dreiarmer Linker zur Bindung des Toxins an einen Antikörper [165]. Für die Kopplung des Monomers an den Linker wurde in dieser Arbeit die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition gewählt, da sie auf natürlich nicht vorkommenden Gruppen aufbaut und die Reaktion bei Raumtemperatur in Wasser abläuft. Eine Zersetzung des empfindlichen, glykosylierten Pyrrolobenzodiazepins ist damit nicht zu erwarten. Die Position des Linkers wurde identisch zu SJG-136 auf Position C9 im Pyrrolobenzodiazepin festgelegt (siehe Abbildung 81).



Da das entsprechende Mutasynton 4-Propargyloxyanthranilsäure nicht kommerziell verfügbar ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Synthese basierend auf 4-Hydroxyanthranilsäure und Propargylbromid etabliert. Die vorläufergesteuerte Biosynthese von 4-Propargyloxyanthranilsäure ergab eine Ausbeute von 6.4 mg/l und das gebildete Produkt DOPOS konnte in hoher Reinheit isoliert werden. Das Dimer konnte hergestellt und über HPLC-MS nachgewiesen werden.

Als Nebenprodukt der Reaktion wurde eine Masse die 9-Desoxy-8-hydroxysibiromycin entspricht gefunden. Dieses Modifikationsmuster konnte in der vorläufergesteuerten Biosynthese nicht erreicht werden. Der Verlust der Propargylgruppe trat analog zu den Ergebnissen von Ghosh und Aubé [178] auf. Sie nutzten Propargylester als Schutzgruppen für Carboxylsäuren, welche sie unter neutralen Bedingungen unter Kupfer(I)-Katalyse entfernten. Eine weitere theoretisch mögliche Reaktion ist die Kupfer(I)-katalysierte Aminierung von Propargylestern [179]. Im Vorversuch zwischen 4-Propargyloxyanthranilsäure und 1,5-Diazido-3-oxapentan waren mit der freien Aminogruppe der Anthranilsäure gute Bedingungen für eine Aminopropargylierungen gegeben, entsprechende Massen wurden aber nicht gefunden. Der Verlust des Propargyls wäre aufgrund der geringen Masse der Hydroxyanthranilsäure nicht detektiert worden. Auch in der Dimerisierung mit DOPOS konnte die Masse des zu erwarteten Dipropargyl-Monomers nicht gefunden werden.

9-Desoxy-8-hydroxysibiromycin ist für weitere Untersuchungen von großem Interesse, da Dimerisierungen von Pyrrolbenzodiazepinen basierend auf einer Hydroxylierung an Position C8 chemisch etabliert, gut untersucht und mit SJG-136 sogar den Eingang in klinische Studien gefunden haben [72], [83], [143], [147], [176], [180]. Eine Reaktion ohne den 1,5-Diazido-3-oxapentan-Linker ermöglicht ein gezieltes „Entschützen“ des 8-Propargyls zum Hydroxyl und eröffnet damit einen regulären Semi-Syntheseweg zu 9-Desoxy-8-hydroxysibiromycin. Das wirtschaftliche Interesse an Pyrrolbenzodiazepin-Dimeren, welche über die 8-Hydroxyl-Gruppe dimerisiert werden, ist durch mehrere Patente dokumentiert [177], [181], [182]. Ein Dimer von 9-Desoxy-8-hydroxysibiromycin analog zu den beschriebenen Tomaymycin-Dimeren (siehe Abbildung 81) könnte Sibiromycin der klinischen Nutzung einen bedeutenden Schritt näher bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Syntheseweg für den Baustein 4-Propargyloxyanthranilsäure etabliert. Dieser Baustein wurde anschließend in der

vorläufergesteuerten Biosynthese zur Herstellung des monomeren propargylierten Sibiromycinanalogons eingesetzt. Abschließend konnte die Dimerisierungsreaktion über 1,5-Diazido-3-oxapentan als Linker gezeigt werden. Nach erfolgreichem Abschluss dieser grundlegenden Arbeiten kann in weiterführenden Versuchen die Dimerisierung und Aufreinigung des Dimers im präparativen Maßstab adressiert werden. Steht das Dimer in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung, kann die Strukturaufklärung mittels NMR erfolgen. Um eine Anwendung des Dimers und möglicher Varianten mit anderen Linkern als potentes antineoplastisches Antibiotikum zu untersuchen, sollten im Folgenden Analysen zur Zytotoxizität durchgeführt werden [82]. Die Aufreinigung und Strukturaufklärung des depropargylierten Monomers ist ein weiterer wichtiger Schritt in der Fortführung dieser Arbeit.

## 5.4 Ausblick

Aufbauend auf den grundlegenden Erkenntnissen dieser Arbeit sowie den etablierten Biosynthese- und Semisynthese-Strategien bieten sich folgende weiterführende Ansätze an. Auf der Basis des Mutasyntesesystems für neue PBDs auf Basis von Tomaymycin und der etablierten vorläufergesteuerten Biosynthese für Sibiromycin-Analoga können nun über eine rationale Herangehensweise gezielt neue Pyrrolobenzodiazepine entworfen werden. Je nach Zielsubstanz gilt es, entsprechende Vorläufer auszuwählen und diese ggf. analog zu dieser Arbeit zu synthetisieren. Auf diesem Wege kann eine umfassende Bibliothek von PBD erstellt werden, welche anschließend vergleichenden Zytotoxizitätstests zugeführt werden kann, um potentielle antibiotische oder antineoplastische Wirkstoffe zu identifizieren. Als alternative Methode zur Erstellung neuartiger PBD-Varianten auf Tomaymycin-Basis kann das in dieser Arbeit erstellte *in vitro*-System unter der Verwendung von TomA und TomB genutzt werden. Auf diese Weise können mechanistische Einblicke in Beladung und reduktive Ablösung von der beteiligten Synthetase erhalten werden und eine größere Bandbreite an Edukten getestet werden.

Die hohe Ausbeute in der heterologen Expression der beiden Proteine sowie die hohe nach der Aufreinigung erreichte Reinheit eröffnen die Möglichkeit der Kristallisation von TomA und TomB mit anschließender Strukturanalyse.

Die im TomA/TomB-*in vitro*-Assay beobachtete Bildung von Dipeptiden kann mit der Aufreinigung und Strukturaufklärung der entstandenen Substanzen näher beschrieben werden.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellte Sibiromycin-Variante DOPOS kann mittels Click-Chemie dimerisiert werden. Analog zum Effekt in zahlreichen PBD-Dimeren z.B. SJG-136 wird auch bei DOPOS eine signifikante Steigerung der Toxizität im Vergleich zum Monomer erwartet. Das gewählte Semisynthesystem lässt einen großen Spielraum für die Auswahl von Linkern. Eine mögliche Toxizitätssteigerung durch Dimerisierung sollte über Zytotoxizitätsassays nach Aufreinigung und Strukturaufklärung untersucht werden. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, stellt DOPOS insbesondere bei Kopplung an spezifische Antikörper einen interessanten potentiellen antineoplastischen Wirkstoff dar. Ein weiterer Ansatz ist die Nutzung des vorgestellten Dimerisierungsmechanismus für Tomaymycin-Varianten.

Über die Entfernung der Propargylgruppe aus DOPOS ließ sich in dieser Arbeit 8-Hydroxy-9-Desoxy-Sibiromycin darstellen. Dieses sollte in Folgeversuchen analog zu SJG-136 und Tomaymycin dimerisiert [143], [177] und anschließenden Zytotoxizitätsassays zugeführt werden. Die vorläufergesteuerte Biosynthese von Sibiromycin-Analoga erwies sich als überraschend robuste und ertragreiche Methode. Es liegt nahe, diese Methode auf Produzenten anderer, strukturell verwandter PBD zu erweitern. Pyrrolbenzodiazepine, die wie Sibiromycin ein 9-Hydroxy-8-Methyl-Substitutionsmuster am A-Ring aufweisen (Anthramycin, Porothramycin, Mazethramycin, Limazepin; vgl. Abbildung 2), könnten aufgrund des parallelen Biosynthesewegs ähnlich zugänglich für Fütterungsversuche sein.

## 6 Zusammenfassung

Pyrrrolbenzodiazepine sind DNA-alkylierende, nichtribosomal synthetisierte Sekundärmetabolite aus Actinomyceten. In dieser Arbeit wurden Studien zur Produktionsoptimierung von Tomaymycin sowie zur Darstellung von Tomaymycin und Sibiromycin-Varianten durchgeführt. Nach Isolierung des Tomaymycin-Biosynthese-Genclusters wurde eine Strategie zur heterologen Expression etabliert. Durch Optimierung der Vektor-Stamm-Kombination sowie genetische Manipulation wurde die Produktion im Vergleich zum Wildtyp um das siebenfache auf 340 mg/l gesteigert. Zudem wurde eine Mutasynthese-Strategie erarbeitet, mit welcher neuartige Tomaymycin-Varianten hergestellt wurden. Diese Methode ermöglicht die Biosynthese interessanter Ausgangsstoffe für zielgerichtete Wirkungsoptimierungen. Der ertragsmindernde Einfluss der Oxidation wurde mittels knock-out eliminiert, wobei *in vivo* ein neuer Abbaumechanismus, die Reduktion des Produkts, identifiziert wurde. Über heterologe Expression der NRPS der Tomaymycin-Biosynthese wurde ein funktioneller *in vitro*-Assay etabliert. In Studien zu einem weiteren PBD, Sibiromycin, wurden mittels vorläufergesteuerter Biosynthese neuartige, glykosylierte PBD-Varianten erzeugt, sowie ein System zur semisynthetischen Dimerisierung via Click-Chemie etabliert. Abschließend konnte eine Sibiromycin-Variante identifiziert werden, welche bei einer Dimerisierung eine deutlich erhöhte Toxizität aufweisen könnte; vergleichbar zum Dimerisierungseffekt von SJG-136.

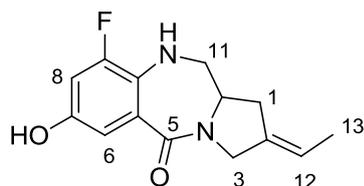
## Summary

*Pyrrrolobenzodizepines are DNA alkylating, non-ribosomally synthesized, peptidic secondary metabolites found in actinomycetes. This work focuses upon optimization for the production of tomaymycine as well as mutasynthetic and precursor directed biosynthesis of new non-native variants of tomaymycine and sibiromycine respectively. For this purpose the tomaymycine biosynthetic genecluster was isolated and a heterologous expression system was established subsequently. By continuous vector/strain optimization and genetic enhancements production could be amplified sevenfold compared to the wildtype yielding a production titer of 340 mg/l. Moreover a strategy for mutasynthesis was built leading to several novel variants of tomaymycine. This newly developed method opens up new approaches for the biosynthesis of a broad spectrum of precursor substances and thereby facilitates directed lead optimization for drug effect and efficiency. The yield reducing oxidative effect was eliminated by knock-out experiments thus revealing a hitherto unknown in vivo degradation process, the reduction of the Pyrrrolobenzodiazepine. A functional in vitro assay was designed via heterologous expression of the NRPS responsible for the biosynthesis of tomaymycine. Likewise studies on sibiromycine, another structurally related PBD, were performed via precursor directed biosynthesis and led to novel glycosylated PBD variants. By the use of a click-chemistry approach a system allowing for semisynthetic dimerization of PBD could be established. Eventually the presented studies provide a sibiromycine variant that once dimerized bears the potential for a highly boosted cytotoxicity - comparable to the effect observed for SJG-136.*

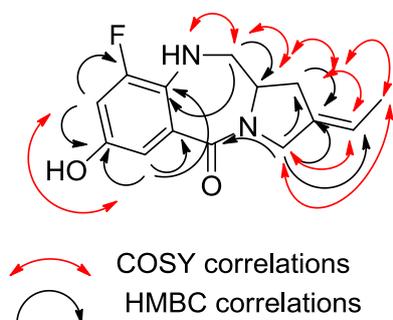
## 7 Anhang

### NMR-Daten:

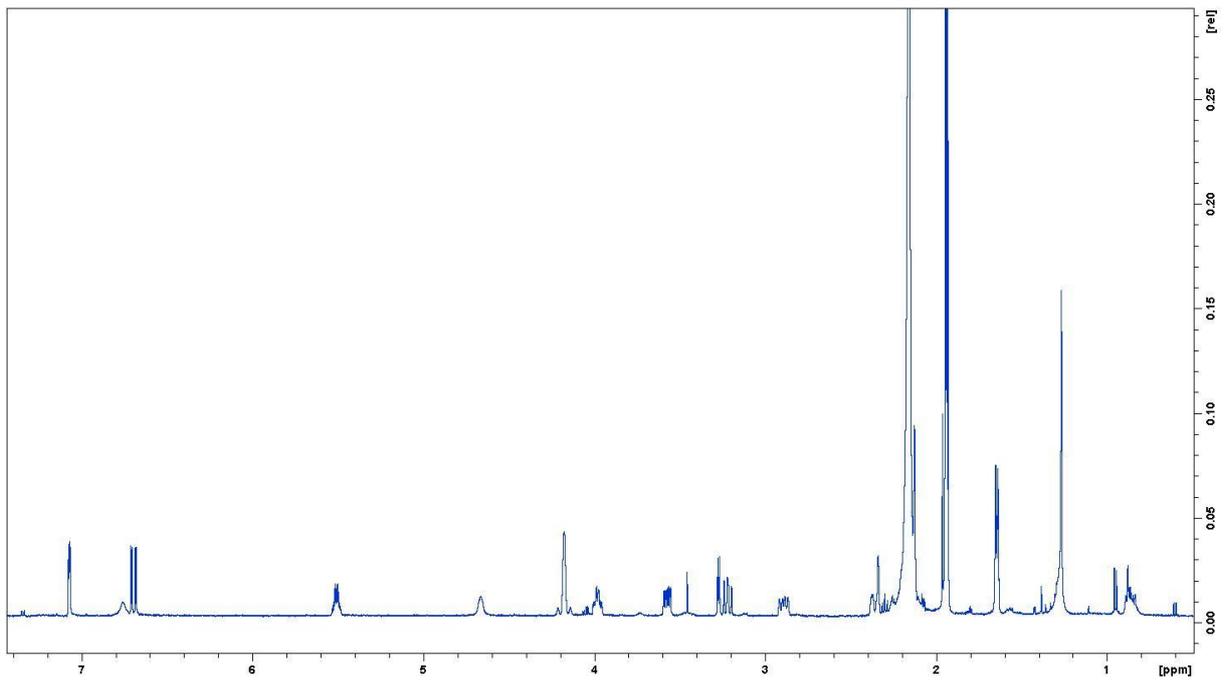
#### 8-Dehydroxy-10,11-dihydro-9-fluor-7-hydroxytomaymycin



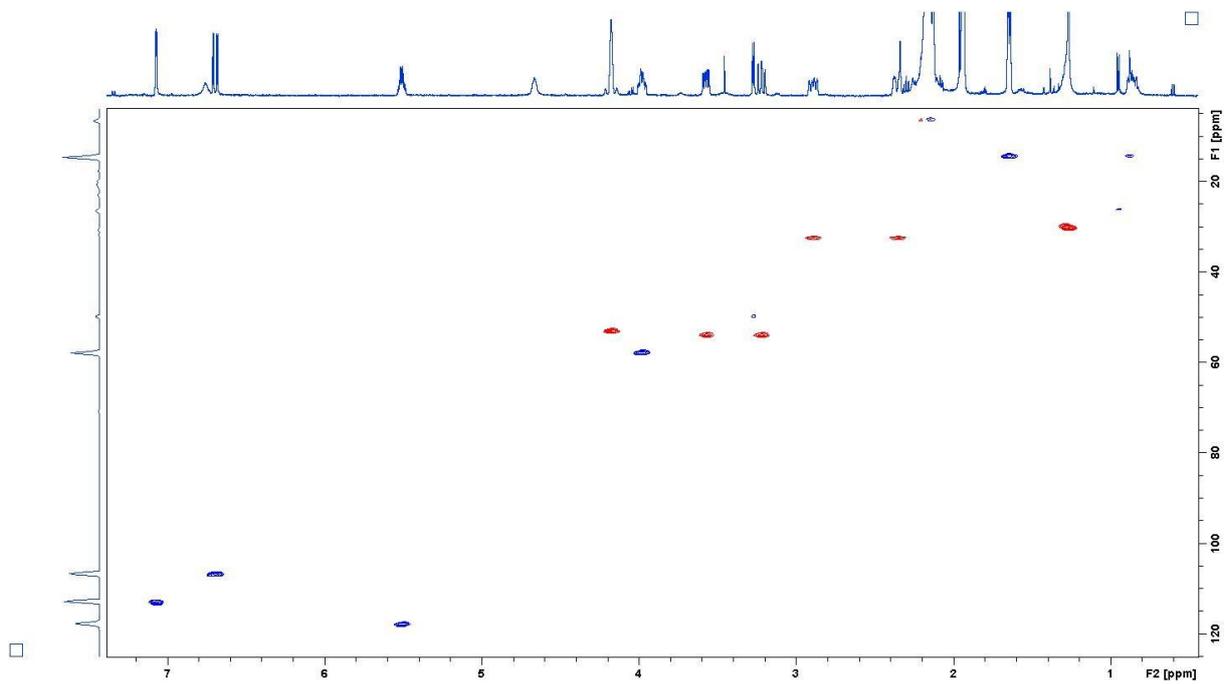
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  7.07 (dd,  $J = 2.9, 1.7$  Hz, 1H, 6-H), 6.76 (bs, OH), 6.70 (dd,  $J = 12.5, 2.9$  Hz, 1H, 8-H), 5.51 (m, 1H, 12-H), 4.67 (bs, 1H, NH), 4.18 (bs, 2H, 3-H), 3.98 (m, 1H, 11a-H), 3.58 (ddd,  $J = 12.3, 6.6, 2.3$  Hz, 1H, 11-H<sub>a</sub>), 3.22 (dd,  $J = 11.6, 10.3$  Hz, 1H, 11-H<sub>b</sub>), 2.89 (dd,  $J = 15.5, 8.2$  Hz, 1H, 1-H<sub>a</sub>), 2.34 (m, 1H, 1-H<sub>b</sub>), 1.65 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  166.4 (5-C), 154.2 (9-C), 148.8 (7-C), 130.1 (9a-C), 123.8 (5a-C), 118.0 (12-C), 113.1 (6-C), 106.9 (8-C), 57.8 (11a-C), 54.1 (11-C), 53.2 (3-C), 32.5 (1-C), 14.4 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 263.1190, found 263.1188.

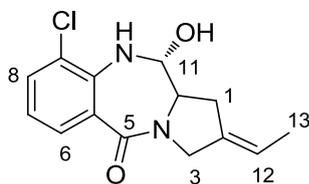


$^1\text{H}$ -NMR Spektrum:

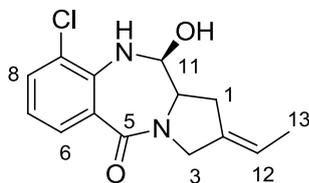


HSQC-NMR Spektrum:

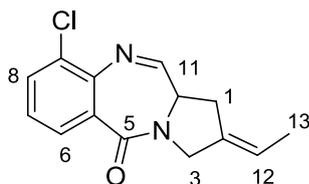


**9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxytomaymycin****9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxytomaymycin (11-Hydroxy, 2 Epimere und 11-Dehydroxy, ca. 1:1:2)****9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxytomaymycin (Epimer 1, 11R-Hydroxy, 11aS)**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.67 (m, 6-H), 7.45 (m, 7-H), 6.72 (m, NH), 6.69 (m, 8-H), 5.40 (m, 1H, 12-H), 4.10 (bd,  $J = 4.0$  Hz, 1H, 11-H), 4.22 - 4.08 (m, 2H, 3- $\text{H}_{a,b}$ ), 3.91 (m, 1H, 11a-H), 2.74 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.56 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.60 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  164.5 (5-C), 139.2 (9a-C), 134.6 (2-C), 131.6 (7-C), 131.2 (6-C), 128.6 (9-C), 119.5 (5a-C), 116.5 (8-C), 114.9 (12-C), 80.5 (11-C), 58.6 (11a-C), 53.4 (3-C), 31.8 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 279.0915, found 279.0895.

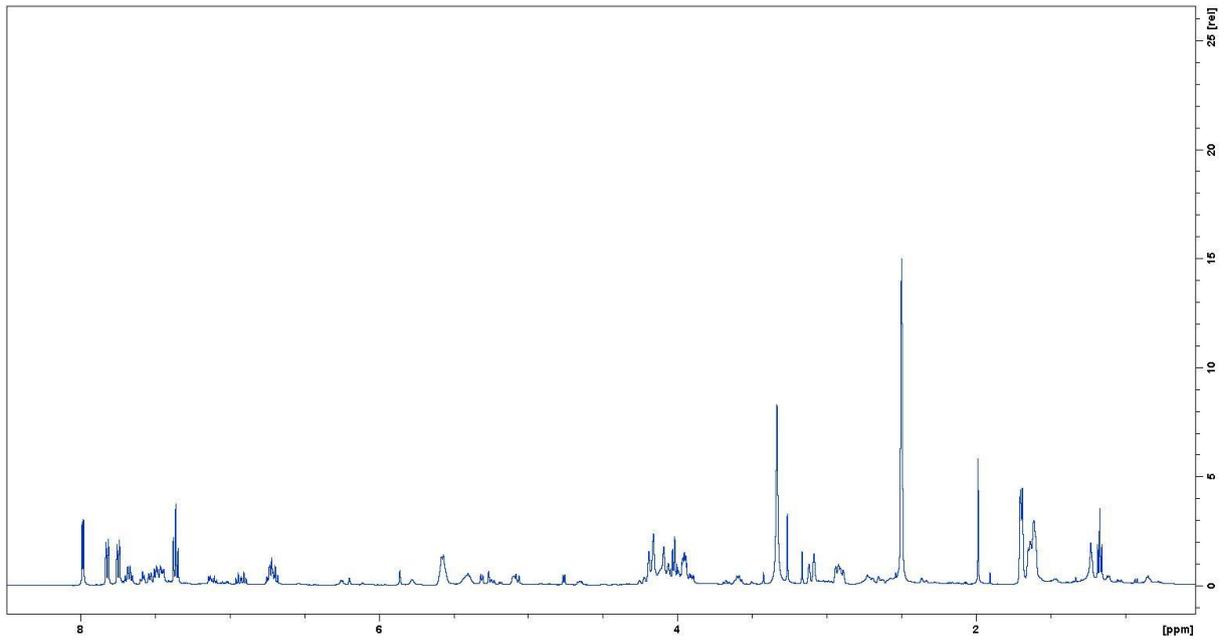
**9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxytomaymycin (Epimer 2, 11S-Hydroxy, 11aS)**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.53 (m, 7-H), 7.50 (m, 6-H), 6.94 (m, 8-H), 6.25 (bd,  $J = 5.9$  Hz, 1H, OH), 5.58 (m, 1H, 12-H), 5.26 (bs, NH), 4.66 (dd,  $J = 9.3, 5.9$  Hz, 1H, 11-H), 4.18 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.08 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.59 (m, 1H, 11a-H), 2.73 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.65 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.64 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  165.6 (5-C), 139.5 (9a-C), 133.6 (2-C), 131.3 (7-C), 128.6 (6-C), 127.8 (9-C), 124.0 (5a-C), 120.7 (8-C), 117.4 (12-C), 85.8 (11-C), 58.6 (11a-C), 51.1 (3-C), 30.5 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 279.0915, found 279.0895.

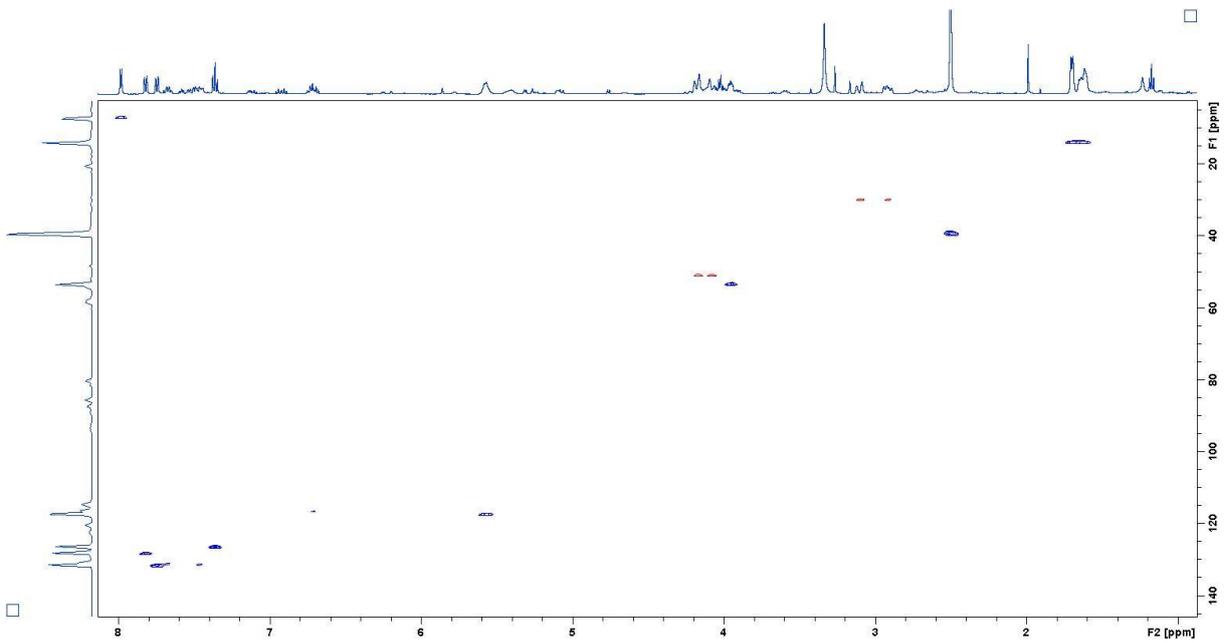
**9-Chlor-8-dehydroxy-7-demethoxytomaymycin (11-Dehydroxy-Form)**

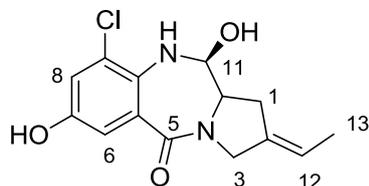
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.98 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, 11-H), 7.82 (d,  $J = 7.9$  Hz, 6-H), 7.75 (d,  $J = 7.9$  Hz, 8-H), 7.36 (d,  $J = 7.9$  Hz, 7-H), 5.57 (m, 1H, 12-H), 4.18 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.08 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.96 (m, 1H, 11a-H), 3.10 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.92 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.70 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  167.6 (11-C), 162.7 (5-C), 142.1 (9a-C), 133.8 (2-C), 131.8 (8-C), 129.2 (9-C or 5a-C), 128.5 (5a-C or 9-C), 128.5 (6-C), 126.7 (7-C), 117.6 (13-C), 53.6 (11a-C), 51.1 (3-C), 30.0 (1-C), 14.0 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 261.0795, found 261.0811.

$^1\text{H}$ -NMR Spektrum:



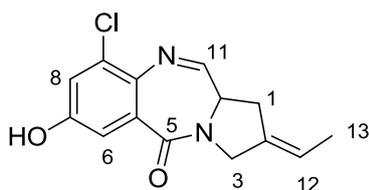
HSQC-NMR Spektrum:



**9-Chlor-8-dehydroxy-7-hydroxy-tomaymycin****9-Chlor-8-dehydroxy-7-hydroxytomaymycin (11S-Hydroxy, 11-Deshydroxy, ca. 1:1)****9-Chlor-8-dehydroxy-7-hydroxytomaymycin, 11S-Hydroxy-Form**

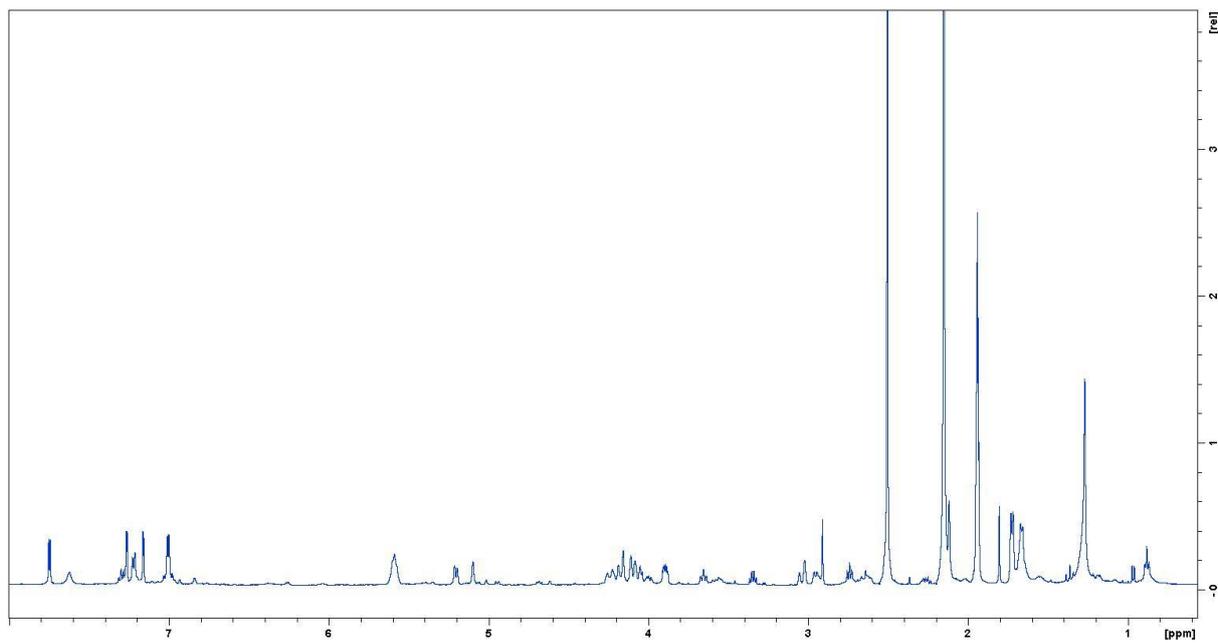
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  7.62 (bs, Ph-OH) 7.00 (m, 2H, 6-H, 8-H), 5.59 (m, 1H, 12-H), 5.20 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-11), 5.10 (bs, 1H, NH), 4.22 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.07 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.65 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H, 11a-H), 2.64 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.51 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.66 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  167.5 (5-C), 153.4 (7-C), 134.2 (9-C or 5a-C), 133.9 (2-C), 131.8 (9a-C), 128.3 (5a-C or 9-C), 119.6 (6-C), 119.0 (13-C), 115.6 (8-C), 87.5 (11-C), 60.6 (11a-C), 51.8 (3-C), 31.5 (1-C), 15.0 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 295.0849, found 295.0844.

(11-S, 11a-S –Derivat, da 11-H = d,  $J = 9$  Hz mit 11a-H, siehe Fotso *et al.* 2009 [183])

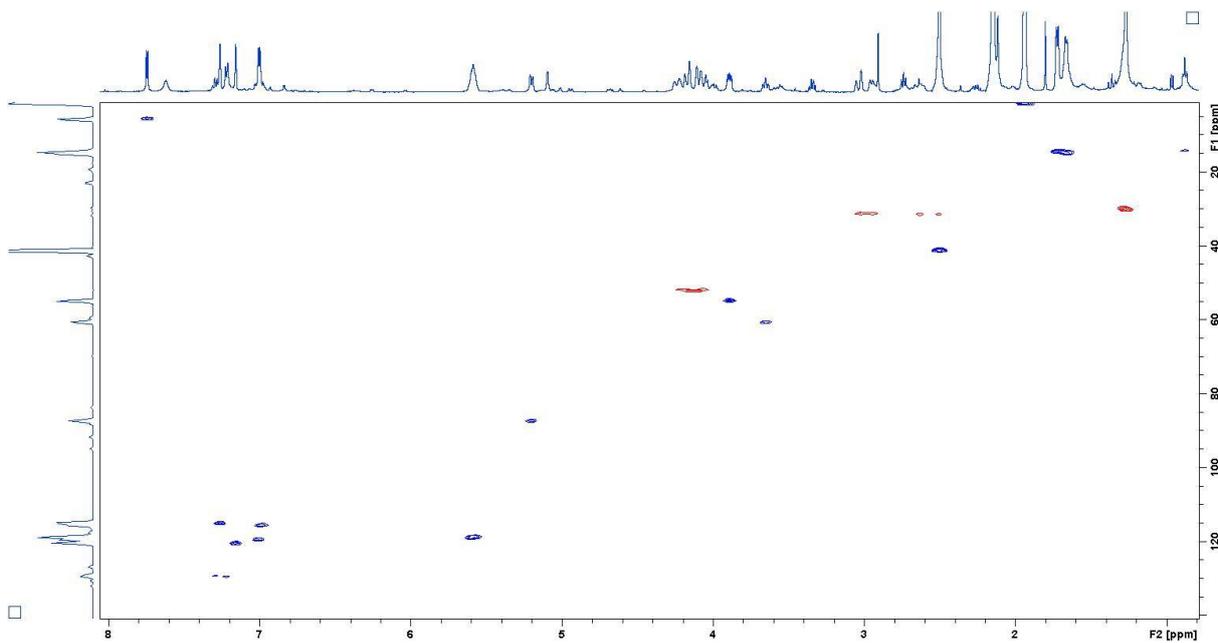
**9-Chlor-8-dehydroxy-7-hydroxytomaymycin, 11-Dehydroxy-Form**

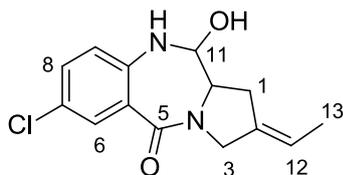
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  7.75 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H, 11-H), 7.62 (bs, Ph-OH) 7.26 (d,  $J = 2.8$  Hz, 6-H), 7.16 (d,  $J = 2.8$  Hz, 8-H), 5.59 (m, 1H, 12-H), 4.16 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.10 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.90 (m, 1H, 11a-H), 3.03 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.94 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.72 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeCN-}d_4$ ):  $\delta$  165.6 (11-C), 164.0 (5-C), 155.9 (7-C), 136.9 (9a-C), 134.6 (2-C), 132.5 (9-C or 5a-C), 131.1 (5a-C or 9-C), 120.6 (8-C), 119.0 (13-C), 115.1 (6-C), 54.9 (11a-C), 52.1 (3-C), 31.3 (1-C), 14.6 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 277.0744, found 277.0741.

$^1\text{H}$ -NMR Spektrum:

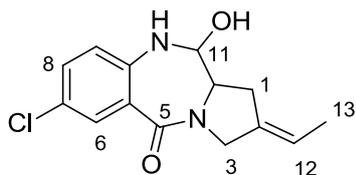


HSQC-NMR Spektrum:

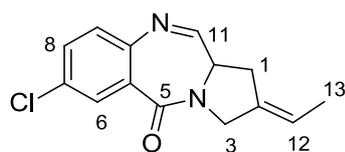


**7-Chlor-8-dehydroxytomaymycin****7-Chlor-8-dehydroxytomaymycin 7-Cl-tomaymycin (11-Hydroxy, 2 Epimere und 11-Dehydroxy)****7-Chlor-8-dehydroxytomaymycin (11-Hydroxy-Epimer 1)**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.46 (d,  $J = 2.7$  Hz, 6-H), 7.29 (dd,  $J = 2.7, 8.6$  Hz, 8-H), 6.95 (d,  $J = 8.6$  Hz, 9-H), 6.19 (d,  $J = 7.4$  Hz, 11-OH), 6.10 (bs, NH), 5.54 (m, 1H, 12-H), 4.53 (m, 1H, 11-H), 4.19 - 4.07 (m, 2H, 3- $\text{H}_{a,b}$ ), 3.58 (m, 1H, 11a-H), 2.72 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.67 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.64 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  165.3 (5-C), 142.8 (9a-C), 133.7 (2-C), 130.9 (7-C), 130.9 (8-C), 128.6 (6-C), 125.5 (5a-C), 122.7 (9-C), 117.1 (12-C), 84.9 (11-C), 58.7 (11a-C), 50.9 (3-C), 30.3 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 279.0895, found 279.0894.

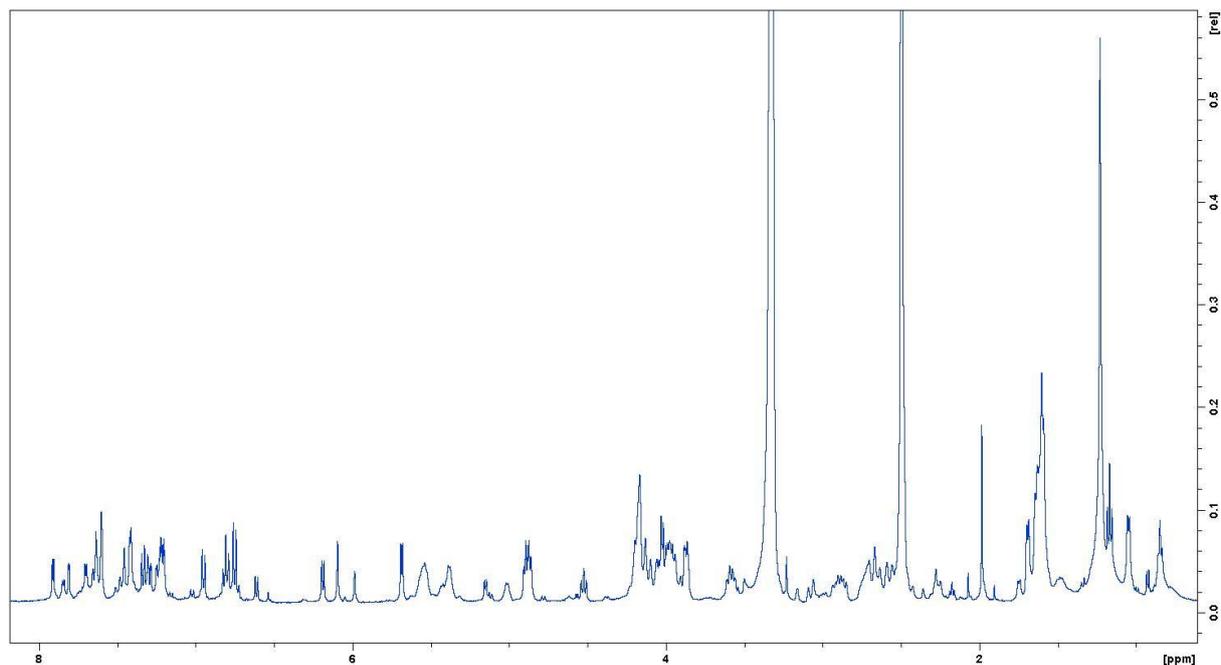
**7-Chlor-8-dehydroxytomaymycin (11-Hydroxy-Epimer 2)**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.60 (d,  $J = 2.7$  Hz, 6-H), 7.43 (bs, NH), 7.21 (dd,  $J = 2.7, 8.9$  Hz, 8-H), 6.75 (d,  $J = 8.9$  Hz, 9-H), 5.69 (d,  $J = 5.8$  Hz, 11-OH), 5.38 (m, 1H, 12-H), 4.90 (m, 1H, 11-H), 4.18 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.04 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.87 (m, 1H, 11a-H), 2.88 (m, 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.58 (m, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.60 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  164.4 (5-C), 143.2 (9a-C), 134.7 (2-C), 130.9 (8-C), 130.6 (7-C), 130.4 (6-C), 119.6 (9-C), 119.2 (5a-C), 114.7 (12-C), 80.6 (11-C), 58.6 (11a-C), 53.2 (3-C), 31.7 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 279.0895, found 279.0894.

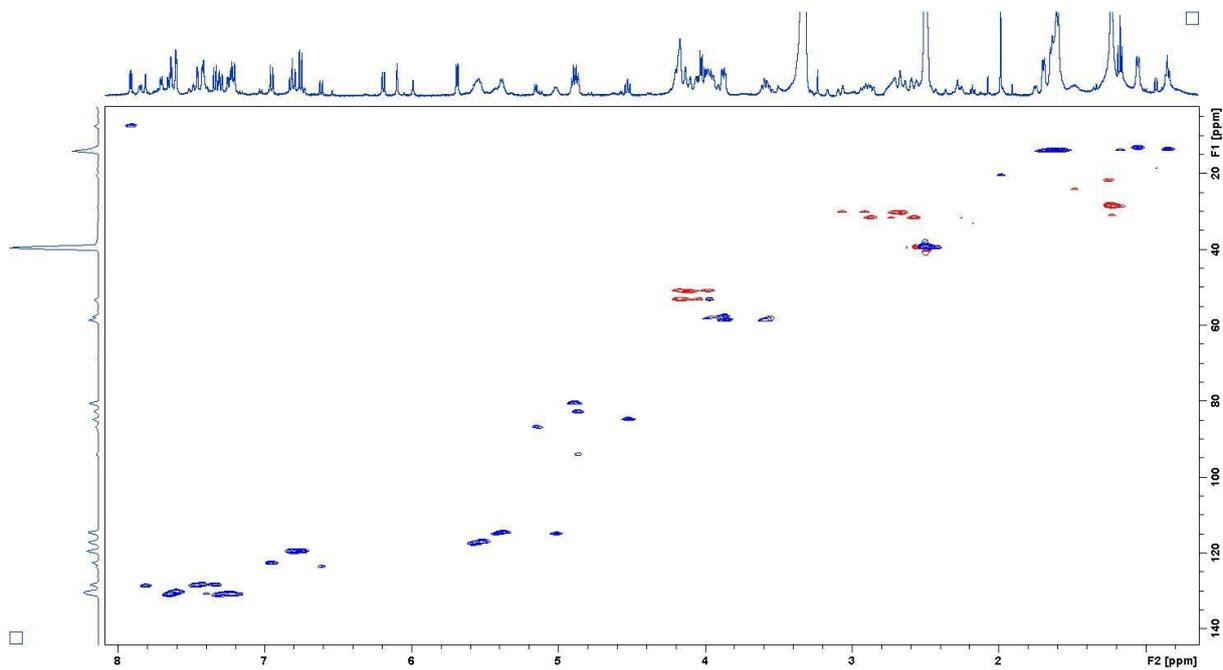
**7-Chlor-8-dehydroxytomaymycin (11-Dehydroxy-Form)**

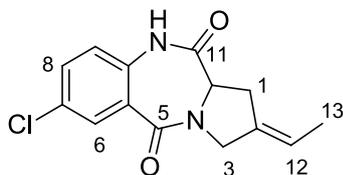
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7.91 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, 11-H), 7.81 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, 6-H), 7.65 (dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz, 1H, 8-H), 7.34 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, 9-H), 5.38 (m, 1H, 12-H), 4.19 - 4.07 (m, 2H, 3-H), 3.97 (m, 1H, 11a-H), 3.08 (d,  $J = 15.4$ , 1H, 1-H<sub>a</sub>), 2.89 (m, 1H, 1-H<sub>b</sub>), 1.60 (m, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  167.4 (11-C), 162.3 (5-C), 144.5 (9a-C), 134.7 (2-C), 131.2 (8-C), 130.2 (7-C), 128.6 (6-C), 128.4 (5a-C), 128.3 (9-C), 114.7 (12-C), 53.3 (11a-C), 51.1 (3-C), 30.2 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 261.0795, found 261.0791.

$^1\text{H}$ -NMR Spektrum:



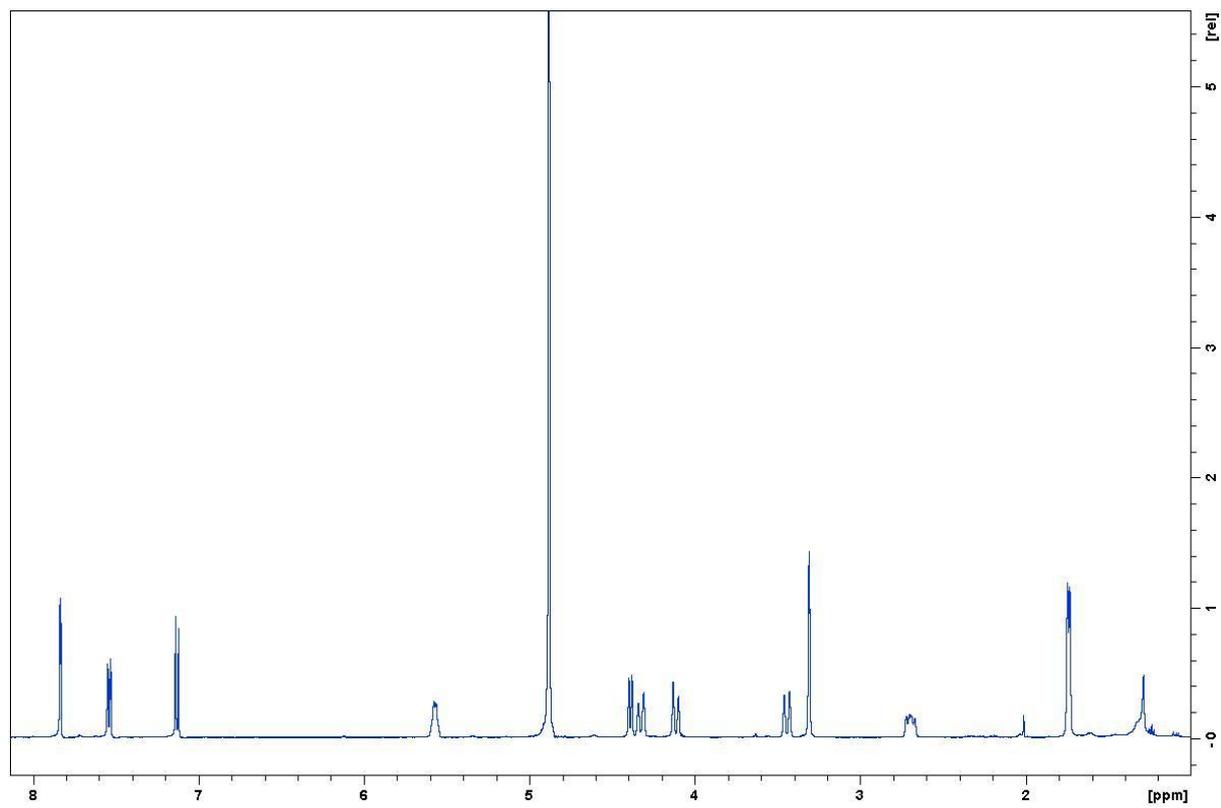
HSQC-NMR Spektrum:



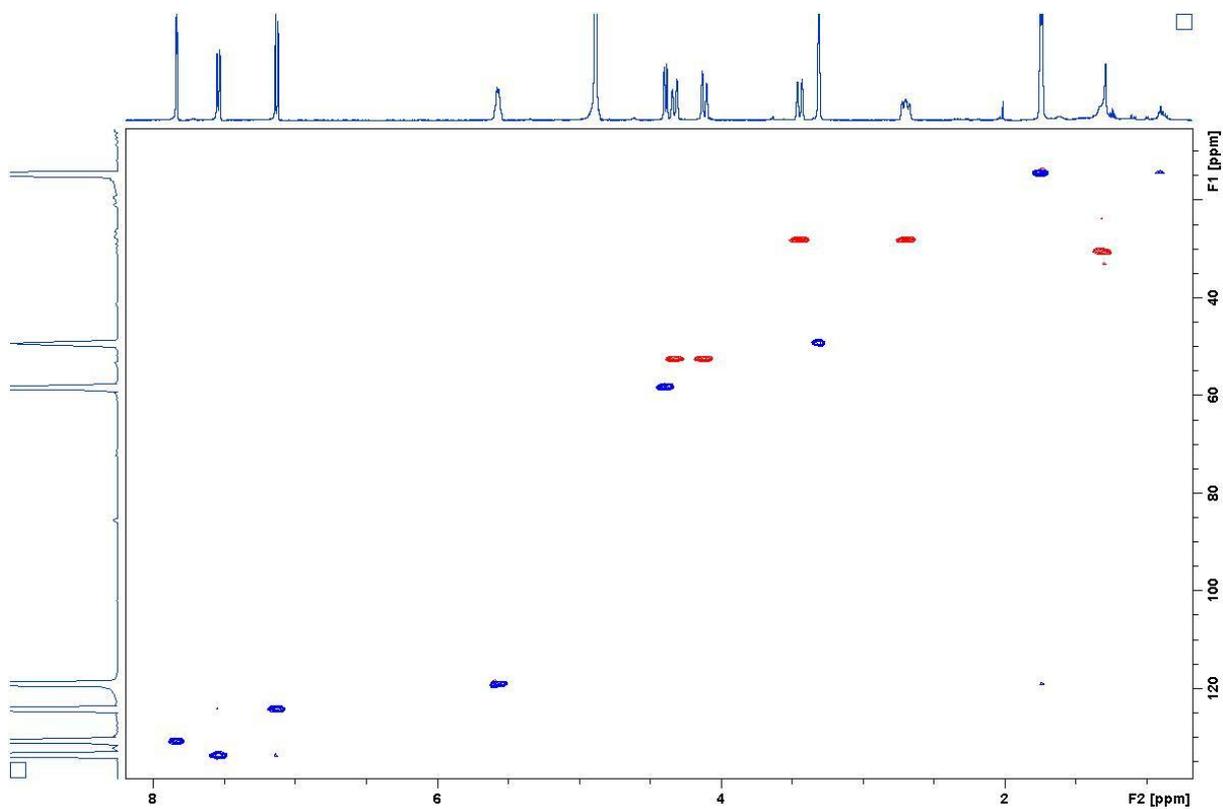
**7-Chlor-8-dehydroxy-oxotomaymycin**

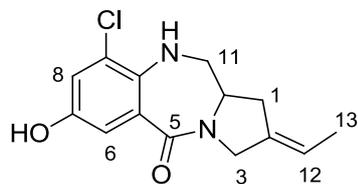
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  7.84 (d,  $J = 2.5$  Hz, 6-H), 7.54 (dd,  $J = 2.5, 8.8$  Hz, 8-H), 7.13 (d,  $J = 8.8$  Hz, 9-H), 5.57 (m, 1H, 12-H), 4.39 (dd,  $J = 9.4, 2.2$  Hz, 1H, 11a-H), 4.33 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.12 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.44 (d,  $J = 16.2$ , 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.70 (dd,  $J = 11.6, 13.8$  Hz, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.74 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  172.0 (11-C), 166.4 (5-C), 136.8 (5a-C or 9a-C), 134.4 (2-C), 133.8 (8-C), 131.1 (5a-C or 9a-C), 130.7 (6-C), 129.1 (7-C), 124.2 (9-C), 119.2 (12-C), 58.2 (11a-C), 52.6 (3-C), 28.2 (1-C), 14.5 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 277.0738, found 277.0739.

$^1\text{H}$ -NMR Spektrum:



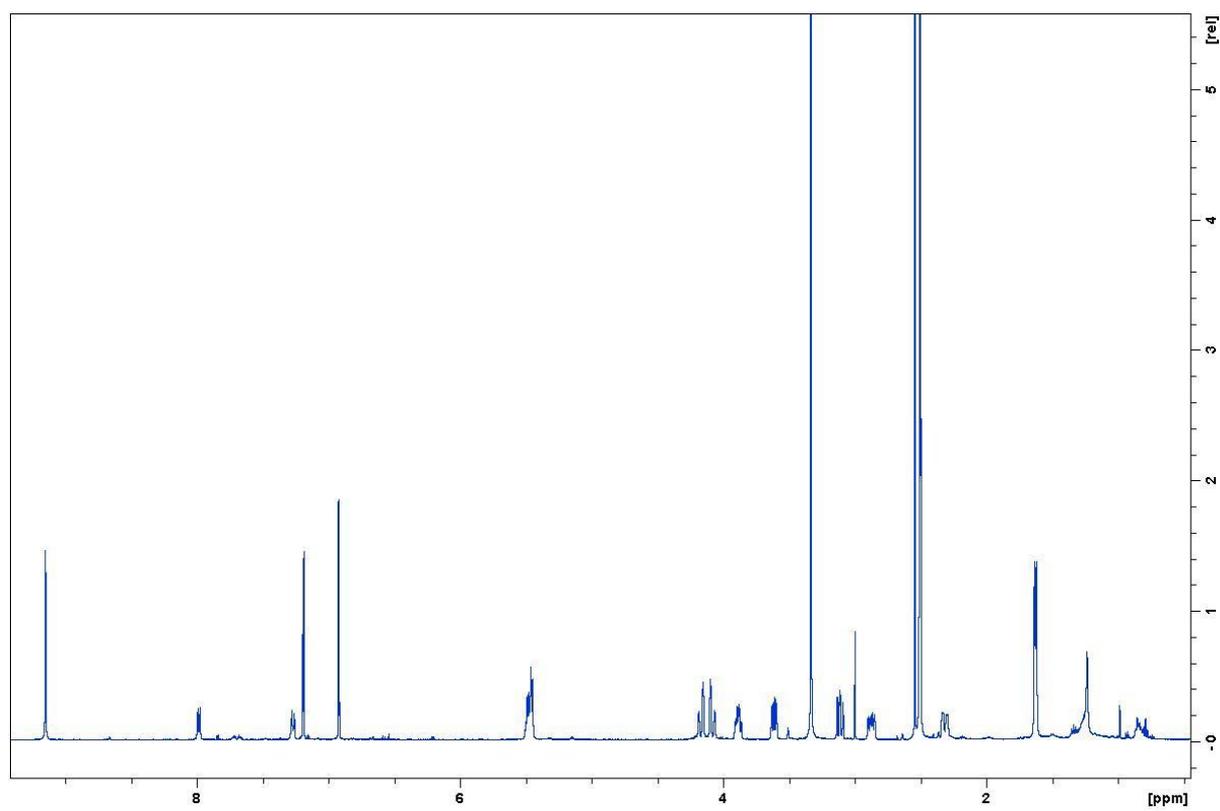
HSQC-NMR Spektrum:



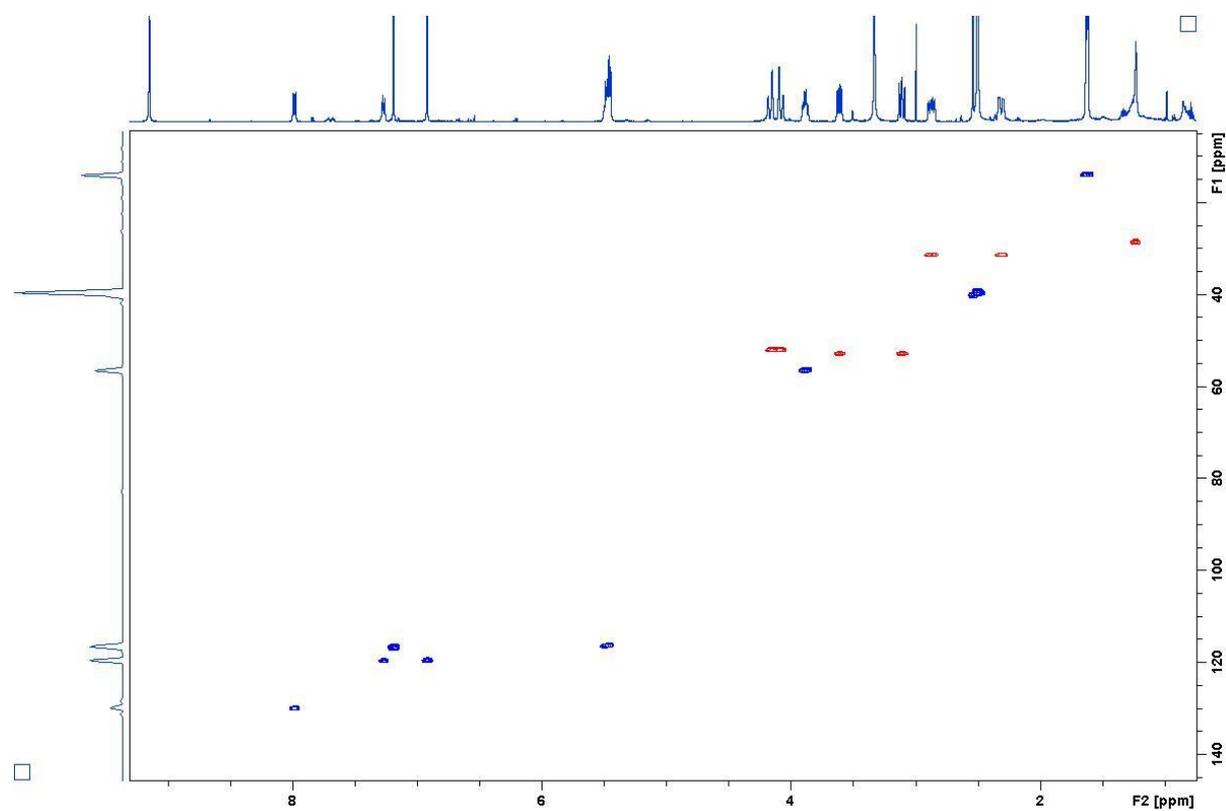
**7-Chlor-10,11-dihydro-8-dehydroxytomaymycin**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.15 (s, 1H, 7-OH), 7.19 (d,  $J = 3.0$  Hz, 6-H), 6.92 (d,  $J = 2.9$  Hz, 8-H), 5.48 (dt,  $J = 6.7, 2.2$  Hz, 1H, 12-H), 5.45 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H, NH), 4.17 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 4.08 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.89 (m, 1H, 11a-H), 3.61 (m, 1H, 11- $\text{H}_a$ ), 3.11 (m, 1H, 11- $\text{H}_b$ ), 2.87 (dd,  $J = 15.8, 3.7$ , 1H, 1- $\text{H}_a$ ), 2.31 (dd,  $J = 15.8, 3.7$  Hz, 1H, 1- $\text{H}_b$ ), 1.62 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 13-H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  164.3 (5-C), 147.7 (7-C), 135.0 (9-C), 133.4 (2-C), 121.7 (5a-C), 121.2 (9a-C), 119.6 (8-C), 116.7 (6-C), 116.4 (12-C), 56.4 (11a-C), 52.9 (11-C), 52.1 (3-C), 31.4 (1-C), 13.9 (13-C) ppm; HR-MS (ESI): calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 279.0900, found 279.0913.

$^1\text{H-NMR}$  Spektrum:



HSQC-NMR Spektrum:



## Bibliographie

- [1] B. Gosio, "Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni del mais: contributo all'etiologia della pellagra," 1896.
- [2] R. Bentley, "Bartolomeo Gosio, 1863–1944: An appreciation," *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 48, pp. 229–250, 2001.
- [3] W. W. Epinette, C. M. Parker, E. L. Jones, and M. C. Greist, "Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety.," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 17, no. 6, pp. 962–971, 1987.
- [4] B. Fulton and A. Markham, "Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation.," *Drugs*, vol. 51, no. 2, pp. 278–298, Feb. 1996.
- [5] A. Fleming, "On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*," *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 10, no. 3, pp. 226–236, Jun. 1929.
- [6] C. Jeśman, A. Młudzik, and M. Cybulska, "History of antibiotics and sulphonamides discoveries," *Pol. Merkur. Lekarski*, vol. 30, no. 179, pp. 320–322, 2011.
- [7] R. Bud, "Innovators, deep fermentation and antibiotics: Promoting applied science before and after the Second World War," *Dynamis*, vol. 31, no. 2, pp. 323–341, 2011.
- [8] A. Schatz, E. Bugie, and S. A. Waksman, "Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria.," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 55, pp. 66–69, 1944.
- [9] E. W. Hafner, B. W. Holley, K. S. Holdom, S. E. Lee, R. G. Wax, D. Beck, H. A. McArthur, and W. C. Wernau, "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)*, vol. 44, no. 3, pp. 349–356, 1991.
- [10] C. Vézina, A. Kudelski, and S. N. Sehgal, "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 28, no. 10, pp. 721–726, 1975.

- [11] E. Pohanka, "New immunosuppressive drugs: an update.," *Curr. Opin. Urol.*, vol. 11, no. 2, pp. 143–151, 2001.
- [12] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchya, Y. Takahashi, and R. Masuma, "A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 30, no. 4, pp. 275–282, 1977.
- [13] J. Sedlak, L. Hunakova, J. Duraj, B. Chorvath, and L. Novotny, "Effects of protein kinase C inhibitor, staurosporine derivative CGP 41 251, on cell cycle, DNA synthesis and drug uptake in neoplastic cell lines.," *Anticancer. Drugs*, vol. 6, no. 1, pp. 70–76, 1995.
- [14] "Clinical trial number NCT00651261: Daunorubicin, Cytarabine, and Midostaurin in Treating Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia." .
- [15] M. Kapadia, K. V. I. Rolston, and X. Y. Han, "Invasive *Streptomyces* infections: Six cases and literature review," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 127, pp. 619–624, 2007.
- [16] X. Liu, "Enzymes in Food Technology," 2010.
- [17] G. Liu, K. F. Chater, G. Chandra, G. Niu, and H. Tan, "Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *streptomyces*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, pp. 112–43, 2013.
- [18] U. Süsstrunk, J. Pidoux, S. Taubert, A. Ullmann, and C. J. Thompson, "Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*," *Mol. Microbiol.*, vol. 30, pp. 33–46, 1998.
- [19] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood, "Practical *Streptomyces* Genetics," *John Innes Cent. Ltd.*, p. 529, 2000.
- [20] J. Ehrlich and D. Gottlieb, "*Streptomyces venezuelae*, n. sp., the source of chloromycetin.," *J Bacteriol.*, vol. 56, no. 4, pp. 467–77, 1948.
- [21] M. A. Glazebrook, J. L. Doull, C. Stuttard, and L. C. Vining, "Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 136, pp. 581–588, 1990.

- [22] M. J. Bibb, A. Domonkos, G. Chandra, and M. J. Buttner, "Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by  $\sigma$ (BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN.," *Mol. Microbiol.*, vol. 84, no. 6, pp. 1033–49, Jun. 2012.
- [23] A. Manteca and J. Sanchez, "Streptomyces development in colonies and soils," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, pp. 2920–2924, 2009.
- [24] K. F. Chater, "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 361, no. 1469, pp. 761–768, 2006.
- [25] A. L. Demain and A. Fang, "The natural functions of secondary metabolites.," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 69, pp. 1–39, 2000.
- [26] A. M. L. Barnard, S. D. Bowden, T. Burr, S. J. Coulthurst, R. E. Monson, and G. P. C. Salmond, "Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1483, pp. 1165–1183, 2007.
- [27] N. Rispaill, B. Hauck, B. Bartholomew, A. A. Watson, R. J. Nash, and K. J. Webb, "Secondary metabolite profiling of the model legume *Lotus japonicus* during its symbiotic interaction with *Mesorhizobium loti*," *Symbiosis*, vol. 50, no. 3, pp. 119–128, 2010.
- [28] B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, and R. Müller, "The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 21, pp. 6476–6485, 2000.
- [29] J. H. Lakey, E. J. Lea, B. A. Rudd, H. M. Wright, and D. A. Hopwood, "A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 129, no. 12, pp. 3565–3573, 1983.
- [30] J. E. Berleman and J. R. Kirby, "Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 33, no. 5, pp. 942–957, 2009.
- [31] C. O. Gualerzi, L. Brandi, A. Fabbretti, and C. L. Pon, *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.
- [32] M. A. Ghannoum and L. B. Rice, "Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 501–517, 1999.

- 
- [33] M. D. Tendler and S. Korman, "REFUIN': A NON-CYTOTOXIC CARCINOSTATIC COMPOUND PROLIFERATED BY A THERMOPHILIC ACTINOMYCETE.," *Nature*, vol. 199, p. 501, 1963.
- [34] W. Leimgruber, V. Stefanović, F. Schenker, A. Karr, and J. Berger, "Isolation and Characterization of Anthramycin, a New Antitumor Antibiotic," *J Am Chem Soc.*, vol. 87, no. 24, pp. 5791–5793, 1965.
- [35] W. Leimgruber, A. D. Batcho, and F. Schenker, "The Structure of Anthramycin," *J Am Chem Soc.*, vol. 87, no. 24, pp. 5793–5795, 1965.
- [36] W. Leimgruber, A. D. Batcho, and R. C. Czajkowski, "Total synthesis of anthramycin," *J Am Chem Soc.*, vol. 90, no. 20, pp. 5641–5643, 1968.
- [37] K. Arima, M. Kohsaka, G. Tamura, H. Imanaka, and H. Sakai, "STUDIES ON TOMAYMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC. I ISOLATION AND PROPERTIES OF TOMAYMYCIN," *J Antibiot*, vol. 25, no. 8, pp. 437–44, 1972.
- [38] G. F. Gauze, T. P. Preobrazhenskaia, L. P. Ivanitskaia, and S. M. A., "[Production of the antibiotic sibiromycin by the *Streptosporangium sibiricum* sp. nov. culture].," *Antibiotiki*, vol. 14, no. 11, pp. 963–9, 1969.
- [39] B. Gerratana, "Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines," *Med. Res. Rev.*, vol. 32, pp. 254–293, 2012.
- [40] D. Antonow and D. E. Thurston, "Synthesis of DNA-interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines (PBDs).," *Chem. Rev.*, vol. 111, pp. 2815–2864, 2011.
- [41] K. Shimizu, I. Kawamoto, F. Tomita, M. Morimoto, and K. Fujimoto, "Prothracarcin, a novel antitumor antibiotic.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 35, pp. 972–978, 1982.
- [42] M. Konishi, H. Ohkuma, N. Naruse, and H. Kawaguchi, "Chicamycin, a new antitumor antibiotic. II. Structure determination of chicamycins A and B.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 37, pp. 200–206, 1984.
- [43] L. H. Hurley, C. Gairola, and N. V Das, "Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Biosynthesis of the antitumor antibiotic 11-demethyltomaymycin and its biologically inactive metabolite oxotomaymycin by *Streptomyces achromogenes*," *Biochemistry*, vol. 15, pp. 3760–3769, 1976.

- [44] H. Osada, K. Ishinabe, T. Yano, K. Kajikawa, and K. Isono, "New pyrrolobenzodiazepine antibiotics, RK-1441A and B. I. Biological properties.," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 54, pp. 2875–2881, 1990.
- [45] Y. Han, Y. Li, Y. Shen, J. Li, W. Li, and Y. Shen, "Oxoprothracarcin, a novel pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotic from marine *Streptomyces* sp. M10946," *Drug Discov. Ther.*, vol. 7, no. 6, pp. 243–247, 2013.
- [46] G. B. Jones, C. L. Davey, T. C. Jenkins, A. Kamal, G. G. Kneale, S. Neidle, G. D. Webster, and D. E. Thurston, "The non-covalent interaction of pyrrolo[2, 1-c][1, 4]benzodiazepine-5, 11-diones with DNA.," *Anticancer. Drug Des.*, vol. 5, pp. 249–264, 1990.
- [47] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, P. D. Cotter, D. J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P. C. Dorrestein, K.-D. Entian, M. A. Fischbach, J. S. Garavelli, U. Goransson, C. W. Gruber, D. H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A. R. Horswill, M. Jaspars, W. L. Kelly, J. P. Klinman, O. P. Kuipers, A. J. Link, W. Liu, M. A. Marahiel, D. A. Mitchell, G. N. Moll, B. S. Moore, R. Muller, S. K. Nair, I. F. Nes, G. E. Norris, B. M. Olivera, H. Onaka, M. L. Patchett, J. Piel, M. J. T. Reaney, S. Rebuffat, R. P. Ross, H.-G. Sahl, E. W. Schmidt, M. E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Sussmuth, J. R. Tagg, G.-L. Tang, A. W. Truman, J. C. Vederas, C. T. Walsh, J. D. Walton, S. C. Wenzel, J. M. Willey, and W. A. van der Donk, "Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 1, pp. 108–160, 2013.
- [48] O. Reva and B. Tümmler, "Think big--giant genes in bacteria.," *Environ. Microbiol.*, vol. 10, no. 3, pp. 768–777, 2008.
- [49] M. A. Marahiel, "Working outside the protein-synthesis rules: Insights into non-ribosomal peptide synthesis," *Journal of Peptide Science*, vol. 15, no. 12, pp. 799–807, 2009.
- [50] F. Kopp and M. A. Marahiel, "Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, no. 4, pp. 735–749, 2007.
- [51] J. Ku, R. G. Mirmira, L. Liu, and D. V. Santi, "Expression of a functional non-ribosomal peptide synthetase module in *Escherichia coli* by coexpression with a phosphopantetheinyl transferase.," *Chem. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 203–207, 1997.
- [52] N. Schracke, U. Linne, C. Mahlert, and M. A. Marahiel, "Synthesis of linear

- gramicidin requires the cooperation of two independent reductases," *Biochemistry*, vol. 44, no. 23, pp. 8507–8513, 2005.
- [53] Y. Li, K. J. Weissman, and R. Müller, "Myxochelin biosynthesis: Direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 24, pp. 7554–7555, 2008.
- [54] D. A. Miller, L. Luo, N. Hillson, T. A. Keating, and C. T. Walsh, "Yersiniabactin synthetase: A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*," *Chem. Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 333–344, 2002.
- [55] T. Stachelhaus and C. T. Walsh, "Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase," *Biochemistry*, vol. 39, no. 19, pp. 5775–5787, 2000.
- [56] T. Velkov and A. Lawen, "Non-ribosomal peptide synthetases as technological platforms for the synthesis of highly modified peptide bioeffectors - Cyclosporin synthetase as a complex example," *Biotechnology Annual Review*, vol. 9, pp. 151–197, 2003.
- [57] S. A. Survase, L. D. Kagliwal, U. S. Annapure, and R. S. Singhal, "Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications," *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 4, pp. 418–435, 2011.
- [58] Y. Hu, V. Phelan, I. Ntai, C. M. Farnet, E. Zazopoulos, and B. O. Bachmann, "Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*," *Chem. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 691–701, Jun. 2007.
- [59] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, and R. E. Dickerson, "Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA," *Nature*, vol. 287, pp. 755–758, 1980.
- [60] Y. Xiong and M. Sundaralingam, "Protein–nucleic acid interaction: major groove recognition determinants," *eLS*, pp. 1–8, 2001.
- [61] D. Antonow, M. Kaliszczak, G.-D. Kang, M. Coffils, A. C. Tiberghien, N. Cooper, T. Barata, S. Heidelberger, C. H. James, M. Zloh, T. C. Jenkins, A. P. Reszka, S. Neidle, S. M. Guichard, D. I. Jodrell, J. A. Hartley, P. W. Howard, and D. E. Thurston, "Structure-activity relationships of monomeric C2-aryl pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) antitumor agents," *J. Med. Chem.*, vol. 53, pp. 2927–2941, 2010.

- 
- [62] R. P. Hertzberg, S. M. Hecht, V. L. Reynolds, I. J. Molineux, and L. H. Hurley, "DNA sequence specificity of the pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotics. Methidiumpropyl-EDTA-iron(II) footprinting analysis of DNA binding sites for anthramycin and related drugs," *Biochemistry*, vol. 25, pp. 1249–1258, 1986.
- [63] D. E. Graves, C. Pattaroni, B. S. Krishnan, J. M. Ostrander, L. H. Hurley, and T. R. Krugh, "The reaction of anthramycin with DNA. Proton and carbon nuclear magnetic resonance studies on the structure of the anthramycin-DNA adduct.," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, pp. 8202–8209, 1984.
- [64] M. D. Barkley, S. Cheatham, D. E. Thurston, and L. H. Hurley, "Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotics: evidence for two forms of tomaymycin bound to DNA.," *Biochemistry*, vol. 25, pp. 3021–3031, 1986.
- [65] M. L. Kopka, D. S. Goodsell, I. Baikalov, K. Grzeskowiak, D. Cascio, and R. E. Dickerson, "Crystal structure of a covalent DNA-drug adduct: anthramycin bound to C-C-A-A-C-G-T-T-G-G and a molecular explanation of specificity.," *Biochemistry*, vol. 33, pp. 13593–13610, 1994.
- [66] R. L. Petrussek, G. L. Anderson, T. F. Garner, Q. L. Fannin, D. J. Kaplan, S. G. Zimmer, and L. H. Hurley, "Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics. Proposed structures and characteristics of the in vitro deoxyribonucleic acid adducts of anthramycin, tomaymycin, sibiromycin, and neothramycins A and B.," *Biochemistry*, vol. 20, pp. 1111–1119, 1981.
- [67] M. S. Puvvada, S. A. Forrow, J. A. Hartley, P. Stephenson, I. Gibson, T. C. Jenkins, and D. E. Thurston, "Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase in vitro transcription by DNA-binding pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines," *Biochemistry*, vol. 36, pp. 2478–2484, 1997.
- [68] G. Wells, C. R. H. Martin, P. W. Howard, Z. A. Sands, C. A. Loughton, A. Tiberghien, C. K. Woo, L. A. Masterson, M. J. Stephenson, J. A. Hartley, T. C. Jenkins, S. D. Shnyder, P. M. Loadman, M. J. Waring, and D. E. Thurston, "Design, synthesis, and biophysical and biological evaluation of a series of pyrrolobenzodiazepine-poly(N-methylpyrrole) conjugates," *J. Med. Chem.*, vol. 49, pp. 5442–5461, 2006.
- [69] M. Kotecha, J. Kluza, G. Wells, C. C. O'Hare, C. Forni, R. Mantovani, P. W. Howard, P. Morris, D. E. Thurston, J. A. Hartley, and D. Hochhauser, "Inhibition of DNA binding of the NF-Y transcription factor by the pyrrolobenzodiazepine-polyamide conjugate GWL-78.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, pp. 1319–1328, 2008.
- [70] R. L. Petrussek, E. L. Uhlenhopp, N. Duteau, L. H. Hurley, R. L. Petrusseks, E. L.

- Uhlenhopp, N. Duteaug, and H. Hurley, "Biological consequences of DNA damage in normal and xeroderma pigmentosum cell . Reaction of Anthramycin with DNA," 1982.
- [71] A. Kamal, M. K. Reddy, A. K. Srivastava, and Y. V. V Srikanth, "Pyrrolobenzodiazepines as Sequence Selective DNA Binding Agents," *Med. Chem. Drug Des.*, 2012.
- [72] K. M. Rahman, A. S. Thompson, C. H. James, M. Narayanaswamy, and D. E. Thurston, "The pyrrolobenzodiazepine dimer SJG-136 forms sequence-dependent intrastrand DNA cross-links and monoalkylated adducts in addition to interstrand cross-links," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, pp. 13756–13766, 2009.
- [73] N. G. Shepelevtseva, "[Effect of the antibiotic sibiromycin on the bioelectrical activity of the heart and the serum transaminase activity in dogs]," *Antibiotiki*, vol. 20, pp. 145–150, 1975.
- [74] W. C. Lubawy, R. A. Dallam, and L. H. Hurley, "Protection against anthramycin-induced toxicity in mice by coenzyme Q10.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 64, no. 1, pp. 105–109, 1980.
- [75] W. C. Lubawy, J. Whaley, and L. H. Hurley, "Coenzyme Q10 or alpha-tocopherol reduce the acute toxicity of anthramycin in mice.," *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, vol. 24, pp. 401–404, 1979.
- [76] T. P. Ryan and S. D. Aust, "The role of iron in oxygen-mediated toxicities.," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 22, no. 2, pp. 119–141, 1992.
- [77] S. D. Aust, L. A. Morehouse, and C. E. Thomas, "Role of metals in oxygen radical reactions.," *J. Free Radic. Biol. Med.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–25, 1985.
- [78] P. G. Baraldi, B. Cacciari, A. Guiotto, R. Romagnoli, A. N. Zaid, and G. Spalluto, "Heterocyclic Analogs of DNA Minor Groove Alkylating Agents," in *Current Pharmaceutical Design*, 1998, pp. 249–276.
- [79] I. T. Yonemoto, W. Li, A. Khullar, N. Reixach, and B. Gerratana, "Mutasythesis of a potent anticancer sibiromycin analogue," *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, pp. 973–977, 2012.
- [80] M. M. Davidson, C. Nesti, L. Palenzuela, W. F. Walker, E. Hernandez, L. Protas, M. Hirano, and N. D. Isaac, "Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 39, pp. 133–147, 2005.

- 
- [81] J.-J. Wang, Y.-K. Shen, W.-P. Hu, M.-C. Hsieh, F.-L. Lin, M.-K. Hsu, and M.-H. Hsu, "Design, synthesis, and biological evaluation of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine and indole conjugates as anticancer agents.," *J. Med. Chem.*, vol. 49, pp. 1442–1449, 2006.
- [82] L. Cipolla, A. C. Araújo, C. Airoidi, and D. Bini, "Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine as a scaffold for the design and synthesis of anti-tumour drugs.," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–31, Jan. 2009.
- [83] T. Hadjivassileva, D. E. Thurston, and P. W. Taylor, "Pyrrolobenzodiazepine dimers: Novel sequence-selective, DNA-interactive, cross-linking agents with activity against Gram-positive bacteria," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, pp. 513–518, 2005.
- [84] K. M. Rahman, H. Rosado, J. B. Moreira, E. A. Feuerbaum, K. R. Fox, E. Stecher, P. W. Howard, S. J. Gregson, C. H. James, M. De la Fuente, D. E. Waldron, D. E. Thurston, and P. W. Taylor, "Antistaphylococcal activity of DNA-interactive pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimers and PBD-biaryl conjugates," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, pp. 1683–1696, 2012.
- [85] Y. M. Chiang, S. L. Chang, B. R. Oakley, and C. C. C. Wang, "Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 15, no. 1, pp. 137–143, 2011.
- [86] U. Galm, L. Wang, E. Wendt-Pienkowski, R. Yang, W. Liu, M. Tao, J. M. Coughlin, and B. Shen, "In vivo manipulation of the bleomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 revealing new insights into its biosynthetic pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 42, pp. 28236–28245, 2008.
- [87] D. A. Aidoo, K. Barrett, and L. C. Vining, "Plasmid transformation of *Streptomyces venezuelae*: modified procedures used to introduce the gene(s) for p-aminobenzoate synthase.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 136, no. 4, pp. 657–662, 1990.
- [88] J. P. Gomez-Escribano and M. J. Bibb, "Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters," *Microb. Biotechnol.*, vol. 4, no. 2, pp. 207–215, 2011.
- [89] J. Fu, X. Bian, S. Hu, H. Wang, F. Huang, P. M. Seibert, A. Plaza, L. Xia, R. Muller, A. F. Stewart, and Y. Zhang, "Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting,"

- Nat Biotech*, vol. 30, no. 5, pp. 440–446, May 2012.
- [90] M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. Nagaraja Rao, and B. E. Schoner, "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.," *Gene*, vol. 116, pp. 43–49, 1992.
- [91] H. W. Nützmann and A. Osbourn, "Gene clustering in plant specialized metabolism," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 26, pp. 91–99, 2014.
- [92] J. F. Martin and P. Liras, "Organization and Expression of Genes Involved in the Biosynthesis of Antibiotics and other Secondary Metabolites," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 173–206, 1989.
- [93] E. Angov, "Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins," *Biotechnology Journal*, vol. 6, no. 6, pp. 650–659, 2011.
- [94] M. Welch, S. Govindarajan, J. E. Ness, A. Villalobos, A. Gurney, J. Minshull, and C. Gustafsson, "Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, p. e7002, 2009.
- [95] M. Komatsu, T. Uchiyama, S. Omura, D. E. Cane, and H. Ikeda, "Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 6, pp. 2646–2651, 2010.
- [96] J. Kennedy, "Mutasythesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 25, no. 1, pp. 25–34, 2008.
- [97] a L. Demain and R. P. Elander, "The beta-lactam antibiotics: past, present, and future.," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 75, no. 1–2, pp. 5–19, 1999.
- [98] C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, and M. K. Richards, "Novel avermectins produced by mutational biosynthesis.," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 44, no. 3, pp. 357–365, 1991.
- [99] B. K. Hubbard and C. T. Walsh, "Vancomycin assembly: Nature's way," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 42, no. 7, pp. 730–765, 2003.
- [100] S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, and R. D. Süssmuth, "Mutasythesis of Glycopeptide Antibiotics: Variations of Vancomycin's AB-Ring Amino Acid 3,5-Dihydroxyphenylglycine,"

- J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 19, pp. 5942–5943, 2004.
- [101] V. Pfeifer, G. J. Nicholson, J. Ries, J. Recktenwald, A. B. Schefer, R. M. Shawky, J. Schröder, W. Wohlleben, and S. Pelzer, “A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis. The biosynthesis of the non-proteinogenic amino acid (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 42, pp. 38370–38377, 2001.
- [102] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, and M. A. Marahiel, “The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases,” *Chem. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 493–505, 1999.
- [103] R. N. Patel, “Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis.,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 52, pp. 361–395, 1998.
- [104] M. Suffnes, Ed., *TAXOL Science and Applications*. 1995.
- [105] M. J, S. MH, W. HL, and J. BA, “Dihydrostreptomycin in topical therapy,” *Arch. Derm. Syphilol.*, vol. 61, no. 4, pp. 648–660, 1950.
- [106] B. Loder, G. G. F. Newton, and E. P. Abraham, “The cephalosporin C nucleus (7-aminocephalosporanic acid) and some of its derivatives,” *Biochem. J.*, vol. 79, no. 2, pp. 408–416, May 1961.
- [107] M. H. Kollef, “New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.,” *Critical care and resuscitation: journal of the Australasian Academy of Critical Care Medicine*, vol. 11, no. 4. pp. 282–286, 2009.
- [108] W. C. Campbell, R. W. Burg, M. H. Fisher, and R. A. Dybas, “The discovery of ivermectin and other avermectins,” in *Pesticide synthesis through rational approaches*, 1984, pp. 5–20.
- [109] A. Crump and S. Ōmura, “Ivermectin, ‘wonder drug’ from Japan: the human use perspective.,” *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, vol. 87, no. 2, pp. 13–28, 2011.
- [110] C. J. B. Harvey, J. D. Puglisi, V. S. Pande, D. E. Cane, and C. Khosla, “Precursor directed biosynthesis of an orthogonally functional erythromycin analogue: Selectivity in the ribosome macrolide binding pocket,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 29, pp. 12259–12265, 2012.
- [111] K. Harmrolfs, L. Mancuso, B. Drung, F. Sasse, and A. Kirschning, “Preparation of new alkyne-modified ansamitocins by mutasynthesis,” *Beilstein J. Org.*

- Chem.*, vol. 10, pp. 535–543, 2014.
- [112] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, “Click-Chemie-chemische funktionalitaet mit einer handvoll guter reaktionen,” *Angew. Chemie*, vol. 113, pp. 2056–2075, 2001.
- [113] F. Amblard, J. H. Cho, and R. F. Schinazi, “Cu(I)-catalyzed huisgen azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in nucleoside, nucleotide, and oligonucleotide chemistry,” *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 9, pp. 4207–4220, 2009.
- [114] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, and V. V. Fokin, “Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, pp. 210–216, 2005.
- [115] D. G. Crosby and N. Aharonson, “The structure of carotatoxin, a natural toxicant from carrot,” *Tetrahedron*, vol. 23, no. 1, pp. 465–472, 1967.
- [116] U. Wittstock, F. Hadacek, G. Wurz, E. Teuscher, and H. Greger, “Polyacetylenes from water hemlock, *Cicuta virosa*,” *Planta Med.*, vol. 61, no. 5, pp. 439–445, 1995.
- [117] A. Kamal, M. V Rao, N. Laxman, G. Ramesh, and G. S. K. Reddy, “Recent developments in the design, synthesis and structure-activity relationship studies of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines as DNA-interactive antitumour antibiotics.,” *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, vol. 2, no. 2, pp. 215–254, 2002.
- [118] R. Kumar and J. W. Lown, “Recent developments in novel pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine conjugates: synthesis and biological evaluation.,” *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 3, no. 4, pp. 323–339, 2003.
- [119] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and J. W. Dubendorff, “Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes,” *Methods in Enzymology*, vol. 185, pp. 60–89, 1990.
- [120] D. J. MacNeil, K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons, and T. MacNeil, “Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector,” *Gene*, vol. 111, pp. 61–68, 1992.
- [121] H. Wang, X. Bian, L. Xia, X. Ding, R. Müller, Y. Zhang, J. Fu, and a F. Stewart, “Improved seamless mutagenesis by recombineering using *ccdB* for

- counterselection.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 5, p. e37, Mar. 2014.
- [122] K. F. Chater and L. C. Wilde, "Streptomyces albus G mutants defective in the SalGI restriction-modification system.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 116, pp. 323–334, 1980.
- [123] D. A. Hopwood, T. Kieser, H. M. Wright, and M. J. Bibb, "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 129, pp. 2257–2269, 1983.
- [124] L. Betancor, M.-J. Fernández, K. J. Weissman, and P. F. Leadlay, "Improved catalytic activity of a purified multienzyme from a modular polyketide synthase after coexpression with *Streptomyces* chaperonins in *Escherichia coli*." *ChemBiochem*, vol. 9, pp. 2962–2966, 2008.
- [125] N. Gaitatzis, A. Hans, R. Müller, and S. Beyer, "The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases.," *J. Biochem.*, vol. 129, no. 1, pp. 119–124, 2001.
- [126] W. J. Dower, J. F. Miller, and C. W. Ragsdale, "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 13, pp. 6127–6145, 1988.
- [127] N. M. Calvin and P. C. Hanawalt, "High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation," *J. Bacteriol.*, vol. 170, no. 6, pp. 2796–2801, 1988.
- [128] H. C. Birnboim and J. Doly, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 1513–1523, 1979.
- [129] T. Vilaivan, "A rate enhancement of tert-butoxycarbonylation of aromatic amines with Boc<sub>2</sub>O in alcoholic solvents," *Tetrahedron Lett.*, vol. 47, pp. 6739–6742, 2006.
- [130] L. H. Hurley, "Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics: comparative aspects of anthramycin, tomaymycin, and sibiromycin.," *J Antibiot*, vol. 30, no. 5, pp. 349–370, 1977.
- [131] S. D. Bentley, K. F. Chater, A.-M. Cerdeño-Tárraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser,

- A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabbinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood, "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).," *Nature*, vol. 417, no. 6885, pp. 141–147, 2002.
- [132] F. Wright and M. J. Bibb, "Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome," *Gene*, vol. 113, no. 1, pp. 55–65, 1992.
- [133] W. Li, S. Chou, A. Khullar, and B. Gerratana, "Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for tomaymycin, an SJG-136 monomeric analog.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 9, pp. 2958–63, May 2009.
- [134] J. G. Marblestone, S. C. Edavettal, Y. Lim, P. Lim, X. Zuo, and T. R. Butt, "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO.," *Protein Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 182–189, 2006.
- [135] J. C. Carrington and W. G. Dougherty, "A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 10, pp. 3391–3395, 1988.
- [136] M. P. Malakhov, M. R. Mattern, O. A. Malakhova, M. Drinker, S. D. Weeks, and T. R. Butt, "SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins," *J. Struct. Funct. Genomics*, vol. 5, no. 1–2, pp. 75–86, 2004.
- [137] T. R. Butt, S. C. Edavettal, J. P. Hall, and M. R. Mattern, "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins," *Protein Expression and Purification*, vol. 43, no. 1, pp. 1–9, 2005.
- [138] K. Nishihara, M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura, "Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 3, pp. 884–889, 2000.
- [139] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, and T. Yura, "Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 1694–1699, 1998.

- [140] J. G. Thomas, A. Ayling, and F. Baneyx, "Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold.," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 66, no. 3, pp. 197–238, 1997.
- [141] W. Li, A. Khullar, S. Chou, A. Sacramo, and B. Gerratana, "Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, pp. 2869–2878, 2009.
- [142] P. Kaiser, F. Flett, and J. Cullum, "Stabilization of *Streptomyces lividans* by homologous recombinational insertion.," *Biotechnology. (N. Y.)*, vol. 10, no. 5, pp. 570–573, 1992.
- [143] S. J. Gregson, P. W. Howard, J. A. Hartley, N. A. Brooks, L. J. Adams, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, and D. E. Thurston, "Design, synthesis, and evaluation of a novel pyrrolbenzodiazepine DNA-interactive agent with highly efficient cross-linking ability and potent cytotoxicity," *J. Med. Chem.*, vol. 44, pp. 737–748, 2001.
- [144] Y. Xiang, B. He, X. Lia, and Q. Zhu, "The design and synthesis of novel 'turn-on' fluorescent probes to visualize monoamine oxidase-B in living cells," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 15, pp. 4876–4879, 2013.
- [145] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599, 2002.
- [146] D. Hochhauser, T. Meyer, V. J. Spanswick, J. Wu, P. H. Clingen, P. Loadman, M. Cobb, L. Gumbrell, R. H. Begent, J. A. Hartley, and D. Jodrell, "Phase I study of sequence-selective minor groove DNA binding agent SJG-136 in patients with advanced solid tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, pp. 2140–2147, 2009.
- [147] Y. Y. Janjigian, W. Lee, M. G. Kris, V. A. Miller, L. M. Krug, C. G. Azzoli, E. Senturk, M. Wade Calcutt, and N. A. Rizvi, "A phase I trial of SJG-136 (NSC#694501) in advanced solid tumors," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 65, pp. 833–838, 2010.
- [148] I. Puzanov, W. Lee, A. Chen, W. M. Calcutt, D. L. Hachey, W. Vermeulen, V. J. Spanswick, C.-Y. Liao, J. A. Hartley, J. D. Berlin, and M. L. Rothenberg, "Phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SJG-136, a novel DNA sequence selective minor groove cross-linking agent, in advanced solid tumors.," *Clin. Cancer Res.*, 2011.

- [149] D. E. Cane, "A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis.," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 7, pp. 2463–2706, 1997.
- [150] A. S. Eustáquio, B. Gust, S. M. Li, S. Pelzer, W. Wohlleben, K. F. Chater, and L. Heide, "Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered *Streptomyces coelicolor* strains," *Chem. Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1561–1572, 2004.
- [151] A. S. Eustáquio, B. Gust, U. Galm, S. M. Li, K. F. Chater, and L. Heide, "Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 5, pp. 2452–2459, 2005.
- [152] N. Zaburanyi, M. Rabyk, B. Ostash, V. Fedorenko, and A. Luzhetskyy, "Insights into naturally minimised *Streptomyces albus* J1074 genome.," *BMC Genomics*, vol. 15, p. 97, 2014.
- [153] M. J. Virolle, C. M. Long, S. Chang, and M. J. Bibb, "Cloning, characterisation and regulation of an alpha-amylase gene from *Streptomyces venezuelae*," *Gene*, vol. 74, no. 2, pp. 321–334, 1988.
- [154] C. Lattemann, M. Broenstrup, S. Werner, R. Müller, and K. Harmrolfs, "Method for Producing Recombinant 11-De-O-Methyltomaymycin," 2012.
- [155] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products*. 2002.
- [156] a Pospiech, J. Bietenhader, and T. Schupp, "Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*," *Microbiology*, vol. 142 ( Pt 4, no. 1 996, pp. 741–6, 1996.
- [157] F. Kopp, C. Mahlert, J. Grünewald, and M. a. Marahiel, "Peptide macrocyclization: The reductase of the nostocyclopeptide synthetase triggers the self-assembly of a macrocyclic imine," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 51, pp. 16478–16479, 2006.
- [158] A. Schneider and M. a. Marahiel, "Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*," *Arch. Microbiol.*, vol. 169, no. 5, pp. 404–410, 1998.
- [159] M. Kotowska and K. Pawlik, "Roles of type II thioesterases and their application for secondary metabolite yield improvement," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 7735–7746, 2014.

- [160] D. Schwarzer, H. D. Mootz, U. Linne, and M. a. Marahiel, "Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 22, pp. 14083–14088, 2002.
- [161] E. Yeh, R. M. Kohli, S. D. Bruner, and C. T. Walsh, "Type II Thioesterase Restores Activity of a NRPS Module Stalled with an Aminoacyl-S-enzyme that Cannot Be Elongated," *Chembiochem*, vol. 5, no. 9, pp. 1290–1293, 2004.
- [162] P. J. M. Jackson, C. H. James, T. C. Jenkins, K. M. Rahman, and D. E. Thurston, "Computational Studies Support the Role of the C7-Sibirosamine Sugar of the Pyrrolobenzodiazepine (PBD) Sibiromycin in Transcription Factor Inhibition," *ACS Chem. Biol.*, vol. 9, no. 10, pp. 2432–2440, 2014.
- [163] A. Mesentsev, V. Kuljaeva, and L. Rubasheva, "Structure of sibiromycin.," *J Antibiot*, vol. 27, no. 11, pp. 866–73, 1974.
- [164] S. Kunimoto, T. Masuda, N. Kanbayashi, M. Hamada, H. Naganawa, M. Miyamoto, T. Takeuchi, and H. Umezawa, "Mazethramycin, a new member of anthramycin group antibiotics.," *J Antibiot*, vol. 33, no. 6, pp. 665–7, 1980.
- [165] L. Ducry and B. Stump, "Antibody-drug conjugates: Linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 21, pp. 5–13, 2010.
- [166] C. Widakowich, G. de Castro, E. de Azambuja, P. Dinh, and A. Awada, "Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers.," *Oncologist*, vol. 12, no. 12, pp. 1443–1455, 2007.
- [167] C. Hess, D. Venetz, and D. Neri, "Emerging classes of armed antibody therapeutics against cancer," *Medchemcomm*, vol. 5, no. 4, p. 408, 2014.
- [168] D. Schrama, R. A. Reisfeld, and J. C. Becker, "Antibody targeted drugs as cancer therapeutics.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 2, pp. 147–159, 2006.
- [169] C. F. McDonagh, E. Turcott, L. Westendorf, J. B. Webster, S. C. Alley, K. Kim, J. Andreyka, I. Stone, K. J. Hamblett, J. A. Francisco, and P. Carter, "Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 19, no. 7, pp. 299–307, 2006.
- [170] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. C. Sun, J. Lenox, C. G. Cerveny, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, and J. A. Francisco, "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 20, pp.

- 7063–7070, 2004.
- [171] G. M. Dubowchik and R. A. Firestone, "Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 8, no. 23, pp. 3341–3346, 1998.
- [172] R. H. Shoemaker, "The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 813–823, 2006.
- [173] D. E. Thurston, D. S. Bose, X. P. W. Howard, T. C. Jenkins, A. Leoni, P. G. Baraldi, A. Guiotto, B. Cacciari, L. R. Kelland, and M. Foloppe, "Effect of A-Ring Modifications on the DNA-Binding Behavior and Cytotoxicity," vol. 120, pp. 1951–1964, 1999.
- [174] D. S. Bose, A. S. Thompson, J. Ching, J. A. Hartley, M. D. Berardini, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, and D. E. Thurston, "Rational design of a highly efficient irreversible DNA interstrand cross-linking agent based on the pyrrolobenzodiazepine ring system," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 12, pp. 4939–4941, 1992.
- [175] S. J. Gregson, P. W. Howard, K. E. Corcoran, S. Barcella, M. M. Yasin, A. A. Hurst, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, and D. E. Thurston, "Effect of C2-exo unsaturation on the cytotoxicity and DNA-binding reactivity of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 16, pp. 1845–1847, 2000.
- [176] S. J. Gregson, P. W. Howard, D. R. Gullick, A. Hamaguchi, K. E. Corcoran, N. A. Brooks, J. A. Hartley, T. C. Jenkins, S. Patel, M. J. Guille, and D. E. Thurston, "Linker Length Modulates DNA Cross-Linking Reactivity and Cytotoxic Potency of C8/C8' Ether-Linked C2-exo-Unsaturated Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) Dimers," *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 5, pp. 1161–1174, 2004.
- [177] A. Commercon and L. Gauzy-Lazo, "Conjugates of pyrrolo[1,4]benzodiazepine dimers as anticancer agents." Google Patents, 2013.
- [178] P. Ghosh and J. Aubé, "Resolution of carboxylic acids using copper(I)-promoted removal of propargylic esters under neutral conditions," *J. Org. Chem.*, vol. 76, no. 10, pp. 4168–4172, 2011.
- [179] Y. Imada, M. Yuasa, I. Nakamura, and S.-I. Murahashi, "Copper(I)-Catalyzed Amination of Propargyl Esters. Selective Synthesis of Propargylamines, 1-Alken-3-ylamines, and (Z)-Allylamines," *J. Org. Chem.*, vol. 59, no. 9, pp. 2282–2284, 1994.

- [180] I. Puzanov, W. Lee, A. P. Chen, M. W. Calcutt, D. L. Hachey, W. L. Vermeulen, V. J. Spanswick, C.-Y. Liao, J. A. Hartley, J. D. Berlin, and M. L. Rothenberg, "Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SJG-136, a novel DNA sequence selective minor groove cross-linking agent, in advanced solid tumors.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 17, pp. 3794–3802, 2011.
- [181] P. W. Howard, S. J. Gregson, P. W. Taylor, D. E. Thurston, and T. S. Hadjivassileva, "Pyrrolobenzodiazepines." Google Patents, 2005.
- [182] H. Bouchard, R. V. J. Chari, A. Commercon, and Y. Deng, "Cytotoxic agents comprising new tomaymycin derivatives and their therapeutic use." Google Patents, 2009.
- [183] S. Fotso, T. M. Zabriskie, P. J. Proteau, P. M. Flatt, D. A. Santosa, and T. Mahmud, "Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine Antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp.," *J. Nat. Prod.*, vol. 72, no. 4, pp. 690–5, Apr. 2009.

# Lebenslauf

## **Stefan Dausend-Werner**

(geb. Werner)

Diplom-Biologe

seit 05/2014

Senior Developer und technischer Projektmanager bei Haus & Gross communications GmbH

09/2012 - 04/2014

Web Developer bei Haus & Gross communications GmbH

seit 08/2008

Promotionsstudium zum Thema

*Vorläuferdirigierte Biosynthese und Mutasyntese in Actinomyceten zur gezielten Darstellung von modifizierten Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepinen*

03/2008 - 07/2012

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Abteilung Mikrobielle Naturstoffe, Professor Dr. Rolf Müller

01/2007 - 02/2008

Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften des olfaktorischen Epithels der Maus, physiologisches Institut, Universitätsklinikum des Saarlandes, Professor Dr. Frank Zufall

10/2006 - 12/2006

Praktikum, Untersuchung der Calcium-Signalgebung in Erythrozyten, Institut für Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Professor Dr. Peter Lipp

10/2005 - 10/2006

Diplomarbeit zum Thema „Entwicklung eines prokaryotischen Expressionssystems für CD81LEL“, Arbeitsgruppe für Strukturbiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Professor Dr. Axel Scheidig

05/2006 - 07/2006

DFG GK 1326: *International Training Course Graduate Research Program Calcium Signalling and Cellular Nanodomains*, Universitätsklinikum des Saarlandes

05/2003 - 04/2005

Studentische Hilfskraft am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes

10/2000 - 10/2006

Studiengang Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie, Diplom mit Abschlussnote sehr gut (1,2)

# Danksagung

Meinem Doktorvater Professor Dr. Rolf Müller danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit meine Ideen frei umsetzen zu können, sowie seinen aufmunternden Zuspruch als die Gerratana-Gruppe zweimal schneller war als wir.

Professor Dr. Manfred Schmitt danke ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Professor Dr. Mark Brönstrup und Dr. Joachim Wink von der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (inzwischen Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung zahlreicher Anthranilsäure- und Prolinderivate sowie den Stamm *Streptosporangium sibiricum*.

Professor Dr. Shwan Rachid danke ich besonders für die intensive Hilfe beim Erstellen der Cosmid-Library.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Kirsten Harmrolfs für die Übernahme der NMR-Analysen, ihre Unterstützung bei den chemischen Synthesen, das Gegenlesen dieser Arbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Silke Wenzel danke ich für die Betreuung in der Anfangszeit meiner Promotion und die Unterstützung bei der Genom-Sequenzierung.

Dr. Thomas Hoffmann und Dr. Daniel Krug danke ich für die geduldigen Erläuterungen zur HPLC-MS.

Dr. Matthias Altmeyer und Dr. Jennifer Hermann danke ich für die MALDI-TOF-TOF-Analysen.

Dr. Angelika Ullrich vom Institut für Organische Chemie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Planung der chemischen Synthesen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Mikrobielle Naturstoffe danke ich für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit.

Corina, Jenni und Stefan danke ich für die schöne Zeit im Labor und die Experimente aus dem gemeinsamen Cocktail-Korb.

Dem Informatikerduo Benjafan möchte ich für die langjährige Freundschaft und für den Anstoß und die Hilfe zum Einstieg in die Softwareentwicklung danken.

Ein ganz besonderer herzlicher Dank für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung geht an meine Eltern. Meine ganze Familie hat mich während der Labor- und Schreibzeit durch ihr Interesse am Fortschritt der Arbeit sowie Trost und Aufmunterung, wenn es mal nicht gut voran ging, stets unterstützt und damit einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Frau Julia, die mich von der ersten Vorlesung an durch Studium und Dissertation begleitet hat, danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung. Ohne ihre Geduld, Liebe und Motivation wäre diese Arbeit nicht entstanden.