

# **Untersuchung der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
**Doktorin der Naturwissenschaften**  
**(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

**Franziska Hemmerling, M. Sc.**  
geboren am 09.04.1988 in Hannover

**2017**

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Frank Hahn

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 21.07.2017

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2013 bis Juni 2017 am Institut für Organische Chemie und am Biomolekularen Wirkstoffzentrum der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Hahn angefertigt.

*Meinen Eltern in Dankbarkeit*

## Kurzfassung

M. Sc. Franziska Hemmerling

### Untersuchung der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments

Schlagwörter: Ambruticin, Polyketid-Biosynthese, ANL-Enzym

Die Ambruticine sind reduzierte Polyketide mit einer Divinylcyclopropyl(DVC)-Einheit im Mittelfragment. Im entsprechenden Biosynthese-Abschnitt finden sich viele Ungewöhnlichkeiten, wie das AT-freie PKS-Modul AmbF sowie Enzyme (AmbG und AmbI) und Domänen (KS, H und Px) kryptischer Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments durchgeführt. Dafür wurde eine Hypothese formuliert, welche eine FAVORS-KII-ähnliche Umlagerung, begleitet von einer Pyridoxaminphosphat-initiierten Polymerverschiebung zur DVC-Bildung sowie die Aktivierung als quervernetztes Succinoyl-dithioat für eine oxidative Decarboxylierung beinhaltet.

Die vermeintlich an der Biosynthese beteiligten Enzyme, Domänen und das Modul AmbF wurden heterolog in *E. coli* produziert. Es wurden *in silico*- und *in vitro*-Studien durchgeführt. Für die ANL-ACP-Didomäne AmbG wurde mithilfe quantitativer  $PP_i$ -Nachweise gezeigt, dass gesättigte Fettsäuren mit Kettenlängen von C6–C18, verzweigte kurzkettige, ungesättigte und funktionalisierte Carbonsäuren sowie aromatische Säuren zu den entsprechenden Acyl-Adenylaten umgesetzt werden. Dies übersteigt nach dem aktuellen Literaturstand das bekannte Substratspektrum für ANL-Subfamilien und wurde in einer bioinformatischen Analyse wiedergespiegelt. Weiterhin wurde mittels Protein-HPLC-MS gezeigt, dass anschließend aktivierte Fettsäuren und einige Derivate von C10 bis C18 auf die ACP-Domäne übertragen werden. Kompetitionsstudien deuteten hierbei indirekt eine Präferenz für  $\pi$ -Systeme im Substrat an. Darüber hinaus wurde Ambruticin VS3 im Kulturüberstand des myxobakteriellen Produktionsstamms So ce10 nachgewiesen und Vorarbeiten für die *in vivo*-Untersuchung von Biosyntheseintermediaten mithilfe der Abspaltung von der PKS durch nicht-hydrolysierbare Malonyl CoA-Analoga geleistet.

## Abstract

M. Sc. Franziska Hemmerling

### Studies on the biosynthesis of the ambruticin middle fragment

Key words: ambruticin, polyketide-biosynthesis, ANL-enzyme

Ambruticins are reduced polyketides with a divinylcyclopropyl(DVC)-moiety in their middle fragment. The corresponding biosynthetic machinery displays plenty of abnormalities, such as the AT-less PKS module AmbF, cryptic enzymes (AmbG and AmbI) and domains (KS, H and Px). In the course of this thesis, first studies on the biosynthesis of the ambruticin middle fragment were performed. Therefore, a hypothesis was proposed, that includes a FAVORSKII-like rearrangement, accompanied by a pyridoxamine phosphate-induced electron shift towards DVC-formation. This is followed by oxidative decarboxylation, which is facilitated in a crosslinked succinoyl-dithioate.

After *in silico*-studies, putatively involved enzymes, domains and the PKS module were heterologously expressed in *E. coli* and included in *in vitro* reactions. Quantitative PP<sub>i</sub>-detection assays with the ANL-ACP didomain AmbG showed a broad substrate specificity for acyl adenylation, including fatty acids with chain lengths from C6–C18, branched short chain and functionalised carboxylic acids as well as aromatic acids. This exceeds the spectrum of known ANL-subfamilies and mirrors in AmbG's unambiguous bioinformatic profiling. Moreover, protein-HPLC-MS revealed that fatty acids and derivatives thereof from C10 to C18 are transacylated onto AmbG's ACP-domain. Competition experiments hinted towards a preference for substrates incorporating  $\pi$ -systems.

In addition, first steps were completed towards *in vivo*-studies of biosynthetic intermediates from the ambruticin-producing myxobacterium *So ce10* via PKS-offloading with non-hydrolysable malonyl CoA-analogues. Therefore, ambruticin VS3-production was confirmed by HPLC-MS in the culture broth of *So ce10*.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Polyketidsynthasen . . . . .	4
1.2	Das Myxobakterium <i>S. cellulosum</i> als Naturstoffproduzent . . . . .	10
1.3	ANL-Enzyme . . . . .	15
1.4	PLP-abhängige Enzyme . . . . .	21
1.5	Die Ambruticine . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>33</b>
3.1	Arbeitshypothese für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments	33
3.2	Studien zum PKS-Modul AmbF . . . . .	40
3.2.1	Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung . . . . .	40
3.3	Studien zu AmbF-Domänen . . . . .	61
3.3.1	Synthetische Arbeiten . . . . .	61
3.3.2	Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung . . . . .	63
3.3.3	Erste Studien zur Funktionalität der Px-Domäne . . . . .	75
3.4	Untersuchung der <i>Tailoring</i> -Enzyme AmbG und AmbI . . . . .	78
3.4.1	Bioinformatische Studien zur Didomäne AmbG . . . . .	78
3.4.2	Synthetische Arbeiten . . . . .	89
3.4.3	Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung . . . . .	91
3.4.4	Enzymaktivitätstests mit der Didomäne AmbG . . . . .	105

3.5	<i>In vivo</i> -Studien zu So ce 10 . . . . .	123
3.5.1	Synthese nicht-hydrolysierbarer Malonyl-CoA-Analoga . . .	126
3.5.2	Nachweis der Ambruticinproduktion von So ce10 . . . . .	127
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>130</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>134</b>
5.1	Biologische Arbeiten – Material . . . . .	134
5.1.1	Allgemeines . . . . .	134
5.1.2	Organismen . . . . .	134
5.1.3	Synthetische Gene, Plasmide und Oligonukleotide . . . . .	135
5.1.4	Größenstandards und Antikörper . . . . .	141
5.1.5	Kulturmedien und Nährböden . . . . .	142
5.1.6	Puffer und Lösungen . . . . .	146
5.1.7	Geräte . . . . .	152
5.2	Biologische Arbeiten – Methoden . . . . .	154
5.2.1	Kultivierung von Mikroorganismen . . . . .	154
5.2.2	Gentechnische Methoden . . . . .	156
5.2.3	Biochemische Methoden . . . . .	173
5.2.4	Enzymaktivitätstests . . . . .	176
5.3	Chemische Arbeiten . . . . .	181
5.3.1	Allgemeines . . . . .	181
5.3.2	Darstellung von Substraten für die Studien mit AmbG . . .	183
5.3.3	Synthese nicht-hydrolysierbarer Malonyl-CoA Analoga . . .	191
5.3.4	Synthese für Untersuchungen zu AmbF-Domänen . . . . .	194
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>198</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>213</b>
6.0.5	Sequenzen der synthetischen Gene . . . . .	213
6.0.6	Bioinformatik . . . . .	227

6.0.7	Standardreihe für den Pyrophosphat-Nachweis . . . . .	238
6.0.8	LCMS-Analyse . . . . .	239
6.0.9	NMR-Spektren . . . . .	292

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
6-MSA	6-Methylsalicylsäure
AAE	<i>adenylate activating enzyme</i>
ACP	<i>acyl carrier protein</i> , auch PKS_PP
AFD	<i>adenylate forming domain</i>
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANL	Acyl-CoA Synthetasen, A_NRPS, Luciferasen
A_NRPS	Adenylierungs-Domäne aus NRPS
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent
AS	Aminosäure
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Carb	Carbenicillin
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
CPEC	<i>circular polymerase extension cloning</i> Zirkuläre Polymerisations-Klonierung
d	Dublett
$\delta$	chemische Verschiebung

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
D	Säulendurchfluss
Da	Dalton
dd	Dublett von Dubletts
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEBS	6-Deoxyerythronolid B Synthase
DH	Dehydratase
DiBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSBR	<i>double-strand break repair</i> Doppelstrang-Reparatur
dt	Dublett von Triplets
DTT	Dithiothreitol
DVC	Divinylcyclopropan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenstoß-Ionisierung
ER	Enoylreduktase
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae/alia</i> und andere
EtOAc	Ethylacetat
FAAL	<i>fatty acyl:adenylate ligase</i> , Fettsäure:AMP-Ligase
FACL	<i>fatty acyl:CoA ligase</i> , Fettsäure:CoA-Ligase
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> , schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie
<i>fw</i>	<i>forward</i> , vorwärts
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
h	<i>hour</i> , Stunde(n)
H	Hydrolase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> Hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSNAc	<i>N</i> -Acetylcysteamin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
J	Joule
Kan	Kanamycin
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
PKS	Polyketidsynthase
<i>lac</i>	Lactose
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LCR	<i>ligase chain reaction</i> Ligase-Kettenreaktion

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
m	Multiplett
M	molare Masse oder Marker
MBP	<i>maltose binding protein</i>
<i>M. capricolum</i>	<i>Mycoplasma capriolum</i>
Me	Methyl
MESG	7-Methyl-6-thioguanosine
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MSA	Multiples Sequenzalignment
MT	Methyltransferase
m/z	Masse/Ladung
ncbi	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHA	Nicht-hydrolysierbare Analoga
Ni-AC	Nickel-Affinitätschromatographie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> Kernspinresonanzspektroskopie
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
NTA	<i>nitriloacetic acid</i> , Nitrilotriessigsäure
NusA	<i>N-utilization substance protein A</i>
oct	Oktett
OD	Optische Dichte
OE-PCR	<i>overlap-extension-PCR</i>
OGAB	<i>ordered gene assembly in B. subtilis</i> Genassemblierung in <i>B. subtilis</i>
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
<i>p</i>	para
P	Pellet, Sediment nach Zellyse

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PAP	Pyridoxaminphosphat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Petrolether
pI	isoelektrischer Punkt
PLP	Pyridoxalphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ppant	Phosphopantethein
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
ppm	<i>parts per million</i>
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
PSSM	<i>position-specific scoring matrix</i>
Px	Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym
q	Quartett
quin	Quintett
Q-TOF	<i>Quadrupol-time of flight mass spectrometer</i> Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
rSAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i> Synthese-abhängige Strang-Hybridisierung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
SLIC	<i>sequence and ligase independent cloning</i> Sequenz- und Ligase-unabhängige Klonierung
SLiCE	<i>seamless ligation cloning extract</i> Klonierung mittels nahtloser Ligation
<i>So ce10</i>	<i>Sorangium cellulosum</i> 10
SPS	<i>solvent purification systems</i> Lösungsmittel-Aufbereitungssystem
SNAc-Ester	<i>N</i> -Acetyl-Cysteamin-Thioester
t	Triplett
tt	Triplett von Triplett
TB	<i>terrific broth</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TEE	<i>translation-enhancing element</i> Translations-verstärkendes Element
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
T <sub>H</sub>	Hybridisierungs-Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> , Transfer-Ribonukleinsäure
Trx	Thioredoxin
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

---

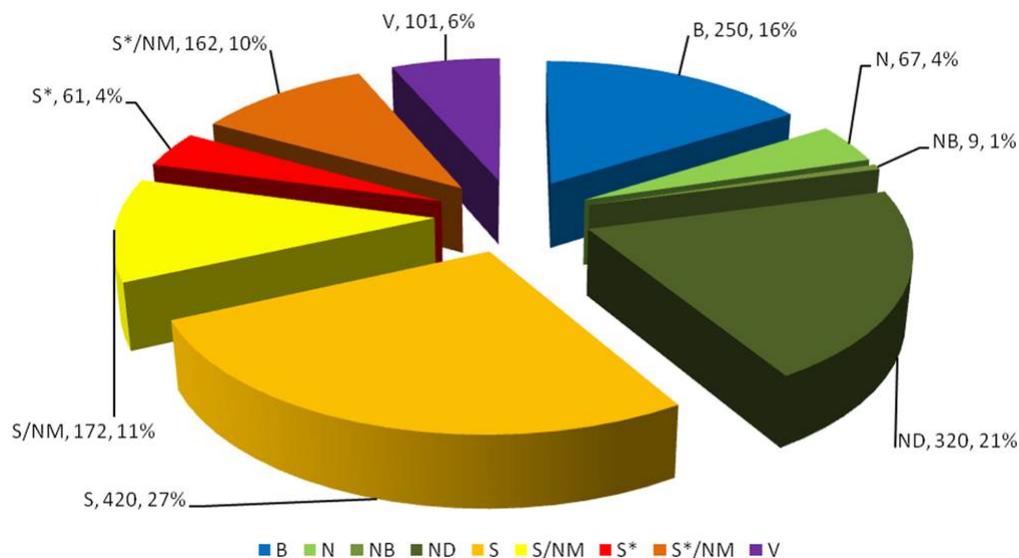
<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
UV	Ultraviolett
Ü	Überstand nach Zellyse
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

---

# 1 Einleitung

In der Natur spielt die Interaktion von Spezies eine große Rolle. So ist es für Organismen entscheidend, zwischen artfremd und eigen zu unterscheiden und einen Nahrungsstandort gegen Fressfeinde zu behaupten. Das Kommunikationsmittel auf molekularer Ebene stellen die Naturstoffe dar. Diese werden als Sekundärmetabolite fakultativ produziert. Das bedeutet, dass sie nicht existentiell notwendig für Wachstums-, Entwicklungs- oder Reproduktionsprozesse sind. Allerdings können sie in bestimmten Situationen den entscheidenden Überlebensvorteil für einen Organismus darstellen, z.B. durch die Verteidigung gegen bakterielle Fressfeinde anhand der Produktion eines Antibiotikums.<sup>[1-3]</sup>

Die „Bauanleitungen“ für Naturstoffe stellen die in Organismengenomen codierten Biosynthesegene dar. Diese geben vor, wie durch das enzymkatalysierte Zusammenfügen kleiner Bausteine schrittweise ein Grundgerüst aufgebaut wird, welches anschließend individuell modifiziert wird.<sup>[3]</sup> Dies resultiert in einer großen Vielfalt an Strukturen, welche eine reichhaltige Quelle für biologische Aktivitäten bieten. Sowohl Strukturen als auch deren Wirksamkeit wurden im Laufe der Evolution auf die im natürlichen Kontext vorherrschenden Bedingungen optimiert.



**Abbildung 1:** Zusammensetzung aller neu eingeführten Medikamente von 1981–2014, übernommen von NEWMAN *et al.*<sup>[4]</sup> B = Biologisches Makromolekül, N = unveränderter Naturstoff, NB = botanisches Medikament (definierte Mischung), ND = Naturstoffderivat, S = synthetisches Medikament, S\* = synthetisches Medikament (Naturstoff-Pharmacophor), V = Impfstoff, /NM = Naturstoffmimetikum.

Deshalb spielen Naturstoffe traditionell eine große Rolle für die medizinische Chemie. Von allen Medikamenten, welche von 1981–2014 auf den Markt gekommen sind, stellen nur 33% keine Naturstoffe, -derivate oder von Naturstoffen inspirierte Moleküle dar (Abb. 1).<sup>[4]</sup> Als aktive Wirkstoffe oder Leitstrukturen haben Naturstoffe folglich eine hohe Relevanz.

Die naheliegende Quelle für Naturstoffe stellen Isolate aus natürlichen Quellen (vor allem Pilze oder Pflanzen) dar. Ein traditionelles Beispiel dafür ist die Isolation von Morphin aus Schlafmohn. Allerdings ist die Ausbeute aus solchen Isolaten meist gering, weil die Naturstoffe nur in niedrigen Konzentrationen produziert werden.<sup>[3]</sup> Auch die Totalsynthese bietet einen Zugang zu Naturstoffen. Das Problem der Totalsynthese von Naturstoffen ist jedoch, dass je komplexer diese sind und je mehr synthetische Operationen benötigt werden, die Ausbeute sinkt. Aus diesem Grund werden meist konvergente Syntheserouten mit einer minimalen Anzahl linearer Transformationen angestrebt.<sup>[1]</sup>

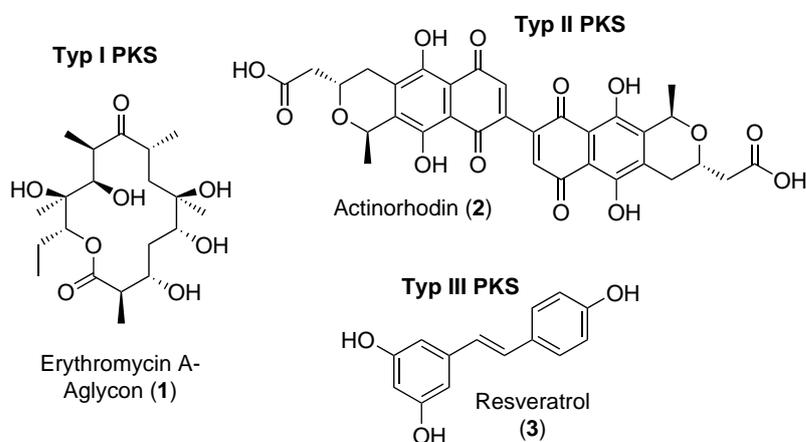
---

Es ist daher vorteilhaft, Naturstoffe durch die Fermentation der produzierenden Mikroorganismen zu erhalten. Allerdings ist nur ein Bruchteil aller Mikroorganismen kultivierbar und Produktionsbedingungen müssen im Labor zunächst aufwändig ermittelt werden. Durch geeignete Selektion und Mutation von Stämmen kann so eine Überproduktion von Naturstoffen erzielt werden.

Durch verbesserte DNA-Sequenzieretechniken ist es zudem möglich, die Biosynthesegene von Naturstoffen zu identifizieren. Mithilfe der heterologen Genexpression, z.B. im Modellorganismus *E. coli*, kann so zum Einen eine Produktion der gewünschten Naturstoffe erfolgen als auch Einsicht gewonnen werden in die Mechanismen der Biosynthese. Dies erlaubt im Idealfall die Nutzung der einzelnen Enzyme für chemische Transformationen im Sinne der Biokatalyse.<sup>[1,3]</sup>

## 1.1 Polyketidsynthesen

Polyketidsynthesen (PKS) katalysieren die Verknüpfung von kurzen Acyl-CoA-Thioestern mittels decarboxylierender CLAISEN-artiger Kondensationsreaktionen sowie die weitere Modifikation der erhaltenen (Poly)ketone.<sup>[5]</sup> Die Polyketide stellen eine wichtige Naturstoffklasse für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Sie weisen sehr diverse Strukturen und ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten auf als z.B. Antibiotika, Immunsuppressoren, Antiparasitica und Anti-Tumor-Wirkstoffe.<sup>[6]</sup>

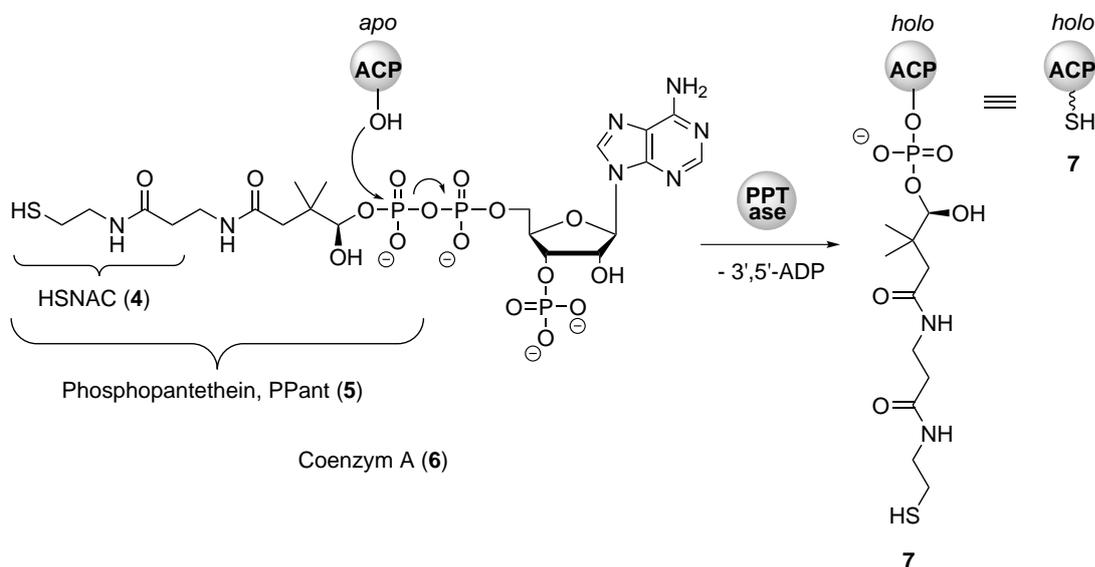


**Abbildung 2:** Typische Polyketide, die durch PKS Typ I, II und III aufgebaut werden.

Je nach Enzymologie wird in PKS Typ I, II oder III unterschieden (Abb. 2). Die PKS Typ III wurde zunächst ausschließlich in Pflanzen entdeckt (wo sie am häufigsten vorkommt), später jedoch auch in Bakterien und Pilzen. Bis heute wurden mindestens 15 Protein-Familien charakterisiert, die jeweils strukturell zu Typ I und Typ II PKS sehr unterschiedlich sind. Sie produzieren mono- und bilytische aromatische Polyketide wie zum Beispiel Resveratrol (3), das unter anderem in verschiedenen Beeren vorkommt. Die PKS Typ III liegen als Homodimere vor, die iterativ in einer einzigen Bindetasche Acyl-CoA-Thioester verknüpfen und zyklisieren - ohne die Beteiligung von ACP-Domänen.<sup>[7]</sup>

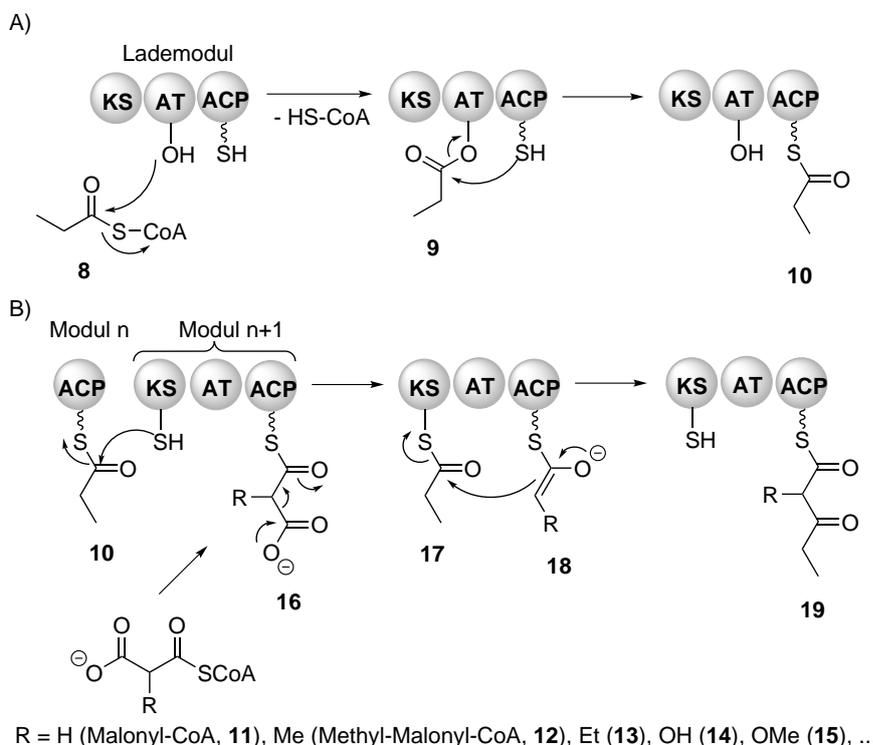
Die bakterielle PKS Typ II besteht aus einem Aggregat monofunktionaler diskreter Enzyme und katalysiert die Biosynthese von polyzyklischen, aromatischen Polyketiden wie zum Beispiel dem Antibiotikum Actinorhodin (**2**).<sup>[8,9]</sup>

Polyketide wie das Aglycon von Erythromycin A (**1**), die von PKS Typ I assembliert werden, weisen meist reduzierte Strukturen sowie einen charakteristischen 1,3-Funktionalitätenabstand auf.<sup>[10,11]</sup> Dieser kann durch weitere Modifikationen oder Umlagerungen jedoch maskiert sein. Bei bakteriellen, modularen, nicht-iterativen PKS Typ I handelt es sich um multimodulare Megaenzymkomplexe, bei denen die Enzymdomänen definierte Aufgaben bezüglich der Auswahl, Verknüpfung oder Prozessierung eines Bausteins übernehmen. Das zentrale Paradigma ist, dass jedes PKS-Modul jeweils genau einen Verlängerungsschritt um eine Ketid-Einheit katalysiert.<sup>[5]</sup> Während der Assemblierung und Modifizierung bleibt die wachsende Polyketidkette jeweils kovalent und doch transient an einer *Acyl-Carrier-Protein*(ACP)-Domäne verankert, welche zuvor durch die Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) posttranslational modifiziert werden müssen.



**Schema 1:** Phosphopantetheinylierung einer ACP-Domäne durch eine PPTase.<sup>[12]</sup> Enzymdomänen werden durch Sphären repräsentiert. Der PPant-Arm wird durch eine gewellte Bindung symbolisiert. 3',5'-ADP = 3',5'-Adenosindiphosphat

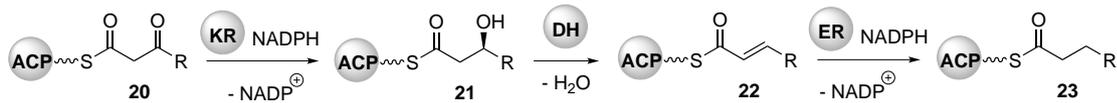
Die PPTasen bestehen aus drei Proteinfamilien. Sie katalysieren die für PKS I und II, NRPS und FAS essentielle posttranslationale Modifikation der *Carrier*-Domänen, indem ein Phosphopantethein(PPant)-Rest (**5**) aus Coenzym A (**6**) auf die Hydroxyfunktion eines konservierten Serins des *apo*-Proteins übertragen wird (Schema 1). Die resultierende Domäne wird als *holo*-Enzym **7** bezeichnet.<sup>[13]</sup> Mit Hilfe des ca. 20 Å langen PPant-Arm und vielen *Docking*-Stellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen, fungieren die ACP-Domänen als Vermittler zwischen den einzelnen Domänen des PKS-Megaenzymkomplexes.<sup>[5]</sup>



**Schema 2:** A) Die AT-Domäne des Lademoduls wählt Propionyl-CoA **8** als Startbaustein aus und katalysiert die Transacylierung auf die ACP-Domäne. B) Schematische Darstellung der Verlängerung des Polyketidrückgrads durch die KS-Domäne mittels decarboxylativer Kondensation in einer minimalen PKS, verändert nach FISCHBACH *et al.*<sup>[14]</sup>

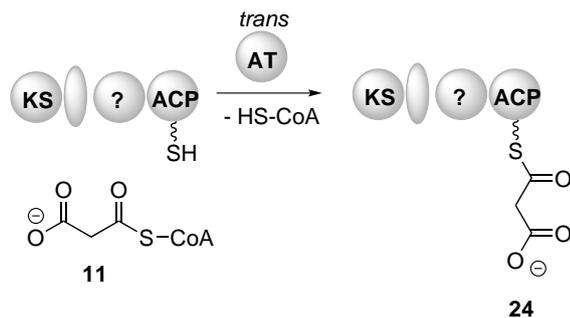
Die Acyltransferase(AT)-Domänen wählen sowohl Acyl-Startbausteine, wie zum Beispiel Propionyl-CoA (**8**) als auch Verlängerungsbausteine (z.B. Malonyl-CoA (**11**) oder 2-substituierte Malonyl-CoA-Derivate **12–15**) aus und übertragen diesen auf das Thiol des PPant-Arms einer benachbarten ACP-Domäne (Schema 2, A). Die Ketosynthase(KS)-Domäne katalysiert eine C-C-Bindungsknüpfung zwischen

dem  $\alpha$ -C-Atom des Verlängerungsbausteins **18** und der Thioester-Carbonylgruppe der ACP-gebundenen wachsenden Polyketidkette **17** in einer decarboxylierende Kondensationsreaktion. So wird ein ACP-gebundener  $\beta$ -Ketoester **19** generiert (Schema 2, B). Zusammen stellen AT-, ACP und KS eine minimale *cis*-AT-PKS dar.<sup>[14]</sup>



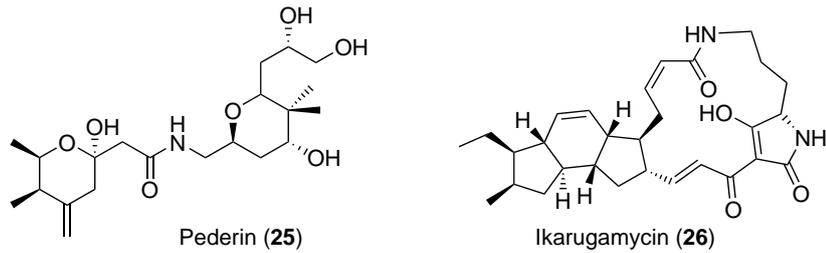
**Schema 3:** Reduktive Schleife.

Der  $\beta$ -Ketothioester **20** kann sequenziell durch die Enzyme der reduktiven Schleife reduziert werden: Eine Ketoreduktase(KR)-Domäne reduziert stereoselektiv zum Alkohol **21**, welcher wiederum durch eine Dehydratase(DH)-Domäne zum  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigten Thioester **22** und final von einer Enoylreduktase(ER)-Domäne zum gesättigten Thioester **23** umgewandelt wird (Schema 3).<sup>[14]</sup> PKS Typ I, die alle oben genannten Domänen enthalten sind strukturell und phylogenetisch nah mit den Fettsäuresynthetasen (FAS) verwandt.<sup>[5]</sup> Darüber hinaus gibt es optionale Enzyme und Domänen wie zum Beispiel Methyl- oder Aminotransferasen, Epimerasen und Oxidasen, die das Grundgerüst weiter modifizieren können. Diese sind entweder Teil des Multienzymkomplexes oder stellen diskrete Enzyme dar, sogenannte *Tailoring*-Enzyme. Weiterhin können sie während der Kettenverlängerung oder am freien Polyketid als *post*-PKS Enzyme agieren. Diese zeigen häufig eine größere Substratpromiskuität, wie zum Beispiel in der Arbeitsgruppe für die O-Methyltransferase JerF aus der Jerangolid-Biosynthese gezeigt werden konnte.<sup>[15]</sup> Die Architektur der Enzymdomänen im Multienzymkomplex spiegelt dabei häufig die Struktur des resultierenden Polyketids wider, was als Kolinearitätsregel bezeichnet wird.<sup>[5]</sup> Die oben beschriebenen Systeme heißen *cis*-AT PKS, weil die AT-Domäne Teil des Moduls ist.



**Schema 4:** Malonyl-CoA (**11**) wird von einer *trans*-AT-Domäne auf eine ACP-Domäne übertragen. Die ovale Domäne steht für einen ATd oder KS/AT-Adapter und das Fragezeichen repräsentiert eine beliebige Anzahl modifizierender Domänen; verändert nach LOHMANN *et al.*<sup>[16]</sup>

Bei *trans*-AT-Systemen wie zum Beispiel der PKS der Pederin(**25**)-Biosynthese fehlt die AT-Domäne im Modul und wird stattdessen als diskretes Enzym im biosynthetischen Gencluster codiert. Das bedeutet, dass sowohl die Kolinearitätsregel nicht gilt als auch das Konzept der minimalen PKS nicht anwendbar ist.<sup>[17]</sup> Phylogenetische Studien ergaben, dass ca. 38% aller modularen bakteriellen PKS *trans*-AT-Systeme sind.<sup>[18]</sup> Die *trans*-AT-PKS bilden eine eigene Klade bezüglich der *cis*-Systeme und zeigen sehr diverse Architekturen. Häufig enthalten diese Systeme Module mit ungewöhnlichen Reihenfolgen oder kryptischen Funktionen, nicht-verlängernde Domänen, Domänen, die über ihr inkorporiertes Modul hinaus aktiv sind oder die auf zwei Proteine aufgeteilt sind. Darüber hinaus werden häufig auch weitere Funktionen von Modulen *in trans* bereit gestellt.<sup>[19]</sup>



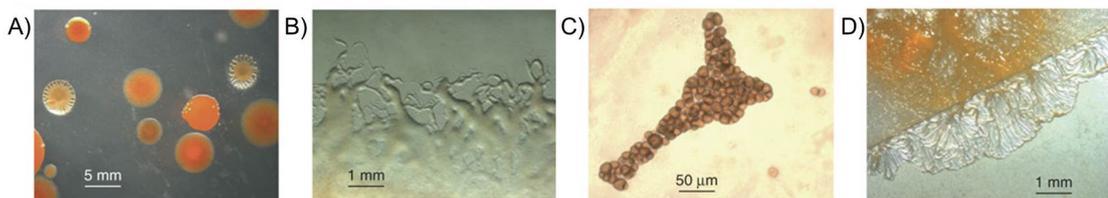
**Abbildung 3:** Strukturen der NRPS/PKS-Hybride Pederin (25) und Ikarugamycin (26).

In bakteriellen modularen iterativen Typ I PKS (*i*PKS) werden die Enzymdomänen eines Moduls mehrfach durchlaufen. Dabei wird in der Regel mit demselben Verlängerungsbaustein verknüpft und identisch modifiziert. Ein Beispiel stellt die PKS der *polycyclic tetramate macrolactams* (PTM) wie z.B. Ikarugamycin (26) dar.<sup>[20]</sup>

## 1.2 Das Myxobakterium *S. cellulosum* als Naturstoffproduzent

Die Myxobakterien (Myxococcales) gehören zu den GRAM-negativen  $\delta$ -Proteobakterien und wurden anhand phylogenetischer 16S RNA-Studien in drei Unterordnungen klassifiziert: *Cytobacterineae*, *Sorangiiineae* und *Nannocystineae*.<sup>[21]</sup> Bis auf *Anaeromyxobacter dehalogenans* sind sie aerobe Bakterien. Die erste Erwähnung von Myxobakterien als separates Taxon stammt aus dem Jahr 1892 von THAXTER, es brauchte jedoch mehrere Jahrzehnte, bis dessen Klassifizierung akzeptiert wurde.<sup>[22,23]</sup> Pionierarbeit zu Myxobakterien wurde unter anderem von REICHENBACH geleistet, dessen über Jahrzehnte erstellte Sammlung von Proben aus ganz Europa im Jahr 2006 über 6000 myxobakterielle Stämme umfasste.<sup>[23]</sup> Im *Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)* finden sich außerdem ca. 2500 myxobakterielle Stämme.

Myxobakterien kommen ubiquitär im Boden, in Dung, auf Baumrinde und rottendem Pflanzenmaterial vor, sodass in der Regel ein Teelöffel Erde für die Isolation von 4–5 Spezies ausreicht.<sup>[23]</sup> Darüber hinaus wurden Myxobakterien auch aus marinen Quellen sowie sehr verschiedenen Habitaten in Klimazonen vom tropischen Regenwald bis hin zur arktischen Tundra isoliert.<sup>[24]</sup>



**Abbildung 4:** Morphologie des myxobakteriellen Stamms So ce56. A) Einzelkolonien auf Festmedium; B) Schwarmbildung; C) Fruchtkörper; D) Wachstum auf Minimalmedium mit Cellulose (sterilem Filterpapier) als einziger Kohlenstoffquelle. Verändert nach SCHNEIKER *et al.*<sup>[25]</sup>

In ihrer vegetativen Form stellen Myxobakterien stäbchenförmige Einzeller von 50–500  $\mu\text{M}$  Durchmesser dar, die als Einzelkolonien wachsen können (Abb. 4, A).<sup>[23]</sup> Sie weisen einen komplexen Lebenszyklus auf, da die meisten Spezies unter

Nahrungsmangelbedingungen Fruchtkörper ausbilden (Abb. 4, C). In diesen werden Myxosporen als vor Austrocknung geschützte Überdauerungsform produziert. Myxobakterien können sich durch Chemotaxis als Schwarm organisieren und aktiv über Oberflächen gleiten (Abb. 4, B), was ihren wenig schmeichelhaften Namen (*lat. myxo* = Schleim) erklärt. Charakteristisch für Myxobakterien ist, dass sie unlösliche Makromoleküle (wie z.B. Lipide oder Peptidoglykane) degradieren sowie als räuberische Bakterien lebende Zellen (u.a. *E. coli*) lysieren und als Nährstoffquelle nutzen können. Daher werden sie auch als „Wolfsrudel“ bezeichnet.<sup>[26]</sup> Im Schwarm ist dabei die Konzentration an lytischen Stoffen auf einem Areal besonders hoch, sodass Nährstoffe effektiver abgebaut und aufgenommen werden. Die Mechanismen der dafür benötigten subzelluläre Kommunikation sowie ihr komplexes kooperatives Sozialverhalten stellen daher aktuelle Forschungsschwerpunkte dar.<sup>[23,26–28]</sup>

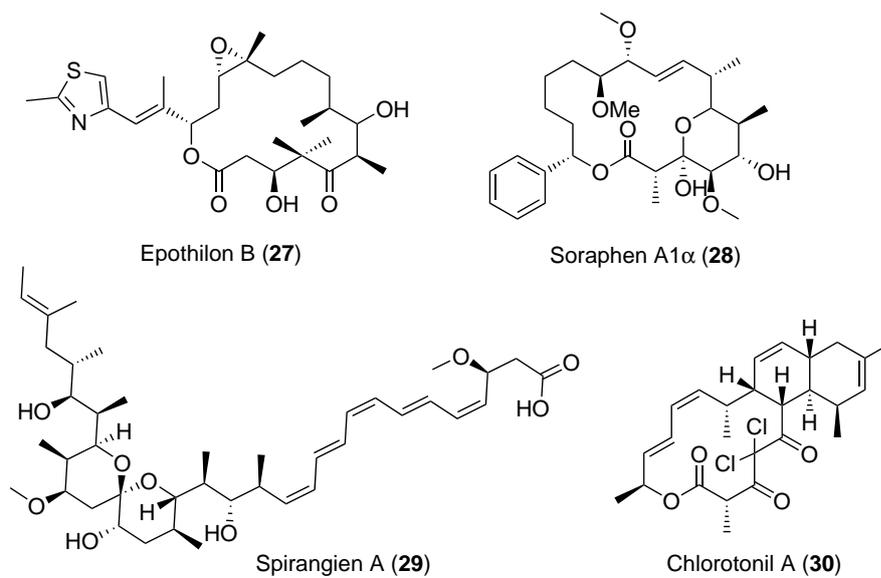
In dieser Arbeit wurde im Speziellen der myxobakterielle Stamm *S. cellulosum* verwendet, welcher nach seiner Fähigkeit, Cellulose als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen, benannt wurde (Abb. 4, D). Die natürlichen Isolationsquellen von *S. cellulosum* sind folglich vor allem Baumrinde und verrottendes Holz sowie der Boden. Im Labor wachsen sie meist unter neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen (pH = 6.5–8) bei Temperaturen zwischen 28–30 °C.<sup>1</sup>

Die meisten Myxobakterien produzieren eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten mit interessanten biologischen Eigenschaften und Strukturen. Darunter sind Substanzen mit antifungalen, antibakteriellen, cytotoxischen, antiviralen, immunsuppressiven, antiparasitären und antioxidativen Eigenschaften.<sup>[27,29–31]</sup> Allein in den letzten sechs Jahren wurden 42 neue Naturstoff-Grundgerüste entdeckt.<sup>[31]</sup> Dies zeigt die Relevanz der Myxobakterien als biologische Quelle für die Entwicklung neuer Leitstrukturen. Von den über 700 cellulolytischen Myxobakterien wie *S. cellulosum* ist von 95% die Produktion bioaktiver Substanzen bekannt. Die meisten Naturstoffe wurden bisher aus den Spezies *S. cellulosum*, *Myxococcus* und *Chondromyces*

---

<sup>1</sup>Persönliche Kommunikation mit Prof. WINK (*HZI Braunschweig*)

isoliert.<sup>[24,32]</sup> In der Regel produzieren *S. cellulorum*-Stämme dabei jeweils eine Familie nah verwandter Substanzklassen, wie z.B. der Stamm So ce90, der über 30 verschiedene Epothilone produziert.<sup>[32,33]</sup> Darüber hinaus gibt es Multiproduzenten, wie So ce1525, die Chivosazole, Disorazole, Sorangicin, Soraphene, Sulfangolide und Sorangiolide freisetzen.<sup>[32]</sup>



**Abbildung 5:** Beispiele für die strukturelle Diversität polyketidischer Wirkstoffe aus *S. cellulorum*

Das klassische Beispiel für einen Naturstoff aus *S. cellulorum*, der erfolgreich Einzug in die Medizin gehalten hat, ist das 16-gliedrige Macrolacton Epothilon B (27) aus u.a. So ce90.<sup>[33]</sup> Aufgrund seiner cytostatischen/antimitotischen Eigenschaften wurde sein semisynthetisches Analogon Ixabepilon unter dem Handelsnamen *Ixempra* im Jahr 2007 von der Firma *Bristol Myers-Squibb* als Brustkrebsmedikament auf den Markt gebracht.<sup>[34]</sup> Soraphen A1α (28) aus So ce26 wirkt gegen phytopathogene Pilze und wird daher als Pflanzenschutzmittel eingesetzt.<sup>[35]</sup> Das Wirkungsspektrum des Spiroketal Spirangien A (29) aus So ce90 umfasst unter anderem antifungale, cytotoxische und antivirale (gegen HIV) Aktivitäten und Chlorotonil A (30) aus So ce1525 mit einer *gem*-Dichlorogruppe wirkt gegen Malaria und verschiedene GRAM-positive Pathogene wie *S. aureus*.<sup>[31]</sup>

Die Fermentation von *S. cellulosum* für die Naturstoffextraktion wird durch deren sehr lange Verdopplungszeit von bis zu 15 h (im Vergleich zu ca. 20 min in *E. coli*) erschwert.<sup>[36]</sup> Diese kann unter anderem auf das sehr große Genom zurückgeführt werden. Bis 2007 stellte das Genom des Modellorganismus So ce56 mit 13.03 Mbp das größte vollständig sequenzierte bakterielle Genom dar.<sup>[25]</sup> Dabei wurde kaum Syntenie zum meist studierten Modellorganismus *Myxococcus xanthus* festgestellt. Im Jahr 2013 wurde dieser Rekord vom *S. cellulosum*-Stamm So0157-2 mit 14.78 Mbp überboten.<sup>[37]</sup>

Unter optimalen Bedingungen können für *S. cellulosum* hohe Zelldichten von bis zu  $10^{10}$ /ml erreicht werden.<sup>[23]</sup> Problematisch für die Kultivierung ist jedoch, dass durch den relativ hohen Anteil an Peptidlysaten im Medium (z.B. Pepton), auch eher viel Ammoniak produziert wird. Soll während der Produktion im industriellen Maßstab auf den Einsatz von Puffern aus Kostengründen verzichtet werden, kann der Ammoniak im *Bypass*-Verfahren extrahiert werden, um die Ausbeute zu verbessern.<sup>[32]</sup> Ein weitere Möglichkeit stellt die Immobilisierung von Zellen in Alginat-Kügelchen (1 mM Durchmesser) dar. Mithilfe dieses Verfahrens waren So ce12-Zellen bei regelmäßigem Wechsel des Kulturmediums über 75 Tage hinweg stabil und die Ausbeute für die Sorangicin-Produktion wurde im Vergleich zur *Batch*-Produktion bezüglich des Volumen/Zeit-Verhältnisses verfünffacht.<sup>[23]</sup> Darüber hinaus wurde die Produktion von Soraphen A1 $\alpha$  (**28**) durch den Zusatz eines XAD-Adsorberharzes zur Fermentation von So ce26 2.5-fach gesteigert, indem die *Feedback*-Inhibition durch kontinuierliche Diffusion in das Material vermieden wurde.<sup>[35]</sup> Der Zusatz von Adsorberharz ermöglicht durch einen Anreicherungseffekt außerdem die Untersuchung von Naturstoffen, die nur in Spuren freigesetzt werden.<sup>[32]</sup>

Die genetische Manipulation von Myxobakterien (z.B. die Erstellung von Gendelestionsstämmen oder stabilen Blockmutanten) ist im Allgemeinen schwierig, weil die gentechnischen Methoden zwischen - auch nah verwandten - myxobakteriellen Spezies selten übertragbar sind.<sup>[36]</sup> Transformationsprotokolle und induzierba-

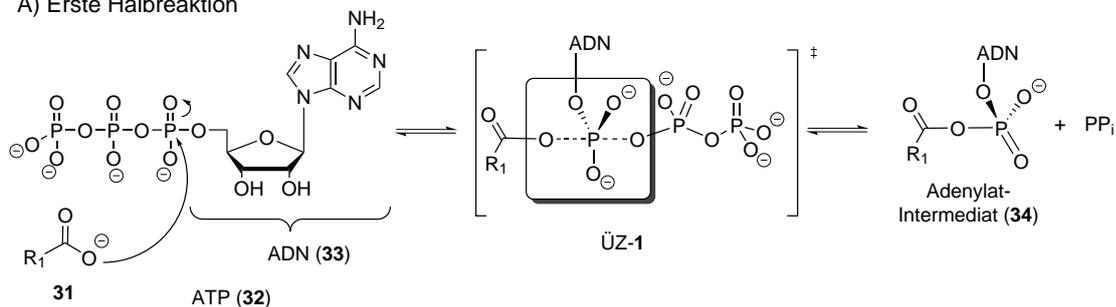
re Expressionssysteme wie zum Beispiel für *Myxococcus xanthus*, wurden darüber hinaus bisher selten publiziert.<sup>[38,39]</sup> Es ist schwierig, Einzelkolonien nach dem Ausplattieren zu erhalten. Ferner benötigen diese in der Regel 8–14 Tage, um bis auf eine mit dem bloßen Augen erkennbare Größe zu wachsen. Weiterhin weisen die meisten Stämme eine natürliche Multiresistenz gegen kommerzielle Antibiotika auf, was die Suche nach geeigneten Selektionsmarkern erschwert.<sup>[36]</sup> So sind zum Beispiel alle bis 2006 getesteten *S. cellulosum*-Stämme resistent gegen Kanamycin, Neomycin und Gentamycin.<sup>[23]</sup>

Alternative Zugänge zu myxobakteriellen Naturstoffen bieten das *Genome Mining* oder metagenomische Ansätze durch verbesserte Sequenzierverfahren und bioinformatische Hilfsmittel. Somit können interessante Biosynthese-Gencluster - auch aus nicht-kultivierbaren Myxobakterien - identifiziert und heterolog in Modellorganismen wie z.B. *E. coli* oder *S. lividans* exprimiert werden.<sup>[30]</sup>

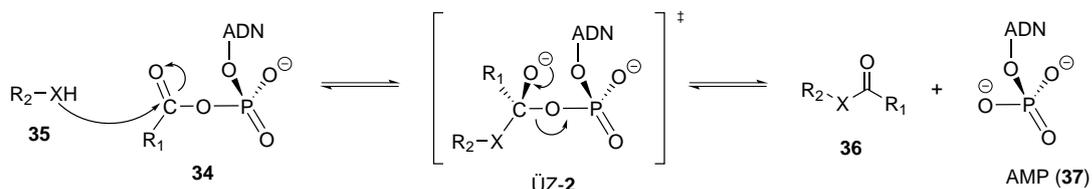
## 1.3 ANL-Enzyme

In der Natur dient die Adenylierung als Werkzeug für die Aktivierung von Carbonsäuren im Zuge der Biosynthese und Degradation verschiedener Biomoleküle wie z.B. Fettsäuren, Aminosäuren sowie Sekundärmetabolite. Für die Superfamilie der AFD-Enzyme (AFD für *adenylate forming domains*) wurde im Jahr 2009 von SCHMELZ *et al.* eine neue Klassifizierung vorgeschlagen, welche die Enzyme nach ihrer katalytischen Aktivität gruppiert: Die erste Klasse umfasst die AcyI:CoA- und AryI:CoA-Synthetasen, Adenylierungsdomänen aus der nicht-ribosomalen Proteinbiosynthese (A\_NRPS), sowie Luciferasen. Von GULICK wurde die Bezeichnung für diese Klasse als ANL-Enzyme eingeführt.<sup>[40]</sup> Zur zweiten Klasse gehören Aminoacyl:tRNA-Synthetasen und in der dritten Gruppe sind die Enzyme für die NRPS-unabhängige Biosynthese von Siderophoren (NIS für *NRPS-independent siderophores*) zusammengefasst.<sup>[41]</sup>

A) Erste Halbreaktion



B) Zweite Halbreaktion

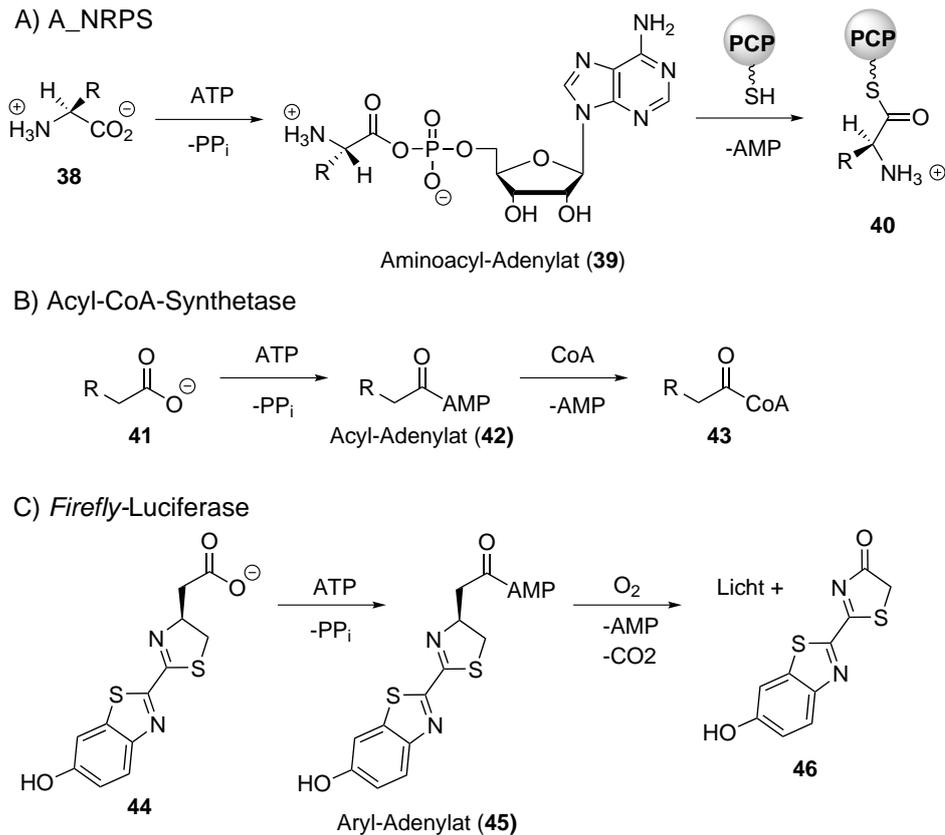


X = O, S oder NH

**Schema 5:** Reaktionsmechanismen für die A) erste und B) zweite Halbreaktion der AFD-Enzyme, verändert nach SCHMELZ *et al.*<sup>[41]</sup> ADN = Adenosin.

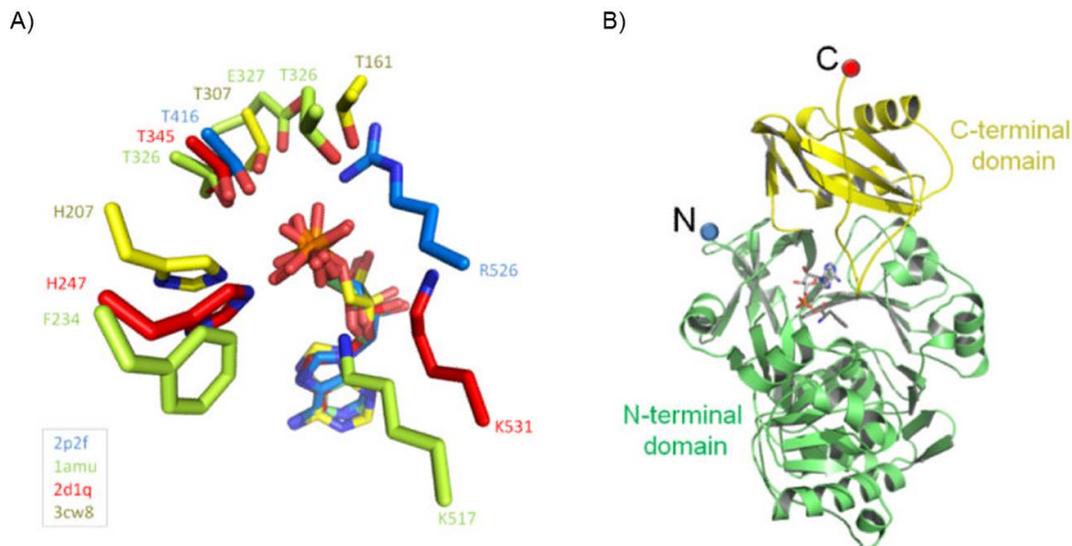
Alle AFD-Enzyme weisen denselben zweistufigen Reaktionsmechanismus auf, in welchem eine schwach nukleophile Carbonsäure **31** und ein schwach elektrophiles Phosphoanhydrid aus ATP (**32**) kondensieren (Schema 5).<sup>[40,41]</sup> In der ersten Halb-

reaktion wird die Carbonsäure **31** durch die Bildung eines Adenylat-Intermediats (**34**) aktiviert und dabei - als Triebkraft für die Reaktion - Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) freigesetzt (Schema 5, A). Das  $\alpha$ -Phosphat des ATPs (**32**) wird im trigonal bipyramidalen Übergangszustand (ÜZ-1) in den AFD-Enzymen jeweils durch eine oder mehrere positiv geladene AS (Arg, Lys oder His) stabilisiert (siehe auch Abb. 6, A). Anschließend reagiert in der zweiten Halbreaktion das hochreaktive Adenylat-Intermediat (**34**) mit einem nukleophilen Akzeptor **35** (ein Alkohol, Amin oder Thiol). Dabei wird AMP (**37**) abgespalten (Schema 5, B). Letztlich wird die Hydroxygruppe der Carbonsäure **31** als Adenylat **34** in eine bessere Abgangsgruppe überführt, was in der organischen Chemie einer Reaktion mit Säurechlorid oder den in der Peptidchemie häufig verwendeten Phosphonium- und Uroniumsalzen entspricht.<sup>[41]</sup> Außerdem sind alle AFD-Enzyme abhängig von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen, welche die Ladung des ATPs (**32**) und des abgespaltenen  $\text{PP}_i$  neutralisieren sowie die Übergangszustände ÜZ-1 und ÜZ-2 stabilisieren.<sup>[41,42]</sup> Interessanterweise sind jedoch sowohl die Anzahl der komplexierten  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen als auch die Koordinationsgeometrie für die Superfamilien und sogar innerhalb der ANL-Klassen verschieden.<sup>[41]</sup>



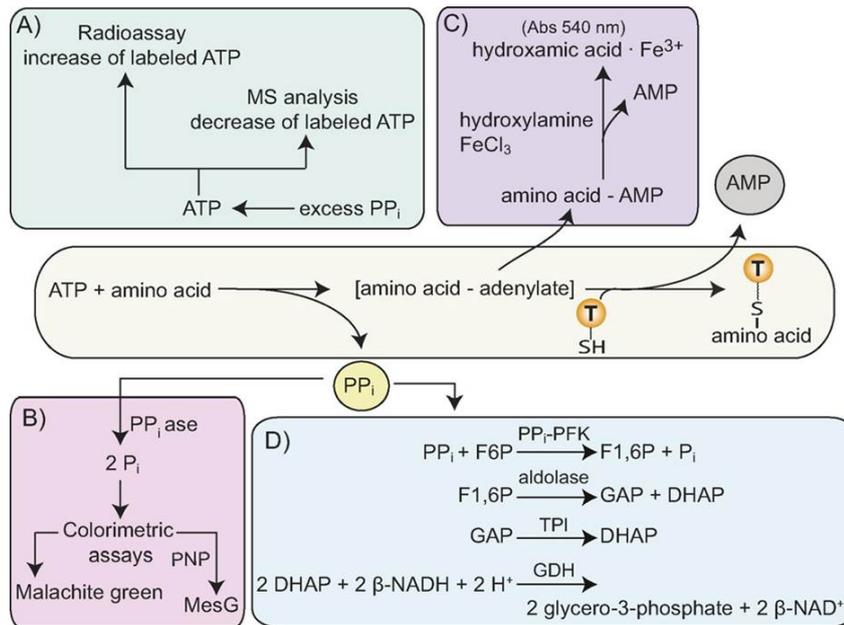
**Schema 6:** Reaktionen von ANL-Enzymen, verändert nach GULICK.<sup>[40]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ANL-Domäne untersucht, weshalb diese Klasse im Folgenden genauer beschrieben wird. Die ANL-Enzyme aktivieren sehr unterschiedliche Substrate und die Subklassen sind auf AS-Sequenzbasis in der Regel nur zu ca. 30% homolog (Schema 6).<sup>[40]</sup> Dennoch sind die aktiven Zentren sehr ähnlich und weisen das *Adenylate Activating Enzyme* (AAE)-Consensus-Motif [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-X-[PASLIVM]-[KR] (PROSITE: PS00455) auf. Dieses ist essentiell für die ATP-Bindung sowie die Adenylatbildung (Abb. 6, A).<sup>[43]</sup> In ANL-Enzymen wird das  $\alpha$ -Phosphat des ATPs (**32**) durch Wechselwirkung mit Arg (im Fall der Acetyl:CoA-Synthetase), Lys (für die A\_NRPS GrsA und *Firefly*-Luciferase) oder His (*Firefly*-Luciferase) stabilisiert, aber auch die Position eines Thr ist konserviert (Abb. 6, A).<sup>[41]</sup> Eine Mutation dieser positiv geladenen AS - z.B. K529R in Firefly Luciferasen - führt in der Regel zum Funktionsverlust.<sup>[44]</sup>



**Abbildung 6:** A) Strukturvergleich der aktiven Zentren von ANL-Enzymen; 2p2f = Acetyl:CoA-Synthetase (blau), 1amu = A\_NRPS Gramacidin S Synthase 1, GrsA (grün), 2d1q = Japanische *Firefly*-Luciferase (rot), 3cw8 = 4-Chlorobenzoyl:CoA-Ligase. B) Konservierte Domänenarchitektur der ANL-Enzyme am Beispiel der GrsA (1amu) im Komplex mit AMP (**37**) und Phe; verändert nach SCHMELZ *et al.*<sup>[41]</sup>

Die ANL-Enzyme weisen darüber hinaus eine konservierte Domänenarchitektur auf, bestehend aus einer großen N-terminalen und einer kleineren C-terminalen Subdomäne, die mit einem flexiblen Linker verbunden sind (Abb. 6, B).<sup>[40,45]</sup> Die Orientierung der Subdomänen zueinander hängt davon ab, welche Halbreaktion katalysiert wird. Die Bindetasche ist lokalisiert zwischen den Subdomänen.<sup>[40,45]</sup> Die hohe Strukturhomologie ist wahrscheinlich auf eine konvergente Entwicklung zurückzuführen, da die Aktivierung von Carbonsäuren als Bausteine eine evolutionär sehr alte Reaktion ist.<sup>[41]</sup>



**Abbildung 7:** Möglichkeiten für die Untersuchung von ANL-Domänen am Beispiel für A\_NRPS. A) ATP/ $PP_i$ -Austausch-Assay; B) Colorimetrischer Phosphat-Assay; C) Hydroxylamin-basierte Quantifizierung des Acyl-Adenylats; D) Enzymgekoppelter NADH/ $PP_i$ -Assay; übernommen von KITTILÄ *et al.*<sup>[46]</sup>

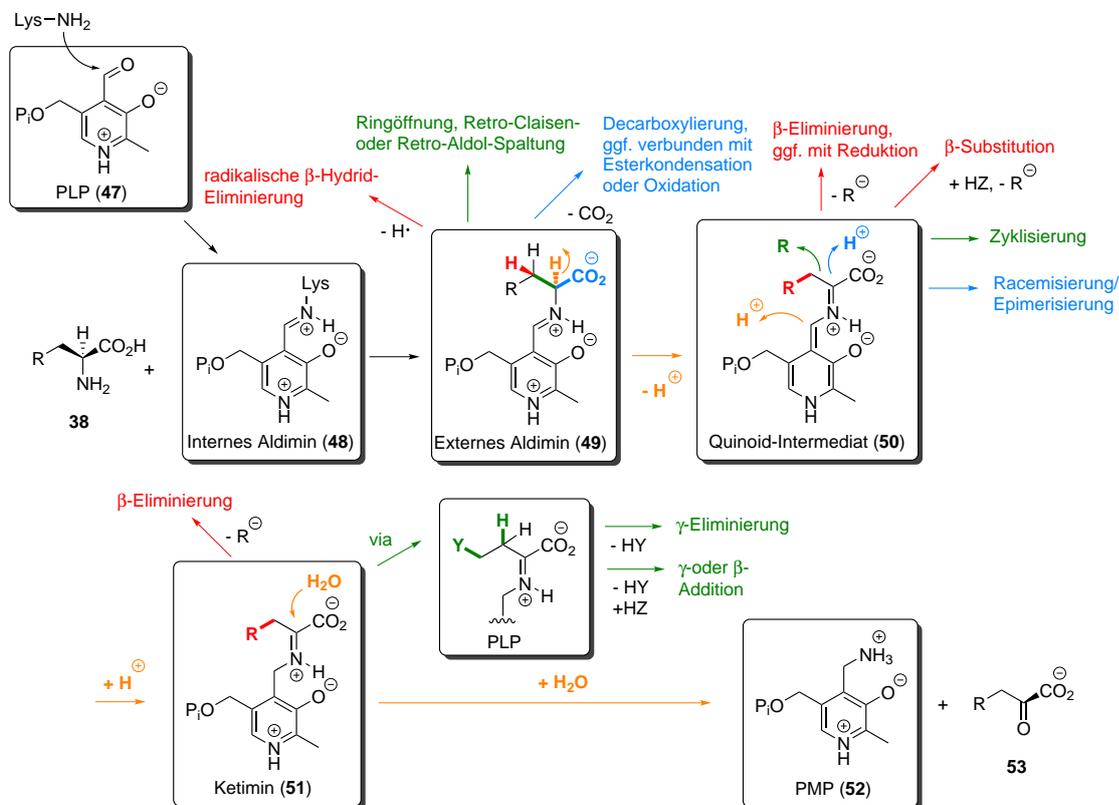
Für die Untersuchung der Aktivität von ANL-Enzymen existieren etablierte Methoden (Abb. 7) für die Quantifizierung aller Substrate, Intermediate und Produkte.<sup>[46]</sup>

Im Jahr 2004 wurden der ANL-Klasse die *Fatty Acyl*:Adenylat-Ligasen (FAAL) hinzugefügt.<sup>[47]</sup> Diese sind homolog zu den *Fatty Acyl*:CoA-Ligasen (FACL) und katalysieren dieselbe erste Halbreaktion (Schema 6, B). Die zweite Halbreaktion ähnelt jedoch eher den A\_NRPS (Schema 6), da die aktivierte Acyl-Einheit **42** anschließend auf eine ACP- oder PCP-Domäne transferiert wird. Auf diese Weise werden Fettsäure-Bausteine aus dem Primärmetabolismus als Startbausteine in die Assemblierungsmaschinerie von PKS oder NRPS eingeschleust. Von ARO-RA *et al.* wurde gezeigt, dass FAALs durch Deletion eines charakteristischen ca. 20 bp umfassenden Insertionsmotifs zwischen der C- und N-terminalen Subdomäne in FACL umgewandelt werden können.<sup>[48]</sup> Die meisten Untersuchungen wurden mit FAALs aus *Mycobacterium tuberculosis* durchgeführt, weil es einen Zusammenhang zwischen FAAL-Aktivität und Virulenz gibt.<sup>[49]</sup> Nur wenige FAALs, die

PKS-assoziiert sind, wurden bereits *in vitro* untersucht - meist mit einer kleinen Substratauswahl, die sich stark am vermuteten natürlichen Substrat orientierte. In der Regel wurde eine hohe Substratspezifität beobachtet, die höchstens gesättigte Fettsäuren verschiedener Kettenlänge einschloss.<sup>[49-53]</sup>

## 1.4 PLP-abhängige Enzyme

Pyridoxalphosphat (PLP, **47**) ist auch als die metabolisch aktive Form von Vitamin B<sub>6</sub> bekannt. Es stellt einen vielseitigen Cofaktor dar, welcher in der Natur sehr verschiedene Reaktionen an Aminen (meistens  $\alpha$ -Aminosäuren **38**) katalysiert. Diese beinhalten unter anderem Transaminierungen, Decarboxylierung, Racemisierung, Eliminierungs- und Substitutionsreaktionen sowie Ringöffnungen (Schema 7).<sup>[54]</sup> In der B6-*DataBase* sind bisher 238 chemische Reaktionen verzeichnet, die von PLP-Enzymen katalysiert werden.<sup>[55]</sup>



**Schema 7:** Die Reaktionen von PLP-Enzymen. Verändert nach STEFFEN-MUNSBERG *et al.*<sup>[54]</sup>

Der erste Schritt ist bei allen PLP-katalysierten Reaktionen gleich. Zunächst wird zwischen einem konservierten Lysin in der aktiven Tasche des PLP-Enzyms und PLP (**47**) eine SCHIFF'sche-Base ausgebildet und so das interne Aldimin (**48**) erzeugt. Es folgt die Bildung eines externen Aldimins (**49**), indem das Lysin mit dem Substrat **38** ausgetauscht wird.

Anschließend bestimmt die Umgebung im aktiven Zentrum, welche Reaktionsroute verfolgt wird. Die Reaktionsspezifität hängt nach TONEY von drei Faktoren ab:

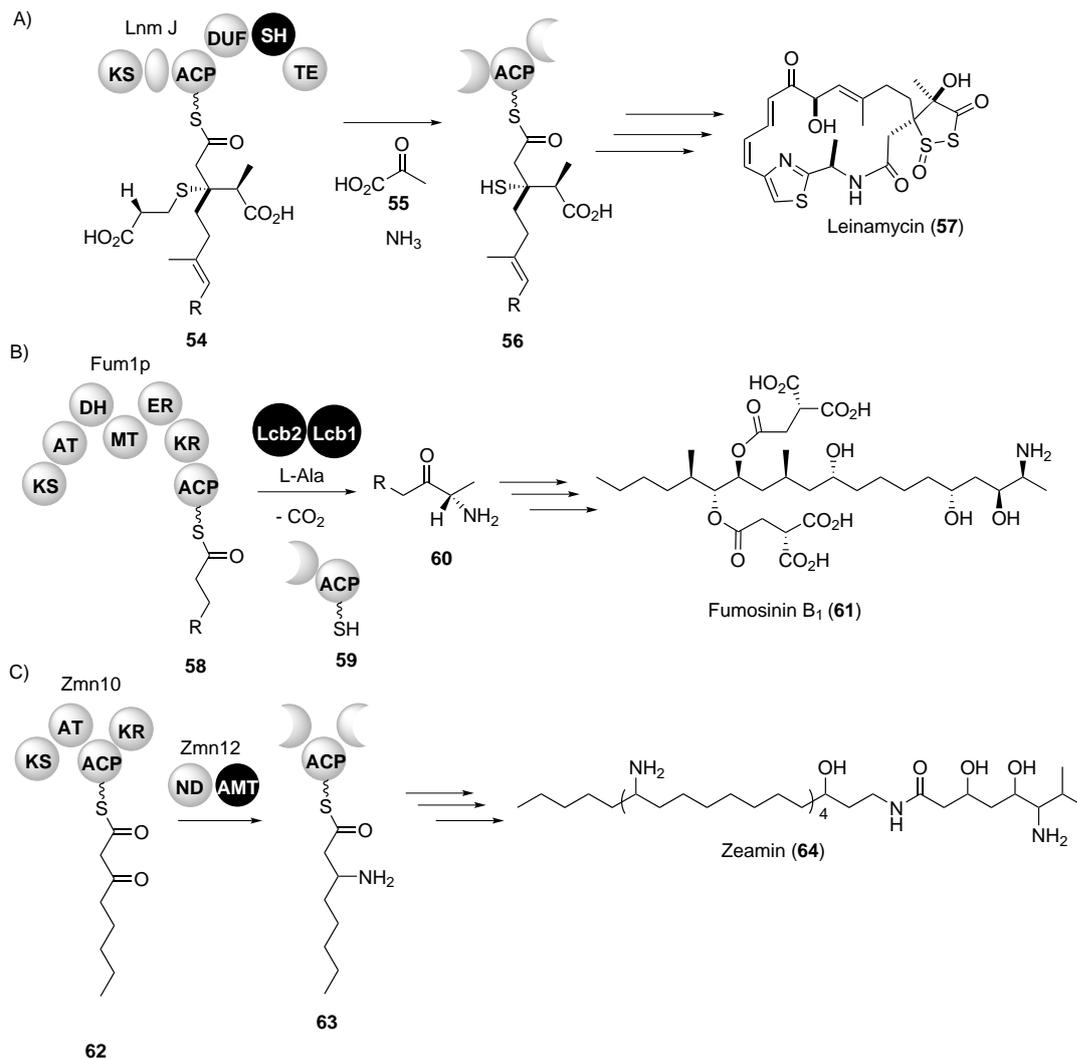
1) *Stereoelektronische Kontrolle.* Funktionelle Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms orientieren die Konformation des Substrats bzw. der jeweiligen Intermediate so, dass die zu brechende Bindung parallel zu den  $\pi$ -Orbitalen des PLP-Systems steht. So wird eine  $\pi$ - $\sigma$ -Orbitalüberlappung ermöglicht, welche notwendig für den Bindungsbruch und die Resonanzstabilisierung der erzeugten Ladung durch das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem des PLPs (47) ist. Dieses Prinzip, welches erklärt, welche der  $C\alpha$ -Substituenten abgespalten wird, heißt das DUNATHAN-Prinzip.<sup>[54,56]</sup>

2) *Die Elektrophilie des SCHIFFsche Base-Pyridinring- $\pi$ -Elektronensystems.* Das PLP (47) ist extrem effizient darin, die überschüssige Elektronendichte am carbanionischen  $C\alpha$  der Intermediate zu delokalisieren. Verschiedene Reaktionen, wie Racemisierung oder Transaminierung benötigen jeweils mehr oder weniger Stabilisierung der negativen Ladung am  $C\alpha$ . Die Enzymumgebung beeinflusst die Elektrophilie des jeweiligen Aldimin-Intermediats, indem das Pyridoxyl  $N$ -Atom protoniert wird oder nicht. Das protonierte  $N$ -Atom erhöht die Kapazität zur Resonanzstabilisierung sodass z.B. ein Quinoid-Intermediat (50) ausgebildet werden kann.

3) *Anordnung der katalytischen Seitenketten.* Die katalytisch aktiven funktionellen Gruppen des Enzyms besitzen eine gewisse positionelle Flexibilität, welche die gewünschte Bindungsbildung propagieren.<sup>[57]</sup>

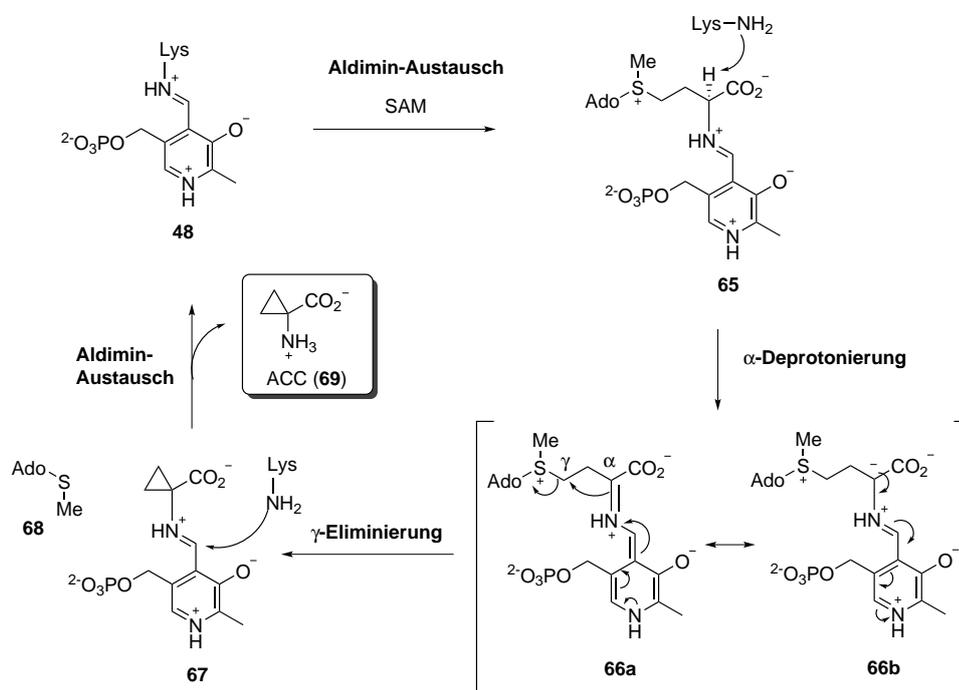
Neben der Reaktionsspezifität ist es für PLP-Enzyme entscheidend, durch die Beschaffenheit des aktiven Zentrums die Substratspezifität und Enantioselektivität zu kontrollieren. Dies ist für viele PLP-Enzyme eine komplexe Aufgabe, da chemisch sehr unterschiedliche Substrate in die aktive Tasche passen müssen und daher eine multiple Substraterkennung notwendig ist.<sup>[54]</sup> Dennoch ist die Tertiärstruktur der PLP-Enzyme hoch konserviert. Bisher wurden lediglich sieben verschiedene Faltungstypen entdeckt.<sup>[55]</sup>

Der PLP-Faltungstyp I wird auch Aspartat-Aminotransferase-Superfamilie genannt und zeigt die größte Quantität und Diversität der Mitglieder, im Vergleich zu den anderen Faltungstypen.<sup>[58]</sup> Bis auf eine sind Enzyme aller EC-Klassen (1–5) vertreten, die mit einer großen Anzahl an Substraten reagieren.<sup>[54]</sup> PLP-Enzyme sind wichtige molekulare *Targets* in der medizinischen Chemie z.B. für die Behandlung parasitärer Protozoen.<sup>[59]</sup>



**Schema 8:** Beispiele für PLP-Enzyme in PKS-Biosynthesewegen. A) Cysteinyl-Lyase in der Leinamycin(**57**)-Biosynthese;<sup>[60]</sup> DUF = *Domain of Unknown Function*, SH = Cysteinyl-Lyase, TE = Thioesterase B) Abspaltung von der PKS in der Fumosinin B<sub>1</sub> (**61**)-Biosynthese;<sup>[61]</sup> Lcb2 = *long-chain base subunit2*, Aminotransferase, Lcb1 = *long-chain base subunit1*, regulative Domäne C) Aminotransferase in der Zeamin(**64**)-Biosynthese;<sup>[62]</sup> ND = 2-Nitropropan-Dioxygenase, AMT = Aminotransferase.

Darüber hinaus gibt es Beispiele für PLP-Enzyme, welche an der PKS- oder NRPS/PKS-Biosynthese beteiligt sind (Schema 8). Diese katalysieren ungewöhnliche Reaktionen. Eine Cystein-Lyase katalysiert einen C-S-Bindungsbruch während der Leinamycin(**57**)-Biosynthese.<sup>[60]</sup> In der Fumosinin B<sub>1</sub>(**61**)-Biosynthese wird das ACP-gebundene Intermediat **58** durch ein PLP-Enzym unter Beteiligung von L-Alanin von der PKS abgespalten und in der Zeamin(**64**)-Biosynthese katalysiert die Amintransferase Zmn12 in nur jedem vierten Iterationsschritt die Aminierung eines  $\beta$ -Ketoesters.<sup>[61,62]</sup>

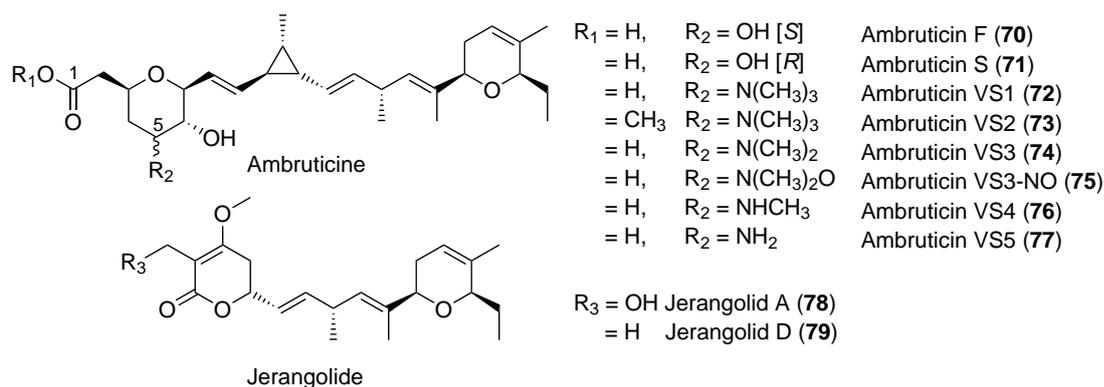


**Schema 9:** Generierung des Cyclopropanbausteins ACC (**69**) für die NRPS durch die ACC-Synthese, verändert nach THIBODEAUX *et al.*<sup>[63]</sup>

Die PLP-abhängige 1-Aminocyclopropan-1-carboxylat(ACC)-Synthese katalysiert die Bildung von **69** aus S-Adenosylmethionin (SAM) in einer intramolekularen  $S_N2$ -Reaktion (Schema 9). ACC (**69**) kann anschließend als ungewöhnliche Aminosäure in das Rückgrad eines nicht-ribosomalen Peptids eingefügt werden.<sup>[63]</sup>

## 1.5 Die Ambruticine

Die Ambruticine stellen eine Naturstoffklasse reduzierter Polyketide mit ungewöhnlichen Strukturmotiven dar (Abb. 8). Dazu zählen ein tetrasubstituierter Tetrahydropyran(THP)- und ein trisubstituierter Dihydropyran(DHP)-Ring, die durch eine Divinylcyclopropan(DVC)-Einheit verbunden sind. Die Isolation von Ambruticin S (**71**) und seinem C-5-Stereoisomer Ambruticin F (**70**) wurde erstmals im Jahr 1977 von RINGEL *et al.* aus dem Kulturüberstand von *Polyangium cellulorum* var. *fulvum* berichtet. Dieser myxobakterielle Stamm wurde später umbenannt in *S. cellulorum* 10 (So ce10, vgl. Kapitel 1.2).<sup>[10]</sup> Die Jerangolide (**78** und **79**) aus dem Myxobakterium So ce 307 sind mit den Ambruticinen strukturell verwandt, weisen jedoch anstelle der DVC-Einheit und dem Tetrahydropyran ein Dihydropyranon auf.<sup>[64]</sup>



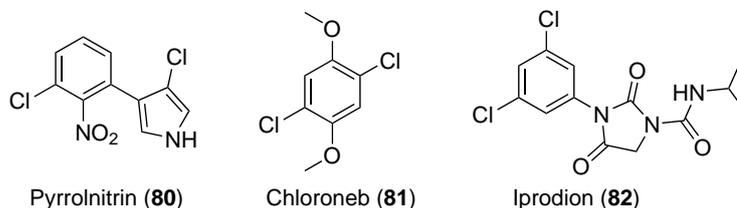
**Abbildung 8:** Übersicht der Ambruticine und Jerangolide. Die Nomenklatur der Ambruticine beschreibt ihr Verhalten während der Dünnschichtchromatographie: VS steht für *Very Slow*, S für *Slow* und F für *Fast*.<sup>[10,65]</sup>

Mithilfe von MS-Studien, IR-, <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, Einkristall-Röntgenstrukturanalyse, partialen Totalsynthesen, Derivatisierung sowie Degradationsstudien wurden die Struktur und Stereochemie der Ambruticine als erste myxobakterielle Antibiotikaklasse bestimmt.<sup>[66-69]</sup> In den 90er Jahren wurden durch Fermentationen im großen Maßstab (360 L) und verbesserte Chromatographiemethoden mit der VS-Serie 1-5 (**72-77**) weitere Ambruticine entdeckt, die sich in ihrer Derivatisierung an C-1 und C-5 unterscheiden.<sup>[65]</sup> Die komplexe Struktur der

Ambruticine mit 10 Stereozentren führte seit der ersten Totalsynthese von Ambruticin S (**71**) im Jahr 1993 durch KENDE *et al.* zu vier weiteren Totalsynthesen - zuletzt im Jahr 2010 von HANESSIAN *et al.*.<sup>[70,71]</sup>

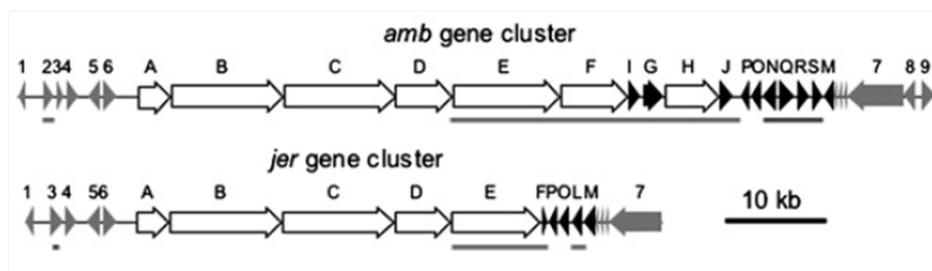
Die Ambruticine sind Fungizide mit einem breiten Wirkungsspektrum *in vivo* und *in vitro* gegen verschiedene Hefe-, Joch-, Schlauch- und Eipilze sowie Deuteromycetes. Darunter fallen auch mehrere Pflanzen-, Tier- und Humanpathogene.<sup>[10,72,73]</sup>

Ambruticine sind beispielsweise aktiv gegen Erreger systemischer Haut- und Lungenerkrankungen wie z.B. *Coccidioides immitis* (Auslöser des *San Joaquin Fever*, einer Lungen-Infektionskrankheit), *Histoplasma capsulatum* (Erreger der systemischen DARLING-Krankheit) sowie verschiedene filamentöse Hautpilze mit minimalen inhibitorischen Konzentrationen von 0.03–1.6 µg/mL bei geringer Toxizität im Mausmodell ( $LD_{50} > 1\text{g/kg}$  bei oraler Aufnahme). Gegen die meisten GRAM-positiven oder -negativen Bakterien ist Ambruticin hingegen unwirksam.<sup>[10]</sup> Aus diesem Grund stellen die Ambruticine eine attraktive Leitstruktur für antifungale Wirkstoffforschung dar.



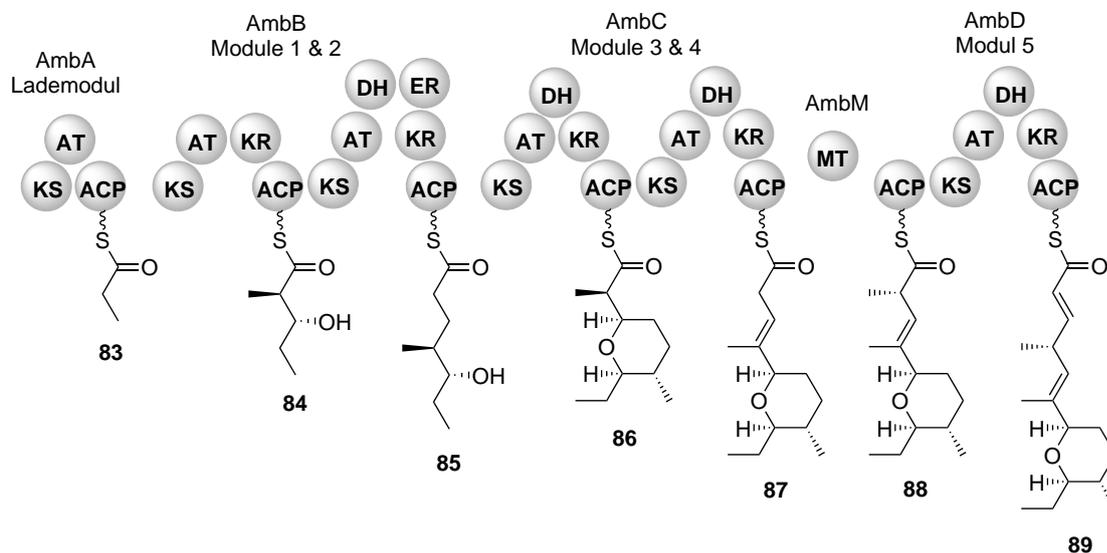
**Abbildung 9:** Strukturen von Fungiziden, die wie **71** den HOG-Signalweg induzieren.<sup>[73]</sup>

Die Wirkung der Ambruticine beruht wie beim Phenylpyrrol Pyrrolnitrin (**80**), dem Dicarboximid Iprodion (**82**) und dem Dimethoxybenzol Chloroneb (**81**) auf der Induktion des *high-osmolarity glycerol*(HOG)-Signalwegs (Abb. 9).<sup>[73,74]</sup> Diese bewirkt die Akkumulation von Glycerin und freien Fettsäuren in der Zelle, sodass der Zellinhalt aufgrund des hyperosmotischen Drucks austritt und es letztlich zum apoptotischen Zelltod kommt. Das molekulare *Target* ist vermutlich die Typ III Histidin-Kinase Hik1.<sup>[74]</sup>



**Abbildung 10:** Die Ambruticin(*amb*)- und Jerangolid(*jer*)-Biosynthese-Gencluster, übernommen von JULIEN *et al.*<sup>[11]</sup> Weiße Pfeile repräsentieren Gene für PKS-Module, schwarze Pfeile kennzeichnen Gene für *Tailoring*-Enzyme und regulatorische Gene sind grau dargestellt. Die unterstrichenen Gene sind nicht homolog zwischen den beiden Genclustern.

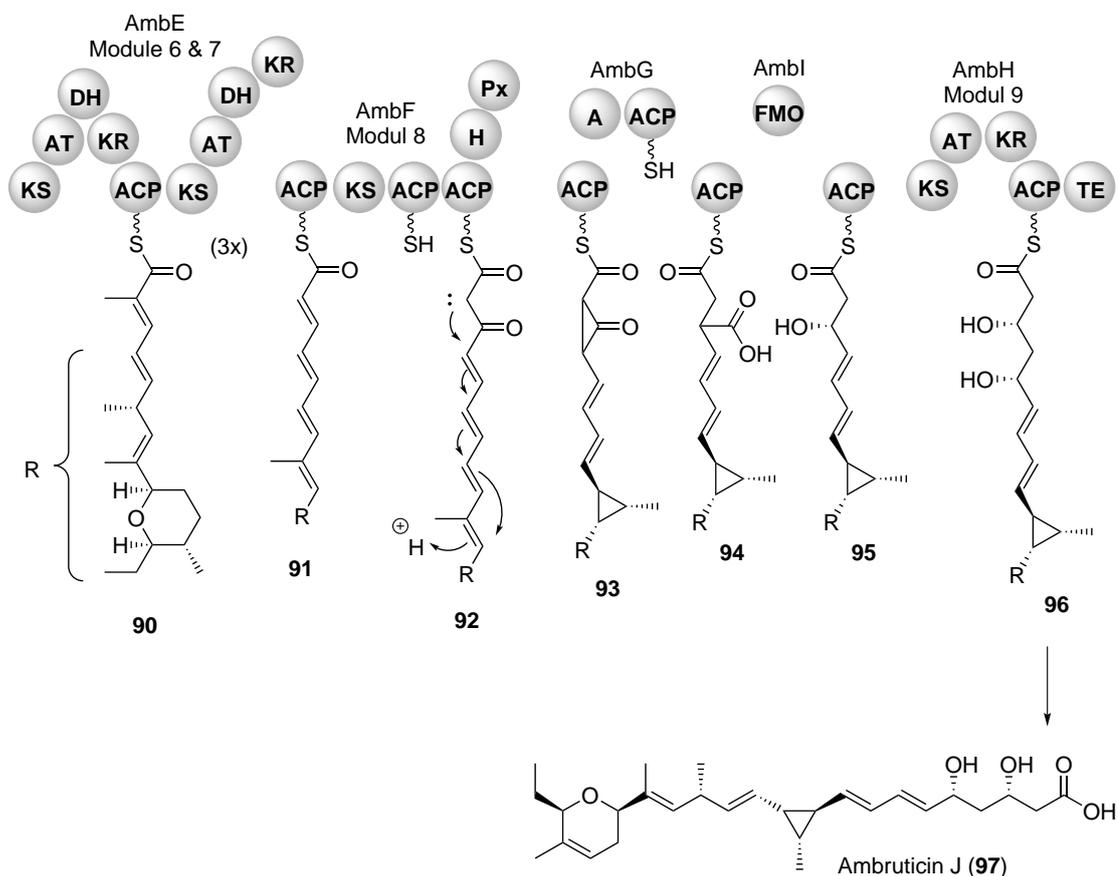
Im Jahr 2006 wurden die Ambruticin- und Jerangolid-Gencluster von JULIEN *et al.* identifiziert (Abb. 10). Anhand von Sequenzvergleichen wurde eine Biosynthese-Hypothese formuliert, in der das Polyketidgrundgerüst von einer PKS Typ I aufgebaut wird und mithilfe von Gendeletionsstudien wurden späte Biosynthese-Intermediate nachgewiesen. Die Gene der ersten vier PKS-Module A bis D des Ambruticin-Clusters sind zu >90% homolog zu jenen der Jerangolid-Biosynthese.<sup>[11]</sup>



**Schema 10:** Darstellung der Biosynthese des Ambruticin-Ostfragments.<sup>[11,75,76]</sup>

In den PKS-Modulen AmbA und AmbB wird der Startbaustein Propionyl-CoA (8) mit Methyl-Malonyl-CoA (12) und anschließend mit Malonyl-CoA (11) kondensiert und, der Kolinearitätsregel folgend (vgl. Kapitel 1.1), sequenziell redu-

ziert (Schema 10). Von BERKHAN *et al.* wurde gezeigt, dass die DH-Domäne in Modul 3 bifunktional ist und sowohl die Dehydratation als auch die stereoselektive THP-Bildung durch eine *Oxa*-MICHAEL-Addition von **85** zu **86** katalysiert.<sup>[75]</sup> Weiterhin wurde die Enzymologie der Doppelbindungs-Isomerisierung aufgeklärt. Die DH-Domäne in Modul 4 stellt eine trifunktionale Dehydratase, Epimerase und Enoylisomerase dar, sodass ein Gemisch von Intermediaten, unter anderem auch **87**, erhalten wird. Die Methyltransferase AmbM zieht die Verbindung durch Methylierung **87** aus dem Gleichgewicht und ermöglicht so die Weiterreichung an Modul 5. Nach erneuter Verlängerung und Reduktion wird das charakteristische Strukturmotiv des 1,4-Diens in Intermediat **89** erhalten.<sup>[76]</sup>

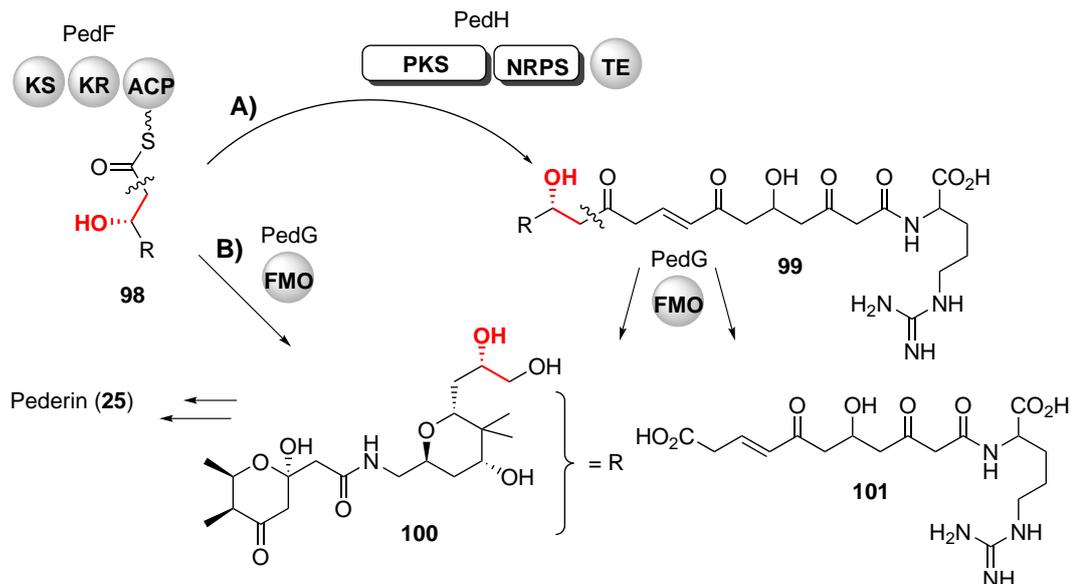


**Schema 11:** Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments nach JULIEN *et al.*<sup>[11]</sup>  
 H = Hydrolase, Px = Domäne mit PLP-Bindemotif, FMO = Flavin-abhängige Monooxygenase, A = Adenylierende Domäne

Für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments wurde von JULIEN *et al.* eine Hypothese aufgestellt (Schema 11).<sup>[11]</sup> Dieser zufolge katalysiert Modul 6 eine Verlängerung mit Methyl-Malonyl-CoA (**12**) und die sequenzielle Reduktion des  $\beta$ -Ketothioesters bis zum Alken. Anschließend verlängert Modul 7 die Polyketidkette **90** iterativ um drei Malonyl-CoA-Einheiten (**11**), welche wiederum bis zum Alken reduziert werden.

Für das AT-freie Modul 8 schlagen JULIEN *et al.* vor, dass die AT-Domäne aus dem vorherigen Modul 7 Malonyl-CoA (**11**) bereitstellt und die KS-Domäne den decarboxylativen Kondensationsschritt katalysiert. Auf die KS-Domäne folgen in Modul 8 zwei ACP-Domänen sowie eine Hydrolase(H)-Domäne und eine Domäne mit PLP-Bindemotif (Px) mit unbekannt Funktionen. Anschließend sind im Biosynthese-Cluster die diskrete A-ACP Didomäne AmbG und die Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO) AmbI in gleicher Leserichtung wie die PKS-Gene codiert.

JULIEN *et al.* schlagen vor, dass in einer FAVORSKII-ähnlichen Umlagerung zunächst **92** in  $\alpha$ -Position zum Thioester deprotoniert wird, wodurch eine Elektronenkaskade im Polyen-System initiiert wird. Diese führt zur Ausbildung der DVC-Einheit mit gleichzeitiger Formung eines Cyclopropanons **93**. Dieses wird regioselektiv zur verzweigten Carbonsäure **94** geöffnet. JULIEN *et al.* argumentieren, dass die Ringspannung des Cyclopropanons ca. 27 kcal/mol beträgt und die Bindungsenergie einer  $\pi$ -Bindung um ca. 22 kcal/mol höher ist als jene einer  $\sigma$ -Bindung. Somit sei nach der Hydrolyse des Cyclopropanons **93** zur verzweigten Carbonsäure **94** die Gesamtreaktion von **92** zu **94** energetisch begünstigt.



**Schema 12:** Ausschnitt aus der Biosynthese von Pederin (**25**), bei der PedG vermutlich eine C-C-Spaltungsreaktion über Weg A) oder B) katalysiert.<sup>[77]</sup> A) Der Pederinvorläufer **98** wird zunächst von der hybriden PKS-NRPS weiter prozessiert und anschließend von PedG in **100** und **101** gespalten. B) PedG katalysiert die direkte Abspaltung des Pederinvorläufers **98** von der ACP-Domäne in einer oxidativen Decarboxylierung.

Anschließend könnten laut JULIEN *et al.* AmbI, die Px-Domäne sowie AmbG an der oxidativen Decarboxylierung von **94** zum Alkohol **95** beteiligt sein. Die Beteiligung von AmbI wurde aufgrund der Homologie zu PedG aus der Pederin(**25**)-Biosynthese vorgeschlagen, weil dieses vermutlich eine ähnliche C-C-Bindungsspaltung katalysiert (Schema 12, B).<sup>[77]</sup>

In der Ambruticin-Biosynthese wird in Modul 9 ein letzter Verlängerungsschritt mit Malonyl-CoA (**11**) katalysiert und der  $\beta$ -Ketothioester zum Alkohol **96** reduziert. Anschließend wird Ambruticin J (**97**) durch die TE-Domäne vom Modul abgespalten. Nach Modifikation durch Post-PKS *Tailoring*-Enzyme AmbJ, AmbQ, AmbN und AmbR werden die verschiedenen natürlich vorkommenden Ambruticin-Derivate erhalten (vgl. Abb. 8).

## 2 Zielsetzung

Die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments wirft viele Fragen über die DVC-Bildung sowie die Entfernung einer C1-Einheit aus dem linearen Polyketid-Grundgerüst auf. Es ist bisher nicht geklärt, welche Aufgaben die vermutlich beteiligten Enzyme und Domänen haben, in welcher Reihenfolge sie agieren oder nach welchem Mechanismus die Ringbildung abläuft.

Ein Verständnis der Enzymologie der in der Natur seltenen DVC-Einheit ist reizvoll, um in Zukunft die Nutzung der betreffenden Enzyme für die Biokatalyse zu ermöglichen. Für die geplanten Studien sollte ein interdisziplinärer Ansatz verfolgt werden, der Methoden aus der (Molekular-)Biologie, Biochemie, Bioinformatik und Organischen Chemie kombiniert.

Mithilfe von *in vitro*-Studien mit dem rekombinanten PKS-Modul AmbF, dessen isolierten Domänen sowie den *Tailoring*-Enzymen AmbG und AmbI sollte ein erster Einblick in die komplexe Biosynthese-Maschinerie gewonnen werden. Dafür sollten die jeweiligen Enzyme als funktionale Fusionsproteine heterolog in *E. coli* produziert und anschließend mit geeigneten Surrogaten für Biosyntheseintermediate in Enzymaktivitätstests zur Reaktion gebracht werden.

Auf gentechnischer Ebene war dafür die Assemblierung des 6.6 kbp großen *ambF*-Gens vonnöten. Weiterhin sollten mithilfe bioinformatischer Methoden die putativen Grenzen der AmbF-Domänen ermittelt werden und alle betreffenden Gene (*ambF*, *ambF*-Domänen, *ambG* und *ambI*) in geeignete *E. coli*-Expressionsvektoren kloniert werden.

Weiterhin waren Optimierungsstudien zur heterologen Produktion der Fusionsproteine in *E. coli* und deren chromatographische Reinigung, die Entwicklung geeigneter Untersuchungsmethoden für ACP-gebundene Intermediate sowie die Synthese biosynthetischer Intermediat-Surrogate notwendig.

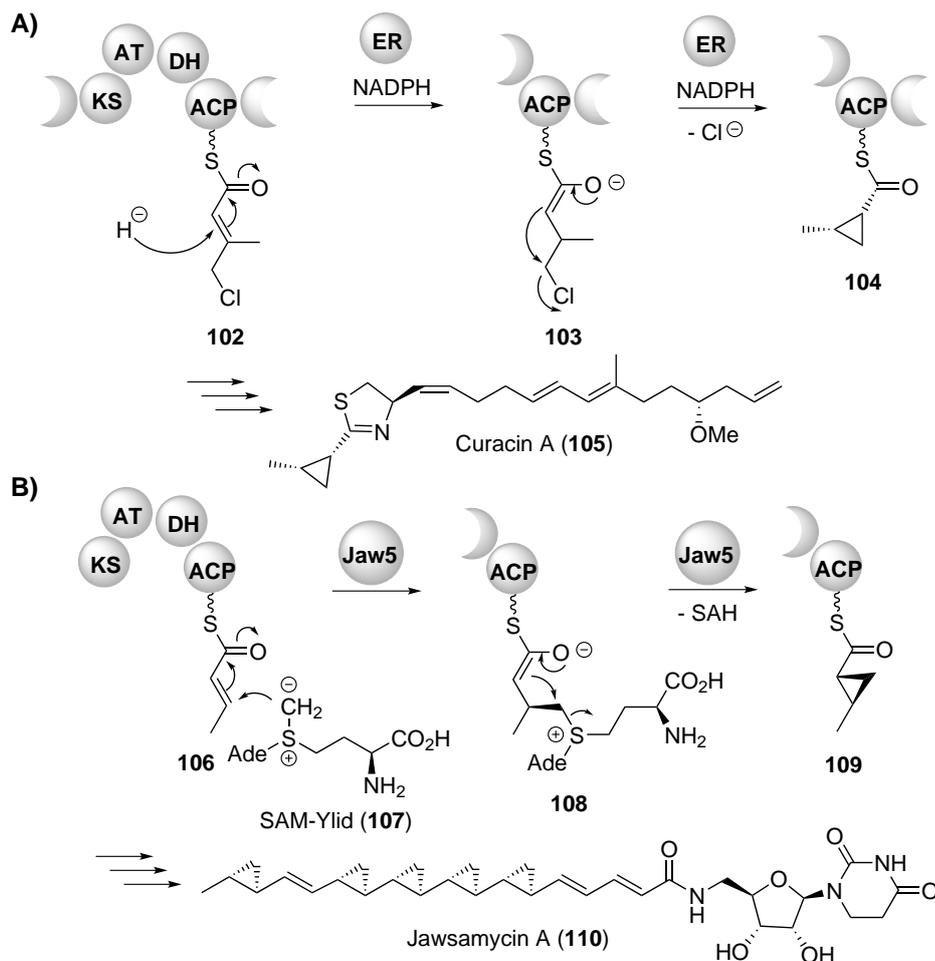
An zentraler Stelle im Mechanismus steht die ANL-ACP Didomäne AmbG. Daher sollten deren katalytische Kompetenz und Substratspezifität *in silico* und *in vitro* untersucht und ihre Rolle in der Ambruticin-Biosynthese beleuchtet werden.

Ferner sollte durch die Analyse von Biosyntheseintermediaten zusätzliche Informationen über den Biosyntheseweg gewonnen werden. Dafür wurde der Ambruticin-Produzent So ce10 für *in vivo*-Studien genutzt, indem Biosyntheseintermediate mithilfe der nicht-hydrolysierbaren Malonyl-CoA Analoga (NHA) von der PKS abgespalten werden sollten. Dafür sollten zunächst die NHA synthetisiert, geeignete Kultivierungs- und Produktionsbedingungen für den myxobakteriellen Stamm gefunden und die Ambruticinproduktion überprüft werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Arbeitshypothese für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments

Im Ambruticin-Mittelfragment ist eine DVC-Einheit enthalten. Die prinzipiellen Reaktionsmechanismen für die Biosynthese von Cyclopropanen umfassen inter- und intramolekulare elektrophile Additionen,  $S_N2$ -Reaktionen (vgl. ACC-Synthase in Abb. 9 in Kapitel 1.4) sowie SAM-abhängige Methylengruppenübertragungen.<sup>[63]</sup>



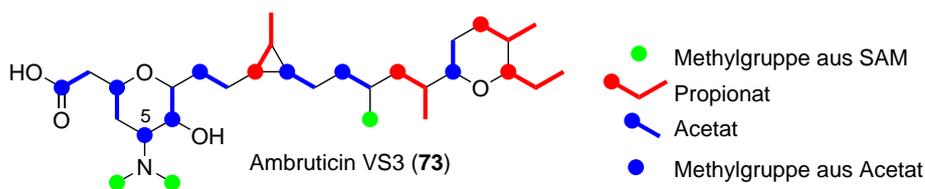
**Schema 13:** Bisher bekannte Mechanismen von Cyclopropanierungen in PKS-Biosynthesewegen, verändert nach SUNDARAM *et al.*<sup>[78]</sup> A) Cyclopropanierung durch eine ER-Domäne in der Biosynthese von Curacin A (105). B) In der Jawsamycin (110)-Biosynthese wird die Cyclopropanierung vermutlich von Jaw5 unter Beteiligung von SAM katalysiert.<sup>[79]</sup>

Es sind bisher zwei Mechanismen in der PKS-Biosynthese bekannt, über welche Cyclopropane in das Polyketidrückgrad integriert werden können (Schema 13).<sup>[78]</sup> In der Curacin A (105)-Biosynthese im Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* wird die Cyclopropanbildung durch eine Terpen-ähnliche Polyketid- $\beta$ -Verzweigungsreaktion und anschließende  $S_N2$ -Reaktion ermöglicht.<sup>[80]</sup> Ein (*S*)-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Intermediat wird von einer Ketoglutarat-abhängigen Non-Häm-Fe(II)-Halogenase chloriert, Wasser eliminiert und decarboxyliert, sodass Allylchlorid 102 erhalten wird. Die Reihenfolge von Chlorierung, Eliminierung und Decarboxylierung ist bisher unklar.

### 3.1 Arbeitshypothese für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments

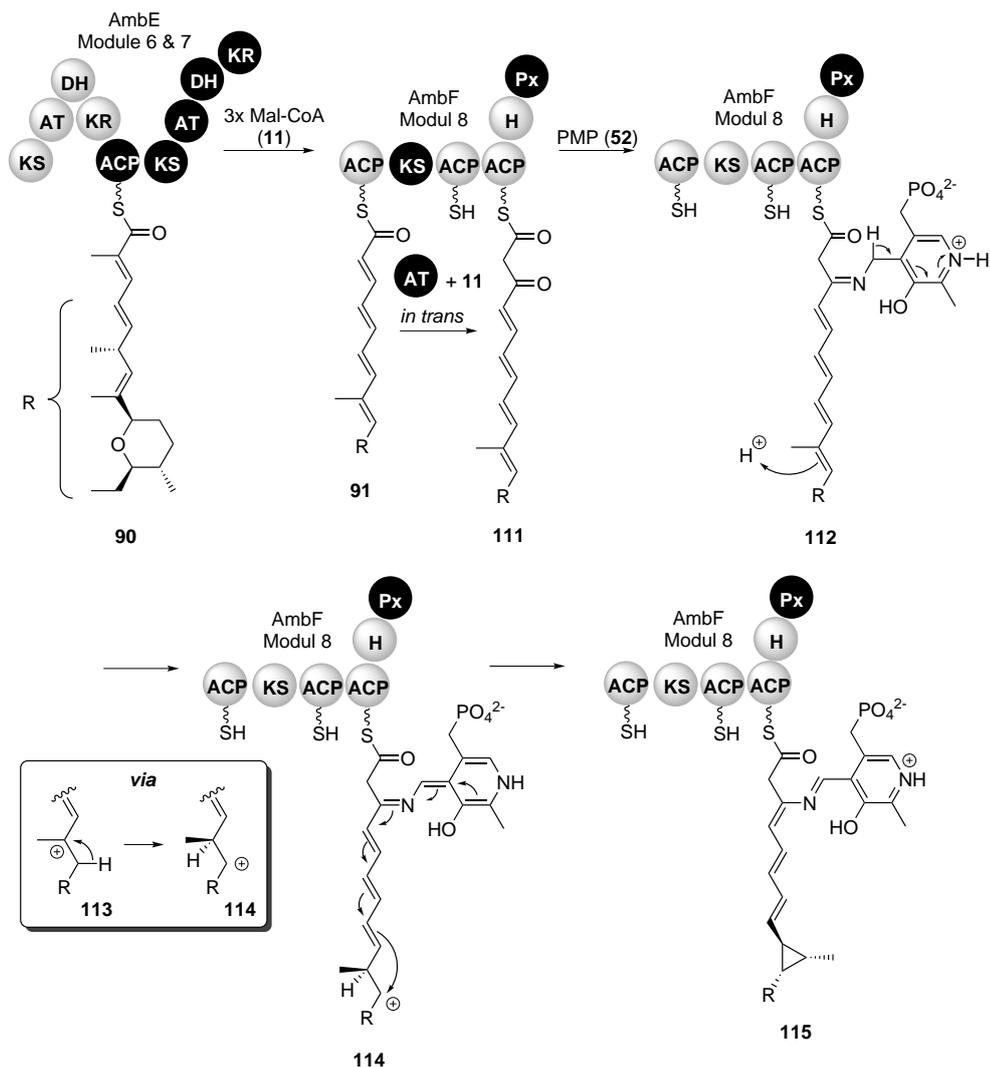
An **102** katalysiert eine ungewöhnliche ER-Domäne eine konjugate 1,4-Hydridaddition. Das resultierende Enolat reagiert durch  $\beta$ -*exo-tet*-Ringschluss unter Abspaltung von Chlorid zu **104** (Schema 13, A).<sup>[78]</sup>

In der Biosynthese von Jawsamycin (**110**) werden die Cyclopropane schrittweise über das Enzym Jaw5 eingeführt, welches homolog zu radikalischen SAM-Enzymen ist. Der Hypothese von HIRATSUKA *et al.* zufolge, wird durch homolytische C-H-Spaltung an der Methylgruppe von SAM und anschließenden Elektronentransfer vom Fe-S-Cluster ein SAM-Ylid (**107**) erzeugt.<sup>[79]</sup> In einer Kaskade aus konjugater 1,4-Addition und  $S_N2$ -Reaktion reagiert das erzeugte Enolat wiederum durch  $\beta$ -*exo-tet*-Ringschluss. Dabei wird S-Adenosylhomocystein (SAH) abgespalten (Schema 13, B).<sup>[78]</sup>



**Abbildung 11:** Markierungsstudien für Ambruticin VS3 (**74**) nach HÖFLE *et al.*<sup>[65]</sup>

Bei gemeinsamer Betrachtung der Zusammensetzung des Ambruticin-Genclusters (vgl. Abb. 10 in Kapitel 1.5), der 1,2,3-Dreifachsubstitution am Cyclopropan sowie der Markierungsstudien von HÖFLE *et al.* (Abb. 11) wird deutlich, dass beide Mechanismen für die DVC-Bildung im Ambruticin VS3 (**74**) nicht anwendbar sind.<sup>[65]</sup> Es ist z.B. keine HMG-Kassette für die Erzeugung einer  $\beta$ -Verzweigung oder ein Enzym, welches eine Abgangsgruppe für die  $S_N2$ -Reaktion einführt, im Ambruticin-Gencluster codiert. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Hypothese von JULIEN *et al.* (vgl. Schema 11) als Grundlage genommen und um die Annahme der Beteiligung des Pyridoxaminphosphat-Cofaktors erweitert.<sup>[11]</sup> Dabei geht die vorgestellte Hypothese ebenso vom  $\beta$ -Ketothioester **111** als Ausgangspunkt für die DVC-Bildung sowie Cyclopropanon **93** und der verzweigten Carbonsäure **94** als Biosynthese-Intermediate aus.



**Schema 14:** Hypothese für die Biosynthese der DVC-Einheit. Die agierenden Enzymdomänen sind schwarz hervorgehoben. Mal-CoA = Malonyl-Coenzym A (**11**), PMP = Pyridoxaminphosphat (**52**).

Das Modul 7 in AmbE verlängert das Polyketid-Rückgrad von **90** iterativ um drei Malonyl-CoA(**11**)-Einheiten und reduziert die  $\beta$ -Ketothioester durch die DH- und KR-Domänen jeweils zum Alken (Schema 14).

In Modul AmbF ist keine AT-Domäne enthalten. Das Malonyl-CoA (**11**) könnte von einer *trans*-AT-Domäne (vgl. Kapitel 1.1) oder einem unbekanntem Enzym bereitgestellt werden.<sup>[17]</sup> Anschließend wird eine der beiden ACP-Domänen mit einer Malonylgruppe versehen und der Acylrest von **91** darauf acyliert. Ob tatsächlich eine *trans*-AT-Domäne mit der KS-Domäne interagiert, könnte in weiterführenden phylogenetischen Studien durch AS-Sequenzvergleiche untersucht werden.<sup>[17]</sup>

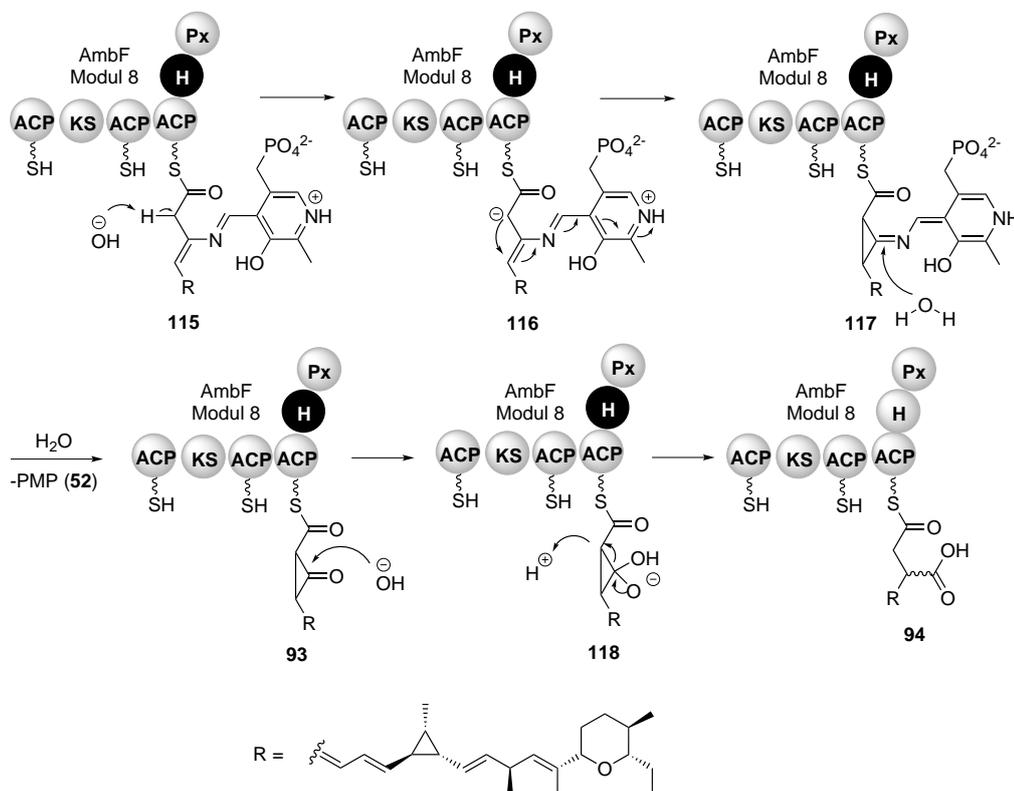
Der Ausgangspunkt für die DVC-Bildung ist der  $\beta$ -Ketothioester **111**. Die Px-Domäne weist laut JULIEN *et al.* ein PLP-Bindemotif auf und wurde von MILANO *et al.* als Aminotransferase der Klasse 3 der Aspartat-Aminotransferase-Superfamilie eingeordnet.<sup>[81]</sup> Weiterhin ist die Px-Domäne homolog zur AMT-Domäne der Zeamin (**64**)-Biosynthese, die eine Aminierung eines  $\beta$ -Ketothioesters katalysiert (vgl. Schema 8 in Kapitel 1.4).<sup>[62]</sup> Im Ambruticin VS3 (**74**) ist jedoch kein Amin im Mittelfragment enthalten. Gendeletionsstudien haben gezeigt, dass die Aminierung von Ambruticin VS3 (**74**) am C-5 durch AmbR katalysiert wird.<sup>[11]</sup> Das konservierte Lysin für die kovalente Bindung von PLP (**47**) ist in der Px-Domäne mutiert, was nahelegt, dass diese stattdessen PMP (**52**) verwendet (vgl. Kapitel 1.4).

Aus diesem Grund könnte die Px-Domäne die Bildung von PMP (**52**) aus PLP (**47**) und einer Aminosäure katalysieren, welches dann eine SCHIFFSche Base mit dem  $\beta$ -Ketothioester **111** ausbildet. Nach Überführung in die quinoide Form **114** wird durch Elektronenverschiebung die Cyclopropanbildung induziert (vgl. Schema 7 in Kapitel 1.4).

Die räumlich entfernte Cyclopropanbildung wird vermutlich in einer Enzyntasche begünstigt. Sie stellt formal eine *3-endo-trig*-Zyklisierung dar (Schema 14), welche nach den BALDWIN-Regeln benachteiligt ist.<sup>[82]</sup> Bereits JULIEN *et al.* deuteten jedoch eine Protonierung der Doppelbindung in **92** an (vgl. Schema 11 in Kapitel 1.5).<sup>[11]</sup> Durch Protonierung der Doppelbindung würde ein tertiäres Kation in **113** gebildet, welches durch eine 1,2-H-Umlagerung - in Analogie zu Terpenzyklen - in ein sekundäres Kation **114** überführt werden könnte (siehe Kasten in Schema 14).<sup>[83]</sup>

Somit finden Bindungsbildung und -bruch nicht mehr synchron statt und auch die Klassifizierung nach *endo* oder *exo* greift nicht mehr. Weiterhin wäre das C-Atom zwischen dem Kation und dem Ende des konjugierten Doppelbindungssystems  $sp^3$ -hybridisiert. Daher beträgt der Bindungswinkel ca.  $109^\circ$  statt  $120^\circ$  und die Bindung ist frei drehbar, sodass sich die p-Orbitale für die Bindungsbildung für eine

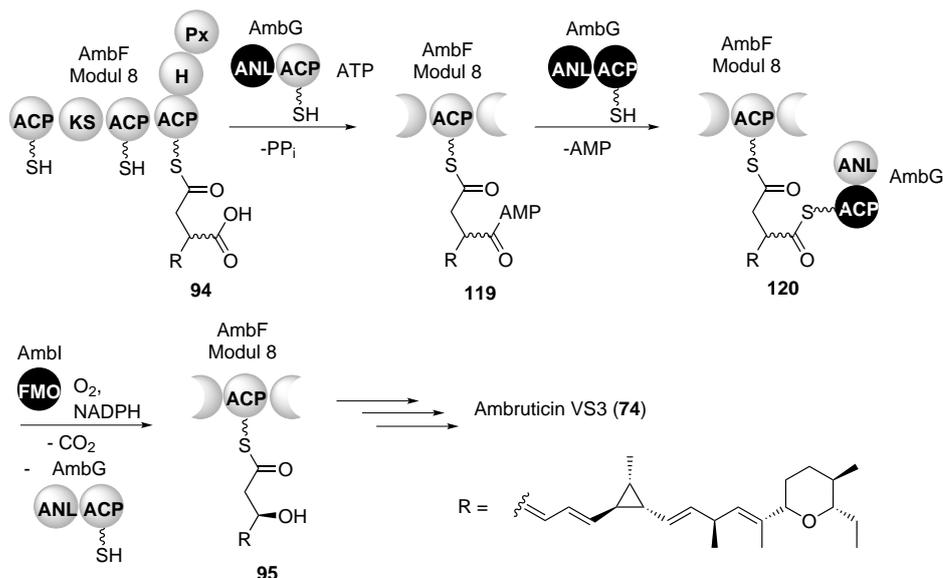
Überlappung näher kommen, als wenn das Zwischenatom ebenfalls  $sp^2$ -hybridisiert wäre. Die Positionen der Doppelbindungen in **115** nach der PMP(**52**)-induzierten Doppelbindungs-Isomerisierung entsprechen anschließend jenen im Ambruticin VS3 (**74**).



**Schema 15:** Darstellung einer durch die H-Domäne katalysierten FAVORSKII-ähnlichen Umlagerung zur verzweigten Thioestercarbonsäure **94**.

Anschließend wird von der Hydrolase(H)-Domäne eine FAVORSKII-ähnliche Reaktionssequenz katalysiert (Schema 15). Nach einer Deprotonierung in  $\alpha$ -Position des Thioesters **115** wird eine Cyclopropyl-Iminium-Spezies **117** erzeugt. Auch hier würde es sich allerdings um einen  $\beta$ -endo-trig-Ringschluss handeln, der nach BALDWIN nicht bevorzugt ist. Nach der spontanen Abhydrolyse von PMP (**47**) wird ein Cyclopropanon-Intermediat **93** erhalten, welches auch von JULIEN *et al.* postuliert wurde.<sup>[11]</sup> Das Cyclopropanon **93** wird regioselektiv zur verzweigten Thioestercarbonsäure **94** geöffnet (Schema 15).

### 3.1 Arbeitshypothese für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments



**Schema 16:** Oxidative Decarboxylierungsreaktion, die von den *Tailoring*-Enzymen AmbG und AmbI katalysiert werden könnte.

Die Thioestercarbonsäure **94** wird von der ANL-Domäne des *Tailoring*-Enzyms AmbG durch Adenylierung aktiviert und auf die eigene ACP-Domäne transferiert, sodass das quervernetzte Intermediat **120** resultiert (Schema 16, vgl. Schema 5 in Kapitel 1.3). Eine ähnliche quervernetzte Spezies ist bereits aus der Bildung von 4-substituierten  $\delta$ -Lactonen während der Rhizoxin-Biosynthese bekannt.<sup>[9,84]</sup>

Diese aktivierte Spezies **120** wird von der Flavin-abhängigen Monooxygenase AmbI oxidativ zum Alkohol **95** decarboxyliert. Anschließend wird **95** durch das Modul AmbH und Post-PKS-*Tailoring*-Enzyme bis zum Ambruticin VS3 (**74**) prozessiert (vgl. Kapitel 1.5). In der vorliegenden Arbeit wurden erste Studien mit den betreffenden Enzymen durchgeführt, um die vorgestellte Arbeitshypothese für die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments zu testen.

## 3.2 Studien zum PKS-Modul AmbF

### 3.2.1 Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung

Für die molekularbiologischen Arbeiten zur Erstellung von *ambF*-Expressionsvektoren für die heterologe Genexpression in *E. coli* wurde eine Strategie aus Genassemblierung in Hefe und anschließender Subklonierung mittels Gateway™-Verfahren nach PAHIRULZAMAN *et al.* verfolgt.<sup>[85]</sup> Anschließend wurde die Proteinproduktion in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen getestet und die Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie (Ni-AC) etabliert.

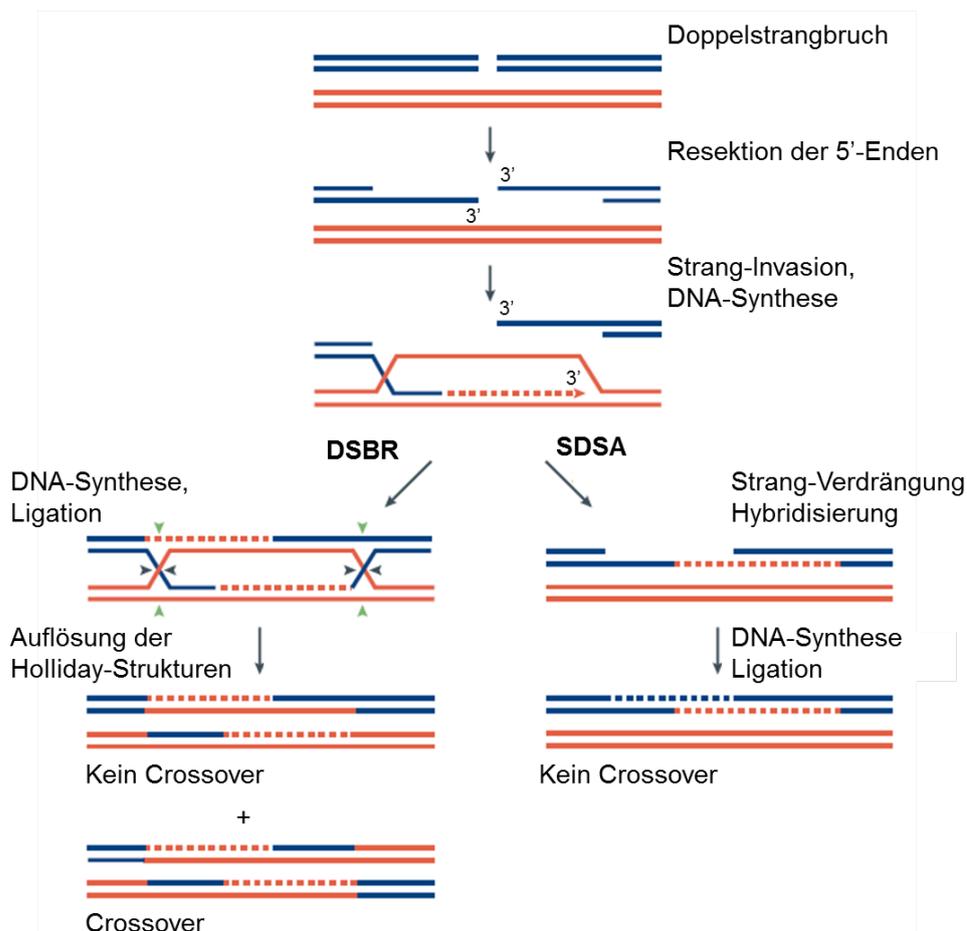
#### 3.2.1.1 Genassemblierung von *ambF* mithilfe von homologer Rekombination in Hefe

Der *Nobelpreis für Physiologie oder Medizin* wurde im Jahr 2007 an MARIO R. CAPECCHI, SIR MARTIN J. EVANS und OLIVER SMITHIES für ihre Beteiligung an der Entwicklung des *Gene-Targetings* verliehen. Dieses Verfahren ermöglicht die gezielte Veränderung einzelner Gene im Zielorganismus und beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination. Als solche wird die Übertragung von Nucleotiden zwischen zwei ähnlichen oder identischen DNA-Fragmenten bezeichnet. Während die grundlegenden Schritte über alle drei Domänen des Lebens hinweg (und in Viren) konserviert sind, unterscheiden sich die agierenden Enzyme stark in verschiedenen Organismen und Zelltypen.

Die homologe Rekombination stellt eine der Möglichkeiten dar, DNA neu zu kombinieren bzw. DNA-Fragmente „nahtlos“ zusammenzufügen. Kürzere DNA-Fragmente werden in der Regel mithilfe von *in vitro*-Methoden verbunden, zu welchen unter anderem die GIBSON-DNA-Assemblierung, SLIC (*Sequence and Ligase Independent Cloning*), CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*), SLiCE (*Seamless Ligation Cloning Extract*), OGAB (*Ordered Gene Assembly in Bacillus subtilis*) und LCR (*Ligase Cycling Reaction*) gehören.<sup>[86]</sup> Die am häufigsten für die *in vivo*-DNA-Assemblierung verwendeten Modellorganismen sind *E. coli*, *B. subtilis* sowie

*S. cerevisiae*. Besonders *S. cerevisiae* weist eine hohe Rekombinationsrate auf und wird zusätzlich für die chromosomale Integration von Fremd-DNA für die heterologe Genexpression verwendet.<sup>[87]</sup>

Gemeinsam mit der DNA-Synthese stellt die DNA-Assemblierung eine der Schlüsseltechnologien für die synthetische Biologie dar, um künstliche biologische Systeme zu erzeugen. Das 582 kbp-große *Mycoplasma genitalium*-Chromosom wurde 2008 vom Team des *J. Craig Venter Institute* als erstes bakterielles Genom in *S. cerevisiae* assembliert.<sup>[88]</sup> Im Jahr 2010 folgte das 1.08 Mbp große, synthetische *Mycoplasma mycoides*-Genom, welches nach Transplantation in eine entkernte *M. capricolum*-Wirtszelle die erste funktionale „Synthetische Zelle“ darstellte.<sup>[89]</sup>

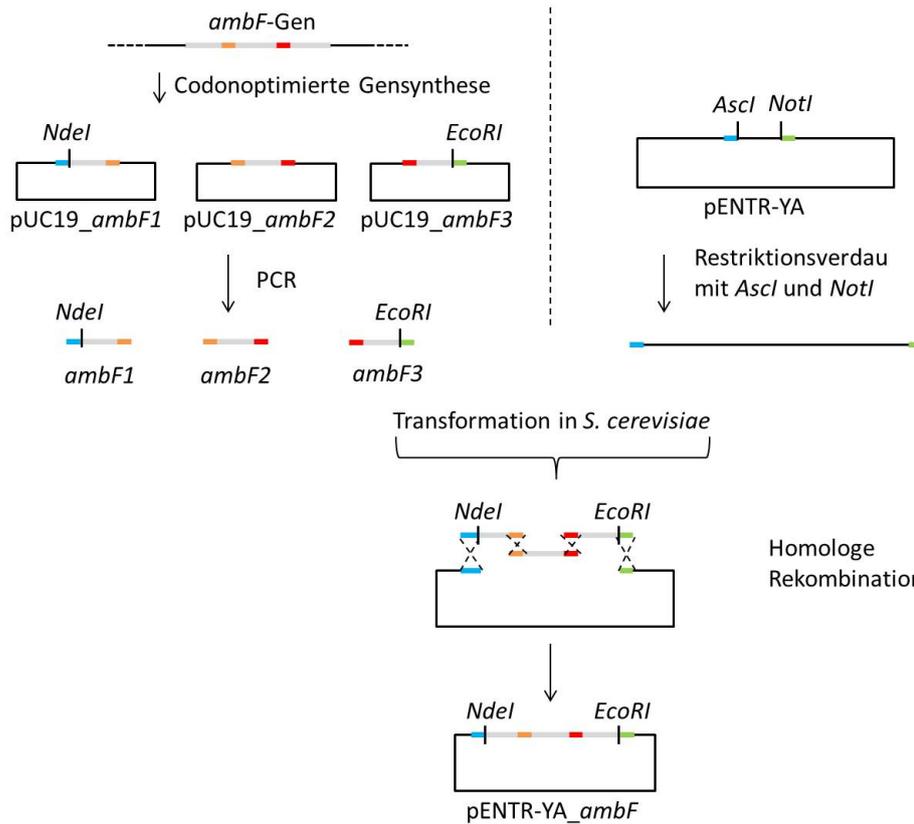


**Abbildung 12:** Übersicht der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination nach dem Doppelstrangbruch-Reparatursystem (DSBR) oder dem Synthese-abhängigen Strang-Hybridisierungs-Modell (SDSA). Verändert nach SUNG *et al.*<sup>[90]</sup>

Die *in vivo*-Genassemblierung beruht auf den Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche, welche unter anderem durch das Doppelstrangbruch-Reparatursystem (engl. *Double-Strand Break Repair*, DSBR) und das Synthese-abhängige Strang-Hybridisierungs-Modell (engl. *Synthesis-Dependent Strand Annealing*, SDSA) beschrieben werden können (Abb. 12). Zunächst werden ausgehend vom Doppelstrangbruch die 5'-Enden abgebaut und somit einzelsträngige 3'-Enden generiert (Resektion). Hybridisieren diese an eine homologe DNA-Sequenz, wird vom 3'-Ende aus die DNA-Synthese initiiert.

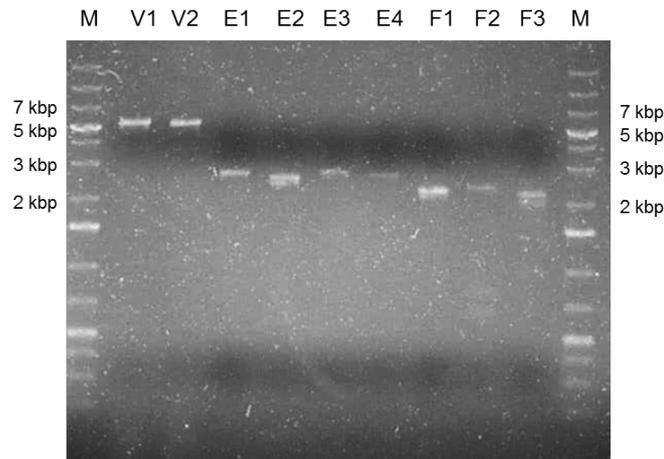
Anschließend wird nach dem DSBR-Modell auch vom anderen 3'-Ende ausgehend DNA synthetisiert und die DNA-Rückgrate werden ligiert. Es bilden sich zwei HOLLIDAY-Strukturen aus, die entweder ohne (an den schwarzen Pfeilen) oder mit *Crossover* (an je einem schwarzen und grünen Pfeil) zu den verbundenen DNA-Fragmenten aufgelöst werden (Abb. 12). Laut dem SDSA-Modell wird der intakte homologe Strang durch Rehybridisierung verdrängt und die DNA-Fragmente mittels DNA-Synthese und Ligation verbunden.<sup>[90]</sup>

Das Ziel war es, die Gene *ambF* und *ambE* aus dem Myxobakterium *So ce10* heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Der genetische Code ist zwar für alle Organismen universal, jedoch ist er auch degeneriert. Das bedeutet, dass durch drei Nukleotide pro Codon mit je vier möglichen Nukleobasen 64 Kombinationen verfügbar sind, um nur 20 kanonische Aminosäuren (AS) zu codieren. Folglich wird eine AS durch mehrere Codons repräsentiert, deren Nutzung speziesabhängig ist und sich je nach evolutionärem Verwandtschaftsgrad zweier Organismen unterscheidet. Zudem spiegelt sich der Codongebrauch in der Konzentration betreffender tRNAs in der Zelle wider, sodass selten verwendete Codons die effektive Translation bremsen oder sogar abbrechen.<sup>[91]</sup> Daher wurde mithilfe der Software der Gensynthese-Firma *Gen9* eine computergestützte Codonoptimierung vorgenommen und anschließend synthetische Genfragmente von *ambF* und *ambE* in pUC19-Vektoren bezogen. Die Länge der zu synthetisierenden DNA-Fragmente wurde dabei aus technischen Gründen auf 3 kbp begrenzt.



**Abbildung 13:** Arbeitsschema für die Genassemblierung in Hefe am Beispiel des *ambF*-Gens.

Das *ambF*-Gen wurde dementsprechend in drei DNA-Fragmente *ambF1*–*ambF3* und das *ambE*-Gen in vier DNA-Fragmente *ambE1*–*ambE4* aufgeteilt (Abb. 13). Dabei wiesen benachbarte Fragmente jeweils 40 identische Basenpaare auf, welche für die effektive homologe Rekombination in Hefe mindestens vorhanden sein müssen.<sup>[92]</sup> Der 5'-Bereich des ersten DNA-Fragments (blau dargestellt) sowie der 3'-Bereich des letzten DNA-Fragments (grün dargestellt) sind zudem identisch zum pENTR-YA-Vektor nach dessen Linearisierung mit den Restriktionsendonukleasen *AscI* und *NotI*. Um eine spätere klassische Subklonierung in Expressionsvektoren zu ermöglichen, wurden zudem im späteren 5'-Bereich der Gene die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NdeI* und im 3'-Bereich für *EcoRI* eingeführt.



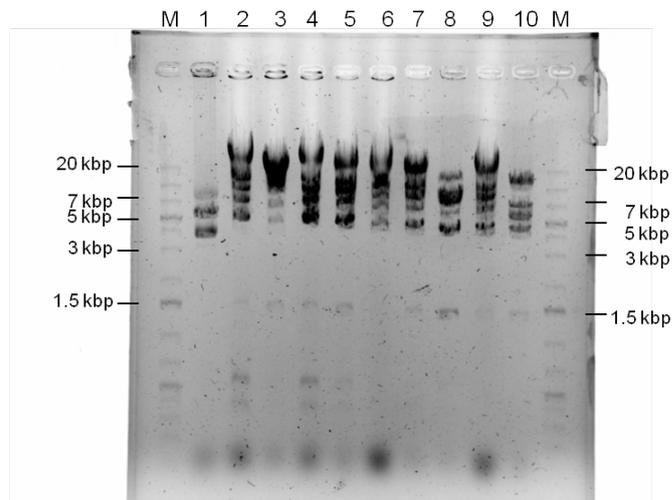
**Abbildung 14:** Übersicht der DNA-Fragmente für die Genassemblierung von *ambE* und *ambF* in Hefe. **M** = 5  $\mu$ L *GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder*, *Thermo Scientific*; **V1** / **V2** = Restriktionsverdau von pENTR-YA mit *NotI* und *AscI*, 5 440 bp, **E1** = 2 643 bp, **E2** = 2 533 bp, **E3** = 2 735 bp, **E4** = 2 641 bp, **F1** = 2 221 bp, **F2** = 2 266 bp, **F3** = 2 142 bp, 1% [w/v] Agarose.

Zunächst wurden die Genfragmente *ambF1–ambF3* sowie *ambE1–ambE4* mittels PCR vervielfacht (Tab. 20) und über ein Agarosegel gereinigt (Abb. 14, E1–E4, F1–F3). Parallel dazu wurde der pENTR-YA-Vektor mit den Restriktionendonukleasen *NotI* und *AscI* linearisiert und der vollständige Umsatz im Agarosegel überprüft (Abb. 14, V1 und V2). Anschließend wurden alle gereinigten DNA-Fragmente äquimolar in chemisch kompetente *S. cerevisiae* CEN.PK2 transformiert und durch homologe Rekombination *in vivo* assembliert (vgl. Abb. 12). Dafür wurde im Vorfeld die Lithiumacetat-PEG-Methode nach GIETZ *et al.* hinsichtlich der eingesetzten *Carrier*-DNA-Konzentration sowie Hitzeschockdauer optimiert.<sup>[93]</sup>

Die resultierenden pENTR-YA-Vektorkonstrukte beinhalteten die assemblierten Gene sowie als Selektionsmarker das Gen *ura3*, welches für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase codiert. Diese ist essentiell für die *de novo*-Biosynthese von Pyrimidinnukleotiden und komplementiert den Hefestamm CEN.PK2, der wegen einer Transposon-Insertion (*ura3–52*) auxotroph für Uracil ist.<sup>[94]</sup> Aus diesem Grund erfolgte die Selektion über den Uracil-freien Nährboden SM Dropout Ura-Agar (Tab. 14).

Der pENTR-YA-Vektor liegt als Hefe-*E. coli*-Shuttle-Klonierungsvektor in beiden Organismen stabil vor. Das bedeutet, dass er zusätzlich zum Hefe-Episom und dem *ura3*-Selektionsmarker den *E. coli* pUC-ori und die  $\beta$ -Lactamase für eine Kanamycin-Resistenz codiert. Zur Generierung einer größeren Vektor-Kopienzahl wurde die DNA aus den Hefezellen isoliert und chemisch kompetente *E. coli* TOP10 mittels Hitzeschock-Methode transformiert.

Dabei wurden ausschließlich für *ambF* und nur mittels Plasmid-Isolation aus der Hefe mit dem *Zymoprep<sup>TM</sup> Yeast Plasmid Miniprep II-Kit* (*Zymo Research*) Klonen erhalten. Das Kit enthielt das Enzym Zymolyase, welches die Zellwände aufschließt sowie Zentrifugationsröhrchen mit Kieselgel für die Adsorption und anschließende Elution von DNA. Weitere Methoden, die im ersten Schritt die mechanische Homogenisierung mithilfe von Glasperlen und anschließende alkoholische Fällung der DNA nutzten (nach FANGMAN oder HAHN), waren nicht erfolgreich.



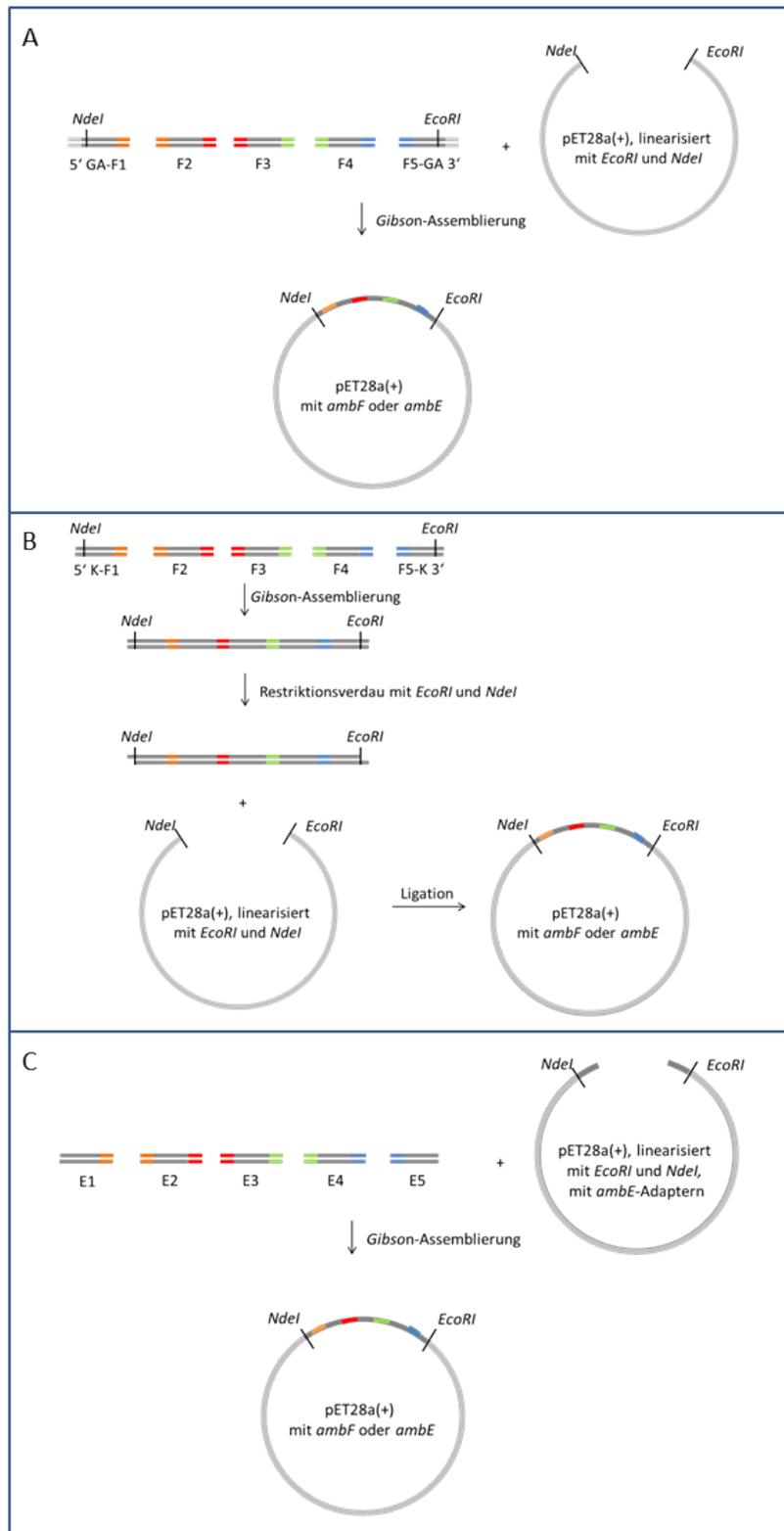
**Abbildung 15:** Testrestriktion von pENTR-YA\_*ambF* mit *EcoRI* und *NdeI* für die Klone 1–10. Für ein positives Konstrukt wurden DNA-Fragmente bei 1365 bp und 6597 bp erwartet. M = 3  $\mu$ L *GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb DNA Plus Ladder*, *Thermo Scientific*; 0.7% [w/v] Agarose.

Nach einer Testrestriktion von pENTR-YA\_*ambF*-Klonen mit *NdeI* und *EcoRI* wurde das Schnittmuster im Agarosegel analysiert. Im Anschluss wurde die Fehlerfreiheit eines positiv getesteten Konstrukts mittels DNA-Sequenzierung mehrerer überlappender Teilstücke bestätigt (Abb. 15, Spur 7).

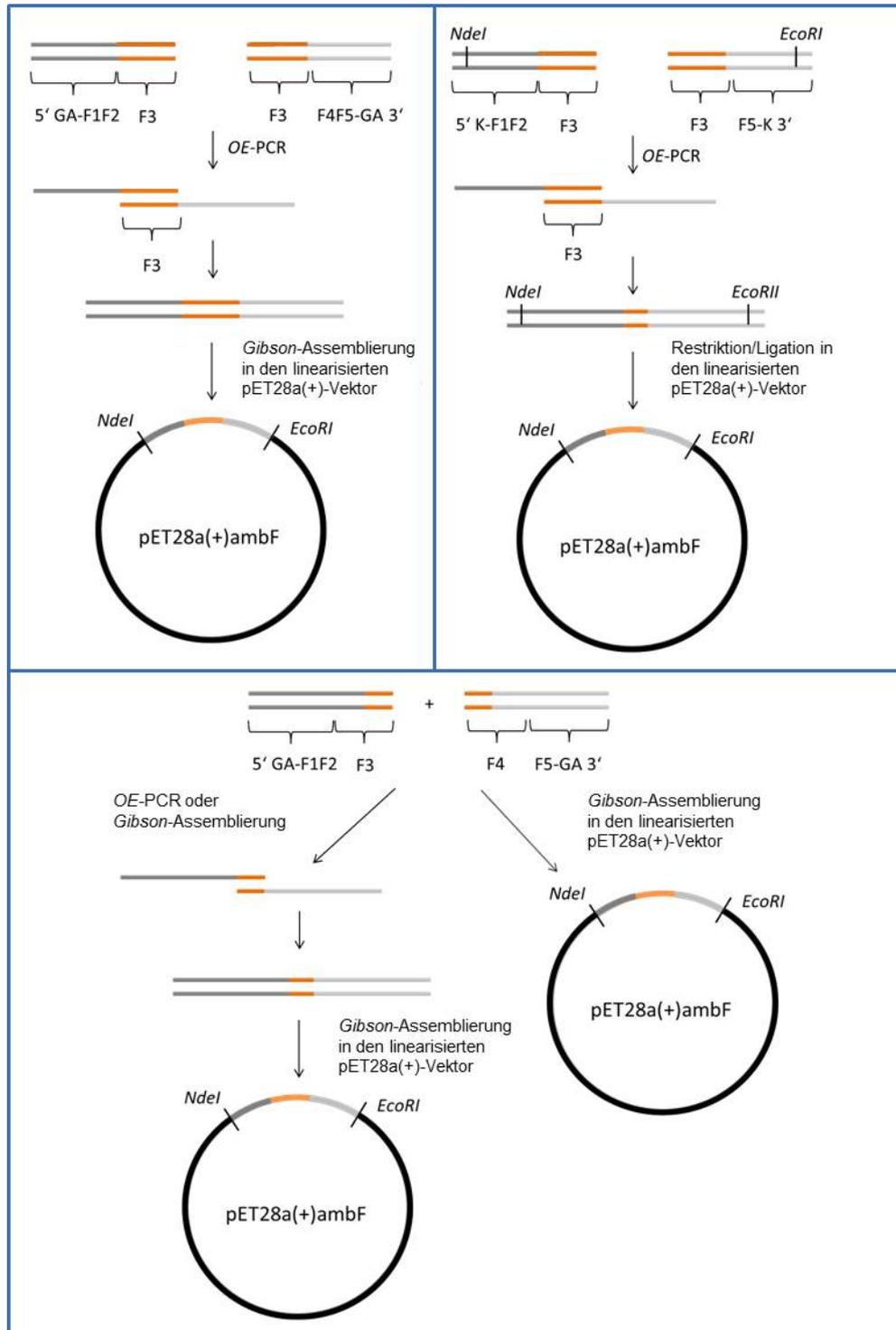
Für die erfolgreiche Assemblierung von *ambE* könnten zum Beispiel die identischen DNA-Überhänge auf 60 bp verlängert sowie die Vektor-essentiellen Sequenzen von Hefe-Episom und Selektionsmarker durch die Aufteilung auf mehrere DNA-Fragmente unterbrochen werden. Mit dieser Methode gelang es KUIJPERS *et al.*, ein 21 kb-großes Plasmid aus 9 DNA-Fragmenten mit einer Fehlerrate von <5% zu erstellen.<sup>[95]</sup>

#### 3.2.1.2 Alternative Strategien zur Genassemblierung von *ambF*

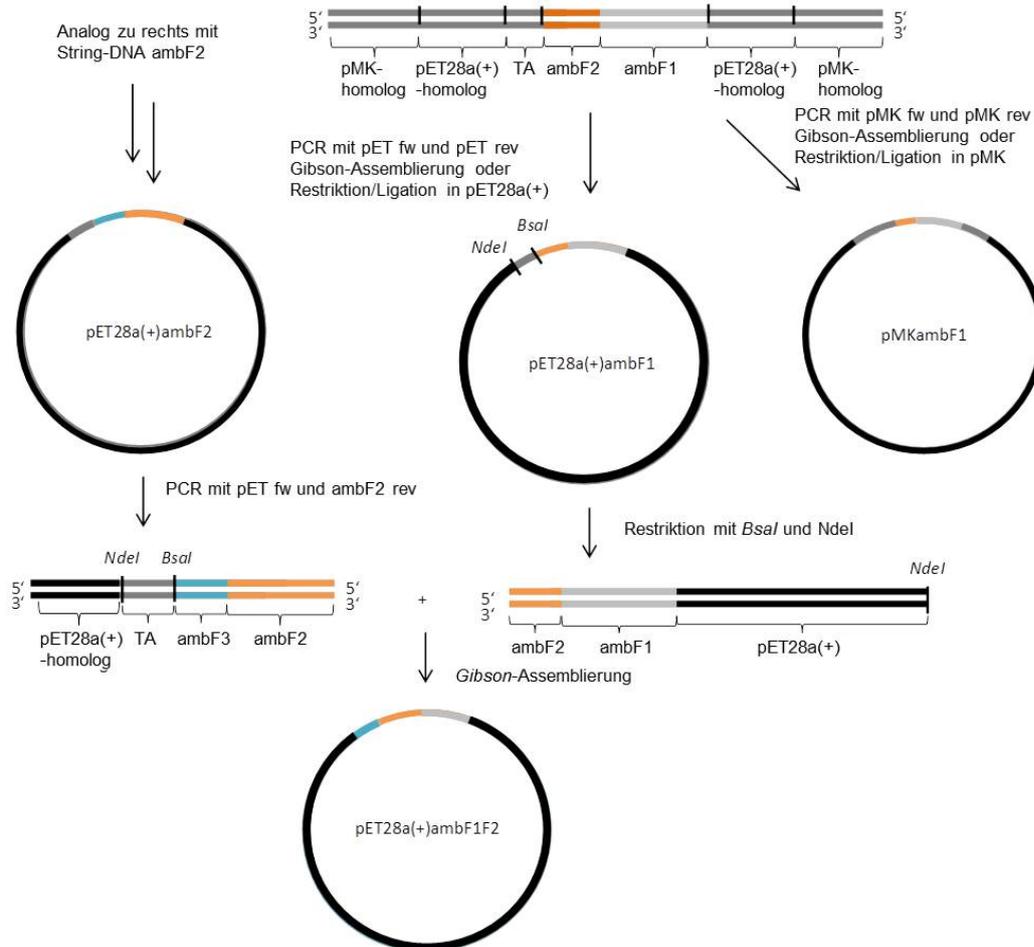
Bevor das *ambF*-Gen erfolgreich mittels homologer Rekombination in Hefe assembliert wurde (vgl. Kapitel 3.2.1.1), sind verschiedene andere Methoden getestet worden. Zu diesen nicht erfolgreichen Strategien zählen die GIBSON-Genassemblierung (GA)<sup>[96]</sup> (Abb. 16), *Overlap-Extension*(*OE*)-PCR (Abb. 17), ein direkter PCR-Ansatz mit genomischer Myxobakterien-DNA, eine *string*-DNA-basierte sequenzielle Assemblierung von ca. 1 kbp synthetischen DNA-Fragmenten (Abb. 18) sowie Kombinationen aus den genannten Methoden.



**Abbildung 16:** Klonierung von *ambF* oder *ambE* in den pET28a(+)-Vektor durch GA<sup>[96]</sup> und Restriktion/Ligation. A) Vektor-homologe Sequenzen an F1 + F5; GA von 6 Genfragmenten. B) *NdeI*- bzw. *EcoRI*-Erkennungssequenzen an F1 + F5; GA von F1–F5; Hydrolyse mit *NdeI*/*EcoRI*; T4-Ligation. C) wie A) mit zu E1 und E5 homologen Sequenzen im Vektor.



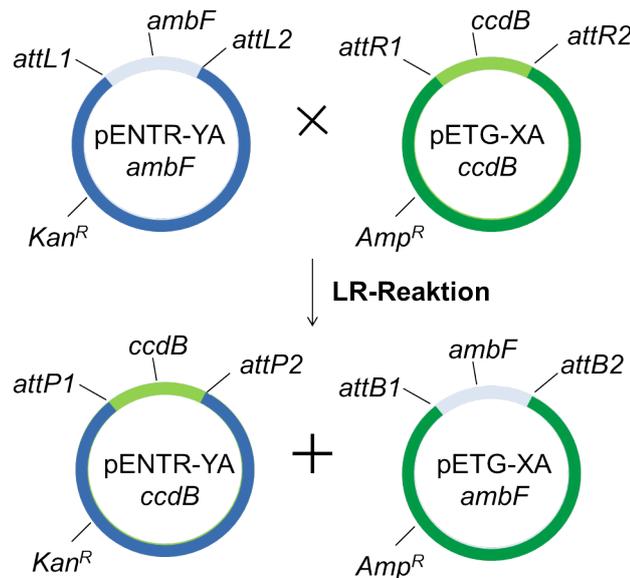
**Abbildung 17:** Drei Strategien für die Klonierung von *ambF* oder *ambE* in den pET28a(+)-Vektor mithilfe von GIBSON-Assemblierung,<sup>[96]</sup> OE-PCR und Restriktion/Ligation



**Abbildung 18:** Sequenzielle Assemblierung kurzer DNA-strings mithilfe von GA<sup>[96]</sup> und Restriktion/Ligation mit der Restriktionsendonuklease *BsaI*. Zunächst wird die String-DNA *ambF1* und *ambF2* zur Sicherung jeweils mittels PCR mit pMK fw und pMK rev amplifiziert und mithilfe von GA oder Restriktion/Ligation in den pMK-Vektor eingebracht. Es resultieren pMKambF1 und pMKambF2. Analog dazu werden die Vektoren pET28a(+)-ambF1 und pET28a(+)-ambF2 erstellt. Der Vektor pET28a(+)-ambF1 wird mit *BsaI* und *NdeI* linearisiert. Aus diesem Grund wurde zwischen der *BsaI*- und der *NdeI*-Schnittstelle eine 9 bp-lange TA-reiche Sequenz („TA“) als Platzhalter eingefügt. Die String-DNA aus dem Vektor pET28a(+)-ambF2 wird in einer PCR mit pET fw und *ambF2* rev amplifiziert. Das resultierende Fragment mit *ambF1* weist einen 40 bp-langen homologen Bereich im zu verknüpfenden Gen (orange) und das Fragment mit *ambF2* einen 40 bp-langen homologen Bereich zu pET28a(+) (schwarz) auf, sodass beide Fragmente in einer Gibson-Assemblierung miteinander zu pET28a(+)-ambF1F2 verbunden werden können. Anschließend werden analog dazu weitere String-DNA-Fragmente hinzugefügt, bis das gesamte Gen *ambF* aufgebaut ist.

### 3.2.1.3 Gateway™-Klonierung des *ambF*-Gens in verschiedene Expressionsvektoren

Mithilfe des Gateway™-Verfahrens (*Life Technologies*) wurde das *ambF*-Gen in fünf verschiedene Gateway™-Zielvektoren für die spätere heterologe Genexpression in *E. coli* integriert.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Gateway™-Klonierung. X = 10, 20, 30, 40 und 60 (siehe Tab. 2). Verändert nach KATZEN.<sup>[97]</sup>

Das Gateway™-Verfahren dient der DNA-Klonierung mittels sequenzspezifischer *in vitro*-Rekombination (vgl. Abb. 12 in Kapitel 3.2.1.1).<sup>[98]</sup> Es beruht auf der Rekombinationsmaschinerie des lysogenen  $\lambda$ -Bakteriophagen, der seine DNA in das *E. coli*-Genom sowohl integrieren als auch ausschneiden kann.<sup>[99]</sup>

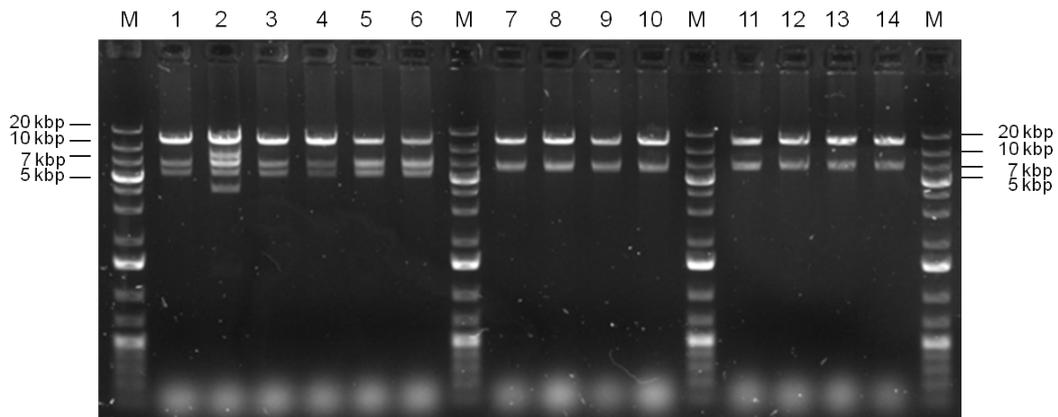
Das *ccdB*-Gen und *ambF* im pENTR-YA-Vektor wurden von *att*-Rekombinationsstellen (*engl. attachment*, Anlagerung) flankiert (Abb. 19). Der pENTR-YA-*ambF*-Vektor, ein Gateway™-Zielvektor pETG-XA (Tab. 2) und die LR-Clonase™-Mischung (bestehend aus den Rekombinationsenzymen Int, IHF und Xis) wurden *in vitro* vermischt.

Anschließend fand ein gerichteter Sequenzaustausch von *ambF* und *ccdB* durch die Rekombination an *attL* x *attR* statt (LR-Reaktion). Somit wurde *ambF* in den Gateway™-Zielvektor und als Nebenprodukt *ccdB* in den pENTR-YA-Vektor eingefügt.

Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10 mit der LR-Reaktionsmischung transformiert. Die Selektion auf positive Konstrukte erfolgte durch einen Wechsel der Antibiotikaresistenzgene von *Kan<sup>R</sup>* im pENTR-YA\_*ambF*-Vektor auf *Amp<sup>R</sup>* im jeweiligen pETG-XA\_*ambF*-Vektor sowie die Toxizität des *ccdB*-Genprodukts in den Vektoren pETG-XA\_*ccdB* und pENTR-YA\_*ccdB*.

Das CcdB-Protein initiiert durch Gyrase-vermittelte Doppelstrangbrüche (ähnlich wie Quinolon-Antibiotika) den SOS-Signalweg und führt somit zum apoptotischen Zelltod.<sup>[100,101]</sup> Es wird durch die Bindung an das CcdA-Protein effektiv detoxifiziert. Dieses proteinogene Toxin-Antidot-System entstammt dem F-Plasmid aus *E. coli*, wo es durch die Kurzlebigkeit des CcdA-Proteins (dieses wird durch die Lon-Protease abgebaut) und die Stabilität des CcdB-Toxins F<sup>-</sup>-Tochterzellen abtötet.<sup>[102]</sup> Aus diesem Grund wurden die Gateway™-Zielvektoren mit *ccdB*-Gen durch Plasmidisolierung aus einem *ccdB-survival*-Stamm bereitgestellt, in dem die Gyrase aufgrund einer Genmutation (*gyrA462*) nicht vom CcdB-Protein inhibiert wird (Tab. 10 in Kapitel 5.1).

Theoretisch können mit dieser Methode nur nach einer erfolgreichen Rekombination Bakterienkolonien erhalten werden und falsch-positive Resultate sind nicht möglich. Diese Stringenz erleichtert den Arbeitsfluss, da weniger Bakterienkolonien getestet werden müssen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass aus einem *Entry*-Vektor (hier der Vektor pENTR-YA\_*ambF*) eine Vielzahl an Ziel-Vektoren generiert werden kann, ohne dass zuvor eine erneute gentechnische Manipulation erfolgen muss.<sup>[97]</sup>



**Abbildung 20:** Testrestriktion nach der Gateway™-Klonierung mit *NdeI* und *EcoRI*. Für positive Konstrukte wurde jeweils ein DNA-Fragment bei 6 597 bp für *ambF* erwartet. **M** = 3  $\mu$ L *GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder*, **1–4** = pETG10A\_ambF K1–K4; **5–6** = pETG20A\_ambF K1 und K2; **7–10** = pETG30A\_ambF K1–K4; **11** = pETG40A\_ambF; **12–14** = pETG60A\_ambF K1–K3; 0.7% [w/v] Agarose.

Für verschiedene Klone aller fünf Gateway™-Konstrukte wurde mittels Testrestriktion gezeigt, dass sie das *ambF*-Gen enthalten (Abb. 20). Anschließend wurde die Identität der Sequenzen mithilfe der DNA-Sequenzierung verifiziert.

**Tabelle 2:** Erzeugte Gateway™-Vektoren für die Genexpression von *ambF* und deren am 5'-Ende angefügte Tags, welche in N-terminalen Fusionsproteinen resultieren.

Vektor	Tags (Größe)
pETG10A_ambF	His <sub>6</sub> (1 kDa)
pETG20A_ambF	His <sub>6</sub> (1 kDa), Trx (12 kDa)
pETG30A_ambF	His <sub>6</sub> (1 kDa), GST (26 kDa)
pETG40A_ambF	MBP (40 kDa)
pETG60A_ambF	His <sub>6</sub> (1 kDa), NusA (54 kDa)

Im Allgemeinen muss ein Expressionsvektor für die erfolgreiche Überproduktion rekombinanter Proteine einen induzierbaren, starken Promotor, einen Replikationsursprung (*engl. origin of replication, ori*), eine ribosomale Bindestelle für die Translation sowie einen Selektionsmarker aufweisen.<sup>[91]</sup> Die Gateway™-Expressionsvek-

toren (Tab. 2) besitzen jeweils den pMB1-ori (15–60 Plasmidkopien/Zelle), das Ampicillin-Resistenzgen *Amp<sup>R</sup>* für eine  $\beta$ -Lactamase sowie den Promotor des T7-Bakteriophagen.

Der T7-Promotor bewirkt eine nur sehr geringe Basaltranskription des regulierten Gens, welches nach Induktion jedoch so stark überexprimiert wird, dass rekombinante Proteine bis zu 50% des Gesamtproteingehalts ausmachen können.<sup>[103]</sup>

Die T7-Terminatorsequenz ermöglicht durch Bildung einer Haarnadelstruktur den Transkriptions-Abbruch nach dem insertierten Gen. Der T7-Promotor wird durch die Bindung der T7-RNA-Polymerase induziert, deren Expression in bakteriellen DE3-Expressionsstämmen wiederum genom basiert unter der Regulation des *lacUV5*-Promotors steht. DE3 stammt aus dem lysogenen  $\lambda$ -Prophagen.<sup>[104]</sup> Die Induktion von *lac*-Promotoren erfolgt durch die Abwesenheit von Glucose und die Präsenz von Lactose oder Allolactose. In der Regel wurde in dieser Arbeit das nicht-verstoffwechselbare Lactose-Analogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet.

Die Gateway<sup>™</sup>-Expressionsvektoren stellen darüber hinaus jeweils unterschiedliche Löslichkeits- oder Affinitäts-Fusionsproteine (Tags) für eine spätere chromatographische Reinigung zur Verfügung (Tab. 2). Der Hexahistidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag) wird für die Affinitätschromatographie (AC) an immobilisierten zweiwertigen Übergangsmetallionen (Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup>) genutzt.<sup>[105]</sup> Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Tag die katalytische Proteinaktivität beeinflusst. Die Auswirkung des relativ kurzen, geladenen His<sub>6</sub>-Tags ist jedoch für gewöhnlich eher gering.<sup>[91]</sup> Problematisch ist hingegen die nicht-orthogonale Natur der Interaktion, sodass auch andere Histidin-reiche Proteine bei der AC mit angereichert werden können.

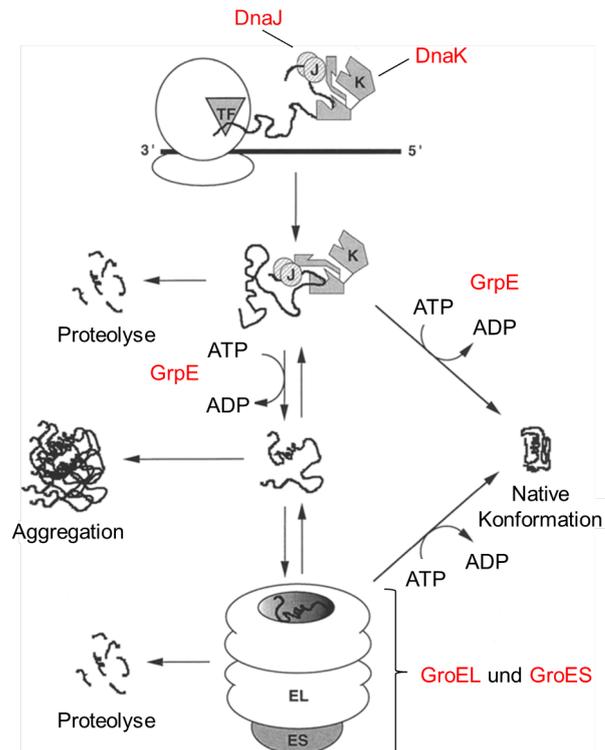
Ein Nachteil bei der heterologen Überexpression ist häufig, dass sich falsch gefaltete, unlösliche und darüber hinaus nicht-funktionale Proteinaggregate (*engl. inclusion bodies*) bilden.<sup>[106]</sup> Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass in der Wirtszelle pH-Wert, Osmolarität, Redoxpotential, Cofaktoren und Faltungsmaschinerie

vom Spender-Organismus abweichen. Zudem ist die intrazelluläre Proteinkonzentration durch die Überexpression stark erhöht, sodass hydrophobe Proteinbereiche, bevor sie korrekt gefaltet werden, miteinander interagieren.<sup>[107]</sup> Die Löslichkeit des Fusionsproteins kann durch hydrophile Löslichkeits-Tags erhöht werden.<sup>[108]</sup> Dazu zählen unter anderem der Thiothionin(Trx)-Tag sowie der *N-utilization substance protein A*(NusA)-Tag aus *E. coli*.<sup>[109,110]</sup> Der Glutathion-*S*-Transferase(GST)- sowie der *Maltose Binding Protein* (MBP)-Tag sind ebenfalls Löslichkeits-Tags, können darüber hinaus in Immuno- oder Enzymassays detektiert werden und ermöglichen die AC-Reinigung an Glutathion-Agarose bzw. an einer quervernetzten Amylose-Matrix.<sup>[111,112]</sup> Der GST-Tag verbessert außerdem die Stabilität gegenüber intrazellulären Proteasen.<sup>[113]</sup>

#### 3.2.1.4 Heterologe Produktion und Reinigung von AmbF-Fusionsproteinen

Die Proteinproduktion des PKS-Moduls AmbF wurde ausgehend von verschiedenen Gateway<sup>™</sup>-Expressionsvektoren (Tab. 2) mit den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) und Rosetta<sup>™</sup> 2 (DE3) pLysS getestet.

BL21 (DE3) wird häufig für die Produktion bakterieller Proteine genutzt, weil die zugehörigen Gene für die bakteriellen Proteasen OmpT und Lon deletiert sind (Tab. 10 in Kapitel 5.1).<sup>[91]</sup> Weiterhin ist der Bakterienstamm aufgrund seiner  $\lambda$ DE3-Modifikation für die Verwendung von Expressionsvektoren mit T7-Promotoren geeignet (vgl. Kapitel 3.2.1.3). Rosetta ist ein BL21 (DE3)-Derivat, welches zusätzlich das kombinierte pLysSRARE2-Plasmid enthält.<sup>[91]</sup> Auf diesem ist im pLysS-Sequenzabschnitt das T7-Lysozym codiert, welches die T7-RNA-Polymerase unter nicht-induktiven Bedingungen inhibiert.<sup>[114]</sup> Zum Anderen werden vom Sequenzabschnitt SRARE2 tRNA-Gene codiert, die in *E. coli* selten verwendete Codons (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA) repräsentieren (vgl. Erläuterungen zum Codongebrauch in Kapitel 3.2.1.1). Daher ist Rosetta unter anderem auch für die Produktion eukaryotischer Proteine geeignet.<sup>[91]</sup>



**Abbildung 21:** Zusammenspiel der Chaperone DnaJ, DnaK, GrpE, GroEL, GroES und dem Ribosom-assoziierten *Trigger Factor* (TF) nach THOMAS *et al.*<sup>[106]</sup>

Außerdem wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Plasmid-basierten Chaperon-Set pG-KJE8 (*Takara*) getestet. Darauf sind die Gene für fünf *E. coli*-Chaperone *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* sowie *groES* und *groEL* codiert, deren Expression über L-Arabinose bzw. Tetrazyklin induziert wird. Chaperone sind Faltungshelfer für Proteine, die cotranslational (DnaJ und DnaK) oder posttranslational (GrpE und GroEL/GroES) agieren können (Abb. 21). Sie verhindern die Aggregation und den Abbau der Proteine und können somit bei Coexpression zu einer höheren Ausbeute an löslichen rekombinanten Proteinen führen (vgl. Erläuterungen zur Ursache fehlgefalteter Fusionsproteine in Kapitel 3.2.1.3).<sup>[106,115]</sup>

Der allgemeinen Vorschrift für die heterologe Proteinproduktion folgend, wurden *E. coli*-Produktionskulturen mit den verschiedenen Expressionsvektoren bis  $OD_{600} = 0.6-0.8$  geschüttelt. Anschließend wurde die Genexpression mit 0.1–1 mM IPTG induziert und die Proteine 1–4 h bei  $\geq 30$  °C oder 18 h bei 20–28 °C produziert (Tab. 3). Die Zellen wurden sedimentiert und in 10 mL Lysepuffer je Gramm

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Biomasse (Tab. 15 in Kapitel 5.1) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden Zellysate und Sediment (im Folgenden als „Lysat“ und „Pellet“ bezeichnet) mithilfe der SDS-PAGE auf produzierte Fusionsproteine hin analysiert. Alternativ wurden Proben in SDS-Probenpuffer aufgekocht und als Mischfraktion untersucht.

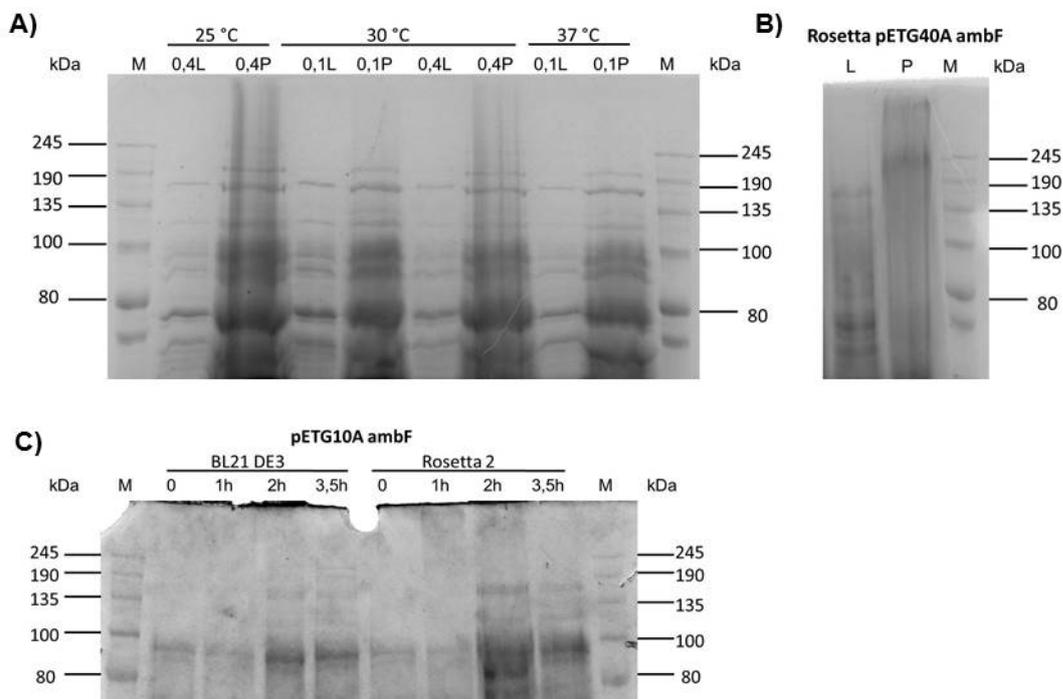
**Tabelle 3:** Expressionsstudien zu Modul AmbF. **B** = *E. coli* BL21 (DE3), **R** = *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS, **T** = *E. coli* BL21 DE3 pG-KJE8, **B/R** = identische Beobachtungen mit B- und R-Stämmen, **R/T** = identische Beobachtungen mit R- und T-Stämmen, **P** = Pellet, **I** = IPTG-Konzentration in mM. Die im SDS-Gel beobachtete Masse ( $M_{\text{beo.}}$ ) ist in kDa angegeben.

Nr.	Konstrukt	Bedingungen	$M_{\text{beo.}}$	Bemerkung
1	B pETG10A	0.4 I, 37 °C, 2–3 h	<245	aufgekocht, schwache Bande (His <sub>6</sub> , 235 kDa)
2	R pETG10A	0.4 I, 37 °C, 1–2 h	>245	aufgekocht, Schlier
3	R pETG20A	0.4 I, 37 °C, 1 h	>245	aufgekocht, Schlier (Trx+His <sub>6</sub> , 247 kDa)
4	B/R pETG30A	0.4 I, 37 °C, 1–2 h	>245	aufgekocht, Schlier (GST+His <sub>6</sub> , 262 kDa)
5	R/T pETG30A	0.1/0.4/0.7/1 I, 30/37 °C, 1–4 h 20/25/28 °C, 18 h	–	Zellaufschluss/aufgekocht
6	B/R pETG40A	0.4 I, 37 °C, 1 h	>245	aufgekocht, Schlier (MBP, 277 kDa)
7	R pETG40A	1 I, 37 °C, 4 h	>245	Zellaufschluss, Bande ausschließlich im P
8	R/T pETG40A	0.1/0.4/0.7/1 I, 30/37 °C, 1 h 20/25/28 °C, 18 h	–	Zellaufschluss/aufgekocht

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 3:** Expressionsstudien zu Modul AmbF – *Fortsetzung*

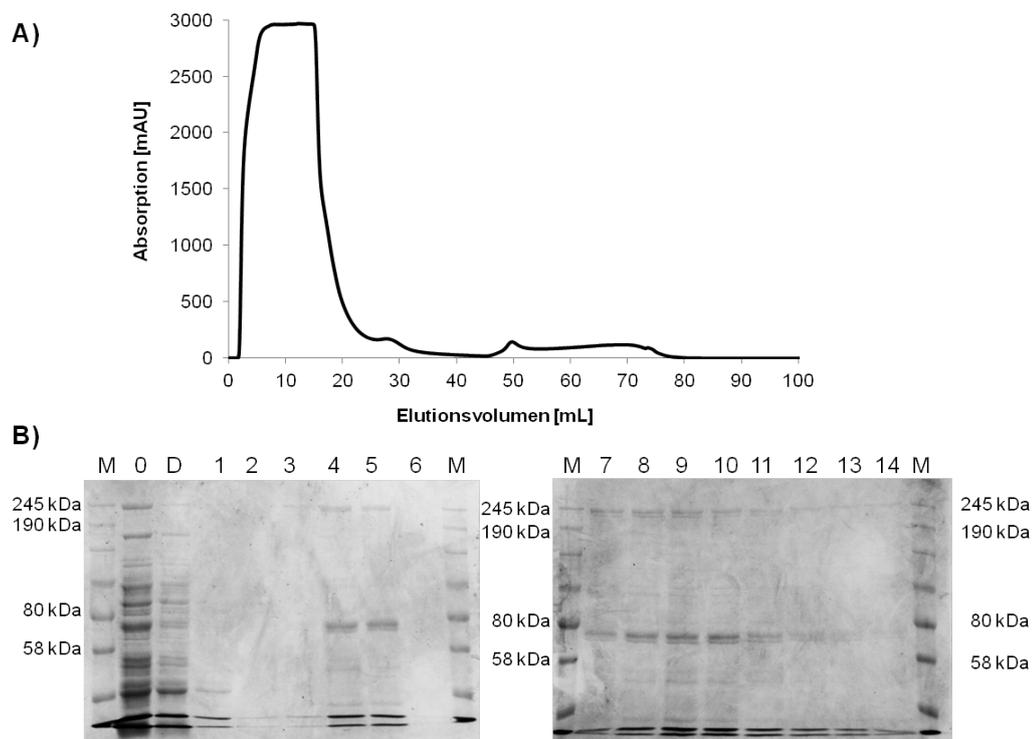
Nr.	Konstrukt	Bedingungen	M <sub>theo.</sub>	Bemerkung
9	T pETG40A	0.4 I, 25 °C, 20 h 30/37 °C, 4 h	>245	Zellaufschluss, Bande ausschließlich im P
10	B/R pETG60A	0.4 I, 37 °C, 1–2 h	>245	aufgekocht, Schlier (NusA+His <sub>6</sub> , 290 kDa)



**Abbildung 22:** Expressionsstudien zum Modul AmbF. A) Ausschnitt der SDS-PAGE zur Expression von pETG40A\_ambF in BL21 (DE3) pG-KJE8 bei verschiedenen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen (GST+His<sub>6</sub>, 262 kDa), siehe Tab. 3 Eintrag 9. B) SDS-PAGE der Expression von pETG40A\_ambF in Rosetta 2 bei 37 °C über 4 h (GST+His<sub>6</sub>, 262 kDa), siehe Tab. 3 Eintrag 7. C) Ausschnitt der SDS-PAGE zur Expression von pETG10A\_ambF in BL21 (DE3) oder Rosetta 2, (His<sub>6</sub>-AmbF = 235 kDa), siehe Tab. 3 Einträge 1+2; L = Lysat, P = Pellet, M = 7 µL *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific), 6%-ige SDS-Trenngele.

Die Proteinproduktion wurde ausschließlich für BL21 (DE3) pETG10A\_ambF, Rosetta 2 pETG40A\_ambF und BL21 (DE3) pG-KJE8 pETG40A\_ambF beobachtet (Tab. 3, Einträge 1, 7 und 9, Abb. 22). Die Proteine lagen für die beiden

letztgenannten Konstrukte jeweils unlöslich und für Eintrag 1 als Mischfraktion vor. Für alle anderen Konstrukte, außer BL21 (DE3) pETG20A\_ambF, wurde im besten Fall ein hochmolekularer Schlier im SDS-Gel beobachtet (Tab. 3, Einträge 2, 4, 6 und 10). Dieser könnte das unter den harschen Bedingungen während der SDS-PAGE denaturierte Modul AmbF, Abbruchprodukte der Proteintranslation oder das Ergebnis proteolytischen Abbaus darstellen (vgl. Erläuterungen zur Ursache fehlgefalteter Fusionsproteine in Kapitel 3.2.1.3).



**Abbildung 23:** Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbF mittels Ni-AC an der FPLC-Anlage mit steigender Imidazolkonzentration (I) von 25–500 mM im FPLC-Elutionspuffer von 34–59 mL. A) UV-Chromatogramm der Reinigung an der FPLC-Anlage. B) SDS-PAGE des Reinigungsverlaufs (His<sub>6</sub>-AmbF = 235 kDa); **M** = 7  $\mu$ L *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); **0** = Überstand nach Zellyse; **D** = Säulendurchlauf, 15 mL; **1** = 25 mM I, 19 mL; **2** = 206 mM I, 44 mL; **3** = 263 mM I, 47 mL; **4** = 309 mM I, 50 mL; **5** = 336 mM I, 51 mL; **6** = 500 mM I, 65 mL **7** = 285 mM I, 48 mL; **8** = 293 mM I, 49 mL; **9** = 309 mM I, 50 mL; **10** = 336 mM I, 51 mL; **11** = 352 mM I, 52 mL; **12** = 362 mM I, 53 mL; **13** = 377 mM I, 54 mL; **14** = 397 mM I, 55 mL; 6%-ige SDS-Trenngele.

Das Vektorkonstrukt pETG40A\_ *ambF* liefert ein sehr großes Fusionsprotein mit MBP-Tag (277 kDa). Aus diesem Grund wurden weitere Optimierungsarbeiten mit BL21 (DE3) pETG10A\_ *ambF* durchgeführt (His<sub>6</sub>-Tag).

Anstelle des 2TY-Mediums wurde das besonders reichhaltige TB-Medium (*engl. Terrific Broth*) verwendet. Dieses ist Phosphat-gepuffert, sodass der pH-Wert im Kultivierungsverlauf konstant bleibt und enthält Glycerin für eine schonendere Induktion der Genexpression nach dessen Verbrauch. Es wurden 100 mL Produktionskultur mit TB-Medium bei OD<sub>600</sub> = 0.4 mit 0.1 mM IPTG induziert und die Proteine 20 h bei 16 °C produziert. Niedrige Temperaturen und geringe IPTG-Konzentrationen bewirken eine langsamere Proteinproduktion bei gleichzeitig gesenkter Aktivität von Proteasen. Somit werden die Proteine schneller gefaltet - spontan oder Chaperon-assistiert - bevor die Aggregation oder Proteolyse eintreten können (vgl. Kapitel 3.2.1.3).<sup>[91]</sup>

Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und in 5 mL Lysepuffer je Gramm Biomasse über 10 min per Ultraschall aufgeschlossen. Unter diesen Bedingungen wurde lösliches His<sub>6</sub>-AmbF-Protein erhalten, dessen katalytische Kompetenz in zukünftigen Enzymtests untersucht werden kann (Abb. 23, B, Spur 0). Die SDS-PAGE wurde hierfür unter Wasserkühlung betrieben und die Spannung während der gelelektrophoretischen Trennung von 170 auf 150 V gesenkt.

Das His<sub>6</sub>-AmbF-Protein konnte aus 20 mL Zellysat mithilfe der Ni-AC an der FPLC-Anlage angereichert werden (Abb. 23). Die Elution erfolgte dabei mit einem linearen Gradienten von 25 auf 500 mM Imidazol im FPLC-Elutionspuffer. Im UV-Chromatogramm der Reinigung ist zu erkennen, dass der Anteil an Fremdproteinen, die nicht an das Säulenmaterial gebunden wurden (bei 10 mL), im Verhältnis zum Elutionspeak für His<sub>6</sub>-AmbF ab ca. 300 mM Imidazol (bei 50 mL) sehr hoch ist (Abb. 23, A). Die Bindung von His<sub>6</sub>-AmbF an das Säulenmaterial war jedoch effektiv, da im Säulendurchlauf nur eine schmale Bande für His<sub>6</sub>-AmbF im SDS-Gel zu sehen ist (Abb. 23, B, Spur D). In den Elutionsfraktionen sind teilweise doppelte Proteinbanden zu erkennen, welche auf die  $\alpha$ -N-6-Phosphogluconoylierung

des His<sub>6</sub>-Tags (+258 Da), eine posttranslationale Modifikation in *E. coli* zurück geführt werden könnten.<sup>[116]</sup> Alternativ kann das Auftreten von Doppelbanden im SDS-Gel auf eine anteilige Reoxidation der Proteinprobe zurück geführt werden, welche durch die Erhöhung des DTT-Gehalts im SDS-Probenpuffer verhindert werden könnte.

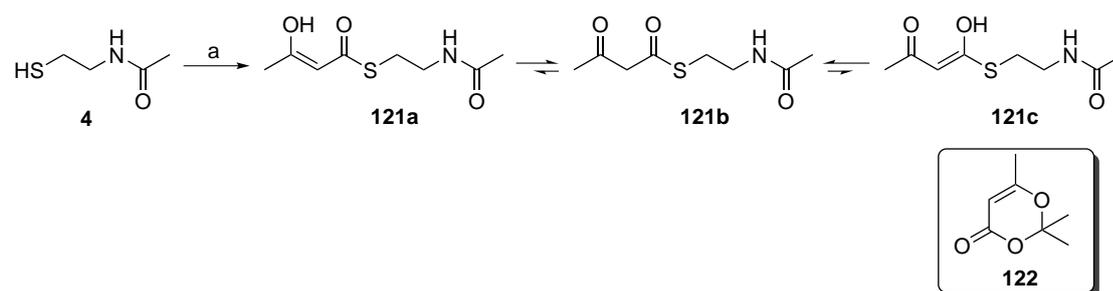
Während der Reinigung ist ein ca. 75 kDa-großes Protein mit angereichert worden. Dessen Präsenz bei hohen Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer sowie das Vorliegen von doppelten Proteinbanden im SDS-Gel suggerieren einen intakten His<sub>6</sub>-Tag. Vermutlich stellt dieses Protein ein N-terminales proteolytisches Spaltprodukt oder ein Abbruchprodukt der Translation des AmbF-Moduls dar. Es kann in einem zusätzlichen Chromatographieschritt, zum Beispiel mittels Gelfiltration, entfernt werden. Weiterhin könnte der Zusatz von Proteaseinhibitoren (wie PMSF oder Leupeptin) während des Zellaufschlusses zu mehr intaktem AmbF-Protein führen.

### 3.3 Studien zu AmbF-Domänen

Die von AmbF katalysierten Biosyntheseschritte sollten mittels *in vitro*-Reaktion einzelner Enzymdomänen mit Substratsurrogaten untersucht werden. Aus diesem Grund wurden zunächst mittels einer Kombination bioinformatischer Verfahren die Domänengrenzen bestimmt. Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden mittels PCR amplifiziert, in den pET28a(+)-Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert. Anschließend wurden mit der Px-Domäne erste Studien zur Funktionalität durchgeführt.

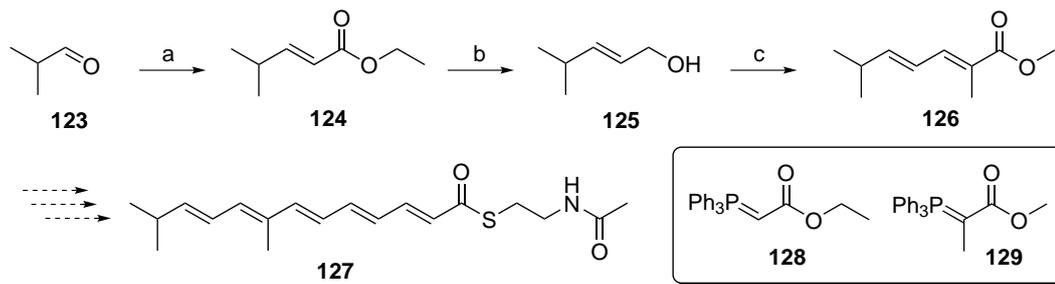
#### 3.3.1 Synthetische Arbeiten

Für die Untersuchung der AmbF-Domänen in Enzymaktivitätstest wurden Substratsurrogate auf synthetischem Weg hergestellt.



**Schema 17:** Synthese des  $\beta$ -Ketothioesters **121** nach GILBERT *et al.*<sup>[117]</sup> a) **122**, Toluol, Reflux, 7 h, Keto:Enol 6:1, 50%.

Der  $\beta$ -Keto-SNAC-Thioester **121** wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift von GILBERT *et al.* durch die nukleophile Öffnung des Dioxinons **122** mit HSNAC (**4**) synthetisiert (Schema 17).<sup>[117]</sup> Dieses Substrat kann für zukünftige Studien zur Funktionalität der Aminotransferase-Domäne Px aus dem Modul AmbF verwendet werden, da es ein Surrogat für einen einfachen ACP-gebundenen  $\beta$ -Ketothioester darstellt.



**Schema 18:** Geplante Synthese des Polyens **127**. a) **128**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C – RT, 24 h, 86%, nach SOUCY *et al.*;<sup>[118]</sup> b) DiBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 2h, 99% c) **129**, MnO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 17 h, 28%.

Der Polyen-Thioester **127** sollte als Surrogat des Biosyntheseintermediats **91** (vgl. Schema 14 in Kapitel 3.1) als fortgeschrittenes Substrat für das Modul AmbF bereit gestellt werden (Schema 18). Dafür wurde eine lineare Syntheseroute ausgehend von Isobutyraldehyd (**123**) bestehend aus einer Serie von WITTIG-Reaktionen mit verschiedenen WITTIG-Ylenen und Reduktionen entwickelt. Im letzten Schritt sollte ein SNAc-Thioester über ein WITTIG-Ylen eingeführt werden. Durch die Umes-terung der Zwischenstufen zu SNAc-Thioestern können auch kürzere Substrate für zukünftige Enzymaktivitätstests erhalten werden. Mittels der dargestellten Syntheseroute wurde das Dien **126** in drei Stufen synthetisiert, die Darstellung von Polyen **127** war im zeitlichen Rahmen der Arbeit nicht mehr möglich.

## 3.3.2 Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung

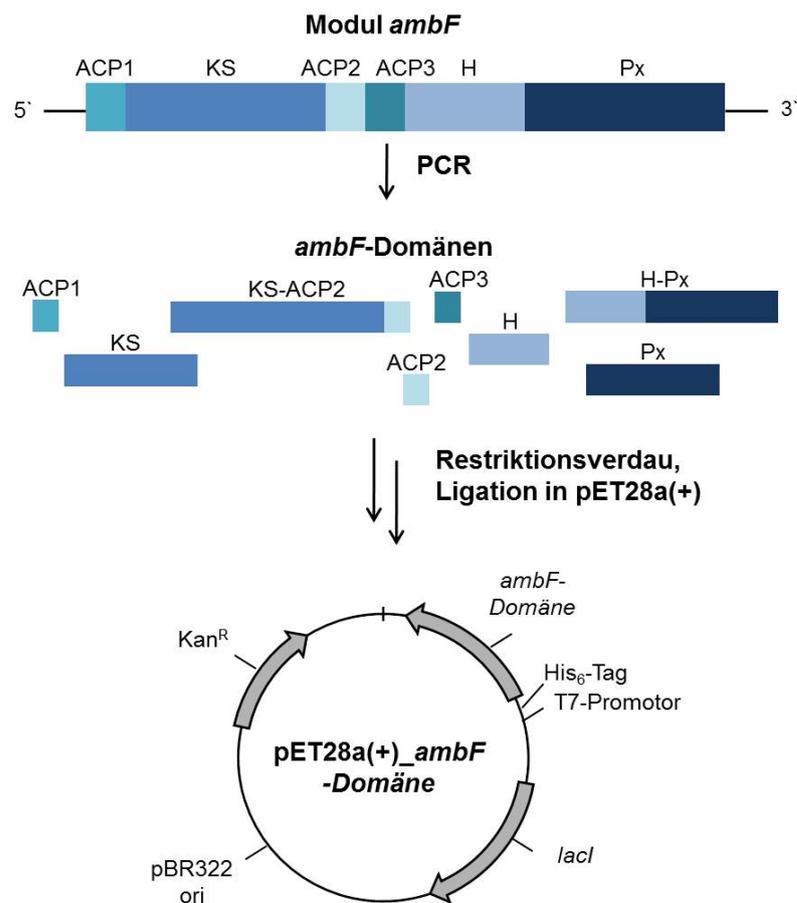
### 3.3.2.1 Bestimmung der AmbF-Domänengrenzen

Zunächst wurde mithilfe der PKS/NRPS-Analyse-Software<sup>[119]</sup> der *University of Maryland* im Modul AmbF nach konservierten Domänen gesucht. Diese Daten wurden für eine Mustererkennung mithilfe von *Hidden Markov*-Modellen in die *Pfam-A*-Datenbank<sup>[120]</sup> eingepflegt und eine Konsensus-Sequenz für die Proteindomänen konstruiert. Damit ist anschließend mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)-Algorithmus<sup>[121]</sup> und *pattern-hit initiated* (Phi)-BLAST-Suche in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (ncbi)<sup>[122]</sup> sowie in der *pdb*-Datenbank<sup>[123]</sup> der *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB) nach strukturhomologen Domänen gesucht worden. Bevorzugt wurden dabei Einträge, bei denen die Struktur bereits experimentell ermittelt wurde.

Diese Sequenzen wurden auf Aminosäureebene mithilfe von Sequenzalignments mit *Clustal Omega*<sup>[124]</sup> auf konservierte Bereiche hin untersucht und die erhaltenen Ergebnisse mithilfe der *Phyre<sup>2</sup>*-Datenbank<sup>[125]</sup> durch *Threading* gegengeprüft. Es ist darauf geachtet worden, dass innerhalb der ausgewählten Sequenz konservierte katalytische Strukturen erhalten und potentielle Bindetaschen vollständig ausgebildet werden konnten. Für die Expression wurden links und rechts der bestimmten Grenzen 7-10 Aminosäuren mehr als Linker angefügt. Mithilfe dieser Verfahren wurden die Grenzen für drei *Acyl Carrier*-Protein-Domänen ACP1, ACP2 und ACP3, eine Ketosynthase-Domäne KS, eine Aminotransferase-Domäne Px sowie für eine Acyltransferase-ähnliche Hydrolase-Domäne H bestimmt (Abb. 24 in Kapitel 3.3.2.2).

### 3.3.2.2 Klonierung von AmbF-Domänen in den pET28a(+)-Expressionsvektor

Die putativen AmbF-Domänen ACP1, KS, ACP2, ACP3, H und Px sowie die Domänenkombinationen KS-ACP2 und H-Px sollten jeweils in den pET28a(+)-Expressionsvektor kloniert werden, um eine spätere heterologe Proteinproduktion der acht Proteine in *E. coli* zu ermöglichen (Abb. 24). Der pET28a(+)-Vektor weist den pBR322-ori (15-20 Kopien pro Zelle), den Selektionsmarker *Kan<sup>R</sup>* und den T7-Promotor auf. Vor und nach dem Polylinker sind jeweils ein His<sub>6</sub>-Tag codiert und das *lacI*-Gen für den Repressor des *lac*-Operons ist im pET28a(+)-Vektor enthalten (vgl. Erläuterungen zu Eigenschaften von Expressionsvektoren in Kapitel 3.2.1.3).<sup>[104]</sup>



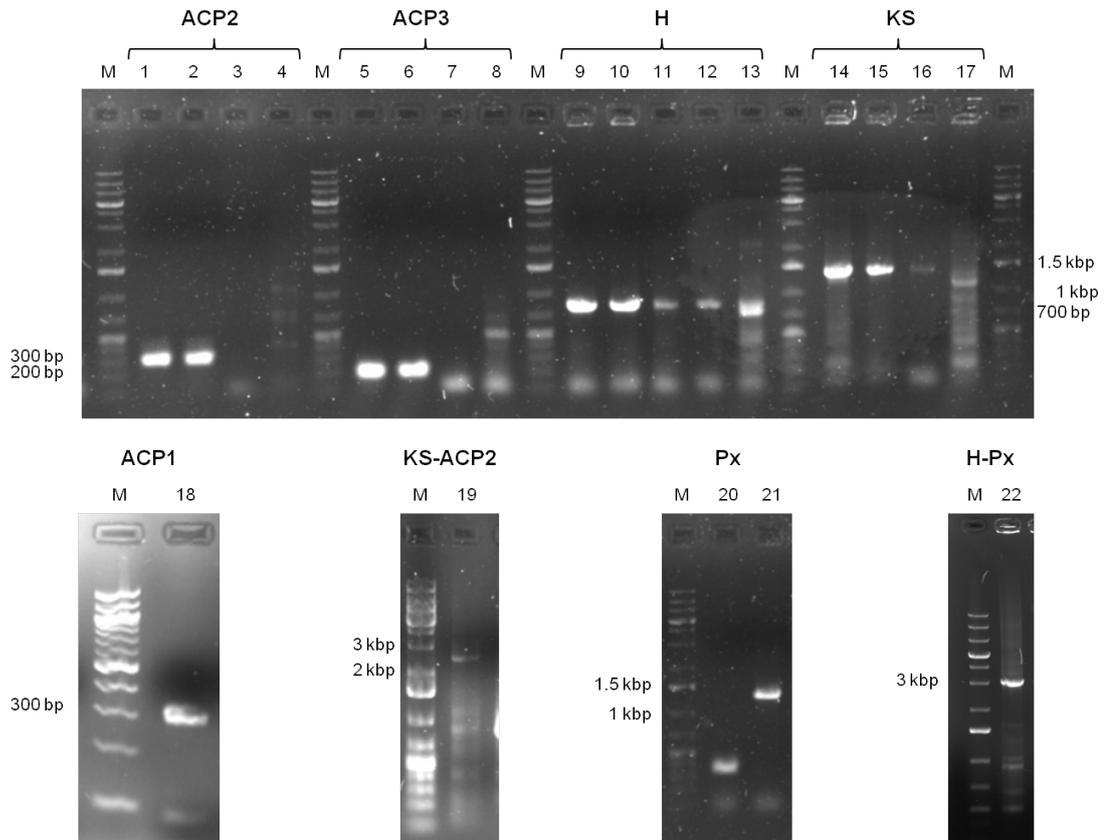
**Abbildung 24:** Klonierungsschema für *ambF*-Domänen oder Domänenkombinationen in den pET28a(+)-Vektor. Die Größe der Domänen zueinander entspricht maßstabsgetreu den gewählten Domänengrenzen.

Die acht DNA-Fragmente (Inserts) wurden ausgehend von den Vektorkonstrukten mit synthetischen Genen (pUC19\_ambF1, pUC19\_ambF2 und pUC19\_ambF3) oder dem pENTR-YA\_ambF-Vektor mittels PCR mit der *Phusion*<sup>®</sup> *High Fidelity* DNA-Polymerase (*NEB*) amplifiziert. Dabei wurden über die Primer Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* (am 5'-Ende) und *EcoRI* (am 3'-Ende) eingeführt, welche ebenfalls im Polylinker des pET28a(+)-Vektors enthalten sind (Tab. 24).

Das Startcodon wurde vom pET28a(+)-Vektor zur Verfügung gestellt, sodass am 5'-Ende der Inserts das Gen für den His<sub>6</sub>-Tag angefügt wurde. Am 3'-Ende der Inserts wurde jeweils direkt hinter der codierenden DNA-Sequenz ein Stoppcodon (TAA) über die Rückwärtsprimer eingeführt. Im Primer ACP2 rev (Tab. 12, Nr. 48) wurde versehentlich das Stoppcodon durch TTA (Leu) ersetzt. Aus diesem Grund wurde bei der späteren Expression mit den Vektoren pET28a(+)\_ACP2 sowie pET28a(+)\_KS-ACP2 zusätzlich ein C-terminaler His<sub>6</sub>-Tag an die ACP2-Domäne angefügt und das vektorbasierte Stoppcodon genutzt.

Der allgemeinen Vorschrift für Klonierungsarbeiten folgend, wurden die PCR-Amplifikate sowie der pET28a(+)-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* geschnitten. Der pET28a(+)-Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert, um die Selbstligation von nur ein Mal geschnittenen Fragmenten und somit den Erhalt falsch-positiver Konstrukte zu minimieren. Beim Restriktionsverdau wurden kompatible DNA-Überhänge generiert, deren Hybridisierung eine gerichtete Integration der Inserts in den pET28a(+)-Vektor ermöglichte. Im Anschluss wurde die Verbindung der Zucker-Phosphat-Rückgrate von der T4-DNA-Ligase katalysiert und chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen mit der Reaktionsmischung transformiert. Die Selektion erfolgte über Kanamycin-haltige Nährböden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 25:** Agarosegele der Kolonie-PCRs von pET28a(+)-Vektoren mit *ambF*-Domänen oder Domänenkombinationen. WK = Wasserkontrolle ohne DNA, VK = Vektorkontrolle mit dem pET28a(+)-Vektor, K = Kolonie, M = 3  $\mu$ L *GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder* (Thermo Scientific); **ACP2** = 420 bp, 1/2 = K1 (pos.)/K2, 3 = WK, 4 = VK; **ACP3** = 351 bp, 5/6 = K1 (pos.)/K2, 7 = WK, 8 = VK; **H** = 867 bp, 9/10/11/12 = K1 (pos.)/K2/K3/K4, 13 = VK; **KS** = 1392 bp, 14/15 = K1 (pos.)/K2, 16 = WK, 17 = VK; **ACP1** = 333 bp, 18 (pos.); **KS-ACP2** = 2583 bp, 19 (pos.); **Px** = 1371 bp, 20/21 = K1/K2 (pos.); **H-Px** = 3024 bp, 22 (pos.); jeweils alle Gele aus 1% [w/v] Agarose, bis auf 2% [w/v] Agarose für ACP1.

Die Kolonie-PCR diente als zügiges Testverfahren für Bakterienkolonien auf die erstellten Vektorkonstrukte. Bei dieser Methode wurde ein Teil der Bakterienkolonie im PCR-Puffer aufgekocht und direkt für die PCR mit der *Dream Taq™* DNA-Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) und Insert-spezifischen Primern eingesetzt. Der Rest der Bakterienkolonie wurde auf einen frischen Nährboden übertragen und weiter kultiviert.

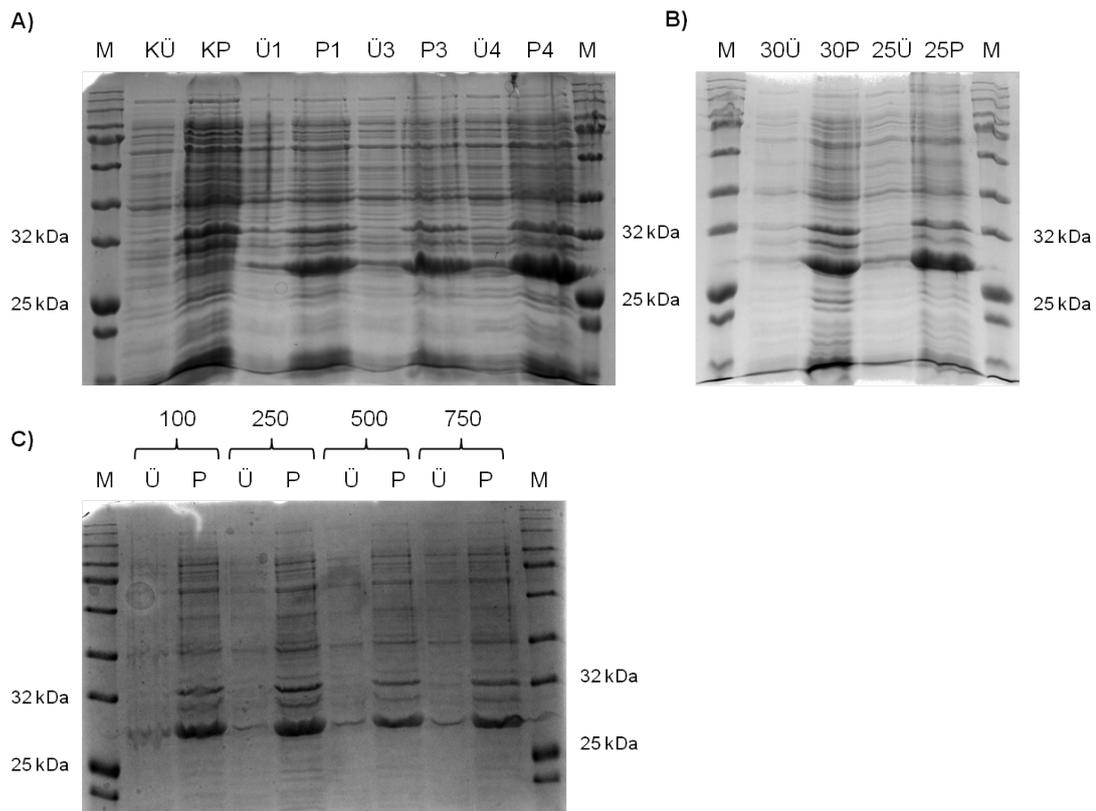
Mit der Kolonie-PCR können beliebig viele Kolonien parallel getestet werden und ausschließlich positive Klone anschließend für Über-Nacht-Kulturen verwendet werden. Dies reduzierte die Probenanzahl für die Plasmidisolierung und somit den Arbeitsaufwand zur Testung erheblich.

Es wurden mittels Kolonie-PCR für alle Expressionsvektoren Amplifikate in der erwarteten Größe erhalten (Abb. 25). Mithilfe von DNA-Sequenzierungen wurde im Anschluss bestätigt, dass alle acht Vektorkonstrukte erfolgreich erstellt wurden (Abb. 25, in der Abbildungsunterschrift mit „pos.“ gekennzeichnete Proben).

### 3.3.2.3 Studien zur heterologen Proteinproduktion und Reinigung von AmbF-Domänen

Die putativen AmbF-Domänen (und Domänenkombinationen) sollten als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine im Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) produziert werden (vgl. Erläuterungen zum Expressionsstamm in Kapitel 3.2.1.4). Zunächst wurden Expressionsstudien zu pET28a(+)<sub>H</sub> und pET28a(+)<sub>KS</sub> durchgeführt.

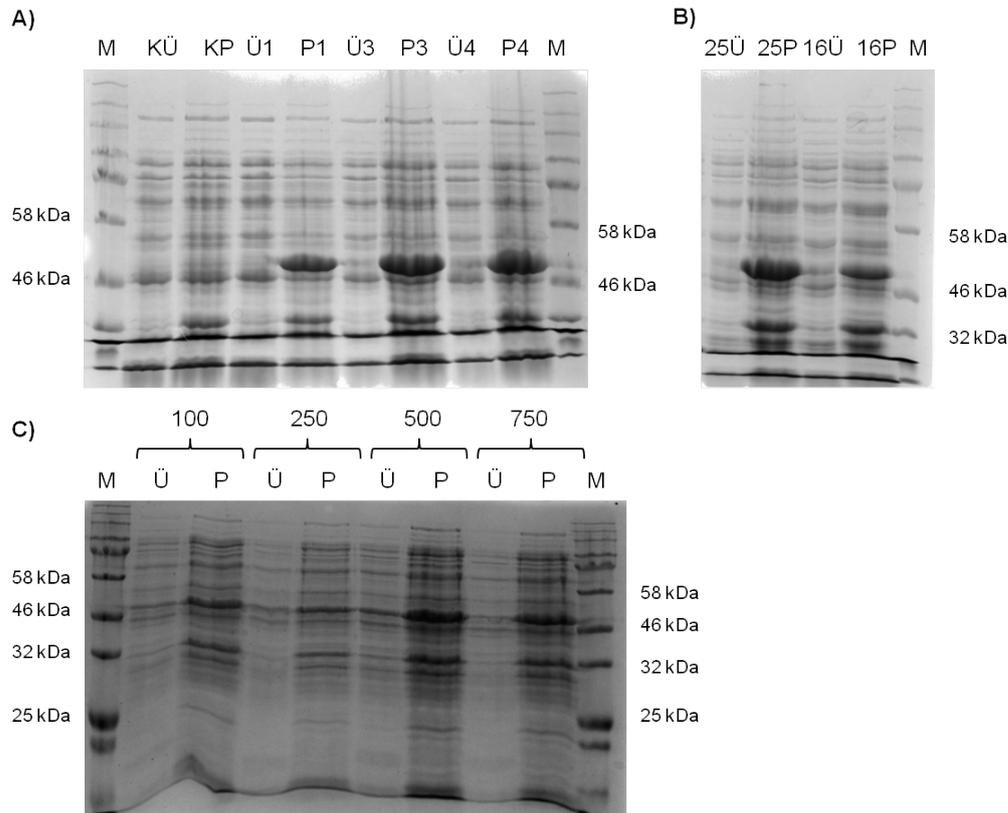
Der allgemeinen Vorschrift für die heterologe Proteinproduktion folgend, wurden Produktionskulturen bis OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8 geschüttelt. Anschließend wurde die Genexpression mit 0.1–1 mM IPTG induziert und die Proteine 1–4 h bei ≥30 °C oder 17 h bei 16–25 °C produziert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 10 mL Lysepuffer je Gramm Zellsediment (Tab. 15 in Kapitel 5.1) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation wurden Überstand und Pellet mithilfe der SDS-PAGE auf produzierte Fusionsproteine hin analysiert (Abb. 26 und Abb. 27).



**Abbildung 26:** Expressionsstudien zur Hydrolase-Domäne ( $\text{His}_6\text{-H} = 30 \text{ kDa}$ ); Ü = Überstand nach Zellyse, P = Pellet nach Zellyse, M = 5  $\mu\text{L}$  *Color Prestained Protein Standard, Broad Range* (NEB); 15%-ige SDS-Trenngele; **A)** Proteinproduktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C für 1, 3 oder 4 h; **B)** Proteinproduktion mit 1 mM IPTG bei 30 °C für 4 h oder 25 °C für 17 h; **C)** Proteinproduktion mit 100–750  $\mu\text{M}$  IPTG bei 37 °C für 4 h.

Unter allen getesteten Bedingungen wurde eine starke Produktion der Hydrolase-Domäne als überwiegend unlösliches  $\text{His}_6$ -Fusionsprotein beobachtet (Abb. 26). Bei 37 °C war mit steigender Expressionsdauer eine erhöhte Proteinkonzentration in den Überständen zu beobachten (Abb. 26, A). Bezüglich der IPTG-Konzentration lag hingegen keine Abhängigkeit für die Produktion löslicher Proteine vor. Mit 100  $\mu\text{M}$  IPTG wurde die größte Menge an Protein im Pellet erhalten (Abb. 26, C). Die größte Konzentration an löslichem Protein wurde mit einer Produktion bei 25 °C über 17 h erzielt.

In weiterführenden Studien müsste daher die Produktionstemperatur weiter gesenkt werden. Alternativ könnte das Gen der Hydrolase-Domäne in einen Expressionsvektor mit Löslichkeits-Tag (z.B. GST-, MBP- oder Trx-Tag, vgl. Kapitel 3.2.1.3) kloniert und heterolog exprimiert werden.



**Abbildung 27:** Expressionsstudien zur Ketosynthase-Domäne ( $\text{His}_6\text{-KS} = 50 \text{ kDa}$ ); Ü = Überstand nach Zellyse, P = Pellet nach Zellyse, M =  $5 \mu\text{L}$  *Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB)*, **A**) Proteinproduktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C für 1, 3 oder 4 h; **B**) Proteinproduktion mit 1 mM IPTG bei 25 oder 16 °C für 17 h; **C**) Proteinproduktion mit 100–750  $\mu\text{M}$  IPTG bei 37 °C für 4 h; 15%-ige SDS-Trenngele.

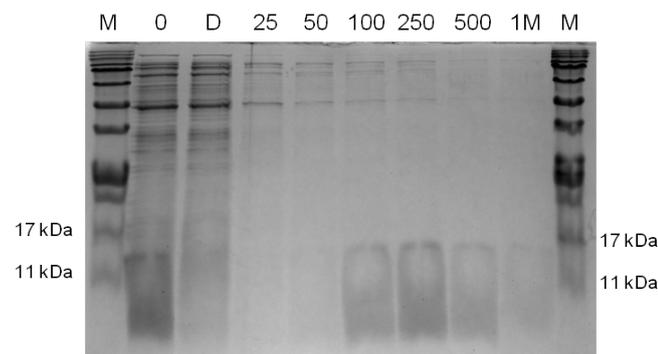
Die Ketosynthase-Domäne wurde ebenfalls unter allen getesteten Bedingungen als überwiegend unlösliches  $\text{His}_6$ -Fusionsprotein erhalten (Abb. 27). Mit steigender Produktionsdauer von 1 auf 4 h war mit 1 mM bei 37 °C zu Zunahme an unlöslichem Fusionsprotein zu beobachten (Abb. 27, A).

Während der Proteinproduktion bei 25 °C mit 1 mM IPTG wurde nach 17 h ebenso viel überwiegend unlösliches Fusionsprotein gebildet (Abb. 27, B). Allerdings wurde mit steigender IPTG-Konzentration von 100 auf 500  $\mu\text{M}$  bei 37 °C für 4 h

sowie bei 16 °C mit 1 mM IPTG über 17 h eine Verbesserung der Proteinkonzentration im Überstand beobachtet (Abb. 27, B und C).

Für den Einsatz in Enzymtests sollte die Enzymgewinnung daher zukünftig bei 16 °C über 17 h mit 500 µM wiederholt und - wie auch für die Hydrolase-Domäne - eine Reinigung mittels Ni-AC etabliert werden.

Im Rahmen einer Masterarbeit wurden die ACP2- und ACP3-Domänen bereits als lösliche His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 (DE3) produziert. Dafür wurden Produktionskulturen bei OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8 mit 0.4 mM IPTG induziert und 3 h bei 37 °C weiter kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen sedimentiert, mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Fusionsproteine über eine gravimetrische Ni-AC sowie Gelfiltration gereinigt und entsalzt.<sup>[126]</sup>

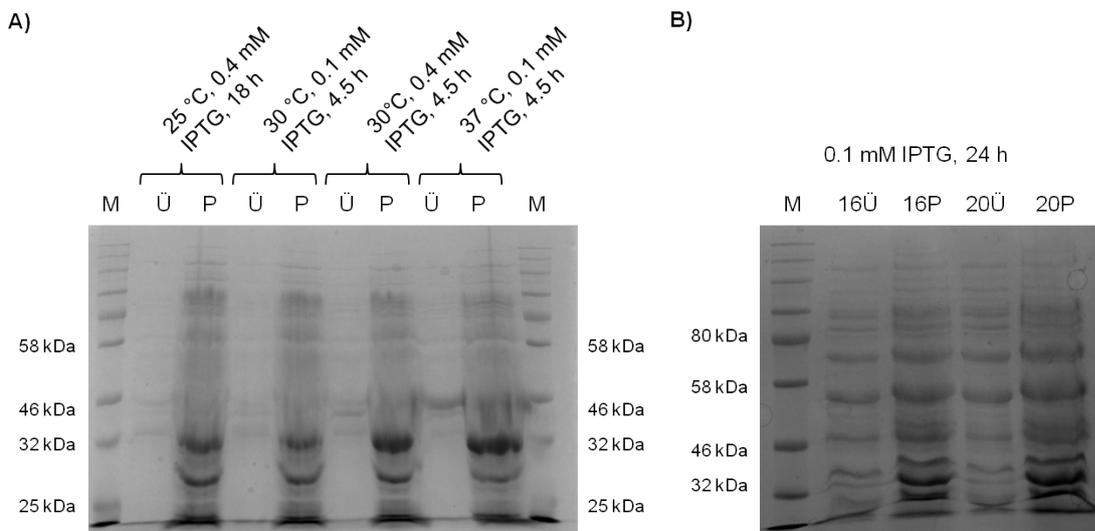


**Abbildung 28:** Reinigung der Proteindomäne His<sub>6</sub>-ACP1 (13 kDa) mittels gravimetrischer Ni-AC. Die Elution erfolgte stufenweise mit 25–500 mM oder 1 M Imidazol im Elutionspuffer; **M** = 5 µL *Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB)*, **0** = Überstand nach der Zellyse, **D** = Säulendurchlauf, 15%-iges SDS-Trenngel, Wasserkühlung während der gelelektrophoretischen Trennung.

Die Produktion und Reinigung der ACP2- und ACP3-Domäne konnten in dieser Arbeit reproduziert und die Bedingungen erfolgreich auf die ACP1-Domäne übertragen werden. Es wurde lösliches His<sub>6</sub>-ACP1-Fusionsprotein erhalten, welches mittels gravimetrischer Ni-AC angereichert werden konnte (Abb. 28). Die Elution der Proteindomäne His<sub>6</sub>-ACP1 erfolgte ab 100 mM Imidazol im Elutionspuffer. Das geringe Molekulargewicht der ACP-Domänen stellte während der SDS-PAGE-Analyse ein generelles Problem dar, weil mit der LAEMMLI-Methode<sup>[127]</sup> (auch unter Wasserkühlung während der gelelektrophoretischen Trennung) vertikal

verbreiterte Proteinbanden beobachtet wurden. Ein möglicher Lösungsansatz für dieses Problem liegt in der Umstellung auf die Tricin-SDS-PAGE-Methode (unter Umständen mit Harnstoffzusatz). Diese Methode stellt das bevorzugte Protokoll für kleine Proteine <30 kDa dar.<sup>[128]</sup> In Enzymtests wurden alle ACP-Domänen vollständig in ihre *holo*-Formen überführt und erfolgreich mittels Protein-MS detektiert. Dies suggeriert, dass die ACP-Domänen jeweils in ihrer korrekt gefalteten Form vorlagen, da sie von der PPTase als Substrate erkannt wurden.

Die Px-Domäne sollte ebenfalls als lösliches His<sub>6</sub>-Fusionsprotein mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)<sub>Px</sub> produziert werden. Die Genexpression in den Produktionskulturen wurde zunächst bei OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8 mit 0.1 oder 0.4 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Produktionskulturen bei 25 °C für 18 h oder bei ≥30 °C für 4.5 h weiter kultiviert (Abb. 29, A).

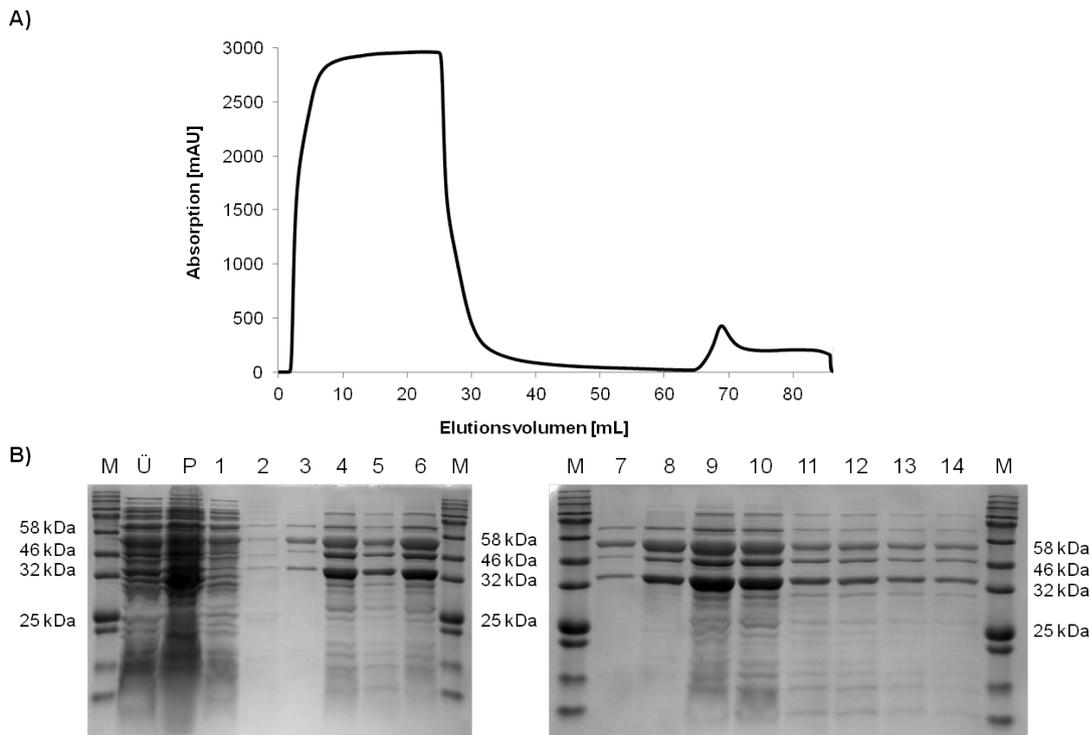


**Abbildung 29:** Expressionsstudien zu His<sub>6</sub>-Px (50 kDa); **M** = 5 µL *Color Pre-stained Protein Standard, Broad Range (NEB)*, **Ü** = Überstand nach der Zellyse, **P** = Pellet, **A**) Expression mit *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)<sub>Px</sub> unter verschiedenen Bedingungen; **B**) Coexpression des Chaperon-Sets pG-KJE8 mit pET28a(+)<sub>Px</sub> in *E. coli* BL21 (DE3) bei 16 oder 20 °C, GroEL = 60 kDa, GroES = 10 kDa, DnaK = 70 kDa, DnaJ = 40 kDa, GrpE = 22 kDa; 12%-ige SDS-Trenngele, Wasserkühlung während der gelelektrophoretischen Trennung.

Die auf Basis der AS-Sequenz kalkulierte Größe von His<sub>6</sub>-Px beträgt 50 kDa. In den Überständen war jeweils eine Proteinbande bei ca. 46 kDa zu erkennen, deren Intensität mit steigenden Produktionstemperaturen zunahm, sodass mit 0.1 mM

IPTG bei 37 °C über 4.5 h die größte Menge an löslichem Protein erhalten wurde. Sehr auffällig war eine starke Proteinbande bei ca. 32 kDa, die in allen unlöslichen Fraktionen zu erkennen war. Eventuell handelte es sich dabei um ein Abbruchprodukt der Proteintranslation. Aus diesem Grund wurde eine Coexpression mit dem plasmidbasierten Chaperon-Set pG-KJE8 vorgenommen (Abb. 29, B, vgl. Abb. 21 in Kapitel 3.2.1.4). Dafür wurden die Produktionskulturen mit 5 ng/L Tetrazyklin und 0.5 mg/mL Arabinose für die Induktion der Genexpression der Chaperone sowie mit 0.1 mM IPTG versetzt und 24 h bei 16 oder 20 °C weiter kultiviert.

Es wurden mehrere neue Proteinbanden in den Überständen beobachtet, die zum Teil auf die überexprimierten Chaperone DnaK (70 kDa), GroEL (60 kDa) und DnaJ (40 kDa) zurück geführt werden können. Aus diesem Grund müsste die Konzentration der Induktoren von pG-KJE8 (Arabinose und Tetrazyklin) in weiterführenden Studien gesenkt werden. Der Vergleich mit der Expression ohne Chaperon-Set legt nahe, dass es sich bei der Proteinbande bei 47 kDa um die Px-Domäne handelt. Eine verlässliche Zuordnung war jedoch ohne AS-Sequenzierung nicht möglich.



**Abbildung 30:** Reinigung von His<sub>6</sub>-Px (50 kDa) aus der Coexpression des pET28a(+)-Vektors mit pG-KJE8 mittels Ni-AC an der FPLC-Anlage. Die Elution erfolgte mit steigender Imidazolkonzentration (I) im FPLC-Elutionspuffer. A) UV-Chromatogramm der Reinigung an der FPLC-Anlage. B) SDS-PAGE der chromatographischen Reinigung; **M** = 5  $\mu$ L **M** = 5  $\mu$ L *Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB)*, **Ü** = Überstand nach der Zellyse; **P** = Pellet; **1** = Säulendurchlauf, 10 mL; **2** = 25 mM I, 39 mL; **3** = 367 mM I, 66 mL; **4** = 443 mM I, 70 mL; **5** = 481 mM I, 72 mL; **6** = Vereinigte Elutionsfraktionen von 66–75 mL (entspricht den Proben **3–5** und **7–14**) nach Umpuffern in Assaypuffer mittels Gel-filtration und Konzentrierung mithilfe von Membranzentrifugation; **7** = 367 mM I, 66 mL; **8** = 386 mM I, 67 mL; **9** = 424 mM I, 69 mL; **10** = 443 mM I, 70 mL; **11** = 481 mM I, 72 mL; **12–14** = 500 mM I, 73–75 mL; 12%-ige SDS-Trenngele, Wasserkühlung während der gelelektrophoretischen Trennung.

Es wurde eine Reinigung von His<sub>6</sub>-Px aus dem Zelllysate mittels Ni-AC an der FPLC-Anlage vorgenommen (Abb. 30). Im UV-Chromatogramm war bei 69 mL (mit 424 mM Imidazol im Elutionspuffer) ein deutlicher Peak zu erkennen, der für eine effektive Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial spricht (Abb. 30, A). Allerdings wird bei der Analyse mittels SDS-PAGE deutlich, dass noch einige weitere stark exprimierte Proteine mit angereichert worden sind (Abb. 30, B).

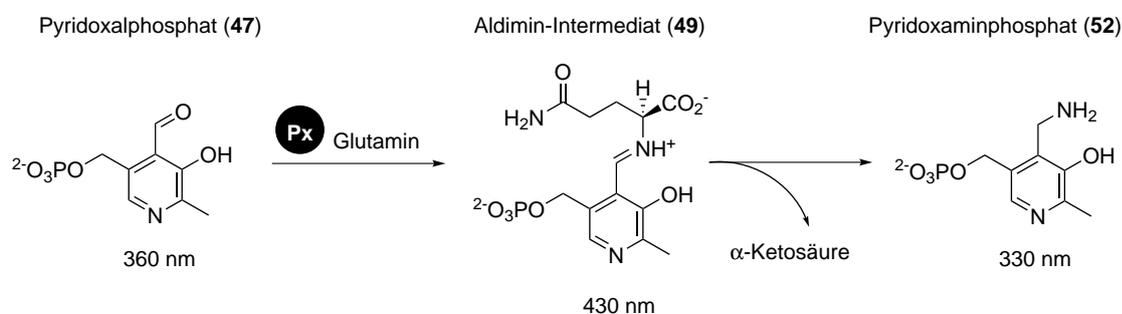
Erste Studien zur Funktionalität der Px-Domäne sind mit den vereinten angereicherten Elutionsfraktion nach Gelfiltration und Konzentrierung mittels Membranzentrifugation durchgeführt worden (Abb. 30, B, Probe 6).

In zukünftigen Studien wäre es notwendig, mithilfe einer AS-Sequenzierung zu klären, bei welcher Proteinbande es sich um das Zielprotein handelt. Anschließend müsste eine Kombination mit anderen chromatographischen Verfahren (z.B. Ionenaustausch-Chromatographie) verwendet werden, um His<sub>6</sub>-Px zu reinigen. Falls es sich bei den coeluierten Proteinen um die Chaperone handelt, können diese laut Herstellerangaben durch Spülen mit 3 mM Mg-ATP eluiert werden. Die beste Möglichkeit für eine verbesserte Produktion und Reinigung stellt auch in diesem Fall die Klonierung in einen anderen Expressionsvektor mit Löslichkeits-Tag dar.

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnten weder weitere Optimierungsarbeiten durchgeführt noch die Produktion der Domänenkombinationen KS-ACP2 und H-Px getestet werden.

### 3.3.3 Erste Studien zur Funktionalität der Px-Domäne

Gemäß der in dieser Arbeit formulierten Hypothese nimmt die Px-Domäne eine Schlüsselrolle in der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments ein, indem sie die Polyenverschiebung für die Cyclopropanbildung einleitet (vgl. Schema 14 in Kapitel 3.1). Daher war es von besonderem Interesse, diese Domäne auf ihre Funktionalität zu testen. Laut der Hypothese reagiert das Intermediat mit Pyridoxaminphosphat (PMP, **52**). Daher sollte in ersten Funktionalitätsstudien getestet werden, ob die Px-Domäne *in vitro* Pyridoxalphosphat (PLP, **47**) mit einer Aminosäure (AS) zu PMP (**52**) umsetzt (Schema 19 sowie Schema 7 in Kapitel 1.4).



Schema 19: Assayprinzip für die Px-Domäne.

Dafür wurde ein photometrischer Assay entwickelt, der auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima für PLP (**47**), PMP (**52**) sowie dem Aldimin-Intermediat (**49**) basiert (Schema. 19).<sup>[57]</sup>

Für die Tests wurde die Px-Domäne wie zuvor beschrieben angereichert und in TAPS-NaOH-Puffer gefiltert (vgl. Abb. 30 in Kapitel 3.3.2.3). Zunächst wurden Enzym und PLP (**47**) vorgelegt und die Absorption der Reaktionsmischung bei 330, 360 und 430 nm über 5 min alle 30 s gemessen. Nach Zusatz der AS wurde wie oben beschrieben über 1 h hinweg gemessen. Als Nullprobe wurde das Enzym in Puffer inkubiert. Als Negativkontrollen wurden jeweils Proben ohne Px-Domäne, PLP (**47**) oder AS mitgeführt.

Tabelle 4: Erste Funktionalitätsstudien zur Px-Domäne.

Eintrag	Bedingungen
1	1 mg/mL Enzym; 20 mM Asp; 20 $\mu$ M PLP
2	1 mg/mL Enzym; 20 mM Asp; 0, 50, 100 und 200 $\mu$ M PLP
3	1 mg/mL Enzym; 4 mM Glu; 20 $\mu$ M PLP
4	1 mg/mL Enzym; 4 mM Glu; 50 oder 100 $\mu$ M PLP
5	0.1 und 0.5 mg/mL Enzym; 4 mM Glu; 20 und 50 $\mu$ M PLP
6	2 und 3 mg/mL Enzym; 20 mM Glu; 20 und 50 $\mu$ M PLP

Es wurden Asp und Glu in Kombination mit unterschiedlichen PLP(**47**)- und Enzymkonzentrationen getestet (Tab. 4). Dabei wurde jeweils keine PMP(**52**)- oder Aldimin-Intermediat(**49**)-Bildung beobachtet. Weiterhin unterschieden sich die beobachteten Trends für die Funktionalitätstests nicht von jenen der Negativkontrollen. Insgesamt wurde eine sehr geringe Signalstärke (ca. 0.015 AU) und ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erhalten. Weitere Optimierungsarbeiten wurden im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt, da in einer Masterarbeit vielversprechende Ergebnisse für Studien zur Didomäne AmbG erhalten wurden.<sup>[126]</sup> Daher wurde der Fokus im Folgenden auf AmbG gelegt.

Der Misserfolg der Tests kann verschiedene Ursachen haben. Der mögliche Einsatz einer falschen AS kann in zukünftigen Studien mithilfe einer AS-Mischprobe umgangen werden. Weiterhin könnte das Amin des TAPS-Puffers das Gleichgewicht aus Schema 19 beeinflusst haben. Daher sollte in weiterführenden Studien ein Puffer ohne Aminbase verwendet werden. Auch der pH-Wert ist kritisch für den Erfolg der Studien und sollte optimiert werden.

In weiterführenden Studien könnte die Px-Domäne mit einem  $\beta$ -Ketothioester (wie z.B. **121**, vgl. Kapitel 3.3.1) getestet werden, dessen Bindung evtl. essentiell für die Reaktivität der Px-Domäne ist. Außerdem könnten die Komponenten im falschen

Verhältnis zueinander oder in falscher Konzentration eingesetzt worden sein. Darüber hinaus ist es möglich, dass bei den gemessenen Wellenlängen eine Überlagerung mit anderen Komponenten vorliegt. Aus diesem Grund müsste ein Wellenlängen-Scan vorgenommen werden, um die optimalen Messpunkte zu ermitteln. Außerdem könnten die Grenzen der Px-Domäne falsch bestimmt worden sein (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Zudem war keine Temperaturkontrolle während der Messungen möglich und eine Erwärmung des Photometers von ca. 22 auf 26 °C zu beobachten. Weiterhin kann es sein, dass die Grenzen zwar korrekt bestimmt worden sind, die Domäne jedoch als einzelstehendes Protein nicht funktional ist, sondern Protein-Protein Wechselwirkungen mit anderen Domänen für die katalytische Aktivität benötigt werden. Eine Verwendung des gesamten Moduls AmbF (vgl. Kapitel 3.2.1.4) oder der H-Px-Domäne wäre in zukünftigen Tests sinnvoll. Andererseits reagieren Intermediate in diesem Fall voraussichtlich direkt weiter mit nachfolgenden Enzymdomänen.

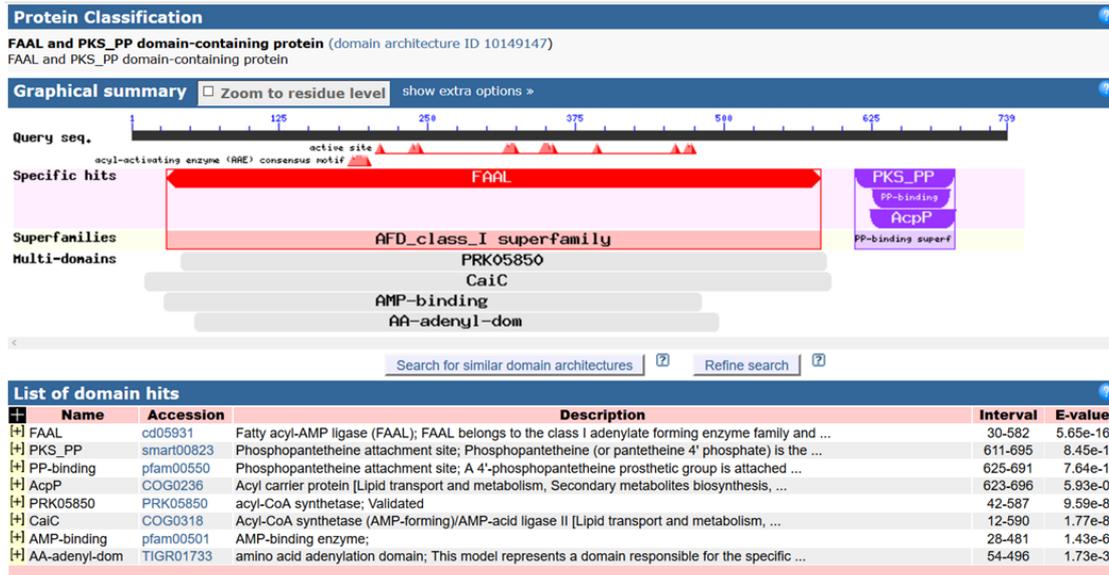
## 3.4 Untersuchung der *Tailoring*-Enzyme AmbG und AmbI

Die Didomäne AmbG ist als einzelstehendes Enzym zentral im Ambruticin-Gencluster codiert (vgl. Abb. 10 in Kapitel 1.5). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welche Rolle dieses Enzym während der Ambruticin-Biosynthese spielt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für bioinformatische Vergleichsstudien dargestellt. Außerdem wurden Substratsurrogate für das postulierte ACP-quervernetzte Biosyntheseintermediat **120** synthetisiert. Weiterhin wurden Enzymaktivitätstests durchgeführt, bei denen die Adenylierungs- und die Acyltransferaseaktivität von AmbG untersucht wurden.

### 3.4.1 Bioinformatische Studien zur Didomäne AmbG

Mithilfe bioinformatischer Studien sollte Einsicht bezüglich der Struktur, Funktion und Substratspezifität der Didomäne AmbG gewonnen werden. Bereits im Jahr 2006 wurde AmbG von JULIEN *et al.* in einer Gencluster-Analyse mithilfe von Sequenzvergleichen als Adenylierung-Thiolierung-Didomäne mit ungewöhnlichem Substratspezifitätscode annotiert (vgl. Kapitel 1.5).<sup>[11]</sup> Zunächst sollte durch Homologie-Studien mit dem *Basic Local Alignment Search Tool*(BLAST)-Algorithmus<sup>[121]</sup> der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (ncbi)<sup>[122]</sup> auf die Funktion von AmbG geschlossen werden.

### 3.4 Untersuchung der Tailoring-Enzyme AmbG und AmbI



**Abbildung 31:** Ergebnis der Datenbanksuche mit der BLAST-CDD in der Standard-Ansicht (aufgerufen am 08.05.2017).<sup>[129]</sup>

In einer Suchanfrage mit der BLAST-basierten *Conserved Domain Database* (CDD)-Datenbank<sup>[129]</sup> wurde AmbG in zwei Domänen-Superfamilien unterteilt (Abb. 31): Eine N-terminale *adenylate forming domain(AFD)\_class\_I*-Domäne sowie eine C-terminale PKS\_PP(ACP)-Domäne mit dem konservierten S654 für die 4'-Phosphopantetheinylierung (vgl. Schema 1 in Kapitel 1.1). Dass AmbG eine ACP- anstelle einer PCP-Domäne aufweist, wird auch durch den niedrigen isoelektrischen Punkt (pI) von 4.5 bestärkt, da PCP-Domänen in der Regel einen pI von 6–7 besitzen, ACP-Domänen dagegen meist einen pI von  $\sim 3.8$ .<sup>[130]</sup>

```

Feature 2          # ##### ##
3KXW_A            170 AFLQYISGSIHPKGVXVSHHLL. [4].KIFT. [ 5].DETIIFSWLP. [1].HH    DXGL. [1].GCILTP 230
query            185 AMLQYASGSIGGAPKGTIVTHASLL    MLAR. [13].RPDVEVTWLP. [1].TH. [3].GYGL. [1].MKCLTG 252
gi 15610937      189 AYLQYISGSIRIPSGVQITHLNLP. [4].QVLN. [ 5].EGDRGVSWLP. [1].FH    DMGL. [1].TVLLAS 249
gi 45580865     167 ALLQYISGSIGDPKGVVTHDNIL. [4].ACVR. [ 5].DDWRVGGWLP. [1].YH    DLAM. [1].GLLNMA 227
gi 104784428    164 AFIQYISGSIGDPKGAVISHANLV. [4].MIQS. [ 5].EHIVGVNWLP. [1].FH    DMGL. [1].GNVLQP 224
gi 115374230    193 SFLQYISGSIATPKGVMTHANLV. [4].ALTS. [ 5].RDSTLVCWLP. [1].FH    DMGL. [1].GNVIHA 253
gi 126656771   168 AFLQYISGSISLPGVMISHSNCL. [4].MALS. [ 5].PESTFVSWLP. [1].YH    DLGL. [1].AHLLHS 228
gi 149918202   197 AFLQYISGSIGTPKGVMIGHDNLL. [4].FAHE. [ 5].EGSVTVSWLP. [1].YH    DMGL. [1].GSLLYP 257
gi 152975600   170 AYFQMTSASIGDGKAVAISHGNII. [4].GIHN. [ 5].QSEKVCSWLP. [1].YH    DMGL. [1].GAELFS 230
gi 81671744    166 SYLQYISGSIANPRGVLSMRNVI. [4].QIIR. [11].LPSSVVSWLP. [1].YH    DMGL. [1].VGLFIP 232

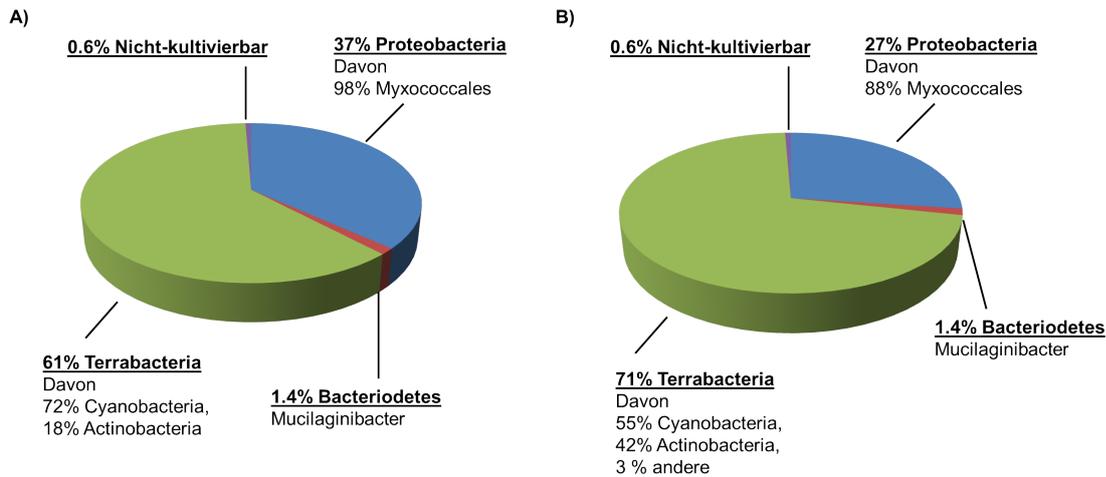
```

**Abbildung 32:** Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments (MSA) von CDD,<sup>[129]</sup> welches AmbG als „query“ und eine Consensus-Sequenz als „3KXW\_A“ enthält. Die konservierten AS des AAE-Motifs sind gelb hervorgehoben.

Die *AFD\_class\_I*-Domäne enthält das AAE-Motif mit einer Punktmutation [STG]190A (Abb. 32, vgl. Kapitel 1.3).<sup>[43]</sup> Als spezifischer Treffer für die ADF-Domäne aus AmbG wurde mit der CDD-Suche eine *fatty acyl adenylate ligase*(FAAL)-Domäne erhalten (Abb. 31). AmbG zeigt sowohl große Ähnlichkeit zur FAAL-Consensus-Sequenz (Anhang, Abb. 65) als auch die charakteristische FAAL-Insertion im MSA mit einer repräsentativen FACL-, A\_NRPS- und Luciferase-Domäne (Anhang, Abb. 66, vgl. Kapitel 1.3). Im Widerspruch dazu steht jedoch, dass auch eine Acyl-CoA Synthetase (AS 12–590, GenBank.: PRK05850) als spezifischer Treffer erhalten wurde. Diese umfasst mehr als eine Domäne und wird keiner Domänen-Superfamilie zugerechnet.

Auch mit dem MINOWA-Algorithmus der *antiSMASH*-Datenbank wurde die AFD-Domäne als CoA-Ligase annotiert.<sup>[131]</sup> Im Folgenden wird die N-terminale Domäne von AmbG daher unter dem Oberbegriff „ANL“-Domäne (nach GULICK für Acy-CoA Synthetasen, NRPS Adenylierungs-Domänen und Luciferasen<sup>[40]</sup>) geführt.

Der BLAST-Treffer mit der höchsten Sequenzidentität ist die uncharakterisierte NRPS aus dem myxobakteriellen Stamm *Minicystis rosea* (GenBank: APR76554.1). Dieser Treffer hat jedoch bei 37% Identität nur eine Sequenzabdeckung von 76% und schließt die ACP-Domäne nicht ein. Der maximale *Alignment-Score*-Wert wird mit dem uncharakterisierten *hypothetical protein* aus *Mucilaginibacter* sp. OK098 (GenBank-Nr.: WP\_073406506.1) mit einer geringen Identität von 32% erhalten (94% Sequenzabdeckung). Somit sind gemäß einer AS-sequenzbasierten Analyse in der ncbi-Datenbank keine nah verwandten Homologe zur AmbG-Domäne vorhanden.



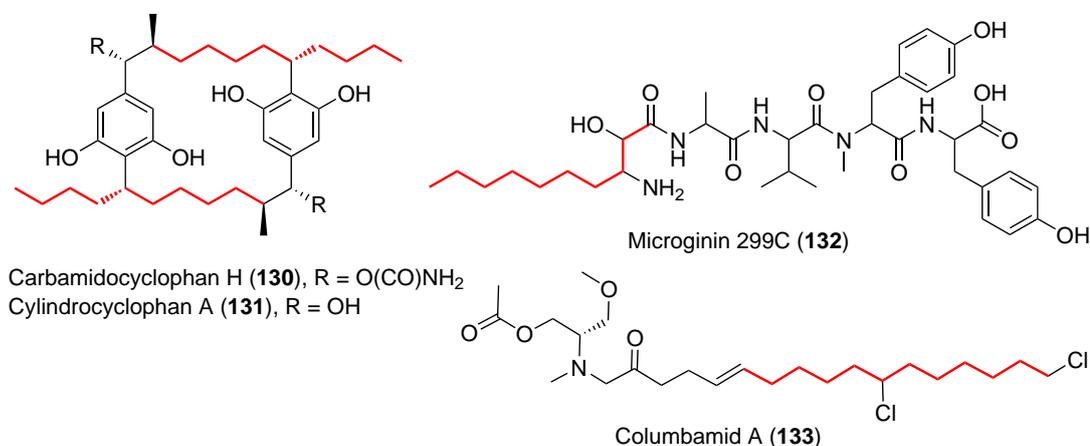
**Abbildung 33:** Taxa der 99 besten BLAST-Treffer für A) die Didomäne AmbG und B) die ANL\_AmbG-Domäne.

Interessanterweise stammen die meisten BLAST-Treffer für AmbG aus dem Myxococcales-Stamm *S. cellulosum* (vgl. Kapitel 1.2) nicht aus dem Phylum der Proteobacteria sondern der Terrabacteria (Abb. 33, A). Wurde lediglich die AS-Sequenz der ANL-Domäne für die BLAST-Analyse verwendet, verringerte sich der Anteil der Proteobacteria von 37% auf 27%. Demzufolge ist die Ähnlichkeit von AmbG zu anderen myxobakteriellen Proteinen vor allem auf die ACP-Domäne zurückzuführen. In phylogenetischen Distanzbäumen der BLASTp-Ergebnisse wurden sowohl AmbG als auch ANL\_AmbG jeweils als *Outgroup* platziert (Anhang, Abb. 71 und Abb. 72). Das bedeutet, dass sämtliche Treffer untereinander eine höhere Homologie als zu AmbG bzw. ANL\_AmbG aufweisen.

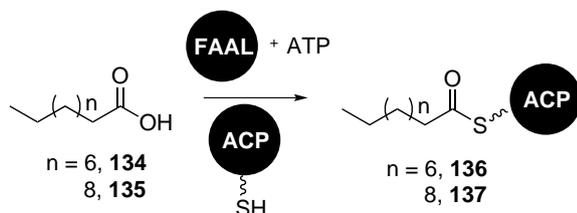
Weitere BLAST-Analysen zur Funktion von AmbG wurden ausschließlich mit der ANL-Domäne durchgeführt, da die ACP-Domäne aufgrund der hohen Sequenz-Konservierung die Ergebnisse offenbar zu stark gewichtet. Der BLAST-Treffer mit dem besten *Alignment-Score* ist mit 39% Identität eine uncharakterisierte *Long Chain Fatty Acid:CoA-Ligase* aus *Cystobacter fuscus* DSM 2262 (GenBank: EPX59373). Die höchste Identität zur ANL\_AmbG-Domäne weist die NRPS aus dem Myxobakterium *Cystobacter ferrugineus* (GenBank: WP\_071902720.1) mit 40% bei 99% Sequenzabdeckung auf.

Die Identitäten der 93 besten BLASTp-Treffer sind alle jeweils geringer als 40%. Von diesen sind 42 N-terminale FAAL-Domänen aus multimodularen Protein-komplexen, 14 sind FAAL-*Carrier-Protein*-Didomänen und 36 sind einzelstehende FAALs (Anhang, Abb. 67–70). Keine der Didomänen oder Cluster-eingebetteten FAALs wurden bisher biochemisch charakterisiert. Die Domänenabfolge der Cluster scheint in der Regel Lipopeptid-assoziiert und konserviert (FAAL → PKS\_PP → C → A\_NRPS → PP) zu sein. Außerdem konnten lediglich acht Treffer für PKS-Cluster gefunden werden.

A)



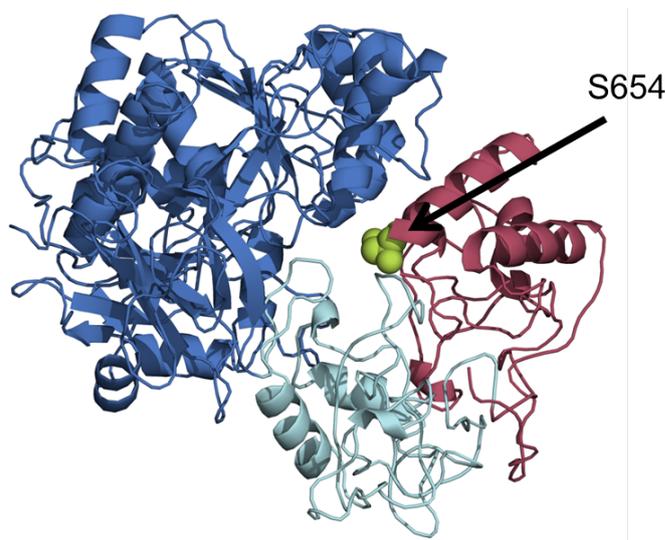
B)



**Schema 20:** Auswahl an Naturstoffen, bei denen eine FAAL mit 34% Identität zu ANL\_AmbG am Einbau einer Fettsäure-Einheit (in A) rot markiert) vermutlich beteiligt ist. B) Postulierte Funktion der FAALs.<sup>[132–135]</sup>

Einige BLASTp-Treffer (mit je 34% Identität zu ANL\_AmbG) repräsentieren einzelständige FAALs aus Cyanobakterien. Für diese wurde postuliert, dass sie am Einbau von Fettsäuren in multimodulare PKS- oder hybride PKS/NRPS-Naturstoffe beteiligt sind. Demnach aktivieren sie die Carbonsäuren als Acyl-Adenylate und übertragen sie anschließend als Startbausteine auf die PPant-Reste einzelständiger ACP-Domänen (Schema 20, B). CylA (GenBank: AFV96135) und sein Ho-

molog CabA (GenBank: AMB48444) aktivieren vermutlich Decansäure (**134**) während der Biosynthese des [7.7]-Paracyclophan-Grundgerüsts für Cylihydrocyclophan (**131**) bzw. Carbamidocyclophan (**130**).<sup>[132,133]</sup> Für ColA (GenBank: AKQ09578) aus der Columbamid(**133**)-Biosynthese wurde vermutet, dass es Dodecansäure (**135**) aktiviert und PuwC (GenBank: AIW82280) aus der Biosynthese des komplexen Cyclopeptids Puwainaphycin akzeptiert voraussichtlich Nonansäure oder Undecansäure.<sup>[134,136]</sup> Darüber hinaus ist eine AMP-abhängige Acyl-CoA Synthetase (GenBank: CUR29756) wahrscheinlich an der Biosynthese von 3-Amino-2-hydroxy-decansäure als Startbaustein für Microginin (**132**) beteiligt (Schema 20, A).<sup>[135]</sup>

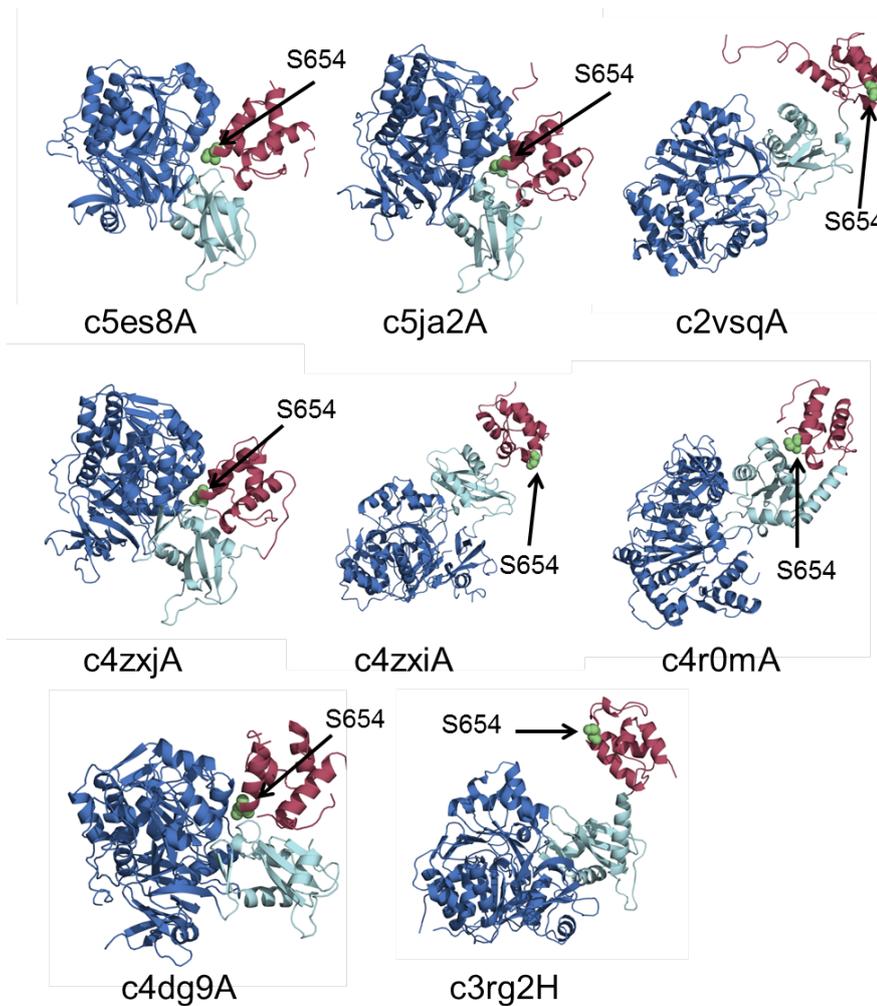


**Abbildung 34:** Finales Strukturmodell für die Didomäne AmbG, erstellt mit Phyre<sup>2</sup><sup>[125]</sup> anhand der 10 besten Strukturhomologen. Die ACP-Domäne (rot) mit dem S654 für die 4'-Phosphopantetheinylierung (grün) ist mit der ANL-Domäne mit einer großen N-terminalen (dunkelblau) sowie einer kleineren C-terminalen Subdomäne (hellblau) verbunden.

Es wurde ein Homologie-Modell für AmbG mit der webbasierten *Protein Homology/analogy Recognition Engine* (Phyre<sup>2</sup>)-Software<sup>[125]</sup> erstellt und die Struktur untersucht. Die Sekundärstruktur konnte mit hoher Verlässlichkeit bestimmt werden (Anhang, Abb. 62 und Abb. 63). Aus den 8 besten Strukturhomologen wurde mit 91–94% Sequenzabdeckung (Anhang, Abb. 64) ein finales Strukturmodell erstellt, bei dem 94% der AS-Reste mit >90% Konfidenz modelliert wurden. Obwohl

die für die Modellierung verwendeten Strukturen nur 19–22% AS-Sequenzidentität aufweisen, besitzen sie mit 100% Konfidenz homologe Strukturen. Dies zeigt die im Allgemeinen hohe Strukturhomologie von ANL-Domänen bei geringer Sequenzidentität von bis zu ca. 30% (vgl. Kapitel 1.3).<sup>[40]</sup>

Im finalen Modell ist die typische Domänenarchitektur von ANL-Domänen zu erkennen (Abb. 34). Diese besteht aus einer großen N-terminalen und einer kleineren C-terminalen Subdomäne. Zwischen diesen ist in der Regel die Bindetasche lokalisiert (vgl. Kapitel 1.3).<sup>[45]</sup> Im Rahmen der Phyre<sup>2</sup>-Analyse wurde das Modell an die Webseite *3D-LigandSite*<sup>[137]</sup> des *Imperial College London* zur Vorhersage einer Bindetasche übermittelt. Aufgrund zu geringer Homologien zu verfügbaren Strukturen konnte jedoch keine Vorhersage getroffen werden.



**Abbildung 35:** Darstellung der Strukturmodelle für AmbG, basierend auf den acht besten Strukturhomologen. Die ACP-Domänen sind rot dargestellt und die ANL-Domänen blau mit einer großen N-terminalen (dunkelblau) sowie einer kleineren C-terminalen Subdomäne (hellblau).<sup>[125]</sup> Die Namen der Modelle beziehen sich auf Abb. 64 im Anhang.

Die ACP-Domäne ist durch einen Linker mit der ANL-Domäne verknüpft, dessen Struktur nicht in allen Modellen modelliert worden ist (Abb. 35). Für einige Modelle konnten jedoch mit hoher Verlässlichkeit zwei Orientierungen der Domänen zueinander vorhergesagt werden.

In Modellen, welche große Übereinstimmungen mit der Gramicidin A Synthetase Untereinheit A im „*thiolation state*“ zeigen (Abb 35, c5es8A, c5ja2A, c4zxjA und c4dg9A), ist die ACP-Domäne wie ein „Deckel“ zur vorhergesagten Bindetasche zwischen den ANL-Subdomänen orientiert. Dabei zeigt das konservierte S654 für die Phosphopantetheinylierung in die Bindetasche.<sup>[138]</sup>

Für Modelle, die ähnlich zur Surfactin Synthetase, Untereinheit 3 im „*open state*“ sind, ist der Linker so orientiert, dass die ACP-Domäne von der Bindetasche entfernt ist (Abb. 35, c2vsqA, c4zxiA, c4r0mA und c3rg2H).<sup>[139]</sup> Dies lässt eine konformationelle Flexibilität vermuten, sodass das beladene Substrat für weitere Prozessierung oder zur Weiterreichung auf ein anderes Enzym präsentiert wird (vgl. Kapitel 1.3).<sup>[40]</sup> Dies wurde bereits in strukturellen Studien für das Gramicidin Synthase Initiationsmodul beschrieben.<sup>[138]</sup> Homologie-basierte Modelle haben den prinzipiellen Nachteil, dass sie abhängig sind von der Präsenz homologer charakterisierter Proteinstrukturen in der verwendeten Datenbank. Daher spiegeln sie jeweils ausschließlich den aktuellen Kenntnisstand wider und gehen nicht darüber hinaus.

Im Anschluss an die homologiebasierte Strukturanalyse wurde mithilfe verschiedener spezialisierter Datenbanken die Substratspezifität der ANL-Domäne untersucht.

BEST MATCH	SCORE	E-VALUE	NUMBER OF DOMAINS	ALIGNMENTS
NRPS	54.1	3e-22	1	<a href="#">1</a>
LONG CHAIN	43.2	2.4e-19	1	<a href="#">1</a>
COUMARATE	-50.2	1.5e-11	1	<a href="#">1</a>
MEDIUM CHAIN	-238.4	2.5e-10	1	<a href="#">1</a>
LUCIFERASE	-226.8	2.4e-09	1	<a href="#">1</a>
ACETYL	-293.3	2.5e-09	1	<a href="#">1</a>

**Abbildung 36:** Substratpräferenz für ANL\_AmbG mit dem HMMER-Algorithmus des webbasierten *ACS prediction tool*.<sup>[140]</sup>

Von KHURANA *et al.* wurde mit dem *ACS prediction tool* eine webbasierte Vorhersage-Software für die Spezifität von AFD-Enzymen entwickelt.<sup>[140]</sup> Auf deren Grundlage soll eine Gruppierung in die verschiedenen AFD-Unterklassen möglich sein (Abb. 36, vgl. auch Kapitel 1.3). Mit beiden Algorithmen dieser Software konnten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse für die Substratpräferenz erhalten werden. Der *Hidden Markov Model*-basierte HMMER-Algorithmus annotierte ANL\_AmbG als eine A\_NRPS oder *Long Chain*-Acyl:CoA-Ligase (Abb. 36).

BEST MATCH	TEMPLATE ACTIVE SITE RESIDUES	QUERY ACTIVE SITE RESIDUES	RAW SCORE	PERCENTILE	ALIGNMENT
LONG CHAIN	HGFFLAGGGYGLSAK	HSTYSMMGGYGMVVS	5.741	16.19	<a href="#">Long chain CoA ligases</a>
COUMARATE	HGFFLAGGGYGLSAK	SYGMNMMGGYGMVVK	3.615	8.532	<a href="#">Coumarate CoA ligases</a>
MEDIUM CHAIN	HGFFLAGGGYGLSAK	HSTYYMMGGYGMVVK	3.084	8.104	<a href="#">Medium chain CoA ligases</a>
NRPS	FDAWTIAGAYGPICK	AGYISMGGYGMVVK	-9.523	-	<a href="#">NRPS</a>
LUCIFERASE	HGFFLAGGGYGLSAK	HSTYYMMGGYGMVVK	-4.043	-	<a href="#">Luciferases</a>
ACETYL	WVTSYGVGTWWQGFK	HSTYYMMGGYGMVVK	-7.825	-	<a href="#">Acetyl CoA ligases</a>

**Abbildung 37:** Substratpräferenz für ANL\_AmbG mit der PSSM-15-Matrix des webbasierten *ACS prediction tool*.<sup>[140]</sup>

Hingegen wurden nach der Mustersuche mit der *position-specific scoring matrix* (PSSM)-15-Matrix lang- oder mittelkettige Fettsäuren sowie *p*-Hydroxyzimtsäure (*Coumarate*) als bevorzugte Substrate vorgeschlagen (Abb. 37).

AmbG_m1 Location: [145,307] ADomain PFAM score: -13.6		Score	Precision
Signatures	LALLHSTAGYGMYSMSMGEIAGYGMSETGYVSGS / STYYMMGYV-		
NRPSpredictor1	Prediction		
Small Clusters	phe-tp	0.407841	0.671
NRPSpredictor2	Prediction		
Three Clusters	hydrophobic-aliphatic	0.130770	0.974
Nearest Neighbor	abu	30 %	-

**Abbildung 38:** Substratpräferenz für ANL\_AmbG mit dem NRPSpredictor1 sowie dem NRPSpredictor2.<sup>[141]</sup>

Mit der NRPSpredictor2-Software<sup>[141]</sup> der *Universität Tübingen*, welche für die Anwendung auf A\_NRPS spezialisiert ist, war das Signatur-Motif der Adenylierungsspezifität nicht innerhalb des Anwendungsgebiets. Mit niedrigen *Score*-Werten wurde ein hydrophobes-aliphatisches Substrat (im Speziellen 2-Aminobuttersäure (abu)) vorgeschlagen.

Im Gegensatz dazu steht das Ergebnis mit dem NRPSpredictor1 für Phenylalanin oder Tryptophan als beste Treffer (Abb. 38). Mit dem NRPSpredictor<sup>[142]</sup> wurde das beste Ergebnis wiederum für ein apolares, aromatisches Substrat (*Score*: 0.407841, Präzision: 0.671) erhalten.

1 Adenylation domains founded in the sequence AmbG (see alignments)

Protein Identifier	Adenylation domain start position	Adenylation domain end position	Substrate	Substrate Name	Score?	Prediction-conditioned fallout?	Alignments
AmbG	0	442	F	Phenylalanine	138.5	0.1516	<a href="#">view</a>

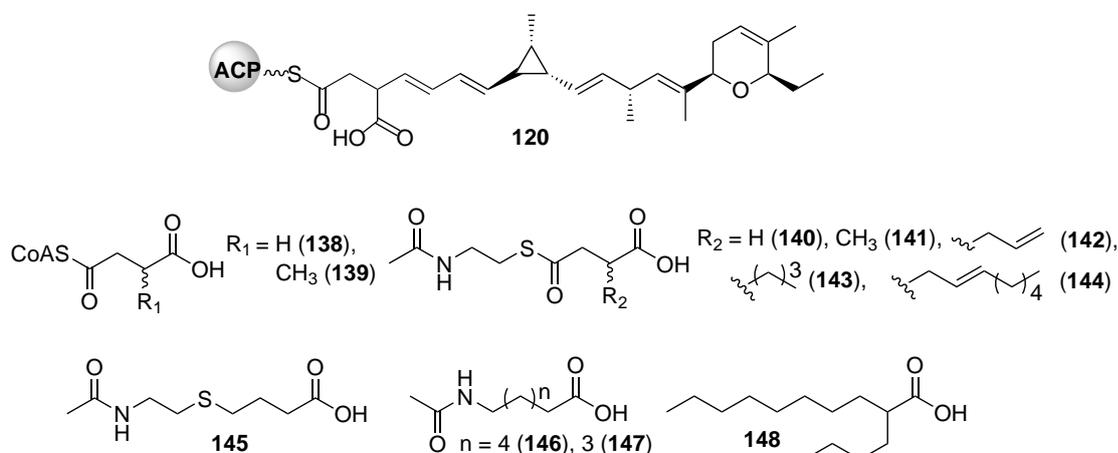
**Abbildung 39:** Substratpräferenz für ANL\_AmbG mit dem NRPSp-Algorithmus.<sup>[143]</sup>

Mithilfe des textbasierten *latent semantic indexing*(LSI)-Algorithmus<sup>[144]</sup> konnte keine Bindetasche detektiert werden. Eine Suchanfrage an den *Non-Ribosomal Peptide Synthase Substrate Predictor*(NRPSp) ergab Phenylalanin als bestes Substrat mit wiederum geringem *Score*-Wert (Abb. 39).<sup>[143]</sup>

Bei gemeinsamer Betrachtung aller Ergebnisse, wurde AmbG reannotiert als ungewöhnliche ANL-ACP Didomäne mit signifikanter Ähnlichkeit zu FAALs. Es konnte jedoch keine der ANL-Subfamilien komplett ausgeschlossen werden, da AmbG mit verschiedenen Methoden außerdem als A\_NRPS, *Medium/Long-Chain Acyl:CoA-Ligase* oder *Aryl:CoA-Ligase* annotiert wurde. Für die Funktion von AmbG kann anhand homologie-basierter Strukturmodelle sowie Sequenzvergleiche vermutet werden, dass die ANL-Domäne eine Carbonsäure als Adenylat aktiviert und auf die benachbarte ACP-Domäne überträgt.

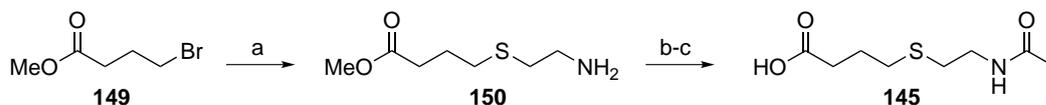
Die verwendeten Algorithmen zur Vorhersage der Substratspezifität ließen keine eindeutigen Aussagen zu und waren zudem widersprüchlich. Je nach Algorithmus wurden für ANL\_AmbG Fettsäuren verschiedener Kettenlänge, aromatische Säuren oder hydrophobe Aminosäuren als wahrscheinlichste Substrattypen vorgeschlagen. Dies lässt auf ein ungewöhnliches natürliches Substrat schließen oder auf eine hohe Promiskuität der Substratpräferenz. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Enzymaktivitätstests ein breites Substratspektrum für AmbG getestet.

## 3.4.2 Synthetische Arbeiten



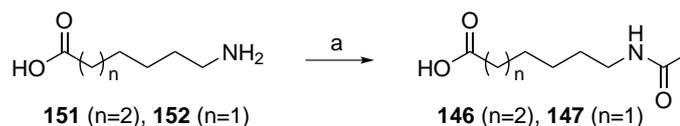
**Abbildung 40:** Übersicht der Surrogate für das postulierte Biosynthese-Intermediat **120** (vgl. Schema 16 in Kapitel 3.1). Die Succinoyl-Halbthioester **138–144** wurden bereits im Rahmen einer Masterarbeit synthetisiert und getestet.<sup>[126]</sup>

Es wurden Surrogate **145–148** für das postulierte Biosynthese-Intermediat **93** synthetisiert, um die Rolle der Didomäne AmbG während der Ambruticin-Biosynthese zu untersuchen (Abb. 40). Die Succinoyl-Halbthioester **138–144** wurden bereits im Rahmen einer Masterarbeit synthetisiert und getestet.<sup>[126]</sup> Dabei wurde gezeigt, dass diese unter den Testbedingungen zu den entsprechenden Bernsteinsäure-Anhydriden cyclisierten. Aus diesem Grund wurden die Hydrolyse-unempfindlichen Surrogate **145–148** bereitgestellt.



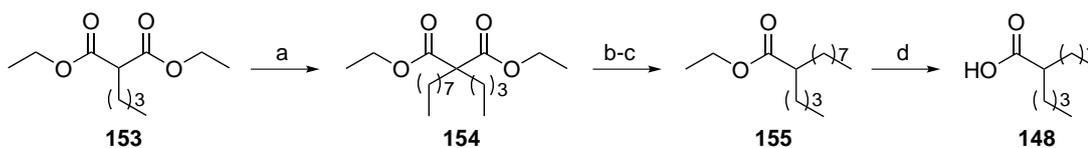
**Schema 21:** Darstellung des Thioether-Surrogats **145**. a) Cysteamin-HCl, NaOH, EtOH, RT, 18 h, 23%; b) TEA, AcCl, MeOH, 0 °C – RT, 18 h, 84%; c) LiOH·H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O:THF (3:1), 50 °C – RT, 13 h, 73%.

Ausgehend von Methyl-4-bromobutyrat (**149**) und Cysteamin-HCl wurde der Thioether **150** über eine nukleophile Substitution erhalten. Die Acylierung des primären Amins mit AcCl und anschließende Entschützung des Methylesters mit LiOH ergab Thioether-Surrogat **145** (Schema 21).



**Schema 22:** Synthese der Acetamide **146** und **147**. a) TEA, AcCl, MeOH, 0 °C – RT, über Nacht, **146** = 27%, **147** = 23%.

Die Acetamide **146** und **147** wurden durch *N*-Acylierung der entsprechenden Amine **151** und **152** erhalten (Schema 22).



**Schema 23:** Synthese von 2-Butyldecansäure (**148**) nach HWANG *et al.*.<sup>[145]</sup> a) C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>Br, NaOEt, EtOH, Reflux, 5 h, 57%; b) KOH, H<sub>2</sub>O, Reflux, 8 h; c) 180 °C, 2 h, 42% über zwei Stufen, d) KOH, H<sub>2</sub>O, Reflux, 13 h, 87%.

Die Darstellung von 2-Butyldecansäure (**148**) wurde nach einer literaturbekannten Syntheseroute nach HWANG *et al.* durchgeführt.<sup>[145]</sup> Diethylbutylmalonate (**153**) wurde mit 1-Bromooctan alkyliert und 2-Butyldecansäure (**148**) anschließend durch eine Verseifungs-/Decarboxylierungssequenz erhalten (Schema 23).

### 3.4.3 Molekularbiologische Arbeiten und Enzymgewinnung

Die Tailoring-Enzyme AmbG und AmbI sollten als funktionale, lösliche Proteine in *in vitro*-Rekonstitutions-Assays mit geeigneten Substraten eingesetzt werden. Aus diesem Grund sollte eine heterologe Überexpression der entsprechenden biosynthetischen Gene im Modellorganismus *E. coli* erfolgen. Die Gene *ambG* und *ambI* wurden als synthetische Gene in pUC19-Vektoren über die Firma Gen9 bezogen und die DNA-Sequenzen zuvor einer computergestützten Optimierung (Gen9-Software) für das Codon-Repertoire in *E. coli* unterzogen (vgl. Erläuterungen zum Codongebrauch in Kapitel 3.2.1.1).

#### 3.4.3.1 Klonierung von *ambG* und *ambI* in verschiedene Expressionsvektoren

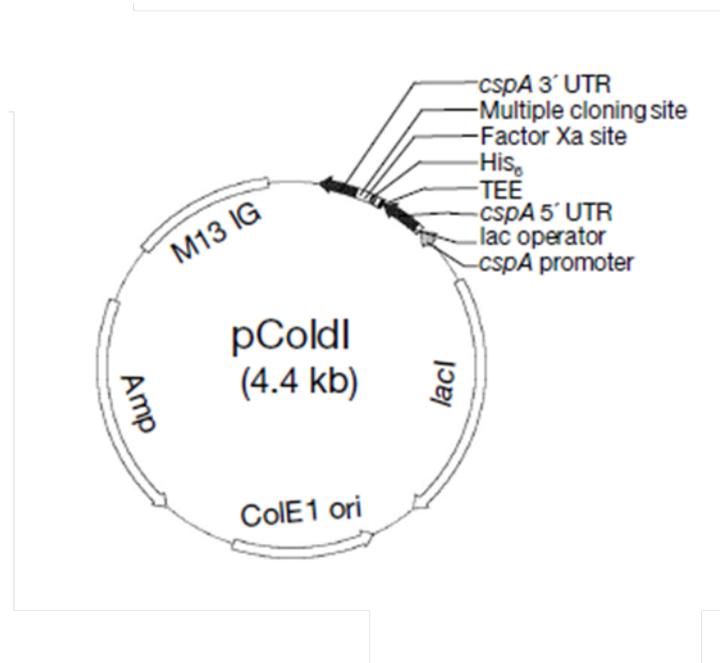
Die Expressionsvektoren pET28a(+), pGEX-6P-1, pET32a(+) sowie pColdI bieten verschiedene Löslichkeits- oder Affinitäts-Tags (Tab. 5).

**Tabelle 5:** Charakteristika der verwendeten Expressionsvektoren. Die Tags wurden jeweils am 5'-Ende angefügt für die Produktion N-terminaler Fusionsproteine und beziehen sich auf die gewählten Leseraster bzw. Restriktionsmuster.

Bezeichnung	Tags (Protease-Schnittstelle)	Selektionsmarker
pET28a(+)	His <sub>6</sub> -Tag (Thrombin)	Kanamycin
pET32a(+)	Trx-Tag, His <sub>6</sub> -Tag (Thrombin), S-Tag (Enterokinase)	Ampicillin
pGEX-6P-1	GST-Tag (PreScission™)	Ampicillin
pColdI	His <sub>6</sub> -Tag (Faktor Xa)	Ampicillin

Bis auf den S-Tag wurden diese bereits in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Der S-Tag (15 AS, 2 kDa) wird für die Affinitätschromatographie sowie eine colorimetrische Detektion in Immunfärbungen von Western Blots genutzt. Er stellt das

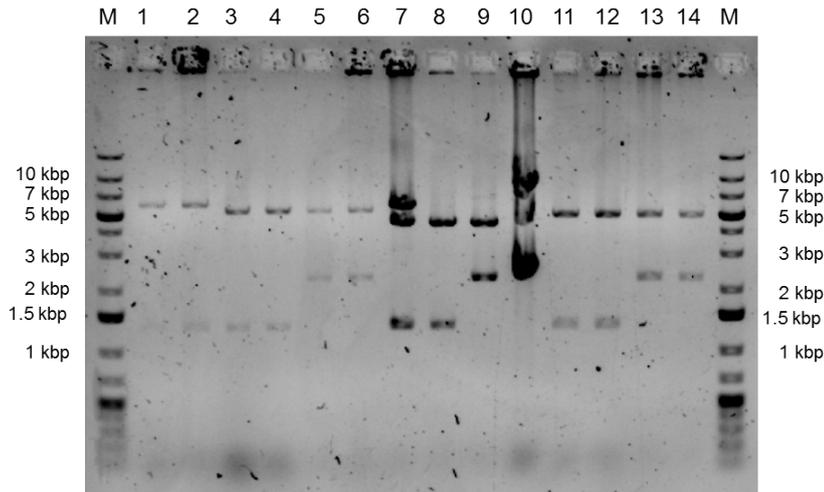
N-terminale proteolytische Spaltprodukt der RNase A dar, sodass Detektionssysteme auf der Rekonstitution der RNase-Aktivität nach Interaktion mit dem C-terminalen Spaltprodukt (S-Protein) basieren.<sup>[146]</sup> Die Tags können anschließend ggf. durch Protease-Schnittstellen vom aktiven Protein entfernt werden.



**Abbildung 41:** Schematische Darstellung des pColdI-Expressionsvektors, übernommen von Qing *et al.*<sup>[147]</sup>

Alle verwendeten Expressionsvektoren außer pColdI besitzen den pBR322-ori und den T7-Promotor. Der pColdI-Expressionsvektor basiert auf dem pUC118-Vektor mit dem ColE1-ori, bei dem der Kälteschock-Promotor *cspA* sowie der *cspA* 5'-UTR (*engl. untranslated region*, untranslatierter Bereich) und die *cspA* 3'-Transkriptions-Terminatorsequenz eingebracht wurden (Abb. 41).<sup>[147]</sup> Zusätzlich ist vor der *cspA*-Transkriptions-Initiationssequenz die *lac*-Operator-Sequenz geschaltet, sodass durch die konstitutive Expression des *lacI*-Gens eine Basaltranskription des eingebrachten Gens bei 37 °C verhindert wird.

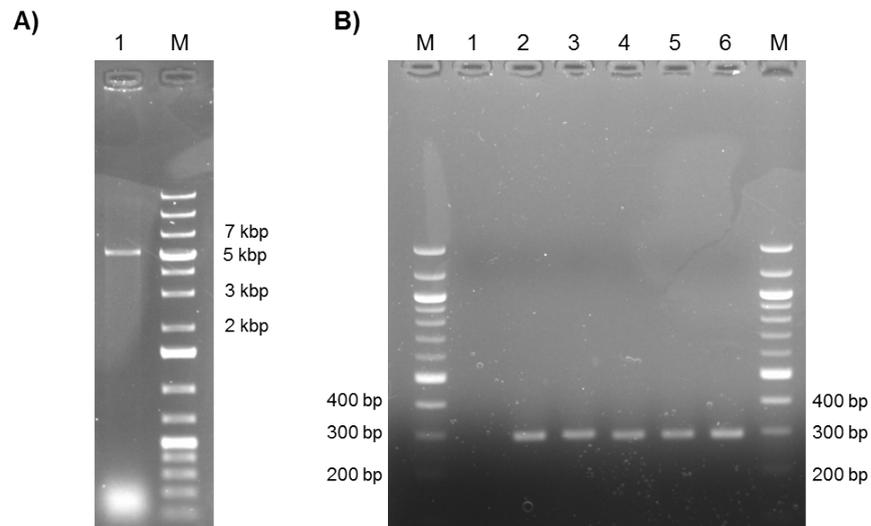
Die Genexpression wird entsprechend durch einen Kälteschock und die Zugabe von IPTG induziert. Weiterhin ist ein *translation-enhancing element* (TEE) direkt hinter dem *cspA* 5'-UTR eingebaut, welches die Transkriptions-Initiationsrate erhöht.<sup>[148]</sup>



**Abbildung 42:** Testrestriktionen von Expressionsvektoren mit *ambI* oder *ambG* mit *NdeI/EcoRI* (N/E) oder *EcoRI/XhoI* (E/X); 0.7% [w/v] Agarose; M = 3  $\mu$ L *GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder*, Thermo Scientific; **1, 2** = pET32a(+)\_*ambI* K1 und K3 (E/X, 1329 + 5870 bp); **3, 4** = pET28a(+)\_*ambI* K1 und K3 (N/E, 1329 + 5327 bp); **5, 6** = pET28a(+)\_*ambG* K1 und K2 (N/E, 2229 + 5327 bp); **7, 8** = pColdI\_*ambI* K1 (negativ) und K2 (N/E, 1329 + 4380 bp); **9, 10** = pColdI\_*ambG* K1 (negativ) und K4 (N/E, 2229 + 4380 bp); **11, 12** = pGEX-6P-1\_*ambI* K1 und K2 (E/X, 1329 + 4889 bp); **13, 14** = pGEX-6P-1\_*ambG* K1 und K4 (E/X, 2229 + 4889 bp).

Die synthetischen Gene *ambI* und *ambG* wurden mittels PCR vervielfacht und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt (Tab. 25). Anschließend wurden *ambG* und *ambI* der allgemeinen Vorschrift für die Klonierung folgend in die vier beschriebenen Expressionsvektoren ligiert.

Anhand der korrekten DNA-Fragmentgrößen nach Testrestriktionen im Agarosegel war zu beobachten, dass die acht verschiedenen Vektor-Konstrukte erfolgreich erstellt wurden (Abb. 42, pET32a(+)\_*ambG* ist nicht gezeigt). Anschließend wurde die Identität der Vektor-Konstrukte *via* DNA-Sequenzierung verifiziert.

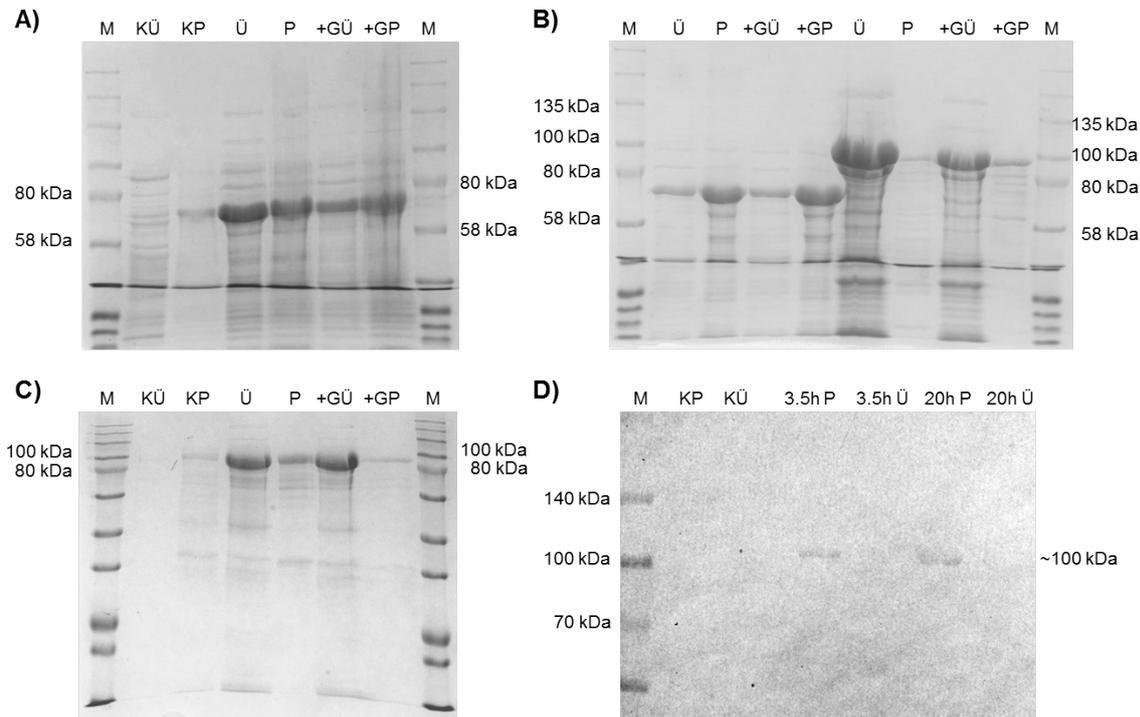


**Abbildung 43:** Klonierung von *acp\_ambG* in den pET28a(+)-Vektor. A) Restriktionsverdau des pET28a(+)-Vektors (**1**) mit *EcoRI* und *NdeI* (5 327 bp); 0.7% [w/v] Agarose; **M** = 3  $\mu$ L *GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder*, *Thermo Scientific*. B) Gradienten-PCR von ACP\_ambG (Tab. 26, 290 bp), **M** = 3  $\mu$ L *100 bp DNA ladder*, *NEB*; **1** = Wasserkontrolle; **2** = T<sub>H</sub> 67.4 °C; **3** = T<sub>H</sub> 68.1 °C; **4** = T<sub>H</sub> 68.7 °C; **5** = T<sub>H</sub> 69.3 °C; **6** = T<sub>H</sub> 69.9 °C; 2% [w/v] Agarose.

Die Domäne *acp\_ambG* wurde ausgehend vom pUC19\_ambG-Vektor mittels Gradienten-PCR erfolgreich bei T<sub>H</sub> = 67.4–69.9 °C amplifiziert und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt (Tab. 26; Abb. 43, B, Spuren 2–6)). Anschließend wurde *acp\_ambG* der allgemeinen Vorschrift für die Klonierung folgend in den linearisierten pET28a(+)-Expressionsvektor (Abb. 43, A) ligiert und der erhaltene Vektor pET28a(+)\_acp\_ambG mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

### 3.4.3.2 Heterologe Produktion von AmbG- und AmbI-Fusionsproteinen

Die Produktion von AmbG- und AmbI-Fusionsproteinen erfolgte jeweils ausgehend von den Expressionsvektoren pColdI, pGEX-6P-1, pET28a(+) und pET32a(+) im Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3).

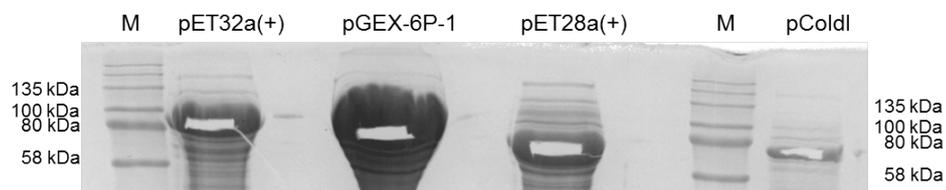


**Abbildung 44:** Expressionsstudien zu *ambG*, für A)–C) wurden mit 0.1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 16 °C die Proteine produziert. **M** = 5 μL *Color Pre-stained Protein Standard, Broad Range (NEB)*, **K** = nicht-induzierte Kontrolle, **Ü** = Überstand nach Zellyse, **P** = Pellet, **+G** = mit 1% [w/v] Glucose; A) Expression mit pET28a(+) = His<sub>6</sub>-AmbG, 82 kDa, 12%-iges SDS-Trenngel; B) Spuren 2–5: Expression mit pColdI = His<sub>6</sub>-AmbG, 82 kDa; Spuren 6–9: Expression mit pGEX-6P-1 = GST-AmbG, 106 kDa, 12%-iges SDS-Trenngel; C) Expression mit pET32a(+) = Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbG, 103 kDa, 15%-iges SDS-Trenngel; D) Nachweis von Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbG (103 kDa) nach Proteinproduktion mit 1 mM IPTG für 3.5 h bei 30 °C oder 20 h bei 16 °C mittels Immunfärbung nach Western Blot mit dem α-His<sub>6</sub>-Tag-Antikörper und dem Alkalische-Phosphatase Detektionssystem, 15%-iges SDS-Trenngel.

Der allgemeinen Vorschrift für die heterologe Genexpression folgend, wurden *E. coli*-Produktionskulturen mit pET28a(+)-, pGEX-6P-1- oder pET32a(+)-Vektor-konstrukten bis OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8 geschüttelt und jene mit pColdI bei OD<sub>600</sub> = 0.4–0.6 einem Kälteschock ausgesetzt. Anschließend wurde die Genexpression mit

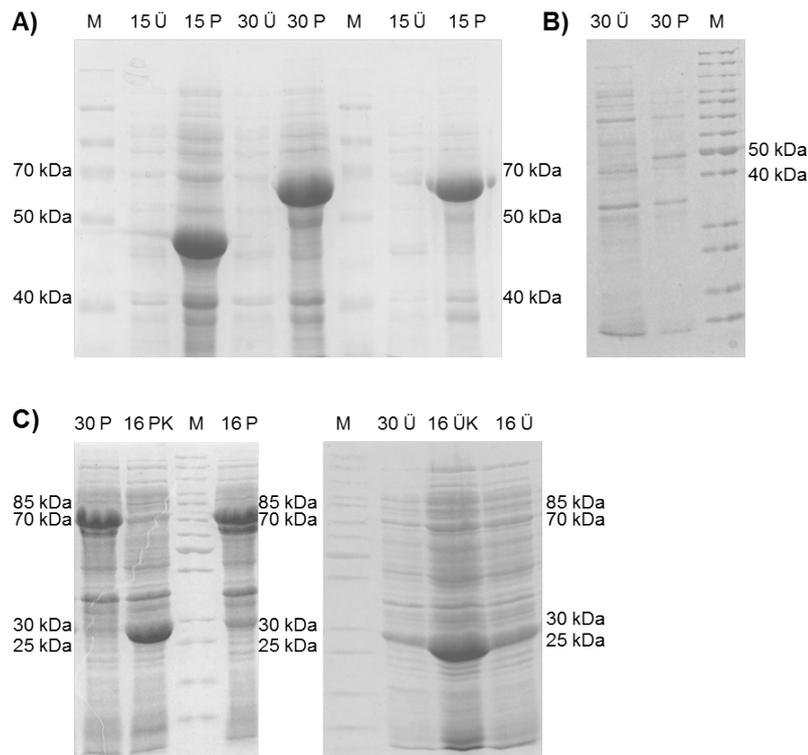
0.1 mM IPTG induziert und die Proteine über Nacht bei 16 °C produziert. Diese Produktionsbedingungen wurden im Vorfeld hinsichtlich IPTG-Konzentration und Temperatur für *ambG*-Konstrukte optimiert. Die Zellen wurden sedimentiert und in Lysepuffer (Tab. 15) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden Zelllysate und Sediment (im Folgenden als „Überstand“ und „Pellet“ bezeichnet) mithilfe der SDS-PAGE auf produzierte Fusionsproteine hin analysiert. Mit allen *ambG*-Vektorkonstrukten wurden unter den gewählten milden Bedingungen lösliche AmbG-Fusionsproteine im Überstand erhalten (Abb. 44, A–C). Dabei wurde die größte Menge löslicher Proteine mit der Expression von pGEX-6P-1\_ambG erzielt (Abb. 44, B, Spur 6). Die apparente Größe der Proteine war jeweils um ca. 10 kDa geringer als auf Basis der AS-Sequenz kalkuliert.

Eine weitere Produktionssteigerung löslicher Proteine sollte durch eine schonendere Induktion bewirkt werden, indem Produktionskulturen 1% [w/v] Glucose zugefügt wurde (Abb. 44, A-C, +G). Kulturmedien die Trypton enthalten (wie das 2TY-Medium), beinhalten unter Umständen Spuren des Induktors Lactose. Dies kann durch Zugabe von 0.2–1% [w/v] Glucose kompensiert werden.<sup>[149]</sup> Der *lac*-Promotor wird durch Glucose reprimiert, sodass die Induktion mit IPTG erst nach Verbrauch der Glucose eintritt und somit die Transkription zu Beginn langsamer erfolgt. Allerdings wurde für alle Expressionsvektoren eine Verschlechterung hinsichtlich Expression, Löslichkeit und Biomasseproduktion nach Glucose-Zugabe beobachtet.



**Abbildung 45:** Proben für die AS-Sequenzierung von AmbG-Fusionsproteinen. **M** = 5  $\mu$ L *Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB)*; **pET32a(+)** = Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbG, 103 kDa, *Score*: 9 112.45; **pGEX-6P-1** = GST-AmbG, 106 kDa, *Score*: 8 414.59; **pET28a(+)** = His<sub>6</sub>-AmbG, 82 kDa, *Score*: 10 092.02; **pColdI** = His<sub>6</sub>-AmbG, 82 kDa, *Score*: 6 730.21; 15%-iges SDS-Trenngel.

Ausschließlich das Fusionsprotein Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbG konnte durch einen Western Blot nach Immunfärbung mit dem  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-Tag-Antikörper und dem Alkalische-Phosphatase Detektionssystem im Pellet nachgewiesen werden (Abb. 44, D, Spuren 4 und 6). Die Identität aller AmbG-Fusionsproteine aus Überständen nach der Zellyse wurde jedoch mithilfe der AS-Sequenzierung mit hohen Konfidenzwerten (*Scores* >50) bestätigt (Abb. 45).



**Abbildung 46:** Expressionsstudien zu *ambI*.  $\ddot{U}$  = Überstand nach Zellyse, **P** = Pellet, **K** = nicht-induzierte Kontrolle, 12% Trenngele; A) Spuren **2 + 3**: Expression mit pColdI = His<sub>6</sub>-AmbI, 52 kDa; Spuren **4–8**: Expression mit pET32a(+) = Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbI, 72 kDa; B) Expression mit pET28a(+) = His<sub>6</sub>-AmbI, 52 kDa; A) + B) **M** = 5  $\mu$ L *PageRuler Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*); C) Expression mit pGEX-6P-1 = GST-AmbI, 76 kDa, **M** = 5  $\mu$ L *PageRuler Unstained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*).

Für *ambI* konnten unter den oben beschriebenen Bedingungen eine starke Überexpression mit allen Expressionsvektoren beobachtet werden, die jedoch in überwiegend unlöslichen AmbI-Fusionsproteinen nach der Zellyse resultierte (Abb. 46). Mit einer Proteinproduktion bei 30 °C für 3 h wurde die maximale Menge unlöslicher Proteine mit pET32a(+)-*ambI* erhalten. Die apparente Größe im SDS-

Gel war für AmbI-Fusionsproteine ebenfalls um ca. 10 kDa geringer als berechnet. Außerdem war eine Überexpression eines ca. 30 kDa-großen Proteins in den nicht-induzierten Kontrollen mit pGEX-6P-1\_ambI zu beobachten, welches mit der Größe der vektor-codierten  $\beta$ -Lactamase übereinstimmt.

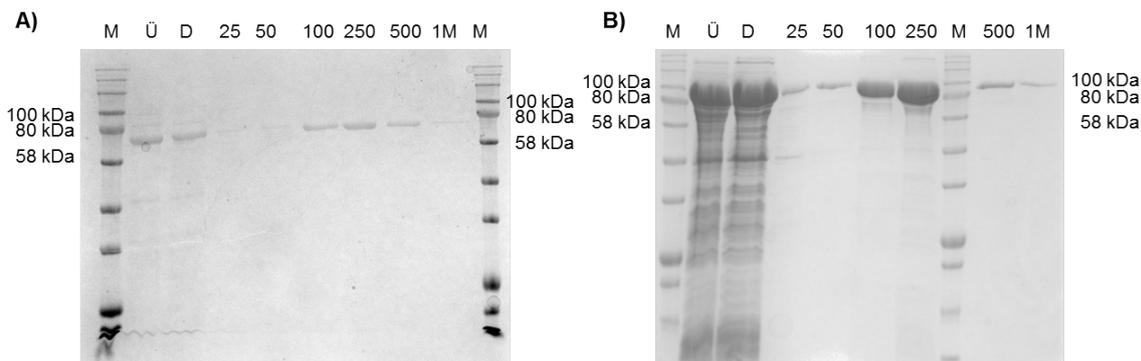
Der Nachweis von His<sub>6</sub>-AmbI oder Trx-His<sub>6</sub>-S-AmbI nach Western Blot und Immunfärbung mit dem oben beschriebenen Detektionssystem war nicht erfolgreich. Mit Hinblick auf die Ergebnisse für AmbG weist dies auf eine zu geringe Nachweisgrenze mit diesem System hin. Alternativ könnte der His<sub>6</sub>-Tag am N-Terminus der AmbI-Fusionsproteine zum Proteininnern hin orientiert sein, sodass er nicht als Epitop erkannt wird.

Allerdings wurde His<sub>6</sub>-AmbI im Rahmen einer Masterarbeit mithilfe von Protein-MS nachgewiesen (200 ppm Abweichung). Weiterhin gelang es im Rahmen der erwähnten Masterarbeit, lösliche His<sub>6</sub>-AmbI-Fusionsproteine durch eine Coexpression des plasmidcodierten Chaperonsets pG-KJE8 (*Takara*) mit pColdI\_ambI zu gewinnen und diese *via* Ni-AC anzureichern.<sup>[126]</sup>

3.4.3.3 Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbG mittels Ni-AC

Mit dem pGEX-6P-1-Vektor wurde in vorangegangenen Expressionsstudien die größte Menge löslicher AmbG-Fusionsproteine (GST-AmbG) erzielt (vgl. Abb. 44 in Kapitel 3.4.3.2). Aufgrund seiner Größe (26 kDa) und der häufigen Bildung von Dimeren, welche unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE nicht nachweisbar sind, muss der GST-Tag meist vor der Durchführung von Enzymaktivitätstests abgespalten werden.<sup>[108]</sup>

Deshalb wurde zunächst die Reinigung der Fusionsproteine His<sub>6</sub>-AmbG und His<sub>6</sub>-Trx-AmbG aus Überständen nach der Zellyse mittels gravimetrischer Ni-AC getestet. Die Elution der Proteine erfolgte kompetitiv mit 25 mM–1 M Imidazol im Elutionspuffer (Tab. 15) und die Zusammensetzung der Elutionsfraktionen wurde per SDS-PAGE analysiert (Abb. 47).

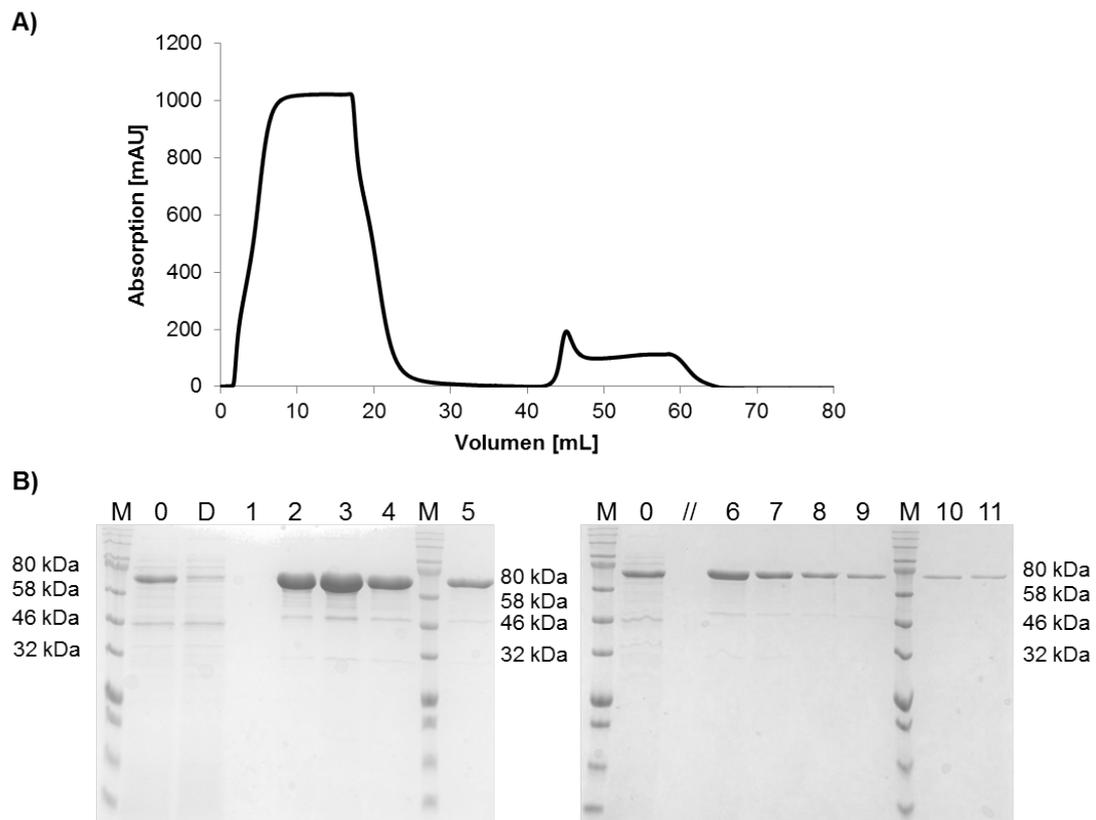


**Abbildung 47:** Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbG-Fusionsproteinen aus je 5 mL Überstand nach Zellyse mittels gravimetrischer Ni-AC. Die Elution erfolgte stufenweise mit 25 mM–1 M Imidazol im Elutionspuffer. **M** = 5  $\mu$ L *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific), **Ü** = Überstand nach Zellyse; **D** = Säulendurchlauf, 15%-ige SDS-Trenngele A) Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbG (82 kDa) aus der Expression mit dem pColdI-Vektor; B) Reinigung von His<sub>6</sub>-Trx-S-AmbG (103 kDa) aus der Expression mit dem pET32a(+)-Vektor.

Beide AmbG-Fusionsproteine konnten erfolgreich gereinigt werden und die größte Proteinmenge wurde jeweils mit 250 mM Imidazol erhalten (Abb. 47). Für His<sub>6</sub>-Trx-AmbG waren bei 100 und 250 mM Imidazol noch weitere schwache Proteinbanden zu erkennen (Abb. 47, B). Diese könnten entweder andere His-reiche Proteine aus *E. coli* oder Abbauprodukte darstellen und in einem zusätzlichen

Chromatographie-Schritt z.B. mittels Gelfiltration entfernt werden. Außerdem waren beide AmbG-Fusionsproteine noch als starke Banden im Säulendurchlauf zu erkennen, was für eine schwache Bindung an das Säulenmaterial spricht (Abb. 47, jeweils Spur D).

Im Anschluss wurde die Reinigung für His<sub>6</sub>-AmbG aus der Expression mit pColdI\_ambG mittels Ni-AC an der FPLC automatisiert und das zu reinigende Volumen auf 15 mL Zellysat (entspricht 100 mL Produktionskultur) erhöht. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 25 auf 500 mM Imidazol im FPLC-Elutionspuffer (Tab. 15).



**Abbildung 48:** Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbG aus der Expression mit dem pColdI-Vektor mittels Ni-NTA an der FPLC-Anlage mit steigender Imidazolkonzentration (I) im FPLC-Elutionspuffer. A) UV-Chromatogramm der Reinigung an der FPLC-Anlage. B) SDS-PAGE der chromatographischen Reinigung; **M** = 5  $\mu$ L *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific); **0** = Überstand nach Zellyse; **D** = Säulendurchlauf, 15 mL; **1** = 350 mM I, 34 mL; **2** = 405 mM I, 44 mL; **3** = 438 mM I, 45 mL; **4** = 472 mM I, 46 mL; **5–11** = 500 mM I, 47–53 mL; 12% SDS-Gel.

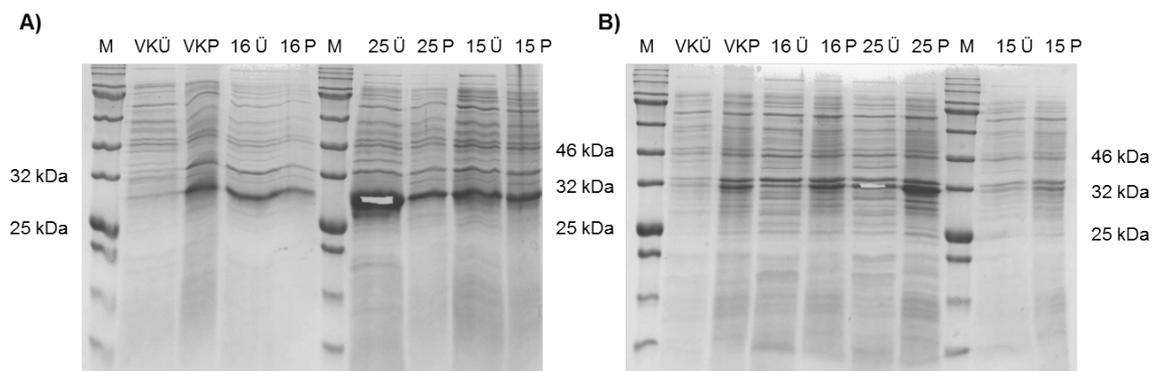
Im Vergleich zur gravimetrischen Reinigung war zu beobachten, dass die Elution der Fusionsproteine erst mit einer höheren Imidazolkonzentration von 400 mM erfolgte und eine starke Konzentrierung der Proteine in den Elutionsfraktionen stattfand (Abb. 48, B). Außerdem war weniger Zielprotein im Durchlauf zu erkennen (Abb. 48, B, Spur D). Das bedeutet, dass die Proteine stärker an das Säulenmaterial gebunden wurden. Allerdings wurden wiederum schwache Proteinbanden mit geringerem Molekulargewicht in den Elutionsfraktionen erhalten (s.o.). Nach Gelfiltration in Lysepuffer wurde die Ausbeute mittels Bradford-Test auf ca. 19 µg angereichertes AmbG-Fusionsprotein je mL Produktionskultur abgeschätzt und insgesamt 4 mg Protein gereinigt. Dieses automatisierte Verfahren eignet sich folglich, um für spätere Studien größere Mengen an AmbG-Fusionsproteinen zu gewinnen. Nach Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags durch die Thrombin-Protease und FPLC-basierter Gelfiltration kann z.B. eine Proteinkristallisation mit anschließender Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden.

Für die nachfolgenden Enzymaktivitätstests wurden jeweils 10 mL Zelllysat von *apo*- oder *holo*-AmbG mittels gravimetrischer Ni-AC gereinigt, weil dieses Verfahren schneller durchführbar war und Proteinlösungen ausreichender Reinheit lieferte. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test nach Gelfiltration in Lysepuffer (3 mL) abgeschätzt und lag reproduzierbar jeweils bei ca. 30–50 µM AmbG-Proteinlösung.

### 3.4.3.4 Heterologe Proteinproduktion und Reinigung von Sfp und MtaA

In Enzymaktivitätstests sollen *apo*-ACP-Domänen durch Umsetzung mit einer Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) in ihre *holo*-Formen überführt werden (vgl. Schema 1 in Kapitel 1.1). Es wurden die PPTasen Sfp aus *Bacillus subtilis* und MtaA aus dem myxobakteriellen Stamm *Stigmatella aurantiaca* DW 4/3-1 ausgewählt. Beide weisen eine hohe Toleranz bezüglich akzeptierter Substrate auf und sind bereits für *in vitro*-Studien verwendet worden.<sup>[150,151]</sup>

Die Proteinproduktion erfolgte jeweils ausgehend von pET-Expressionsvektoren im Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3). Dementsprechend wurde die Genexpression durch den T7-Promotor reguliert und N-terminale His<sub>6</sub>-Fusionsproteine generiert (vgl. Kapitel 3.3.2.2).

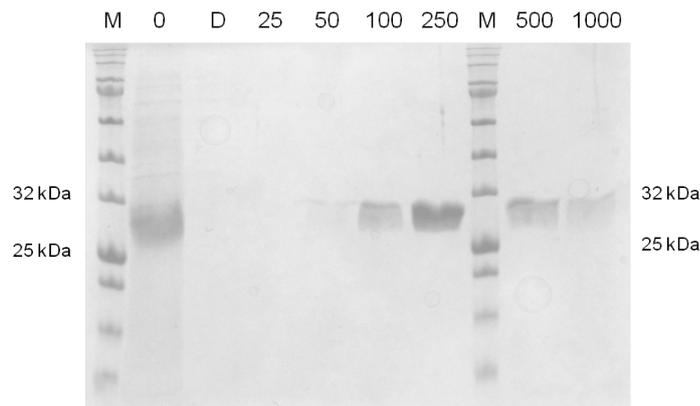


**Abbildung 49:** Heterologe Proteinproduktion von A) His<sub>6</sub>-Sfp (28 kDa) und B) His<sub>6</sub>-MtaA (33 kDa) mit pET-Vektoren in *E. coli* BL21 (DE3). Die Proteine wurden jeweils über Nacht mit 1 mM IPTG bei 16 oder 25 °C oder mit 0.1 mM bei 15 °C produziert. Es wurde jeweils ein Gelstück für die AS-Sequenzierung präpariert. **M** = *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, *Thermo Scientific*; **VK** = Vor-kultur (nicht induziert); **Ü** = Überstand; **P** = Pellet; 15%-ige SDS-Trenngele.

Der allgemeinen Vorschrift für die heterologe Proteinproduktion folgend, wurden Produktionskulturen bis  $OD_{600} = 0.6-0.8$  geschüttelt. Anschließend wurde die Genexpression mit 1 mM IPTG induziert und die Kulturen über Nacht bei 16 °C oder 25 °C weitergeführt. Alternativ wurden 0.1 mM IPTG zugegeben und die Proteine über Nacht bei 15 °C produziert. Die Zellen wurden wie für die Expressionsstudien zu *ambG* (vgl. Kapitel 3.4.3.2) mittels Ultraschall lysiert und Überstand und Pellet mithilfe der SDS-PAGE auf produzierte Fusionsproteine hin analysiert (Abb. 49).

Das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-Sfp (28 kDa) wurde unter allen gewählten Produktionsbedingungen erhalten (Abb. 49, A). Die größte Menge an löslichem Protein wurde mit 1 mM IPTG bei 25 °C erzielt und die Identität von His<sub>6</sub>-Sfp wurde in einer AS-Sequenzierung bestätigt (Abb. 49, A, Probe 25 Ü, *Score*: 1138.31). Diese Expressionsbedingungen wurden daher im Anschluss für die Produktion von His<sub>6</sub>-Sfp verwendet.

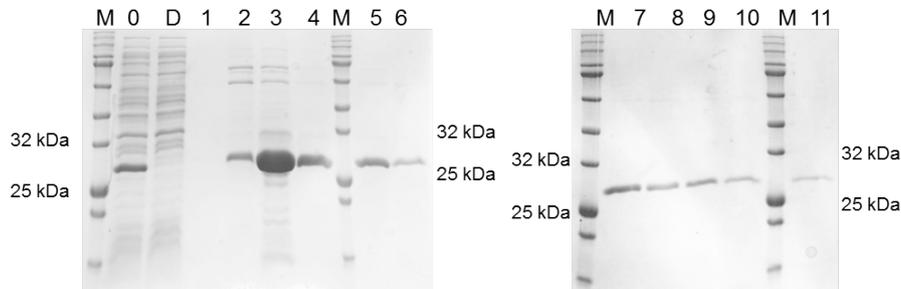
Das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-MtaA (33 kDa) wurde hingegen nur schwach exprimiert und lag überwiegend unlöslich vor (Abb. 49, B). Es wurde ebenfalls bei 25 °C das beste Ergebnis erzielt, jedoch konnte His<sub>6</sub>-MtaA nicht mittels AS-Sequenzierung detektiert werden. Für His<sub>6</sub>-Sfp und His<sub>6</sub>-MtaA wurde eine Basalexpression in den nicht-induzierten Vorkulturen beobachtet, die überwiegend zu unlöslichen Proteinen führte.



**Abbildung 50:** Reinigung von His<sub>6</sub>-Sfp (28 kDa) mittels gravimetrischer Ni-AC. **M** = *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, *Thermo Scientific*; **0** = Lysat; **D** = Säulendurchlauf; **25–1000** = Imidazolkonzentration im Elutionspuffer [mM]; 15%-iges SDS-Trenngel.

Aufgrund der vielversprechenden Expressionsergebnisse für His<sub>6</sub>-Sfp, wurde das Lysat aus 600 mg lysiertem Zellmaterial (40 mL Produktionskultur) mittels gravimetrischer Ni-AC gereinigt (Abb. 50). Die Bindung von His<sub>6</sub>-Sfp an das Säulenmaterial war so effizient, dass im Durchlauf keine Bande bei 28 kDa zu erkennen ist. Die Elution der Proteine erfolgte ab 100 mM Imidazol und mit 250 mM Imidazol wurde die größte Proteinmenge erhalten. Alle Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden vereinigt und in Lysepuffer gefiltert. Anschließend wurde die Proteinkon-

zentration mit einem Bradford-Test bestimmt. Es wurden 6.2 mg Fusionsprotein gereinigt, was einer Konzentration von 155  $\mu\text{g}$  Protein/mL Produktionskultur entspricht.



**Abbildung 51:** Elutionsprofil der Reinigung von His<sub>6</sub>-Sfp (28 kDa) mittels Ni-AC an der FPLC-Anlage mit steigender Imidazolkonzentration (I) im FPLC-Elutionspuffer. **M** = *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific*; **0** = Lysat; **D** = Säulendurchlauf; **1** = 350 mM I; **2** = 405 mM I; **3** = 438 mM I; **4** = 472 mM I; **5–11** = 500 mM I; 15%-iges Trenngel.

Anschließend wurde His<sub>6</sub>-Sfp aus dem Lysat von 1.5 g Zellmaterial (entspricht 100 mL Produktionskultur) wie zuvor für His<sub>6</sub>-AmbF beschrieben an der FPLC-Anlage gereinigt (vgl. Abb. 23). Die Elution erfolgte wiederum ab ca. 400 mM Imidazol, was auf eine stärkere Bindung an das Säulenmaterial als mit dem gravimetrischen Verfahren hinweist. Mit 438 mM Imidazol wurde die größte Menge an His<sub>6</sub>-Sfp erhalten, es wurden jedoch weitere His-reiche Proteine mit angereichert.

Im Anschluss sind alle Fraktionen, die gereinigtes Sfp-Fusionsprotein enthielten, vereinigt und mithilfe einer Gelfiltration in Sfp-Lagerungspuffer (Tab. 15) überführt worden. Nach Konzentrierung mittels Membranzentrifugation (10 kDa Ausschlussgröße) wurde die Proteinkonzentration mit einem Bradford-Test bestimmt. Es wurden 30 mg Fusionsprotein gereinigt, was einer Konzentration von 300  $\mu\text{g}$  gereinigtem Protein/mL Produktionskultur entspricht.

Bis zur Verwendung in Enzymaktivitätstest wurden Sfp-Proben als Stammlösungen (10-12 mg/mL in Sfp-Lagerungspuffer) bei -20 °C gelagert und waren über mindestens 6 Monate katalytisch aktiv.

### 3.4.4 Enzymaktivitätstests mit der Didomäne AmbG

In den folgenden Enzymaktivitätstests wurde die Adenylierungsaktivität von AmbG mithilfe von  $PP_i$ -Release-Assays und HPLC-Studien untersucht. Des Weiteren wurde der ACP-Transfer mittels Protein-HPLC-MS untersucht und Kompetitionsstudien durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Karen Lebe wurde in Vorarbeiten ein Protokoll für die 4'-Phosphopantetheinylierung von ACP-Domänen entwickelt.<sup>[126]</sup> Dabei wurde gezeigt, dass die Umsetzung in *holo*-ACPs auch im Zellysate möglich ist. Vor der Durchführung von Enzymaktivitätstests wurde jeweils der vollständige Umsatz von ACP-Domänen in die *holo*-Form mittels Protein-HPLC-MS geprüft.

#### 3.4.4.1 Untersuchungen zur Adenylierungsaktivität von ANL\_AmbG

Zunächst wurde die Adenylierungsaktivität der Didomäne AmbG untersucht. Dafür wurde das freigesetzte  $PP_i$  in Endpunktmessungen mit dem *EnzChek Pyrophosphate Assay Kit E 6645 (Molecular Probes)* quantifiziert (vgl. Abb. 7 in Kapitel 1.3).

Die Assaymischungen bestanden aus 32  $\mu$ M gereinigtem *holo*-AmbG (vgl. Kapitel 3.4.3.2) in Assaypuffer (Tab. 15) mit 1.25 mM ATP, 1 mM TCEP-HCl, 10 mM  $MgCl_2$  und 2 mM Substrat. Nach 1.5 h Inkubation bei 30 °C erfolgte die Analyse anhand einer  $PP_i$ -Standardkurve als technische Dreifachbestimmung (Anhang, Abb. 73). Es wurden Negativkontrollen ohne Substrat, Enzym oder ATP mitgeführt, um Hintergrundeffekte zu kompensieren. Darüber hinaus diente eine Standardprobe mit 5  $\mu$ M  $PP_i$  der Normalisierung der experimentellen Sets.

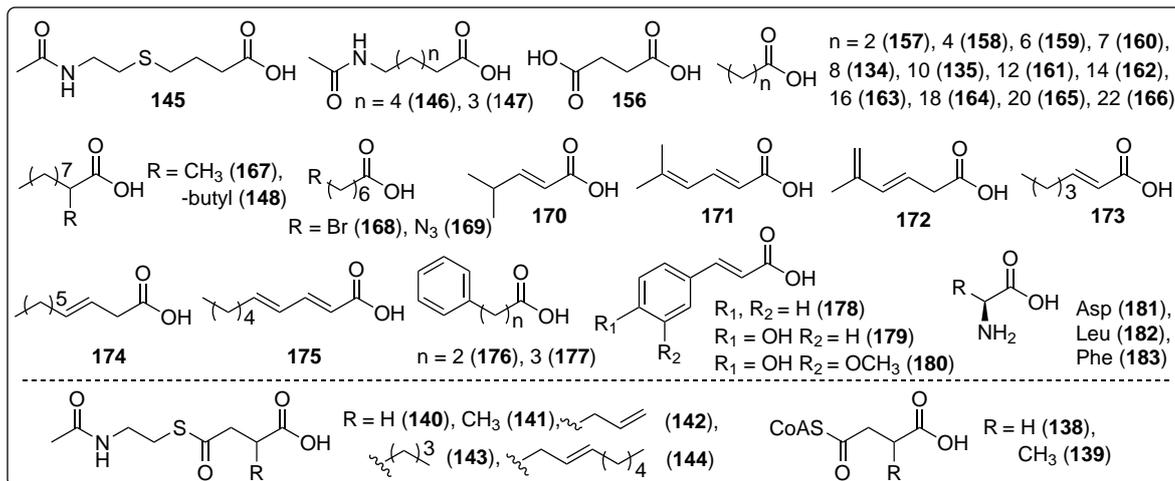


Abbildung 52: Substratauswahl für die Untersuchung der Adenylierungsaktivität.

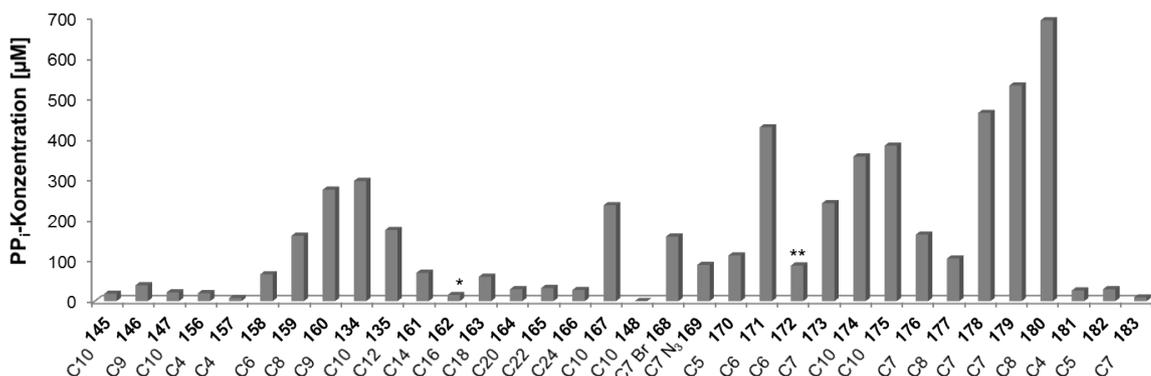


Abbildung 53: Vergleich der freigesetzten PP<sub>i</sub>-Konzentrationen in Assays mit *holo*-AmbG. \*162 Stammlösung wurde in EtOH gelöst, 163-166 in EtOAc, \*\*enthält 11% 171.

Die Adenylierungsspezifität von *holo*-AmbG wurde mit einer Bibliothek strukturell hoch diverser Substraturrogate getestet (Abb. 53). Neben gesättigten Fettsäuren wurden verschiedene ungesättigte, verzweigte und funktionalisierte Carbonsäuren kurzer und mittlerer Kettenlänge, Zimtsäurederivate sowie Succinoyl-Halbthioester-Analoga eingesetzt (Abb. 52). Nach dem aktuellen Literatur-Kennntnisstand repräsentiert dies die breiteste Substratauswahl, mit der ANL-Domänen bisher getestet wurden (vgl. Kapitel 1.3).

Im Rahmen einer Masterarbeit wurden bereits verschiedene Succinoyl-CoA- und Succinoyl-SNAC-Halbthioester **138–144** als Mimetika für ACP-gebundene Substrate getestet.<sup>[126]</sup> Anhand von <sup>1</sup>H-NMR-Studien wurde jedoch beobachtet, dass diese in Wasser zu den entsprechenden Bernsteinsäure-Edukten rezyklierten. Aus diesem Grund war keine verlässliche Aussage über den Aktivierungsgrad dieser Substrate möglich.

Entgegen der eigenen biosynthetischen Hypothese (vgl. Abb. 40 sowie Abb. 16 in Kapitel 3.1), wurden die Succinoyl-Halbthioester-Analoga **145–147** nur wenig aktiviert. Hingegen wurden hydrophobere Substrate im Allgemeinen gut akzeptiert. Die Fettsäuren von C4 (**157**) bis C10 (**134**) wurden mit zunehmender Kettenlänge stärker aktiviert. Ab C14 (**161**) war die beobachtete PP<sub>i</sub>-Freisetzung gering und die zunehmend schlechtere Löslichkeit der Substrate unter den Testbedingungen verkomplizierte die Auswertung zusätzlich.

Die verzweigte 2-Methyldecansäure (**167**) wurde in etwa so stark wie Decansäure (**134**) aktiviert. Hingegen wurde 2-Butyldecansäure (**148**) nicht akzeptiert. Dies legt nahe, dass eine zweite, sterisch anspruchsvolle hydrophobe Kette die Interaktion mit dem aktiven Zentrum behindert.

Eine Funktionalisierung wurde toleriert, solange der insgesamt hydrophobe Charakter des Substrats nicht drastisch verändert wurde. Während 7-Bromheptansäure (**168**) zu einer ähnlich hohen PP<sub>i</sub>-Freisetzung wie Octansäure (**159**) führte, wurde die polare 7-Azidoheptansäure (**169**) wesentlich schwächer aktiviert als Decansäure (**134**).

Die Präsenz *trans*-konfigurierter Doppelbindungen war ebenso nicht problematisch. Für **173–175** lag die freigesetzte PP<sub>i</sub>-Konzentration jeweils über jener der gesättigten Fettsäuren mit gleichen Kettenlängen.

Überraschenderweise wurden verzweigte, ungesättigte Carbonsäuren mit kurzer Kettenlänge besser akzeptiert als die gesättigten Substrate vergleichbarer Größe, wenn das Doppelbindungssystem in Konjugation zur Carbonsäure stand (siehe **170** und **171** im Vergleich zu **157** und **158** sowie die Doppelbindungsisomere **171** und

**172**). Sogar Zimtsäure (**178**) und Zimtsäurederivate **179** und **180** waren kompetent und zeigten die höchsten  $PP_i$ -Konzentrationen. 3-Phenylpropionsäure (**176**) und 4-Phenylbuttersäure (**177**) wurden ebenfalls akzeptiert aber in einem geringeren Maße, was einen unterstützenden Effekt der Rigidität um das Carboxyende und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen nahelegt.

Bereits im Rahmen einer Masterarbeit wurde beobachtet, dass Aminosäuren (hier gezeigt Leu (**182**), Phe (**183**) und Asp (**181**)) kaum oder gar nicht aktiviert werden.<sup>[126]</sup> Es kann folglich vermutet werden, dass das natürliche Substrat von AmbG keine Aminosäure ist.

**Tabelle 6:** Auswahl biochemisch charakterisierter ANL-Enzyme und deren Identität(I) oder Ähnlichkeit(Ä) zu ANL\_AmbG. Die Ähnlichkeitswerte wurden mit einem globalen paarweisen Sequenz-Alignment (Needleman-Wunsch Algorithmus) von *EMBOSS Needle*<sup>[152]</sup> ermittelt (Parameter: EBLOSUM62-Matrix, *Gap-penalty* = 10.0, *Extend-penalty* = 0.5).

GenBank	Name [Organismus]	Substrat	I, Ä [%]
AIW82280 <sup>[136]</sup>	PuwC [ <i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 988]	Nonan-, Undecansäure	32, 48
AHN85651 <sup>[53]</sup>	Phn2 [ <i>Nannocystis pusilla</i> ]	(Hydroxy)-Zimts.	31, 44
AFV96135 <sup>[133]</sup>	AMP-dependent synthetase [ <i>Cylindrospermum licheniforme</i> UTEX B 2014]	Decansäure	30, 46
WP_011556561 <sup>[50]</sup>	AMP-dependent synthetase FtpD [ <i>Myxococcus xanthus</i> ]	Stearinsäure	29, 41
CCP45733 <sup>[153]</sup>	FAAL FadD26 [ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	Langkettige Fettsäuren	29, 45
WP_003238152 <sup>[154]</sup>	Mycosubtilin synthase subunit A [ <i>Bacillus subtilis</i> ]	<i>trans</i> -Decen-, Decan-, Myristin-, Palmitinsäure	24, 38

Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite

**Tabelle 6:** Biochemisch charakterisierte AFD-Enzyme – *Fortsetzung*

GenBank	Name [Organismus]	Substrat	I, Ä [%]
AFT91380 <sup>[155]</sup>	EcdI [ <i>Aspergillus rugulosus</i> ]	Linolensäure	22, 37
CAL48957 <sup>[51]</sup>	Anthranilate-CoA-ACP transferase [ <i>Stigmatella aurantiaca Sg a15</i> ]	Anthranilsäure	21, 33
EPE34349 <sup>[20]</sup>	Acetyl-CoA synthetase-like protein [ <i>Glarea lozoyensis ATCC 20868</i> ]	Myristin-, Pentadecan-, Palmitinsäure	20, 37

AmbG zeigte in den *in vitro*-Untersuchungen eine unerwartet breite Substrattoleranz in Bezug auf den Adenylierungsschritt, welche gesättigte Fettsäuren mittlerer und langer Kettenlänge, verzweigte, ungesättigte oder funktionalisierte sowie aromatische Säuren unterschiedlicher Polarität einschloss. Diese Flexibilität geht darüber hinaus, was bisher für ANLs (ausgenommen A-Domänen aus NRPS) beobachtet wurde und reflektiert die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse (Tab. 6 sowie vgl. Kapitel 3.4.1). Im Allgemeinen liegt die Sequenzähnlichkeit der ANL\_AmbG-Domäne zu biochemisch charakterisierten AFD-Domänen - unabhängig von deren Spezifität - bei jeweils ca. um die 40% (Tab. 6).

Die beobachteten Trends sind teilweise widersprüchlich. Die Ergebnisse für lineare, gesättigte Fettsäuren legen die Wichtigkeit hydrophober Interaktionen nahe mit einem Maximum bei einer Kettenlänge von C10.

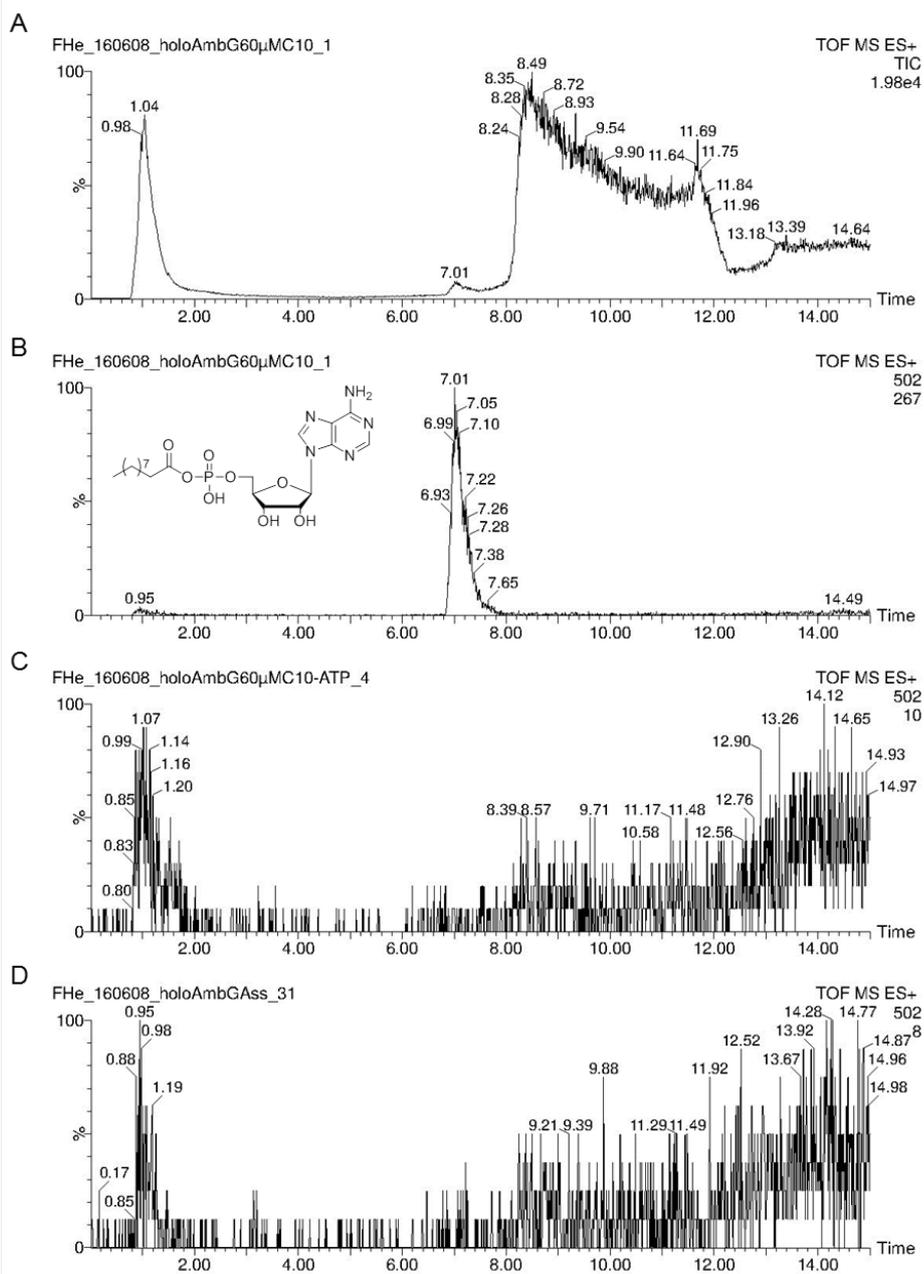
Hingegen hatten polare Wasserstoffbrückenbindungsdonoren oder -Akzeptoren einen negativen Effekt. Alkylverzweigungen wurden akzeptiert, so lange sie nicht sterisch zu anspruchsvoll waren. Andererseits wurden kürzere und stärker funktionalisierte Substrate aktiviert, falls Doppelbindungen oder aromatische Reste in der Nähe des Carboxyendes vorlagen.

Offensichtlich waren  $\pi$ - $\pi$  Interaktionen ebenso produktiv und konnten hydrophobe Kontakte ersetzen. Vermutlich spielen beide Interaktionen eine signifikante Rolle und tragen zur gesamten Bindungsaffinität des natürlichen AmbG-Substrats bei. Für eine verlässliche Aussage zur Substratpräferenz sind in Zukunft kinetische Studien notwendig. Diese können zum Beispiel in Form von Austausch-Experimenten mit radioaktiv markiertem  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP gegen unmarkiertes  $\text{PP}_i$  in einem Isotopenlabor durchgeführt werden.

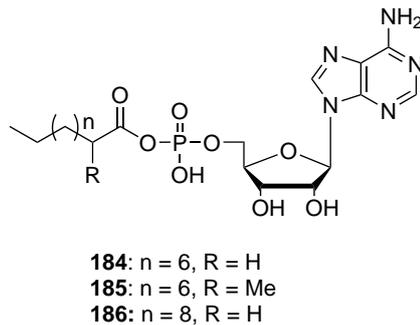
#### 3.4.4.2 Nachweis von Acyl-Adenylaten mittels HPLC-MS

Die unter Kapitel 3.4.4.1 und 3.4.4.3 beschriebenen Enzymaktivitätstest-Mischungen wurden mittels HPLC-MS analysiert. Im UV-Chromatogramm wurde unter anderem für Assays mit 60  $\mu\text{M}$  Decansäure (**134**) vor dem breiten Protein-Elutions-Signal ab  $t_{\text{R}} = 8$  min ein weiteres Signal mit geringerer Intensität detektiert (Abb. 54, A, bei  $t_{\text{R}} = 7.01$  min).

Dieses Signal wurde der einer Verbindung mit der molaren Masse  $M = 502$  zugeordnet, welche Decanoyl-AMP (**184**) entspricht. Diese ist nicht präsent in Abwesenheit von ATP oder Decansäure (**134**) in der Assaymischung (Abb. 54). Die Bildung von **184** wurde weiterhin ausschließlich in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen beobachtet, war jedoch nicht abhängig von der Phosphopantetheinylierung der ACP-Domäne (Anhang, Abb. 108). Dies steht im Einklang mit dem beobachteten Ergebnis, dass die Adenylierungsaktivität der ANL-Domäne unabhängig von der Phosphopantetheinylierung der ACP-Domäne ist (vgl. Kapitel 3.4.4.3). Außerdem wurde kein Decanoyl-AMP (**184**) in einer Enzymreaktion beobachtet, in der statt *holo*-AmbG lediglich *holo*-ACP\_AmbG eingesetzt wurde, sodass dessen Bildung auf die Aktivität der ANL-Domäne zurückzuführen ist.



**Abbildung 54:** HPLC-MS-Analyse der ACP-Transfer Assays mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol). A) TIC-Spur der Inkubation von *holo*-AmbG mit **134** unter Assaybedingungen; B) Inkubation von *holo*-AmbG mit **134** unter Assaybedingungen, Massenspur für M = 502 (C10-AMP, **184**). Massenspur für M = 502 (C10-AMP, **184**) in Abwesenheit von C) ATP oder D) Substrat **134**; X-Achse: Retentionszeit, Y-Achse: relative Intensität der Extinktion.

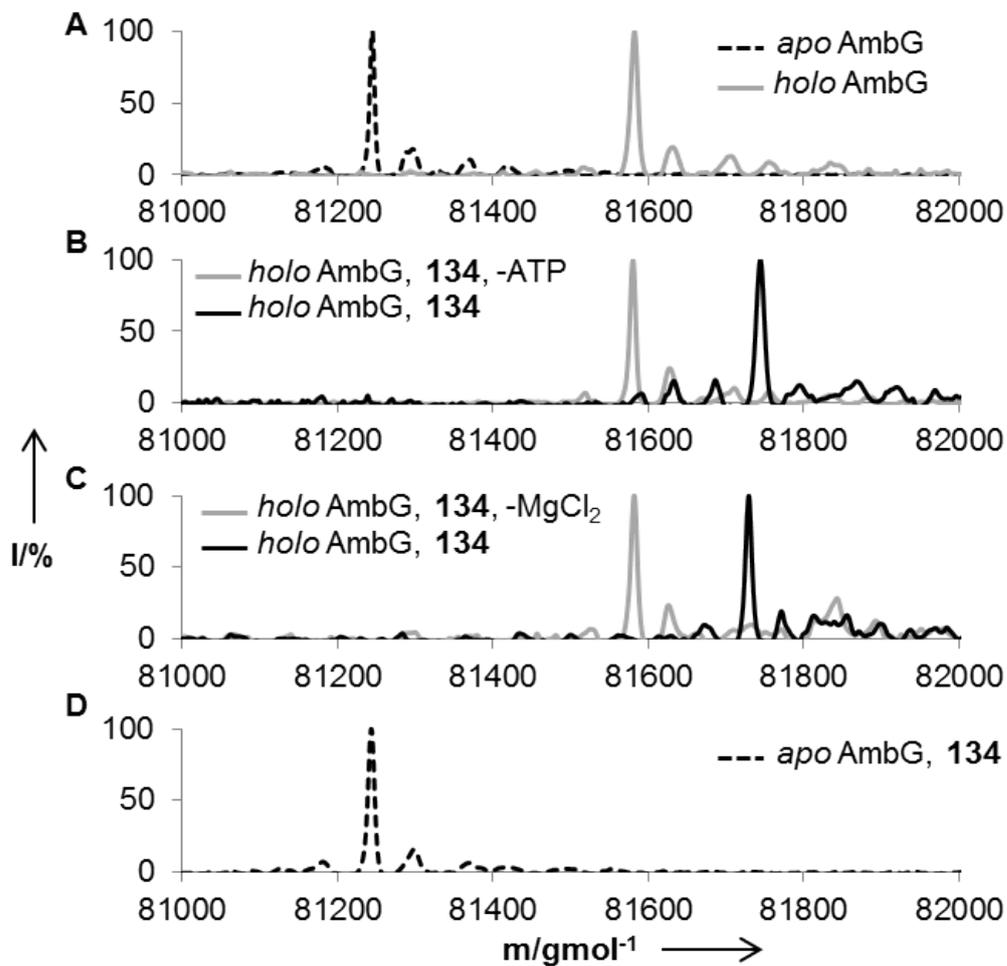


**Abbildung 55:** Strukturen der *via* HPLC-MS-Analyse nachgewiesenen Acyl-Adenylate.

In den Gemischen mit 2-Methyldecansäure (**167**) und Dodecansäure (**135**) wurden die Acyl-Adenylate **185** und **186** nachgewiesen (Abb. 55, Anhang, Abb. 109 und Abb. 110). Technisch bedingt konnten ausschließlich Massenspezies über 500 g/mol gleichzeitig mit den eluierten Proteinen in der MS-Analyse fokussiert werden. Für die getesteten Fettsäure erhöhte sich jedoch mit wachsender Kettenlänge die Hydrophobizität der amphiphilen Substrate und die Löslichkeit unter Assaybedingungen sank. Dies führte zu einer stärkeren Interaktion mit der HPLC-Säule und einer Signalverbreiterung bei gleichzeitig gesenkter Signalintensität. Für Tetradecansäure (**161**) und Hexadecansäure (**162**) konnte daher keine verlässliche Aussage bzgl. Acyl-Adenylaten getroffen werden. Vermutlich können jedoch die in Kapitel 3.4.4.1 beobachteten unlösliche Präzipitate in Gemischen mit langkettigen Fettsäuren auf die Unlöslichkeit der Magnesium-Salze der Acyl-Adenylate zurückgeführt werden.

#### 3.4.4.3 Untersuchung der ACP-Transfer-Reaktion

Gemäß der eigenen biosynthetischen Hypothese (vgl. Schema 16 in Kapitel 3.1) und dem Ergebnis der bioinformatischen Studien (vgl. Kapitel 3.4.1), wurde getestet, ob die von der ANL-Domäne aktivierten Substrate auf die ACP-Domäne transacyliert werden. Dafür wurden Untersuchungen mittels Protein-HPLC-MS durchgeführt und zunächst anhand der Signalverschiebung bewertet, ob *holo*-AmbG acyliert wurde (Abb. 56, A). Zwischen den Messungen wurde jeweils ein Spülprogramm und eine Testmessung mit Wasser durchgeführt, um einen Probenübertrag und die Blockierung der HPLC-Säule zu verhindern. Zunächst wurde eine Optimierung der Reaktionsbedingungen mit Decansäure (**134**) als Substrat vorgenommen, da diese die am stärksten aktivierte Fettsäure darstellte (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1).

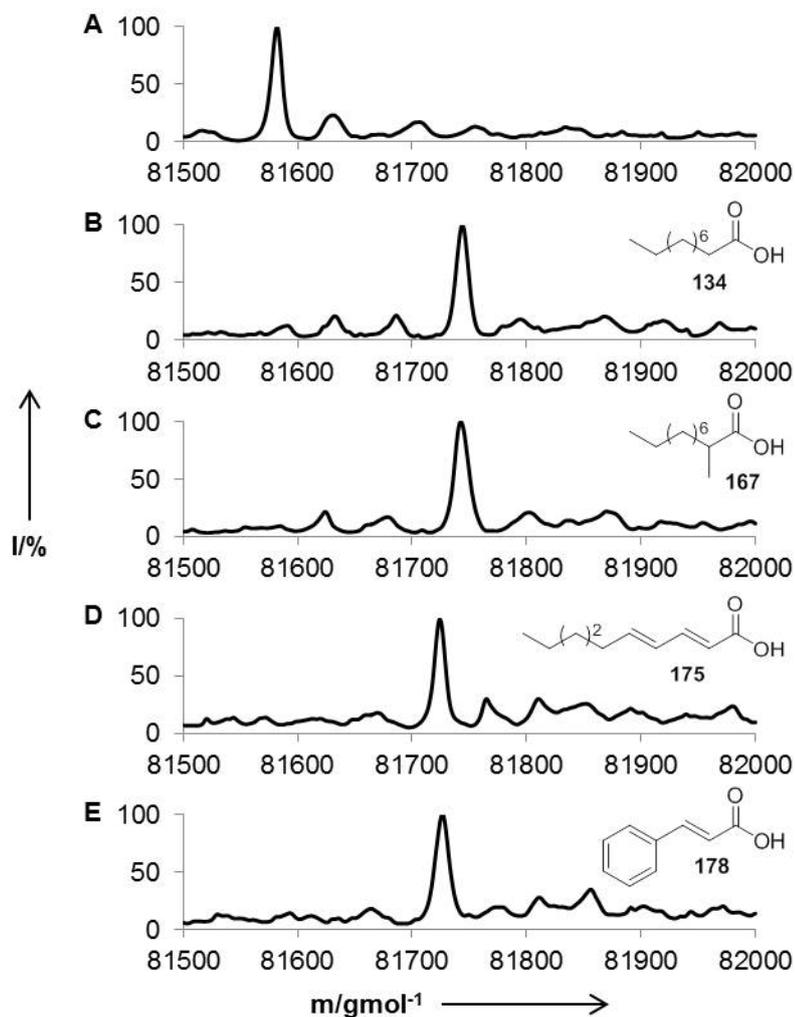


**Abbildung 56:** Kontrollexperimente zur Acylierung. A) Phosphopantetheinylierung von *apo*-AmbG (81.240 kDa) ergibt *holo*-AmbG (81.580 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** führt zur vollständigen Acylierung (81.734 kDa). Inkubation von *holo*-AmbG mit/ohne B) ATP oder C)  $MgCl_2$ ; D) Inkubation von *apo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134**.

Vor der Durchführung von Enzymtests wurde anhand der charakteristischen Signalverschiebung von 340 Da überprüft, ob AmbG von der PPTase Sfp vollständig in die *holo*-Form überführt wurde (Abb. 56, A, grau). Wurde *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**) für 15 min inkubiert, wurde ein neues Signal beobachtet, welches der Masse der einfach acylierten *holo*-AmbG-Spezies mit **134** entsprach (Abb. 56, B, schwarz). Die Kontrollexperimente zeigten zudem, dass die Signalverschiebung ATP- und  $MgCl_2$ -abhängig ist (Abb. 56, B und C, grau). Darüber hinaus wurde das Signal unter den gleichen Bedingungen mit *apo*-

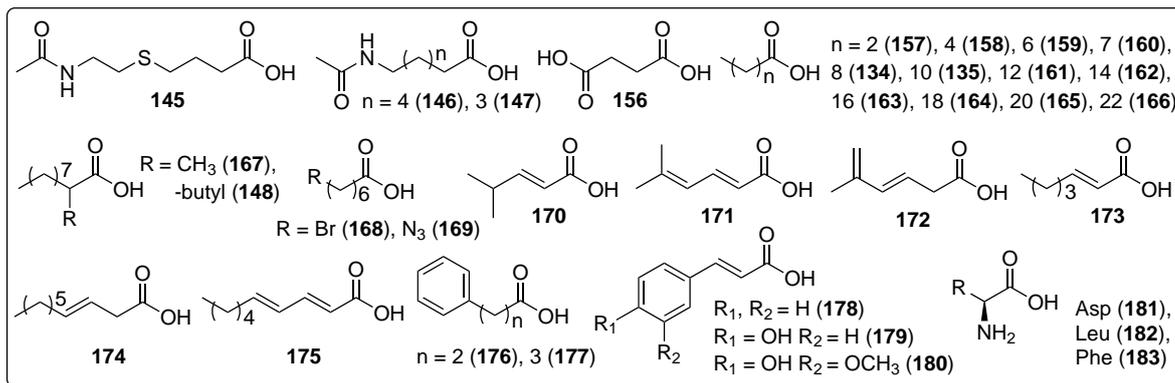
AmbG nicht beobachtet, obwohl in der Reaktionsmischung Decanoyl-AMP (**184**) per HPLC-MS nachgewiesen wurde (vgl. Anhang, Abb. 108 sowie Kapitel 3.4.4.2). Des Weiteren wurden Kontrollexperimente mit der einzelständigen ACP\_AmbG-Domäne durchgeführt (vgl. Anhang, Abb. 104). Diese wurde zunächst durch Inkubation mit der PPTase Sfp in die *holo*-Form überführt (Abb. 104, B). Weder die Inkubation mit Decansäure (**134**) noch mit Hexadecansäure (**162**) führte zu einer Signalverschiebung. Ebenso wurde kein Acyl-AMP per HPLC-MS detektiert (vgl. Kapitel 3.4.4.2). Eine spontane Selbstacylierung der ACP-Domäne kann demnach ausgeschlossen werden.

Wurde *holo*-AmbG mit höheren Substratkonzentrationen mit Decansäure (**134**) unter den zuvor beschriebenen Assaybedingungen inkubiert, führte dies zu einer bis zu vierfachen Beladung (vgl. Anhang, Abb. 105 und Abb. 106). Dies wurde bereits im Rahmen einer Masterarbeit beobachtet.<sup>[126]</sup> Diese Beladung trat ebenfalls - wenn auch in geringerem Ausmaß - mit *apo*-AmbG unter Assaybedingungen auf (vgl. Anhang, Abb. 107) und suggeriert weitere nukleophile Positionen auf der Proteinoberfläche nah des aktiven Zentrums, die spontan mit dem Acyl-AMP-Intermediat reagieren. Die Mehrfachbeladung wurde für verschiedene Substrate beobachtet und stellte sich als dosisabhängig heraus. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Optimierung der oben beschriebenen Assaybedingungen vorgenommen. Mit einer gesenkten Substratkonzentration auf 60  $\mu\text{M}$  konnte bereits nach 15 min bei 30 °C eine vollständige Umwandlung von *holo*-AmbG in die einfach beladene Spezies beobachtet werden, während unter gleichen Bedingungen keine Beladung von *apo*-AmbG zu verzeichnen war (Abb. 56, D), obwohl per HPLC-MS das Decansäure-Adenylat (**184**) nachgewiesen wurde (Anhang, Abb. 108). Das bedeutet, dass die Affinität des Acyl-Adenylats zum PPant-Thiol höher ist als zu weiteren nukleophilen Positionen. Für diese Experimente wurde eine kürzere Reaktionszeit gewählt, da bereits nach 15 min keine Veränderung im Acylierungsgrad mehr zu beobachten war.



**Abbildung 57:** Dekonvolutierte Massenspektren zum ACP-Transfer für ausgewählte Substrate. A) *holo*-AmbG (81.580 kDa), B) 60  $\mu$ M C10 (**134**, 81.734 kDa, C) 60  $\mu$ M 2-Methyldecansäure **167** (81.748 kDa), D) 60  $\mu$ M **175** (81.730 kDa), E) 120  $\mu$ M Zimtsäure (**178**, 81.710 kDa).

Für die Fettsäuren ab einer Kettenlänge von C8 (**159**)–C14 (**161**) wurde die vollständige Acylierung der ACP-Domäne beobachtet (Abb. 57, Tab. 7). Sogar Hexadecansäure (**162**) und Octansäure (**163**) ergaben vollständigen Umsatz, obwohl in den entsprechenden Tests zur Bildung von Acyl-Adenylaten nur wenig  $\text{PP}_i$  freigesetzt wurde (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1). Die funktionalisierten Decansäure-Derivate **167**, **174** und **175** wurden ebenfalls vollständig umgesetzt (Abb. 57). Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnten die Substrate **164**–**166** nicht getestet werden (Abb. 58 und vgl. Kapitel 3.4.4.2).



**Abbildung 58:** Substrate, für welche die Acylierung von *holo*-AmbG getestet wurde.

**Tabelle 7:** Normalisierte Signalintensitäten für acylierte *holo*-AmbG-Spezies. Die zugehörigen dekonvolvierten Massenspektren sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. 74– 102).

Substrattyp	0	<50%	100%
Succinoyl-Derivate	145, 147, 156	146	
Fettsäuren	157, 158	159	134, 135, 160–163
Fettsäurederivate	148, 168, 169		167, 174, 175
Kurzkettige Säuren	170, 172, 173	171	
Aromatische Säuren	176, 177, 179, 180	178	
Aminosäuren	181–183		

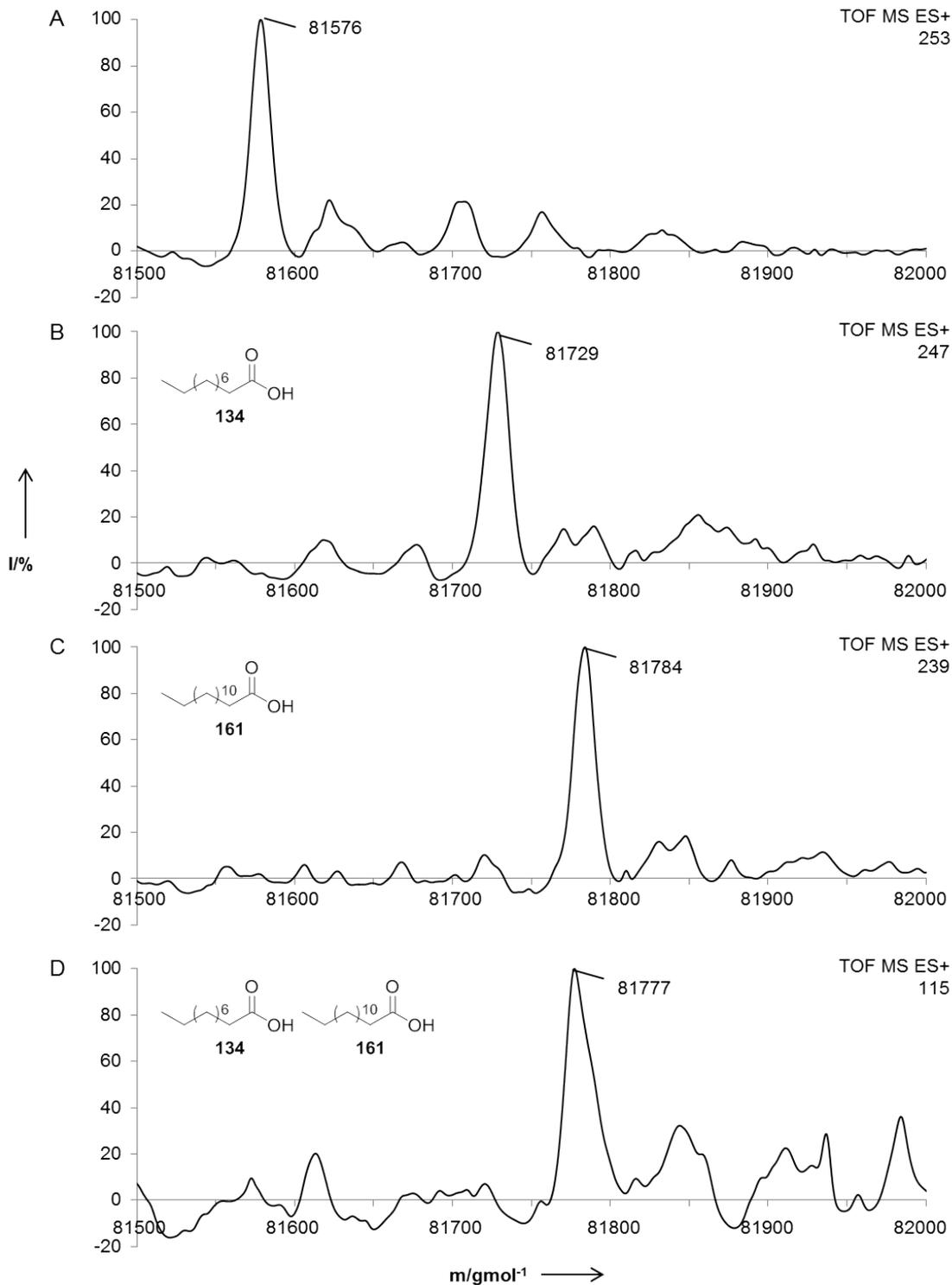
Trotz der starken Aktivierung beider Substrate, wurde nur ein geringer Acylierungsgrad für Zimtsäure (**178**) und die verzweigte Hexadiensäure **171** beobachtet (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1). Weder das polare C10-Analogon **169** noch 7-Bromheptansäure (**168**) wurden übertragen. Da die letzte eine ähnlich hohe freigesetzte  $PP_i$ -Menge wie Octansäure (**159**) aufweist, lässt das darauf schließen, dass das sperrige Bromatom oder die polarisierte C–Br-Bindung die Übertragung verhindern.

Von den hochgradig aktivierten Substraten wurden weder die Zimtsäure-Derivate **179** und **180** noch die ungesättigten Säuren **170** und **173** auf AmbG geladen. Letztlich wurden keine der schwach aktivierten, polaren Substrate wie **145**, **147**, **156** und **181–183** übertragen (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1).

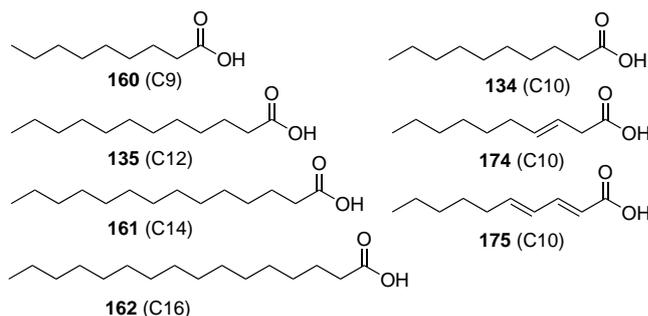
Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass die ANL-Domäne die Substrate aktiviert und auf das PPant (**5**) der ACP-Domäne überträgt. Eine weitere Bestätigung könnte zukünftig durch einen tryptischen Verdau erfolgen, indem das PPant-Acyl-Fragment *via* HPLC-MS detektiert wird. Offenbar werden Substrate nur übertragen - unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad - wenn sie eine gewisse Größe aufweisen, einen insgesamt hydrophoben Charakter besitzen und keine polaren Reste enthalten. Außerdem werden in diesem Schritt  $\pi$ -Systeme toleriert.

#### 3.4.4.4 Kompetitionsstudien für die ACP-Transferreaktion

Im Anschluss an die ACP-Transfer Experimente wurde die Substratpräferenz von *holo*-AmbG bezüglich der ACP-Transferreaktion untersucht. Dafür wurden die Enzymaktivitätstests wie unter Kapitel 3.4.4.3 beschrieben durchgeführt und jeweils zwei Substrate gleichzeitig zugefügt. Anschließend wurde das Gemisch mittels HPLC-MS untersucht. Durch den Vergleich mit Massenspektren der einzelnen Substrate erfolgte die Zuordnung, welches Substrat bevorzugt auf die ACP-Domäne übertragen wurde (beispielhaft in Abb. 59 dargestellt, vgl. Anhang Abb. 112–117). Für die kompetitiven Studien wurde im Vergleich zu den ACP-Transferexperimenten ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis bei geringer Gesamtintensität beobachtet. Aus diesem Grund konnten Messungen mit Octadecansäure (**163**) nicht in die Analyse einbezogen werden. Eine weitere Schwierigkeit war, dass für Substrate mit ähnlichem Molekulargewicht (wie z.B. **134** und **174** oder **175**) wegen der minimalen Differenz der molaren Massen der beteiligten beladenen AmbG-Spezies keine Aussage getroffen werden konnte.



**Abbildung 59:** Dekonvolutierte Protein-Massenspektren der kompetitiven ACP-Transferreaktion mit je 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol) und Tetradecansäure (**161**, 228 g/mol). A) *holo*-AmbG-Kontrolle ohne Substrat (81.576 kDa). Unter Testbedingungen wurde *holo*-AmbG vollständig mit B) **134** ( $M = 81.729$  kDa, 12 ppm) oder mit C) **161** ( $M = 81.784$  kDa, 24 ppm) acyliert. D) Bei gleichzeitiger Testung von 60  $\mu$ M **134** und **161** wurde *holo*-AmbG ausschließlich mit **161** acyliert (81.777 kDa, 110 ppm).



**Abbildung 60:** Übersicht der Substrate, welche in die Kompetitionsstudien eingesetzt wurden.

**Tabelle 8:** Kompetitionsstudien zum ACP-Transfer mit Decansäure (**134**) und Hexadecansäure (**162**). Die zugehörigen HPLC-MS-Spektren sind in Abb. 112–117 im Anhang zu finden; n.i. = nicht interpretierbar.

Nr.		<b>134 (C10)</b>	<b>162 (C16)</b>
1	<b>160 (C9)</b>	<b>134 (C10)</b>	<b>162 (C16)</b>
2	<b>135 (C12)</b>	<b>135 (C12)</b>	100% <b>162</b> , >50% <b>135</b>
3	<b>161 (C14)</b>	<b>161 (C14)</b>	n.i.
4	<b>174 (C10)</b>	–	100% <b>162</b> , >50% <b>174</b>
5	<b>175 (C10)</b>	–	100% <b>162</b> , <50% <b>175</b>

Es wurden Substrate ausgewählt, für welche zuvor eine vollständige Acylierung der ACP-Domäne mit 60  $\mu$ M Substrat beobachtet worden war (Abb. 60, vgl. Tab. 7 in Kapitel 3.4.4.3). Dabei wurde ein Trend zu Substraten mit längerer Kettenlänge festgestellt (Tab. 8). Indirekt konnte darauf geschlossen werden, dass die ungesättigten Substrate **174** und **175** im Vergleich zu **134** bevorzugt akzeptiert werden (vgl. Tab. 8, Einträge unter 2 im Vergleich zu 4 und 5).

Dies legt einen positiven Effekt von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen nahe, welche hydrophobe Interaktionen kompensieren können. Es war wiederum zu beobachten, dass für die Adenylierungsreaktion und die Transferreaktion unterschiedlich ausgeprägte Reaktivitäten vorliegen. Hexadecansäure (**162**) wurde im Vergleich zu den un-

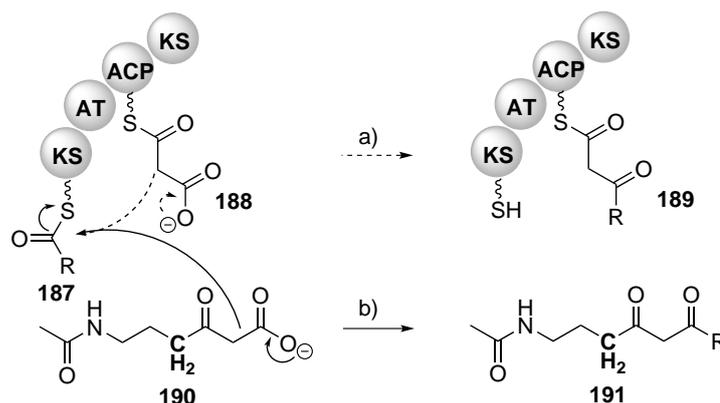
gesättigten Substraten **174** und **175** wesentlich schwächer aktiviert, wurde jedoch bevorzugt auf die ACP-Domäne übertragen (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1). Dies wurde auch in der Analyse der Gemische der Kompetitionsstudien auf Acyl-Adenylate hin beobachtet: Obwohl für Decansäure (**134**) und Dodecansäure (**135**) beide Acyl-Adenylate nachgewiesen wurden, konnte ausschließlich die mit **135** acylierte *holo*-AmbG-Spezies detektiert werden (Anhang, Abb. 111 und Abb. 113, vgl. Kapitel 3.4.4.2). Die Schlussfolgerung entspricht jener aus Kapitel 3.4.4.1, dass für eine verlässliche Aussage zur Substratpräferenz in Zukunft kinetische Studien notwendig sind.

### 3.5 *In vivo*-Studien zu So ce 10

Das Ziel biosynthetischer Studien ist im Allgemeinen die Identifikation von Intermediaten zur Bestimmung von Reihenfolge und Reaktionsmechanismen enzymkatalysierter Transformationen. In der Regel bleiben Polyketide jedoch während ihrer Assemblierung als Thioester am PKS-Multienzymkomplex verankert und werden zwischen den Domänen weitergereicht. Sie sind somit nicht zugänglich für analytische Verfahren. Dies ist vor allem bei der Untersuchung der Enzymologie iterativer Systeme problematisch.

Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit ACP-gebundene Vorläufer unter harschen Bedingungen (z.B. mit 0.5 M NaOH bei 65 °C für 30 min<sup>[156]</sup>) hydrolysiert oder Gencluster mittels gentechnischer Methoden verändert. Beispielsweise hat die Gendeletion von Domänen oder die Relokalisation einer TE-Domäne mit flexibler Substrattoleranz hinter ein PKS-Modul zur Anreicherung von Vorläufermolekülen bzw. zur spontanen Freisetzung von Intermediaten geführt.<sup>[5]</sup> Eine alternative Strategie stellt die Produktion einzelner Enzymdomänen als rekombinante Proteine dar (vgl. Kapitel 3.3.2). Hierbei besteht jedoch das Risiko, dass Domänengrenzen falsch bestimmt werden und die Enzyme durch inkorrekte Faltung nicht in ihrer aktiven Form vorliegen. Der Vorteil von *in vivo*-Studien liegt in der Untersuchung biosynthetischer Enzyme in ihrem natürlichen Kontext.

Im Jahr 2009 wurde von TOSIN *et al.* eine nicht-invasive Methode vorgestellt, welche die Abspaltung von KS-gebundenen Polyketid-Intermediaten ermöglicht (Schema 24, b).<sup>[157]</sup> Malonyl carba(dethia)-*N*-acetylcysteamine (**190**) sind nicht-hydrolysierbare Analoga (NHA) CoA-gebundener Malonyleinheiten **188** und konkurrieren daher mit ACP-Domänen, die auf KS-Domänen nachfolgen, um die wachsende Polyketidkette **187**. Die Kondensation mit NHA **190** führt zur irreversiblen Abspaltung von Biosynthese-Intermediaten von KS-Domänen und kann theoretisch auf der Stufe jeder KS-katalysierten Verlängerungsreaktion stattfinden.<sup>[158]</sup> Anschließend diffundieren freigesetzte Intermediate **191** aus der aktiven Tasche und können mittels LC-MS charakterisiert werden.

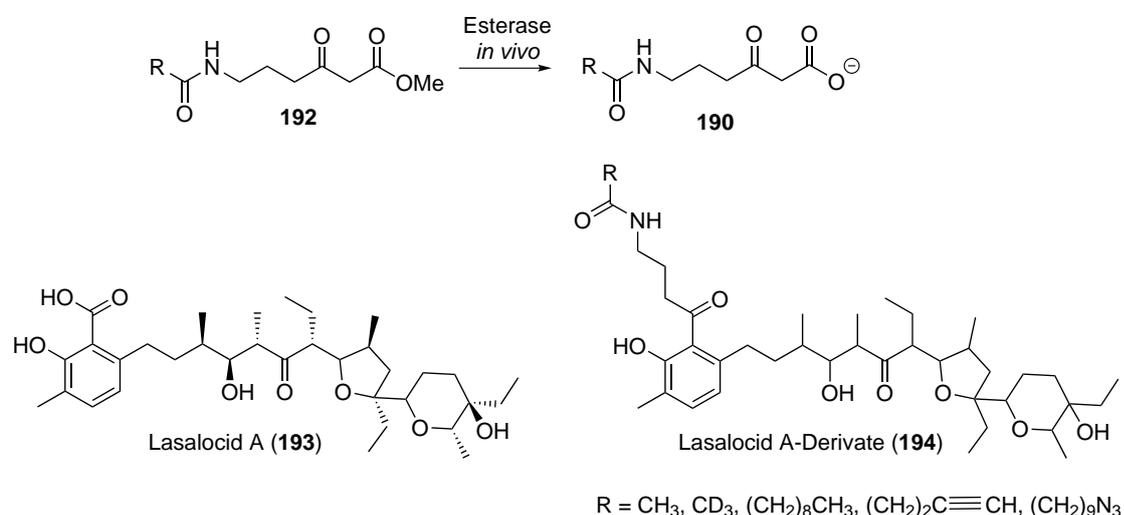


**Schema 24:** Funktionsweise nicht-hydrolysierbarer Malonyl-CoA Analoga (NHA, **190**). a) Die KS-Domäne katalysiert die Verlängerung der Polyketidkette **187** um eine ACP-gebundene Malonyleinheit **188**. b) Das Biosynthese-Intermediat **187** wird irreversibel durch decarboxylative CLAISEN-Kondensation an Malonyl-carba-(dethia)-*N*-acetylcysteamin (**190**) von der KS-Domäne abgespalten. Verändert nach TOSIN *et al.*<sup>[159]</sup>

Mithilfe dieser Methode wurden bereits die PKS Typ III Stilben-Synthetase, das modulare PKS Typ I Multienzym DEBS3 und die ungewöhnliche *i*PKS der Thio-lactomycin-Biosynthese *in vitro* untersucht.<sup>[157,158,160]</sup> Meilensteine waren die *in vivo*-Untersuchung der DEBS-Biosynthese in *Saccharopolyspora erythraea* und der Lasalocid A(**193**)-Biosynthese in *Streptomyces lasaliensis* im Jahr 2011.<sup>[159,161]</sup> Dabei wurden den Produktionskulturen die korrespondierenden Methylester der NHA zugesetzt und diese *in situ* von wirtseigenen Esterasen gespalten, weil negativ geladene Carbonate **190** Zellmembranen nicht passieren können.

Weitere NHA-Studien konzentrierten sich auf die Untersuchung der Reihenfolge biosynthetischer Transformationen von iterativen Typ I-Systemen. Beispielsweise wurde die Abfolge von Ketoreduktion und Aromatisierung der *partially reducing i*PKS der Micacocidin-Biosynthese im *Pseudomonas*-Stamm *Ralstonia solanacearum* GMI1000 aufgeklärt.<sup>[162]</sup> Die Eignung der Methode für die Untersuchung iterativer PKS-Module kann in Zukunft die Charakterisierung des Moduls AmbE und des an AmbF weiter gereichten Intermediats erlauben. Die Analyse freigesetzter Intermediate könnte klären, ob die KS-Domäne von AmbF katalytisch aktiv ist und ob beziehungsweise wie die Cyclopropanbildung im Bereich des Moduls AmbF biosynthetisch abläuft (vgl. Schema 14 in Kapitel 3.1).

Am Beispiel der 6-Methylsalicylsäure(6-MSA)-Biosynthese wurde gezeigt, dass *in vivo*-Studien mit NHA im fungalen Wirt *Penicillium patulum*, im gram-positiven *Streptomyces antibioticus* oder bei heterologer Genexpression in *E. coli* möglich sind.<sup>[163]</sup> Außerdem wurde in die Thiotetronat-Bildung durch ungewöhnliche iterative Synthesen in den filamentösen Bakterienstämmen *Lentzea sp.* und *Streptomyces thiolactonus* NRRL 15439 Einsicht gewonnen.<sup>[164]</sup> Die Anwendbarkeit für ein breites Spektrum verschiedener Mikroorganismen legt die Übertragbarkeit der *in vivo*-Methode auf den myxobakteriellen Stamm So ce10 (vgl. Kapitel 1.2) nahe.



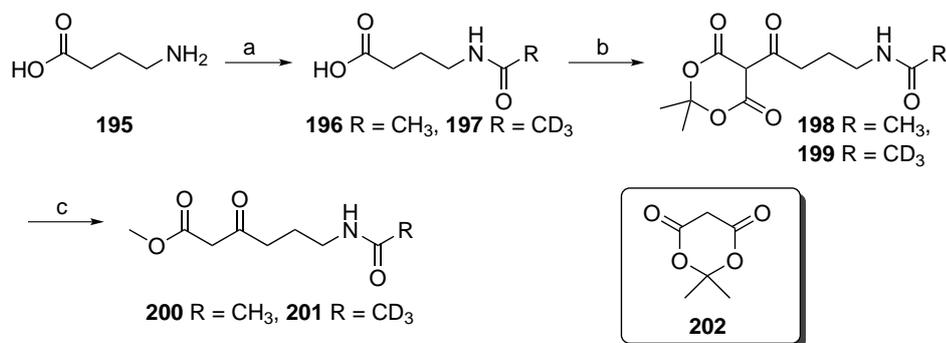
**Schema 25:** Übersicht von akzeptierten NHA-Modifikationen zur Generierung neuer Naturstoffderivate am Beispiel der Lasalocid A(**193**)-Biosynthese. Die Methyl-ester **192** werden *in vivo* von unspezifischen wirtseigenen Esterasen hydrolysiert.<sup>[6]</sup>

Mithilfe modifizierter NHA wurde Grundlagenforschung zur Substratflexibilität von KS-Domänen betrieben. Darüber hinaus ermöglichte die Funktionalisierung der NHA die Generierung neuartiger Naturstoffderivate ausgehend von der Thiotetronat-, Lasalocid A(**193**)- oder der 6-MSA-Biosynthese (Schema 25).<sup>[6,163–165]</sup> Außerdem konnten die organischen Extrakte von *S. lasaliensis*-Produktionskulturen mit modifizierten NHA direkt für die Semisynthese einer Bibliothek unnatürlicher Polyether in geringen Mengen eingesetzt werden.<sup>[165]</sup> Dieser Aspekt ist vor allem hinsichtlich der großen Dichte an funktionellen Gruppen im Ambruticin (vgl. Abb. 8 in Kapitel 1.5) interessant, da er, im Falle der Übertragung der Ergebnisse

auf einen größeren Maßstab, den Ausblick auf die Gewinnung neuer Ambruticin-Derivate und komplexer Ausgangssubstanzen für die chemoenzymatische Synthese bietet.

### 3.5.1 Synthese nicht-hydrolysierbarer Malonyl-CoA-Analoga

Für die spätere Isolation von Intermediaten der Ambruticin-Biosynthese wurden die nicht-hydrolysierbaren Malonyl-CoA-Analoga **200** und **201** nach einer literaturbekannten Vorschrift von Tosin *et al.* hergestellt (Schema 26).<sup>[158]</sup> Die deuterierte Methylgruppe von **201** sollte die spätere <sup>1</sup>H-NMR- und MS-basierte Analyse erleichtern.



**Schema 26:** Darstellung der nicht-hydrolysierbaren Malonyl-CoA-Analoga **200** und **201** nach einer Vorschrift von TOSIN *et al.*<sup>[158]</sup> a) *d*<sub>3</sub>-AcCl, TEA, MeOH, 0 °C – RT, 18 h; b) **202**, DMAP, EDC, THF, RT, 18 h; c) MeOH, Reflux, 2 h, **201** = 45% über drei Stufen ab **195**, **200** = 75% über zwei Stufen ab **196**.

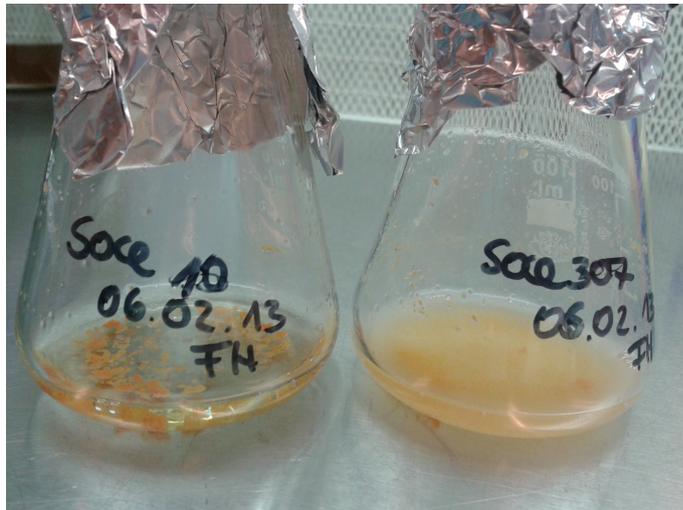
Die Synthese von **201** erfolgte ausgehend von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (**195**) und Acetyl-*d*<sub>3</sub>-chlorid durch *N*-Acylierung. Verbindung **196** war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die *N*-acylierten Carbonsäuren **196** und **197** wurden an Meldrumsäure (**202**) kondensiert. Nach Abspaltung von Aceton und CO<sub>2</sub> durch Methanolyse in der Siedehitze wurden die  $\beta$ -Ketomethylester **200** und **201** erhalten.

### 3.5.2 Nachweis der Ambruticinproduktion von *So ce10*

Für die spätere Durchführung von *in vivo*-Studien sollte sichergestellt werden, dass das *amb*-Gencluster (vgl. Abb. 10 in Kapitel 1.5) in *So ce10* exprimiert wird und die biosynthetischen Enzyme in ihrer aktiven Form vorliegen. Dafür wurde zunächst die Stammhaltung für den Ambruticinproduzenten *So ce10* etabliert (vgl. Kapitel 1.2 und 1.5).

Die Kultivierung des kommerziellen *So ce10*-Stamms DSM5386 war nicht erfolgreich mit den von Ringel *et al.* beschriebenen Kulturmedien (Tab. 14) und -bedingungen.<sup>[10]</sup> Aufgrund des langsamen Wachstums der Zellen (mehrere Wochen bis zur stationären Phase) und deren Homogenität wurde eine Kontamination der Dauerkulturen vermutet.

Vom *HZI Braunschweig* wurde daher ein neuer *So ce10*-Stamm bezogen und die Kulturmedien auf CY/H-Medium und CY-Agar-Nährböden umgestellt. Mit dem CY/H-Medium wurde die Kultivierungsdauer auf fünf Tage bis zur stationären Phase verkürzt und die Stammhaltung reproduzierbar ausgehend von Dauerkulturen möglich.



**Abbildung 61:** Stationäre *So ce10*- (links) und *So ce307*-Kulturen (rechts) in CY/H-Medium nach fünftägiger Kultivierung.

Dabei wurde beobachtet, dass keine homogene Suspension vorlag, sondern die Zellen adhäsiv auf dem Sojabohnenmehl im CY/H-Medium als Trägermaterial wuchsen und einen Biofilm an der Kolbenwand bildeten (Abb. 61, links). Dies führte zum Aufklaren des Kulturmediums und einem veränderten Erscheinungsbild im Vergleich zum Jerangolid-Produzenten So ce307 (Abb. 61, rechts, vgl. Kapitel 1.5). Weitere Unterschiede zum So ce10-Medium nach Ringel *et al.* sind das veränderte Puffersystem (HEPES-Puffer statt Phosphatpuffer), die Präsenz von CaCl<sub>2</sub> und Fe-EDTA sowie zusätzlich Hefeextrakt als komplexe und Glucose als definierte Nährstoffquellen.

Anschließend sollte Ambruticin mittels LC-MS durch den Vergleich mit Referenzproben (Tab. 9, Spektren siehe Anhang Abb. 118– 126) im So ce10-Kulturüberstand nachgewiesen werden.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der Ambruticin-Referenzprobe aus So ce10 Kulturüberstand. AmbVS3\* stellt eine Reinprobe dar.  $m_{\text{ber.}}$  = berechnete Masse;  $m_{\text{gef.}}$  = gefundene Masse;  $t_{\text{R}}$  = Retentionszeit.

Derivat	Summenformel	$m_{\text{ber.}}$	$m_{\text{gef.}}$	$t_{\text{R}}$ [min]
Amb VS3-NO ( <b>75</b> )	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>6</sub>	518.3482	518.3505	3.04
		[M+H] <sup>+</sup>		
Amb VS1 ( <b>72</b> )	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>5</sub>	516.3689	516.3706	2.94
Amb VS3 ( <b>74</b> )	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>5</sub>	502.3525	502.3525	3.12
		[M+H] <sup>+</sup>		
Amb VS3* ( <b>74</b> )	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>5</sub>	502.3525	502.3525	2.99
		[M+H] <sup>+</sup>		
Amb VS4 ( <b>76</b> )	C <sub>29</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>5</sub>	488.3376	488.3399	2.69
		[M+H] <sup>+</sup>		

Dafür wurde *So ce10*, ausgehend von einer CY/H-Vorkultur, über fünf Tage in 100 mL A-Medium kultiviert. Im Vergleich zum CY/H-Medium ist das A-Medium nährstoffreicher und enthält mehr Sojabohnenmehl für die Zelladhäsion. Nach Extraktion von 1 mL Kulturüberstand mit EtOAc konnte jedoch im Rückstand kein Ambruticin detektiert werden. Dies kann auf die geringe Konzentration der Ambruticine im Vergleich zu den Bestandteilen des Kulturmediums zurückgeführt werden.

Aus diesem Grund wurde die Kultivierung, wie von HÖFLE *et al.* beschrieben, mit dem Zusatz von 1% [v/v] Adsorberharz-Suspension (Amberlite<sup>®</sup> XAD-1180N) wiederholt.<sup>[65]</sup> Unter diesen Bedingungen wurden die produzierten Ambruticine kontinuierlich durch Diffusion in das hydrophobe, poröse Material angereichert (vgl. Kapitel 1.2). Anschließend wurde das Adsorberharz von der Kulturbrühe abgetrennt und die Ambruticine mit MeOH eluiert.

Im Rückstand wurde Ambruticin VS3 (**74**) bei  $m/z = 502.3525$  und  $t_R = 3.02$  min erfolgreich detektiert (Anhang, Abb. 123). Das bedeutet, dass die Enzyme der Ambruticin-Biosynthese unter den gewählten Produktionsbedingungen in ihrer aktiven Form vorlagen. Folglich sollten *in vivo*-Untersuchungen von *So ce10* zukünftig mit A-Medium unter Zugabe des Adsorberharzes durchgeführt werden. Aufgrund der geleisteten Vorarbeiten können die Abfangexperimente nun jederzeit durchgeführt werden.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments durchgeführt. Dem vorgestellten Biosynthese-Postulat zufolge sind sowohl das PKS-Modul AmbF als auch die *Tailoring*-Enzyme AmbG und AmbI an der DVC-Bildung sowie der Entfernung einer C1-Einheit aus dem Polyketidrückgrad beteiligt (vgl. Kapitel 3.1). Aus diesem Grund wurden die betreffenden Enzyme durch heterologe Proteinproduktion in *E. coli* bereit gestellt.

Zunächst wurde das 6.6 kbp-große *ambF*-Gen mittels homologer Rekombination synthetischer Genfragmente in *S. cerevisiae* assembliert und mithilfe der Gateway™-Klonierung in fünf verschiedene Expressionsvektoren inseriert (vgl. Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.3). Anschließend wurde His<sub>6</sub>-AmbF erfolgreich mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) produziert und *via* Ni-AC an der FPLC-Anlage angereichert (vgl. Kapitel 3.2.1.4). Somit steht das Modul AmbF für weiterführende Enzymaktivitätstests zur Verfügung.

Die in Modul AmbF ablaufenden Biosyntheseschritte sollen zukünftig mittels schrittweiser *in vitro*-Rekonstitution der durch die einzelnen Domänen katalysierten Schritte mit synthetischen Surrogaten für Biosyntheseintermediate untersucht werden. Daher wurden mithilfe verschiedener bioinformatischer Verfahren die katalytisch unabhängigen Domänengrenzen bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden mittels PCR amplifiziert, in den pET28a(+)-Expressionsvektor kloniert und als lösliche His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert

---

(vgl. Kapitel 3.3.2). Anschließend wurde die Px-Domäne per Ni-AC angereichert und in ersten photometrischen Assays auf die Bildung von PMP (**52**) hin untersucht, welche jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Die direkte Beteiligung von PLP (**47**) oder PMP (**52**) an der postulierten Polyenverschiebung (vgl. Schema 14 und Kapitel 3.1) konnte bisher nicht experimentell bestätigt werden (vgl. Kapitel 3.3.3), weshalb Studien zur Px-Domäne mit komplexen Substratsurrogaten und AS-Gemischen in Zukunft besonders interessant sind.

Darüber hinaus wurden die synthetischen Gene *ambI* und *ambG* in jeweils vier verschiedene *E. coli*-Expressionsvektoren ligiert (vgl. Kapitel 3.4.3.1). Für AmbG wurden mit allen vier Vektoren lösliche Fusionsproteine erhalten, deren Identität mittels AS-Sequenzierung und Immunfärbung nach Western Blot (für Trx-His<sub>6</sub>-AmbG) bestätigt werden konnte. Hingegen wurde für AmbI mit allen Vektorkonstrukten überwiegend unlösliche Fusionsproteine gewonnen (vgl. Kapitel 3.4.3.2). Allerdings gelangen die Produktion, Reinigung und der Nachweis von His<sub>6</sub>-AmbI mittels Protein-MS im Rahmen einer Masterarbeit.<sup>[126]</sup>

Die bioinformatische und biochemische Charakterisierung der Didomäne AmbG lieferte überraschende Erkenntnisse. Mithilfe bioinformatischer Methoden konnte keine eindeutige Zuordnung in eine ANL-Unterklasse erfolgen. Es wurden jedoch signifikante Ähnlichkeiten zu FAALs festgestellt (vgl. Kapitel 3.4.1).

Diese Ergebnisse spiegelten sich in der beobachteten Spezifität des Adenylierungsschritts wider. In PP<sub>i</sub>-Release-Assays konnten hohe Aktivierungen für gesättigte Fettsäuren mittlerer und langer Kettenlänge, verzweigte, ungesättigte oder funktionalisierte sowie aromatische Säuren unterschiedlicher Polarität beobachtet werden (vgl. Abb. 53 in Kapitel 3.4.4.1). Diese Flexibilität geht darüber hinaus, was bisher für ANLs beobachtet wurde (vgl. Tab. 6 in Kapitel 3.4.4.1).

In Zusammenarbeit mit K. LEBE wurde ein Protokoll für die Phosphopantetheinylierung von ACP-Domänen mit der rekombinanten PPTase Sfp entwickelt (vgl. Kapitel 3.4.4.3).<sup>[126]</sup> Nur ein Teil der aktivierten Substrate wurde in der zweiten Halbreaktion auf die ACP-Domäne transacyliert (vgl. Tab. 7 in Kapitel 3.4.4.3).

Für diese Experimente wurde eine kürzere Reaktionszeit gewählt, da bereits nach 15 min keine Veränderung im Acylierungsgrad mehr zu beobachten war. Offenbar werden Substrate übertragen - unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad - wenn sie eine gewisse Größe (Kettenlänge > C9) aufweisen, einen insgesamt hydrophoben Charakter haben und keine polaren Reste enthalten. Außerdem werden in diesem Schritt  $\pi$ -Systeme toleriert. In Kompetitionsstudien zur ACP-Transferreaktion wurde ein Trend zu Substraten mit längerer Kettenlänge festgestellt und indirekt darauf geschlossen, dass die ungesättigten Substrate **174** und **175** im Vergleich zu **134** bevorzugt akzeptiert werden (vgl. Tab. 8 in Kapitel 3.4.4.4). Dies legt einen positiven Effekt von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen nahe, welche hydrophobe Interaktionen kompensieren können.

Die biosynthetische Arbeitshypothese (vgl. Kapitel 3.1) konnte für die Didomäne AmbG nicht bestätigt werden, da die synthetisierten Biosynthese-Surrogate für eine ACP-gebundene Säure, Thioether **145**, 2-Butyldecansäure (**148**) sowie die Acetamide **146** und **147** nur in geringem Maße aktiviert und nicht auf die ACP-Domäne transacyliert wurden (vgl. Kapitel 3.4.4).

Allerdings legen die beobachteten Aktivitäten ein eventuell polyketidisches Substrat für AmbG nahe, zumindest aber eines mit einem höheren Funktionalisierungsgrad als lineare Fettsäuren, da  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen produktiv waren.

Eine Aussage zur biosynthetischen Rolle wird in Zukunft durch das Studium der Didomäne AmbG im Kontext mit AmbF und AmbI möglich sein. Weiterhin ist es reizvoll, die Struktur der Didomäne AmbG durch einen Proteinkristall zu studieren, um auf molekularer Ebene die Faktoren zu verstehen, welche die gefundenen, ungewöhnlichen Spezifitäten erklären.

Da die Acyl-Adenylate in freier Form vorliegen, ist es interessant, zu untersuchen, ob die ANL-Domäne aus AmbG aktivierte Acyl-Substrate in der Manier einer diskreten FAAL im Sinne der kombinatorischen Biosynthese in PKS oder NRPS-Biosynthesewege einschleusen kann.

---

Zudem wurden Vorarbeiten für *in vivo*-Studien mit dem Ambruticin-Produzenten So ce10 durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5). Der Myxobakterienstamm So ce10 wurde in Anwesenheit eines Adsorberharzes kultiviert und nach dessen Extraktion Ambruticin VS3 (**74**) mittels HPLC-MS in der Kulturbrühe nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.5.2). Dadurch wurde gezeigt, dass das Ambruticin-Gencluster unter den gewählten Produktionsbedingungen exprimiert wird und die biosynthetischen Enzyme aktiv vorliegen. In Zukunft können also Studien mit den NHA **200** und **201** durchgeführt werden (vgl. Kapitel 3.5.1).

Für fortführende Studien sollte das Gen für das Modul AmbE assembliert und dieses produziert werden. Die Mechanismen der vorangegangenen Biotransformationen wurden bereits in der Arbeitsgruppe aufgeklärt (vgl. Kapitel 1.5).<sup>[75,76]</sup> Somit würde die kombinierte Testung von AmbE und AmbF ermöglichen zu prüfen, ob die DVC-Bildung in diesen Modulen abläuft. Eine schrittweise Rekonstitution mit rekombinantem AmbI und AmbG würde dann die Untersuchung der Entfernung der C1-Einheit aus dem Polyketidrückgrad ermöglichen.

# 5 Experimenteller Teil

## 5.1 Biologische Arbeiten – Material

### 5.1.1 Allgemeines

Für die Herstellung von Kulturmedien, Lösungen und Puffer wurden Chemikalien der Firmen *AppliChem*, *Alfa Aesar*, *Carl Roth*, *Fluka* und *Sigma-Aldrich* sowie deionisiertes membranfiltriertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Enzyme und dazugehörige Puffer wurden über die Firmen *Fermentas*, *New England Biolabs* und *Thermo Scientific* bezogen. Es wurden die Sterilfilter CHROMAFIL Xtra<sup>®</sup> PTFE-45/13 mit 0.45 µm Porengröße der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff (Pipettenspitzen, Reaktions- und Kryogefäße) wurden in der Regel von der Firma *Sarstedt* bezogen.

### 5.1.2 Organismen

**Tabelle 10:** Verwendete Organismen.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> One Shot <sup>®</sup>	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	<i>Life Technologies</i>
<i>ccdB</i> Survival <sup>™</sup> 2 T1 <sup>R</sup>	Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i>	<i>Novagen</i>

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

Tabelle 10: Verwendete Organismen – Fortsetzung

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> One Shot®	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )	Invitrogen
TOP10	Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	
<i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
<i>S. cellulosum</i> (So ce10)	nicht bekannt	HZI Braunschweig
<i>S. cellulosum</i> (DSM5386)	nicht bekannt	Leibniz Institut (DSMZ)
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2	MATa ( <i>his3D1, leu2-<sub>112</sub>, ura3-52</i> <i>trp1-289, MAL2-8c</i> ) SUC2	Euroscarf

### 5.1.3 Synthetische Gene, Plasmide und Oligonukleotide

#### 5.1.3.1 Synthetische Gene

Die Gene der Ambruticin-Biosynthese *ambG*, *ambI* sowie die Genfragmente *ambF1*, *ambF2*, *ambF3*, *ambE1*, *ambE2*, *ambE3* und *ambE4* wurden in pUC19-Vektoren als synthetische Gene über die Firma Gen9 bezogen. Zuvor wurde eine Codon-Optimierung der Sequenzen für die heterologe Genexpression in *E. coli* vorgenommen. Die Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen.

## 5.1.3.2 Plasmide

Tabelle 11: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Selektionsmarker	Referenz
pColdI	Amp	QING <i>et al.</i> , <sup>[147]</sup> Bezug über TAKARA
pColdI_ambG	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pColdI_ambI	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pENTR-YA	Kan, Ura	K. WILLIAMS, Arbeitsgruppe COX an der <i>University of Bristol</i>
pENTR-YA_ambF	Kan, Ura	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pGEX-6P-1	Amp	erstellt von <i>Amersham Pharmacia, Biotech</i> , Buckinghamshire, UK, Bezug über <i>GE Healthcare</i> <sup>[166]</sup>
pGEX-6P-1_ambG	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pGEX-6P-1_ambI	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pG-KJE8	Cam	NISHIHARA <i>et al.</i> , <sup>[115]</sup> Bezug über TAKARA
pET28a(+)	Kan	<i>Novagen</i> <sup>[167]</sup>
pET28a(+)_acp1	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_acp2	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_acp3	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_ambG	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_ambI	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_h	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_h-px	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_ks	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_ks-acp2	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET28a(+)_px	Kan	erstellt im Rahmen dieser Arbeit

Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite

Tabelle 11: Verwendete Plasmide – Fortsetzung

Bezeichnung	Selektionsmarker	Referenz
pET29a_ <i>mtaA</i>	Kan	R. MÜLLER, <i>HZI Saarbrücken</i>
pET29a_ <i>sfp</i>	Kan	P. LEADLAY, <i>University of Cambridge</i>
pET32a(+)	Amp	Novagen <sup>[167]</sup>
pET32a(+)_ <i>ambG</i>	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pET32a(+)_ <i>ambI</i>	Amp	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pETG-10A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-10A_ <i>ambF</i>	Amp, Cam	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pETG-20A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-20A_ <i>ambF</i>	Amp, Cam	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pETG-30A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-30A_ <i>ambF</i>	Amp, Cam	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pETG-40A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-40A_ <i>ambF</i>	Amp, Cam	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pETG-41A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-60A	Amp, Cam	A. GERLOF, <i>HZI München</i>
pETG-60A_ <i>ambF</i>	Amp, Cam	erstellt im Rahmen dieser Arbeit
pUC19_ <i>ambE1</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambE2</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambE3</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambE4</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambF1</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambF2</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambF3</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambG</i>	Amp	<i>Gen9</i>
pUC19_ <i>ambI</i>	Amp	<i>Gen9</i>

## 5.1.3.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden lyophilisiert über die Firma *Sigma-Aldrich* bezogen und als 100  $\mu$ M Stammlösungen in ddH<sub>2</sub>O bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide.

Nr.	Name	Basensequenz 5'→3' (Länge)
1	AmbF1 fw	GCCAACTTTGTACAAAAAAGC (21)
2	AmbF1 rev	CCATCGGTTGCTGC (14)
3	AmbF2 fw	ATATTCTGGTTAGTGATGGTCG (22)
4	AmbF2 rev	TGCACCCACGCTTTCTTG (18)
5	AmbF3 fw	TCGTGGTGGCCTGG (14)
6	AmbF3 rev	TGCCAACTTTGTACAAGAAAG (21)
7	AmbE1 fw	GCCAACTTTGTACAAAAAAGC (21)
8	AmbE1 rev	GGCCCTGAACATGCA (15)
9	AmbE2 fw	GGTCGTCTGGTTTCAGC (17)
10	AmbE2 rev	GCACCAGGCAGACG (14)
11	AmbE3 fw	TGGTGCGTGCCG (12)
12	AmbE3 rev	TCACAAATGCCGGTG (15)
13	AmbE4 fw	AGCCAGTGTGTTACCCG (17)
14	AmbE4 rev	TGCCAACTTTGTACAAGAAAG (21)
15	AmbF1 GA fw	CGTCAGGGGCGAACAATCT (19)
16	AmbF1 GA rev	CGTACATGACACCCACGAAGA (21)
17	AmbF2 GA fw	CGTCTTCGTGGGTGTCATGT (20)
18	AmbF2 GA rev	TCTTCCAGGGATGCGGAA (18)
19	AmbF3 GA fw	AGCGAGCTGTTTCCGCAT (18)
20	AmbF3 GA rev	CGAGCACGAAGAGCGGTA (18)
21	AmbF4 GA fw	CGTACCGCTCTTCGTGCTC (19)
22	AmbF4 GA rev	TCTCATGGAAGCGCCGTATC (20)

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide – Fortsetzung

Nr.	Name	Basensequenz 5'→3' (Länge)
23	AmbF5 GA fw	GCGATACGGCGCTTCCAT (18)
24	AmbF5 GA rev	TGCAGTACTCAGGTTGAGCGC (21)
25	AmbFpETGA fw	TGCCGCGCGGCAGCCATATGATGACAAGCTGG (32)
26	AmbFpETGA rev	TGTCGACGGAGCTCGAATTCTCATGTCTCTT (32)
27	AmbF fw <i>NdeI</i>	TAAGTTATTCATATGATGACAAGCTGGTTG (30)
28	AmbF rev <i>EcoRI</i>	ATCCTGATGGAATTCTCATGTCTGTC (25)
29	AmbE1 GA fw	GTGAAGGACGAGGTGCTTTTCG (21)
30	AmbE1 GA rev	CTGCTCCACCTCGCCG (16)
31	AmbE2 GA fw	ATGGCCGTGATCGAGCG (17)
32	AmbE2 GA rev	TCAGGTCCGAGGTCGATGAG (20)
33	AmbE3 GA fw	CTCATCGACCTCGGACCTGAC (21)
34	AmbE3 GA rev	CTTCAGCAGCAAGACCCCG (19)
35	AmbE4 GA fw	GAAGGCTGCGGGGTCTTG (18)
36	AmbE4 GA rev	CTGGAAATGGATGGTCCGCT (20)
37	AmbE5 GA fw	AGCGGACCATCCATTTCCAG (20)
38	AmbE5 GA rev	AATTCCTCCGTCTTCGCCAG (20)
39	AmbEpETGA fw	TGCCGCGCGGCAGCCATATGGTGAAGGACGAG (32)
40	AmbEpETGA rev	TGTCGACGGAGCTCGAATTCCTCTTCGC (30)
41	AmbE fw <i>NdeI</i>	ATTATTAGGCATATGGTGAAGGACGAG (27)
42	AmbE rev <i>EcoRI</i>	ATAATAATCGAATTCCTCTTCGC (25)
43	ACP1 fw <i>NdeI</i>	GAATATAGTTACATATGACCAGCTGGCT (28)
44	ACP1 rev <i>EcoRI</i>	ATTATTATAGAATTCTTAAAACAGTTCATGCAGCT (35)
45	KS fw <i>NdeI</i>	ATAATATTTACATATGGCAAGCAGCGGTGATCAG (34)
46	KS rev <i>EcoRI</i>	GAATATAGTTAGAATTCTTAAACGGTACGCTGCAGTGC (38)
47	ACP2 fw <i>NdeI</i>	TAATATAGTTACATATGGTTCAGGCAGCCGATCA (34)
48	ACP2 rev <i>EcoRI</i>	ATAATATTTAGAATTCTAAACCGCTCAGACGATCCG (36)

Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite

Tabelle 12: Verwendete Oligonukleotide – Fortsetzung

Nr.	Name	Basensequenz 5'→3' (Länge)
49	ACP3 fw <i>NdeI</i>	TAATATAGTTACATATGGTTCAGGCAGCCGATCAG (35)
50	ACP3 rev <i>EcoRI</i>	GAATATAGTTAGAATTCTTAACCTGACAGG (37)
51	H fw <i>NdeI</i>	ATAATATTTACATATGCCGCGTGCACAGGGTC (32)
52	H rev <i>EcoRI</i>	TAATATAGTTAGAATTCTTAACTACGGGCTGGTGCAGG (38)
53	Px fw <i>NdeI</i>	TAATATAGTTACATATGAGTCTGGATGCATTTGGGCTG (38)
54	Px rev <i>EcoRI</i>	GAATATAGTTAGAATTCTTAGGTGGTTTTGAAACCACGCAG (41)
55	AmbG fw <i>NdeI</i>	ATCAATGTACATATGCAGTGTATGAGC (27)
56	AmbG rev <i>EcoRI</i>	TCCAAGTGTAGAATTCTTATTTACGACC (28)
57	AmbG fw <i>EcoRI</i>	ATAATATTTAGAATTCAGTGTATGAGCCGTGAA (34)
58	AmbG rev <i>XhoI</i>	ATTATTATACTCGAGTTATTTACGACCATCCAGAT (35)
59	ACP AmbG fw	TAGAGATTATCATATGCTGGATGAACCGGATG (32)
60	ACP AmbG rev	CAGTATCTATGAATTCTTACAGTTTTTCACAAACAAAGC (39)
61	AmbI fw <i>NdeI</i>	ATTATTATACATATGAGCGCACAGC (25)
62	AmbI rev <i>EcoRI</i>	TAATATTTATGAATTCTTATGCACGAACA (29)
63	AmbI fw <i>EcoRI</i>	ATTATTATAGAATTCAGCGCACAGCCGGAATAT (33)
64	AmbI rev <i>XhoI</i>	ATAATATTTACTCGAGTTATGCACGAACAACATCAC (36)
65	AmbG seq1	CTGGATCTGAGCTGTTGGA (20)
66	AmbG seq2	GTGTTCTGGTTGCCTATG (18)
67	AmbG seq3	GCCGTCATAAAGGTAAACAG (20)
68	AmbF seq1	GTATGGATCCGCAAGAAC (18)
69	AmbF seq2	TCGTGCACCGATTTCAG (16)
70	AmbF seq3	AGAACTGTGGGCAAGC (16)
71	AmbF seq4	CTGGCGTGTACCACCAGTG (19)
72	AmbF seq5	TGCGACCCTGGAAACC (16)
73	pColdI fw	GCCATATCGCCGAAAG (16)
74	pColdI rev	GGCAGGGATCTTAGATTC (18)

Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite

**Tabelle 12:** Verwendete Oligonukleotide – *Fortsetzung*

Nr.	Name	Basensequenz 5'→3' (Länge)
75	pET28 fw	TCATCACAGCAGCGGCCT (18)
76	pET28 rev	AGCGGGCAGTGAAAGGAAGG (20)
77	T7minus1	AATACGACTCACTATAGGG (19)
78	pGEX-5	CTGGCAAGCCACGTTTGG (18)
79	pGEX-3	GGAGCTGCATGTGTCAGAG (19)

### 5.1.4 Größenstandards und Antikörper

Als DNA-Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese wurden *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use 250 to 10,000 bp* oder *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Ready-to-Use 75 to 20,000 bp* der Firma *Thermo Scientific* sowie *100 bp DNA Ladder* von *NEB* verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden die Protein-Größenstandards *PageRuler Unstained Protein Ladder* oder *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* der Firma *Thermo Scientific* sowie *Color Prestained Protein Standard, Broad Range (NEB)* eingesetzt.

Für die Immunfärbung wurden die folgenden Antikörper (AK) verwendet:

**Tabelle 13:** Verwendete Antikörper für die Immunfärbung.

Beschreibung	Produzent	Hersteller	Verdünnungsfaktor
$\alpha$ -His <sub>6</sub> -Tag (DP3514) in AK-I-Puffer	Hase	<i>Acris</i>	5 000
$\alpha$ -IgG aus Hase, AP-Konjugat (A3687) in AK-II-Puffer	Ziege	<i>Sigma</i>	20000

### 5.1.5 Kulturmedien und Nährböden

Alle Kulturmedien wurden vor ihrer Verwendung 15 min bei 120 °C und 2 bar sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0.45 µm). Die Zusammensetzungen der So ce10-Medien A, CY/H und des CY-Agars wurden freundlicherweise von Prof. J. WINK (*HZI Braunschweig*) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 14:** Verwendete Kulturmedien und Nährböden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Kulturmedien und Nährböden für <i>E. coli</i></b>	
LB-Medium	10 g/L Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt
LB-Agar	LB + 15 g/L Agar
2 TY-Medium	16 g/L Trypton 10 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl
2 TY-Agar	2 TY + 15 g/L Agar
TB-Medium	17 g/L Trypton 24 g/L Hefeextrakt 20% [v/v] Glycerin 1X Puffer B
10X Puffer B	125 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 23.1 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 14:** Verwendete Kulturmedien und Nährböden – *Fortsetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SOB-Medium	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
SOC-Medium	94% [v/v] SOB 25 mM MgCl <sub>2</sub> 5,6 mM Glucose
<b>Kulturmedien und Nährböden für <i>S. cerevisiae</i></b>	
YPAD-Medium	10 g/L Hefeextrakt 20 g/L Pepton 20 g/L Glucose 1 g/L Adenin-Hemisulfat
SM Drop-Out Ura-Medium	7.0 g/L Hefe Stickstoff-Basis (Ohne Aminosäuren) 20 g/L Glucose 0.8 g/L Drop-Out Mix pH 5.6
Drop-Out Mix	9 g Valin 3 g Phenylalanin, Tryptophan je 2 g Adenine Hemisulfat, Arginin-HCl, Histidin-HCl, Isoleucin, Leucin, Lysin-HCl, Methionin, Serin, Threonin, Tyrosin
SM Drop-Out Ura-Agar	SM Drop-Out Ura + 16 g/L Agar

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

Tabelle 14: Verwendete Kulturmedien und Nährböden – *Fortsetzung*

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Kulturmedien und Nährböden für <i>S. cellulosum</i></b>	
CY-Agar	3.0 g/L Casiton 1.0 g/L Hefeextrakt 50 mM HEPES 9 mM CaCl <sub>2</sub> 16 g/L Agar pH 7.2
CY/H-Medium	4 g/L Kartoffelstärke 1.5 g/L Casiton 1.5 g/L Hefeextrakt 1.0 g/L Sojabohnenmehl 50 mM HEPES 9 mM CaCl <sub>2</sub> 5.3 mM MgCl <sub>2</sub> 5.6 mM Glucose 23.2 µM Fe-EDTA pH 7.3
A-Medium	8.0 g/L Kartoffelstärke 4.0 g/L Sojabohnenmehl 2.0 g/L Hefeextrakt 50 mM HEPES 43.4 mM Glycerin 9 mM CaCl <sub>2</sub> 5.3 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7.3

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 14:** Verwendete Kulturmedien und Nährböden – *Fortsetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>So ce10</i> –Medium (Ringel <i>et al.</i> <sup>[10]</sup> )	5.0 g/L Kartoffelstärke 2.5 g/L Casiton 250 mg/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 250 mg/L MgSO <sub>4</sub> pH 7.2
PM–Agar (Ringel <i>et al.</i> <sup>[10]</sup> )	500 mg/L Pepton 738 mg/L Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 12.0 g/L HEPES 15.0 g/L Agar pH 7.4 Nach dem Autoklavieren zufügen: 3.5 g/L Glucose 500 mg/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 60 mg/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 140 mg/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 mg/L Na-Fe-EDTA

### 5.1.6 Puffer und Lösungen

**Tabelle 15:** Verwendete Puffer und Lösungen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Antibiotikastammlösungen und Medienzusätze</b>	
Carbenicillin (Carb)	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/mL in 70% [v/v] Ethanol in ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin (Kan)	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O
Tetrazyklin (Tet)	5 mg/mL in 70% [v/v] Ethanol in ddH <sub>2</sub> O
Arabinose (Ara)	500 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M in ddH <sub>2</sub> O
<b>Lösungen für die Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i></b>	
Lösung I	50 mM TRIS 10 mM EDTA pH 8.0 + 100 ng/mL RNase-Lösung
RNase-Lösung	10 mg/mL DNase-freie RNase A 10 mM Natriumacetat (pH 5.2) 100 mM TRIS-HCl (pH 7.4)
Lösung II	200 mM NaOH 1% [w/v] SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat (pH 5.5)
TE-Puffer	10 mM TRIS 1 mM EDTA pH 8.0

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 15:** Verwendete Puffer und Lösungen – *Fortsetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Lysepuffer für die Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i></b>	
Fangman-Methode	10 mM TRIS (pH 8.0) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 2% [v/v] Triton X-100 1% [w/v] SDS
Hahn-Methode	100 mM TRIS (pH 8.0) 50 mM EDTA 1% [w/v] SDS
Hahn-Quick-Methode	10 mM TRIS (pH 8.0) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0.1% [w/v] SDS
<b>Lösungen für die Agarosegelelektrophorese</b>	
50X TAE-Puffer	2 M TRIS-Acetat 5 mM EDTA pH 8.0
6X Probenpuffer	30% [w/v] Glycerin in ddH <sub>2</sub> O 0.25% [w/v] Bromphenolblau 0.25% [w/v] Xylencyanol FF
<b>Lösungen für die SDS-PAGE</b>	
3X Laemmli-Mix	150 mM TRIS (pH 6.8) 6% [w/v] SDS 30% [w/v] Glycerin 0.02% [w/v] Bromphenolblau

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

Tabelle 15: Verwendete Puffer und Lösungen – *Fortsetzung*

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer	1X Laemmli-Mix 1% [w/v] SDS 100 mM DTT
5% Sammelgel (1mL)	170 $\mu$ L Rotiphorese Gel 30 130 $\mu$ L 1 M TRIS (pH 6.8) 680 $\mu$ L ddH <sub>2</sub> O 10 $\mu$ L 10% [w/v] SDS 10 $\mu$ L 10% [w/v] APS 1 $\mu$ L TEMED
6% Trenngel (5 mL)	1 mL Rotiphorese Gel 30 1.3 mL 1.5 M TRIS (pH 8.8) 2.6 mL ddH <sub>2</sub> O 50 $\mu$ L 10% [w/v] SDS 50 $\mu$ L 10% [w/v] APS 4 $\mu$ L TEMED
12% Trenngel (5 mL)	2 mL Rotiphorese Gel 30 1.3 mL 1.5 M TRIS (pH 8.8) 1.6 mL ddH <sub>2</sub> O 50 $\mu$ L 10% [w/v] SDS 50 $\mu$ L 10% [w/v] APS 2 $\mu$ L TEMED

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 15:** Verwendete Puffer und Lösungen – *Fortsetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
15% Trenngel (5 mL)	2.5 mL Rotiphorese Gel 30 1.3 mL 1.5 M TRIS (pH 8.8) 1.1 mL ddH <sub>2</sub> O 50 µL 10% [w/v] SDS 50 µL 10% [w/v] APS 2 µL TEMED
10X SDS-Laufpuffer	50 mM TRIS-HCl 0.1 mM EDTA 1% [w/v] SDS pH 8.0
Entfärbelösung	25% [v/v] Isopropanol 10% [v/v] Essigsäure
Färbelösung	Entfärbelösung + 1% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250
<b>Lösungen für den Western Blot</b>	
Blotting-Puffer	40 mM TRIS 50 mM Glycin pH 9.1
TBS-T-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0.05% [v/v] Tween <sup>®</sup> 20 pH 7.7
TBS-T-MP-Puffer	TBS-T-Puffer + 5% [w/v] Magermilchpulver
Ponceau S-Lösung	0.1% [w/v] Ponceau S 5% [v/v] Essigsäure

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

Tabelle 15: Verwendete Puffer und Lösungen – *Fortsetzung*

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Lösungen für die Immunfärbung</b>	
Alkalische Phosphatase-Puffer	100 mM TRIS 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9.5
AK-I-Puffer	40 mM TRIS 100 mM NaCl pH 7.5
AK-II-Puffer	50 mM TRIS 50% [w/v] Glycerin 15 mM NaN <sub>3</sub> 1% [w/v] BSA 1 mM MgCl <sub>2</sub> pH 8.0
BCIP-Lösung	50 mg/mL BCIP (4-Toluidin-Salz) in DMF
NBT-Lösung	50 mg/mL NBT in 70% [v/v] DMF in ddH <sub>2</sub> O
<b>Puffer und Lösungen für die NAC</b>	
Lysepuffer	10 mM TRIS-HCl 100 mM NaCl pH 8.0
Puffer für gravimetrische NAC	Lysepuffer + 25 mM bis 1 M Imidazol pH 8.0

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 15:** Verwendete Puffer und Lösungen – *Fortsetzung*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FPLC-Puffer	30 mM TRIS-HCl 500 mM NaCl 10% [w/v] Glycerin pH 7.5 entgast und sterilfiltriert
FPLC-Waschpuffer	FPLC-Puffer + 20 mM Imidazol, pH 7.5 entgast und sterilfiltriert
FPLC-Elutionspuffer	FPLC-Puffer + 500 mM Imidazol, pH 7.5 entgast und sterilfiltriert
<b>Assay- und Lagerungspuffer</b>	
Sfp-Lagerungspuffer	30 mM TRIS-HCl 500 mM NaCl 20% [w/v] Glycerin pH 7.5
Px-Assaypuffer	100 mM TAPS-NaOH (pH 8.5)
<b>Sonstige Puffer und Lösungen</b>	
Kompetenzpuffer	10 mM Kaliumacetat 50 mM CaCl <sub>2</sub> pH 6.2

## 5.1.7 Geräte

Tabelle 16: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav VX-95	<i>Systemec</i>
Autoklav VX-150	<i>Systemec</i>
SpeedvacConcentrator 5301	<i>Eppendorf</i>
Inkubator VT5042EK	<i>Heraeus</i>
Inkubator HeraTherm	<i>Thermo Scientific</i>
Trockenschrank	<i>Binder</i>
pH-Meter Checker	<i>Hanna</i>
pH-Meter pHenomenal™ pH 1000L	<i>VWR</i>
Double Vision UV/VIS (Transilluminator)	<i>Hoefer</i>
Gel Doc™XR+ System	<i>Biorad</i>
Thermocycler MJ Research Minicycler PTC-150	<i>Biorad</i>
Thermocycler PeqSTAR 96 Universal Gradient	<i>PEQLAB GmbH</i>
Thermomixer Comfort 5355	<i>Eppendorf</i>
Microbial Safety Cabinet MSC Advantage 1.8	<i>Thermo Scientific</i>
Sterilbank SAFE 2020	<i>Thermo Scientific</i>
Photometer FoodALYT	<i>OMNILAB</i>
Photometer UV-1601 PC Spectrophotometer	<i>Shimadzu</i>
UV/Vis Spektralphotometer NanoDrop®ND-1000	<i>PEQLAB GmbH</i>
Spektrophotometer Nanodrop DS-11+	<i>DENOVIX®</i>
Elisa Reader Mithras LB 940	<i>Berthold Technologies</i>
Ultraschallgerät Sonifier 250	<i>Branson</i>
Ultraschallgerät Sonopuls HD3100	<i>Bandelin</i>
5147 R Mikrozentrifuge	<i>Eppendorf</i>
Mikrozentrifuge Qik spin	<i>Edwards Instruments</i>
Heraeus Megafuge 16R	<i>Thermo Scientific</i>

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 16:** Verwendete Geräte – *Fortsetzung*

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	<i>Thermo Scientific</i>
Sorvall LYNX 6000 Zentrifuge	<i>Thermo Scientific</i>
Tischschüttler CH-4103	<i>Infors-AG</i>
Schüttler Innova 4335	<i>New Brunswick Scientific</i>
Innova <sup>®</sup> 44 Incubator Shaker Series	<i>New Brunswick Scientific</i>
Reinstwassersystem BarnsteaGenPurePro	<i>Thermo Scientific</i>
Excella E24 Incubator Shaker Series	<i>New Brunswick Scientific</i>
Vortexmischer Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i>
Gelkammer ComPhor Mini	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
Perfect Blue Gel System Midi S	<i>PEQLAB GmbH</i>
Perfect Blue <sup>™</sup> Double Gel Systems Twin M	<i>PEQLAB GmbH</i>
FPLC-Anlage ÄKTA <sup>™</sup> pure	<i>GE Healthcare</i>
UV-Detektor U9-L	
Leitfähigkeitsdetektor C9	
Mini PROTEAN Tetra Cell	<i>Biorad</i>
Power Supply E833	<i>Consort</i>
Power Supply E835	<i>Consort</i>
peqPOWER E250 Power supply	<i>PEQLAB GmbH</i>
DPX 200, DPX 400, AVANCE 400	<i>Bruker</i>
GC System 6890	<i>Hewlett Packard</i>
Micromass LCT Premier Massenspektrometer	<i>Waters</i>

## 5.2 Biologische Arbeiten – Methoden

### 5.2.1 Kultivierung von Mikroorganismen

#### 5.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte jeweils bei 37 °C in LB-, 2TY- oder TB-Medium (Tab. 14) mit entsprechenden Antibiotika- und Medienzusätzen (Tab. 15). Die Selektion Plasmid-tragender Bakterien fand nach einem Ausstrich auf LB- oder 2TY-Agar über Nacht statt. Für eine Über-Nacht-Kultur (ÜNK) wurden 6 mL antibiotikahaltiges LB-, 2TY- oder TB-Medium mit Bakterien von einem Nährboden oder aus der Glycerin-Dauerkultur inokuliert und bei 180 Upm geschüttelt.

Die Sicherung von Klonierungs- und Expressionsvektoren erfolgte jeweils in 2 mL-Kryogefäßen als 25% [v/v] Glycerin-Dauerkultur im Kulturstamm *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 bei -80 °C. Zusätzlich wurden Expressionsvektoren in den Kulturstämmen *E. coli* BL21 (DE3) und/oder *E. coli* Rosetta 2 pLysS gelagert. Für die Gateway<sup>™</sup>-Zielvektoren mit intaktem *ccdB*-Gen wurden ausschließlich Dauerkulturen mit *E. coli* One Shot<sup>®</sup> *ccdB* Survival<sup>™</sup> 2 T1<sup>R</sup> angelegt.

#### 5.2.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2

Der Hefekulturstamm *S. cerevisiae* CEN.PK2 wurde bei 30 °C und 200 Upm geschüttelt. Plasmid-tragende Hefezellen wurden unter Verwendung von SM Dropout Ura-Medium oder -Agar-Nährboden (Tab. 14) selektiert. Für ÜNK wurden 13 mL-Kulturröhrchen mit 5 mL YPAD-Medium verwendet und für Hauptkulturen (HK) 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikane und 50 mL Medium. Dauerkulturen wurden als 15%-ige Glycerin-Suspension einer ÜNK hergestellt und bei -80 °C gelagert.

### 5.2.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Zellsuspensionen

Die optische Dichte bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $OD_{600}$ ) von *E. coli*- oder *S. cerevisiae*-Zellsuspensionen wurde mit 1 mL Kulturvolumen gegen das Kulturmedium als Referenz bestimmt. Bei Zellsuspensionen von *S. cerevisiae* entspricht eine optische Dichte von 0.1 bei 600 nm in etwa einem Titer von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL.

### 5.2.1.4 Kultivierung von *Sorangium cellulosum*10

Ausgehend von 1 mL Dauerkultur wurde So ce10 auf CY–Agar-Nährboden (Tab. 14) bei 30 °C bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert und anschließend steril in 15 mL CY-Medium überführt und 3-5 Tage bei 30 °C 200 Upm geschüttelt. Mit der erhaltenen Biomasse aus der Vorkultur wurden 100 mL CY/H- oder A-Medium inokuliert und fünf Tage als HK weiter geführt. Nach 3-4 Tagen wurden Dauerkulturen aus der Biomasse der HK angelegt.

### 5.2.1.5 Naturstoffextraktion aus *Sorangium cellulosum*10

Es wurden 25 g Amberlite® XAD-1180N („XAD-Harz“, Porengröße: 300 Å, Oberfläche: 600 m<sup>2</sup>/g, *Rohm and Haas*) mit 150 mL ddH<sub>2</sub>O versetzt und die wässrige Phase mit 10% HCl auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde die Suspension 4x 5 min mit 200 mL ddH<sub>2</sub>O, 2x 15 min mit je 50 mL Aceton bzw. MeOH und 3x kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Es wurde eine 50%-ige Suspension in ddH<sub>2</sub>O hergestellt und diese 20 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert.

Die So ce10-HK wurden steril mit 1% [v/v] XAD-Harz-Suspension versetzt und, wie oben beschrieben, fünf Tage weiter geschüttelt. Dann wurde 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert, der Kulturüberstand verworfen und das Sediment in einem Volumen MeOH resuspendiert.

Es wurde 1.5 h bei 160 Upm geschwenkt, wie oben zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN gelöst und per HPLC-MS untersucht.

## 5.2.2 Gentechnische Methoden

### 5.2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA – Allgemeine Vorbemerkungen

Die Sedimentation der Zellen erfolgte bei RT über 5 min bei 5 000 Upm und alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C und 14 000 Upm durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 70% EtOH gewaschen und unter vermindertem Druck bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer (Tab. 15) oder ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei 4 °C (< 7 Tage) oder bei -20 °C gelagert.

Es wurden ca. 300 mg Glasperlen mit 1 M HCl und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und wie zuvor beschrieben autoklaviert. Die Homogenisierung mithilfe der Glasperlen erfolgte mit dem Vortexmischer.

### 5.2.2.2 Plasmidpräparation aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse

Es wurden 100 mg DNase-freie RNase A (*AppliChem*) in 10 mM Natriumacetat (pH 5.2, 10 mL) gelöst und 15 min auf 98 °C erhitzt. Die Lösung wurde auf RT gekühlt, mit 1 mL 1 M TRIS-HCl (pH 7.4) vermischt und bei -20 °C gelagert.

Das Zellsediment aus 3 mL ÜNK wurde in 200 µL Puffer 1 (Tab. 15) und 5 µL RNase-Lösung resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse mit 200 µL Puffer 2 über 2 min bei RT. Es wurde 200 µL eiskalter Puffer 3 zugefügt und das Reaktionsgefäß 3x invertiert. Nach Zufügen weniger Tropfen CHCl<sub>3</sub> und 5 min Inkubation auf Eis wurde 7 min zentrifugiert.

Im Anschluss wurde die wässrige Phase mit 350 µL Isopropanol vermischt, mindestens 20 min lang zentrifugiert und der DNA-Rückstand wie zuvor beschrieben gewaschen, getrocknet und gelöst. Sollten größere Mengen Plasmid-DNA präpariert werden, wurden bis zu 50 mL ÜNK verwendet und die Volumina aller verwendeten Lösungen entsprechend angepasst.

### 5.2.2.3 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae* mittels alkalischer Lyse

**„Fangman“-Methode<sup>[168]</sup>** Die sedimentierten Zellen aus 5 mL ÜNK wurden mit Glasperlen, je 200 µL Fangman-Lysepuffer (Tab. 15) und 1:2 Phenol/CHCl<sub>3</sub> vermischt und 2 min homogenisiert. Anschließend wurden 200 µL TE-Puffer zugefügt und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 800 µL EtOH vermischt und 3 min zentrifugiert. Der DNA-Rückstand wurde wie zuvor beschrieben gewaschen, getrocknet und gelöst.

**„Hahn“-Methode** Das Zellsediment aus 5 mL ÜNK wurde mit 5 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in 500 µL Hahn-Lysepuffer (Tab. 15) resuspendiert und 30 s mit Glasperlen homogenisiert. Anschließend wurden 25 µL gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt, 30 s gemischt und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 30 s mit 400 µL TE-gesättigtem Phenol gemischt und 4 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 400 µL 4:1 Phenol/CHCl<sub>3</sub> extrahiert, mit 1 mL EtOH vermischt und 6 min zentrifugiert. Der DNA-Rückstand wurde wie zuvor beschrieben gewaschen, getrocknet und gelöst.

**„Hahn-Quick“-Methode** Nach 3-4 Tagen wurden die Kolonien von einem Nährboden in 200 µL Hahn-Quick-Lysepuffer (Tab. 15) aufgenommen und 1 min mit Glasperlen homogenisiert. Anschließend wurden 200 µL 1:1 Phenol/CHCl<sub>3</sub> zugegeben, kurz gemischt und 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 mL EtOH vermischt und 6 min zentrifugiert. Der DNA-Rückstand wurde wie zuvor beschrieben gewaschen, getrocknet und gelöst.

#### 5.2.2.4 Plasmidpräparation aus *S. cerevisiae*–mittels Kit

Für die DNA-Isolation mit dem „*Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II*“-Kit (*Zymo Research*) wurden 3-4 Tage alte Hefekolonien von einem Nährboden in 1-2 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und sedimentiert. Im Anschluss erfolgten der Zellaufschluss und die DNA-Isolation nach Herstellerangaben.

#### 5.2.2.5 Konzentrationsabschätzung von DNA-Lösungen

Die spektroskopische Konzentrationsabschätzung von DNA-Lösungen erfolgte bei  $\lambda = 260$  nm gegen ddH<sub>2</sub>O als Referenz. Die Reinheit der DNA-Lösungen wurde mithilfe des Quotienten der Absorptionen bei  $\lambda = 280$  nm (Proteine,  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1.8\text{--}2.0$ ) und 230 nm (z.B. Phenole,  $A_{230\text{nm}}/A_{280\text{nm}} > 2.0$ ) abgeschätzt.

#### 5.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 0.7–2% Agarose [w/v] in 1X TAE-Puffer (Tab. 15) unter Aufkochen gelöst und auf ca. 50 °C abgekühlt. Anschließend wurden 100 mL Agarose-Gel mit 5  $\mu\text{L}$  Roti<sup>®</sup>-GelStain (*Roth*) oder 5  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid versetzt, luftblasenfrei ca. 3–5 mm hoch in einen Gelschlitten gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden in 6X DNA-Ladepuffer aufgenommen und für jeden Gellauf ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte in 1X TAE-Puffer in der Regel bei 110 V, 250 mA und 150 W über 45–60 min. Die Geldokumentation wurde unter UV-Licht durchgeführt.

#### 5.2.2.7 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

In der Regel wurden konventionelle, *FastDigest™* - (*Thermo Fisher Scientific*) oder *High-Fidelity<sup>®</sup>*-Restriktionsendonukleasen mit verringerter *Star*-Aktivität und *Cut-Smart<sup>®</sup>*-Puffersystem (*NEB*) nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 17). Es wurden die Restriktionsendonukleasen *AscI*, *EcoRI*, *NdeI*, *NotI* und *XhoI* verwendet.

Dabei erfolgte für Klonierungsarbeiten die Hydrolyse mit *High-Fidelity*<sup>®</sup>-Enzymen für 3–16 h in 50 µL Reaktionsvolumen und für Testrestriktionen mit *FastDigest*<sup>™</sup> - Enzymen für 20–30 min im 10 µL-Maßstab.

Linearisierten Expressionsvektoren wurden in den letzten 30 min der Hydrolyse jeweils 1 U *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP, *NEB*) zur Dephosphorylierung zugesetzt und die Enzyme anschließend 5 min bei 65 °C inaktiviert.

**Tabelle 17:** Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen.

Komponente	Konzentration
10X Reaktionspuffer	1X
Restriktionsendonukleasen	je 1-2 U/µL
DNA	< 50 ng/µL Plasmid-DNA oder < 10 ng/µL DNA-Fragmente
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

#### 5.2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die *Phusion*<sup>®</sup> *High Fidelity* DNA Polymerase (*NEB*) ist eine *High Speed*-Polymerase und besitzt zusätzlich eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die zu einer verminderten Fehlerrate (*proofreading*) führt. Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurde nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt (Tab. 18).

Tabelle 18: Standard-PCR Protokoll.

Komponente	Konzentration
5X <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF-Puffer	1X
1 mM dNTP-Mix <sup>1</sup>	200 $\mu\text{M}$
20 $\mu\text{M}$ Primer <i>fw</i> und <i>rev</i>	je 500 nM
DNA-Matrize	2.5 ng $\mu\text{L}^{-1}$ genomische DNA oder ca. 0.2 ng $\mu\text{L}^{-1}$ Plasmid-DNA oder ca. 0.3 pg $\mu\text{L}^{-1}$ String-DNA oder ca. 0.01 ng $\mu\text{L}^{-1}$ DNA-Fragmente
<i>Phusion</i> <sup>®</sup> High Fidelity DNA Polymerase (2 U $\mu\text{L}^{-1}$ )	0.02 U $\mu\text{L}^{-1}$
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{L}$

Die Hybridisierungs-Temperaturen ( $T_{\text{H}}$ ) der Primerpartner wurden mithilfe des webbasierten Programms *Phusion*<sup>®</sup> *Tm-calculator* (*NEB*) basierend auf ihrer Basensequenz und Länge bestimmt. Lag die  $T_{\text{H}}$  über 72 °C, wurde die Elongationszeit entsprechend um die Hybridisierungsdauer verlängert.

Sollte mithilfe von Primern Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt werden, wurden beim PCR-Programm zunächst für 1–5 Zyklen die  $T_{\text{H1}}$  des homologen Bereichs verwendet und anschließend die  $T_{\text{H2}}$  des auf voller Länge bindenden Primers. Die PCR-Programme orientierten sich jeweils am folgenden Standard-Programm (Tab. 19):

<sup>1</sup>1 mM dNTP Mix enthält je 0.25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

**Tabelle 19:** Standard-PCR-Programm.

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Primer-Hybridisierung	variabel	20 s	5–35
Elongation	72	20 s/kb	
Finale Elongation	72	5 min	1
Lagerung	8	beliebig	

### 5.2.2.9 PCR für die Hefe-DNA-Assemblierung

Die Genfragmente *ambF1*, *ambF2*, *ambF3*, *ambE1*, *ambE2*, *ambE3* und *ambE4* wurden ausgehend von den entsprechenden pUC19-Vektoren (Tab. 12) nach dem Standard-PCR-Protokoll (Tab. 18) und -Programm (Tab. 19) mit einer Elongationszeit von 1 min 20 s amplifiziert (Tab. 20).

**Tabelle 20:** Hybridisierungstemperaturen ( $T_H$ ) für PCRs der DNA-Fragmente für die Hefemassemblierung. Die Primernummern beziehen sich auf Tab. 12

DNA-Fragment	Größe (bp)	Primer	$T_H$ [°C]	DNA-Matrize
<i>ambE1</i>	2 643	7, 8	60	puC19_ <i>ambE1</i>
<i>ambE2</i>	2 533	9, 10	58	puC19_ <i>ambE2</i>
<i>ambE3</i>	2 735	11, 12	58	puC19_ <i>ambE3</i>
<i>ambE4</i>	2 641	13, 14	59	puC19_ <i>ambE4</i>
<i>ambF1</i>	2 221	1, 2	58	puC19_ <i>ambF1</i>
<i>ambF2</i>	2 266	3, 4	58	puC19_ <i>ambF2</i>
<i>ambF3</i>	2 142	5, 6	59	puC19_ <i>ambF3</i>

#### 5.2.2.10 PCR für die Gibson-DNA-Assemblierung

Die DNA-Fragmente für die Gibson-DNA-Assemblierung wurden ausgehend von genomischer *So ce10*-DNA amplifiziert.<sup>2</sup> Es wurde das Standard-PCR-Protokoll (Tab. 18) mit GC-Puffer an Stelle von HF-Puffer und 1.5 M Betain-Zusatz verwendet. Die DNA-Polymerase wurde der PCR-Lösung jeweils nach der initialen Denaturierung zugefügt.

Im Anschluss an die Amplifizierung wurde der Erfolg der PCR mittels Agarose-Gel-elektrophorese überprüft und bei Vorliegen mehrerer Amplifikate das gewünschte DNA-Fragment präparativ über ein Agarose-Gel gereinigt. Bei geringen Amplifikatmengen wurden die betreffenden DNA-Fragmente erneut in eine PCR eingesetzt (*Re*-PCR). Die DNA-Fragmente wurden nach den folgenden PCR-Programmen vervielfältigt und die verwendeten Primer sind jeweils in Klammern angegeben (mit Bezug auf Tab. 12):

---

<sup>2</sup>Die genomische *So ce10*-DNA wurde mir freundlicherweise von Claudia Holec zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 21:** PCR-Programm für die Gibson-DNA-Fragmente E2 (31, 32), E4 (35, 36) und F5 (23, 24)

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	3 min	1
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	69–68	20 s	5
Elongation	72	70 s	
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	68–67	20 s	5
Elongation	72	70 s	
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	67–66	20 s	20
Elongation	72	70 s	
Finale Elongation	72	5 min	1
Lagerung	8	beliebig	

**Tabelle 22:** PCR-Programm für die Gibson-DNA-Fragmente F1 (15, 16), F2 (17, 18), F3 (19, 20) und F4 (21, 22)

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	3 min	1
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	70–69	20 s	2
Elongation	72	70 s	
Senkung der $T_H$ um 1 °C nach jedem 2. Zyklus bis auf 62–61 °C			
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	61–60	20 s	10
Elongation	72	70 s	

*Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite*

**Tabelle 22:** Gibson-DNA-Fragmente F1, F2, F3 und F4 – *Fortsetzung*

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Finale Elongation	72	5 min	1
Lagerung	8	beliebig	

Für das DNA-Fragment E3 (33, 34) wurde statt Betain final 7.5% [v/v] DMSO zugesetzt und das PCR-Programm aus Tab. 22 mit  $T_H = 65\text{--}55\text{ °C}$  verwendet.

Das Anfügen von Vektor-Adapttern (VA) an E5 und F1 für die Gibson-DNA-Assemblierung oder die klassische Klonierung (K) wurde mit dem folgenden PCR-Programm durchgeführt (Tab. 23):

**Tabelle 23:** Adapter-PCR-Programm für die Gibson-DNA-Fragmente E5-VA (37, 40), E5-K (37, 42) und F1-VA (16, 25)

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	3 min	1
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	40	30 s	1
Elongation	72	70 s	
Denaturierung	98	20 s	
Primer-Hybridisierung	60	30 s	30
Elongation	72	70 s	
Finale Elongation	72	5 min	1
Lagerung	8	beliebig	

Für das DNA-Fragment F1-K (27, 16) wurde das Programm aus Tab. 23 mit  $T_{H1} = 49$  °C und für F5-VA (23, 26) und F5-K (23, 28) mit  $T_{H1} = 30$  °C verwendet. Die DNA-Fragmente E1-K (30, 41) und E1-VA (30, 39) wurden entsprechend mit  $T_{H1} = 38$  °C erhalten.

### 5.2.2.11 PCR für die Subklonierung von AmbF-Domänen in pET28a(+)

Es wurden dem Standard-PCR-Protokoll (Tab. 18) und -Programm (Tab. 19) folgend Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (am 5'-Ende für *NdeI* und am 3'-Ende für *EcoRI*) an das jeweilige Amplifikat angefügt (Tab. 24).

**Tabelle 24:** ( $T_H$ ) für PCRs der AmbF-Domänen. Die Primernummern beziehen sich auf Tab. 12.

Domäne	(bp)	Primer	$T_{H1}, T_{H2}$ [°C]	DNA-Matrize
ACP1	(276)	43, 44	54, 66	puC19_ambF1
ACP2	(279)	47, 48	64, 72	puC19_ambF2
ACP3	(279)	49, 50	64, 71	puC19_ambF2
KS	(1323)	45, 46	65, 72	puC19_ambF1
KS-ACP2	(2445)	45, 48	64, 72	pE-YA_ambF
H	(795)	51, 52	68, 72	puC19_ambF2
Px	(1308)	53, 54	68, 72	puC19_ambF3
H-Px	(2964)	51, 54	68, 72	pE-YA_ambF

### 5.2.2.12 PCR für die Klonierung von *ambG*, *ACP\_ambG* und *ambI*

Die Gene *ambG* und *ambI* wurden nach dem Standard-PCR-Protokoll (Tab. 18, Tab. 19) mit einer Elongationszeit von 1 min amplifiziert. Dabei wurden jeweils für die Klonierungen in die Vektoren pET32a(+) und pGEX-6P-1 in 5'-Position eine *EcoRI*- und in 3'-Position eine *XhoI*-Erkennungssequenz an das Amplifikat angefügt.

Für die Klonierungen in pET28a(+) und pColdI wurde analog verfahren und in 5'-Position eine *NdeI*- und in 5'-Position eine *EcoRI*-Erkennungssequenz angefügt (Tab. 25).

**Tabelle 25:** ( $T_H$ ) für PCRs mit AmbG und AmbI. Die Primernummern beziehen sich auf Tab. 12.

DNA-Fragment	(bp)	Primer	$T_{H1}, T_{H2}$ [°C]	DNA-Matrize
<i>ambG-NdeI/EcoRI</i>	2.248	55, 56	52, 62	pUC19_ambG
<i>ambG-EcoRI/XhoI</i>	2.248	57, 58	56, 67	pUC19_ambG
<i>ambI-NdeI/EcoRI</i>	1.348	61, 62	56, 57	pUC19_ambI
<i>ambI-EcoRI/XhoI</i>	1.348	63, 64	58, 59	pUC19_ambI

An das DNA-Fragment *ACP\_ambG-NdeI/EcoRI* wurde in einer Gradienten-PCR (Tab. 26, Primer 59 und 60 (Tab. 12), pColdI\_ambG als DNA-Matrize) nach dem Standard-PCR-Protokoll (Tab. 18) in 5'-Position eine *NdeI*- und in 5'-Position eine *EcoRI*-Erkennungssequenz angefügt.

**Tabelle 26:** Gradienten PCR-Programm für *ACP\_ambG*

Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	30	1
Denaturierung	95	7	
Primer-Hybridisierung	58	15	2
Elongation	72	5	
Denaturierung	95	7	
Primer-Hybridisierung	$69 \pm 3^3$	15	30
Elongation	72	5	
Finale Elongation	72	10	1
Lagerung	8	beliebig	

<sup>3</sup>67.4 °C, 68.1 °C, 69.3 °C, 69.9 °C

### 5.2.2.13 Kolonie-PCR

Es wurde wenig Zellmaterial einer zu testenden Bakterienkolonie auf einen LB-Agar-Nährboden mit entsprechendem Antibiotikum übertragen und dieser über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in 46 µL Mastermix 1 (**M1**, Tab. 27) resuspendiert und 5 min bei 95 °C lysiert. Anschließend wurden 4 µL Mastermix 2 (**M2**) zugegeben und die DNA mit einem geeigneten PCR-Programm basierend auf dem Standard-PCR-Programm (Tab. 19) vervielfältigt.

**Tabelle 27:** Kolonie-PCR.

Komponente	Konzentration	
10X <i>Dream Taq</i> <sup>TM</sup> Green-Puffer	1X	<b>M1</b>
ddH <sub>2</sub> O	43 µL	
1 mM dNTP-Mix <sup>4</sup>	200 µM	
20 µM Primer <i>fw</i> und <i>rev</i>	je 400 nM	<b>M2</b>
<i>Dream Taq</i> <sup>TM</sup> DNA-Polymerase (5 U µL <sup>-1</sup> )	0.1 U/µL	

Es wurde die *Dream Taq*<sup>TM</sup> DNA-Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet und daher die Elongationszeit auf 1 min/kb erhöht. Als T<sub>H</sub> wurde die Schmelztemperatur der Primer – 5 °C verwendet. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

<sup>4</sup>1 mM dNTP Mix enthält je 0.25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

#### 5.2.2.14 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Kit

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel oder aus PCR-Ansätzen erfolgte mithilfe des *NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up-Kit* (*Macherey-Nagel*) nach Herstellerangaben. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die gebundene DNA mit 750  $\mu\text{L}$  70% EtOH gewaschen und die Elution mit 2x 15  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O (50 °C) über 10 min bei RT durchgeführt und die Eluate vereinigt.

#### 5.2.2.15 Reinigung von DNA-Fragmenten nach der *Freeze and Squeeze*-Methode

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14 000 Upm und 4 °C durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, mit 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer (Tab. 15) versetzt, in Flüssigstickstoff eingefroren und 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gekühlt und die Extraktion des Gels 2x wiederholt. Die vereinigten DNA-Lösungen wurden mit 1/10 Volumenteilen 3 M Natriumacetat und 2 Volumenteilen EtOH (-20 °C) gemischt und >20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde 15 min zentrifugiert und die DNA wie zuvor beschrieben gewaschen, getrocknet und gelagert.

#### 5.2.2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*) für 10 min bei 22 °C oder 16 h bei 4 °C nach folgendem Protokoll (Tab. 28). Anschließend wurde die Ligase 10 min bei 80 °C inaktiviert und 5  $\mu\text{L}$  der Lösung für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen verwendet.

**Tabelle 28:** Ligation mit T4-DNA Ligase.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
10X T4 DNA-Ligase Puffer	1X
T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ L)	0.05 U/ $\mu$ L
Linearisierte Vektor-DNA	1–5 ng/ $\mu$ L
Insert-DNA	5–7-facher molarer Überschuss zur Vektor-DNA
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ L

### 5.2.2.17 DNA-Assemblierung nach Gibson<sup>[96]</sup>

Die DNA-Assemblierung wurde mit dem *Gibson Assembly*<sup>®</sup> *Master Mix* (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt (Tab. 29). Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 50 °C inkubiert und bis zur Transformation in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 29:** DNA-Assemblierung nach Gibson.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
DNA Fragmente	250–500 pg/ $\mu$ L Vektor-DNA, 2–3-facher molarer Überschuss Insert-DNA
2X Gibson Assembly Master Mix	1X
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ L

### 5.2.2.18 Gateway™ -Klonierung

Der *LR Clonase™ II Enzyme Mix* (Life Technologies) wurde 2 min auf Eis aufgetaut, 2x kurz mit dem Vortexmischer gemischt und der Reaktionslösung als letzte Komponente zugefügt (Tab. 30). Die Lösung wurde kurz zentrifugiert und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde die LR-Reaktion durch Zugabe von 0.5  $\mu\text{L}$  Proteinase K-Lösung (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und Inkubation für 10 min bei 37 °C beendet. Die Lösung wurde im Anschluss direkt für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen verwendet.

**Tabelle 30:** Pipettierschema für die Gateway™ -Klonierung.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
pENTR-YA_ambF (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Gateway™ -Zielvektor (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
<i>LR Clonase™ II Enzyme Mix</i>	1 $\mu\text{L}$
TE-Puffer	2 $\mu\text{L}$

### 5.2.2.19 Chemische Transformation von *E. coli*

Es wurden 50 mL HK in 2TY (Tab. 14) bis  $\text{OD}_{600} = 0.3\text{--}0.6$  kultiviert und 10 min bei 3500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 50 mL Kompetenzpuffer (Tab. 15) resuspendiert, 1 h unter gelegentlicher Agitation auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert. Die Zellen wurden in 5 mL Kompetenzpuffer mit 20% Glycerin aufgenommen und als 100  $\mu\text{L}$ -Aliquots bei -80 °C gelagert.

Die chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, mit 1–5  $\mu\text{L}$  Ligationslösung oder 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert.<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup>Chemisch kompetente *E. coli* TOP10- und *E. coli* BL21 DE3-Zellen wurden mir freundlicherweise z.T. von Katja Körner zur Verfügung gestellt.

Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und 10 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 500 µL SOC-Medium zugefügt und 1 h bei 37 °C und 150 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden 30 s bei 5000 Upm sedimentiert, in 100 µL SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Nährboden mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

#### 5.2.2.20 Chemische Transformation von *S. cerevisiae* zur DNA-Assemblierung

Anhand der OD<sub>600</sub> wurde der Titer einer *S. cerevisiae* CEN.PK2 ÜNK in 2X YPAD (Tab. 14) bestimmt (s.o.) und 50 mL HK in 2X YPAD mit 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL inokuliert. Die Kultur wurde bis OD<sub>600</sub> = 2 weitergeführt, 5 min bei 3000 x g und 4 °C sedimentiert und mit 25 mL bzw. 1 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in 1 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, in 100 µL-Aliquots (ca. 10<sup>8</sup> Zellen), 30 s zentrifugiert und bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert.

Es wurden 2 mg/mL Lachssperma-DNA (*Sigma-Aldrich*) in TE-Puffer (Tab. 15) gelöst, 5 min bei 95 °C denaturiert und im Eisbad abgekühlt (*Carrier-DNA-Lösung*). Der Transformations-Mix (optimiert nach GIETZ *et al.*<sup>[93]</sup>) wurde nach Tab. 31 bereitgestellt und unter leichter Agitation mit den kompetenten Hefezellen auf Eis vermischt.

**Tabelle 31:** Transformations-Mix für Hefezellen.

Komponente	Volumen
PEG 3350 (50% in ddH <sub>2</sub> O)	240 µL
1 M LiAc	36 µL
<i>Carrier-DNA-Lösung</i>	150 µL
pENTR_YA (25 ng/µL, 322 ng)	13 µL
DNA-Fragmente (je 107 ng)	21 µL

Es folgte ein Hitzeschock über 50 min bei 42 °C und 350 Upm und 30 s Zentrifugation bei 14 000 x g. Das Zellsediment wurde mit 1 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf SM Drop-Out Ura–Agar–Nährboden ausgestrichen. Die Selektion Plasmidtragender Hefezellen erfolgte über 3–4 Tage bei 30 °C.

### 5.2.2.21 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von *GATC Biotech* (im *Single Read Sequencing*- oder *LIGHTrun Sequencing*-Verfahren) oder von *MWG eurofinns* (im *SmartSeq™* -Verfahren) durchgeführt und die Proben den Service-Firmen entsprechend zur Verfügung gestellt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Programme *Serial Cloner*, *ClustalW2* oder *Clustal Omega* und *Chromas*.

### 5.2.2.22 Allgemeine Vorschrift für Klonierungsarbeiten

Die Zielvektoren und DNA-Matrizen wurden mittels alkalischer Lyse aus den entsprechenden *E. coli* TOP10 ÜNK isoliert. In einer PCR wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen an die Insert-DNA angefügt. Nach Überprüfung der Homogenität der Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Amplifikate entweder präparativ über ein Agarose-Gel oder direkt gereinigt. Anschließend wurden Insert-DNA und Zielvektoren mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Die Enzyme in der Reaktionslösung mit Insert-DNA wurden durch Hitzebehandlung inaktiviert. Die Zielvektoren wurden dephosphoryliert, präparativ über ein Agarose-Gel gereinigt und anschließend die Konzentration und Reinheit aller DNA Fragmente photometrisch überprüft. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente ligiert, in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen transformiert und erstellte Konstrukte auf die plasmidcodierte Antibiotika-Resistenz hin selektiert. Die Identität der erhaltenen Konstrukte wurde mithilfe von Testrestriktion oder Kolonie-PCR getestet und anschließend mittels DNA-Sequenzierung und Sequenzvergleich verifiziert.

## 5.2.3 Biochemische Methoden

### 5.2.3.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Es wurden HK mit 2% ÜNK inokuliert und bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. In der Regel wurde 2TY-Medium (Tab. 14, TB-Medium für AmbF) mit entsprechendem Antibiotikum (Tab. 15) verwendet. Den *E. coli* BL21 DE3 pG-KJE8-HK wurden 5 ng/L Tetrazyklin sowie 0.5 mg/mL Arabinose zugesetzt und HK mit dem pColdI-Vektor wurden bei  $OD_{600} = 0.4-0.6$  für 1 h auf 15 °C gekühlt und anschließend induziert.

Die Produktion heterologer Proteine wurde durch IPTG-Zugabe induziert und die Produktionskulturen 3–4 h bei >30 °C oder 18–24 h bei <30 °C geschüttelt. Anschließend wurde 5 min bei 3 000 Upm zentrifugiert und das Zellsediment bei -20 °C gelagert.

### 5.2.3.2 Zellyse mittels Ultraschall

Das Zellsediment wurde mit 1 mL Lyse-Puffer (Tab. 15) je 100 mg Biomasse resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung unter Eiskühlung (45% Amplitude, 0.02 kJ/s, 30 s Puls und 30 s Pause) über 7 min lysiert. Anschließend wurde 30 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert und das Zellysat bis zur weiteren Verwendung im Eisbad gekühlt.

### 5.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Es wurde die diskontinuierliche Laemmli-Methode mit 6, 10, 12- oder 15%-igen Trenngelen (Tab. 15) unter denaturierenden Bedingungen verwendet.<sup>[127]</sup> Hierfür wurden Proteinproben 1:1 mit 2X SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min aufgekocht und kurz zentrifugiert. In jede Tasche eines 5%-igen Sammelgels wurden 20–30 µL Probe aufgetragen und jeweils ein Protein-Größenstandard (3–5 µL) mitgeführt. Die Proteine wurden in der Regel 20 min bei 100 V im Sammelgel fokussiert und anschließend bei 170 V aufgetrennt, bis Bromphenolblau aus dem Trenngel

austrat. bei der Verwendung von 6%-igen Trenngelen wurde die Gelkammer mit Wasserkühlung betrieben, bei 110 V fokussiert und anschließend bei 150 V für 1 h aufgetrennt. Im Anschluss wurden die SDS-Gele mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, >3 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und über Nacht mit Entfärbelösung behandelt.

### 5.2.3.4 Proteintransfer mittels *semi-dry Western Blot*

Das SDS-Gel wurde mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in Blotting-Puffer (Tab. 15) äquilibriert. Anschließend wurden luftblasenfrei 3 in Blottingpuffer-getränkte Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran (Porendurchmesser: 0.2 µm), das SDS-Gel und 3 Filterpapiere auf die positive Elektrodenplatten gelegt. Die negative Elektrodenplatte wurde dem Stapel aufgesetzt und die Proteine 30 min bei 4 mA cm<sup>-2</sup> übertragen.

### 5.2.3.5 Immunfärbung

Alle Schritte, bis auf die Farbreaktion, wurden bei 100 Upm durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit TBS-T-Puffer (Tab. 15) gewaschen und mit Ponceau S-Lösung behandelt. Sie wurde mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt und über Nacht bei 4 °C in TBS-T-MP-Puffer inkubiert. Es folgte die Behandlung für 1 h mit dem 1. AK, 3x 5 min mit TBS-T-MP-Puffer und dem 2. AK für 1 h. Anschließend wurde 2x 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und 2x 5 min in Alkalische-Phosphatase-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wurde mit 1:2 BCIP/NBT-Lösung in Alkalische-Phosphatase-Puffer bis zum Sichtbarwerden der Banden (oder über ca. 40 min) durchgeführt und mit ddH<sub>2</sub>O beendet.

### 5.2.3.6 Gravimetrische Nickel-Affinitätschromatographie

Es wurden 1 mL *Protino Ni-TED* (Macherey-Nagel) und <10 mL Zellysat verwendet. Alle Spülschritte wurden mit 10 mL ddH<sub>2</sub>O oder Puffer durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde mit Lysepuffer (Tab. 15) äquilibriert und anschließend

1 h bei 4 °C mit dem Zelllysate inkubiert. Nach dem Probendurchlauf wurde 2x mit 1 mL Lysepuffer +25 mM Imidazol gewaschen und anschließend mit je 1 mL Lysepuffer mit 50, 100, 250 und 500 mM sowie 1 M Imidazol eluiert. Das Säulenbett wurde mit ddH<sub>2</sub>O gespült und 30 min mit 2 mL 0.5 M NaOH bei 4 °C inkubiert. Dann wurde mit ddH<sub>2</sub>O gespült und das Säulenbett bei 4 °C in Lysepuffer gelagert. Das Säulenmaterial wurde regeneriert mit ddH<sub>2</sub>O, 2 mL 100 mM EDTA (pH 8.0), ddH<sub>2</sub>O, 2 mL 100 mM NiSO<sub>4</sub> und ddH<sub>2</sub>O.

#### 5.2.3.7 Nickel-Affinitätschromatographie mittels FPLC

Es wurde die *HisTrap FF*-Chromatographiesäule (*GE Healthcare*, 5 mL Bettvolumen) und filtrierte Puffer, Lösungen und Zelllysate verwendet (0.45 µm Porengröße). Die Flussrate betrug 5 mL/min ohne und 1 mL/min mit eingebauter Chromatographiesäule. Die FPLC-Anlage und -säule wurden mit ddH<sub>2</sub>O sowie mit FPLC-Puffer (Tab. 15) gespült und Luftblasen entfernt. Das Zelllysate wurde mit FPLC-Puffer aus einem Probenreservoir (*Superloop*, 50 mL Volumen) auf die Chromatographiesäule aufgetragen und gebundene Proteine über einen linearen Gradienten (25–500 mM Imidazol) mit 60 mL Puffer eluiert. Oberhalb eines UV-Schwellenwerts von 80 mAU wurden 1 mL Elutionsfraktionen gesammelt. Die FPLC-Anlage und -säule wurden mit ddH<sub>2</sub>O gespült und in 20% EtOH gelagert. Bei Bedarf wurde die Säule wie zuvor beschrieben regeneriert.

#### 5.2.3.8 Gelfiltration und Konzentrierung von Proteinproben

Für die Gelfiltration wurden PD-10-Chromatographiesäulen (*GE Healthcare*) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 10 mL Puffer äquilibriert, 2.5 mL Proteinprobe aufgetragen und mit 1 mL Puffer gespült. Anschließend wurde mit 3 mL Puffer eluiert, die Proteinlösung im Eisbad gekühlt und das Säulenmaterial mit 20 mL Puffer gespült.

Weiterhin wurden die Membranzentrifugationsgefäße *Amicon*<sup>®</sup> *Ultra-15* (*Merck Millipore*, 30 kDa oder 10 kDa Ausschlussgröße) nach Herstellerangaben verwendet.

### 5.2.3.9 Proteinbestimmung nach Bradford<sup>[169]</sup>

Nach Herstellung einer 1:40 und 1:80 Verdünnung der Proteinlösung in ddH<sub>2</sub>O wurden diese in Dreifachbestimmung 1:5 mit 1X Roti-Nanoquant (Roth) versetzt, 5 min inkubiert und die Absorptionen bei 450 und 590 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wurde anschließend durch den Vergleich mit einer BSA-Standardreihe und einer linearen Regression ermittelt.

### 5.2.3.10 Aminosäure-Sequenzierung

Die Proteinproben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Coomassie-Färbung visualisiert und ein ca. 1 x 4 mm großes Gelstück ausgeschnitten. Dieses wurde in ddH<sub>2</sub>O entfärbt, unter vermindertem Druck getrocknet und bei -20 °C gelagert.<sup>6</sup>

## 5.2.4 Enzymaktivitätstests

### 5.2.4.1 Phosphopantetheinylierung von ACP-Domänen

Die *apo*-ACP-Domänen wurden mit der rekombinanten Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) Sfp aus *B. subtilis* bei 30 °C und 300 Upm für 1 h im Zelllysats in einem Reaktionsvolumen von 1 mL in ihre *holo*-Form überführt (Tab. 32).<sup>7[151]</sup> Anschließend wurden die *holo*-Proteine *via* Ni-Affinitätschromatographie gereinigt und mittels Gelfiltration in Assaypuffer (Tab. 15) überführt. Der vollständige Umsatz wurde mittels massenspektroskopischer Analyse überprüft und die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

---

<sup>6</sup>Die Durchführung der LC-MS-MS-Messungen erfolgte durch den AK Braun.

<sup>7</sup>Die Phosphopantetheinylierung wurde in Zusammenarbeit mit Karen Lebe etabliert.

**Tabelle 32:** Phosphopantetheinylierung mit der Ppant-Transferase Sfp.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
ACP-Domäne (in Lysepuffer)	ca. 7 $\mu$ M
Sfp (in Sfp-Lagerungspuffer)	210 nM
Coenzym A	60 nM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
TCEP-HCl	1 mM

#### 5.2.4.2 Test der Substratspezifität von AmbG

Die Enzymaktivitätstest mit gereinigtem AmbG wurden in 100  $\mu$ L Reaktionsvolumen bei 30 °C und 300 Upm durchgeführt. Die Substrate wurden als geeignete Stammlösungen in EtOH (Substrate **163–166** in EtOAc) bereitgestellt, sodass die finale Lösungsmittel-Konzentration in Assaymischungen jeweils <1% war. In der Regel wurden ACP-Transfer Assays und Konkurrenzexperimente für 15 min mit 60  $\mu$ M Substrat und Pyrophosphat-Bestimmungen für 1.5 h mit 2 mM Substrat inkubiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Analyse jeweils bei 0–4 °C.

**Tabelle 33:** Enzymaktivitätstests mit AmbG.

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
<i>holo</i> -AmbG in Lysepuffer (Tab. 15)	25–40 $\mu$ M
Substrat	variabel
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
ATP	1.25 mM
TCEP-HCl	1 mM

### 5.2.4.3 Pyrophosphat-Bestimmung

Für die Bestimmung der Pyrophosphat( $PP_i$ )-Konzentration der Enzymaktivitätstests wurde das *EnzChek Pyrophosphate Assay Kit E 6654 (Molecular Probes)* nach Herstellerangaben verwendet. Das Reaktionsvolumen wurde auf 200  $\mu\text{L}$  gesenkt und die Messung in einer 96-Loch-Platte durchgeführt.

Die Quantifizierung erfolgte gegen eine  $PP_i$ -Standardreihe.<sup>8</sup> Zur Normalisierung wurde in jedem Datenset ein 5  $\mu\text{M}$   $PP_i$ -Standard mitgeführt. Hintergrundeffekte wurden kompensiert durch Negativkontrollen ohne Substrat bzw. ATP.

### 5.2.4.4 Protein-Massenspektrometrie

Mithilfe eines Autosamplers wurden 3–5  $\mu\text{L}$  der Assaymischung auf eine C4-Säule (*Butyl HPLC column 50 x 2.1 mm I.D. S-3  $\mu\text{m}$ , 30 nm von YMC*) aufgetragen. Eine Desolvationsenergie von 350 °C wurde für die Elektrospray-Ionisierung (ESI) im positiven Modus eines *Micromass LCT Premier* Massenspektrometers (*Waters*) angelegt. Es wurde ein ACN:ddH<sub>2</sub>O-Gradient (0 → 90% Acetonitril, mit 0.1% Ameisensäure) über 15 min mit einer Flussrate von 0.4 ml/min angelegt. Alternativ wurde eine CN-Säule (*EC 50/2 NUCLEODUR 100-3 CN-RP, Macherey-Nagel*) verwendet und 5  $\mu\text{L}$  Probe in einem linearen Gradienten aus MeOH:ddH<sub>2</sub>O (35% → 95%, mit 0.1% Ameisensäure) über 15 min mit einer Flussrate von 0.3 ml/min aufgetragen.

Zwischen Messungen wurde die HPLC-Säule mit alternierenden ACN:MeOH:ddH<sub>2</sub>O-Gradienten über 20 min gespült (Tab. 34) und anschließend eine Testmessung mit Wasser mit dem zuvor beschriebenen ACN:ddH<sub>2</sub>O-Gradienten durchgeführt.

Anschließend wurden die Daten mithilfe der *MassLynx*-Software (*Waters*) prozessiert. Dafür wurden das Hintergrundrauschen des UV-Chromatogramms reduziert (Parameter: Polynomordnung 15, 40% Integral, 0.01 Toleranz) und die Daten mit-

---

<sup>8</sup>Die  $PP_i$ -Standardreihe von 1  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  wurde für eine lineare Regression genutzt und ist dem Anhang zu entnehmen.

hilfe von *MaxEnt1* dekonvolutiert (für AmbG: 75–85 kDa, für ACPs: 10–13 kDa, 1.00 Da/Kanal, jeweils Iteration bis zur Konvergenz).

**Tabelle 34:** Spülprogramm für die HPLC mit einer Flussrate von 0.3 mL/min. A = ddH<sub>2</sub>O, B = MeOH, C = ACN

Zeit [min]	% A	% B	% C
0	90	10	0
5	40	60	0
7	40	60	0
9	0	100	0
11	90	10	0
12	5	0	95
14	90	0	10
15	0	100	0
17	90	10	0

#### 5.2.4.5 Untersuchung der Px-Domäne

Die Untersuchung der Px-Domäne wurde in 100 µL Reaktionsvolumen bei RT in der 96-Loch-Platte in Dreifachbestimmung nach dem in Tab. 35 folgenden Protokoll durchgeführt. Zunächst wurden Puffer, Enzyme und Pyridoxalphosphat (PLP) vorgelegt und über 10 min hinweg alle 30 s folgende Wellenlängen gemessen:  $\lambda = 330$  nm (Pyridoxaminphosphat),  $\lambda = 360$  nm (PLP) und  $\lambda = 430$  nm (PLP-Aldimin-Intermediat). Nach Zugabe des Substrats (oder Puffer in Negativkontrollen), wurden obengenannte Wellenlängen über 1 h hinweg alle 30 s gemessen. Es wurden Negativkontrollen ohne Enzymdomäne, PLP oder Substrat mitgeführt.

**Tabelle 35:** Enzymaktivitätstests mit der Px-Domäne.

---

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
Px-Domäne	0.1–3 mg/mL
Substrat	4–20 mM
TAPS-NaOH Puffer (pH 8.5)	100 mM
Pyridoxalphosphat	20–200 $\mu$ M
(Stamm 20 mM in NaPO <sub>4</sub> , pH 7.0)	

---

## 5.3 Chemische Arbeiten

### 5.3.1 Allgemeines

Sämtliche Chemikalien wurden über die Firmen *ABCR Feinchemikalien*, *Acros*, *AppliChem*, *Alfa Aesar*, *Carl Roth*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich* und *TCI* bezogen. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien ohne weitere Reinigung in den entsprechenden Reaktionen eingesetzt.

Vor ihrer Benutzung wurden Petroleumether (PE) und EtOAc destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel wurden mit analytischem oder HPLC-Reinheitsgrad bezogen und ohne Reinigung eingesetzt. Wasserfreies  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde aus einer MB SPS-Apparatur mit Trockenkartusche (*M. Braun*) erhalten, alle weiteren wasserfreien Lösungsmittel wurden direkt vom Hersteller gekauft. Trockenes THF wurde durch Erhitzen unter Rückfluss über Natriumdraht (mit Benzophenon als Indikator) hergestellt und anschließend destilliert. Triethylamin wurde über KOH getrocknet und stets frisch destilliert verwendet.

Luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten und unter Inertgasbedingungen abgekühlten Reaktionsgefäßen unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Flüssigkeiten wurden diesen Reaktionsgemischen mit inertgasgespülten Einwegspritzen durch Septendurchstichkappen und Feststoffe im Inertgas-Gegenstrom zugesetzt.

Die pH-Werte von Lösungen wurden mittels pH-Papier mit Universalindikator (pH 1-14) bestimmt.

### 5.3.1.1 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung wurde unter leichtem Überdruck nach dem Prinzip der *Flash*-Chromatographie mit Kieselgel (60 Å, Korngröße 35–70 µm, *Merck*) als stationärer Normalphase durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittelgemische sind in den jeweiligen Versuchsvorschriften aufgeführt.

### 5.3.1.2 Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenz-Indikator (ALUGRAM Xtra G/UV254, *Macherey-Nagel*) verwendet. Aufgetrennte Verbindungen sind mittels UV-Absorption ( $\lambda = 254$  nm und 366 nm), Inkubation in einer Iodkammer und/oder Kaliumpermanganat-, Bromcresolgrün-, Ninhydrin- oder Cer-Molybdat-Tauchreagenzien und anschließende Wärmebehandlung detektiert worden.

### 5.3.1.3 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden an den Geräten AVANCE 400, DPX 200 und DPX 400 (alle von *Bruker*) aufgenommen. Alle Messungen wurden in  $\text{CDCl}_3$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren entsprechend auf das Restprotonensignal von  $\text{CDCl}_3$  bei 7.26 ppm oder  $\text{D}_2\text{O}$  bei 4.79 ppm kalibriert. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelt vermessen und auf das deuteriumgekoppelte Signal von  $\text{CDCl}_3$  bei 77.16 ppm bezogen.<sup>[170]</sup>

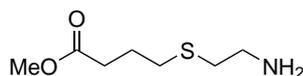
Die Auswertung der Spektren erfolgte mithilfe der Software *Mestre Nova* (*Mestrelab Research*). Die Signale wurden anhand chemischer Verschiebungen  $\delta$  (notiert in ppm) und Kopplungskonstanten  $J$  (in Hz angegeben) zugeordnet. Als Abkürzungen für die Multiplizitäten der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet), dt (Dublett von Triplets), tt (Triplet von Triplets), q (Quartett), quin (Quintett), oct (Octett) und m (Multiplett) verwendet.

#### 5.3.1.4 Massenspektrometrie

Die hochaufgelösten Massenspektren (HRMS) wurden nach Injektion Methanolgelöster Proben in eine UPLC-Anlage (Acquity Ultraperformance, *Waters*) mit nachgeschaltetem Q-TOF Premier Massenspektrometer (*Waters*) im *Lock-Spray*-Modus erhalten. Alternativ wurde ein Micromass LCT Premier mit *Lock-Spray*-Einheit über *loop-mode* Injektion aus einem HPLC-System (Alliance 2695, *Waters*) verwendet. Die GC-MS Messungen wurden mit dem GC System 6890 Series und dem Mass Selective Detector 5973 (beide von *Hewlett Packard*) durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte jeweils mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) oder über Elektronenstoß-Ionisation (EI). Es sind jeweils berechnete (ber.) und gefundene (gef.) Massen angegeben.

### 5.3.2 Darstellung von Substraten für die Studien mit AmbG

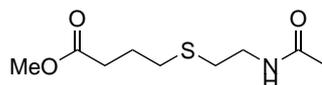
#### 5.3.2.1 4-[(2-Aminoethyl)thio]butansäuremethylester (**150**)



Zu einer Lösung von Cysteaminhydrochlorid (800 mg, 7.04 mmol, 2.0 Äq.) in trockenem EtOH (22 mL) wurde NaOH (422 mg, 10.6 mmol, 3.0 Äq.) portionsweise hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Methyl-4-bromobutyrat (**149**) (449  $\mu$ L, 3.55 mmol, 1.0 Äq.) innerhalb von 5 min hinzuge tropft und es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O (50 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl auf pH 1 eingestellt, 3x mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und anschließend mit 1 M NaOH auf pH 8.5 eingestellt. Nach erneuter dreimaliger Extraktion mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden die vereinigten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Thioether **150** (142 mg, 801  $\mu$ mol, 23%) wurde als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5% MeOH) = 0.25;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.39 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1.91 (tt,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.44 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{O}_2\text{CCH}_2$ ), 2.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.60 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.86 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 25.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 31.2 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 33.0 ( $\text{O}_2\text{CCH}_2$ ), 36.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 41.3 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 51.8 ( $\text{CH}_3$ ), 173.7 ( $\text{CH}_2\text{CO}_2$ ); **HRMS** (ESI):  $m/z$  für  $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : ber. 178.0902, gef. 178.0901.

### 5.3.2.2 4-[(2-Acetamidoethyl)thio]butansäuremethylester (203)

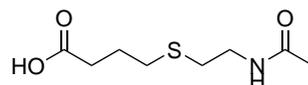


Thioether **150** (142 mg, 801  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurde in trockenem MeOH (10 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der Lösung wurde Triethylamin (472  $\mu\text{L}$ , 3.39 mmol, 4.2 Äq.) in drei Portionen zugefügt und anschließend über einen Zeitraum von 20 min Acetylchlorid (115  $\mu\text{L}$ , 1.61 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 0 °C und im Anschluss über Nacht bei RT gerührt. Alle flüchtigen Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  (6 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde 3x mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2 + 2\%$  MeOH), sodass Acetamid **203** (148 mg, 675  $\mu\text{mol}$ , 84%) als gelbes Öl erhalten wurde.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2% MeOH) = 0.33;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.91 (tt,  $J_1 = 7.2$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.99 (s, 3H,  $\text{NC}(\text{O})\text{CH}_3$ ), 2.44 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{O}_2\text{CCH}_2$ ), 2.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S})$ ), 2.66 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.43 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.68 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),

5.92 (bs, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 23.4 (NC(O)CH<sub>3</sub>), 24.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.0 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 31.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 32.8 (O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>N), 51.8 (OCH<sub>3</sub>), 170.2 (NCO), 173.6 (CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); **HRMS** (ESI): m/z für C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: ber. 242.0827, gef. 242.0824.

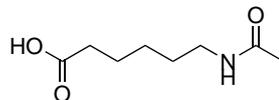
### 5.3.2.3 4-[(2-Acetamidoethyl)thio]butansäure (**145**)



Eine Lösung von Methylester **203** (140 mg, 638  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in H<sub>2</sub>O/THF 3:1 (9 mL) wurde portionsweise mit LiOH·H<sub>2</sub>O (267 mg, 6.36 mmol, 10.0 Äq.) versetzt, für 30 min auf 50 °C erhitzt und anschließend 13 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde 2x mit Et<sub>2</sub>O extrahiert und die wässrige Phase wurde mit HCl auf pH 1 eingestellt. Nachfolgende dreimalige Extraktion mit EtOAc, Trocknung der vereinigten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab Carbonsäure **145** (95.0 mg, 463  $\mu\text{mol}$ , 73%) als hochviskoses farbloses Öl.

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH) = 0.14;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 1.90 (tt,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.01 (s, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.51 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 2.63 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.72 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.40 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 21.7 (CH<sub>3</sub>), 24.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>S), 30.2 (CH<sub>2</sub>S), 32.7 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 38.7 (CH<sub>2</sub>N), 174.3 (NCO), 178.1 (CO<sub>2</sub>H); **HRMS** (ESI): m/z für C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>S [M + Na]<sup>+</sup>: ber. 228.0670, gef. 228.0669.

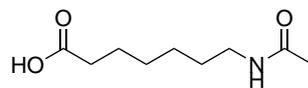
## 5.3.2.4 6-Acetamidohexansäure (147)



Eine Lösung von 6-Aminohexansäure (**152**) (418 mg, 3.19 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (15 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und portionsweise mit Triethylamin (1.86 mL, 13.4 mmol, 4.2 Äq.) versetzt. Acetylchlorid (455 µL, 6.37 mmol, 2.0 Äq.) wurde innerhalb von 5 min zugetropft und das Reaktionsgemisch 1 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Alle flüchtigen Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in H<sub>2</sub>O (12 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M NaOH auf pH 9 eingestellt, 3x mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und mit 1 M HCl auf pH 1 eingestellt. Nach erneuter dreimaliger Extraktion mit EtOAc wurden die vereinigten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, sodass die literaturbekannte 6-Acetamidohexansäure (**147**) (151 mg, 872 µmol, 27%) als gelbes Öl erhalten wurde.

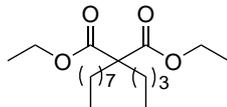
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 1.28–1.38 (m, 2H, (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)), 1.45–1.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.54–1.64 (m, 2H, HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.37 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 3.14 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>2</sub>N); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 21.7 (CH<sub>3</sub>), 23.9 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.4 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.6 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 39.2 (CH<sub>2</sub>N), 173.8 (NCO), 179.0 (CO<sub>2</sub>H); **HRMS** (ESI): *m/z* für C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: ber. 174.1130, gef. 174.1131.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[171]</sup>

5.3.2.5 7-Acetamidoheptansäure (**146**)

Eine Lösung von 7-Aminoheptansäure (**151**) (400 mg, 2.75 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (23 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und portionsweise mit Triethylamin (1.61 mL, 11.6 mmol, 4.2 Äq.) versetzt. Acetylchlorid (394 µL, 5.51 mmol, 2.0 Äq.) wurde innerhalb von 5 min zugetropft und das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Alle flüchtigen Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (12 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt, 3x mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und im Anschluss mit 1 M HCl auf pH 4 eingestellt. Nach erneuter dreimaliger Extraktion mit EtOAc wurden die vereinigten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, sodass 7-Acetamidoheptansäure (**146**) (121 mg, 646 µmol, 23%) als gelbes Öl erhalten wurde.

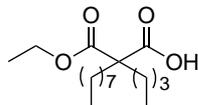
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 1.27–1.37 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)), 1.44–1.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.53–1.62 (m, 2H, HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 3.14 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 21.7 (CH<sub>3</sub>), 24.11 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 27.7 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.7 (HO<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 39.3 (CH<sub>2</sub>N), 173.8 (NCO), 179.3 (CO<sub>2</sub>H); **HRMS** (ESI): *m/z* für C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>: ber. 186.1130, gef. 186.1130.

5.3.2.6 Diethyl 2-butyl-2-octylmalonat (**154**)

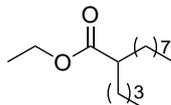
Zu einer Lösung von NaOEt (3.40 g, 50.0 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem EtOH (50 mL) wurde Diethylbutylmalonat (**153**, 10.8 g, 50.0 mmol, 1.0 Äq.) innerhalb von 20 min zugetropft. In drei Portionen wurde 1-Bromooctan (9.66 g, 50.0 mmol, 1.0 Äq.) zugefügt und die Suspension 5 h unter Rückflussbedingungen erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter vermindertem Druck konzentriert und der Rückstand wurde in H<sub>2</sub>O (25 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde 3x mit Et<sub>2</sub>O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen je 2x mit 1 M HCl und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (75% Umsatz, berechnet nach <sup>1</sup>H-NMR). Nach Vakuumdestillation (5 mbar) wurde das literaturbekannte dialkylierte Diethylmalonat **154** (9.36 g, 28.5 mmol, 57%) als farbloses Öl erhalten.

**Siedepunkt** (5 mbar): 168–170 °C [Lit: 168–171 (2 mbar)]; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.84–0.92 (m, 6H, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.04–1.17 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.19–1.35 (m, 18H, 2x CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.80–1.90 (m, 4H, (O<sub>2</sub>C)<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, 2x OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.1 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 23.1 (CH<sub>2</sub>), 24.0 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 57.7 ((O<sub>2</sub>C)C(CH<sub>2</sub>)), 61.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 172.2 (CO<sub>2</sub>); **HRMS** (ESI): *m/z* für C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: ber. 351.2511, gef. 351.2509.

Der Siedepunkt stimmt mit der Literatur überein.<sup>[145]</sup>

5.3.2.7 (*rac*)-2-Butyl-2-(ethoxycarbonyl)decansäure (**204**)

Diethyl 2-butyl-2-octylmalonat (**154**) (4.13 g, 12.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde einer noch heißen 50%-igen KOH-Lösung in H<sub>2</sub>O (60 mL, 535 mmol, 42.5 Äq.) zugefügt und die Emulsion wurde 8 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit jeweils 25 mL H<sub>2</sub>O und Et<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit HCl<sub>konz.</sub> auf pH 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde 4x mit Et<sub>2</sub>O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die Carbonsäure **204** (2.70 g Rohausbeute) wurde als racemisches Gemisch als bräunliches Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

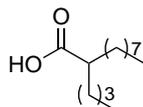
5.3.2.8 (*rac*)-Ethyl 2-butyldecanoat (**155**)

Das Rohprodukt der Verseifungsreaktion **204** (2.70 g, 8.99 mmol, 1.0 Äq.) wurde 2 h bei 180 °C gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war (2.07 g Rohausbeute, 77% Umsatz über zwei Stufen, berechnet nach <sup>1</sup>H-NMR). Nach Vakuumdestillation (1.8 mbar) wurde der Ester **155** (1.36 g, 5.30 mmol, 42% über zwei Stufen) als racemisches Gemisch als farbloses Öl erhalten.

**Siedepunkt** (1.8 mbar): 97–100 °C; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.84–0.91 (m, 6H, 2x CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.18–1.35 (m, 19H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 8x CH<sub>2</sub>), 1.37–1.48 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 1.52–1.65 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 2.25–2.35 (m, 1H, CH), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.1

(CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>), 14.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>2</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>), 45.9 (CH), 60.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 176.8 (CHCO<sub>2</sub>); **HRMS** (ESI): m/z für C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: ber. 279.2300, gef. 279.2304.

### 5.3.2.9 (*rac*)-2-Butyldecansäure (**148**)



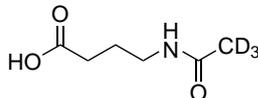
Ethyl 2-butyldecanoat (**155**) (210 mg, 819 μmol, 1.0 Äq.) wurde einer 50%-igen KOH-Lösung in H<sub>2</sub>O (3.28 mL, 29.2 mmol, 35.7 Äq.) zugefügt und 13 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Der Reaktionsmischung wurde H<sub>2</sub>O zugefügt und die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl auf pH 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde 4x mit Et<sub>2</sub>O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden 2x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die literaturbekannte 2-Butyldecansäure (**148**) (162 mg, 709 μmol, 87%) wurde als racemisches Gemisch als gelbliches Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.84–0.92 (m, 6H, 2x CH<sub>3</sub>), 1.17–1.38 (m, 16H, 8x CH<sub>2</sub>) 1.40–1.53 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 1.56–1.68 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 2.29–2.39 (m, 1H, CH); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.1 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>), 27.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 45.6 (CH), 182.4 (CO<sub>2</sub>H); **HRMS** (ESI): m/z für C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> [M-H]<sup>-</sup>: ber. 227.2011, gef. 227.2013.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[172]</sup>

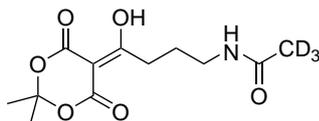
### 5.3.3 Synthese nicht-hydrolysierbarer Malonyl-CoA Analoga

#### 5.3.3.1 4-(Acetamido-2,2,2- $d_3$ )butansäure (**197**)

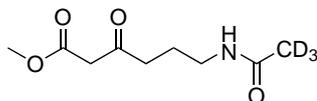


Der Vorschrift von TOSIN *et al.* folgend, wurde eine Lösung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (**195**) (638 mg, 6.19 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeOH (40 mL) portionsweise mit Triethylamin (3.68 mL, 26.0 mmol, 4.2 Äq.) versetzt.<sup>[158]</sup> Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und Acetyl- $d_3$ -chlorid (470  $\mu$ L, 6.35 mmol, 1.0 Äq.) wurde innerhalb von 5 min zugetropft. Es wurde 1 h bei 0 °C und anschließend 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde die *N*-Acetyl-Carbonsäure **197** ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

#### 5.3.3.2 *N*-[4-(2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yliden)-4-hydroxybutyl]-2,2,2- $d_3$ -acetamid (**199**)



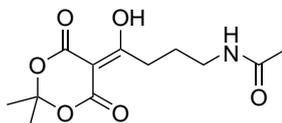
Dem Rohprodukt der *N*-Acetylierung **197** wurden unter Argon-Atmosphäre 4-DMAP (938 mg, 7.68 mmol, 1.2 Äq.), EDC (1.31 g, 6.82 mmol, 1.1 Äq.) und Meldrumsäure (**202**) (892 mg, 6.19 mmol, 1.0 Äq.) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde mit trockenem THF (100 mL) versetzt und 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Anschließend wurde die organische Phase je 2x mit 0.2 M HCl und mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Meldrumsäureaddukt **199** wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

5.3.3.3 6-(Acetamido-2,2,2-*d*<sub>3</sub>)-3-oxo-hexansäuremethylester (201)

Das Meldrumsäureaddukt **199** wurde in MeOH (40 mL) gelöst und 30 min unter Rückflussbedingungen gerührt. Alle flüchtigen Komponenten wurden *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:4, 5% MeOH) und der Methylester **201** (570 mg, 2.79 mmol, 45% über drei Stufen) als hochviskoses gelbes Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 1:4, 5% MeOH) = 0.37; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.82 (quin, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.61 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.26 (apt q, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.47 (s, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>C(O)), 3.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.66 (bs, 1H, NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 23.2 (CD<sub>3</sub>), 23.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 38.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 40.3 (NCH<sub>2</sub>), 48.9 (OC(CH<sub>2</sub>)CO), 52.4 (CH<sub>3</sub>), 167.7 (CH<sub>3</sub>O(C)O), 170.3 (CD<sub>3</sub>(C)O), 202.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(C)O); **HRMS** (ESI): *m/z* für C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>D<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> [M + Na]<sup>+</sup>: ber. 227.1134, gef. 227.1138.

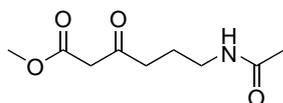
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[158]</sup>

5.3.3.4 *N*-[4-(2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yliden)-4-hydroxybutyl]-acetamid (198)

*N*-Acetyl-Carbonsäure **196** (5.15 g, 35.5 mmol, 1.0 Äq.), 4-DMAP (5.63 g, 122 mmol, 3.4 Äq.), EDC (8.15 g, 192 mmol, 5.4 Äq.) und Meldrumsäure (**202**) (6.13 g, 144 mmol, 4.1 Äq.) wurden in trockenem THF (350 mL) gelöst und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde

unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Anschließend wurde die organische Phase je 2x mit 0.2 M HCl und mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Meldrumsäureaddukt **198** wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

### 5.3.3.5 6-Acetamido-3-oxo-hexansäuremethylester (**200**)

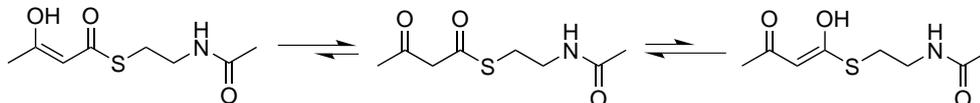


Das Meldrumsäureaddukt **198** wurde in MeOH (150 mL) gelöst und 2 h unter Rückflussbedingungen gerührt. Alle flüchtigen Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  1:4, 5% MeOH), um den literaturbekannten Methylester **200** (5.34 g, 26.5 mmol, 75% über zwei Stufen) als gelbes Öl zu erhalten.

**R<sub>f</sub>** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  1:4, 5% MeOH) = 0.37; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.82 (quint,  $J$  = 6.8 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.96 (s, 3H,  $\text{O}(\text{C})\text{CH}_3$ ), 2.62 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.26 (apt q,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.47 (s, 2H,  $\text{OC}(\text{CH}_2)\text{CO}$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.66 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 23.2 ( $\text{O}(\text{C})\text{CH}_3$ ), 23.2 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 38.7 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 40.3 ( $\text{NCH}_2$ ), 48.9 ( $\text{OC}(\text{CH}_2)\text{CO}$ ), 52.3 ( $\text{CH}_3$ ), 167.7 ( $\text{CH}_3\text{O}(\text{C})\text{O}$ ), 170.4 ( $\text{CH}_3(\text{C})\text{O}$ ), 202.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C})\text{O}$ ); **HRMS** (ESI):  $m/z$  für  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_4$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : ber. 224.0893, gef. 224.0899.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[158]</sup>

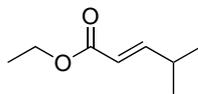
## 5.3.4 Synthese für Untersuchungen zu AmbF-Domänen

5.3.4.1 S-(2-Acetamidoethyl)-3-oxobutathioat (**121**)

Eine Lösung von 2,2,6-Trimethyl-1,3-dioxin-4-on (**122**, 151 mg, 1.06 mmol, 1.0 Äq.) in Toluol (5 mL) wurde nach einer Vorschrift von GILBERT *et al.* mit HSNAC (**4**, 127 mg, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und 7 h unter Rückflussbedingungen gerührt.<sup>[117]</sup> Alle flüchtigen Komponenten wurden unter vermindertem Druck entfernt und der literaturbekannte  $\beta$ -Ketoester **121** nach säulenchromatographischer Reinigung (1.5 x 1.0 cm 1:3 CuSO<sub>4</sub>-imprägniertes Kieselgel sowie unbehandeltes Kieselgel, PE/EtOAc 4:1 → PE/EtOAc 1:9) in Keto- und Enol-Form (6:1) als gelbliches Öl erhalten (108 mg, 531  $\mu$ mol, 50%).

**R<sub>f</sub>** (PE/EtOAc 1:9) = 0.30; Keto-Form: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.99 (s, 3H, NC(O)CH<sub>3</sub>), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C(O)CH<sub>2</sub>), 3.09 (dd,  $J$  = 12.9, 6.9 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>), 3.44–3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.71 (s, 2H, C(O)CH<sub>2</sub>C(O)), 5.88 (bs, 1H, NH); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 21.05 (NC(O)CH<sub>3</sub>), 29.25 (C(O)CH<sub>3</sub>), 39.19 (SCH<sub>2</sub>), 39.96 (CH<sub>2</sub>N), 58.03 (C(O)CH<sub>2</sub>), 170.38 (NC(O)), 192.13 (C(O)S), 199.67 (CH<sub>3</sub>C(O)CH<sub>2</sub>); HRMS (ESI):  $m/z$  für C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S [M + H]<sup>+</sup>: ber. 204.0694, gef. 204.0695.

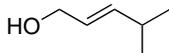
Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[173]</sup>

5.3.4.2 (*E*)-4-Methylpent-2-ensäureethylester (**124**)

Wittig-Ylen **128** (16.0 g, 45.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde nach einer Vorschrift von SOUCY *et. al.* in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (55 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt.<sup>[118]</sup> Anschließend wurde 4 °C kaltes Isobutanal (**123**) (4.80 mL, 52.6 mmol, 1.2 Äq.) innerhalb von 15 min zugetropft. Es wurde 5 min bei 0 °C gerührt, auf RT erwärmt und 24 h weiter gerührt. Alle leicht flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der Feststoff wurde 3x mit Pentan gefällt und abgesaugt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass das literaturbekannte Wittigprodukt **124** (5.59 g, 39.3 mmol, 86%) als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

**R<sub>f</sub>** (PE/EtOAc 20:1) = 0.33; **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2x CHCH<sub>3</sub>), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.38–2.51 (m, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.75 (dd, *J* = 15.7, 1.5 Hz, 1H, (O)<sub>2</sub>CCH), 6.93 (dd, *J* = 15.7, 6.8 Hz, 1H, CHCHCH); **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21.4 (CHCH<sub>3</sub>), 31.1 (CHCH<sub>3</sub>), 60.3 (OCH<sub>2</sub>), 118.8 (O<sub>2</sub>CCH), 155.5 (CHCHCH), 167.2 (CO<sub>2</sub>); **HRMS** (EI): *m/z* für C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> [M·]<sup>+</sup>: ber. 142.0994, gef. 142.0993.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[174]</sup>

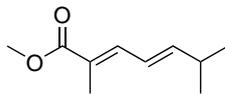
5.3.4.3 (*E*)-4-Methylpent-2-en-1-ol (**125**)

Wittigprodukt **124** (451 mg, 3.52 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (14 mL) gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Im Anschluss wurde *D*iBAL-H (1 M in Hexan, 8.80 mL, 2.5 Äq.) tropfenweise über 30 min zugefügt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaK-Tartrat-Lösung (36 mL) beendet. Es wurde 18 h bei RT gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase 3x mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je 2x mit  $\text{H}_2\text{O}$  und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, um den literaturbekanntesten Alkohol **125** (350 mg, 3.49 mmol, 99%) als leicht bräunliches Öl zu erhalten.

$R_f$  (PE/EtOAc 10:1) = 0.21;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.99 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ), 1.22–1.28 (bs, 1H, OH), 2.30 (oct,  $J = 6.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 4.08 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5.58 (dt,  $J = 15.6$  Hz, 5.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 5.67 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 6.6 Hz, 1H, CHCHCH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.3 ( $\text{CH}_3$ ), 30.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 64.0 ( $\text{CH}_2$ ), 126.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 140.5 (CHCHCH); HRMS (EI):  $m/z$  für  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}$   $[\text{M}-\text{OH}]^+$ : ber. 83.0861, gef. 83.0861.<sup>9</sup> Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[175]</sup>

<sup>9</sup>Aufgrund der Verwendung von Heptacosafuorotributylamin als Referenz Überlagerung mit Fragment bei 99.9936 für  $[\text{M}]^+$ .

## 5.3.4.4 (2E,4E)-2,6-Dimethylhepta-2,4-diensäuremethylester (126)



Alkohol **125** (50.0 mg, 499  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) gelöst und mit Ylen **129** (210 mg, 603  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq.) sowie  $\text{MnO}_2$  (347 mg, 3.99 mmol, 8.0 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei RT gerührt, über Kieselgur filtriert und der Filterkuchen 3x mit  $\text{CHCl}_3$  nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (PE:EtOAc 20:1), um den Ester **126** (23.4 mg, 139  $\mu\text{mol}$ , 28%) als gelbliches Öl zu erhalten.

$R_f$  (PE/EtOAc 20:1) = 0.45;  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.05 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3\text{CHCH}_3$ ), 1.93 (s, 3H,  $\text{C(O)CCH}_3$ ), 2.44 (oct,  $J = 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{CHCH}_3$ ), 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.04 (dd,  $J = 15.1, 6.8$  Hz, 1H,  $\text{C(O)CCHCHCH}$ ), 6.29 (dd,  $J = 15.1, 11.2$ , 1H,  $\text{C(O)CCHCH}$ ), 7.16 (d,  $J = 11.2$  Hz, 1H,  $\text{C(O)CCH}$ ).

# Literaturverzeichnis

- [1] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*(17), 4012–4022.
- [2] G. Habermehl, P. E. Hammann, H. C. Krebs, W. Ternes, *Naturstoffchemie*, Springer-Lehrbuch, Springer Berlin Heidelberg, **2008**.
- [3] F. Hemmerling, F. Hahn, *GIT-Labor-Fachzeitschrift* **2014**, *5*, 48–51.
- [4] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*(3), 629–661.
- [5] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*(4), 380–416.
- [6] I. Wilkening, S. Gazzola, E. Riva, J. S. Parascandolo, L. Song, M. Tosin, *Chem. Commun.* **2016**, *52*(68), 10392–10395.
- [7] Y. Lim, M. Go, W. Yew, *Molecules* **2016**, *21*(6), 806.
- [8] Z. Zhang, H.-X. Pan, G.-L. Tang, *F1000 Res.* **2017**, *6*, 172.
- [9] F. Hemmerling, F. Hahn, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512–1550.
- [10] S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann, *J. Antibiot.* **1977**, *30*(5), 371–375.
- [11] B. Julien, Z.-Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, *13*(12), 1277–1286.
- [12] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*(11), 923–936.

- 
- [13] J. Beld, E. C. Sonnenschein, C. R. Vickery, J. P. Noel, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*(1), 61–108.
- [14] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*(8), 3468–3496.
- [15] S. Friedrich, F. Hemmerling, F. Lindner, A. Warnke, J. Wunderlich, G. Berkhan, F. Hahn, *Molecules* **2016**, *21*(12), 1443.
- [16] J. R. Lohman, M. Ma, J. Osipiuk, B. Nocek, Y. Kim, C. Chang, M. Cuff, J. Mack, L. Bigelow, H. Li, M. Endres, G. Babnigg, A. Joachimiak, G. N. Phillips, B. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*(41), 12693–12698.
- [17] E. J. N. Helfrich, J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*(2), 231–316.
- [18] R. V. O’Brien, R. W. Davis, C. Khosla, M. E. Hillenmeyer, *J. Antibiot.* **2014**, *67*(1), 89–97.
- [19] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*(7), 996.
- [20] H. Chen, L. Du, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*(2), 541–557.
- [21] R. Garcia, K. Gerth, M. Stadler, I. J. Dogma, R. Müller, *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, *57*(2), 878–887.
- [22] R. Thaxter, *Botanical Gazette* **1892**, (17), 389–406.
- [23] L. J. Shimkets, M. Dworkin, H. Reichenbach, „The Myxobacteria“ in *The Prokaryotes* (Hrsg.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt), Springer New York, New York, NY, **2006**, S. 31–115, 00397 DOI: 10.1007/0-387-30747-8\_3.
- [24] W. Dawid, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*(4), 403–427.
- [25] S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten,

- J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A. Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goemann, C. Groeger, F. Gross, L. Jelsbak, L. Jelsbak, J. Kalinowski, C. Kegler, T. Knauber, S. Konietzny, M. Kopp, L. Krause, D. Krug, B. Linke, T. Mahmud, R. Martinez-Arias, A. C. McHardy, M. Merai, F. Meyer, S. Mormann, J. Muñoz-Dorado, J. Perez, S. Pradella, S. Rachid, G. Raddatz, F. Rosenau, C. Rückert, F. Sasse, M. Scharfe, S. C. Schuster, G. Suen, A. Treuner-Lange, G. J. Velicer, F.-J. Vorhölter, K. J. Weissman, R. D. Welch, S. C. Wenzel, D. E. Whitworth, S. Wilhelm, C. Wittmann, H. Blöcker, A. Pühler, R. Müller, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*(11), 1281–1289.
- [26] J. Muñoz-Dorado, F. J. Marcos-Torres, E. García-Bravo, A. Moraleda-Muñoz, J. Pérez, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*.
- [27] W. Wrótniak-Drzewiecka, A. J. Brzezińska, H. Dahm, A. P. Ingle, M. Rai, *Ann. Microbiol.* **2016**, *66*(1), 17–33.
- [28] J. Korp, M. S. Vela Gurovic, M. Nett, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 594–607.
- [29] K. J. Weissman, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*(9), 1276.
- [30] T. F. Schäberle, F. Lohr, A. Schmitz, G. M. König, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*(7), 953.
- [31] J. Herrmann, A. A. Fayad, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*(2), 135–160.
- [32] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*(2-3), 233–253.
- [33] I. H. Hardt, H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*(7), 847–856.
- [34] N. Denduluri, S. M. Swain, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2008**, *17*(3), 423–435.

- 
- [35] K. Gerth, N. Bedorf, H. Irschik, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1994**, *47*(1), 23–31.
- [36] K. J. Weissman, R. Müller, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*(6), 2121–2136.
- [37] K. Han, Z.-f. Li, R. Peng, L.-p. Zhu, T. Zhou, L.-g. Wang, S.-g. Li, X.-b. Zhang, W. Hu, Z.-h. Wu, N. Qin, Y.-z. Li, *Sci. Rep.* **2013**, *3*(1).
- [38] J. Wang, W. Hu, R. Lux, X. He, Y. Li, W. Shi, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*(9), 2122–2132.
- [39] A. A. Iniesta, F. Garcia-Heras, J. Abellon-Ruiz, A. Gallego-Garcia, M. Elias-Arnanz, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*(21), 5875–5885.
- [40] A. M. Gulick, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*(10), 811–827.
- [41] S. Schmelz, J. H. Naismith, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*(6), 666–671.
- [42] R. K. Airas, *Biophys. Chem.* **2007**, *131*(1-3), 29–35.
- [43] A. M. Gulick, V. J. Starai, A. R. Horswill, K. M. Homick, J. C. Escalante-Semerena, *Biochemistry* **2003**, *42*(10), 2866–2873.
- [44] B. R. Branchini, R. A. Magyar, M. H. Murtiashaw, S. M. Anderson, L. C. Helgerson, M. Zimmer, *Biochemistry* **1999**, *38*(40), 13223–13230.
- [45] E. Conti, N. P. Franks, P. Brick, *Structure* **1996**, *4*(3), 287–298.
- [46] T. Kittilä, M. Schoppet, M. J. Cryle, *ChemBioChem* **2016**, *17*(7), 576–584.
- [47] O. A. Trivedi, P. Arora, V. Sridharan, R. Tickoo, D. Mohanty, R. S. Gokhale, *Nature* **2004**, *428*(6981), 441–445.
- [48] P. Arora, A. Goyal, V. T. Natarajan, E. Rajakumara, P. Verma, R. Gupta, M. Yousuf, O. A. Trivedi, D. Mohanty, A. Tyagi, R. Sankaranarayanan, R. S. Gokhale, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*(3), 166–173.

- [49] A. Goyal, P. Verma, M. Anandhakrishnan, R. S. Gokhale, R. Sankaranarayanan, *J. Mol. Biol.* **2012**, *416*(2), 221–238.
- [50] T. Hayashi, Y. Kitamura, N. Funai, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, *ChemBioChem* **2011**, *12*(14), 2166–2176.
- [51] D. Pistorius, Y. Li, S. Mann, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*(32), 12362–12365.
- [52] A. Agarwal, C. Kahyaoglu, D. B. Hansen, *Biochemistry* **2012**, *51*(8), 1648–1657.
- [53] S. M. Bouhired, M. Crüsemann, C. Almeida, T. Weber, J. Piel, T. F. Schäberle, G. M. König, *ChemBioChem* **2014**, *15*(5), 757–765.
- [54] F. Steffen-Munsberg, C. Vickers, H. Kohls, H. Land, H. Mallin, A. Nobili, L. Skalden, T. van den Bergh, H.-J. Joosten, P. Berglund, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*(5), 566–604.
- [55] R. Percudani, A. Peracchi, *BMC Bioinf.* **2009**, *10*(1), 273.
- [56] H. C. Dunathan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1966**, *55*(1), 712–716.
- [57] M. D. Toney, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*(11), 1407–1418.
- [58] G. Schneider, H. Käck, Y. Lindqvist, *Structure* **2000**, *8*(1), R1–6.
- [59] B. Kappes, I. Tews, A. Binter, P. Macheroux, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*(11), 1567–1576.
- [60] M. Ma, J. R. Lohman, T. Liu, B. Shen, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2015**, *112*(33), 10359–10364.
- [61] R. Gerber, L. Lou, L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(9), 3148–3149.

- [62] J. Masschelein, W. Mattheus, L.-J. Gao, P. Moons, R. Van Houdt, B. Uytterhoeven, C. Lamberigts, E. Lesclinier, J. Rozenski, P. Herdewijn, A. Aertsen, C. Michiels, R. Lavigne, *PLoS ONE* **2013**, *8*(1), e54143.
- [63] C. J. Thibodeaux, W.-c. Chang, H.-w. Liu, *Chem. Rev.* **2012**, *112*(3), 1681–1709.
- [64] K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1996**, *49*(1), 71–75.
- [65] G. Höfle, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *1991*(9), 941–945.
- [66] D. T. Connor, R. C. Greenough, M. von Strandtmann, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*(23), 3664–3669.
- [67] D. T. Connor, M. Von Strandtmann, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*(24), 4606–4607.
- [68] G. Just, P. Potvin, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*(20), 2173–2177.
- [69] N. J. Barnes, A. H. Davidson, L. R. Hughes, G. Procter, V. Rajcoomar, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*(18), 1751–1754.
- [70] A. S. Kende, J. S. Mendoza, Y. Fujii, *Tetrahedron* **1993**, *49*(36), 8015–8038.
- [71] S. Hanessian, T. Focken, X. Mi, R. Oza, B. Chen, D. Ritson, R. Beaudegnies, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*(16), 5601–5618.
- [72] S. Shadomy, D. M. Dixon, A. Espinel-Ingroff, G. E. Wagner, H. P. Yu, H. J. Shadomy, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1978**, *14*(1), 99–104.
- [73] P. Knauth, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2000**, *53*(10), 1182–1190.
- [74] L. Vetcher, H. G. Menzella, T. Kudo, T. Motoyama, L. Katz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*(10), 3734–3736.

- [75] a) G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*(51), 14240–14244;  
b) G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chem.* **2014**, *126*(51), 14464–14468.
- [76] a) G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*(43), 13589–13592; b) G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chem.* **2016**, *128*(43), 13787–13790.
- [77] J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*(22), 14002–14007.
- [78] S. Sundaram, C. Hertweck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *31*, 82–94.
- [79] T. Hiratsuka, H. Suzuki, R. Kariya, T. Seo, A. Minami, H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*(21), 5423–5426.
- [80] L. Gu, B. Wang, A. Kulkarni, T. W. Geders, R. V. Grindberg, L. Gerwick, K. Håkansson, P. Wipf, J. L. Smith, W. H. Gerwick, D. H. Sherman, *Nature* **2009**, *459*(7247), 731–735.
- [81] T. Milano, A. Paiardini, I. Grgurina, S. Pascarella, *BMC Struct. Biol.* **2013**, *13*(1), 26.
- [82] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, (18), 734.
- [83] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, *93*(6), 2189–2206.
- [84] T. Bretschneider, J. B. Heim, D. Heine, R. Winkler, B. Busch, B. Kusebauch, T. Stehle, G. Zocher, C. Hertweck, *Nature* **2013**, *502*(7469), 124–128.
- [85] K. A. K. Pahirulzaman, K. Williams, C. M. Lazarus, „A Toolkit for Heterologous Expression of Metabolic Pathways in *Aspergillus oryzae*“ in *Methods in Enzymology*, , *Bd. 517* Elsevier, **2012**, S. 241–260.
- [86] M. Juhas, J. W. Ajioka, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*(3), 277–286.
- [87] N. A. Da Silva, S. Srikrishnan, *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*(2), 197–214.

- [88] D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas, M. A. Algire, C. Merryman, L. Young, V. N. Noskov, J. I. Glass, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Science* **2008**, *319*(5867), 1215–1220.
- [89] D. G. Gibson, J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R.-Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, M. G. Montague, L. Ma, M. M. Moodie, C. Merryman, S. Vashee, R. Krishnakumar, N. Assad-Garcia, C. Andrews-Pfannkoch, E. A. Denisova, L. Young, Z.-Q. Qi, T. H. Segall-Shapiro, C. H. Calvey, P. P. Parmar, C. A. Hutchison, H. O. Smith, J. C. Venter, *Science* **2010**, *329*(5987), 52–56.
- [90] P. Sung, H. Klein, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*(10), 739–750.
- [91] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 1–17.
- [92] D. Jovicevic, B. A. Blount, T. Ellis, *Bioessays* **2014**, *36*(9), 855–860.
- [93] R. D. Gietz, R. H. Schiestl, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*(1), 31–34.
- [94] M. Rose, F. Winston, *Mol. Gen. Genet.* **1984**, *193*(3), 557–560.
- [95] N. G. Kuijpers, D. Solis-Escalante, L. Bosman, M. van den Broek, J. T. Pronk, J.-M. Daran, P. Daran-Lapujade, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*(1), 47.
- [96] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nat. Methods* **2009**, *6*(5), 343–345.
- [97] F. Katzen, *Expert Opin. Drug Discovery* **2007**, *2*(4), 571–589.
- [98] J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, *Genome Res.* **2000**, *10*(11), 1788–1795.
- [99] A. Landy, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*(1), 913–941.

- [100] P. Bernard, M. Couturier, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*(3), 735–745.
- [101] T. Miki, J. A. Park, K. Nagao, N. Murayama, T. Horiuchi, *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*(1), 39–52.
- [102] P. Bernard, K. E. Kézdy, L. Van Melderen, J. Steyaert, L. Wyns, M. L. Pato, P. N. Higgins, M. Couturier, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*(3), 534–541.
- [103] F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*(5), 411–421.
- [104] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*(1), 113–130.
- [105] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* **1975**, *258*(5536), 598–599.
- [106] J. G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *66*(3), 197–238.
- [107] M. Carrió, A. Villaverde, *J. Biotechnol.* **2002**, *96*(1), 3–12.
- [108] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*(5), 523–533.
- [109] G. D. Davis, C. Elisee, D. M. Newham, R. G. Harrison, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*(4), 382–388.
- [110] E. R. LaVallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, J. M. McCoy, *Bio/Technology* **1993**, *11*(2), 187–193.
- [111] C. di Guan, P. Li, P. D. Riggs, H. Inouye, *Gene* **1988**, *67*(1), 21–30.
- [112] R. B. Kapust, D. S. Waugh, *Protein Sci.* **1999**, *8*(8), 1668–1674.
- [113] D. B. Smith, K. S. Johnson, *Gene* **1988**, *67*(1), 31–40.
- [114] N. M. Stano, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*(16), 16136–16143.
- [115] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*(5), 1694–1699.

- [116] K. F. Geoghegan, H. B. Dixon, P. J. Rosner, L. R. Hoth, A. J. Lanzetti, K. A. Borzilleri, E. S. Marr, L. H. Pezzullo, L. B. Martin, P. K. LeMotte, A. S. McColl, A. V. Kamath, J. G. Stroh, *Anal. Biochem.* **1999**, *267*(1), 169–184.
- [117] I. H. Gilbert, M. Ginty, J. A. O’Neill, T. J. Simpson, J. Staunton, C. L. Willis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*(15), 1587–1590.
- [118] F. Soucy, L. Grenier, M. L. Behnke, A. T. Destree, T. A. McCormack, J. Adams, L. Plamondon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(43), 9967–9976.
- [119] B. O. Bachmann, J. Ravel, „Chapter 8 Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data“ in *Methods in Enzymology*, , *Bd. 458* Elsevier, **2009**, S. 181–217.
- [120] M. Punta, P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman, R. D. Finn, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*(D1), D290–D301.
- [121] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*(3), 403–410.
- [122] NCBIResourceCoordinators, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*(D1), D12–D17.
- [123] H. M. Berman, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*(1), 235–242.
- [124] M. Goujon, H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, R. Lopez, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*(Web Server), W695–W699.
- [125] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. E. Sternberg, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*(6), 845–858.

- [126] K. E. Lebe, „Studien zur in vitro–Aktivität und Substratspezifität der ungewöhnlichen Didomäne AmbG und der Monooxygenase AmbI. Masterarbeit am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover.“, **2015**.
- [127] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*(5259), 680–685.
- [128] H. Schägger, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*(1), 16–22.
- [129] A. Marchler-Bauer, M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R. A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*(D1), D222–D226.
- [130] T. Weber, M. A. Marahiel, *Structure* **2001**, *9*(1), R3–9.
- [131] Y. Minowa, M. Araki, M. Kanehisa, *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*(5), 1500–1517.
- [132] M. Preisitsch, S. Heiden, M. Beerbaum, T. Niedermeyer, M. Schneefeld, J. Herrmann, J. Kumpfmüller, A. Thürmer, I. Neidhardt, C. Wiesner, R. Daniel, R. Müller, F.-C. Bange, P. Schmieder, T. Schweder, S. Mundt, *Mar. Drugs* **2016**, *14*(1), 21.
- [133] H. Nakamura, H. A. Hamer, G. Sirasani, E. P. Balskus, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*(45), 18518–18521.
- [134] K. Kleigrew, J. Almaliti, I. Y. Tian, R. B. Kinnel, A. Korobeynikov, E. A. Monroe, B. M. Duggan, V. Di Marzo, D. H. Sherman, P. C. Dorrestein, L. Gerwick, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*(7), 1671–1682.
- [135] T. B. Rounge, T. Rohrlack, A. J. Nederbragt, T. Kristensen, K. S. Jakobsen, *BMC Genomics* **2009**, *10*(1), 396.

- [136] J. Mareš, J. Hájek, P. Urajová, J. Kopecký, P. Hrouzek, *PLoS One* **2014**, *9*(11), e111904.
- [137] M. N. Wass, L. A. Kelley, M. J. E. Sternberg, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*(Web Server), W469–W473.
- [138] J. M. Reimer, M. N. Aloise, P. M. Harrison, T. Martin Schmeing, *Nature* **2016**, *529*(7585), 239–242.
- [139] A. Tanovic, S. A. Samel, L.-O. Essen, M. A. Marahiel, *Science* **2008**, *321*(5889), 659–663.
- [140] P. Khurana, R. S. Gokhale, D. Mohanty, *BMC Bioinf.* **2010**, *11*(1), 57.
- [141] M. Rottig, M. H. Medema, K. Blin, T. Weber, C. Rausch, O. Kohlbacher, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*(suppl), W362–W367.
- [142] C. Rausch, T. Weber, O. Kohlbacher, W. Wohlleben, D. H. Huson, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*(18), 5799–5808.
- [143] C. Prieto, „Characterization of Nonribosomal Peptide Synthetases with NRPSp“ in *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis, Bd. 1401* (Hrsg.: B. S. Evans), Springer New York, New York, NY, **2016**, S. 273–278.
- [144] D. Baranašić, J. Zucko, J. Diminic, R. Gacesa, P. F. Long, J. Cullum, D. Hranueli, A. Starcevic, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*(2), 461–467.
- [145] Y.-S. Hwang, M. S. Mulla, J. R. Arias, *J. Agric. Food. Chem.* **1974**, *22*(6), 1004–1006.
- [146] B. R. Kelemen, T. A. Klink, M. A. Behlke, S. R. Eubanks, P. A. Leland, R. T. Raines, *Nucleic Acids Res* **1999**, *27*(18), 3696–3701.
- [147] G. Qing, L.-C. Ma, A. Khorchid, G. V. T. Swapna, T. K. Mal, M. M. Takayama, B. Xia, S. Phadtare, H. Ke, T. Acton, G. T. Montelione, M. Ikura, M. Inouye, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*(7), 877–882.

- [148] J.-P. Etchegaray, M. Inouye, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(15), 10079–10085.
- [149] F. W. Studier, *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*(1), 207–234.
- [150] N. Gaitatzis, A. Hans, R. Müller, S. Beyer, *J. Biochem.* **2001**, *129*(1), 119–124.
- [151] L. E. N. Quadri, P. H. Weinreb, M. Lei, M. M. Nakano, P. Zuber, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1998**, *37*(6), 1585–1595.
- [152] P. Rice, I. Longden, A. Bleasby, *Trends Genet.* **2000**, *16*(6), 276–277.
- [153] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Bas- ham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Felt- well, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squa- res, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B. G. Barrell, *Nature* **1998**, *393*(6685), 537–544.
- [154] D. B. Hansen, S. B. Bumpus, Z. D. Aron, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(20), 6366–6367.
- [155] R. A. Cacho, W. Jiang, Y.-H. Chooi, C. T. Walsh, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*(40), 16781–16790.
- [156] C. R. Valenzano, R. J. Lawson, A. Y. Chen, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(51), 18501–18511.
- [157] M. Tosin, D. Spiteller, J. B. Spencer, *ChemBioChem* **2009**, *10*(10), 1714–1723.
- [158] M. Tosin, L. Betancor, E. Stephens, W. M. Ariel Li, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2010**, *11*(4), 539–546.

- [159] M. Tosin, Y. Demydchuk, J. S. Parascandolo, C. Blasco Per, F. J. Leeper, P. F. Leadlay, *Chem. Commun.* **2011**, 47(12), 3460.
- [160] M. E. Yurkovich, R. Jenkins, Y. Sun, M. Tosin, P. F. Leadlay, *Chem. Commun.* **2017**, 53(13), 2182–2185.
- [161] a) M. Tosin, L. Smith, P. F. Leadlay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50(50), 11930–11933; b) M. Tosin, L. Smith, P. F. Leadlay, *Angew. Chem.* **2011**, 123(50), 12136–12139.
- [162] H. Kage, E. Riva, J. S. Parascandolo, M. F. Kreutzer, M. Tosin, M. Nett, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13(47), 11414–11417.
- [163] a) J. S. Parascandolo, J. Havemann, H. K. Potter, F. Huang, E. Riva, J. Connolly, I. Wilkening, L. Song, P. F. Leadlay, M. Tosin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55(10), 3463–3467; b) J. S. Parascandolo, J. Havemann, H. K. Potter, F. Huang, E. Riva, J. Connolly, I. Wilkening, L. Song, P. F. Leadlay, M. Tosin, *Angew. Chem.* **2016**, 128(10), 3524–3528.
- [164] J. Havemann, M. E. Yurkovich, R. Jenkins, S. Harringer, W. Tao, S. Wen, Y. Sun, P. F. Leadlay, M. Tosin, *Chem. Commun.* **2017**, 53(11), 1912–1915.
- [165] a) E. Riva, I. Wilkening, S. Gazzola, W. M. A. Li, L. Smith, P. F. Leadlay, M. Tosin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53(44), 11944–11949; b) E. Riva, I. Wilkening, S. Gazzola, W. M. A. Li, L. Smith, P. F. Leadlay, M. Tosin, *Angew. Chem.* **2014**, 126(44), 12138–12143.
- [166] G. E. Healthcare, *GST Gene Fusion System Handbook*, GE Healthcare UK Limited, **2014**.
- [167] Novagen, *pET System Manual*, EMD Biosciences Inc., Darmstadt, **2003**.
- [168] M. Rose, F. Winston, P. Hieter, *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbour, **1990**.

- [169] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [170] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*(21), 7512–7515.
- [171] D. Plażuk, J. Zakrzewski, M. Salmain, A. Błauż, B. Rychlik, P. Strzelczyk, A. Bujacz, G. Bujacz, *Organometallics* **2013**, *32*(20), 5774–5783.
- [172] Y. Zhu, X. Li, X. Wang, X. Huang, T. Shen, Y. Zhang, X. Sun, M. Zou, S. Song, N. Jiao, *Org. Lett.* **2015**, *17*(19), 4702–4705.
- [173] H.-M. Ge, T. Huang, J. D. Rudolf, J. R. Lohman, S.-X. Huang, X. Guo, B. Shen, *Org. Lett.* **2014**, *16*(15), 3958–3961.
- [174] K. L. Dhumaskar, C. Bhat, S. G. Tilve, *Synth. Commun.* **2014**, *44*(10), 1501–1506.
- [175] P. Tosatti, J. Horn, A. J. Campbell, D. House, A. Nelson, S. P. Marsden, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*(18), 3153–3157.

# 6 Anhang

## 6.0.5 Sequenzen der synthetischen Gene

### 6.0.5.1 *ambE* Fragment 1 (2.643 bp)

ATGAAGTGCTGAGCTTTCGTCGTGCACTGGAAAAACCGTTGTTGAAATTCGTCGTCTGA  
ACACCGAAATTGATGGTCTGCGTGCAAAAAGCGTTGAACCGATTGCAATTGTTAGCATGG  
CATGTCGTTATCCGGGTGGTGTGATAGTCCGGCAGCACTGTGGCAGCTGCTGAGCGAAG  
GTCGTGATGCAATTGGTCCGTTTCCGGAAGGTCGCGGTTGGGATGTTGCAGGTCTGTATG  
ATCCTGATCCGGATGCACCGGGTAAAAGCATTACCACCCAGGGTGGCTTCTGTATGACG  
CAGATCATTGATCCGATGTTTTTTGGTATTAGTCCGCGTGAAGCAGAACGTATTGATC  
CGCAGCAACGCCTGCTGCTGGAATGTGCATGGGAAGCCCTGGAAAGCGCAGGTATTGCAC  
CGCATACTGGGTGCAAGCGCAACCGGTGTTTTTATTGGTCTGATGTATAACCGAATATG  
GCCTGCGTCTGATGAATCAGCCGGAAGCACTGGATGGTTATATTGGTATTGGTAGCGCAG  
GTTCAACCGCAAGCGGTCTGATTAGCTATAACCCTGGGCCTGCGTGGTCCGGCAGTTACCG  
TTGATACCGCATGTAGCAGCAGCCTGGTTAGCCTGCATCTGGCATGTACCGCACTGCGTC  
GTGGTGAATGTGATCTGGCACTGGCAGGCGGTGCAGCAGTTGTTAGCACACCGGCACCGT  
TTATTGAATTTAGCCGTCAGCGTGCCCTGGCAGTTGATGGTCGTTGTAAAAGCTTTGGTG  
CGGGTGCAGATGGTGTAGTTGGAGTGAAGGTTGTGGTCTGCTGGTTCTGAAACGTCTGA  
GTGATGCACAGCGTGATGGTATCGTGTTCTGGCAGTTCTGCGTGGTAGTGCAGTTAATC  
AGGATGGTCGTAGCCAGGGTCTGACCGCACCGAACGGTCCGGCACAGCAGGATGTTATTC  
GTCAGGCGCTGGCAGCAGCCGGTCTGACACCGGCAGATATTGATGCAGTTGAAGGTCATG  
GCACCGGTACACCGCTGGGTGATCCGATTGAAGCACAGGCACTGCTGGCAACCTATGGTA  
AAGCACATAACCGCAGAACGTCCGCTGTGGCTGGGTAGCATTAAAAGCAATTTGGTCATA

CCCAGGCAGCAGCGGGTGTGGCCGGTGTATGAAACTGGTTCTGGCAATGCAGCATGCCG  
AACTGCCCTCGTACCCTGCGTGCCAATCCGCCTAGTCCGCATGTTGATTGGAGTCAGGGTC  
ATATTGCACTGCTGAATGAACCGGCAAGCTGGCCACGTACCGATCGTCCGCGTCGTGCAG  
CCGTTAGCAGTTTTGGTGTAGCGGCACCAATGCACATGTGATTATTGAAGAAGCTCCGG  
CACCGGCAGCCGAAGTTACCAGTCCGGGTGCCGAACCGCCTGCAGTTGCACTGCCGCTGC  
TGGTTAGTGGCCGTGATGATGCAGCACTGCGTGACAGGCAGAACGTTGGGCAGCATGGC  
TGGCAGCCCATCCGGAAGCTCGCTGGGCAGATGTTGTTTCATACAGCAGCAGTTCGTGTA  
CCCATCTGGAAGCACGTGCAGCGGTTACCGCAGCAAGCGCAGCAGATGCAGCAGCAGCAC  
TGACAGCCCTGAGCCAGGGTGAACCGCATCCGGCAGTGACAGCCGGTGAAGCCCGTGCAC  
GTGGTAAAGTTGTTTTTGTGGCACCGGGTCAGGGTAGCCAGTGGCCTGCAATGGGTGCTG  
CCCTGCTGGCAGAAAGCGAAGTTTTTGCAGCCGCAGTTGCAGCATGTGACGCAGCCCTGC  
GTCCGTTTACCGGTTGGAGCGTCTGAGTGTGCTGCGTGGTGAACAGGGTGAAGCAGTTC  
CTCCGGCAGATCGTGTTGATGTTGTGCAGCCTGCACTGTTTGCAATGGCAGTTGGTCTGA  
GCGCAGTTTGGCGTGCATGGGGTATTGAACCGAGCGCAGTGGTGGGTCATAGTCAGGGCG  
AAGTTGCCGCAGCCTATGTTGCGGGTGCCCTGACCCTGGAAGATGCAGCCCGTGTGTTG  
CCCTGCGTAGCCAGCTGGTGCCTCGTATTGCCGGTGGTGGTGAATGGCCGTTATTGAAC  
GTCCGGTTGGTGAAGTTGAACAGCGTCTGAGCCGTTTTGGTGGTGCAGCTGAGCGTTGCCG  
CAGTTAATACACCGGGTAGCACCGTTGTTAGCGGTGATGCCGCAGCGGTTGATCGTCTGC  
TGGCCGAACCTGGAACATGAAGAGGTTTTTGCCCGTCTGTGTTAATGTGGATTATGCAAGCC  
ATAGCGCACATGTTGATGCCATTCTGCCGGAACCTGGAAGCCTGTCTGGCAAGCGTGAAC  
CGCGTGCATGTGCAATTCCGCTGTATAGCACCGTGACCCTGGAAGTACTGGCAGGTCCTG  
AACTGGGTGCCGCATATTGGTGTGTAATCTGCGTGAACCGGTGCGTCTGGATCGTGCGC  
TGAGTCGCCTGCTGGCGGATGGTCATGGTGTGTTTTGTTGAAGTGAGCGCACATCCGGTTC  
TGGCCATTCCGCTGACCGCAGCATCTGCAGAACGTGGTGGTGTGGTTGTTGGTAGCCTGC  
AGCGTGACGATGGTGGTCTGGGTGCTGTTTCAGCCCTGGGTGCACTGCATGTTCAGG  
GCC

---

### 6.0.5.2 *ambE* Fragment 2 (2.533 bp)

GCCATAGCGTTGAATGGGCACGTGTGCTGGCACCGTATGGCGGTAATCTGGTTGATCTGC  
CGACCTATGCATTTTCAGCGTCAGCGTTATTGGCTGGAAGCAAGCCGTAGCCGTATTGATG  
CCAGCGATCTGGGTCTGGCAGCCACCGGTCGTCCTCTGCTGGGTGCAGCAACCCGTGTTG  
CAGGCACCGATAGCTATATTCTGGCAGGCCGTCTGAGCACAGCAGAACATCCGTGGCTGA  
GCGGTCAGGTTGTGTTTGAACGTACCCTGTTTCCGGCAACCGGTTTTCTGGAACTGGCCC  
TGGAAGCCGCAGATGCCATGGGTGTGGCAGGCGTTACCGAACTGGTTGTTCCGGCTCCGC  
TGATTCTGCCTGCCCGTGGTGCCGTTTCATGTGCAGGTTGCAGTTCAGGGTCCGGATGAAG  
CAGGTCGTCGTCCGTTTTTCAGTTTATAGCCGTGCAGAAACCGCAGGTCTGGATGCAGAAT  
GGACCCTGCATGCGACTGGCCTGCTGGGAGGTGCACGTGCCAGTGCGGCAGCAGATACCG  
GTCTGGAAGCTTGCCACCGGAAGGTGCAGCACCGGTTGATGTTAGTGATGCCTATGCAC  
GTCTGGAAGATGCCGGTGTTCGTTATGCACCGAGCCTGCGTGCGCTGGTTGAAGCATGGC  
AAGCCGAACGTCGTATTTATGCCCGTGCCGTTCTGCCAGGTGGTGCGACCCAGGGTCATG  
GTCTGCATCCTGCCCTGTGGGATGCGGCTCTGCATGCCCTGGCTCTGGTTGTGCTGGGTC  
AGGATGCCGAACATGCGGGTGTACTGCTGCCTCGTGCATGGTCAGATGTTACCCTGGCAG  
CACAGGGTGCAACCGAACTGCGTGTTTCGTGTTGAACTGGCAGATGCCGATGCAGAACATG  
TTAGCGCAAGCCTGACCATGGCCGATGCTGATGGTCAGCCGTTGCCACCGTTGGTAGTG  
TTGAAGTTCGCCGTGCAACCGCAGCCCAGGTTTCGTGCAATGAGCACCGCAACCCAGCATC  
TGTATGGTGTGTAATGGAAAGCCGTTGCACTGGCGGAACCGCCTCGTTCAGCTGGCGAAC  
AGGTAGTTCTGGGTCCCTGATGGTGAACCTGGCCACCCGTCTGGGTGCCCGTCGCGCAGGCA  
ATCTGGATGAACTGTTTGCCGATGGTGAAGCCGCACGTCCGGCACCTCGTCGCCTGGTTG  
TTGATGCACGTACCCGTCGTGACGGTGATGTTCCCTGCCGCAGTTCATCAGGCAACCCGTC  
AGGCACTGGAACCTGGTTCAGCGTTGGCTGGCCGATGCCCGTCTGACCGATAACAGAACTGG  
TCGTTCTGACCCGTGAAGCGGTTAGCACCGGTCCAGATGTTGGTGTGGAAGATCTGGGCC  
ATGCAGCGCTGTGGGGTTTTCTGCGTGCGGTTTCGTAGCGAACATCCTGATCGTGGTGTTT  
GTCTGATTGATCTGGGACCGGATGCGAGCGCAGCGGAACTGCTGGATCGCGCTCTGGAAA  
CCGTGGCAGAACCAGAACTGGCGCTGCGTCAGGGTATCGCCCTGGCACCTCGCCTGGGTG  
TTCCGCGTGATCGTGCTGGTGCCCTGCACCGATGCGCCTGGATCCGGACGGCACCGCAC  
TGATTACCGGTGGTACAGGCGAACTGGGTGCCATGTTGCAAAAACATCTGGTGACCGCAC

ATGGTGTGCGTCATCTGGTGCTGACCAGCCGTCGTGGTATGGATGCTCCTGATGCAGCGG  
CACTGGTTGATGAGCTGCGTGCCGCAGGCGCAGCAACCGTGGATGTGGCAGCCTGTGATG  
CTGCAGACGCAGCAGCCCTGGCAGCGGTTGTTGAAGCAATTCGGGCAGCCCGTCCGCTGA  
CAGCCGTGGTGCATACTGCGGGTGTTCTGGATGATAGCGTTGTTACCAAAGTGCAGTGCAG  
AGCAGATGGCACGTGTTCTGCGTCCGAAAGTGGATGGTGCATTTTCATCTGCATGAGCTGA  
CCAAACATGCACCTCTGGCAGCATTGTTCTGTTTAGCAGCGCAGCAGGCACCCTGGGTA  
GTCCGGGTCAGGCAAATTATGCAGCAGCAAATACCTTTCTGGATGCACTGGCAAGCCATC  
TGCGTGCACGTGGTGTTCGGCAATGAGCCTGGCATGGGGTTTTTGGGCACAGGCAGGTC  
TGGGTATGACCGCACATCTGGGTGCAGCAGATATTGCACGTATGAAACGTCTGGGTGTTG  
TTACCATGAGTCCGCAAGAAGGTCTGGAAGTCTGGATGCAAGCCTGCAGCGTCCGGATC  
CGCTGCTGGTTCCGGCACCGCTGGATCTGGCAGCACTGGAACGTGCAGCACGTGAAGGTG  
CACCGGCAAGTCCGATGCTGCGCGAACTGGTTCGTGGCGCACCGGCACGTCGTGCAGCAG  
CCGGTGATGGTGCAAGCGGTAAAGCATCAGCACTGCGTGCCCTGCTGGCAGCCCGTCCGC  
AGAGCGAACGTTTTTGCAGCAGTGCTGGAAGTGGTGCCTGCGGAAGCAGCCCGTGTCTGC  
GTCTGCCTGGTGC

### 6.0.5.3 *ambE* Fragment 3 (2.735 bp)

TGCAGCCGCAGTTCCGCCTGATCGTCCGCTGAAAGAACTGGGTCTGGATAGCCTGACCGC  
AGTGGAAGTGCGTAATCGTCTGGCAGCCCGTACCGAAGCAAACAGCCTGCAACCCTGGT  
TTTTGATCATCCGACCCCGAGCGCAATTAGCCGTTTTCTGCTGAAACAAGCCGGTGCTGA  
TCTGGCACCGAGCGAAGCAGCAGCCAGCCTGGCACCGTCAAGCCGTCGTGCTCCGCTGGA  
TGAACCGATTGCAATTGTTGCAATGGCATGTCGTTGTCCGGGTGGTGTGATAGTCCGGA  
AGCACTGTGGCGTCTGCTGAGCGAAGTTCGTGATGCAATTGGTCCGCTGCCGGAAGAACG  
TGGTTGGAGCGTTGAGCAGATTCTGGGTCGTGATCCGGGTGCAAGCAGCAAACCGTTTTAG  
CGGTCGTGGTGGTTTTCTGTATGGTGCAGATCAGTTTGATGCCGAATTTTTTGGTATTAC  
ACCGCGTGAAGCACGTTTTCTGGATCCGCAGCACGCCCTGCTGCTGGAATGTACCTGGGA  
AGCCCTGGAACGCGCAAGCATTGTGCCGCAGAGCCTGGAAGGTAGCAGCACCGGTGTTTT  
TGTTGGTATGGTTGGTGGTATGGCAGCAGGTCATGGTAGCGTTAGCAGCGAAGGTTATGC  
ACTGACCGGTACAGCACTGAGCACCGCCAGCGGTTCGTATTAGCTATGCCCTGGGTCTGCA

---

GGGTGCCGCAGTTACCGTTGATACCGCATGTAGCAGTAGCGCAGTTGCAATTCATCTGGC  
ATGTACCAGCCTGCGTACCGGTGAATGTGATCTGGCCCTGGCAGGCGGTGTTACCGTTAT  
GGGTGCTCCGAAATCTTTAGCGAATTTGGTCGTCTGGATATTCTGGCAAGTGATGGTCG  
TTGTAAAGCATTGTTGGTGCCACCGCAGATGGTGTTGGTTGGGGTGAAGGTTGTGGTGTCT  
GCTGCTGAAACGCCTGAGTGATGCACAGCGTGATGGTGATCGTGTTCTGGCAGTTATTCG  
TGGTAGTGCAGTTAATCAGGATGGTCGTAGCCAGGGTCTGACAGCACCGAATGGTCCGAG  
CCAAGAGGCCGTTATTCAGCGTGCACTGGCCAGCGCAGGTCTGACGGCAGCAGATGTTGA  
TGCAGTTGAAGCACATGGTACAGGCACCCGTCTGGGCGATCCGATTGAAGCCCAGGCACT  
GCTGAGCACCTATGGTCAGGCACATGCAGCCGGTCAGCCGCTGTGGCTGGGTAGCATTAA  
AAGCAATCTGGGCCATACCAGGCAGCAGCGGGTGTGCGGTGTGATTAAAATGGTTCT  
GGCAATGCAGCATGGTCAGCTGCCTCGTACCCTGTATGCAGATACCCCGAGTCCGGATAT  
TGATTGGAGTCAGGGTCATGTTTCGTCTGCTGGTTGATGCCGTTCCGTGGCCTCAGAGCGC  
ACGTGCTCGTCGTGCGGGTGTTAGCAGCTTTGGTATTTACAGGCACCAATGCACATATTCT  
GGTTGAAGAAGCACCCGAACCGCCTCGTGCAGGCGCTGCACCTGAAGCTCCGGTTACCCT  
GCCGTTTCTGCCACTGCTGGTTAGTGGTCGTGACCTGGCTGCACTGCGTAGTCAGGCAGC  
TCGCCTGGCTGCCCATCTGCGCGAGCGTCCTGATCAGCGTCTGGTGGATGTTACCGCAAG  
CCTGGCAACCACCCGTACCCACCTGGCAGCGCGTCTGGCACTGCCGTTGCAGCAACAGC  
AGGCCGTGATGAAATTTGTGGTGCACTGGATGCATTTGCCGCACGTGGTCTGGCGCTGAA  
TGGTGCATGGGTTACACCGGCACAGCATCGTGCCGGTAAAGTTGCAGTTCTGTTTGCAGG  
TCAGGGTGCCAGCGTCCTGCAATGGGTCGTGGTCTGTATGAAGCCCTGCCGGTTTTTCG  
TGAGGCCCTGGATGAAGTTTGTGCACGTCTGGATGCCACCTGGGTGCACCTCTGAAAGA  
TGTTCTGTTTAGCGCAGAAGGTTACCCGGAAGCAAGTACCCTGCATCAGACCGGCTGGGC  
ACAGCCTGCCCTGTTTGCCTGGAAGTTGCACTGTATCGTCAGTGGGAAGCATGGGGTCT  
GCGTCCAGATGCACTGATGGGTCATAGCCTGGGTGAAATTGTTGCCGCACATGTTGCGGG  
TGTGTTTGTCTGGCGGATGCCTGTGCACTGATTGCAGCACGCGGTCGCTGATGCAGGC  
CCTGCCTACAGGTGGTGCAATGGCGAGCATTGAAGCAAGCGAAGATGATGTTTCGTCTCT  
GCTGGACGCACAGCAGGGTTCGCGCATCACTGGCTGCGCTGAACGGTCCGCGTCAGACCGT  
GTTAGCGGTGATGAAGATGCCGTGGAAGCAGTTTGTGATCATTTCAAAGCACAGGGTCTG  
CGTGTTAAACGTCTGACCGTTAGCCATGCATTTTCATAGCGCACGTATGGAACCGATGCTG

GAAGCATTTCGTGCAGTTGCCGCAACCCTGACGTTTCGTGCACCTCAGATTCCGATTGTT  
AGCAATGTGACCGGTGAACGCGCACCGGTTGAAGCGCTGACCTCACCGGATTATTGGGTT  
CGTCAGGTTTCGTGAAGCAGTTTCGTTGGACCGATGGTGTTTCGTGCCCTGGAAGCCGATGGT  
ATTACCACCTATGTTGAATGTGGTCCGGATGGTGCGACCTGTGCCATGGCCAGCCAGTGT  
GTTACCCGTGCAGCAAAGCACCGGCATTTGTGA

#### 6.0.5.4 *ambE* Fragment 4 (2.641 bp)

GAATCGTAAAGGTGATGAGGTTCAAGCACTGGTTAGCGCAGCATGTGCAGTTCATGTGCG  
TGGTGATAGCCTGGATTGGAGCGCATTTTTTGGCCGGTAGCGGTGCCCGTCGTGTTGAACT  
GCCGACCTATGCCTTTCAGCGTCGTCGTTATGGCGTTGATGAACCGTCACCGCGTCCGGC  
TGAAGTGCCTGCACCGGATACCACCCGCACCCGTGTTTCATGTGAGCGCAGATGATCCGAC  
CGTTCGTGGTCATGTTGTTGGTAGCCAGACCCTGTATCCGGCAGCAAGCTATATTGACCT  
GGCCCTGCGTGTTGCAGCCTCTGCCGGTCAGGCATGTGTGCGTGCAGCCAATATGGCATG  
GTTTGCTCCGGCAATTGTTCCCTCCGGAAGGTCTGAGCCTGGATGTTTCAGCTGCGTCGCAC  
CAAAGCGGGTCTGGAATGTGAAGTGAGCAGCGGTGATAGCGATCAGCGTACCATTTCATTT  
TCAGGGTACACTGCTGGGTGGCGATCCTGGTCCGTGGCCAGCAGTTGATCTGCGTCGTAT  
TATTGGTGAATGTAGCCTGCGTCTGGATCGTGCACATCTGTATGGCATTTTTTGCCAATTA  
TGGCTTTGGTTATGATCGTGCCTTTCAGAGCGTTGCATGGCTGGTGAAGCAATGCAAATGA  
TGTTGTGGGTTCGCGTAGAACTGCCTGCAAGCGAAAGCGCAACCGCAGAGCATCATCTGCA  
GCCGAATCTGCTGGATGGTGCATTTTCAGACCATTATTGGCCTGGATGCAGTTAGCGCACT  
GAGCGGTCCGACACCGGATGCAGGTTTTAACTTTGTTCCGAGCGCCATTTCAGGATGTGCA  
GATTTTTGGTTCGCCTGCGTTCGCGCAGCCTATGTTTCATGCAACCCGTCGTGGTAAAGCCCA  
TGGTAGCCCGAGCTGTGATTTTCAGCTGCTGGGCGAAAATGGTGAACCGATCGCCCTGGT  
TACCGGTCTGACCTTTCGTAAACTGCGTAGCCGTGCAGAACTGGATGCTCCGAGCGCACC  
AGCACAGCGTCCGAGCAATGGTGAAGCAGCACGTCCGCGTAATGTACCGGCACCAGCAA  
TGTTCCAGCCCCTGCAAATGTGCCTGCACCTGGTGGTGCATGCAGATGCAAGTCCGCG  
TGCACCTAGTGCAGAAGTGTGTTTTTTAGTCCGGCATGGGTTCCGGAAAACCTGTTAT  
GGCAGCCAGCGTTACAGGTGATATTGTTGTTTTTGGAGATGATGATGCCAGATTACACA  
TCTGCGTGGTCTGCTGCCTCTGGCACGTCTGATTCATGTTTCGAGCGGTCCGGGTTTTCA

---

GCGTACAGGTCCAGCAGCGTATGCAGTTCGTCCGGATAGCCAAGAAGATCTGAGCGCACT  
GTTTACCGAATTTGATGATGCACGTAGCAAAAGTCTGCGTGCGCTGTATCTGTGGGAACC  
GAGTCGCCGTGCGGCAGAAGGCTCAGCACCCGCTGGTGACGGTGATGTTGCAGCAGCGAT  
TCGTAGCCTGTTTTGTCTGTTTTAAAGCACACATGGCAGAACGTCGCAAAGGTATGCAGCT  
GCTGTACCTGACCTCTAGCGCAACCAGCGCAGTGCCGGTTAATGAAGCCGTTCTGGCCTT  
TTTTCGCACCATTCGTACCGAAAATCCGACGTATGTTGGTAAAGTTATTGCAGTTGCAGA  
TCCGGGTCATATTGGTCGTGCATGTGCAACCGAACTGGGCCTGCCGACCGGTAGTGATGT  
TGTTACAGCATGTTGATGGTGCGCGTCATGTGCGCAAACCTGTTTAGTCGTGAACCGGCTCC  
GCGTGAACGTCTGCGTGATGCCCTGCCGCTGGCACCGGGTGGCACCTTTGTTCTGACCGG  
TGGTGCAGGTAAAATTGGCCTGCTGCTGACCGATATGCTGGTTCGTGAATATCAGGTAA  
TGTTGCCCTGATTGGTCGTAGTCAGCTGGACGAACCGCGTCGCCAGGCAATTGATAGCAT  
TCGTAGTGGTCCGGCACGCGCACTGTATTATAGTGCCGATGTTGGCGTTCTGAGCGATAC  
CGAACGTGCCATTGGTGAAATTCGTGAAACCCTGGGTCCGATTCGTGGTGCCATTCATGC  
CGCAGCAATTATTCGTGATAGCTTTTTTATCAAAAAACCCCTGGCCGAAGTTGATAGTGT  
GCTGCGTCCGAAAGTTAATGGTGCTATTTATCTGGATTTCCCTGCTGCGTGACGATCCGCT  
GGAAGTTTTTGTCTGTGTTTACAGGTCTGGCGAGCCTGCTGGGTAATCAGGGCCAGTCAGA  
CTATGCGGCAGCGAATGGTTTTCTGGATGGTTTTGCGATTCAGCGCAAGCGCTGCGTCA  
GGCAGGCCGTCGTCAGGGTCGTACCATTAGCATTAAATTGGCCTCTGTGGGGTGGTGATGG  
CGGTATGGGTGTGCCGATTATATTGAACTGAACTGCTGAAACGTGGTCTGGTTCCGCT  
GGATATTAGTGATGGTGTTACCGCATTCGTCAGGCGATTGCAATGAAAGAACCGCAGGT  
TGCAGTTGTGGCTGGTCAGCGTGCCGACGCCGTCGCTCTGCTGCGTCCTTGGCTGTCAGA  
AGGTCGTACAGAAGATCATCAGTAAGAATTCCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGC  
A

#### **6.0.5.5 *ambF* Fragment 1 (2.221 bp)**

GCTGGCTGCTGGCAAAAACCGAAGAATTTCTGGGTGATCTGGTTAGCGAAGTGAGCGAAA  
TTCGTGATGATACCATTAGTCCGGATGCAGATTTTCAAGAATTTGGTCTGGATAGCCGTT  
TTGTGATTGCAATGAATAGCCGTCTGGAACAGTATTTTAGCGGTCTGCCTCGTACCCTGT  
TTTTTGAATATCCGAGCATTCGTGCAGTTGCAAGCTATCTGGTTGAAGAGTTTCAGGATC

AGCTGCATGAACTGTTTCCGGATGGTGAACCGGCAGAAGCAAGCCGTCCGGCACAGAGCG  
TTCCGGTTGCACGTCCGAGCGGTGCAATTCCGTCAGGTGCCAGCCCGAGTGGTGCATCAC  
CGTCTGGTGCATTCCGAGTGGCGCAAGCCCGTCAGGCGCAATTCCTAGCGGTGCCTCAC  
CAAGTGGTGCATCCCAAGCGGTGCGAGTCCGCAGACCAGCACCAGCAGCGCAGCAGATC  
TGAGCGATCTGGCAAGCCTGATTCAGCAGATTCCGCTGCCGGAAGCAGTTCTGAGCAGCG  
TTGAACGTCCGCGTGTTGATCCGCGTCCGGCAGCACCGGCACCGAGTGTGTTTCGTGCAA  
GCAGCGGTGATCAGAGCGGTGATGATATTGCAGTTATTGGTGTTCAGGTCGTTATCCGA  
AAGCACGTAATATTGAAGAATTTTGGCGCAATCTGCGTGAAGGTCGTGATTGTATTGAAC  
CGCTGCCGAAAGAACGTTGGAGTCCGGATCCGAGCGATCCGCTGCGTTGGGGTGGTTATC  
TGGATGGTGTACCGATTTTGATAGCCTGTTTTTCGGTATTAGTCCGCGTGAAGGCGAAG  
GTATGGATCCGCAAGAACGTCTGTTTCTGGAAGTTGCATGGGAAACCATTGAAAGCGCAG  
GTTATGATCCTCTGCGTCTGGGTCTAGTGGCGAACCGGCAAGCGTTGGTGTTTTTGTTG  
GTGTTATGTATGGTGAAGTATCAGGTTTTTGGTGCAGAACTGACCCTGCTGGGCCAGCCGA  
CCCTGGTTAGCAGCAGCTATGCAACCATTCCGAATCGTGTTAGCTATTTTCTGAATTTTA  
GTGGTCCGAGCCTGGCACTGGATACCATGTGCAGCAGCAGCCTGACCGCACTGCATCTGG  
CATGTGCAAGCCTGCGTAGCGGTGATTGTAAAATGGCACTGGTTGGTGGCACCAATGTTA  
CCATTCATCCGAACAAATATCGTCTGCTGGAAGCAGGTAAATATCTGGCATCAGATGGTC  
GTTGTCTGATGCTATGGTGCAGATGGTGTGTTATGTTCCCTGCCGAAGGTGTTGGTGCCG  
TTCTGATTAAACCGCTGGCAGATGCACGTCGTGATGGCGATAACCATTTGGGGTGTGATTA  
AAAGCACAGTATTAATCATGGTGCACGTGCCCGTGGTTATAACCACCCCGAATCCGAATG  
CCCAGAGCGCCAGCCTGAGTCTGGCCCTGGAACGTGCAAAAATCGAACCGCATAACCCTGG  
GTTATATTGAAGGTCATGGTACAGGCACCAGCCTGGGCGATCCGATTGAAATTCGTGGTA  
TTCAGAAAGCAGTTGGTTCGCGTTAGCGAAAAAATTCGATTGGTAGCGTGAAAAGCAATA  
TTGGTCATGCAGAAAGTGCAGCCGGTGTTCGCGGTCTGACCAAAGTTCTGCTGCAACTGC  
GTGCACGTGAACTGGTTCCGAGTATTCATTGTGAACCGCCTAATCCGAACATTGATTTTG  
ATCGTGCACCGATTGAGTTTCCGCGTCATGCAGCACCAGTGGAAATCGTCTGACCATACCA  
GCGGTGGTGTGACCCGTGAAGTTCGCGTCTGCGTGGTTAGCGCATTGTTGGTGCAGGTTG  
GTAGCAATGCACATGTTGTTGTTGAAGAAGCAGACGCTCCGGCACTGCAGCGTACCGTTA  
GCGCACAGCCTCGTCTGTTTGTCTGAGCGCACGTAGCGTGGAAACCGCTGCGTGCCCATG

---

CACAGAGCTTTCTGGATTTTTTCAGCCGTATGCCGACACTGCGCGAAGCCGAAGCACGCG  
AACTGTTTTATGATATGTGTGCAACCTGTATTTTGGTCGCGCACCGTTTGAAGCACGTC  
TGGCAATTGTTGCAGAATCACTGCGTACCCTGCAGCAAAAACCTGGCAGCATTGTTTATG  
GTGCAAGCCGTGATCCGGATATTCTGGTTAGTGATGGTCGTAGCCTGGCAGCAACCGATG  
G

#### 6.0.5.6 *ambF* Fragment 2 (2.266 bp)

TGGTGGTCAGCGTCAGCTGAGTGGTCTGGCAGATCTGGGTCGCCGTTGGGTTGCCGGTGA  
AGCAGTTGATGCGAGCGAGCTGTTTCCGCATCCGTGGAAAAAACTGGCCCTGCCGACCTA  
TCCGTTTGAACGTCGTCGTCTGTGGGCACCTAGTGGTGAAAAACTGTATGATCTGCGTAG  
TGCAGCGGCTCCTGCACCGGCAGCCCTCCGGGTAATGGTGCAGCCCTCGCGAAGTTCC  
GGCAAATGTTCCGCGTGCAGCACGTACCGATACCGCAGAAACCGCAGTTGTGAGCGGTCC  
GCAGCATGCACGTATTGCTCCGGCAGAACGTCGCTGGCAGTTGCCGAACAGGTTATTGA  
AGTTGCGGAACGTCCGAGTCCGCCTGATCGTGGTCCGTCAACCAGCGAAACCCGTGGTAG  
CGAAAGTGATCCGCATGTTACCAGCACCTGAATGGTCATACCTCAGCACTGAACGGCCA  
TACCAGTGCGCTGAATGGCCATGCCGCACGTGCCACCGGTCCAGAACGTCTGCAGCAGC  
CGTTCAGGCAGCCGATCAGGGTGCAGCCGTTGAAATTGTTCAAGAAATGGTTCGCGATCT  
GGTTGCACAGATTCTGTTTGTGGATCGTAGCACCATCCTGCCGGATGCCGCACTGTTTGA  
TTATGGTCTGGAAAGCGTTAGCAGTGTGAACTGGCCGAACGTCTGAATGCAATGCTGGG  
CACCGATATTACCCCGACCAGCTTTTTATGAATTTAACACCCTGGCACATTTTTCTCGTCA  
TCTGGTGGAAACGTTATAATCTGGCGGATCGTCTGAGCGGTCTGAGTGCAGGCCTGGCAGG  
CGGTAGTAGCGCTCCTGCAGGTCCGAGTGGTCGTGGTGATAGCCCTCCTCGTGCCGCAGC  
GGGTGCGGAAGGTCCGGTTGTTGGTGCGGCAGCCGCAGAAGGCGCAGCAGCTCCAGCAGC  
AGGCGGTCCGACCGTTGAAGAACTGTGGGCAAGCGCAATGCATGCAGAAGGACTGGCAGC  
CCTGCCGTCACCGGAACCGCGTCGTAGCGCAAGCAAAGCACCGCGTCCTGCACCTCCGGT  
TCAGCCGAGTGATCAGGCCACACCGGTGAAATCGTGCAAGAAATTGTGCGTGACCTGGT  
GGCCCAAATCCTGTTTCGTTGATCGTTCAACCATTCTGCCGACCACAGCCCTGTTTCGATTA  
CGGCCTGGAATCAGTTAGCTCAGTGGAACCTGGCAGAGCGCCTGAACGCCATGCTGGGTAC  
AGACATCACACCGACCTCATTTTTATGAGTTCAATACGCTGGCCCACTTTAGTCGTCACCT

GGTTGAGCGGTACAACCTGGCCGATCGCCTGTCAGGTCTGTCAGCCGGTCTGGCTGGCGG  
TTCAAGCGCACCAGCACGTGCAAGTGCACCCGCTGCACAGGGTCTGCGGCACTGAGCAG  
CAGCGAACCTCGTCGTTTCAGATGCAGGCATTGAACTGCATGTTATTCCGGGTGTTGATGG  
TCATGCCGTTGAATTTGCCACCCTGGGTAGTGGTGTTCGCTGTTTGTGCTGGGTGGTCT  
GCTGGCCACCCATGATGCCCTGACCCTGAACCCGGATATCCTGAGCCTGGGTGAGACCTA  
TCGCGTTATTATGGTTCATCCGCCTGGTGCCGGTTCGTAGCGAACTGCCTCGTGGTGA  
GACCATGGATTTTATTGTTTCGTCAGGTGAAAGGTGTGCGTCAGAGTCTGGGTCTGTCAAG  
CGTTGTTCTGGTTGGTTATAGCTTTGGTGGTCTGGTTGCCAGGCCTATGTTGCACAGTT  
TCCGGAACGTGCCAGCAAACCTGGTTCTGGCGTGTACCACCAGTGATCCGGCAAGTGTGTT  
TAATGGTATGCATCTGGTCGCAGCAGAAGCACAGCGTCATCCAGATGGTCTGCGTGCTCT  
GCAGTTTGCAGATGTTAGCAAATTTCCGCTGTATAGCCAGCTGAGCACCCGTCTGCGTCC  
GGAAACCCTGGCATATCCGGCAATTCCGACCCTGATTGTAGCCGGTGCCGAAGATCGTTA  
TGTGCCGACCATTTCATGCTGAACGCCTGGCACGCGCAAATCCGAACGCAACCCTGCATAT  
TGTGGAAGGTGCAGGTCATTTTCTGGGCCTGAGCCATGGTGGTGTCTGGTACATCTGGT  
TAATGGTTTTTGTCTGGGAGATCGTACCGCACCAGCCCGTAGTCCGGCAGTTAGCGCGAG  
CCGTCGTGGTGGCCTGCGTAAAATGAGCCAAGAAAGCGTGGGTGCA

#### **6.0.5.7 *ambF* Fragment 3 (2.142 bp)**

GCACTGAAATCATATCTGGAAGAAGGTGAAATTGCAAGCGGTGTTGAAGCATCACCGGTT  
GCTGGTCAGGTGGGTTACCTGCTGAACCGTCTGCTGTCTGGTCAAGAAGCACCGAGCAGT  
CCGTATCATTGCTTTTTTATGCCGAGTGGCCTGGAAGCCGTGGATGCAGCACTGCGTTTT  
GGTCGTCGTCGTGCAAACTGAGCCGTGGCCTGGGTGATGCAAAAACCCTGGTACTGGAT  
CCGGAAGGTGCCCTGCGTCGTCATTTTGAATTTCTGCCTCAAGAGCGGCTGTTCCCGGAT  
CTGATTTTTGTGGGTGAAAGTCGTGAACTGCTGCGTCTGCTGCAGTCAGCGGAAGATGTG  
GGTGCAGCGTATGTTACCACCGCATGTGATGATGCGACCCTGGAACCGTTGCAGCCGAA  
TGTGCACGTCGCGGTATTGTTAGCGTTCTGGGCGAACTGCACGCAGATACAGGCGAACTG  
GTTTCTGCACGTCTGCGTAGCAAACCGGATGTTGTGGTTCTGGATGAAGCAATTGCAGGT  
TTTGAACGCGTTTTGGTGTGTTGTGCCATTCGTCGTTTTTCATGAATCAGGTGTTTGGACC  
CGTCAGCCGGAAGAATTTGCAGTTCGTGTTCCGGGTAGCATGGCAGGTCTGCACTGACC

---

GTGGTTCGTGAAAATATTCTGCGTCGCTTTCGTGCGGTTGTGACCAATGATACCACAGCA  
AACCTGCGTGCAATTGCCGTTGATCAGCGTCGCACCAAAGAAGCACATCGTAGTTACGTT  
AATCCGGTACTGCTGGAAAGTCTGGATGCATTTGGGCTGGCAGGTCGTCAGCGCCATGCC  
GATCGTCGTGGTTATGAAATTGAACGTGATGATGGTAGCAGCGCACGTTATTAATCTG  
TATCTGGTTACCAGCGCAAGCTTTCGCGGTCATAACCGGTTTCAGAAATTGCACAGTCTGTT  
CTGGGTACACATGATATTACACGTGATTATTGGGCTGATCTGGAACGTCGTATTCCTCGT  
GAAACGGATTTTGGCCGTGTTTTTCTGCAGCGGGTCCGGCAACCGCAGTGGAACAGCA  
GTTAAACTGGGCCTGCTGGCAGCGCGTAAAGGTAGCGCACTGCTGGTTCTGAAAGGTAGC  
CCGATTTTTTACCCGTCTGGGTGCCCTGGTGAGCCATGCAGAACCGGGTAGTCCGCTGGAA  
GCCCTGGTTGAAAGCTGTCCGTGGTCAAAGTTATTGCGGTTGATCCGTTTGGCGAAGGG  
GCAGCGGCAGAACTGGAAGCCAAACTGACCAGTGATGATGTTGGTTTTGTGTGGCTGGAA  
ACACTGCAGAGTGATTGGGGTGGACTGCGTTCAGTTCGGATGCGGTGCTGGAAGTTATT  
GATCGTCATCGTGAACGTAGCGGTTACCTGGTTGGCGTTGATGAAACCTATAACAGTCTG  
GGTTGTGGTTCGTATGTTTCATTGGCAGGGTAAACTGGCTCGTCCGGATGTGGTTGCGGTT  
TGTGTTGGTTGGACCGATTGTCAGCTGCTGGCTGGCTATGTTCTGACCACCGAAGAAGTT  
GCCGCACGCGCACGTGAGCGCAATGAAGCAGTGGTTAGTGCACTGCAAGAACAGCTGCGT  
TGCCAGCTGACAGCACATGCAACACTGCGCCTGCTGGATGTTCTGAAAGAAGATCGTATT  
CTGGCACAGATTGCCGAAACCGAACGTCGTTTTTCTGGTGCCCTGAATGATTTTGCCGCA  
GAATGTGGTATGGTTAAACGTGTTTGGGGTGAAGGTCTGTTTTGGGCAGTTCAGTTTGAT  
CTGGACGGTTGGCCTCGTTTTGTTTCGTGATTGGTTTAGCAGCTTCTGTGGTCTGAATGT  
CTGCGCGATCCTGTTGCACCGGTGGCCGTTAGCATGCAGCCGCTGACACCGGCATGTATT  
CGCGTTGAACCGCGTTATGATATTCCAGCAGCCGAACTGGATGCGGCAATGGGTACGCTG  
AAACGCGTGCTGGGTAAAGGCGTTGAAGGTATTGTTGCCAGCGTTGCAGATGATGTAGAA  
CGCCGTGGTGATGCGCGTCGCGCTGAACTGTTCCGTCGCATTCTGCGTGGTTTTCAAACC  
ACCTAAGAATTCCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCA

#### **6.0.5.8 *ambG* (2.229 bp)**

CATATGCAGTGTATGAGCCGTGAAGGCACCAGCAGCATGAATATTGGTAGTCCGCTGCCT  
CCGATTGAAAATGCACTGGACCTGTTCAAACATTATGCAACCAGCGCACCCGGAAGCACGT

ATTGCAGTTTTTATTGAAGAAGAAGGTCAAGAACAGGGTCTGACCTATCGTGAACCTGGAA  
CGTGCAGCAACCAATCTGAGCCTGGAACTGGCAAGCGTTGCAGCACCGGGTGATCGTGTT  
CTGGTTGCCTATGATAGCGGTCCGATGTATCTGGTTGGTGTGGGCAGCACTGTATGCA  
GGTATGATTGCAGTTCCGGTTGATCCGCTGGGTCCGGATCGTCCGGCAGCAAATCTGACC  
CGTCTGCTGAATGTTACCGCAGATAGCGGTGCAACCGTTTTGTATTGCAAGCCGTAGCATG  
CTGGATGCAGTTAAAAGCCATCCGGGTGCACGCCAGCTGACCGAACAGCTGCGTTGGGTT  
GTTCCGAGCCTGCCGGATCTGCTGGGTCTGTCACCTGGTAGCCCTCCGGCTGCACTGCGT  
ACCGAAAAAGATGTTGCAATGCTGCAGTATGCCAGCGGTAGCACAGGTGCACCGAAAGGC  
ACCATTGTTACCCATGCAAGCCTGCTGATGCTGGCACGTGCACTGCTGATTAGCACCAGC  
GCAGAAAGCCCGTTTTGGTCGTCCGGATGTTGAAGTTACCTGGCTGCCGCTGACCCATAGC  
ACCGCAGGTTATGGTCTGATTATGAAATGTCTGACCGGTGCCACCATGAGCGCATGGTAT  
ATTGCACCGAGCGCATTGTCACGTAGTCCGGCAATTTGGCTGCGTACCATTAGCCGTCAT  
AAAGGTAAACAGGTTTATAGCGTTGCACCGAATTTTGCCTGGATTGGTGTGTTAGCAGC  
ACCACCGAAGCAGAACGTAAACAGCTGGATCTGAGCTGTTGGACCCATGTTATGAGCATG  
GGTAAAAAGTTCGTCCGGAAACCTGGAAAGCATTTAGTGATGCATTTTCGTGAAAGCGGT  
TTTACCCGAAACTGTTTTATTGCCGGTTATGGTATGAGCGAAACCGGTTATGTTAGCGGT  
AGCGTTAATGGTGGTAAAACCGTTCGTTTTGATCGTGCAGCCATGGATGAAGGTAGCCTG  
GTTGAAGCTCCGGAAGGTGGCATTCTGCTGCTGAGCAGCTCAGGTTTTACCCTGCCTGGT  
GTTGCTGTTGCAATTGTTGATCCGGAAACACGTGAAGTTCTGCCGGAAGGTAAAATTGGT  
GAAATTTGGGTTAGCACCCCGACCGCAATGACCGGTTATTGGAACCGTCCGGAAGAAACA  
GAACAGCAGTTTCGTGCCCGTGCAGCAGATGGTAGTGGTCCGTTTTTTCGTAGTGGTGAT  
ATGGGTGCATTCTATGGTGGCAACCTGTTTGTACCAGTTCGTCGTAAGCATTGTTGTT  
ATTCGTGGCCGTAAACACTATGCCGAAGATATTGAAAGCACCCCTGGAACGCGCTCTGGAT  
TGGCTGGGTGCAAATAGCTCAATTGCATTTGCAGATGATGTGAATGGTGTGGAAGAACTG  
TTCATTGCAGTGGATCCGCGTGGTGCACGTGATGGTGTGGTTTTGAAGAACGTACCGAT  
GCAATTCGTAGCGTTGTTGCACGTGAATTTGGTGTGCGTGTTTCATGAAGTGCTGTTTCTG  
GCAGCAGGTCAGCTGCCTCGTACCAGTATGGGTAAAGTTAGCCGTGTTAGCTGTAAAGAC  
CTGTTTTCGTTCAGGCGAACTGGAAATTGCAGCCCGTAGCGGTAGTATTGCCCGTGGTGGT  
GCCGATCTGCCTGCAGTTGATCTGCGTGCAATCTGGATGAACCGGATGCAGAACTGCGT

---

GTTGCCCGTATGACCGAATATATCCGTAGCCTGCTGTCAGCAAGCCTGAGCGTTCCTGCA  
GATGCACTGAGCCTGACCAAAGCTTTGATGAACTGGGTGTTGATAGCATGACCGGTGTT  
CGTTTTTCGTGGTGAAGTTCGTGCACTGGGTCTGGAAGTCCCGGAAAGTATTGTTTAT  
AACTATCCGACCATTGCACAGCTGGCAAGCTTTGTTTGTGAAAACTGACCGGTACAGCA  
GGTAGCAATGATGCCGAACGTGCCGATCGTGGTCCTGCAGCACTGGCAGCCCTGGATGTG  
GAATCAATGAGCGAAGAAGCAGCAGCCGCAGCACTGCGTGCCCATCTGGATGGTCGTAAA  
TAAGAATTC

#### **6.0.5.9 *amb1* (1.329 bp)**

CATATGAGCGCACAGCCGGAATATTGTATTGTTGGTGGTGGTCCGATTGGTATTGGCATT  
GGTAAATGTTTTGCACAAGAAGGCCTGAAATTTACCATTGTTGAAGCCGATGAAGATTTT  
GGTGGCACCTGGGCACTGAGCCAGCGTAGCGGTCTGGTGTATAAAAGCACCCATCTGATT  
AGCAGCAAAAAAACACCCAGTTTCTGGATTTTCCGATGCCGGAAGATTATCCGCATTAT  
CCGAGCCATGCACAGATGCTGAGCTATCTGCGTAGCCTGGCAACCCATTATGGTCTGTAT  
GATCGTGCACTGTTTGGCACCCGTGTTGAACATGTTGAACCGAATGGTGCAGGTTGTCGT  
GTTTCGTCTGAGCAATGGTGAACCCGTACCTTTAGCGCAGTTGTTGTTGCAAATGGTCGT  
ATGCGTACACCGCTGATTCGCGTATCCGGGTGTGTTTAGCGGTGAAACCATGCATAGC  
GCAGCATATAAAAGCCATGAAGTGTTCGTGGTAAACGTGTTCTGGTTATTGGTGGCGGT  
AATAGCGGTTGTGATATTGCAGTTGATGCAGCACTGGCAGCAGAACAGACCTTTCATAGC  
ACCCGTCGTGGTTATCATTACATGCCGAAATTTATCCATGGTAAACCGACCCAAGAATGG  
CTGATGGATATGGGTAGCAAATTTTCGTAGCCAGGATGATTATTGGAGCTTTGTTTCAGCGT  
GAATTTAAAGCAGCAGGTTATGATCCGGTTGATTATGGCCTGCCTCGTCCGGATCATGCA  
TTCATGAAGCACATCCGATTCTGAATAGCCTGGTTCTGTATTATATCGGTCATGGTGATA  
TTCATCCGAAACCGGATGTTTCGTCGTTTTGAAGGTCGTACCGTTGAATTTGTTGATGGTA  
CACGTGCAGAAGTTGATCTGATTCTGTATGCAACCGGTTATGAAATGGATTTCCCGTTTC  
TGCCAGAAGATCTGCGTCCGTCAGATGGTGCAGTGGAACTGTTTCTGAGCATGTTTCATC  
GTAAAGCAGATAGTCTGGTTTTTCGTGGGCTATTTCAATGCAGCAAGTGGTCTGGGTAATC  
TGCTGAATTGTGGTGGTGCCCTGGTTACCGATTATCTGGTTGCACGTGAGAAAAATACCG  
ATGCATTTTCGTGTTCTGCGTCGTCTGATTCAGGGTCCGGAACCGGATATTGGTTCGCGGTC

GTTTTCTGAACAGTCCGCGTCATCGTGTTGAAACCGATCTGTGGAAAGCAATGAAAGTGA  
TGAACTTTTTTCGCAGCGTTCTGAATCCGGCACGTGCAGCCGGTGATGTTGTTTCGTGCAT  
AAGAATTC

## 6.0.6 Bioinformatik

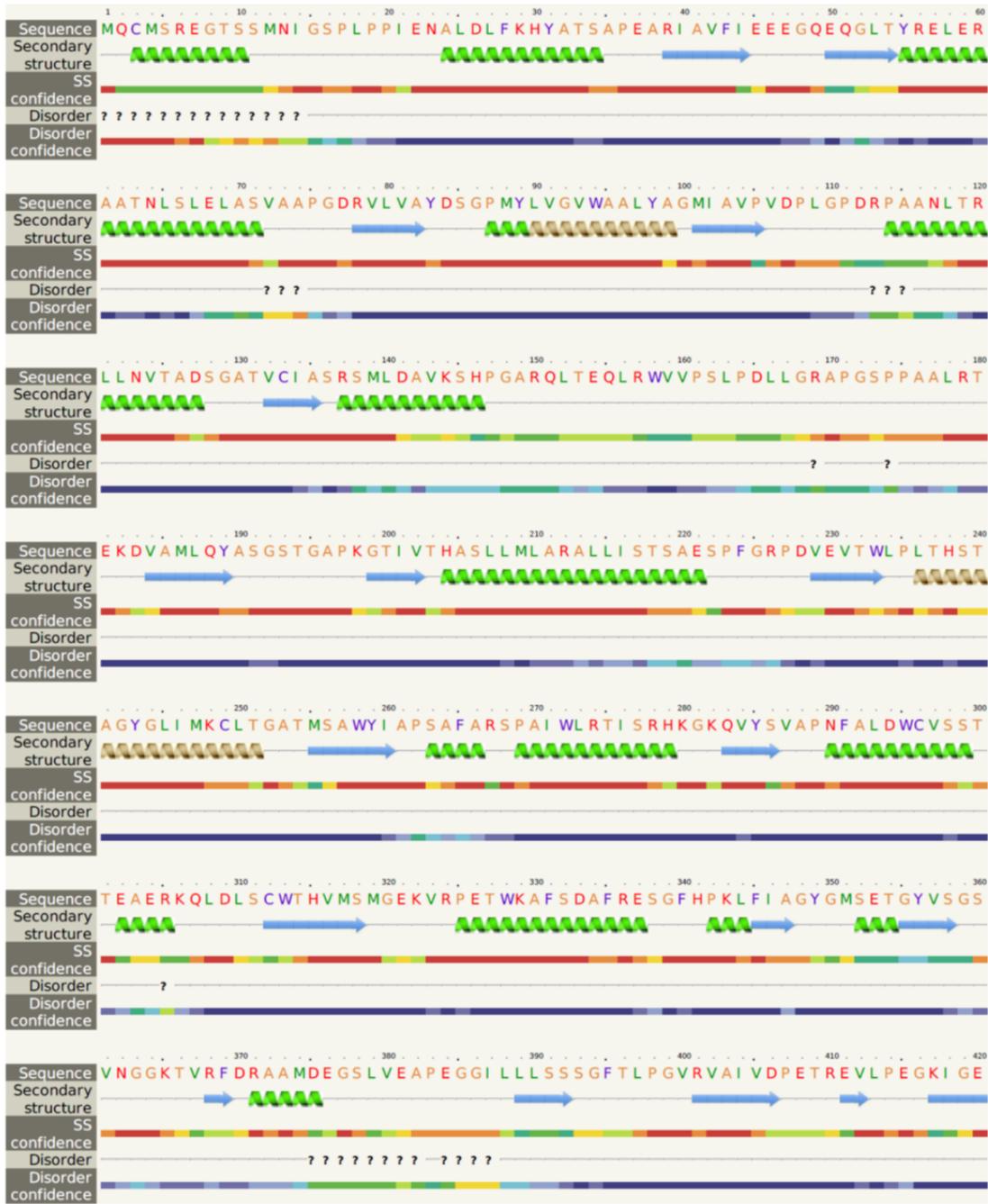


Abbildung 62: Vorhersage von Sekundärstruktur und Strukturordnung für AmbG mit phyre2.



Abbildung 63: Vorhersage von Sekundärstruktur und Strukturordnung für AmbG mit phyre2 (Fortsetzung).

Domain analysis						
Rank	Aligned region					
1	c5es8A_					
2	c5ja2A_					
3	c2vsqA_					
4	c4zxiA_					
5	c4zxiA_					
6	c4r0mA_					
7	c4dg9A_					
8	c3rg2H_					
9	c4wd1A_					
10	d1pg4a_					
11	c5ifiA_					
12	c5ey8D_					
13	d1ry2a_					
14	c3tsyA_					
15	c3kxwA_					
16	c4r0mB_					
17	c3gqwB_					
18	c3e7wA_					
19	d3cw9a1_					
20	c3vnqA_					

Detailed template information						
#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c5es8A_			100.0	22	<b>PDB header:</b> ligase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> linear gramicidin synthetase subunit a; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of the initiation module of lgra in the thiolation2 state
2	c5ja2A_			100.0	21	<b>PDB header:</b> ligase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> enterobactin synthase component f; <b>PDBTitle:</b> entf, a terminal nonribosomal peptide synthetase module bound to the2 non-native mbth-like protein pa2412
3	c2vsqA_			100.0	20	<b>PDB header:</b> ligase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> surfactin synthetase subunit 3; <b>PDBTitle:</b> structure of surfactin a synthetase c (srfa-c), a2 nonribosomal peptide synthetase termination module
4	c4zxiA_			100.0	21	<b>PDB header:</b> biosynthetic protein <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> enterobactin synthase component f; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of holo-entf a nonribosomal peptide synthetase in2 the thioester-forming conformation
5	c4zxiA_			100.0	19	<b>PDB header:</b> biosynthetic protein <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> tyrocidine synthetase 3; <b>PDBTitle:</b> crystal structure of holo-ab3403 a four domain nonribosomal peptide2 synthetase bound to amp and glycine
6	c4r0mA_			100.0	23	<b>PDB header:</b> ligase <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> mcyg protein; <b>PDBTitle:</b> structure of mcyg a-pcp complexed with phenylalanyl-adenylate
7	c4dg9A_			100.0	19	<b>PDB header:</b> ligase/inhibitor <b>Chain:</b> A; <b>PDB Molecule:</b> pa1221; <b>PDBTitle:</b> structure of holo-pa1221, an nrps protein containing adenylation and2 pcp domains bound to vinylsulfonamide inhibitor
8	c3rg2H_			100.0	20	<b>PDB header:</b> ligase <b>Chain:</b> H; <b>PDB Molecule:</b> enterobactin synthase component e (ente), 2,3-dihydro-2,3- <b>PDBTitle:</b> structure of a two-domain nrps fusion protein containing the ente2 adenylation domain and entb aryl-carrier protein from enterobactin3 biosynthesis

**Abbildung 64:** Ergebnisse der phyre2-Domänenanalyse für AmbG in Form von Strukturvergleichen sowie detaillierte Informationen zu den acht besten Strukturhomologen für die Erstellung des finalen Strukturmodells.

Pssm-ID: 213297 [Multi-domain] Cd Length: 547 Bit Score: 488.24 E-value: 3.14e-164

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 30 HYATSAPEARIAVFIIEEGQEQGLTYRELERAAINLSLELASVAAPGDRVLVAYDSGPMYLVGVWAALYAGMIAVFPVDFI 109
Cdd:cd05931  1 ARAAAQPDARVYTFLLFDDDEEETLTYAELDRRARAIARLQALGAPGDRVLLAPPGLDFVAFFFGCLYAGIAVFPAPP- 79

      90     100     110     120     130     140     150     160
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 110 gPDRPAANLIRLLNVTADSGATVCIASRSMLEDAVKSHpGARQLTEQLRWVVPsLPDLLGRAPGSPPAALRTEKDVAMLQY 189
Cdd:cd05931  80 -PRRLGRHLARLAAAILADAGARAVLTTSAVLAALRAA-LRAPAALLLLLIA--ADDLAALAAADWRPPPPDFDDIAFLQY 155

     170     180     190     200     210     220     230     240
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 190 ASGSTGAPKGTIVTHASLL---MLARALLIstsaespfGRPDVEVTWLPPLHstaGYGLIMKCLTG--ATMSAWYIAPS 263
Cdd:cd05931 156 TSGSTGAPKGVMTHTGNLLanlrAIARAFGL-----DPDVGVSWLPPLYH---DMGLIGGLLQPLyAGFPVVLMSFL 224

     250     260     270     280     290     300     310     320
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 264 AFARSPAIWLRITISRHKGkqVYSVAPNFALDWCVSSITAEERKQLDLSCWTHVMSMGKVRPETWKAFSDAFRESGFHPK 343
Cdd:cd05931 225 AFLRRPLRWLEAISRYRA--TVSGAPNFAYDLCVRRVRDEQLAGLDLSSWRVAFNGAEPVRADTLERFAERFAPAGFRPE 302

     330     340     350     360     370     380     390     400
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 344 LFIAGYGMSE-TGYVSGSV--NGGKTVRFDRAMDEGSLVEAPEGG--ILLSSSGFTLPGVRVAIVDPETREVLPEGKI 418
Cdd:cd05931 303 AFLPCYGLAEaTLAVSGGPpgAGPVVLRVDRDALARGAAVAAADGaaARELVSCGRPLPGHEVRIVDPETRRLPDGEV 382

     410     420     430     440     450     460     470     480
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 419 GEINWSTPTAMTGYWNRPEETEQQFRARAADGSGPFFRSGDMCAFYGGNLFVTGRKRSIVVIRGRKHVAEDIESTLERAL 498
Cdd:cd05931 383 GEINVRGFSVAAGYWNRPEATAETFGARLATDEGGWLRtGDLGFLHDGELYVTGRKLDLIIIRGRNHYPQDIEATVERAH 462

     490     500     510     520     530     540     550     560
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
gi 117168597 499 DWLGANSSIAFADDVNGVEELFIAVDPRGARDGVGFEEERTDAIRSVVAREFGVRVHEVLFLLAAGQLPRTSMGKVSRSVCK 578
Cdd:cd05931 463 PALRFGAAAASFVGDGGEERLVVVAEVRRRGLPADLAAALAEAIRAAVAREHGVAPADVVLVVRPGTLPKTSSGKIQRACR 542

     579     582
.....
gi 117168597 579 DLFR 582
Cdd:cd05931 543 ELYL 546

```

**Abbildung 65:** AmbG (gi 117168597) zeigt relevante Ähnlichkeit zur FAAL-Consensus-Sequenz (Cdd: cd05931).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

ANL_AmbG          mqcsmregtssmngisplppienaldlrfkhyatsapeariavfi-----eeegqegqgity
Firefly_luciferase  -----MEDAKNI-KKGPAPPYPLEDGTAGBQLHKAMK-RYALVPGTIAFTDAHIEVNITY
anthranilate_CoA_ligase  -----m-kasdiplynavdilernlpvran-ktalft-----pdremtf
fadd19_FACL       -----MAVALNIADLABHAIDA VPD-RVAVIC-----GDEQLTY
                  . . . . . : * : . : * :

ANL_AmbG          releraatnlelelasvaa-pgdrvlvaydegpmylvgwaalyagmiavpvdplgpdrp
Firefly_luciferase  AEYPFEMSVRLAEAMKRYGLNTHRIVVCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERE
anthranilate_CoA_ligase  rqvsnearngvgnalkglgrvrfgecvlltldsawwtsffgfvklgaiavgintllkppe
fadd19_FACL       AQLLEDKANRLAHLIDQGVQKDDKVGLYCRNRIEIVIAMLGIVKAGAILVNVNFRYVEGE
                  : : : . : . . . . : * . . :

ANL_AmbG          aanltrllnvtadsgatvciaarsmldavkshpgarqteql-----rww
Firefly_luciferase  -----LLNSMNISQPTVVPVSKKGLQKILNVQKLP I IQKI I IMDSKT--DYQGQSGMY
anthranilate_CoA_ligase  -----yeylrdrcarvlivhqeflpliesirgnlpmehivvigegpqegylsfndwi
fadd19_FACL       -----LRYLFDNSDMVALVHERRYADR VANVLPDTPHVRTILVVEDGSDQYRRYGGVE
                  . . . . . : . . . . .

ANL_AmbG          vpslpdlgragp-----paalrtekdvamlqyasgsgapkggtivthasllmlaral
Firefly_luciferase  TPVT---SHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNSGGTSGSPKGVALPHRTACVRFSHA
anthranilate_CoA_ligase  rpgp-----tt-----lea---aqshredicslnysagttggpkgiphahkkdyptaqlw
fadd19_FACL       FYSA-----IAAGSPERD---PGRSADAIYLLYTGTTGFPFKGVMWRHEDIYR--VLF
                  : . * : * * * *

ANL_AmbG          listsaespf-----grpd-vevtwlpithstagyglmkcltgatmsawyia
Firefly_luciferase  RDPIFGNQII-----PDTAILSVVPPHHGPGMPTTLGYLICGFRV---VL
anthranilate_CoA_ligase  gvnvlgire-sdrtfalaklf-----ft-----fgtgnlifpw---yvgasc---vl
fadd19_FACL       GGTDFATGEFVKDEYDLAKAAAANPPMIRYPIPPMIMGATQSATWMLPFGQTT---VL
                  : . . . . . : * . . . .

ANL_AmbG          psafarspaiwrtisrhkgkqvysvapnfdwcvssstteaerkqldiscwthvmsmge
Firefly_luciferase  MYRF--EEELPLRSIQDYKIQSALLVPTLPSFF--AK--STLIDKYDLSNLHEIASGGA
anthranilate_CoA_ligase  fpgaarvasnvlstisrfkptifynaptgyaaal--a--lkdfsqhdlselrlcvase
fadd19_FACL       APEF--NADEVWRTIHKHKVNLFFPTGDAMARPLVDA--LVKGNVDLSSLFLLASTAA
                  : : * : . . . . . : * * * *

ANL_AmbG          kvrpetwkafesdafresgfhpklfiagygmsetgyvsgvnggktvrfdraamdegisive
Firefly_luciferase  PLSKEVGEAVAKRFH----LPGIRQGYGLTETTS-AILITPE-----
anthranilate_CoA_ligase  alpaalwyawke-at----gvdldgigcten-fhifisnrp-----
fadd19_FACL       LPSPSIKEKLELLP----NRVITDSIGSETGPGGTSVVA-----
                  . . . . . : * : * :

ANL_AmbG          apeggilllsssgftlpgvrvaivdpetrevlpegkigeiwwstptamtgywnrpeeteq
Firefly_luciferase  ---GDDKPGAVGVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVNDPEATN-
anthranilate_CoA_ligase  ---gdirpgsagkpvveyelklvddgktvpagelgnvllrse-taalsywhnfeksrq
fadd19_FACL       ---GQAHGGGPRVRIDHRTVVLDDDDGNEVKPGSGMRGVIAKKG-NIPVGYKDEKKTAE
                  * . . . . : * : * : * : * :

ANL_AmbG          qfraraadgsgpffrsgdmgaf-yggnlfvtrrksivvirgrkhyaediestleraldw
Firefly_luciferase  --ALIDKDG--WLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRLKS LI KYKGCQVAPAELESILLQHPI
anthranilate_CoA_ligase  tfqg----e---wlatgdkyfvdadgyywhagraddmlkvvggiwvswpveestliqhpav
fadd19_FACL       TPRTINGVR--YAI PGDYAQVEEDGTVTVLGRGSVSINSGGKVVPEVEVAALKGHPDV
                  . * * . . . . . : * : * : * : *

ANL_AmbG          lganssiafaddvng-veelfiavdprgardvgvfeertdairsvvarefgvrvhevifl
Firefly_luciferase  FDAGVA-GLPGDDAGELPAAVVLEHGKTMTEK--EIVDYVASQVTTAKKLRGG---VV
anthranilate_CoA_ligase  qecavi-gcpdqsrllkpkafilkpeqipsealirqitdhctekma-aykrprw---ie
fadd19_FACL       FDALVV-GVPDPRYQQQVAAVVQARPGCRPSLA---ELDSFVRSEIA-GYKVPRS---LW
                  . . . . . : . . . . .

ANL_AmbG          aagqlprtmgkvervsckdlfr-----
Firefly_luciferase  PVDEVKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKSKL-----
anthranilate_CoA_ligase  fvtelpktatgkiqrflrsaa-----
fadd19_FACL       PVDEVKRSFAGKPDYRWAKQTEARPADDVHAGHVTSGS
                  . : : * * . . .

```

**Abbildung 66:** Multiples Sequenzalignment von ANL\_AmbG mit der *Firefly Luciferase* aus *Photinus pyralis* (GenBank: Q27758), Anthranilat CoA-Ligase aus *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 (GenBank: CCA65703) und der *long-chain-fatty-acid-AMP ligase* FadD19 aus *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: CCP45733). ANL\_AmbG zeigt das charakteristische 21 AS lange Insertionsmotif zwischen den N- und C-terminalen Subdomänen (gelb, AS 365–384). Das Alignment wurde mit dem webbasierten Programm *Clustal Omega* unter Standardeinstellungen erstellt.

GenBank	Name [Organismus]	Domänenarchitektur	Identität, e-value
EPX59373	long-chain-fatty-acid-CoA ligase [ <i>Cystobacterfuscus</i> DSM 2262]	PRK05850/FAAL → PP → C → A_NRPS → PP	39%, 2e-94
ADO71979	non-ribosomal peptide synthase [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → AFD_classI → seco_metab_LLM → A_NRPS → PP	38%, 5e-90
OJH36227	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Cystobacterferrugineus</i> ]	FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	38%, 2e-93
OJT22007	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Archangium</i> sp. Cb G35]	FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	38%, 4e-92
WP_055409317	hypothetical protein [ <i>Frankia</i> sp. ACN1ag]	Lone standing FAAL/AA-adenyl- dom	37%, 2e-89
KFA94581.1	peptide synthetase [ <i>Cystobacter</i> <i>violaceus</i> Cb vi76]	PRK05850/FAAL → PP → C → A_NRPS → PP	37%, 5e-94
WP_049805170	peptide synthetase [ <i>Stigmatella</i> <i>aurantiaca</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS_Srf-like → PP	37%, 4e-92
ADO72625	Non-ribosomal peptide synthase [ <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS_Srf-like → PP	37%, 3e-92
AKJ03360.1	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase [ <i>Archangium gephyra</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → 4x (C → A_NRPS → PP)	37%, 6e-89
WP_016876672	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Chlorogloeopsis fritschii</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	37%, 3e-92
WP_051114458	hypothetical protein [ <i>Streptomyces</i> sp. CNS335]	FAAL/AMP-binding → PKS_PP → EntF	37%, 6e-91
WP_051312285.1	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Streptomyces</i> sp. CNQ865]	FAAL → PP → C → EntF/A_NRPS_TImIV_like → mcbC-like oxidoreductase → AFD_classI → PP → C → EntF/A_NRPS_TImIV_like → PP → Lys2b	37%, 3e-90
WP_018851162.1	hypothetical protein, partial [ <i>Streptomyces</i> sp. CNY243]	PRK05850/FAAL → PP → C → AFD_classI	37%, 6e-90
AFE09749.1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase [ <i>Corallococcus corallobides</i> DSM 2259]	PRK05850/FAAL → PP → 8x (C → A_NRPS_Sfm-like → PP) → EntF	36%, 4e-91
WP_018399776.1	type I polyketide synthase [filamentous <i>cyanobacterium</i> ESFC-1]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → KS → AT → KR_2_FAS_SDR_x → FabG → PKS_PP → Sulfotransfer_1 → MhpC- → Abhydrolase_5	36%, 5e-91
ABF92714	non-ribosomal peptide synthase [ <i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622]	PRK05850/FAAL → PP → 3x (C → A_NRPS → PP)	36%, 2e-97
WP_017307786	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Fischerella</i> sp. PCC 9339]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C → A_NRPS_Sfm_like → PP	36%, 7e-95
BAU05972	amino acid adenylation [ <i>Fischerella</i> sp. NIES-3754]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	36%, 1e-95
AFY82813	acyl-CoA synthetase (AMP- forming)/AMP-acid ligase II [ <i>Oscillatoria</i> <i>acuminata</i> PCC 6304]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C	36%, 1e-89
AFZ09439.1	amino acid adenylation domain protein [ <i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP → C → A_NRPS_TImIV_like → PP	36%, 3e-90
WP_016866913	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Fischerella musciicola</i> ]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	36%, 1e-93
KU83904.1	amino acid adenylation protein [ <i>Scytonema tolypothrichoides</i> VB-61278]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS_Ta1_like → PP	36%, 1e-89

**Abbildung 67:** Auswahl der besten BLASTp-Treffer für ANL\_AmbG und deren Identität zu AmbG (Teil 1). PRK05850 = acyl-CoA synthetase; seco\_metab\_LLM = luciferase-like monooxygenase domain; PRK07769 = long-chain-fatty-acid-CoA ligase; SmtA = SAM-dependent methyltransferase; CaiC = Acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II; PRK12827 = short chain dehydrogenase; AAT\_I = Aspartate aminotransferase superfamily (fold type I) of pyridoxal phosphate-dependent enzymes; MhpC = Pimeloyl-ACP methyl ester carboxylesterase; AFD\_classI = adenylate forming domain, class I superfamily.

AGH69810.1	non-ribosomal peptide synthase [ <i>Nostoc</i> sp. ' <i>Peltigera membranacea</i> cyanobiont']	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → SmtA → AFD_classI → PP	36%, 3e-90
KIF37514.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Hassallia byssoidea</i> VB512170]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C	36%, 4e-96
WP_066383290.1	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Anabaena</i> sp. CA = ATCC 33047]	FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	36%, 4e-89
KUJ79069	beta-ketoacyl synthase [ <i>Tolypothrix campylonemoides</i> VB511288]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT → KR_2_FAS_SDR_x → FabG → PKS_PP	35%, 8e-91
WP_069166750.1	hypothetical protein [ <i>Nocardia altamirensis</i> ]	Lone standing FAAL/CaiC	35%, 4e-89
OKH14707	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Fischerella major</i> NIES-592]	FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS	35%, 2e-95
WP_066426846	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Anabaena</i> sp. 4-3]	FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS	35%, 5e-89
WP_048868480	type I polyketide synthase [ <i>Scytonema tolypothrichoides</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT → KR_2_FAS_SDR_x → PRK12827 → PKS_PP	35%, 5e-90
WP_012409516.1	hybrid non-ribosomal peptide synthetase/type I polyketide synthase [ <i>Nostoc punctiforme</i> ]	FAAL/PRK07769 → seco_metab_LLM → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT → PP → AAT_I → 2x (C → A_NRPS → PP) → C	35%, 1e-89
ADN17715	AMP-dependent synthetase and ligase (plasmid) [ <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822]	Lone standing PRK05850/FAAL	35%, 5e-100
KOP26733.1	amino acid adenylation protein [ <i>Hapalosiphon</i> sp. MRB220]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	35%, 6e-90
EHC14792.1	amino acid adenylation domain protein [ <i>Fischerella</i> sp. JSC-11]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	35%, 4e-94
KIE11755.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Tolypothrix bouteillei</i> VB521301]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	35%, 4e-96
KIF37331	beta-ketoacyl synthase [ <i>Hassallia byssoidea</i> VB512170]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT	35%, 4e-91
WP_015145342	polyketide synthase [ <i>Pleurocapsa minor</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT → KR_2_FAS_SDR_x → PKS_PP → Sulfotransfer_1 → Abhydrolase_1/Abhydrolase_5	35%, 2e-89
WP_052490322.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Tolypothrix campylonemoides</i> ]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → EntF	35%, 3e-89
WP_045198196.1	hypothetical protein [ <i>Pseudomonas</i> sp. 2(2015)]	Lone standing FAAL/PRK07769	35%, 3e-89
CCQ54060.1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase [ <i>Crocospaera watsonii</i> WH 0005]	Lone standing PRK05850/FAAL	35%, 2e-97
AFZ23801	amino acid adenylation enzyme/thioester reductase family protein [ <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417]	FAAL/PRK07769 → PP → C → A_NRPS → PP	35%, 2e-91
AKJ00840.1	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase [ <i>Archangium gephyra</i> ]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	35%, 2e-91
OKH55355.1	hypothetical protein NIES2130_26900 [ <i>Scytonema</i> sp. HK-05]	FAAL/CaiC → CaiA → PP → KBL_like	35%, 1e-89
ACK73822.1	amino acid adenylation domain protein (plasmid) [ <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → C → A_NRPS → SmtA → AFD_classI → PP → C → CAS_like	35%, 3e-89

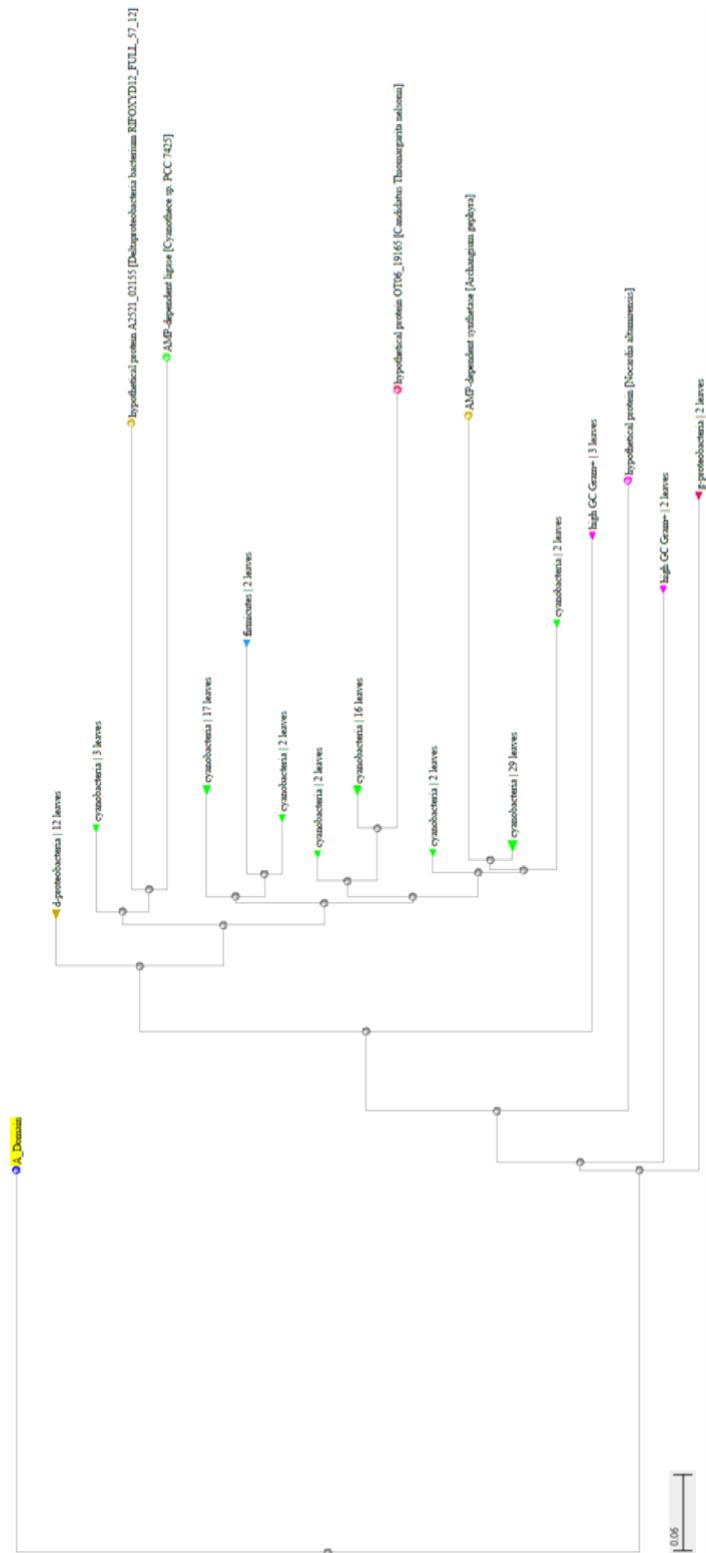
**Abbildung 68:** Auswahl der besten BLASTp-Treffer für ANL\_AmbG, deren Domänenarchitektur und Identität zu AmbG (Teil 2). PRK05850 = acyl-CoA synthetase; seco\_metab\_LLM = luciferase-like monooxygenase domain; PRK07769 = long-chain-fatty-acid-CoA ligase; SmtA = SAM-dependent methyltransferase; CaiC = Acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II; PRK12827 = short chain dehydrogenase; CAS\_like = Clavaminic acid synthetase-like; AFD\_classI = adenylate forming domain, class I superfamily.

CCQ64803	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase [ <i>Crocospaera watsonii</i> WH 0402]	Lone standing PRK05850/FAAL	35%, 1e-96
WP_019509160.1	type I polyketide synthase [ <i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → PKS_AT → KR_2_FAS_SDR_x → PP → Sulfotransfer_1 → MhpC/Abhydrolase	35%, 3e-90
SHN27194	Acyl transferase domain-containing protein, partial [ <i>Mucilaginibacter</i> sp. OK098]	FAAL/CaiC → PKS_PP → PKS_KS → PKS_AT → KR_2_FAS_SDR_x → PKS_PP → PKS_KS	35%, 7e-93
WP_026736727.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Fischerella</i> sp. PCC 9605]	Lone standing PRK05850/FAAL	35%, 6e-92
KU84553	AMP-dependent synthetase [ <i>Scytonema</i> <i>tolypothrichoides</i> VB-61278]	Lone standing PRK05850/FAAL	35%, 1e-95
EAZ89250.1	Beta-ketoacyl synthase [ <i>Cyanothece</i> sp. CCY0110]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 7e-93
ACV02552.1	AMP-dependent synthetase and ligase [ <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802]	PRK05850/FAAL → PP	34%, 1e-93
KYC35297.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Scytonema</i> <i>hofmannii</i> PCC 7110]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	34%, 3e-93
KU84021	AMP-dependent synthetase [ <i>Scytonema</i> <i>tolypothrichoides</i> VB-61278]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	34%, 4e-92
WP_016876567.1	hypothetical protein [ <i>Chlorogloeopsis</i> <i>fritschii</i> ]	PRK05850/FAAL → PP	34%, 7e-99
ACK67647	AMP-dependent synthetase and ligase [ <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801]	PRK05850/FAAL → PP	34%, 1e-92
KOP27297	AMP-dependent synthetase [ <i>Hapalosiphon</i> sp. MRB220]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	34%, 1e-89
CUR29756.1	Putative AMP-dependant acyl-CoA synthetase, involved in microginin biosynthesis [ <i>Planktothrix rubescens</i> ]	Lone standing FAAL/CaiC	34%, 5e-95
WP_016862272.1	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Fischerella muscicola</i> ]	FAAL/PRK07769 → PKS_PP → C → A_NRPS → PP	34%, 1e-92
AFY75734.1	acyl-CoA synthetase (AMP- forming)/AMP-acid ligase II [ <i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327]	Lone standing FAAL/PRK07769	34%, 3e-92
WP_019489576	hypothetical protein [ <i>Calothrix</i> sp. PCC 7103]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 2e-94
WP_016949104.1	hypothetical protein [ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7108]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 5e-59
AKQ09578	CoIA [ <i>Moorea bouillonii</i> PNG5-198]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 3e-92
KYC42745	AMP-dependent synthetase [ <i>Scytonema</i> <i>hofmannii</i> PCC 7110]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	34%, 4e-92
OKH21105.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Hydrococcus rivularis</i> NIES-593]	Lone standing FAAL/CaiC	34%, 2e-92
ELP53462.1	AMP-binding enzyme family protein [ <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98]	PRK05850/FAAL → PP	34%, 7e-94
OKH26447.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Chroogloeocystis siderophila</i> 5.2 s.c.1]	Lone standing FAAL/CaiC	34%, 4e-93
EGO65795.1	amino acid adenylation domain- containing protein [ <i>Acetonema longum</i> DSM 6540]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 1e-95
WP_016951645.1	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Anabaena</i> sp. PCC 7108]	PRK05850/FAAL → PKS_PP → 2x (C → A_NRPS → PP)	34%, 1e-92
CCI38261.1	Putative fatty-acid-CoA ligase (Acyl- CoA synthetase) [ <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 2e-92

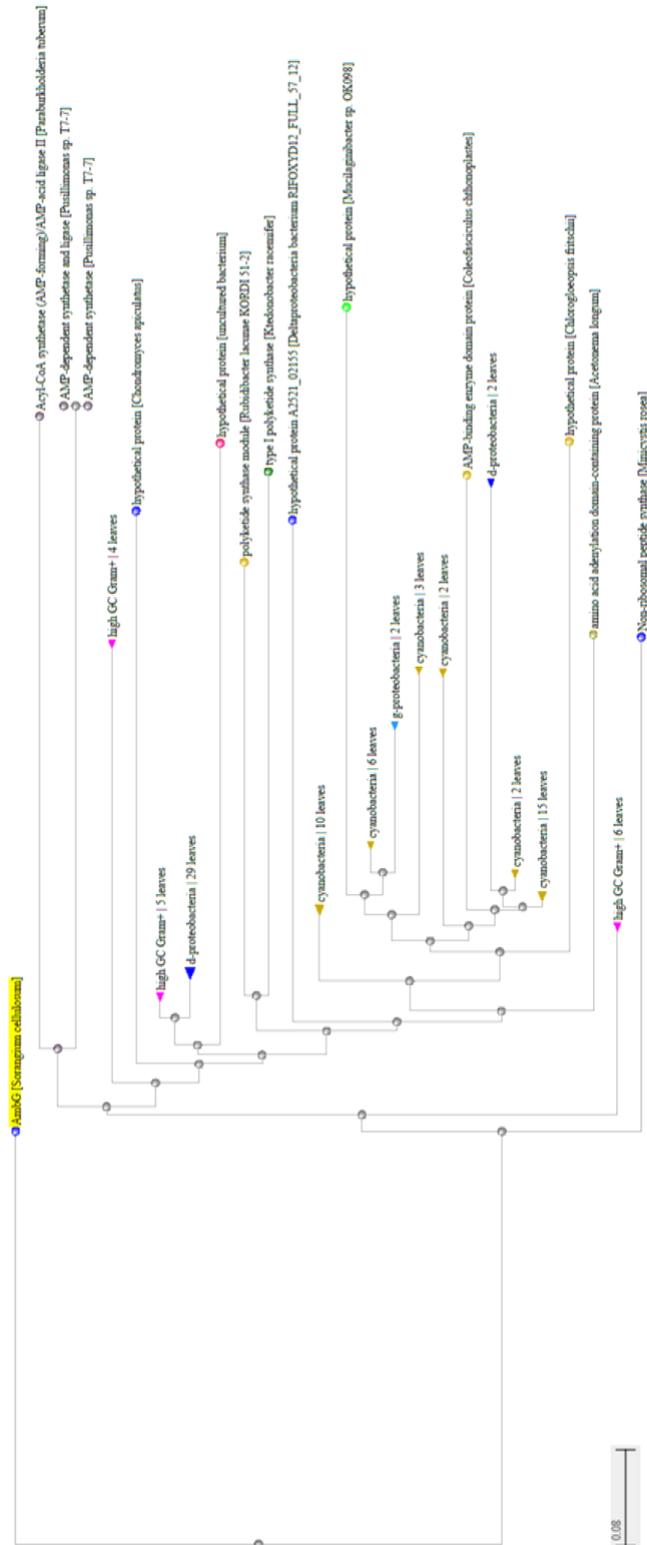
**Abbildung 69:** Auswahl der besten BLASTp-Treffer für ANL\_AmbG, deren Domänenarchitektur und Identität zu AmbG (Teil 3). PRK05850 = acyl-CoA synthetase; PRK07769 = long-chain-fatty-acid-CoA ligase; CaiC = Acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II.

EDX72645.1	AMP-binding enzyme domain protein [ <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> PCC 7420]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	34%, 1e-95
AMB48444.1	long-chain-fatty-acid--CoA ligase [ <i>Nostoc</i> sp. CAVN2] "CabA"	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 1e-97
AFV96135.1	AMP-dependent synthetase/ligase [ <i>Cylindrospermum licheniforme</i> UTEX B 2014]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 9e-96
AW82280.1	PuwC [ <i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 988]	Lone standing PRK05850/FAAL	34%, 4e-89
WP_024968817.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Microcystis aeruginosa</i> ]	Lone standing FAAL/PRK07769	34%, 2e-90
KJH69463.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Alliterella atlantica</i> CENA595]	Lone standing PRK05850/FAAL	33%, 6 e-90
ODV36714	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase [ <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-98]	Lone standing FAAL/CaiC	33%, 1e-90
ELP56809	AMP-binding enzyme family protein [ <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98]	Lone standing FAAL/PRK07769	33%, 2e-90
CCI09464.1	Putative fatty-acid--CoA ligase (Acyl-CoA synthetase) [ <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7941]	Lone standing FAAL/PRK07769	33%, 4e-90
AKL71641	NokJ [ <i>Nostoc</i> sp. CCAP 1453/38]	Lone standing FAAL/CaiC	33%, 8e-93
AFZ24148	acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II [ <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417]	Lone standing PRK05850/FAAL	33%, 6e-95
AHH34188.1	fatty acyl ACP ligase [ <i>Moorea producens</i> JHB]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	33%, 9e-91
AOW99347.1	AMP-dependent synthetase [ <i>Moorea producens</i> PAL-8-15-08-1]	FAAL/CaiC → PKS_PP	33%, 9e-91
WP_044493475	AMP-binding protein [ <i>Moorea producens</i> ]	Lone standing PRK05850/FAAL	33%, 1e-89
EGJ32276.1	AMP-forming acyl-CoA synthetase [ <i>Moorea producens</i> 3L]	Lone standing PRK05850/FAAL	33%, 2e-89
EGJ35087.1	AMP-forming acyl-CoA synthetase [ <i>Moorea producens</i> 3L]	PRK05850/FAAL → PKS_PP	33%, 3e-91
AJQ29986.1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase [ <i>Pelosinus fermentans</i> JBW45]	Lone standing PRK05850/FAAL	33%, 8e-92
WP_019504308.1	hypothetical protein [ <i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319]	Lone standing PRK05850/FAAL	32%, 1e-90
AFZ28242.1	acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II (plasmid) [ <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417]	Lone standing PRK05850/FAAL	32%, 4e-93

**Abbildung 70:** Auswahl der besten BLASTp-Treffer für ANL\_AmbG, deren Domänenarchitektur und Identität zu AmbG (Teil 4). PRK05850 = acyl-CoA synthetase; PRK07769 = long-chain-fatty-acid-CoA ligase; CaiC = Acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II; AFD\_classI = adenylate forming domain, class I superfamily.

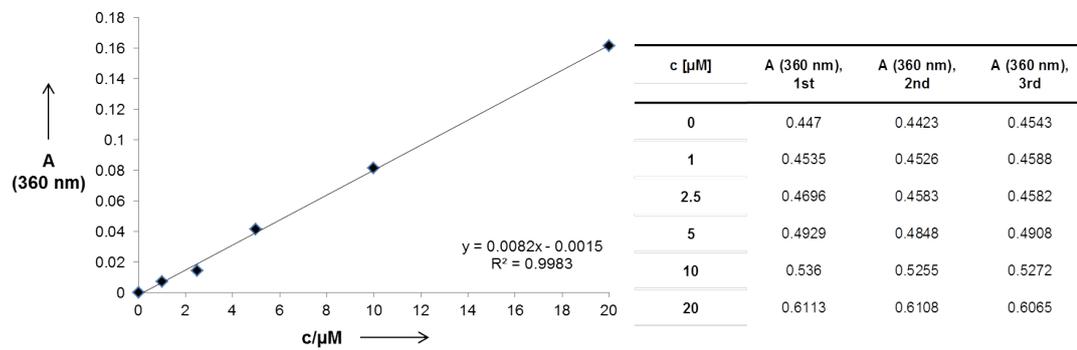


**Abbildung 71:** Phylogenetische Analyse der ANL-Domäne von AmbG gegen ein Set der 99 besten Homologe der BLASTp-Analyse. Die Domäne wird als *Outgroup* (gelb) platziert.



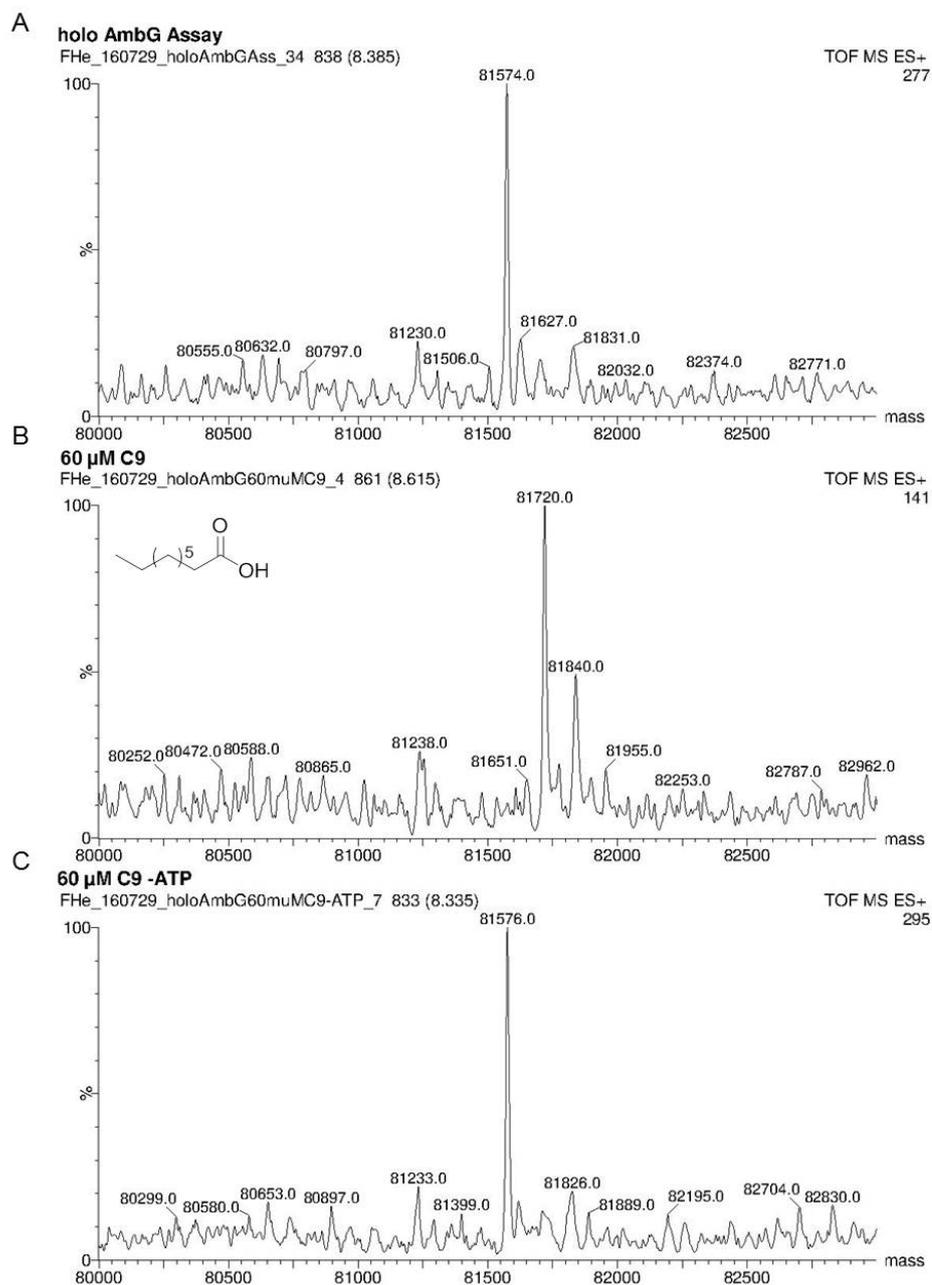
**Abbildung 72:** Phylogenetische Analyse von AmbG gegen ein Set der 99 besten Homologe der BLASTp-Analyse. Die Didomäne wird als *Outgroup* (gelb) platziert.

## 6.0.7 Standardreihe für den Pyrophosphat-Nachweis

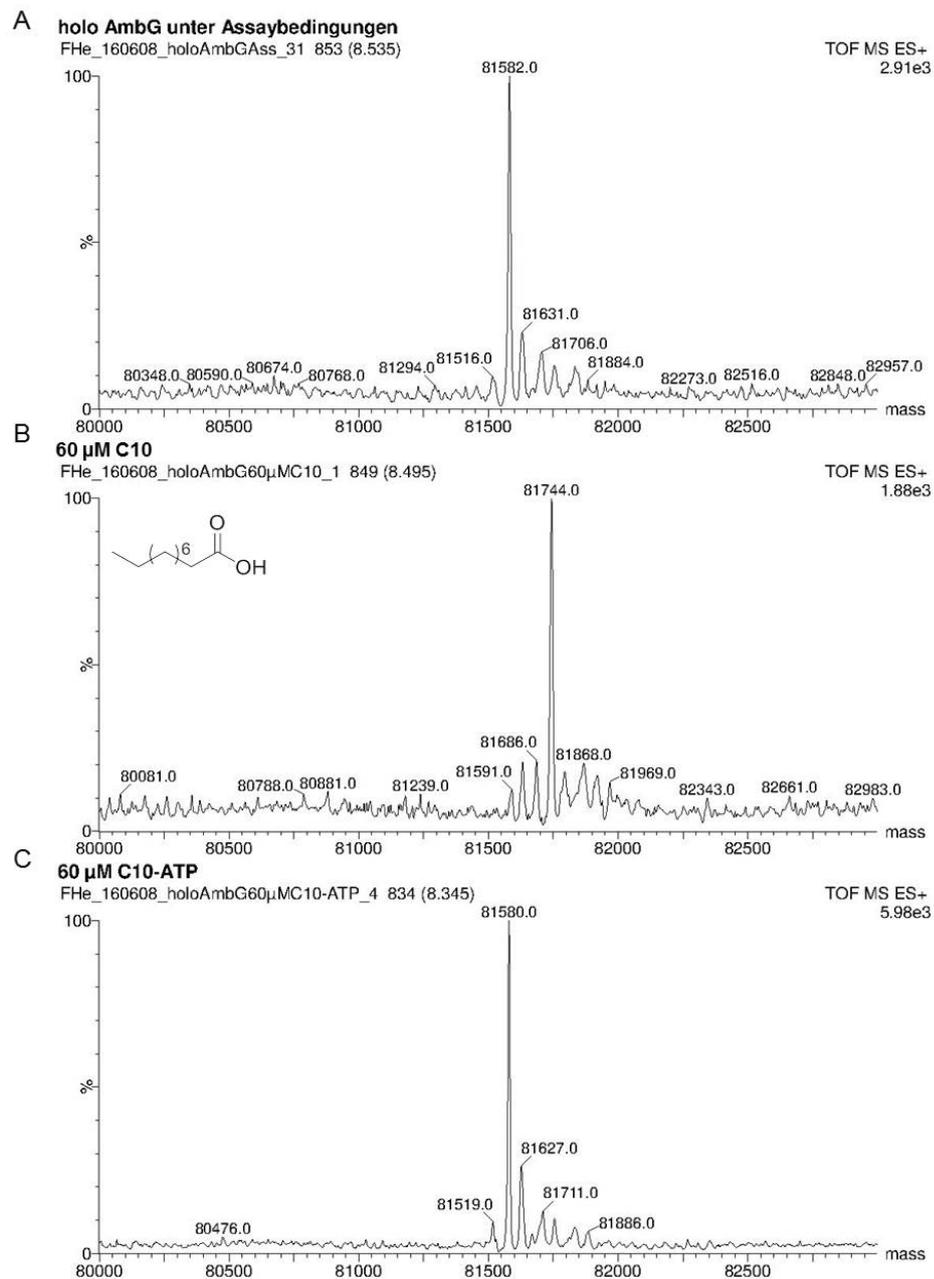


**Abbildung 73:** Standardreihe für den Pyrophosphat-Nachweis mit dem EnzChek Pyrophosphate Assay Kit E 6645 (*Molecular Probes*). Der Nullwert wurde jeweils von den anderen Messwerten subtrahiert.

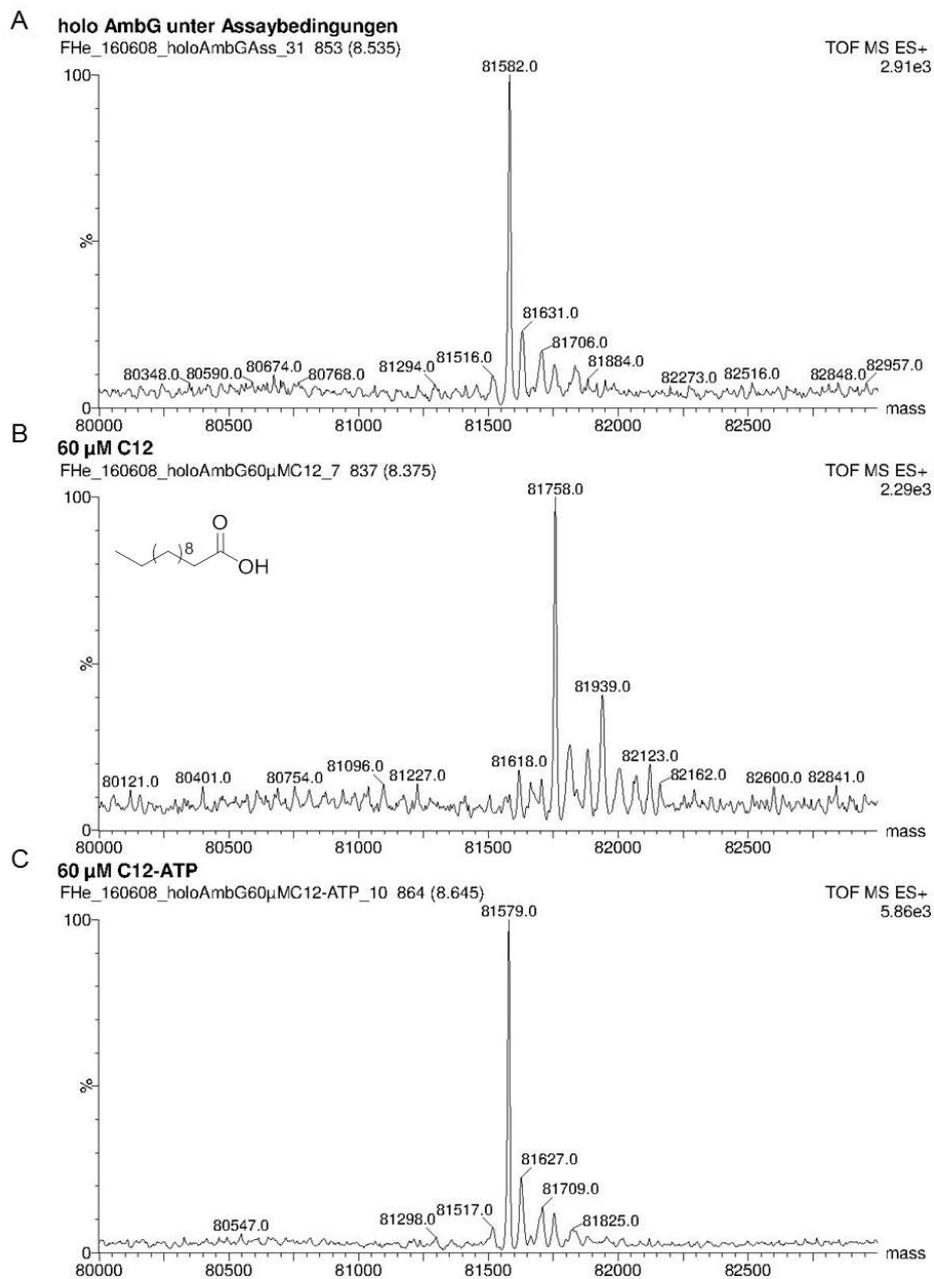
## 6.0.8 LCMS-Analyse



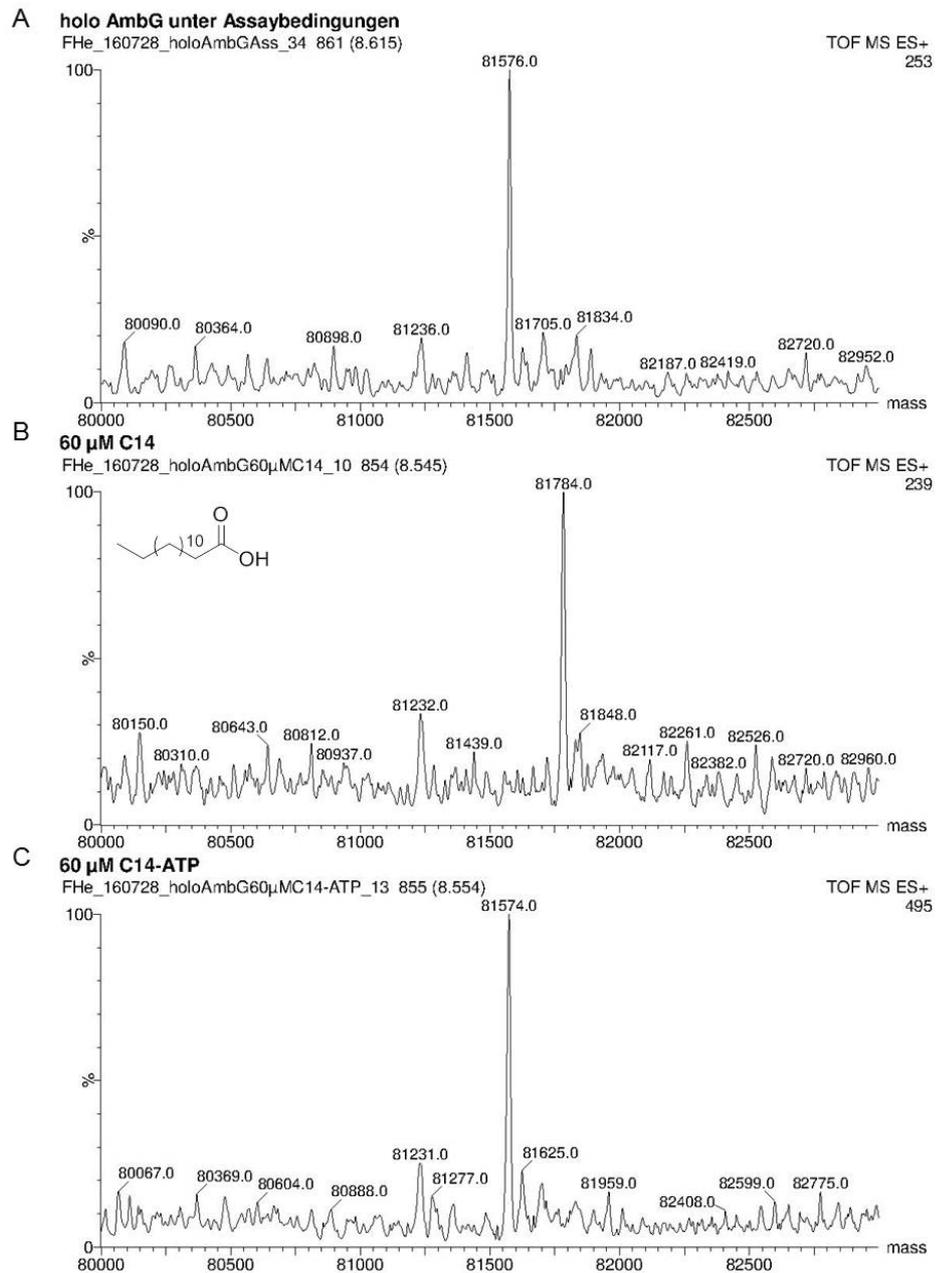
**Abbildung 74:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60 μM Nonansäure (**160**, 158 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.574 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **160** führt zur vollständigen Acylierung (81.720 kDa, 73 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60 μM **160** nicht acyliert.



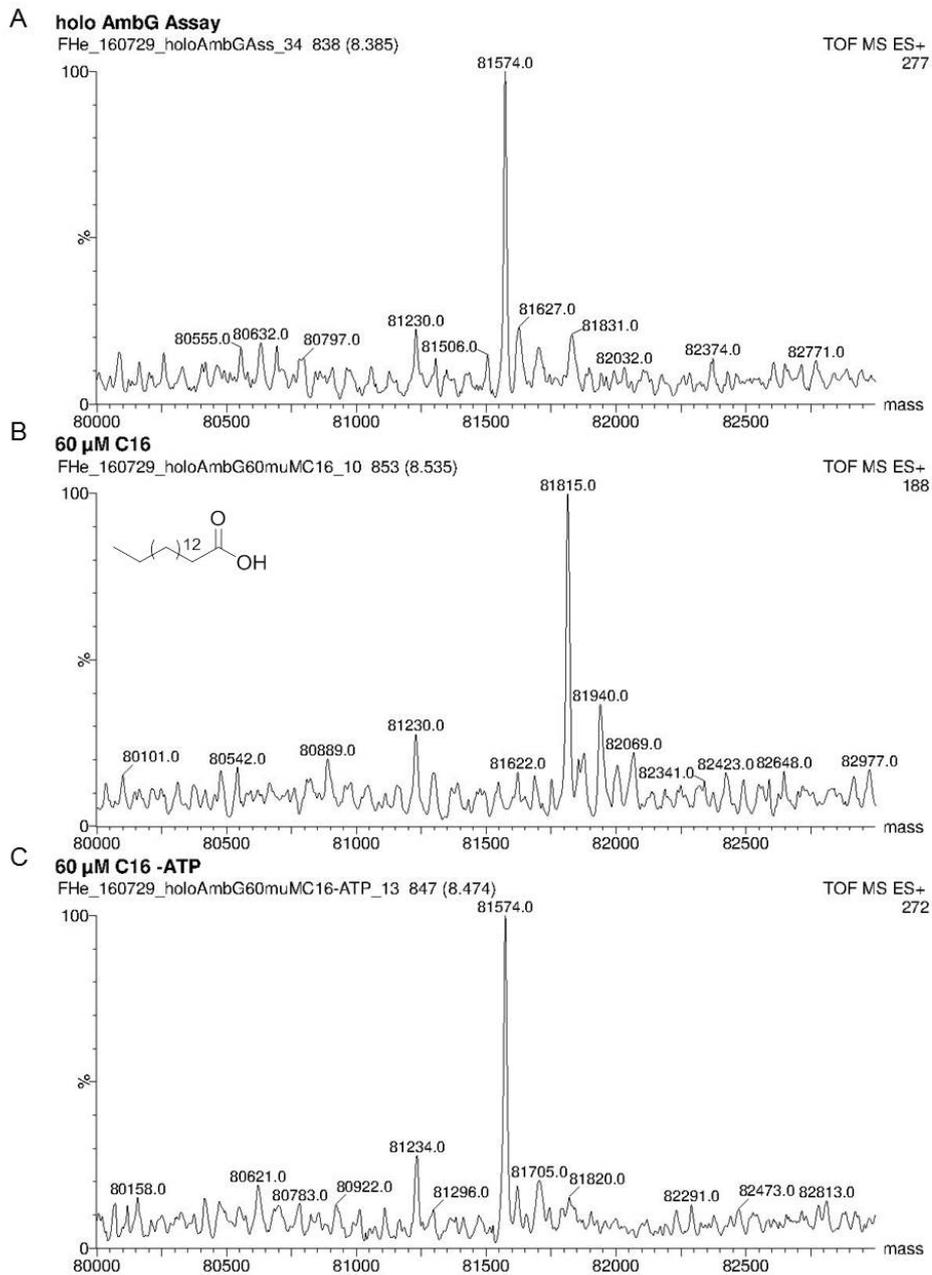
**Abbildung 75:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.582 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** führt zur vollständigen Acylierung (81.744 kDa, 98 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **134** nicht acyliert.



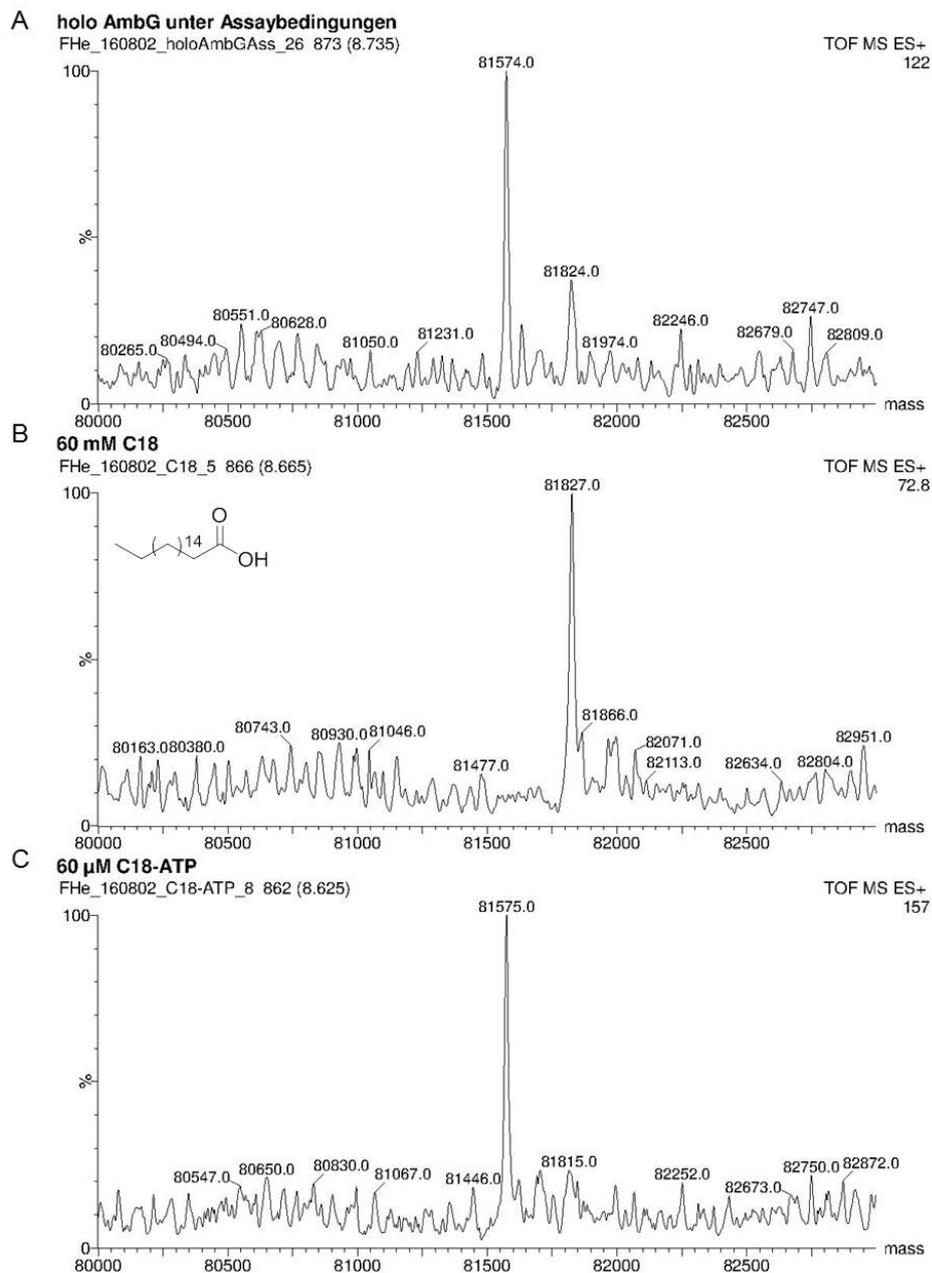
**Abbildung 76:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Dodecansäure (**135**, 200 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.582 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **135** führt zur vollständigen Acylierung (81.758 kDa, 73 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **135** nicht acyliert.



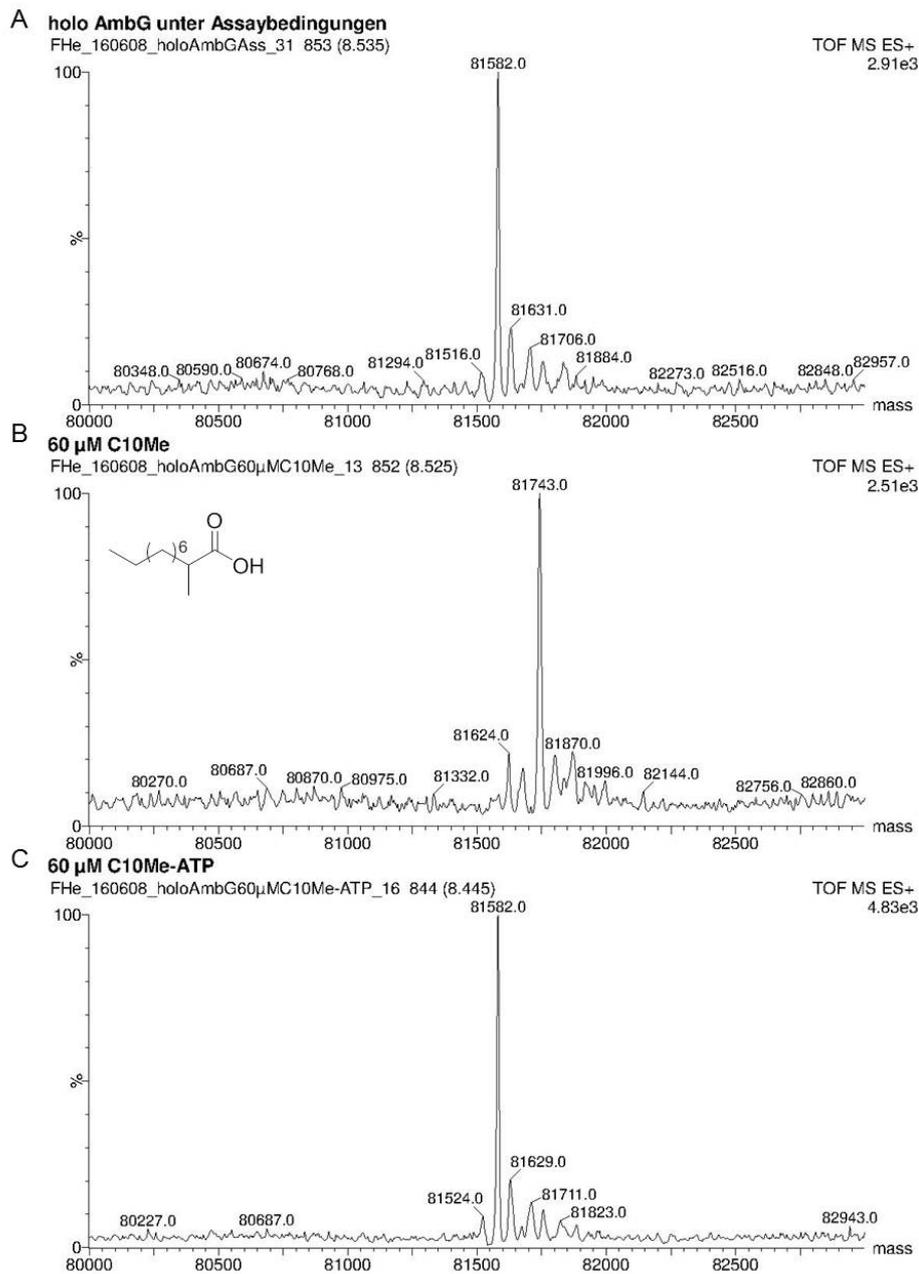
**Abbildung 77:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Tetradecansäure (**161**, 228 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.576 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **161** führt zur vollständigen Acylierung (81.784 kDa, 24 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **161** nicht acyliert.



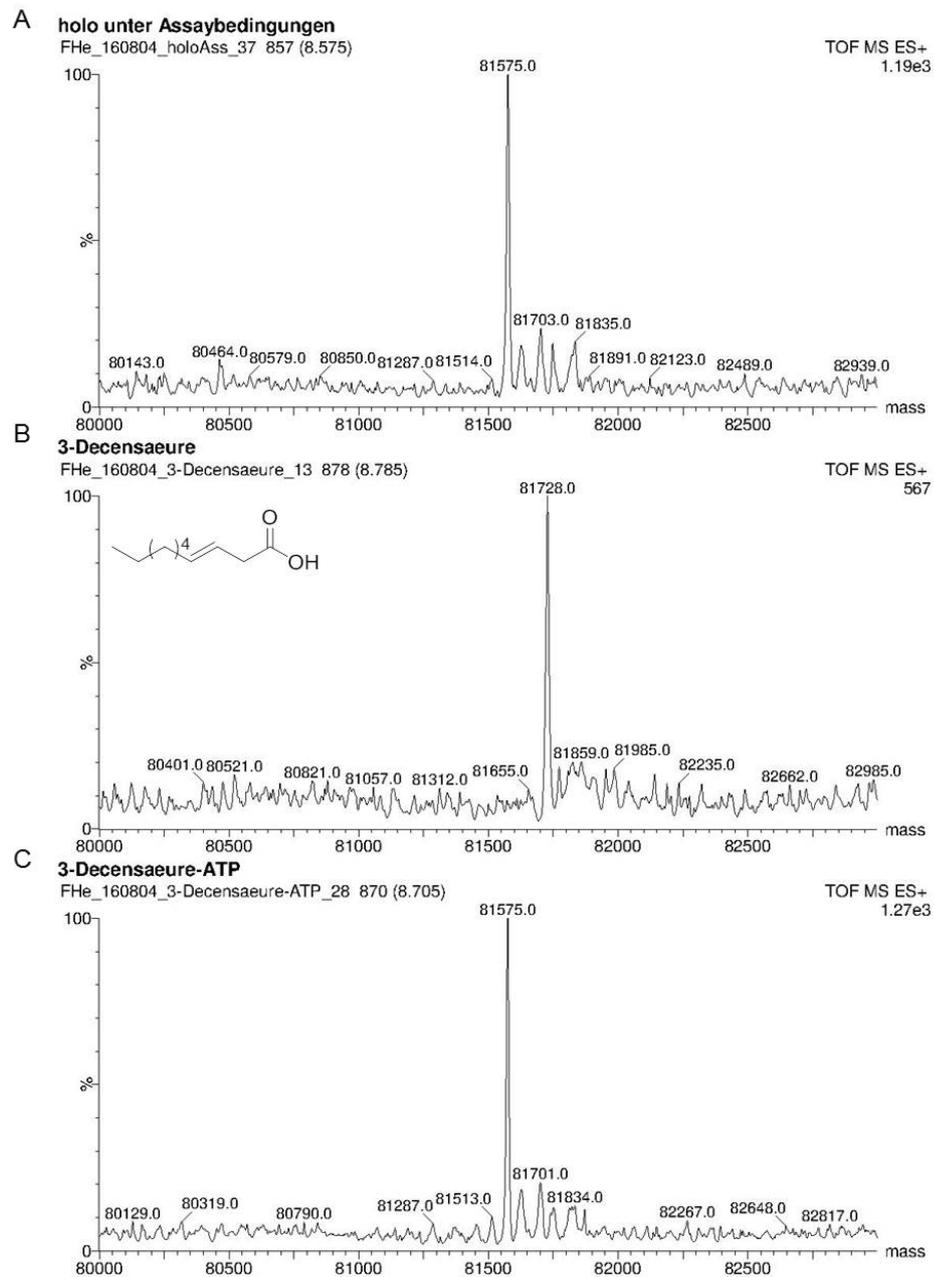
**Abbildung 78:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Hexadecansäure (**162**, 256 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.574 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **162** führt zur vollständigen Acylierung (81.815 kDa, 36 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **162** nicht acyliert.



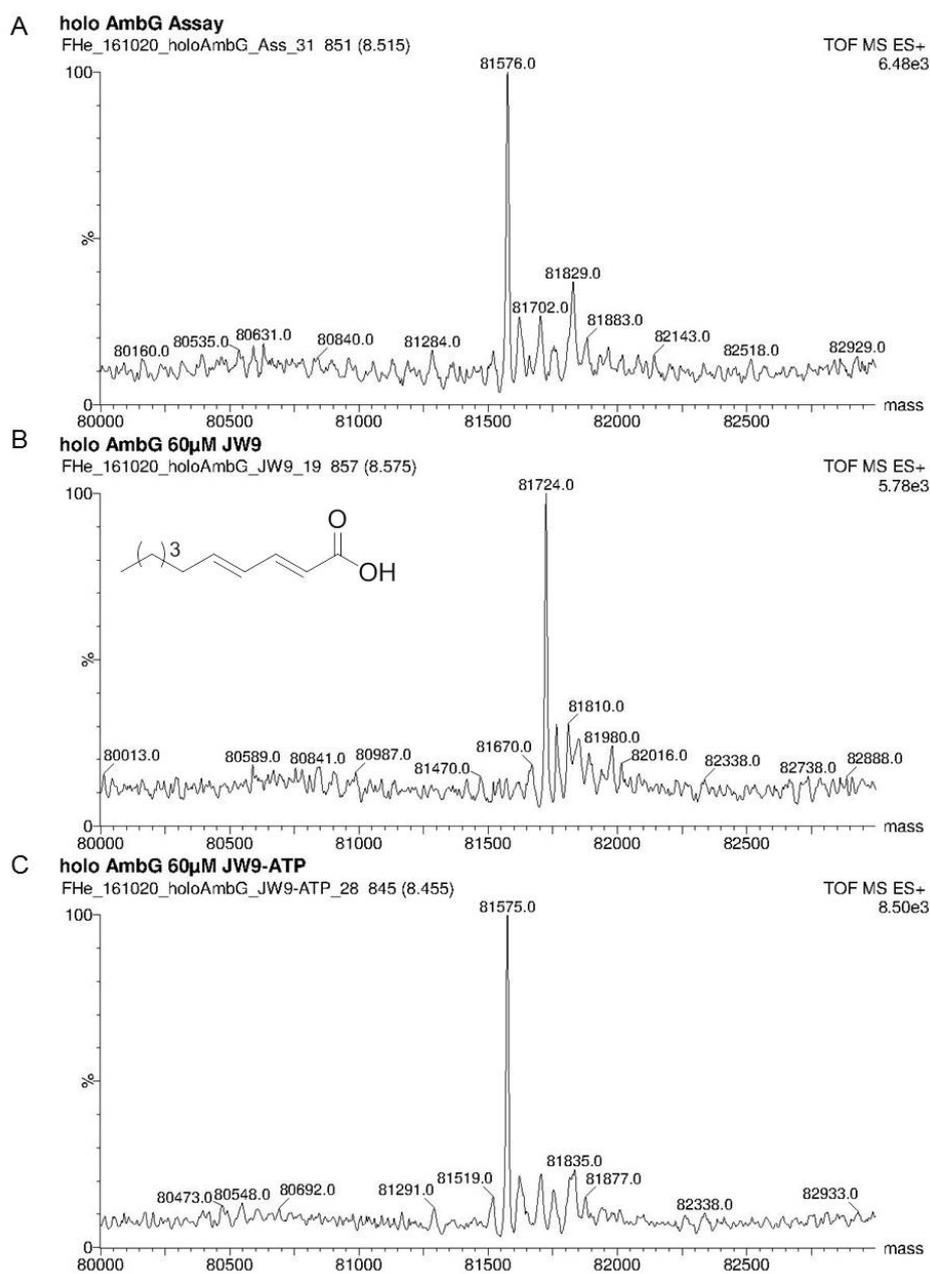
**Abbildung 79:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  Octadecansäure (**163**, 284 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.574 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **163** führt zur vollständigen Acylierung (81.827 kDa, 159 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **163** nicht acyliert.



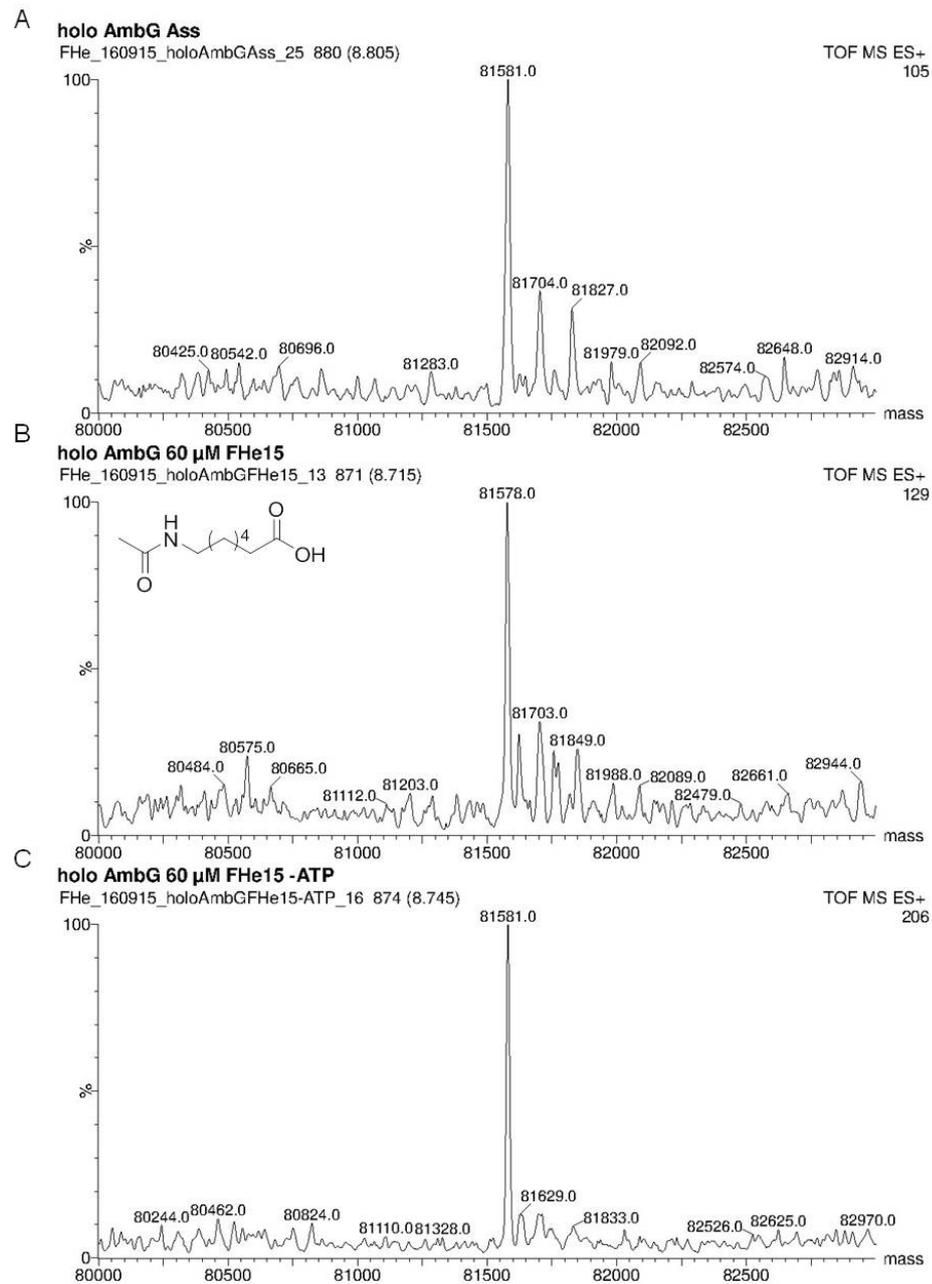
**Abbildung 80:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 2-Methyldekansäure (**167**, 186 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.582 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **167** führt zur vollständigen Acylierung (81.743 kDa, 86 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **167** nicht acyliert.



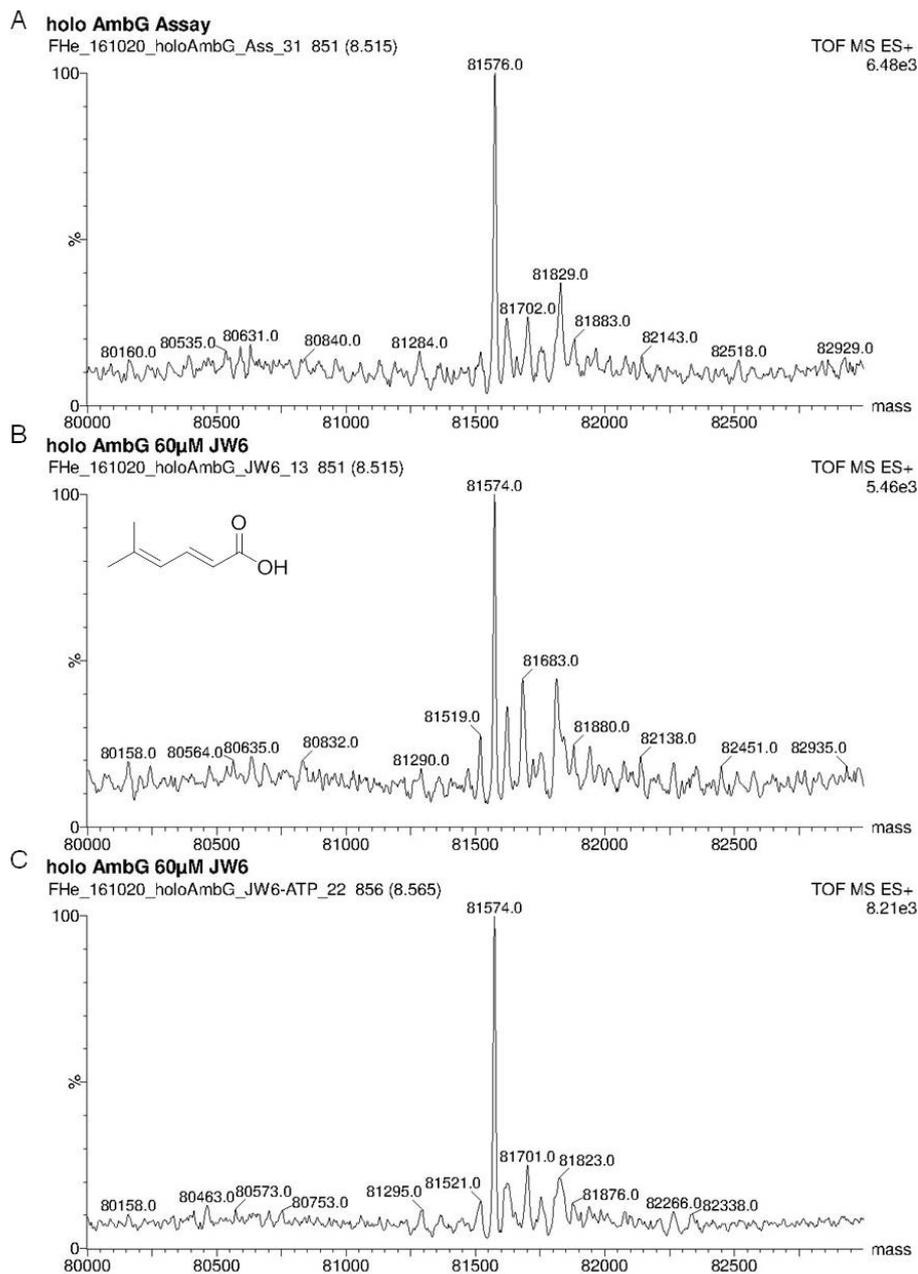
**Abbildung 81:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  (3*E*)-Decensäure (174, 170 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.575 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  174 führt zur vollständigen Acylierung (81.728 kDa, 12 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  174 nicht acyliert.



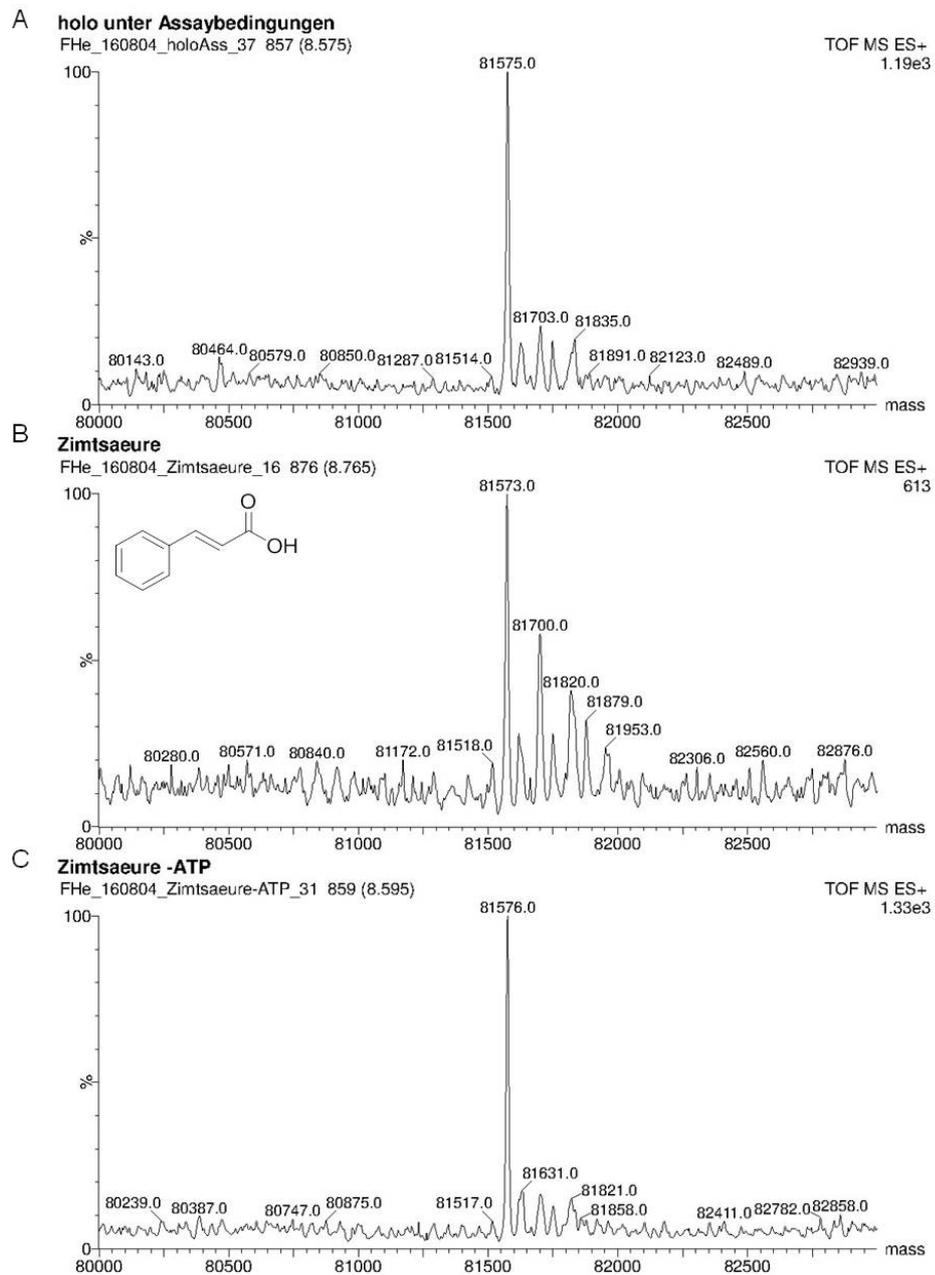
**Abbildung 82:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60 µM (2*E*,4*E*)-Deca-2,4-diensäure (**175**, 168 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.576 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 µM **175** führt zur vollständigen Acylierung (81.724 kDa, 24 ppm). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60 µM **175** nicht acyliert.



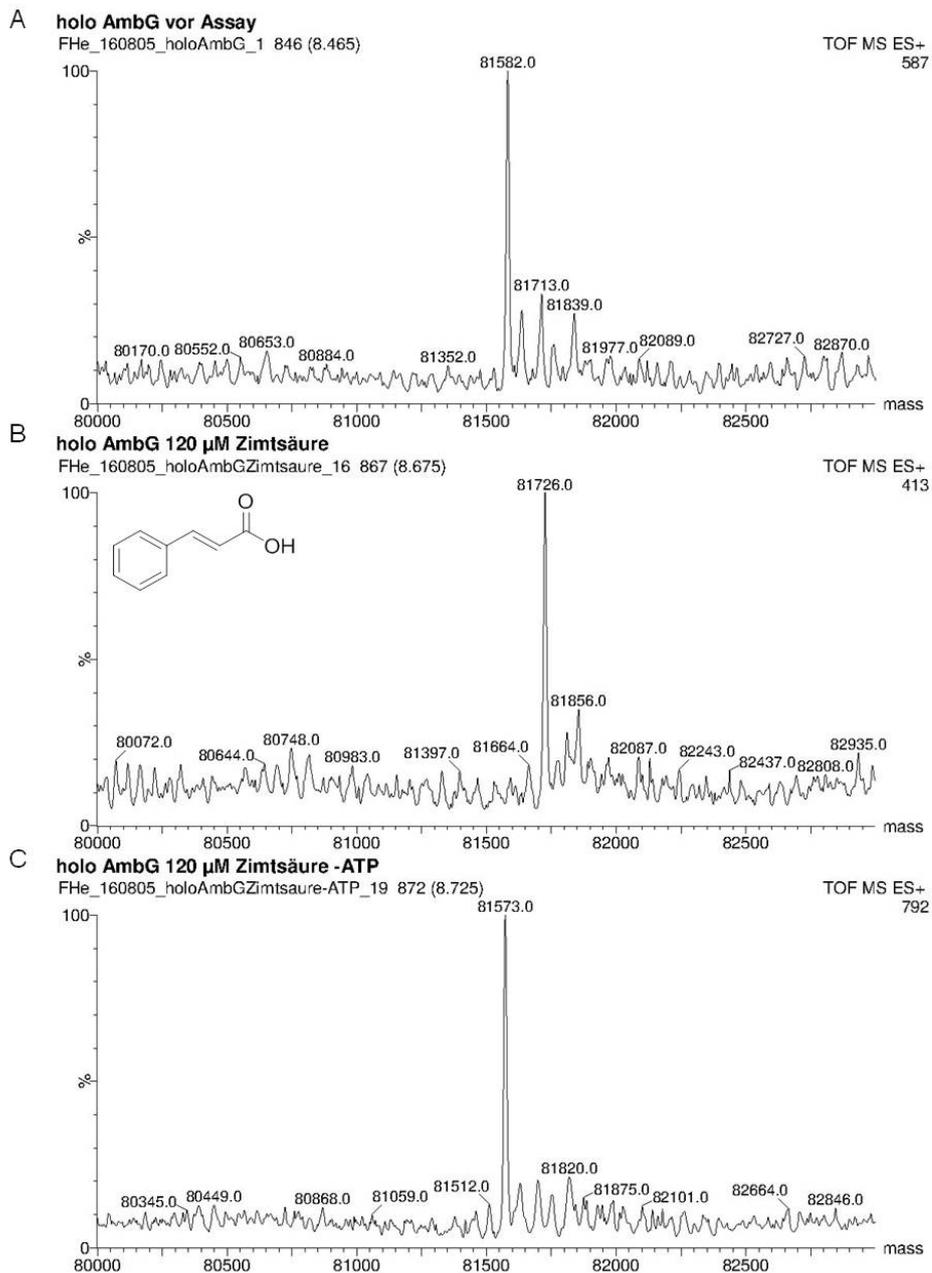
**Abbildung 83:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  7-Acetamidoheptansäure (**146**, 187 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.581 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **146** unter Testbedingungen. Der nicht-annotierte Peak bei ca. 81.570 kDa repräsentiert evtl. das Produkt einer marginalen Umsetzung. C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **146** nicht acyliert.



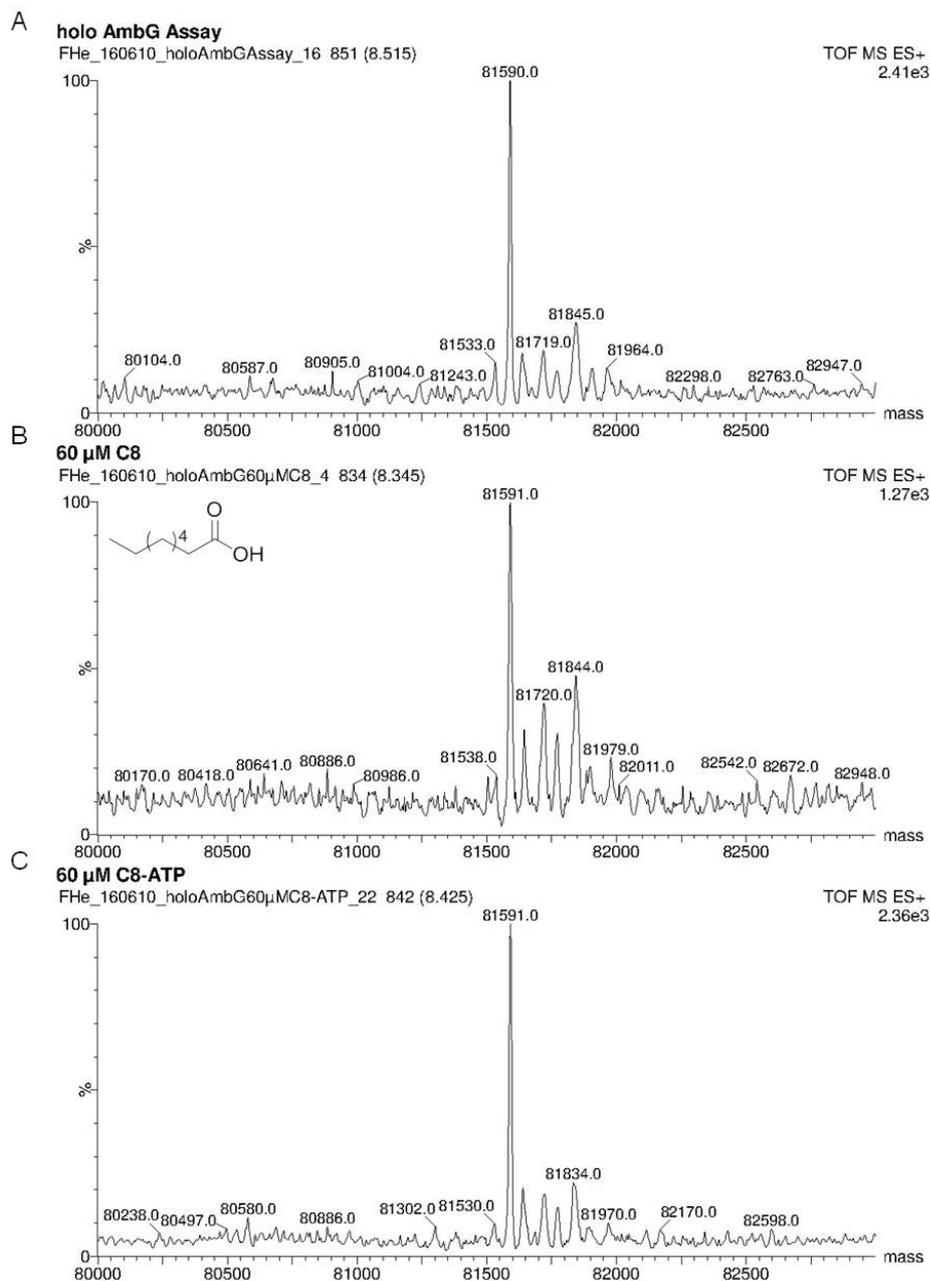
**Abbildung 84:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  (*E*)-5-Methylhexa-2,4-diensäure (**171**, 126 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.576 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **171** unter Testbedingungen. Der Peak bei 81.683 kDa repräsentiert das Produkt einer geringfügigen Acylierung (81.683 kDa, 12 ppm, <50%\*). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **171** nicht acyliert. \*Normalisierte Signalintensität



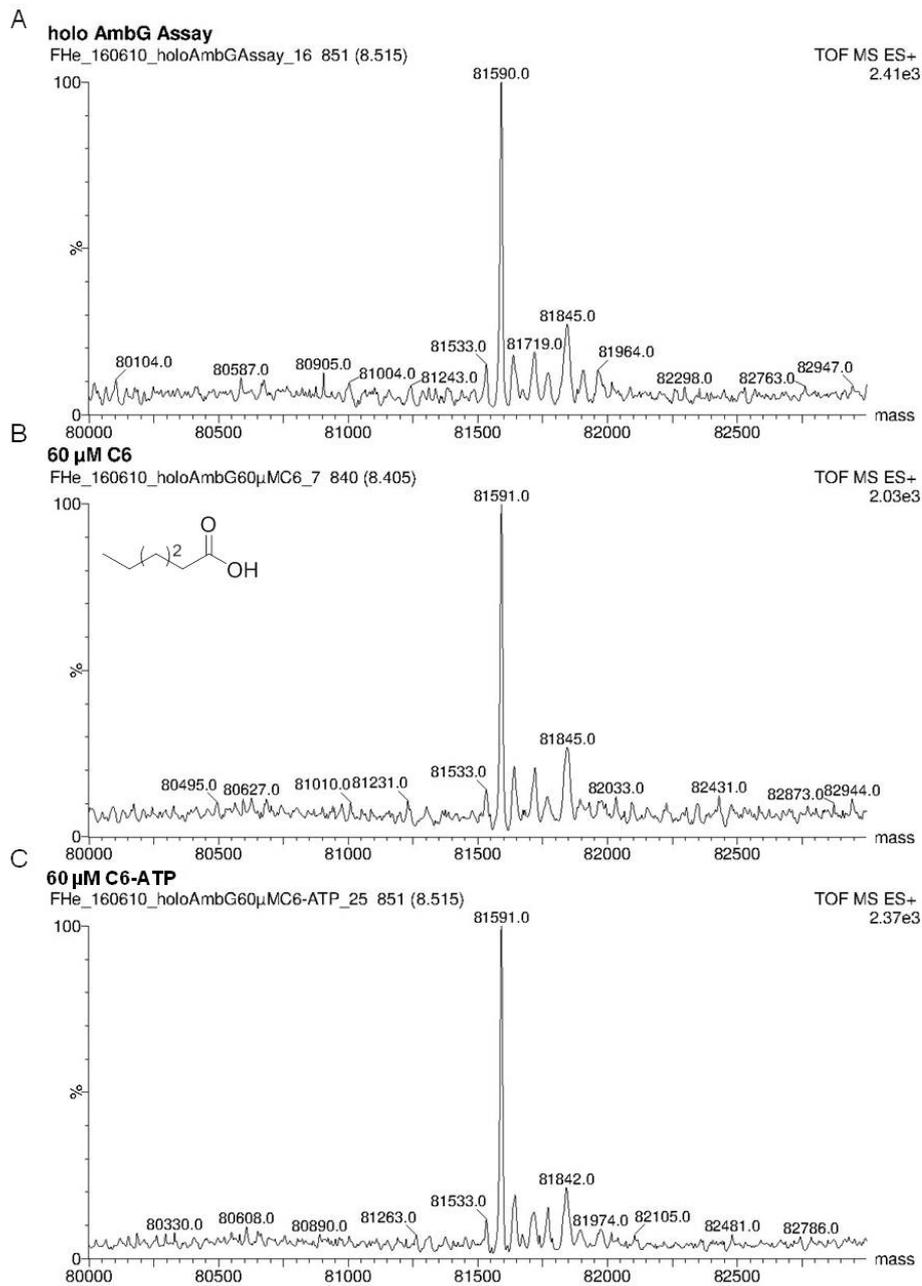
**Abbildung 85:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  Zimtsäure (**178**, 148 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.575 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **178** unter Testbedingungen. Der Peak bei 81.700 kDa repräsentiert evtl. das Produkt einer geringfügigen Acylierung (81.700 kDa, 61 ppm, <50%\*). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **178** nicht acyliert. \*Normalisierte Signalintensität



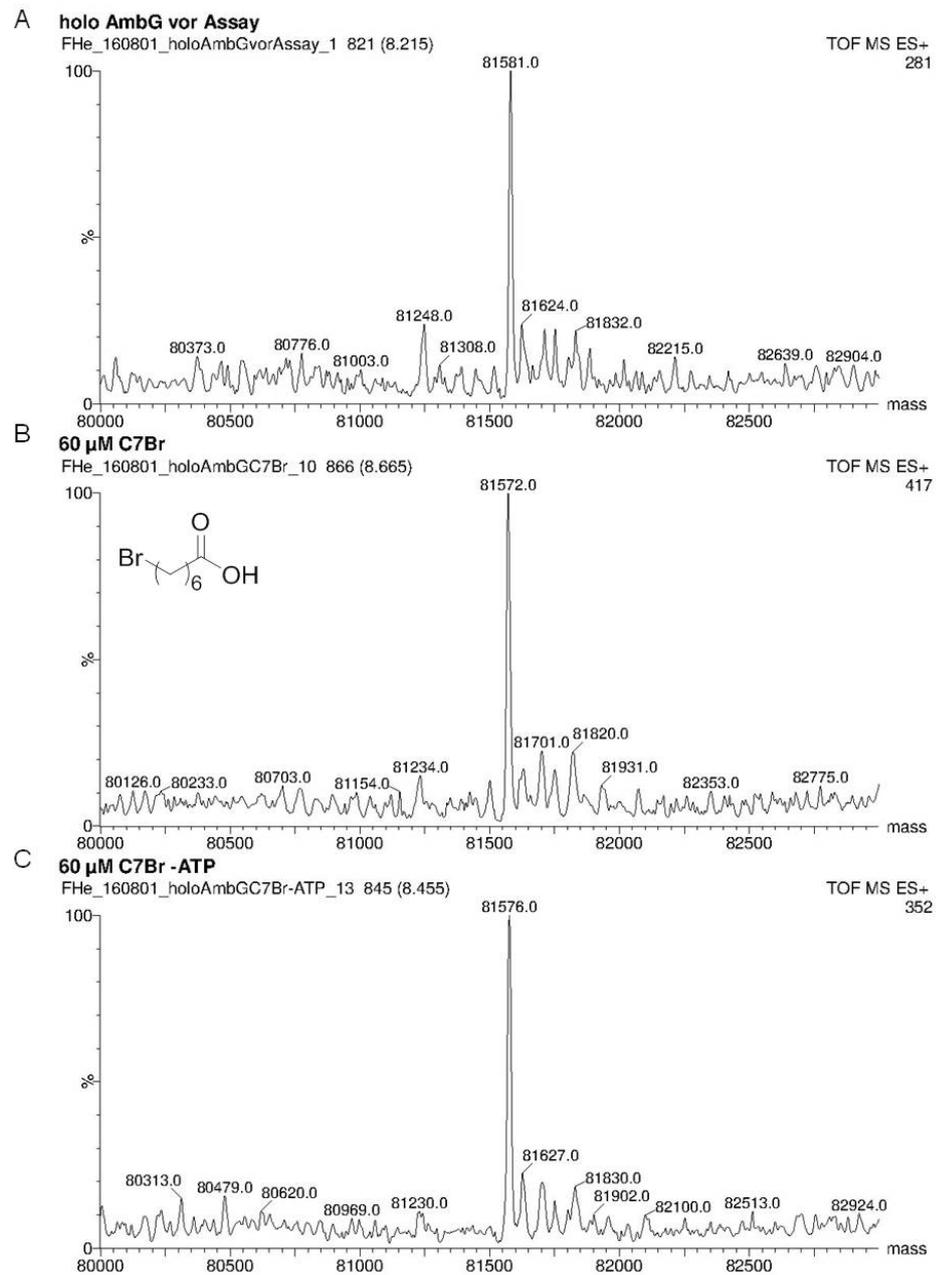
**Abbildung 86:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 120  $\mu$ M Zimtsäure (**178**, 148 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.582 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 120  $\mu$ M **178** unter Testbedingungen führt zu einer vollständigen Acylierung ( $[M+Na]^+ = 81.726$  kDa, 110 ppm). Dies suggeriert, dass es sich beim korrespondierenden Signal bei 81.700 kDa in Abb. 85 um acyliertes *holo*-AmbG handelt. C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 120  $\mu$ M **178** nicht acyliert.



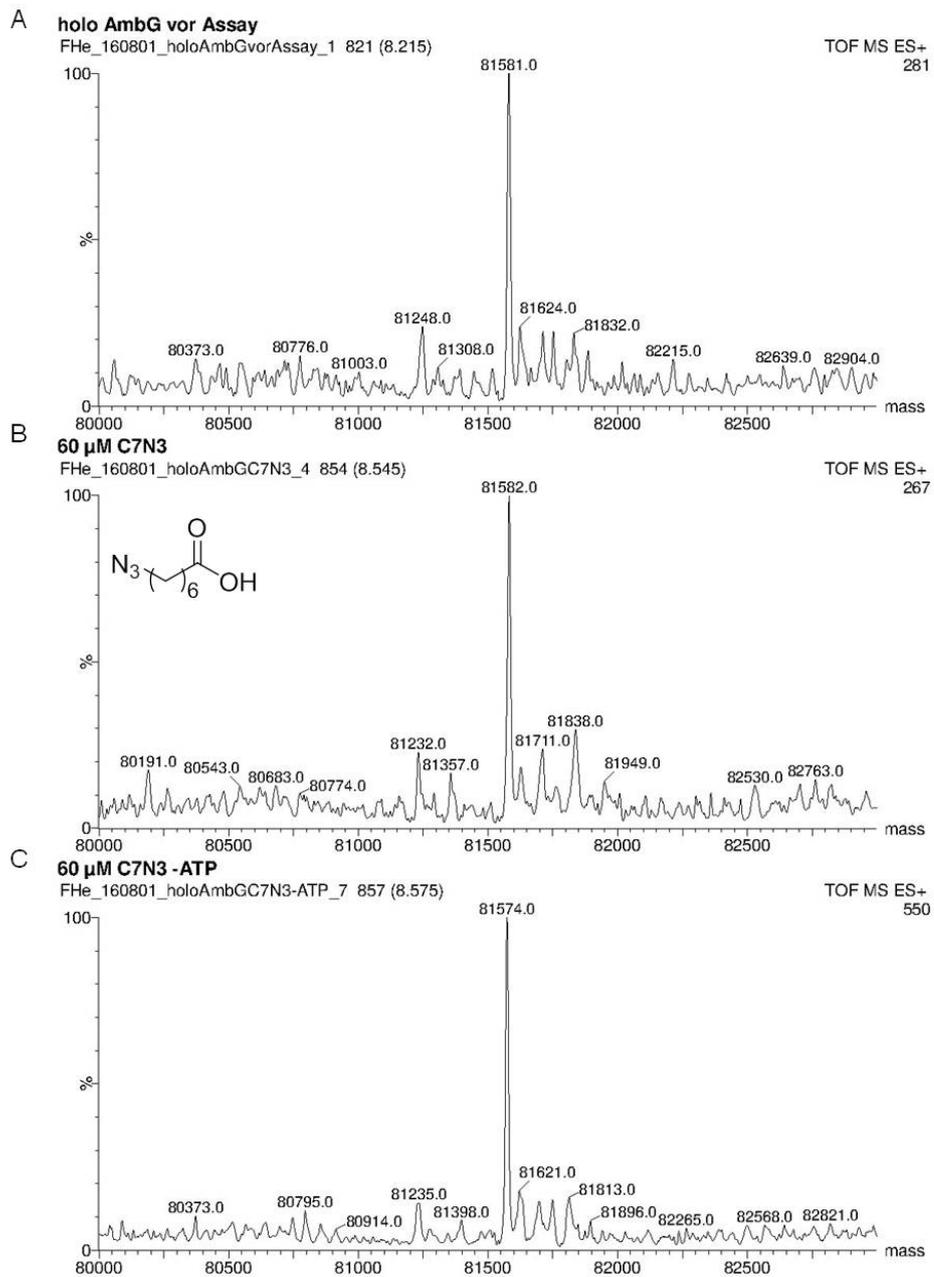
**Abbildung 87:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  Octansäure (**159**, 144 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.590 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **159** unter Testbedingungen. Der Peak bei 81.720 kDa repräsentiert evtl. eine geringfügige Acylierung (81.720 kDa, 49 ppm, <50%\*). C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **159** nicht acyliert. \*Normalisierte Signalintensität



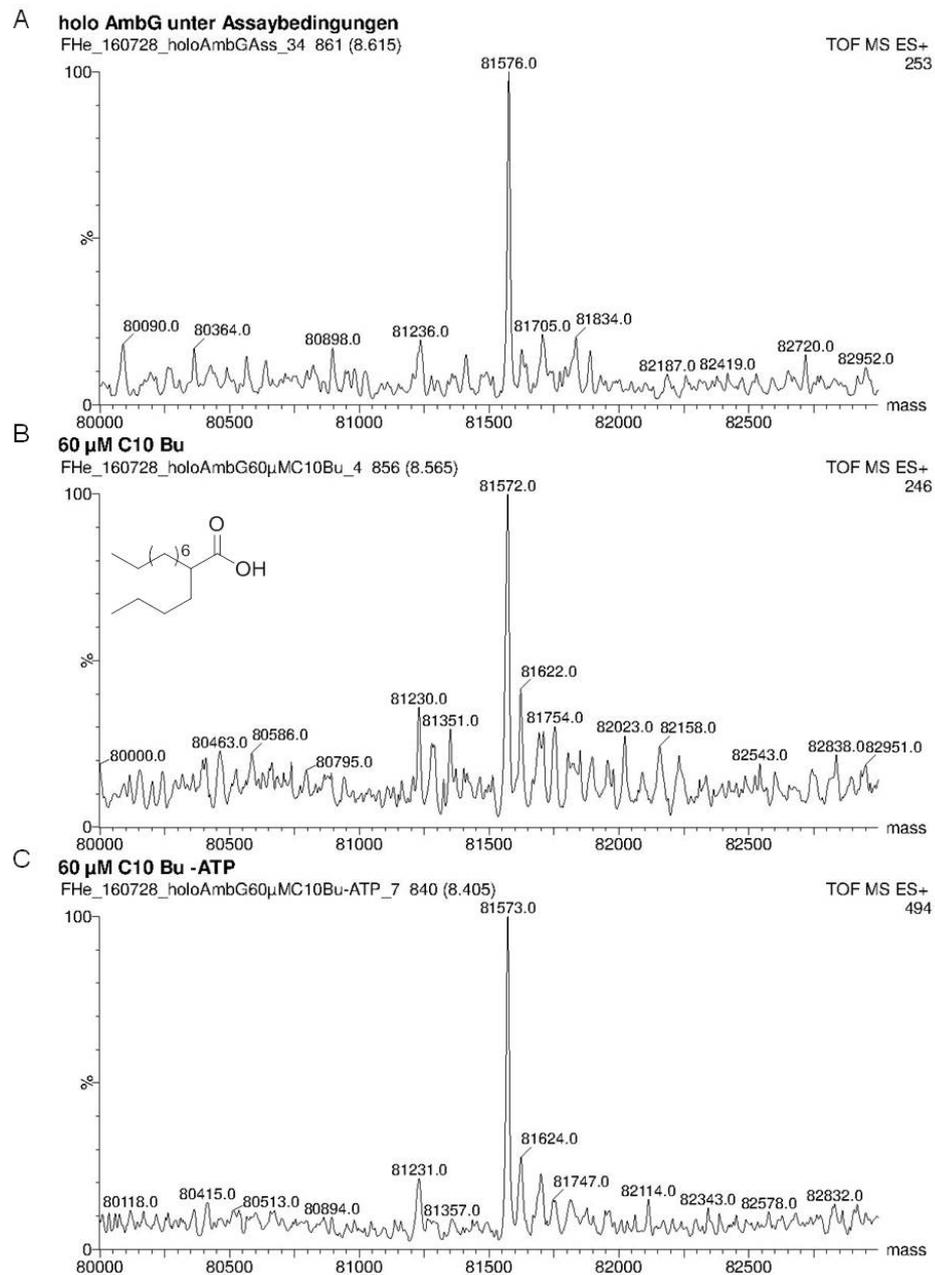
**Abbildung 88:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Hexansäure (**158**, 116 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.590 kDa). Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **158** B) mit ATP oder C) ohne ATP führt jeweils zu keiner Umsetzung.



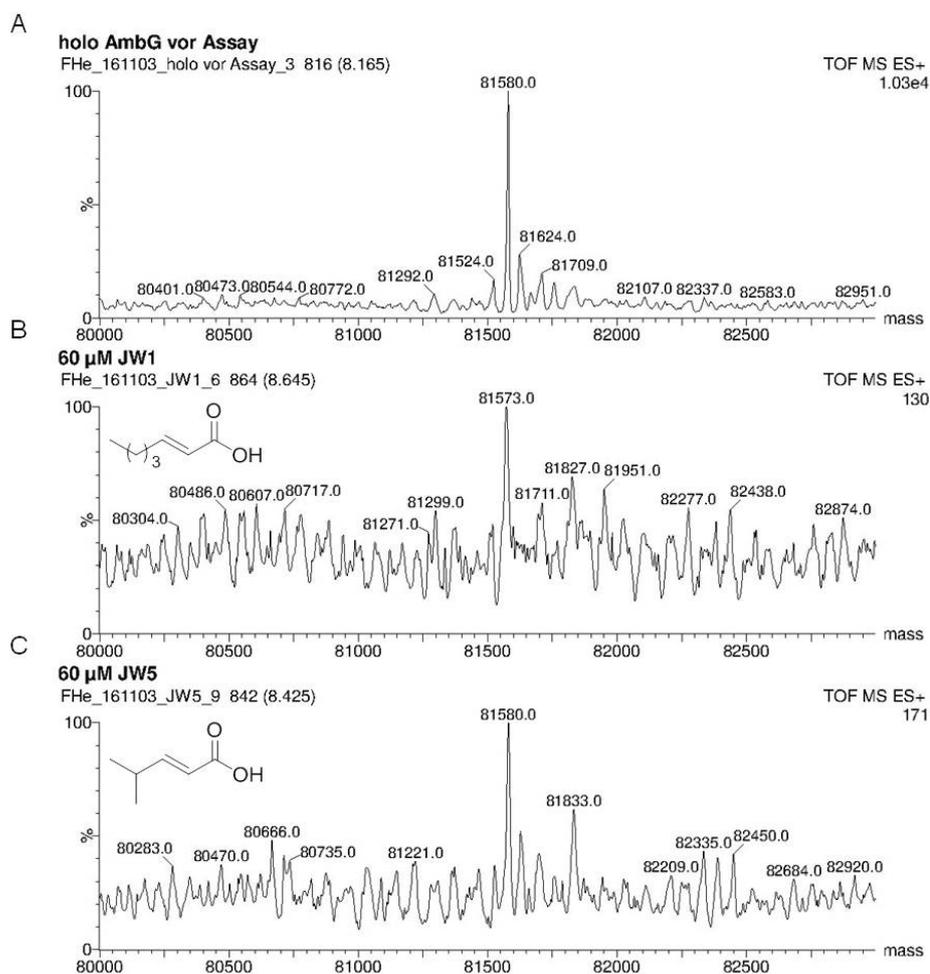
**Abbildung 89:** Dekonvolvierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60 μM 7-Bromheptansäure (**168**, 208 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.581 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **168** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung. Das Produkt einer HBr-Eliminierung der acylierten Spezies wurde ebenfalls nicht detektiert.



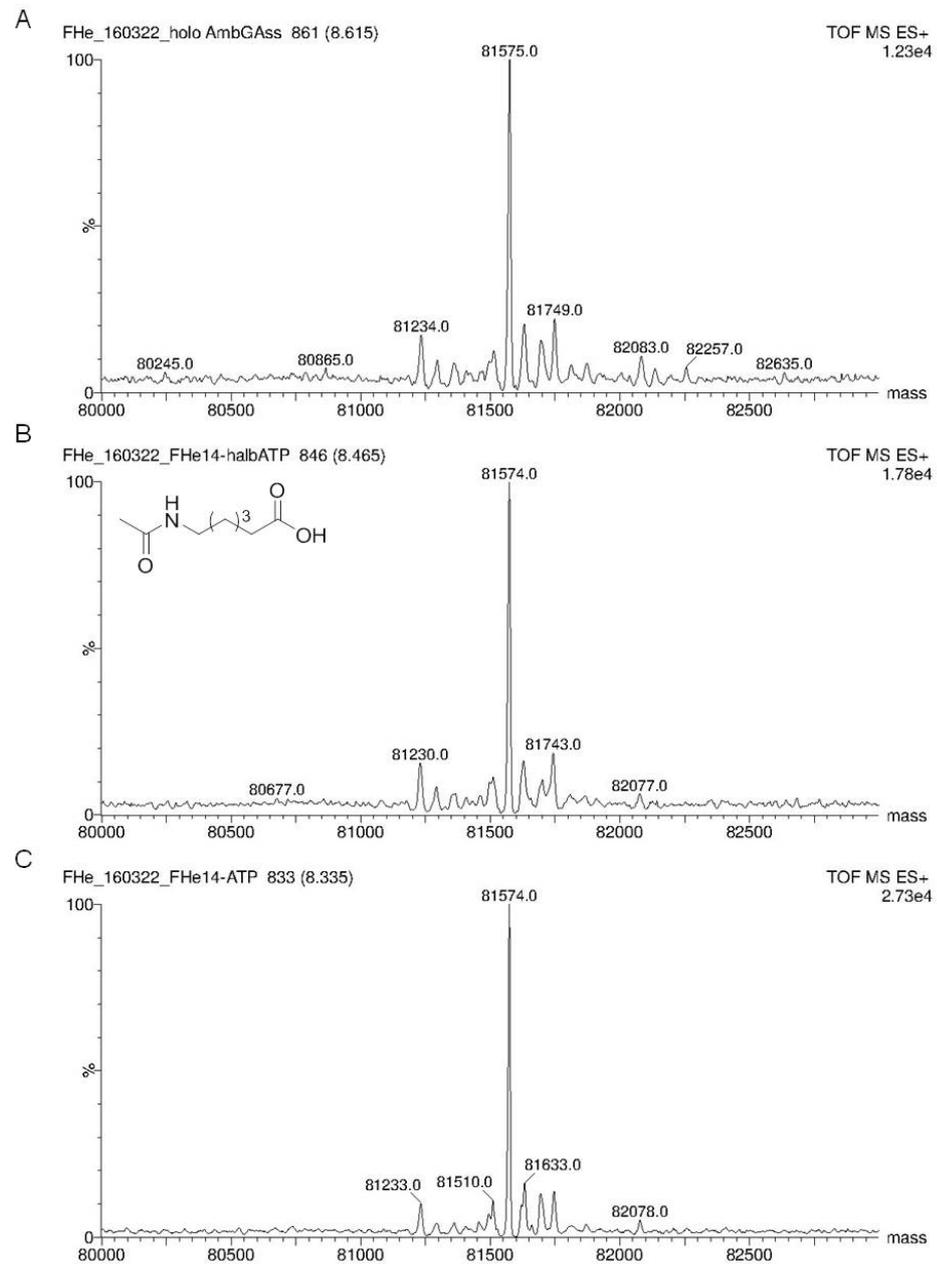
**Abbildung 90:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 7-Azidoheptansäure (**169**, 171 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.581 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **169** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



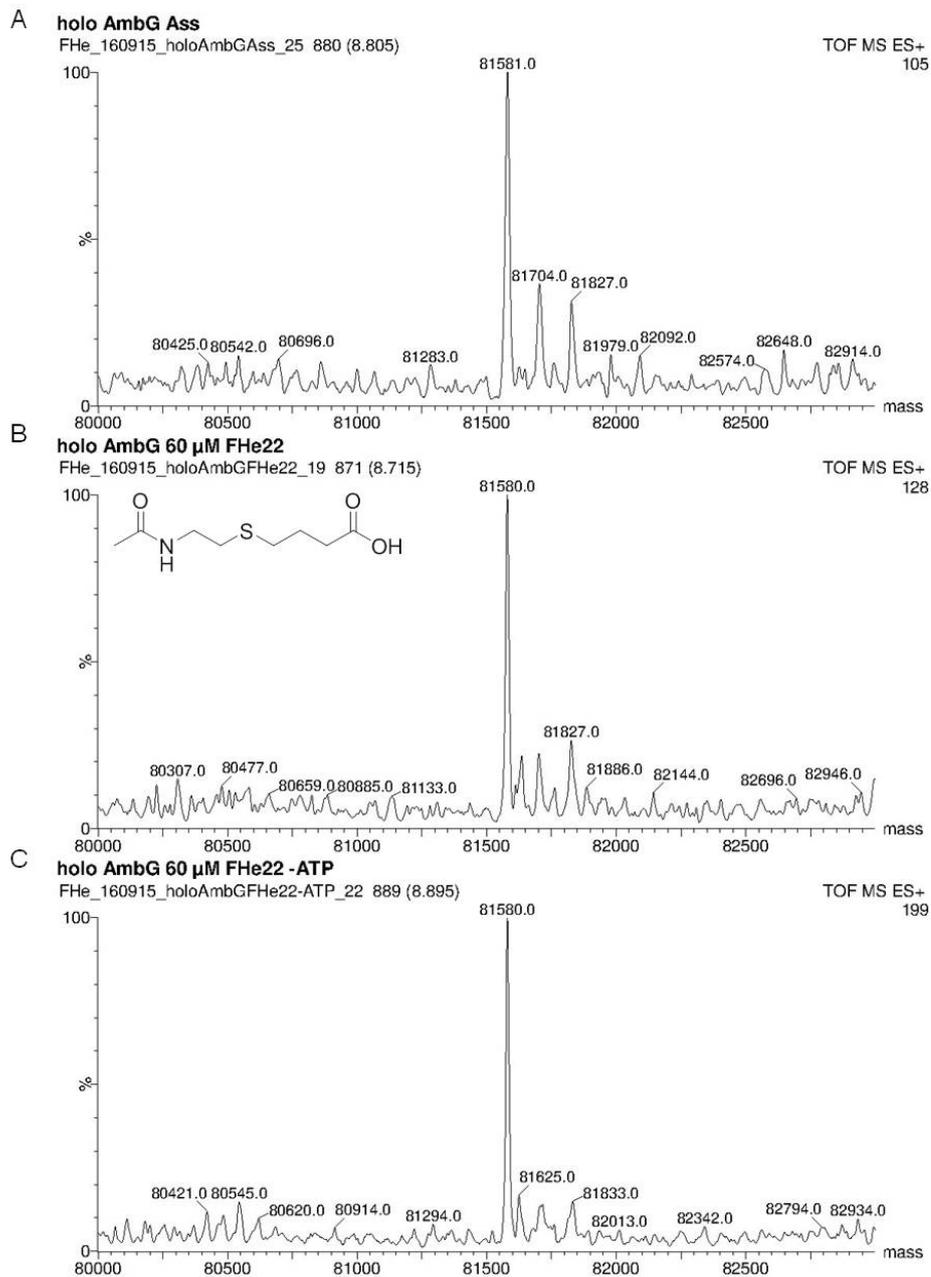
**Abbildung 91:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 2-Butyldecansäure (148, 242 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.576 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M 148 B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



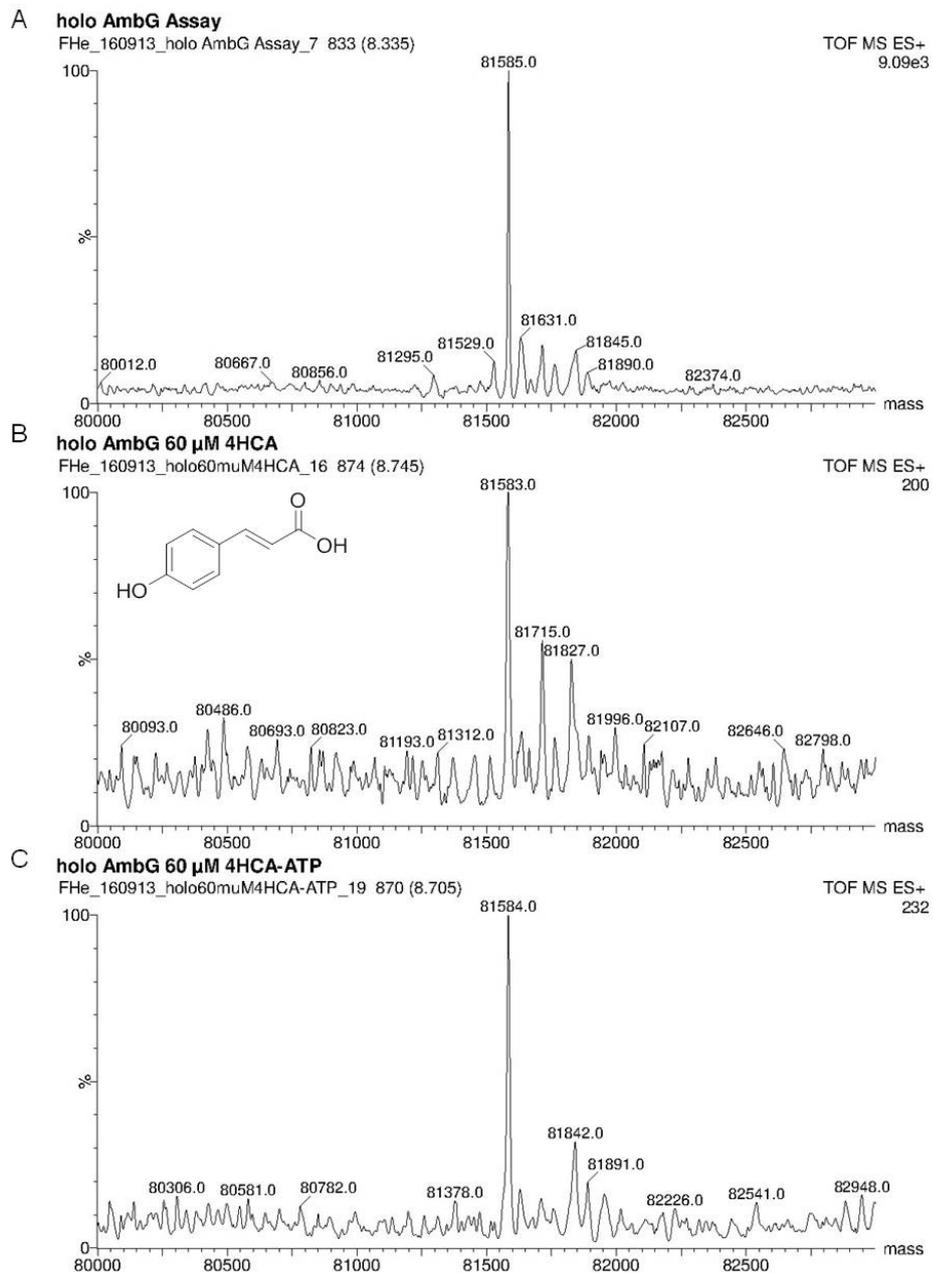
**Abbildung 92:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  (*E*)-Hept-3-ensäure (**173**, 128 g/mol) oder 60  $\mu\text{M}$  (*E*)-4-Methylpent-2-ensäure (**170**, 114 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.580 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit B) **173** oder C) **170** führte jeweils zu keiner Umsetzung.



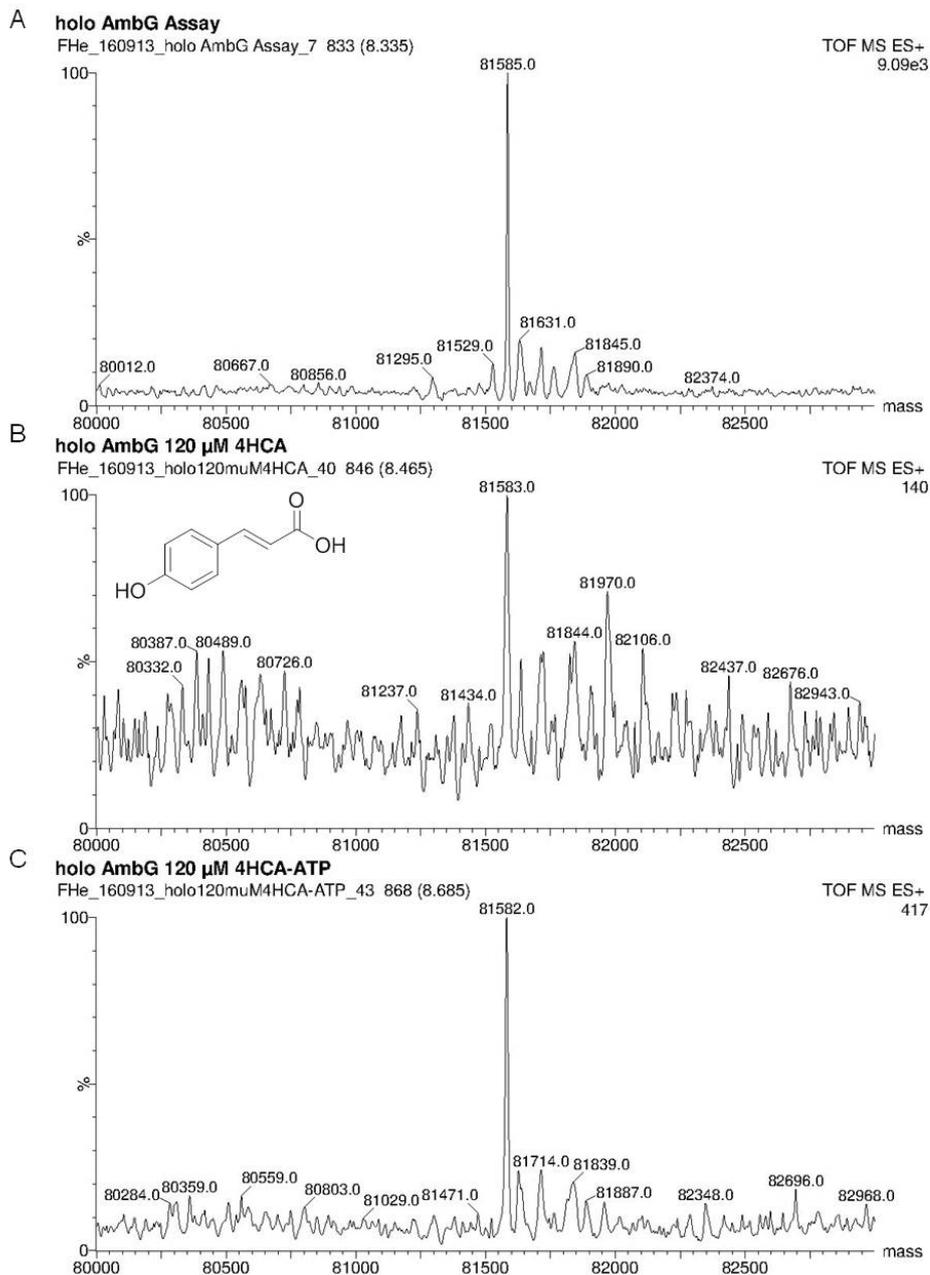
**Abbildung 93:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 2 mM 6-Acetamidohexansäure (**147**, 173 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.575 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 2 mM **147** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



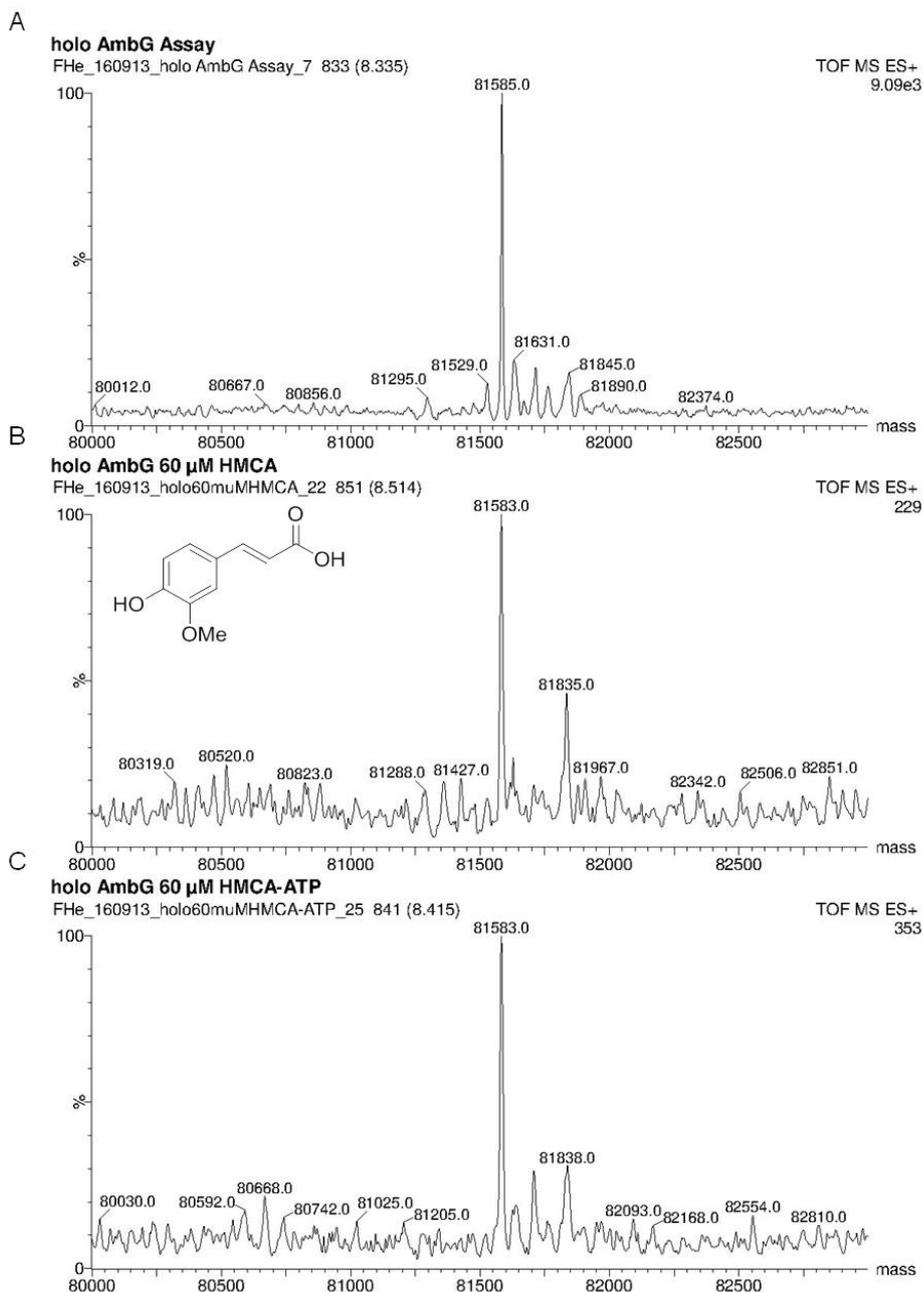
**Abbildung 94:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 4-((2-Acetamidoethyl)thio)butansäure (**145**, 205 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.581 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **145** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



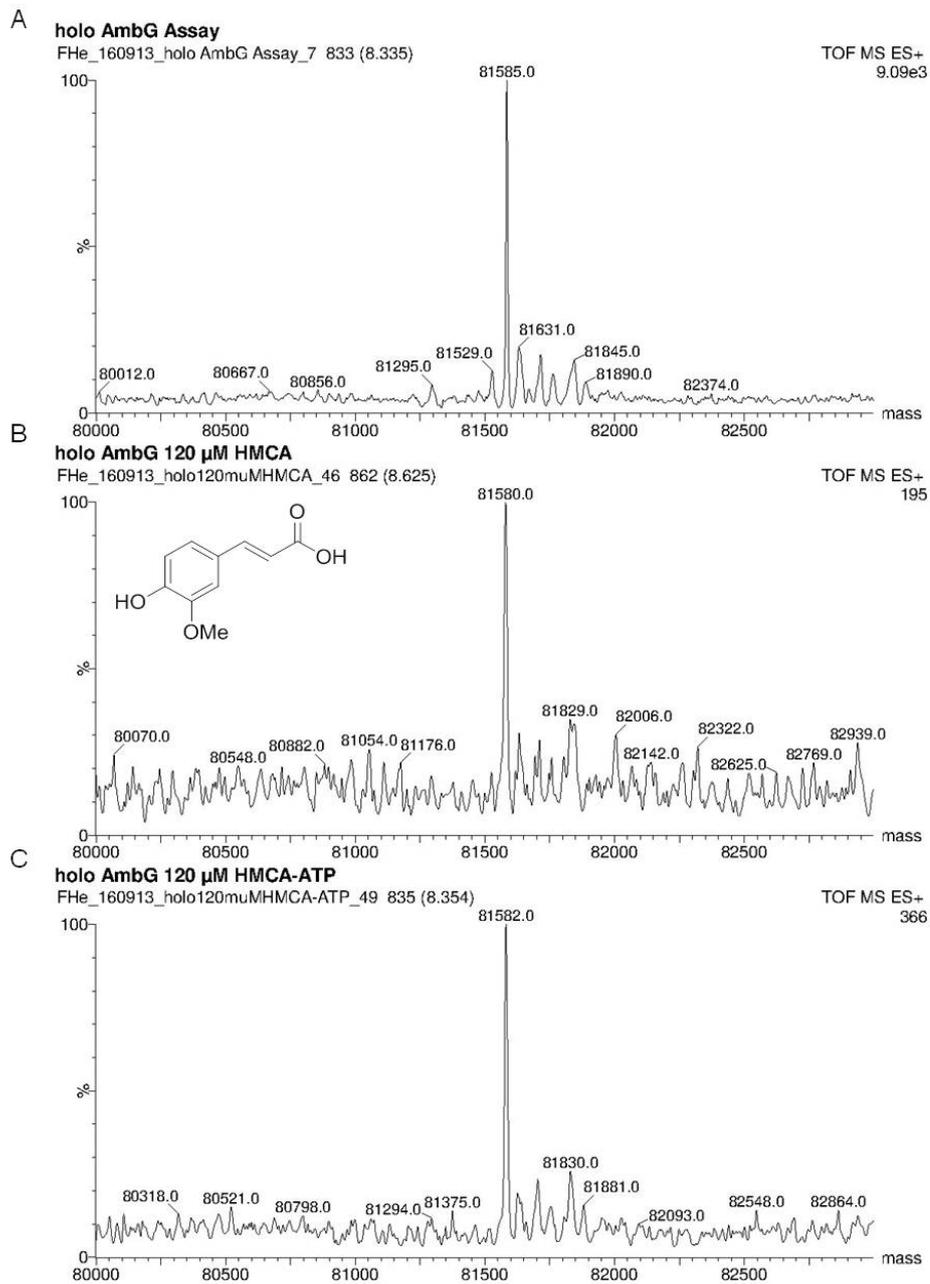
**Abbildung 95:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  4-Hydroxycimtsäure (**179**, 164 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **179** führt zur geringfügigen Umsetzung in zwei Spezies mit  $M(\text{holo-AmbG})+130$  Da ( $>50\%$ \*) sowie  $M(\text{holo-AmbG})+242$  Da ( $<50\%$ \*), welche nicht als Acylierungsprodukte annotiert werden konnten. C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu\text{M}$  **179** nicht umgesetzt. \*Normalisierte Signalintensität



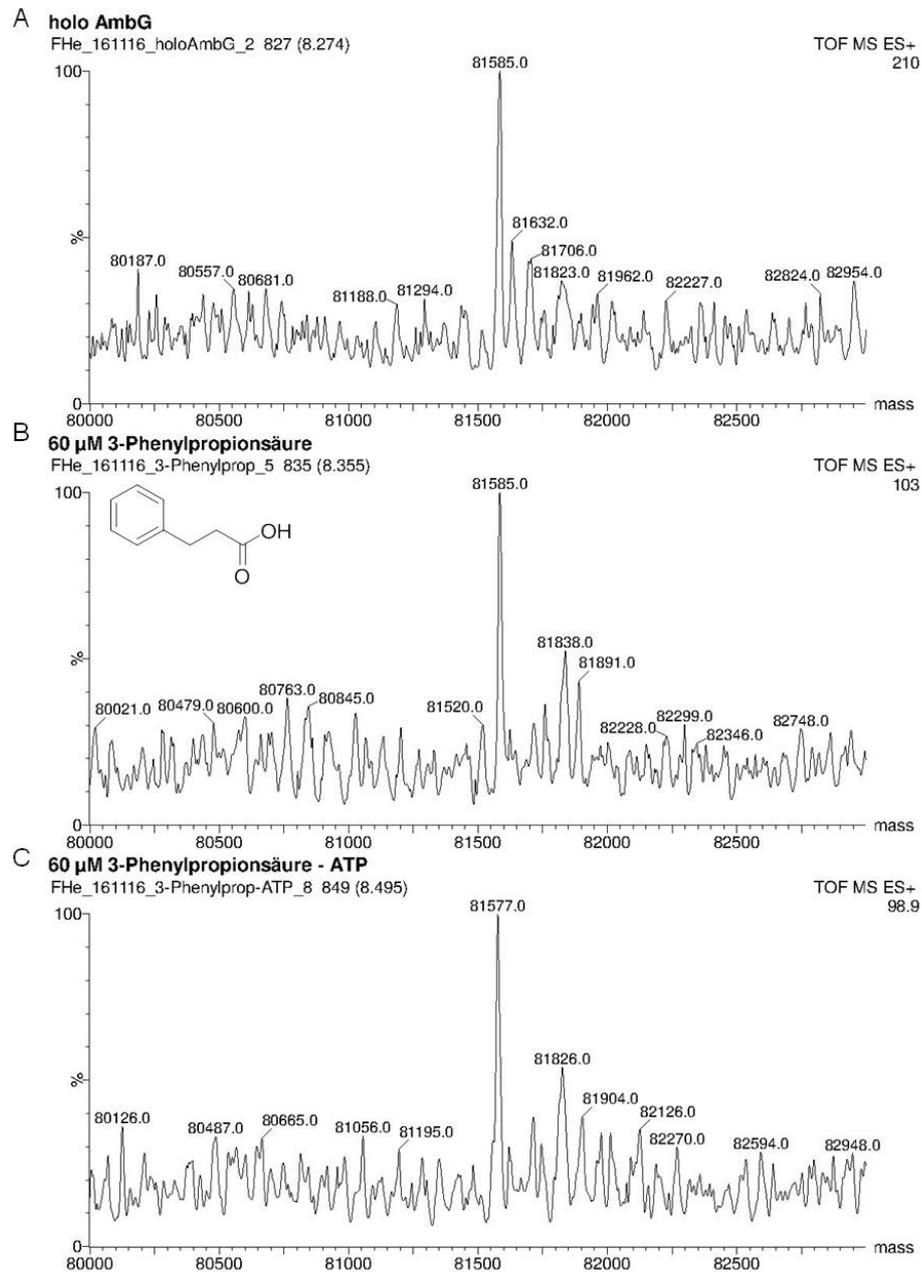
**Abbildung 96:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 120 μM 4-Hydroxyzimtsäure (**179**, 164 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 120 μM **179** führt zu einer niedrigen Signalintensität. Die Spezies mit  $M(\textit{holo}\text{-AmbG})+387$  Da konnte nicht als Acylierungsprodukt annotiert werden. C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60 μM **179** nicht umgesetzt.



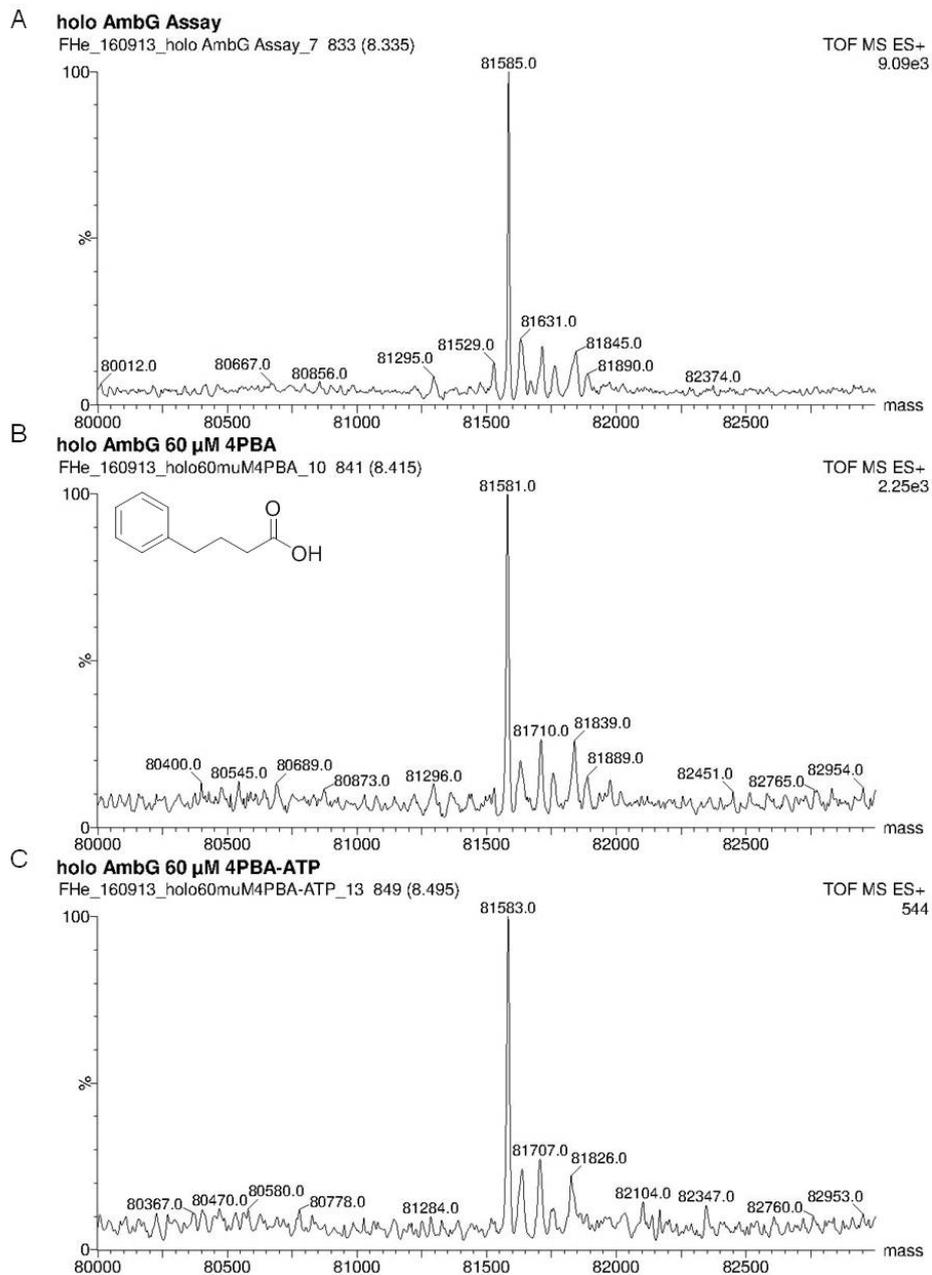
**Abbildung 97:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure (**180**, 194 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **180**. Die Spezies mit  $M(\text{holo-AmbG})+252$  Da konnte nicht als Acylierungsprodukt annotiert werden. C) Ohne ATP wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **180** nicht umgesetzt.



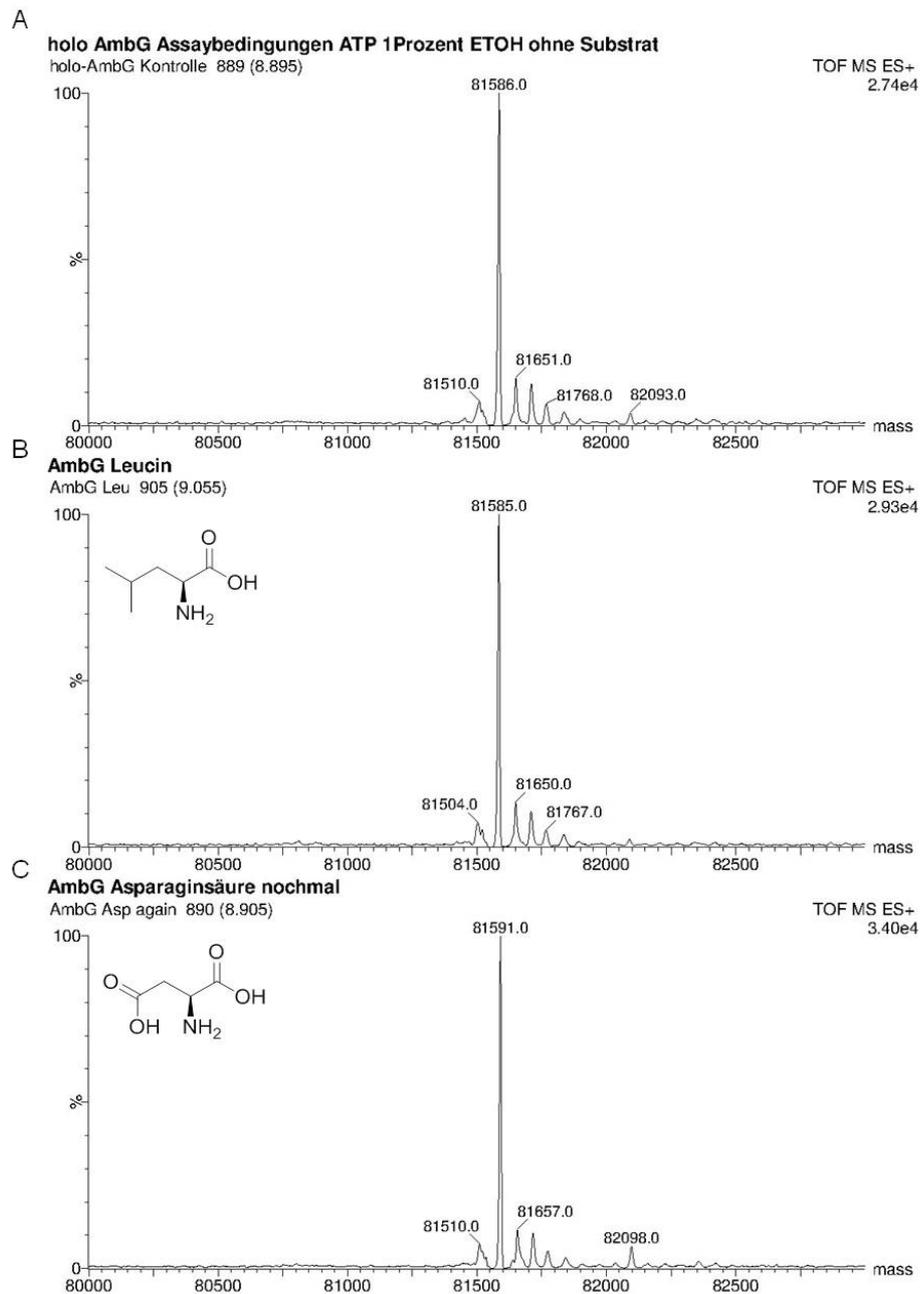
**Abbildung 98:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 120  $\mu$ M 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure (180, 194 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 120  $\mu$ M 180 B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



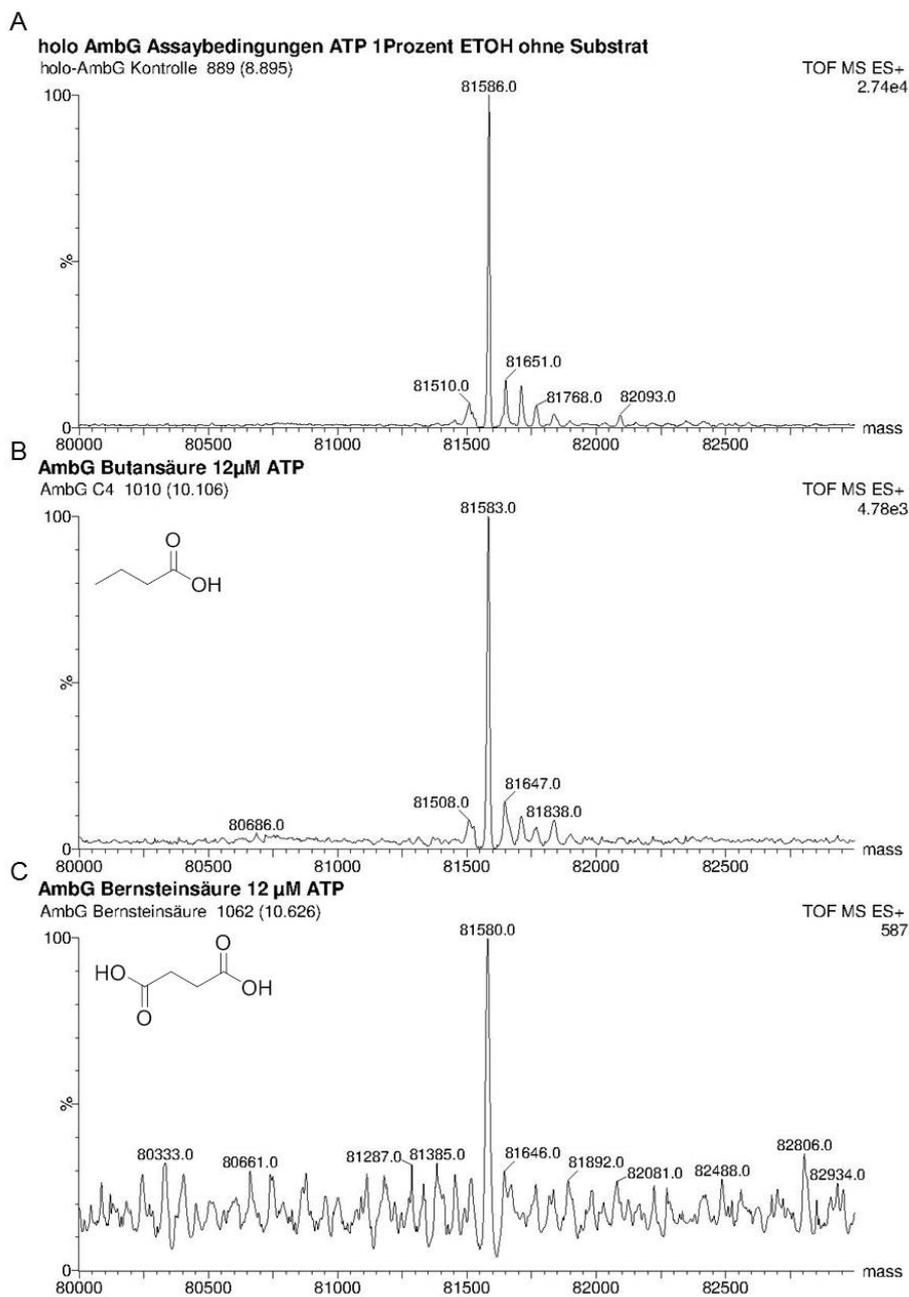
**Abbildung 99:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 3-Phenylpropionsäure (**176**, 150 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **176** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.



**Abbildung 100:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M 4-Phenylbutansäure (**177**, 164 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.585 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **177** B) mit ATP oder C) ohne ATP führte jeweils zu keiner Umsetzung.

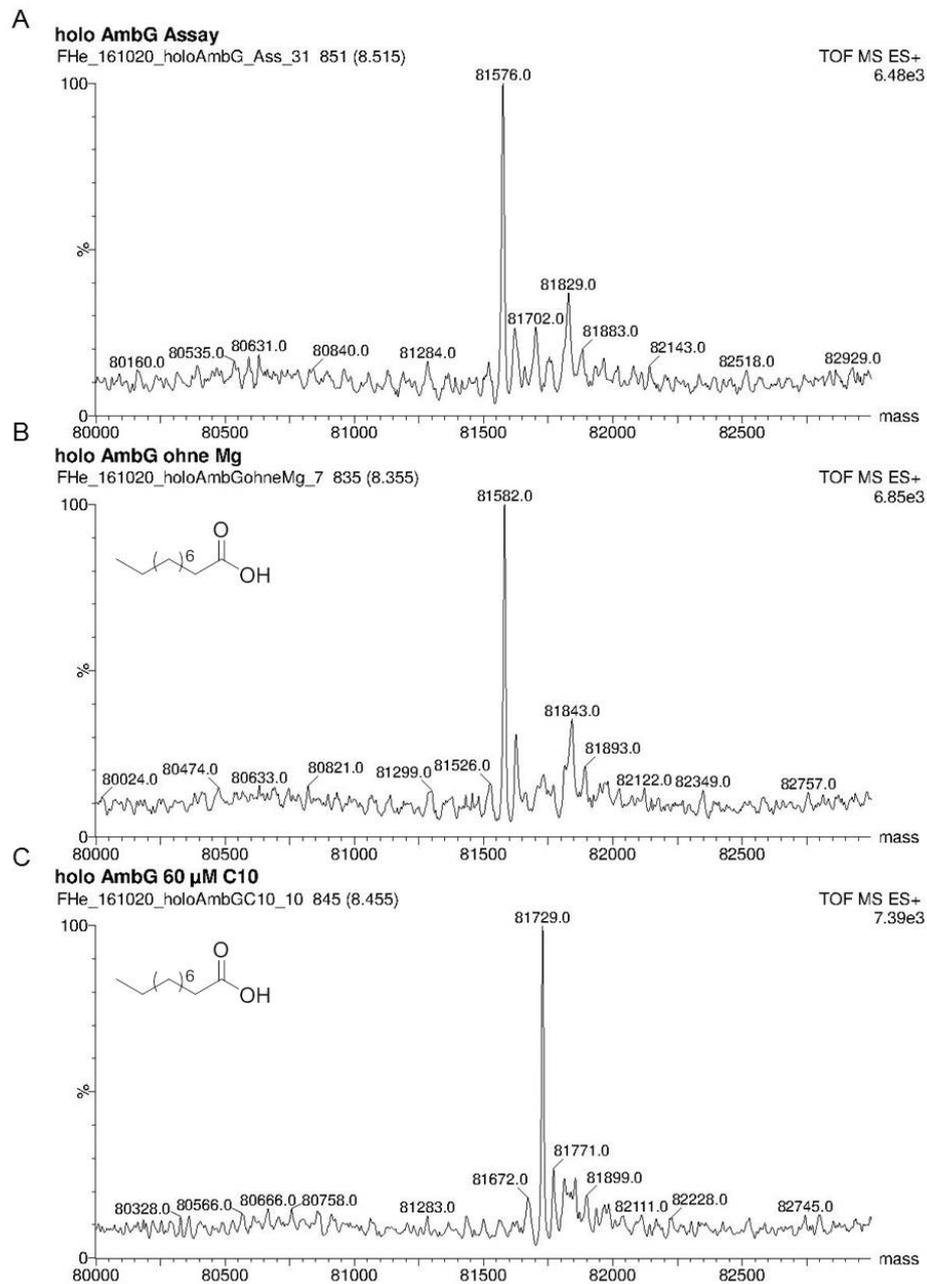


**Abbildung 101:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 2 mM L-Leucin (**182**, 131 g/mol) oder 2 mM L-Asparaginsäure (**181**, 133 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.586 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit B) **182** oder C) **181** führte jeweils zu keiner Umsetzung.

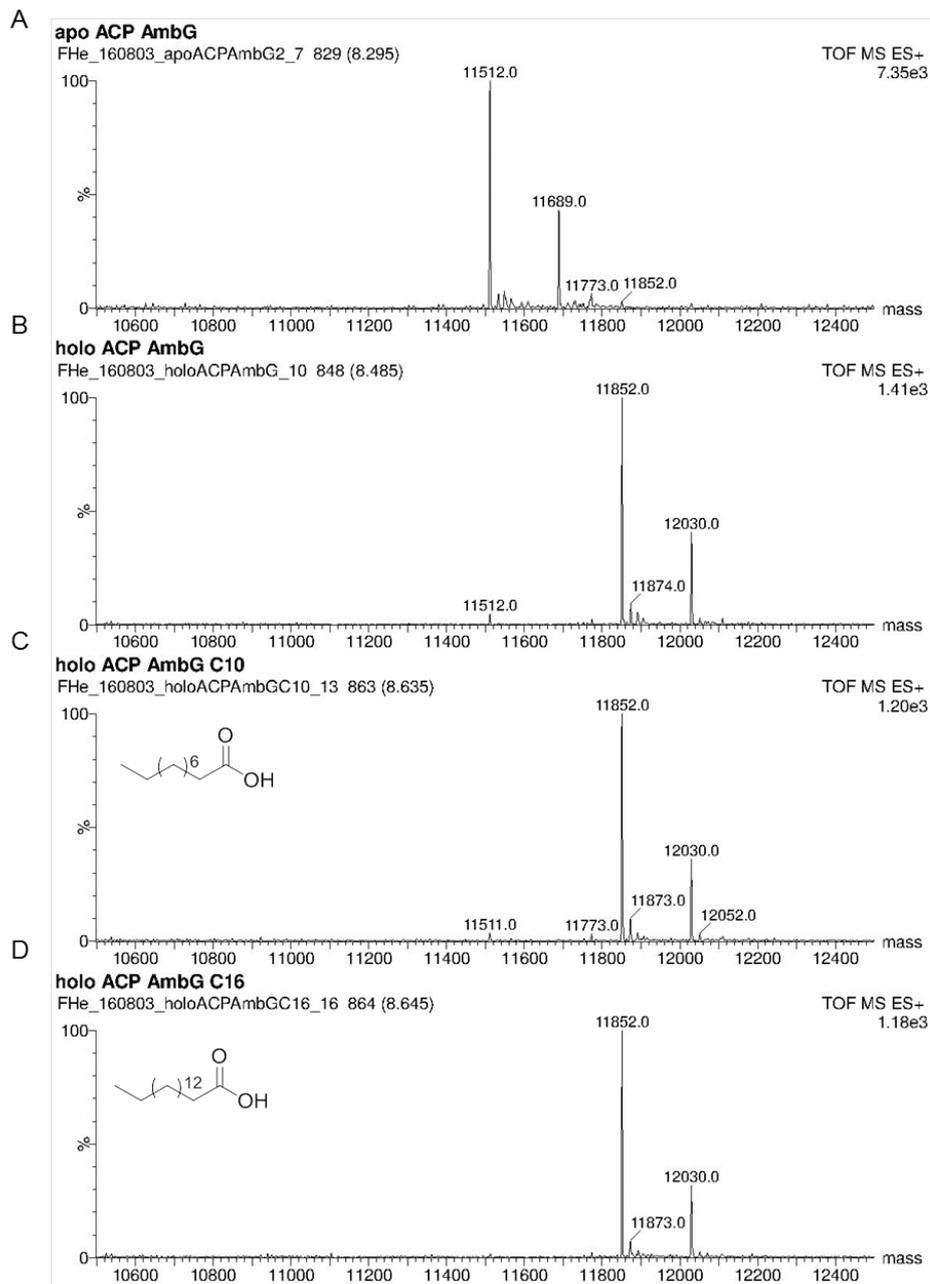


**Abbildung 102:** Dekonvolutierte Massenspektren der APC-Transfer-Assays mit 2 mM Butansäure (**157**, 88 g/mol) oder 2 mM Bernsteinsäure (**156**, 118 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.586 kDa). Die Inkubation von *holo*-AmbG mit B) **157** oder C) **156** führte jeweils zu keiner Umsetzung.

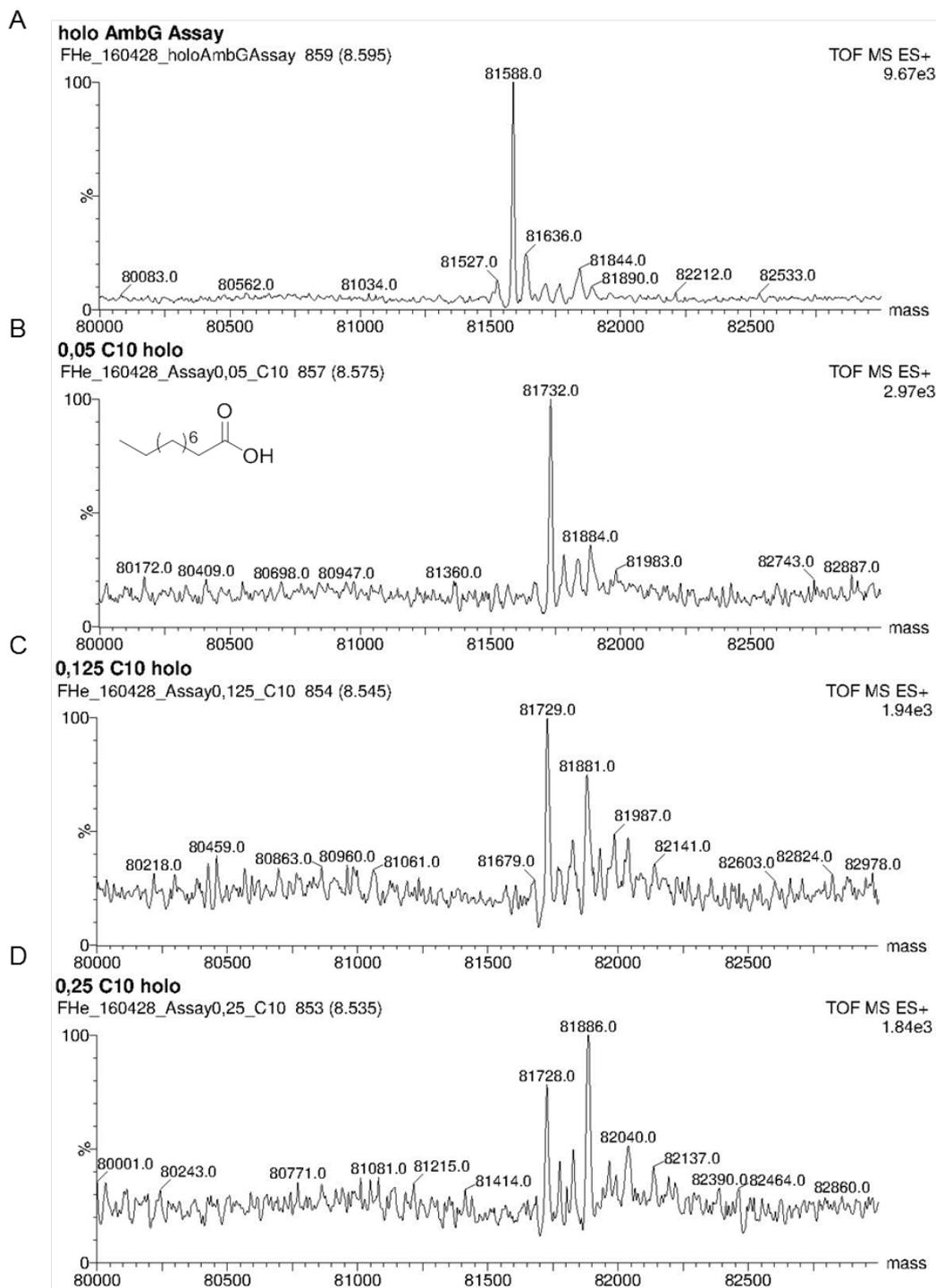
## 6.0.8.1 Kontrolllexperimente



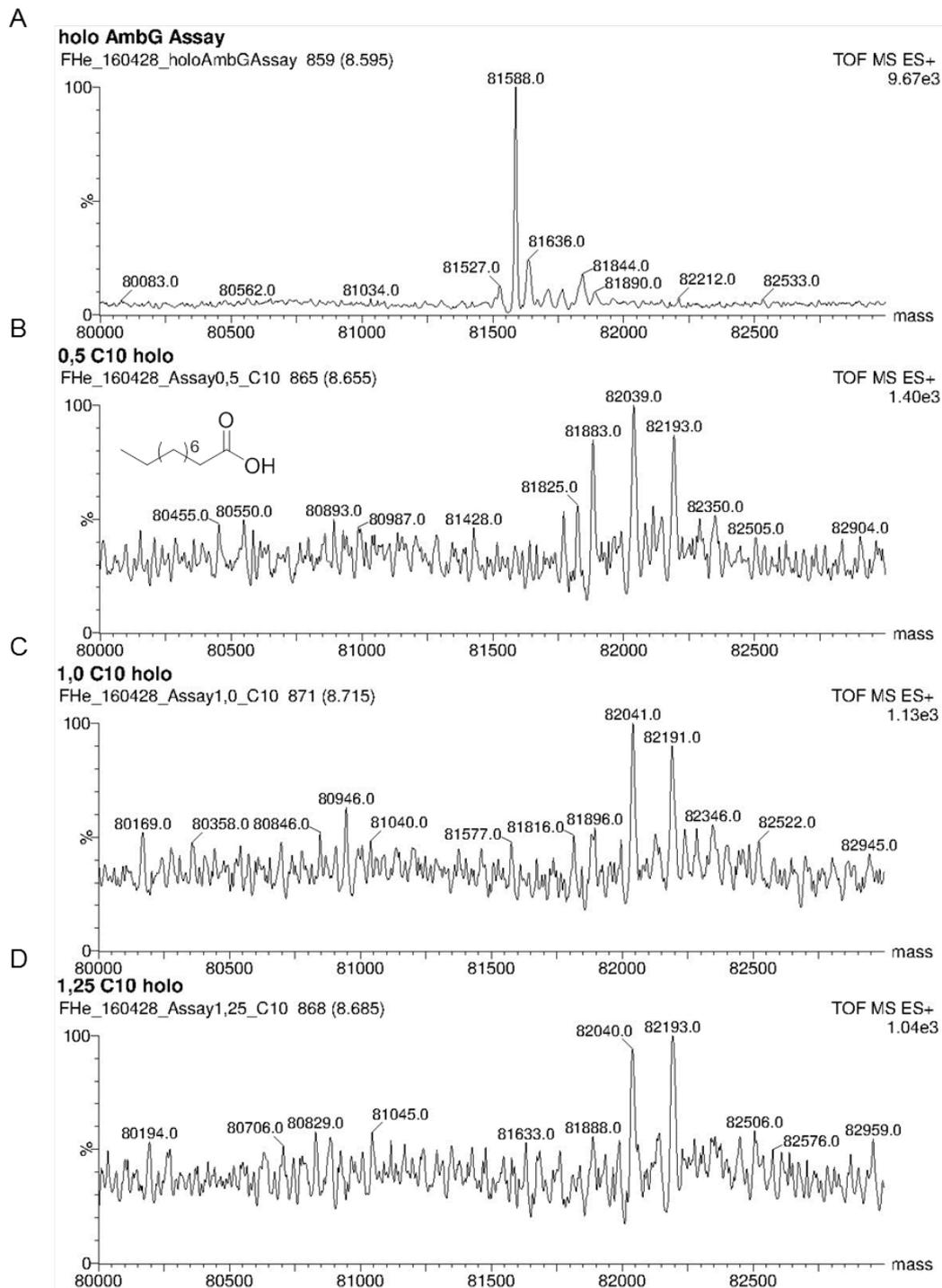
**Abbildung 103:** Kontrolle der ACP-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol) mit/ohne  $\text{MgCl}_2$ . A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.576 kDa). B) Ohne  $\text{MgCl}_2$  wird *holo*-AmbG unter Testbedingungen mit 60  $\mu$ M **134** nicht acyliert. C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** führt zur vollständigen Acylierung (81.729 kDa, 12 ppm).



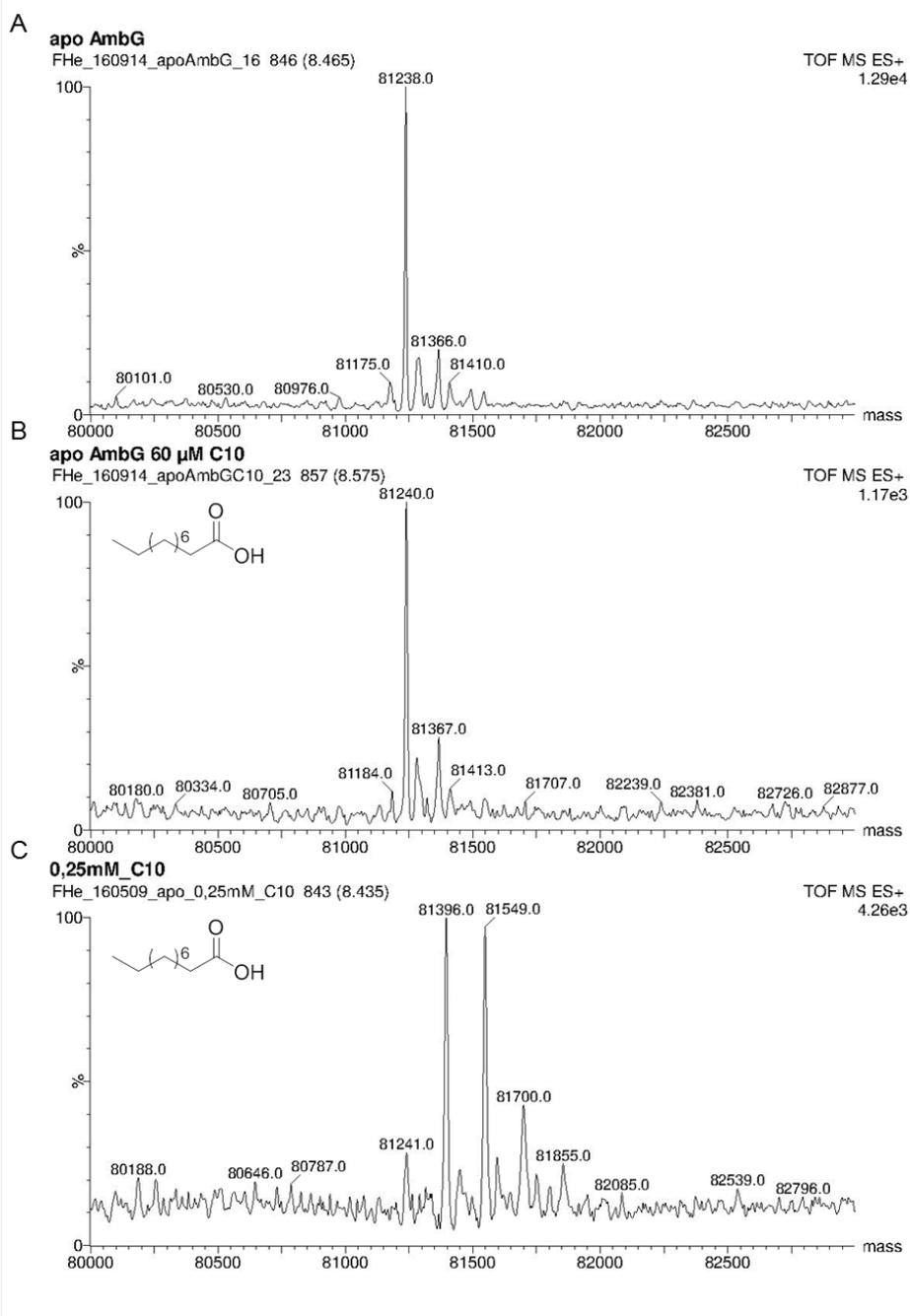
**Abbildung 104:** Dekonvolutierte Massenspektren der Kontrollexperimente mit ACP\_AmbG. A) Dekonvolutierte Protein-Massenspektren von *apo*-ACP\_AmbG (11.512 kDa, [M + Glucuronsäure] = 11.689 kDa). B) Die Phosphopantetheinylierung von *apo*-ACP\_AmbG führt zu einer charakteristischen Massenerhöhung um 340 Da und *holo*-ACP\_AmbG (11.852 kDa, [M + Glucuronsäure] = 12.030 kDa) wird erhalten. Weder die Inkubation mit C) 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol) noch mit D) 60  $\mu$ M Hexadecansäure (**162**, 256 g/mol) unter Assaybedingungen führt zu einem Umsatz von *holo*-ACP\_AmbG.



**Abbildung 105:** Assays mit 50–250  $\mu\text{M}$  Decansäure (**134**, 172 g/mol) zeigen eine dosisabhängige Acylierung. A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen ohne Substrat (81.588 kDa). B) Mit 50  $\mu\text{M}$  **134** wurde *holo*-AmbG vollständig 1x acyliert (81.732 kDa, 122 ppm). C) Mit 125  $\mu\text{M}$  **134** wurde *holo*-AmbG 1x (81.729 kDa, 159 ppm, 100%\*) und 2x (81.881 kDa, 183 ppm, >50%\*) acyliert. D) Mit 250  $\mu\text{M}$  **134** wurde *holo*-AmbG 1x (81.728 kDa, 171 ppm, >50%\*), 2x (81.886 kDa, 122 ppm, 100%\*) und 3x (82.040 kDa, 122 ppm, >50%\*) acyliert. \*Normalisierte Signalintensität

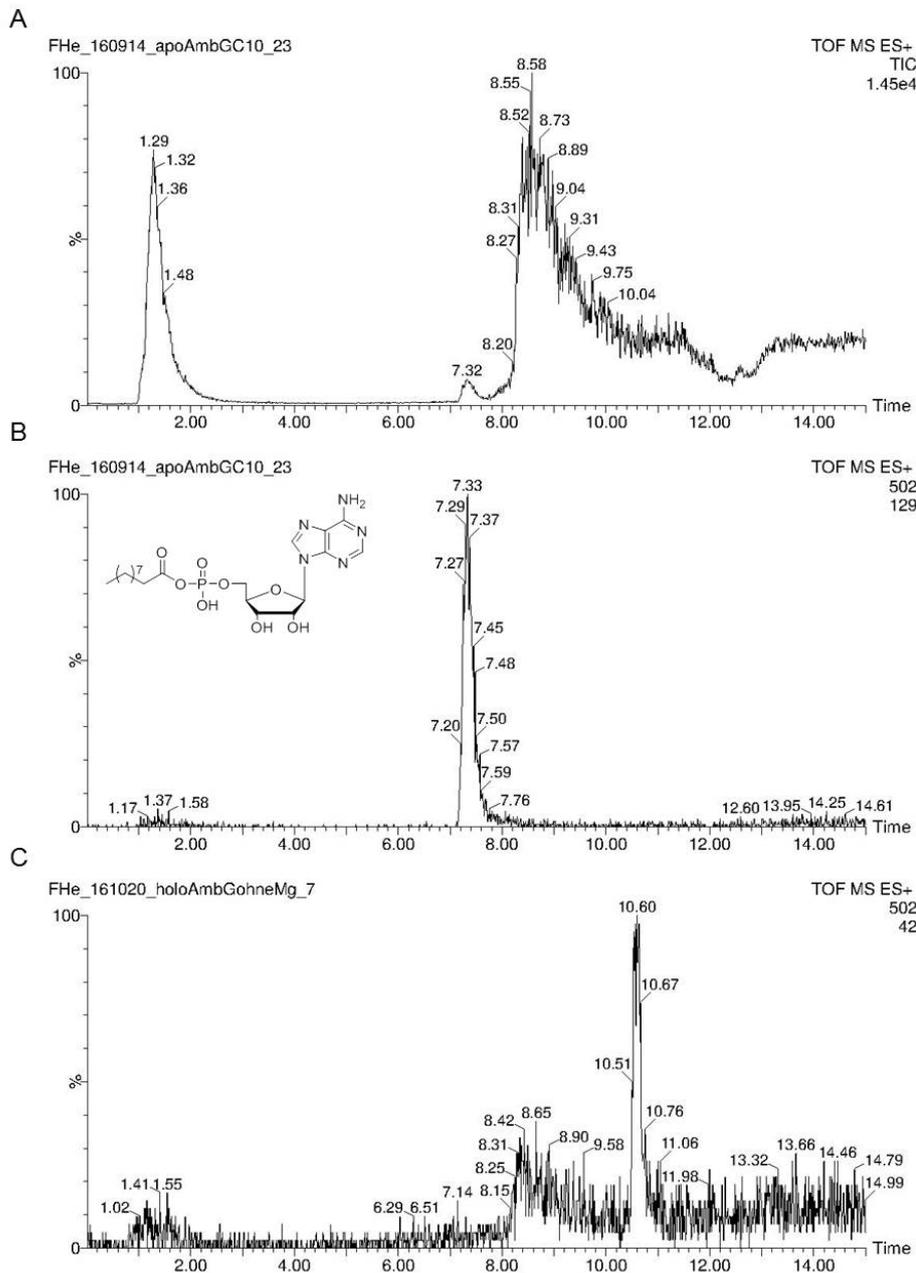


**Abbildung 106:** Assays mit 0.5–1.25 mM Decansäure (**134**, 172 g/mol) zeigen eine dosisabhängige Acylierung (Fortsetzung). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen ohne Substrat (81.588 kDa). B) Mit 500  $\mu$ M **134** wurde *holo*-AmbG 2x (81.883 kDa, 159 ppm, >50%\*), 3x (82.039 kDa, 134 ppm, 100%\*) und 4x (82.193 kDa, 134 ppm, >50%\*) acyliert. C) Mit 1 mM **134** wurde *holo*-AmbG 3x (82.041 kDa, 110 ppm, 100%\*) und 4x (82.191 kDa, 158 ppm, >50%\*) acyliert. D) Mit 1.25 mM **134** wurde *holo*-AmbG 3x (82.040 kDa, 122 ppm, >50%\*) und 4x (82.193 kDa, 134 ppm, 100%\*) acyliert. \*Normalisierte Signalintensität

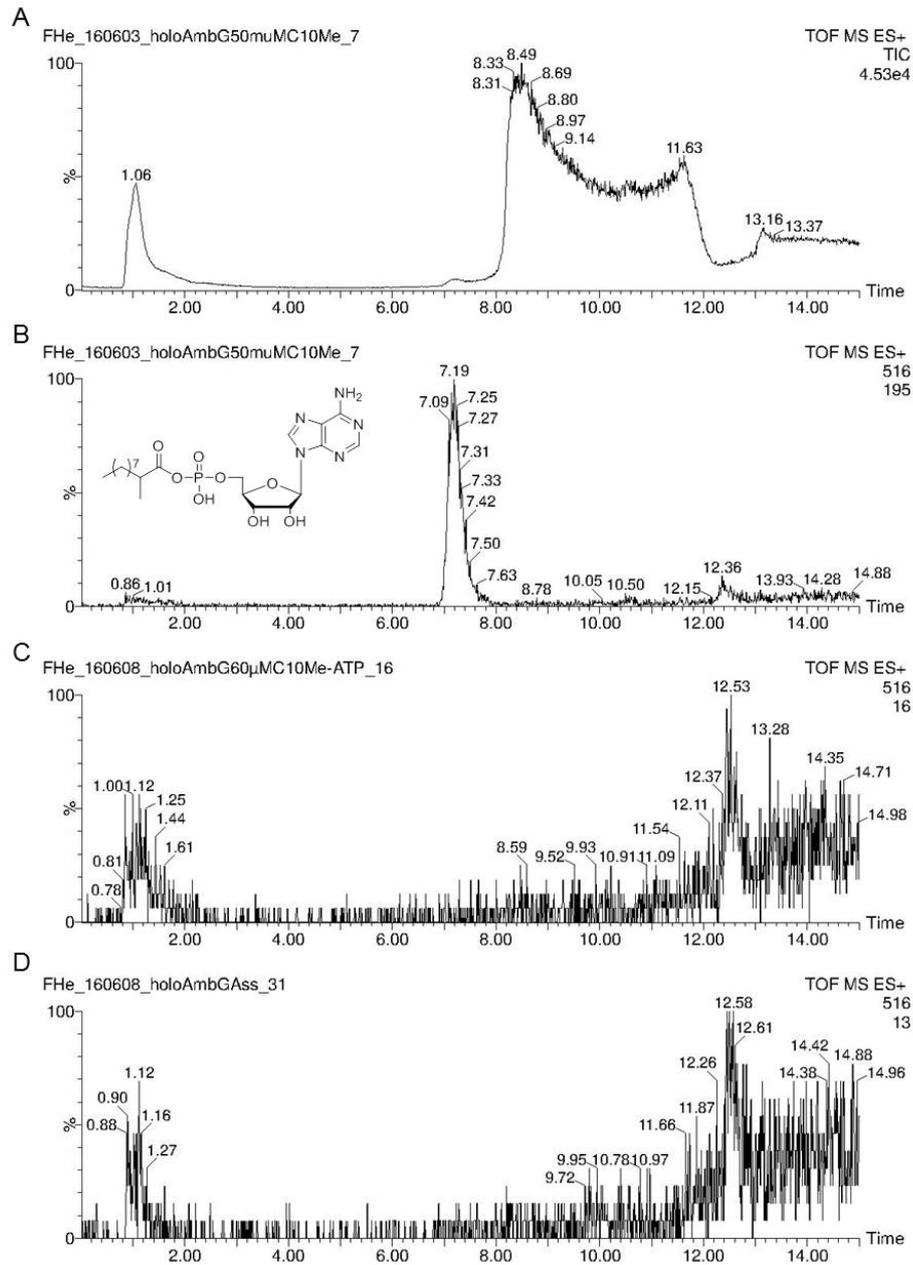


**Abbildung 107:** Assays mit 60–250  $\mu\text{M}$  Decansäure (**134**, 172 g/mol) zeigen eine dosisabhängige Acylierung für *apo*-AmbG. A) *apo*-AmbG unter Testbedingungen ohne Substrat (81.238 kDa). B) Mit 60  $\mu\text{M}$  **134** wurde *apo*-AmbG nicht acyliert. C) Mit 250  $\mu\text{M}$  **134** wurde *apo*-AmbG teilweise (<50%\* *apo*-AmbG, 1x (81.396 kDa, 12 ppm, 100%\*), 2x (81.549 kDa, >50%\*) und 3x (81.700 kDa, 37 ppm, <50%\*) acyliert. \*Normalisierte Signalintensität

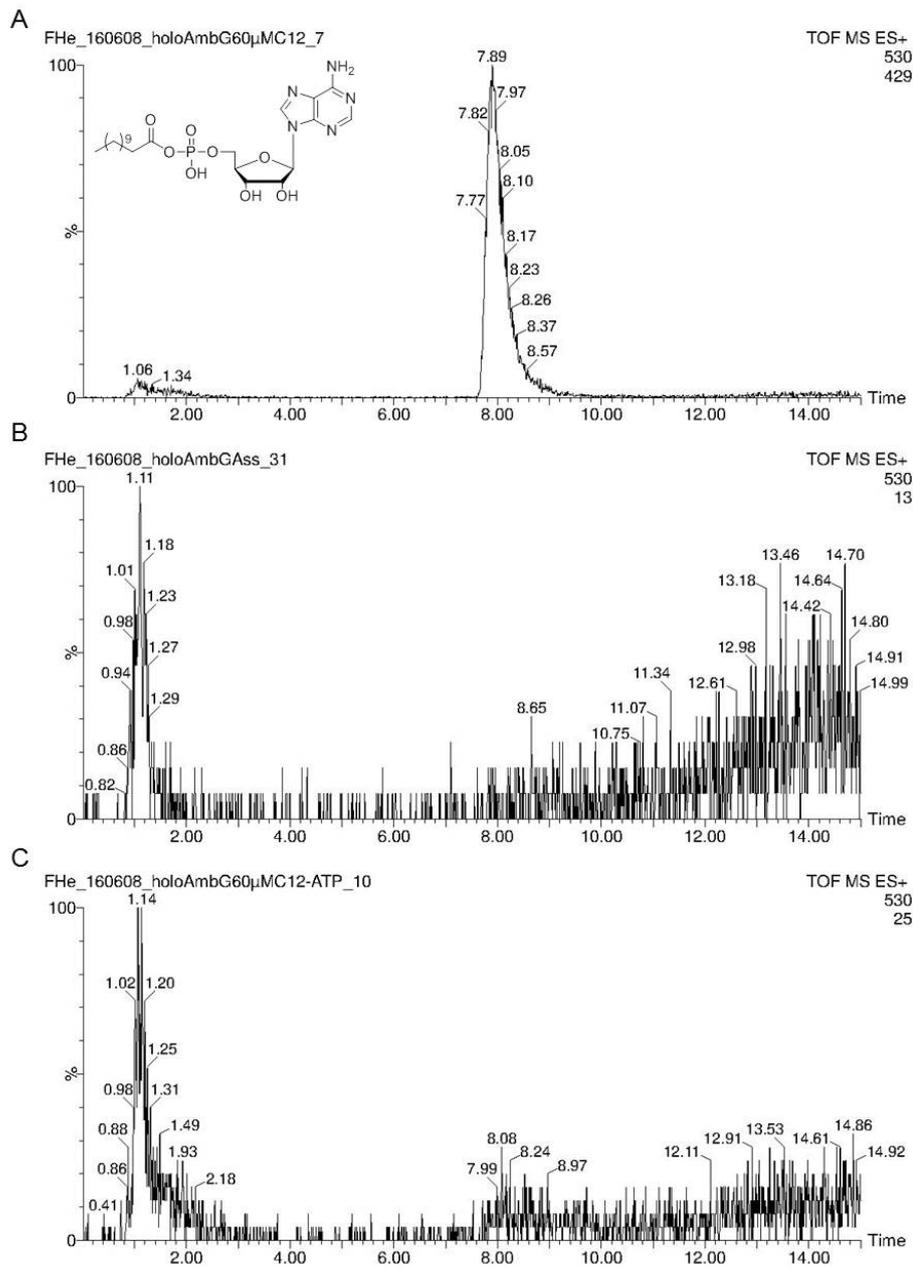
## 6.0.8.2 Acyl-Adenylate



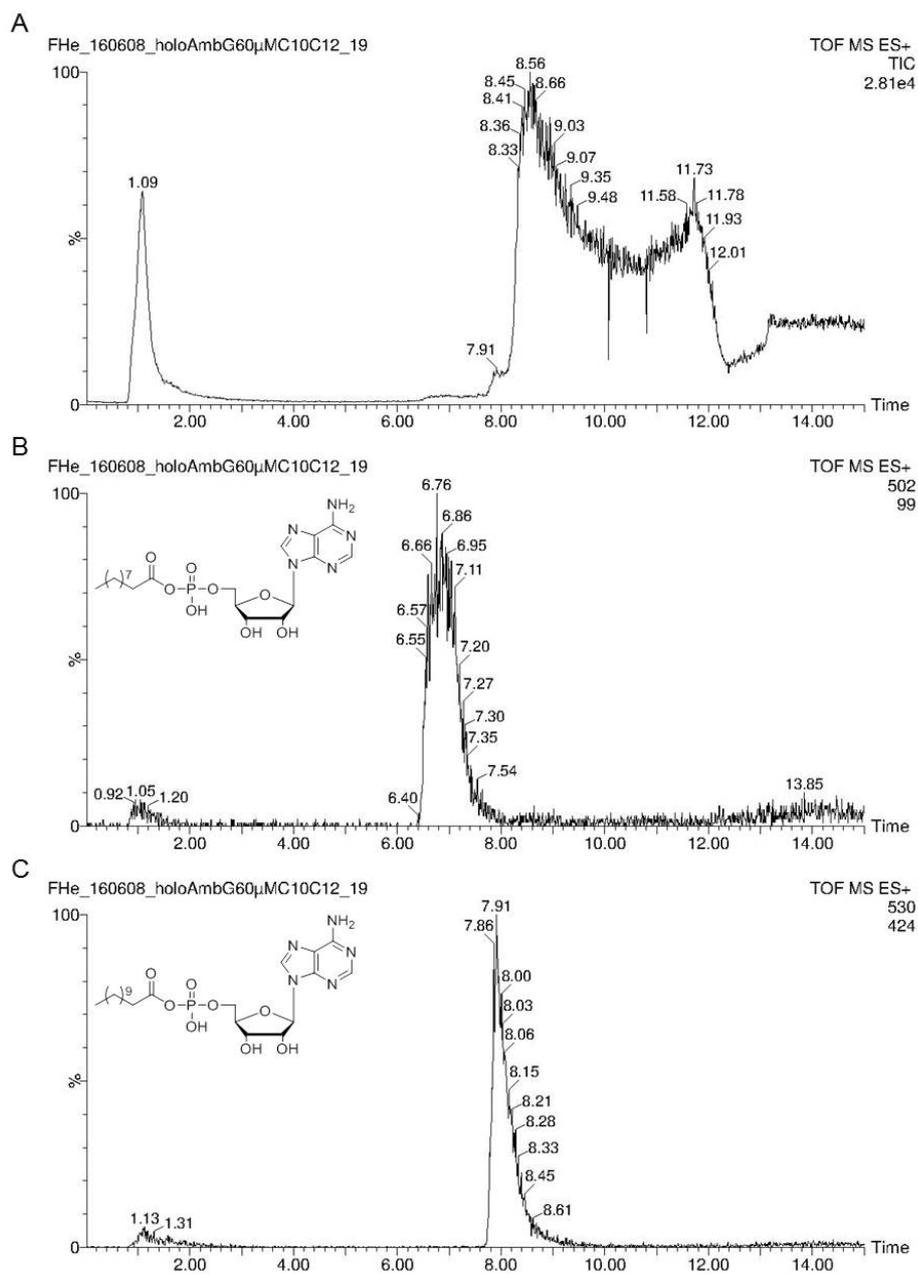
**Abbildung 108:** HPLC-MS-Kontrolle der ACP-Transfer-Assays mit Decansäure (**134**, 172 g/mol). A) Die TIC-Spur für die Inkubation von *apo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** zeigt einen Peak bei 7.32 min. B) Inkubation von *apo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** unter Testbedingungen zeigt einen Peak bei 7.33 min für die Massenspur  $M = 502$  (C10-AMP, **184**). C) Ohne  $MgCl_2$  wird kein Peak bei 7.33 min für die Massenspur  $M = 502$  (C10-AMP, **184**) mit 60  $\mu$ M **134** unter Testbedingungen erhalten. X-Achse: Retentionszeit, Y-Achse: relative Intensität.



**Abbildung 109:** HPLC-MS-Analyse der der ACP-Transfer-Assays mit 2-Methyl-decansäure (**167**, 186 g/mol). A) Die TIC-Spur für die Inkubation von *holo*-AmbG mit 50  $\mu$ M **167** zeigt einen Peak bei 7.19 min. B) Inkubation von *holo*-AmbG mit 50  $\mu$ M **167** unter Testbedingungen zeigt einen Peak bei 7.19 min für die Massenspur M = 516 (C10Me-AMP, **185**). Es werden keine Peaks für die Massenspur M = 516 (C10Me-AMP, **185**) ohne B) **167** oder C) ATP erhalten. X-Achse: Retentionszeit, Y-Achse: relative Intensität.

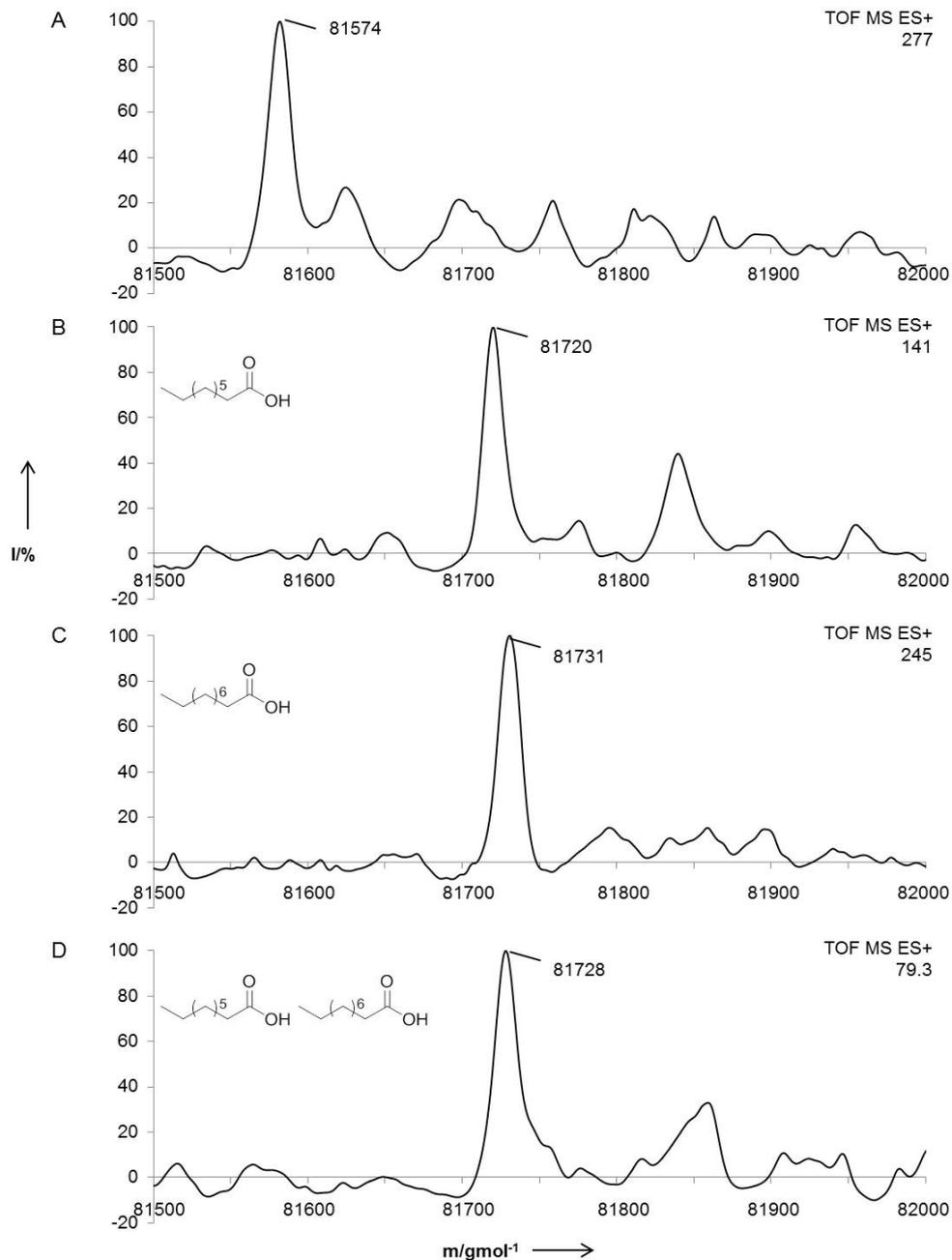


**Abbildung 110:** HPLC-MS-Analyse der ACP-Transfer-Assays mit Dodecansäure (**135**, 200 g/mol). A) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **135** unter Testbedingungen zeigt einen Peak bei 7.89 min für die Massenspur  $M = 530$  (C12-AMP, **186**). Es werden keine Peaks für die Massenspur  $M = 530$  (C12-AMP, **186**) ohne B) **167** oder C) ATP erhalten. X-Achse: Retentionszeit, Y-Achse: relative Intensität.

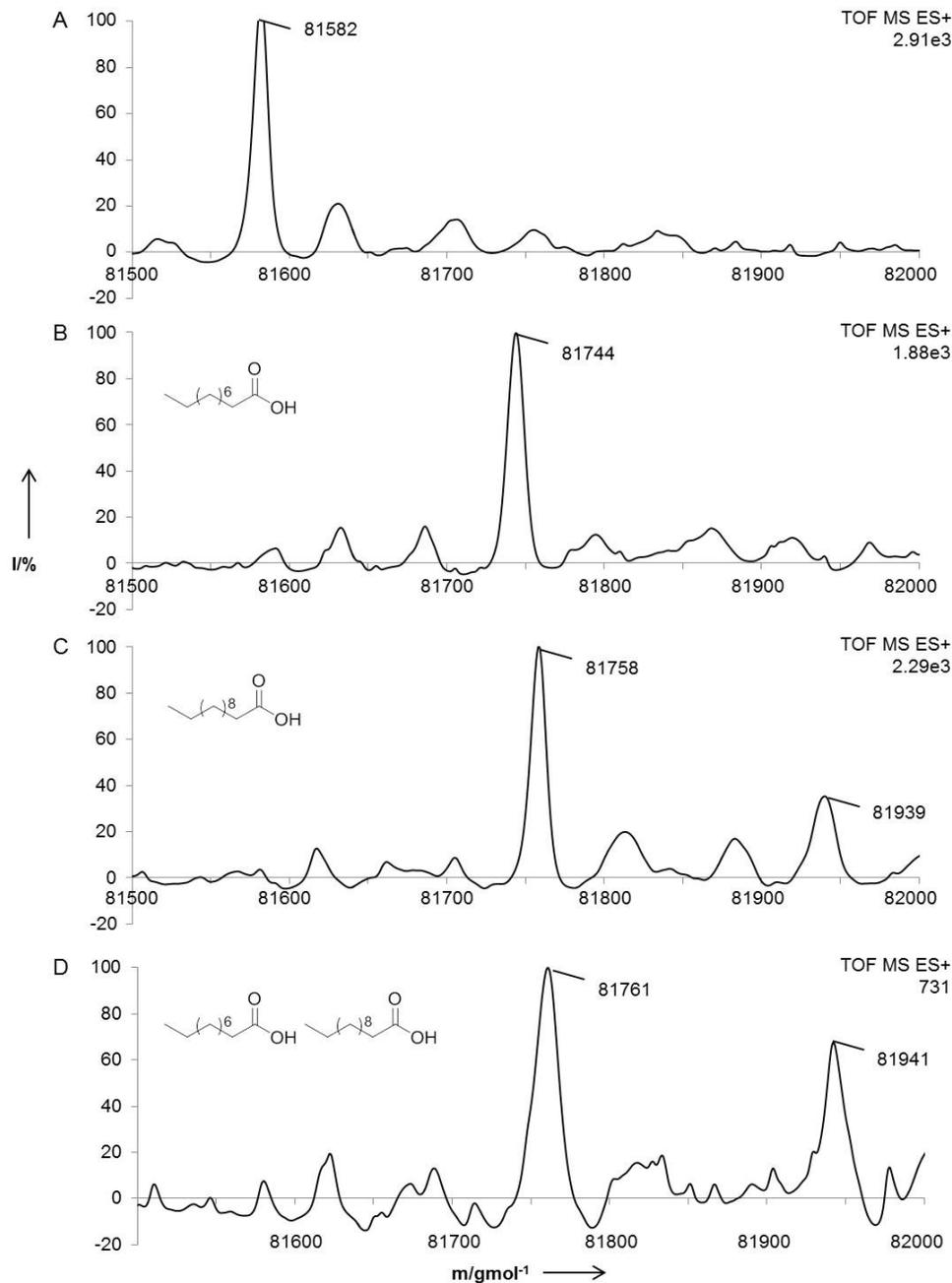


**Abbildung 111:** HPLC-MS-Analyse der kompetitiven ACP-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol) und Dodecansäure (**135**, 200 g/mol). A) Die TIC-Spur für die Inkubation von *holo*-AmbG mit **134** und **135** zeigt breite Peaks bei ca. 7 min und 7.91 min. Diese repräsentieren beide Acyl-Adenylate für B) bei 6.76 min, für die Massenspur M = 502 (C10-AMP, **184**) und C) bei 7.91 min, für die Massenspur M = 530 (C12-AMP, **186**) X-Achse: Retentionszeit, Y-Achse: relative Intensität.

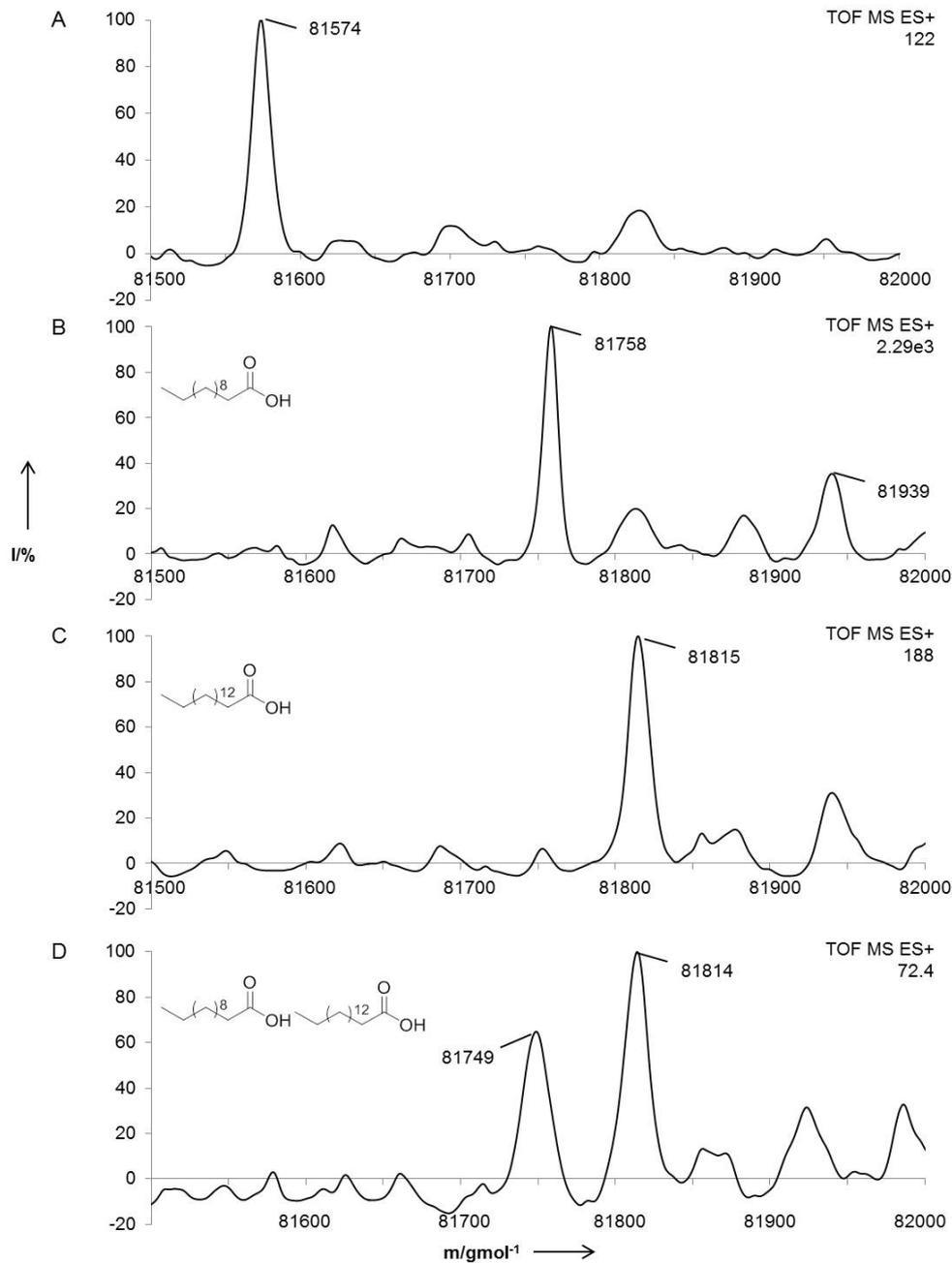
### 6.0.8.3 Kompetitionsstudien



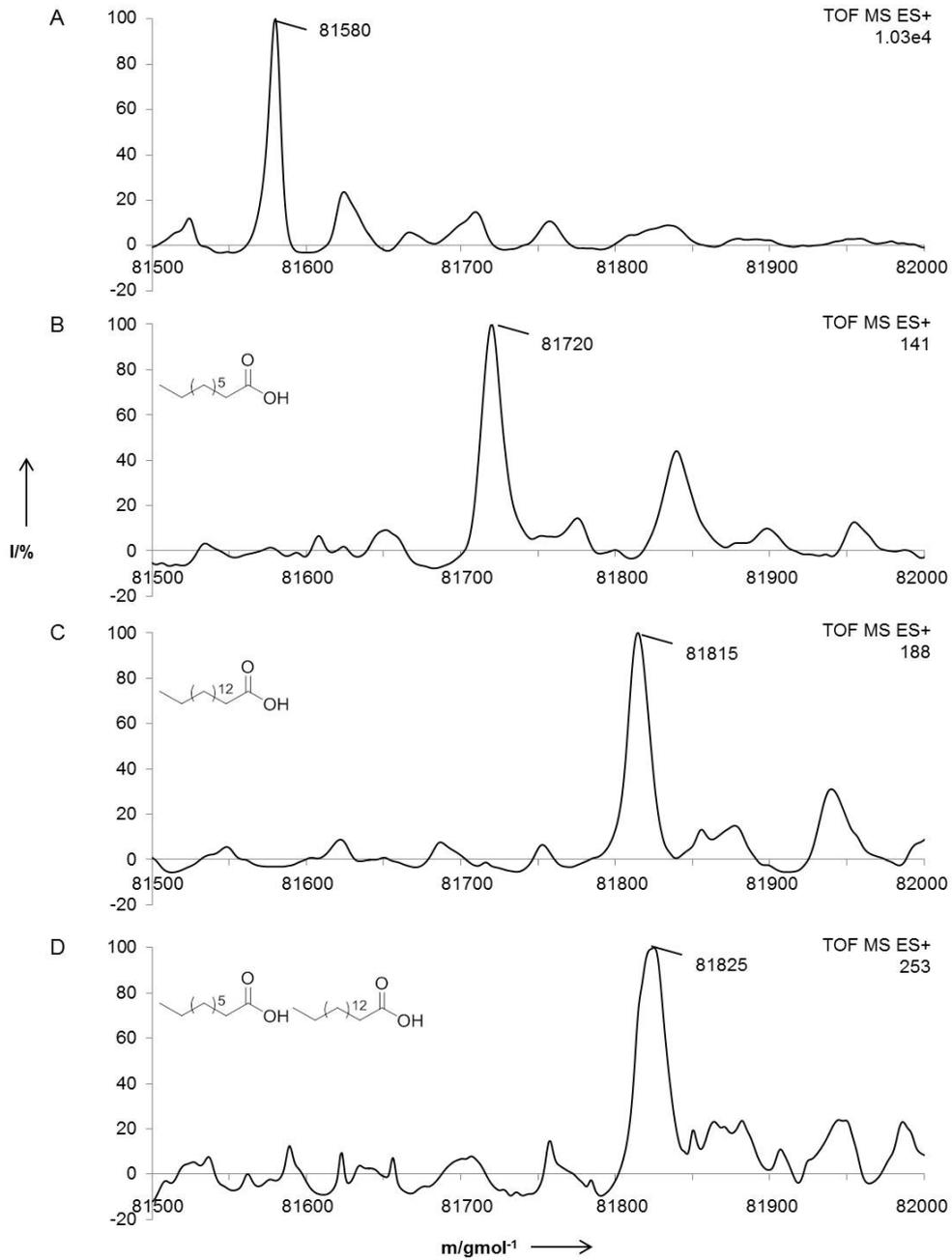
**Abbildung 112:** Dekonvolvierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60 μM Nonansäure (**160**, 158 g/mol) und Decansäure (**134**, 172 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.574 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **160** führt zur vollständigen Acylierung (81.720 kDa, 73 ppm). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **134** führt zur vollständigen Acylierung (81.731 kDa, 37 ppm). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **160** und **134** führt zur vollständigen Acylierung mit **134** (81.728 kDa).



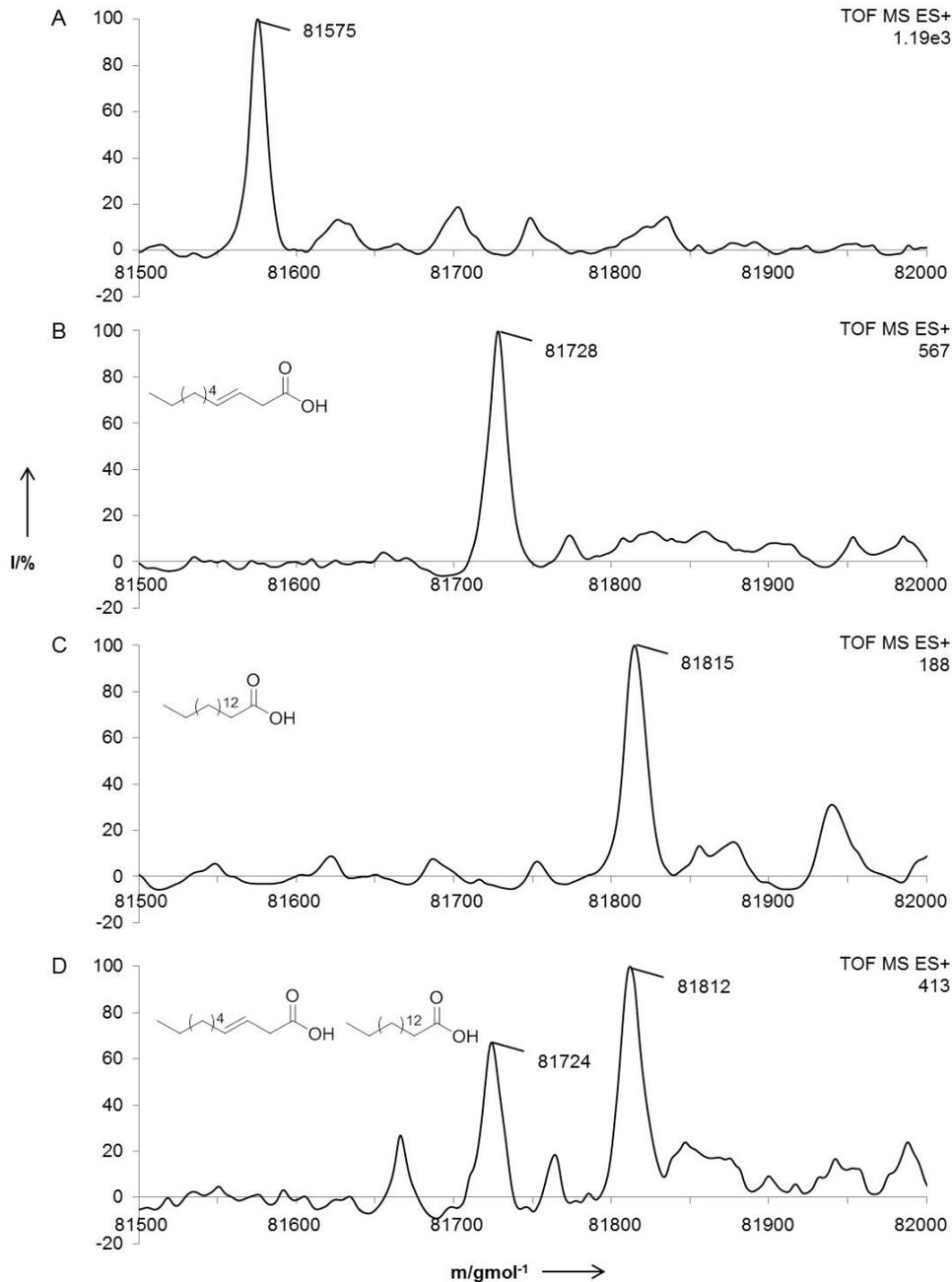
**Abbildung 113:** Dekonvolutierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu$ M Decansäure (**134**, 172 g/mol) und Dodecansäure (**135**, 200 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.582 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** führt zur vollständigen Acylierung (81.744 kDa, 98 ppm). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **135** führt zur vollständigen einfachen (81.758 kDa, 73 ppm, 100%\*) und doppelten Acylierung (81.939 kDa, 85 ppm, <50%\*). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu$ M **134** und **135** führt zur vollständigen einfachen (81.761 kDa, 37 ppm, 100%\*) und doppelten Acylierung mit **135** (81.942 kDa, 49 ppm, >50%\*). \*Normalisierte Signalintensität



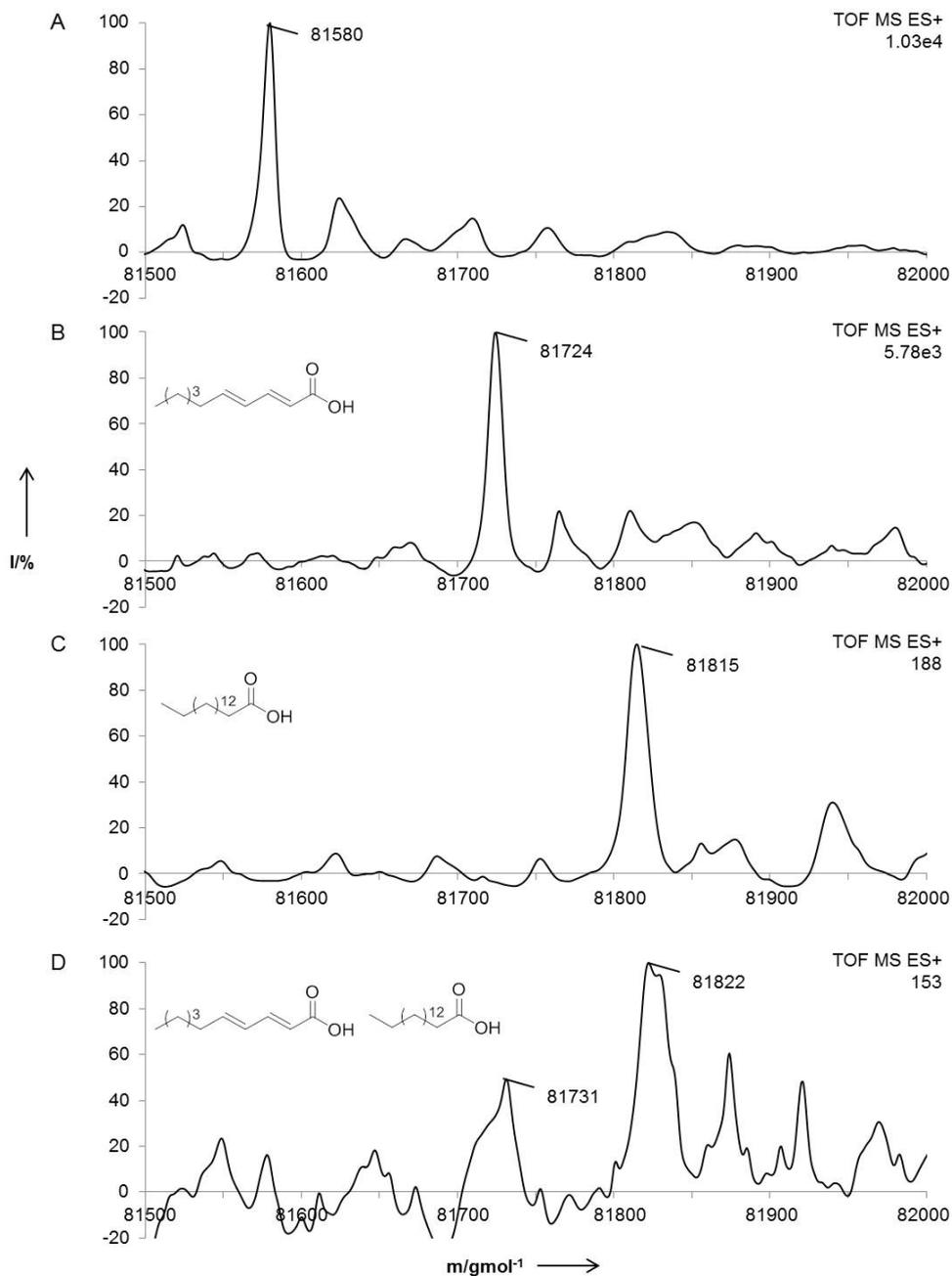
**Abbildung 114:** Dekonvolvierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60 μM Dodecansäure (**135**, 200 g/mol) und Hexadecansäure (**162**, 256 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.574 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **135** führt zur vollständigen einfachen (81.758 kDa, 24 ppm, 100%\*) und doppelten Acylierung (81.939 kDa, 12 ppm, <50%\*). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **162** führt zur vollständigen Acylierung (81.815 kDa, 37 ppm). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60 μM **135** und **162** führt zur vollständigen einfachen Acylierung mit **135** (81.749 kDa, 86 ppm, >50%\*) und mit **162** (81.814 kDa, 24 ppm, 100%\*). \*Normalisierte Signalintensität



**Abbildung 115:** Dekonvolutierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  Nonansäure (**160**, 158 g/mol) und Hexadecansäure (**162**, 256 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.580 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **160** führt zur vollständigen einfachen Acylierung (81.720 kDa, 73 ppm). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **162** führt zur vollständigen Acylierung (81.815 kDa, 36 ppm). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **160** und **162** führt zur vollständigen Acylierung mit **162** (81.825 kDa, 86 ppm). \*Normalisierte Signalintensität



**Abbildung 116:** Dekonvolutierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  (3*E*)-Decensäure (**174**, 170 g/mol) und Hexadecensäure (**162**, 256 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.575 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **174** führt zur vollständigen einfachen Acylierung (81.728 kDa, 12 ppm). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **162** führt zur vollständigen Acylierung (81.815 kDa, 36 ppm). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **174** und **162** führt zur vollständigen Acylierung mit **174** (81.724 kDa, 37 ppm, >50%\*) und **162** (81.812 kDa, 12 ppm, 100%\*). \*Normalisierte Signalintensität



**Abbildung 117:** Dekonvolvierte Massenspektren der kompetitiven APC-Transfer-Assays mit 60  $\mu\text{M}$  (2*E*,4*E*)-Deca-2,4-diensäure (**175**, 168 g/mol) und Hexadecansäure (**162**, 256 g/mol). A) *holo*-AmbG unter Testbedingungen (81.580 kDa). B) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **175** führt zur vollständigen einfachen Acylierung (81.724 kDa, 24 ppm). C) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **162** führt zur vollständigen Acylierung (81.815 kDa, 36 ppm). D) Die Inkubation von *holo*-AmbG mit 60  $\mu\text{M}$  **175** und **162** führt zur vollständigen Acylierung mit **175** (81.731 kDa, 12 ppm, <50%\*) und **162** (81.822 kDa, 37 ppm, 100%\*). \*Normalisierte Signalintensität

## 6.0.8.4 Ambruticin-Spektren

### Elemental Composition Report

Page 1

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

3434 formula(e) evaluated with 64 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

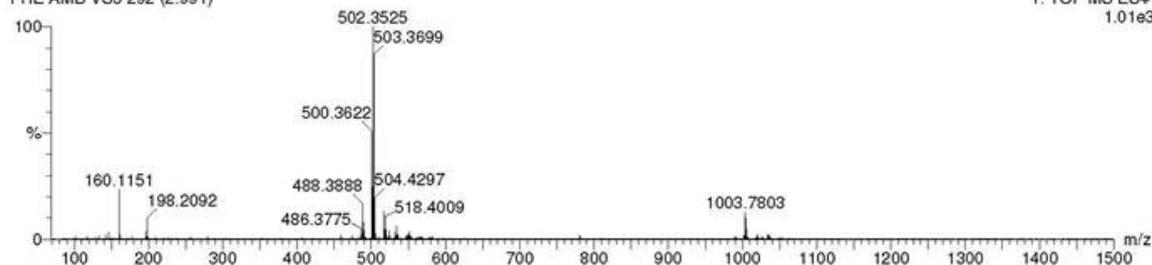
Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20 F: 0-3 Na: 0-1

Hemmerling

FHE AMB VS3 292 (2.991)

1: TOF MS ES+  
1.01e3



Minimum: -0.5  
Maximum: 5.0 50.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
502.3525	502.3474	5.1	10.2	16.5	C37 H44 N
	502.3450	7.5	14.9	13.5	C35 H45 N Na
	502.3685	-16.0	-31.9	11.5	C34 H48 N O2
	502.3485	4.0	8.0	12.5	C34 H45 N O F
	502.3598	-7.3	-14.5	12.5	C33 H45 N3 F
	502.3661	-13.6	-27.1	8.5	C32 H49 N O2 Na
	502.3661	-13.6	-27.1	8.5	C32 H47 N F3
	502.3461	6.4	12.7	9.5	C32 H46 N O F Na
	502.3434	9.1	18.1	12.5	C32 H44 N3 O2
	502.3696	-17.1	-34.0	7.5	C31 H49 N O3 F
	502.3573	-4.8	-9.6	9.5	C31 H46 N3 F Na
	502.3497	2.8	5.6	8.5	C31 H46 N O2 F2
	502.3532	-0.7	-1.4	7.5	C30 H48 N O5
	502.3637	-11.2	-22.3	5.5	C30 H48 N F3 Na
	502.3609	-8.4	-16.7	8.5	C30 H46 N3 O F2

Abbildung 118: HRMS der Referenzprobe Ambruticin VS3 (74) aus der Reinprobe.

## Elemental Composition Report

Page 1

## Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

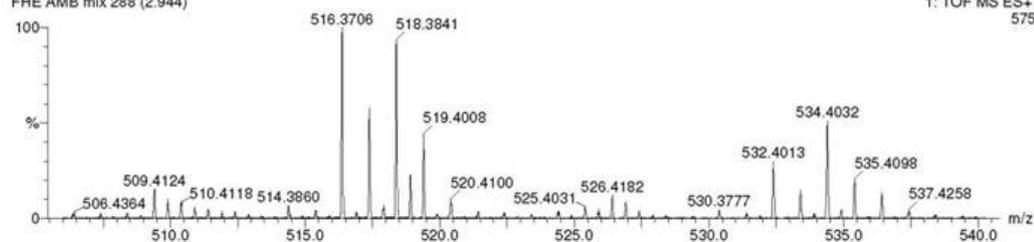
511 formula(e) evaluated with 11 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20

Hammerling

FHE AMB mix 288 (2.944)

1: TOF MS ES+  
575

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
516.3706	516.3630	7.6	14.7	16.5	C38 H46 N
	516.3842	-13.6	-26.3	11.5	C35 H50 N O2
	516.3954	-24.8	-48.0	11.5	C34 H50 N3 O
	516.3478	22.8	44.2	12.5	C34 H46 N O3
	516.3590	11.6	22.5	12.5	C33 H46 N3 O2
	516.3689	14.7	3.3	7.5	C31 H50 N O5
	516.3801	-9.5	-18.4	7.5	C30 H50 N3 O4
	516.3900	-19.4	-37.6	2.5	C28 H54 N O7
	516.3536	17.0	32.9	3.5	C27 H50 N O8
	516.3649	5.7	11.0	3.5	C26 H50 N3 O7
	516.3496	21.0	40.7	-0.5	C22 H50 N3 O10

Abbildung 119: HRMS der Referenzprobe Ambruticin VS1 (72) aus der Mischprobe.

## Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

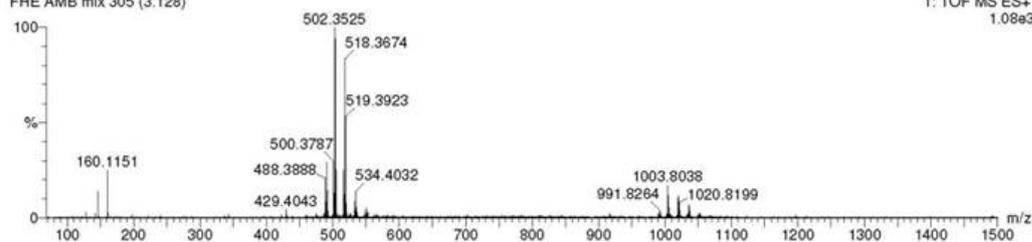
490 formula(e) evaluated with 11 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20

Hammerling

FHE AMB mix 305 (3.128)

1: TOF MS ES+  
1.08e3

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
502.3525	502.3532	-0.7	-1.4	7.5	C30 H48 N O5
	502.3492	3.3	6.6	3.5	C25 H48 N3 O7
	502.3474	5.1	10.2	16.5	C37 H44 N
	502.3434	9.1	18.1	12.5	C32 H44 N3 O2
	502.3645	-12.0	-23.9	7.5	C29 H48 N3 O4
	502.3380	14.5	28.9	3.5	C26 H48 N O8
	502.3685	-16.0	-31.9	11.5	C34 H48 N O2
	502.3340	18.5	36.8	-0.5	C21 H48 N3 O10
	502.3321	20.4	40.6	12.5	C33 H44 N O3
	502.3744	-21.9	-43.6	2.5	C27 H52 N O7
	502.3281	24.4	48.6	8.5	C28 H44 N3 O5

Abbildung 120: HRMS der Referenzprobe Ambruticin VS3 (74) aus der Mischprobe.

## Elemental Composition Report

Page 1

## Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

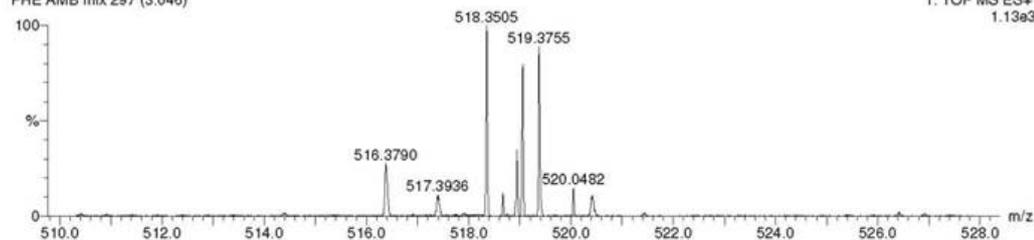
511 formula(e) evaluated with 12 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20

Hammerling

FHE AMB mix 297 (3.046)

1: TOF MS ES+  
1.13e3

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
518.3505	518.3482	2.3	4.4	7.5	C30 H48 N O6
	518.3535	-3.0	-5.8	16.5	C36 H44 N3
	518.3441	6.4	12.3	3.5	C25 H48 N3 O8
	518.3423	8.2	15.8	16.5	C37 H44 N O
	518.3594	-8.9	-17.2	7.5	C29 H48 N3 O5
	518.3383	12.2	23.5	12.5	C32 H44 N3 O3
	518.3634	-12.9	-24.9	11.5	C34 H48 N O3
	518.3329	17.6	34.0	3.5	C26 H48 N O9
	518.3693	-18.8	-36.3	2.5	C27 H52 N O8
	518.3289	21.6	41.7	-0.5	C21 H48 N3 O11
	518.3270	23.5	45.3	12.5	C33 H44 N O4
	518.3747	-24.2	-46.7	11.5	C33 H48 N3 O2

Abbildung 121: HRMS der Referenzprobe Ambruticin VS3-NO (75) aus der Mischprobe.

## Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

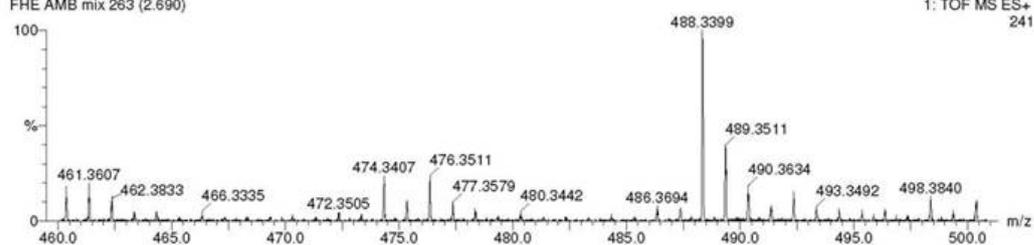
476 formula(e) evaluated with 11 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20

Hammerling

FHE AMB mix 263 (2.690)



Minimum:

Maximum:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
488.3399	488.3376	2.3	4.7	7.5	C29 H46 N O5
488.3336		6.3	12.9	3.5	C24 H46 N3 O7
488.3317		8.2	16.8	16.5	C36 H42 N
488.3488		-8.9	-18.2	7.5	C28 H46 N3 O4
488.3277		12.2	25.0	12.5	C31 H42 N3 O2
488.3529		-13.0	-26.6	11.5	C33 H46 N O2
488.3223		17.6	36.0	3.5	C25 H46 N O8
488.3587		-18.8	-38.5	2.5	C26 H50 N O7
488.3183		21.6	44.2	-0.5	C20 H46 N3 O10
488.3165		23.4	47.9	12.5	C32 H42 N O3
488.3641		-24.2	-49.6	11.5	C32 H46 N3 O

Abbildung 122: HRMS der Referenzprobe Ambruticin VS4 (76) aus der Mischprobe.

## Elemental Composition Report

Page 1

## Single Mass Analysis

Tolerance = 50.0 PPM / DBE: min = -0.5, max = 50.0

Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

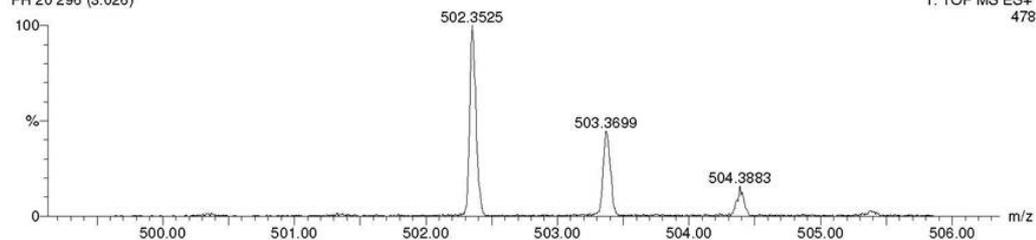
490 formula(e) evaluated with 11 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-70 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-20

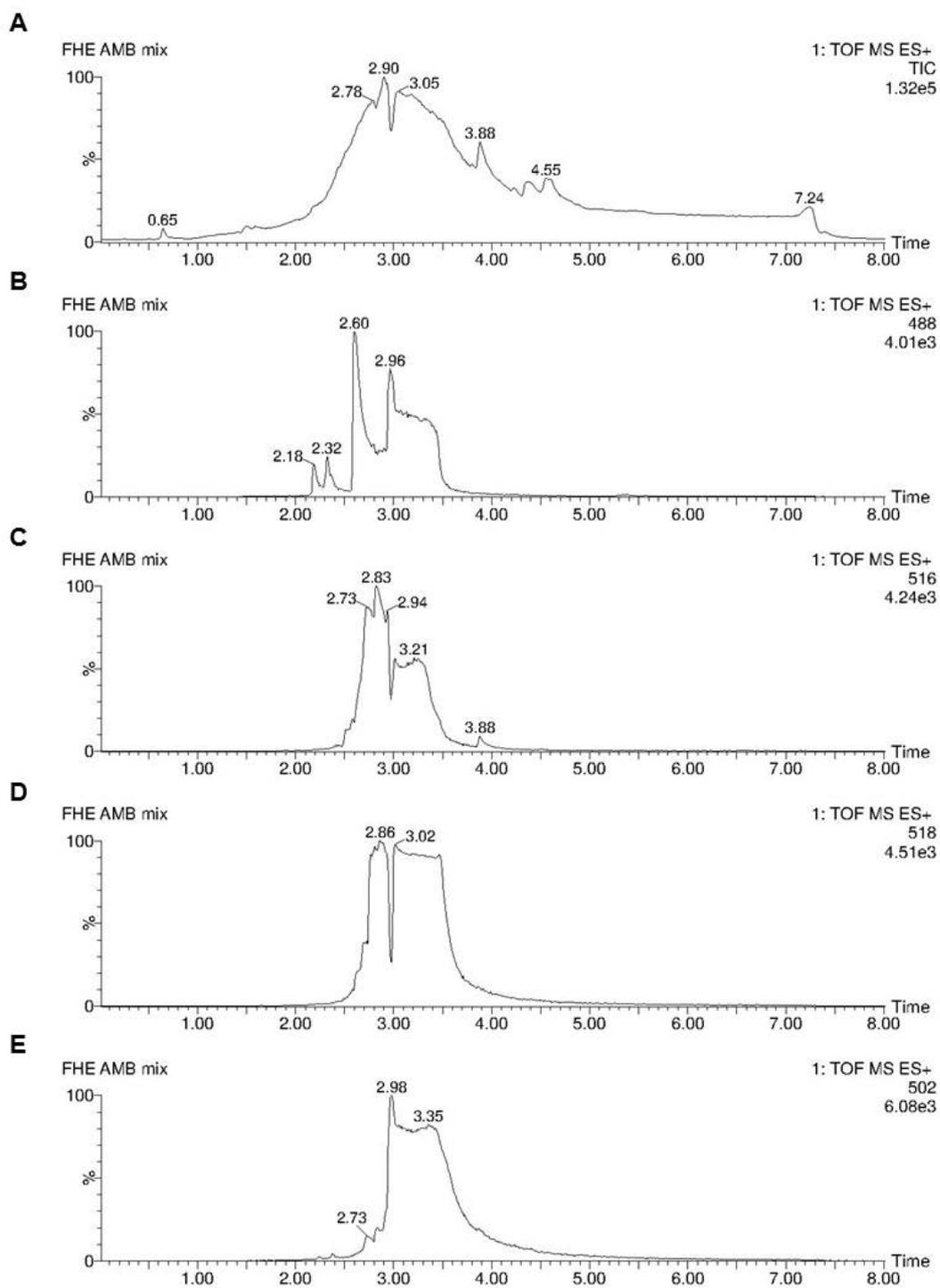
Hammerling

FH 20 296 (3.026)

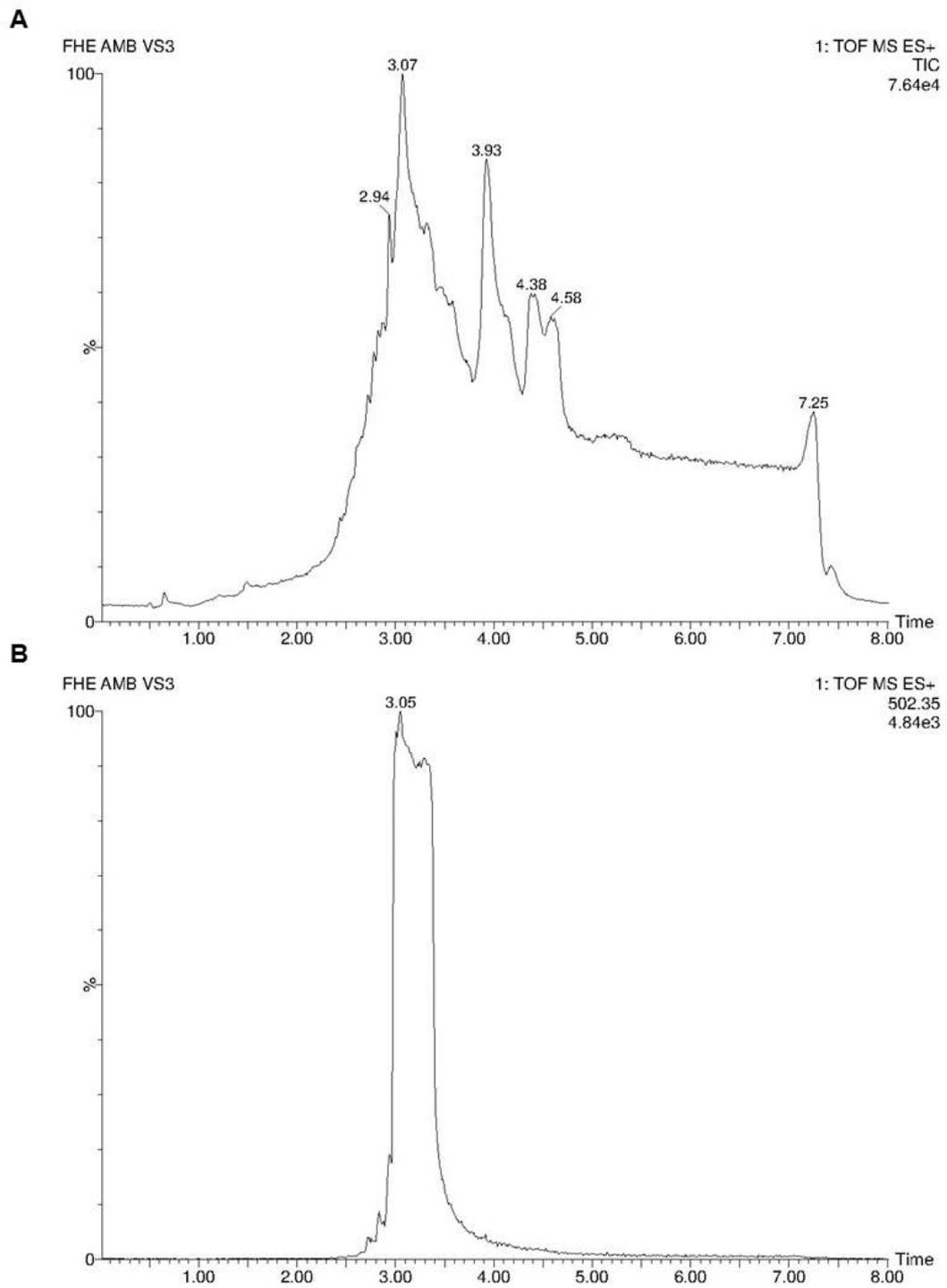


Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
502.3525	502.3532	-0.7	-1.4	7.5	C30 H48 N O5
	502.3492	3.3	6.6	3.5	C25 H48 N3 O7
	502.3474	5.1	10.2	16.5	C37 H44 N
	502.3434	9.1	18.1	12.5	C32 H44 N3 O2
	502.3645	-12.0	-23.9	7.5	C29 H48 N3 O4
	502.3380	14.5	28.9	3.5	C26 H48 N O8
	502.3685	-16.0	-31.9	11.5	C34 H48 N O2
	502.3340	18.5	36.8	-0.5	C21 H48 N3 O10
	502.3321	20.4	40.6	12.5	C33 H44 N O3
	502.3744	-21.9	-43.6	2.5	C27 H52 N O7
	502.3281	24.4	48.6	8.5	C28 H44 N3 O5

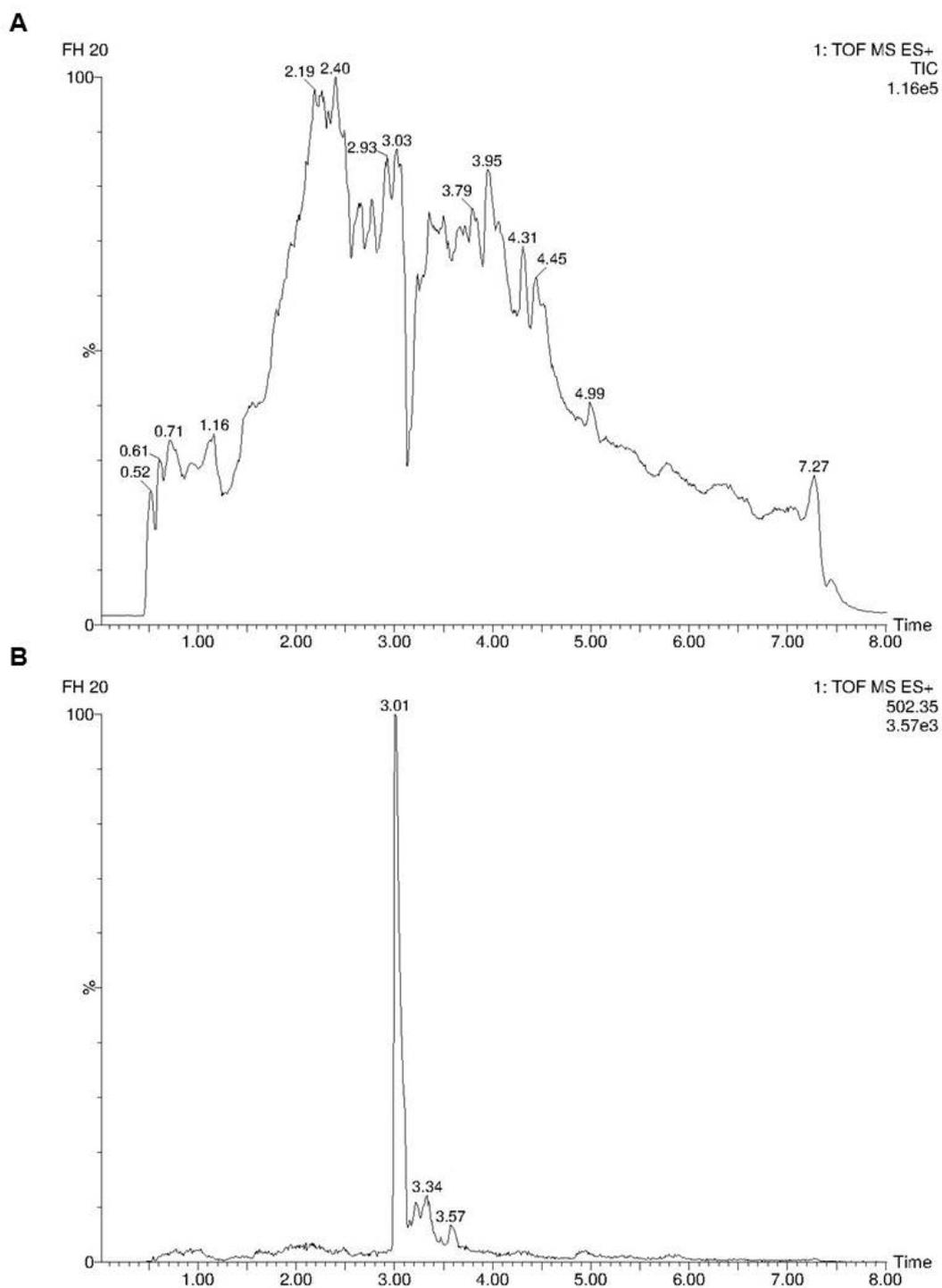
Abbildung 123: HRMS der isolierten Verbindung Ambruticin V3 (74).



**Abbildung 124:** UV-Chromatogramme der Ambruticine aus der Mischprobe. **A)** TIC, **B)** AmbVS4 (**76**), **C)** AmbVS1 (**72**), **D)** AmbVS3-NO (**75**), **E)** AmbVS3 (**74**).

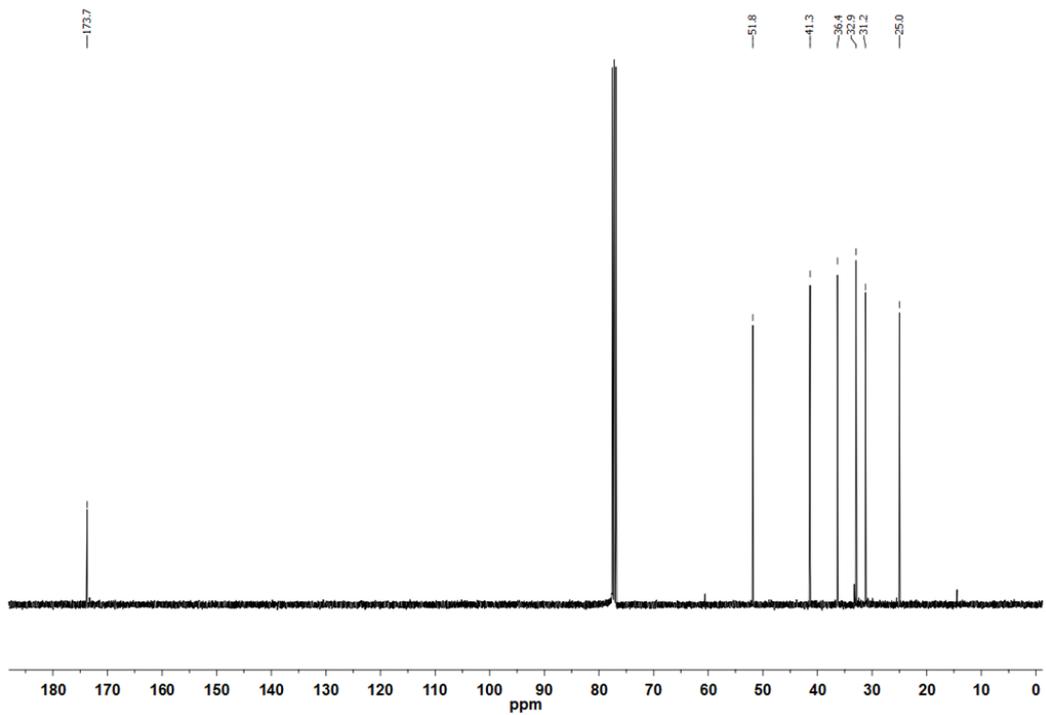
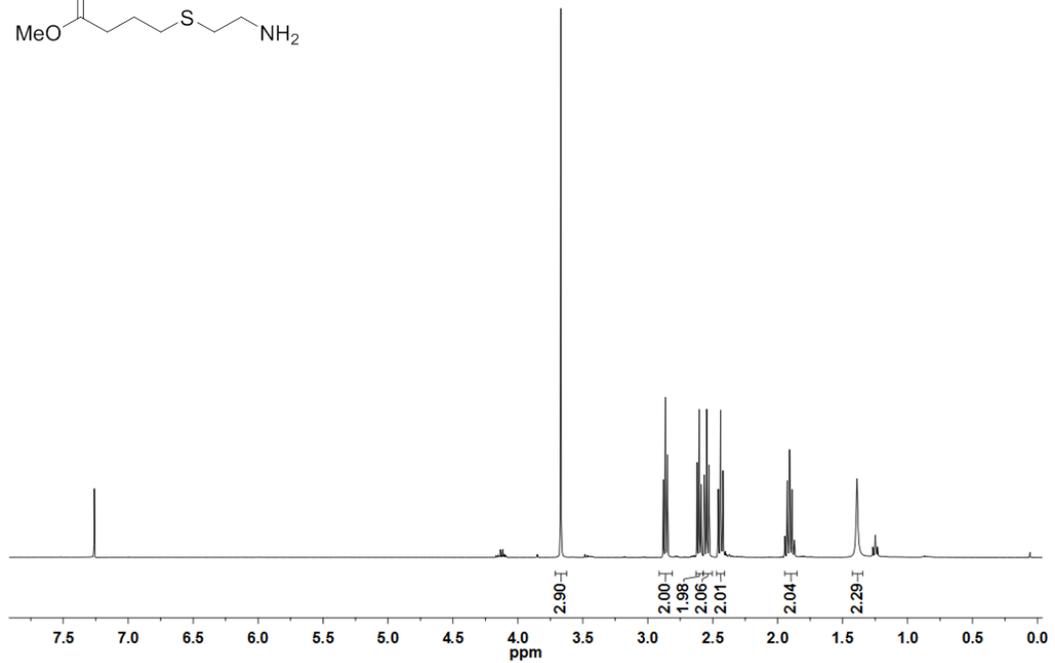
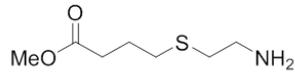


**Abbildung 125:** UV-Chromatogramm von Ambruticin VS3 (74) aus der Reinprobe. **A)** TIC, **B)** AmbVS3 (74).

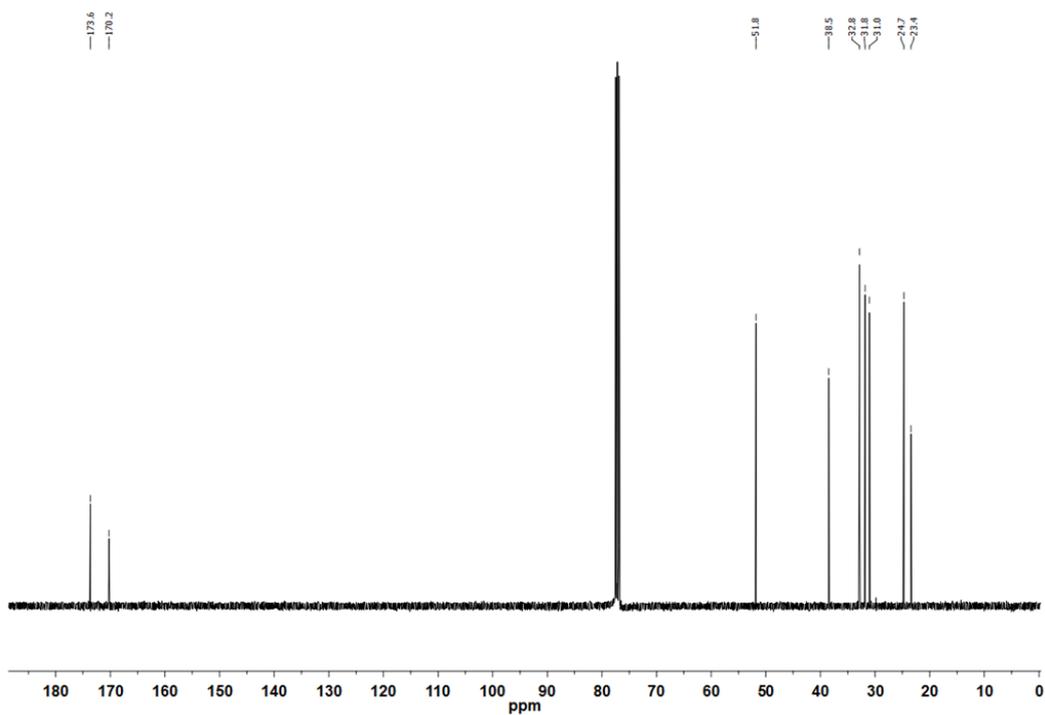
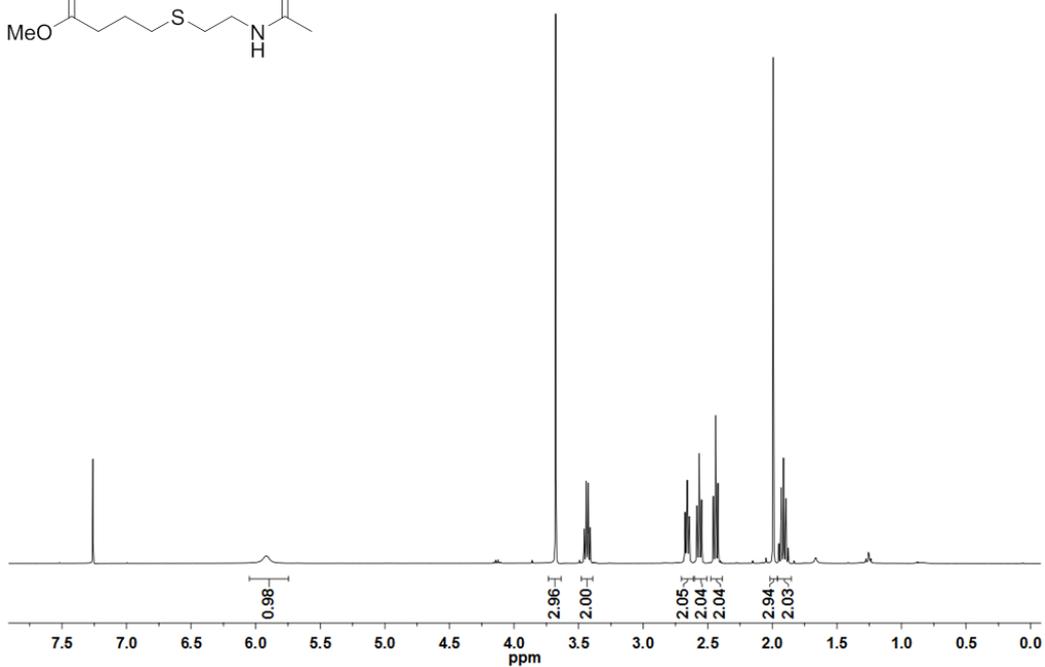
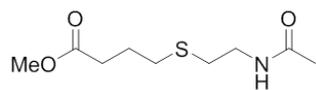


**Abbildung 126:** UV-Chromatogramm von Ambruticin VS3 (**74**), isoliert aus So ce10-Kulturüberstand. **A)** TIC, **B)** AmbVS3 (**74**).

## 6.0.9 NMR-Spektren

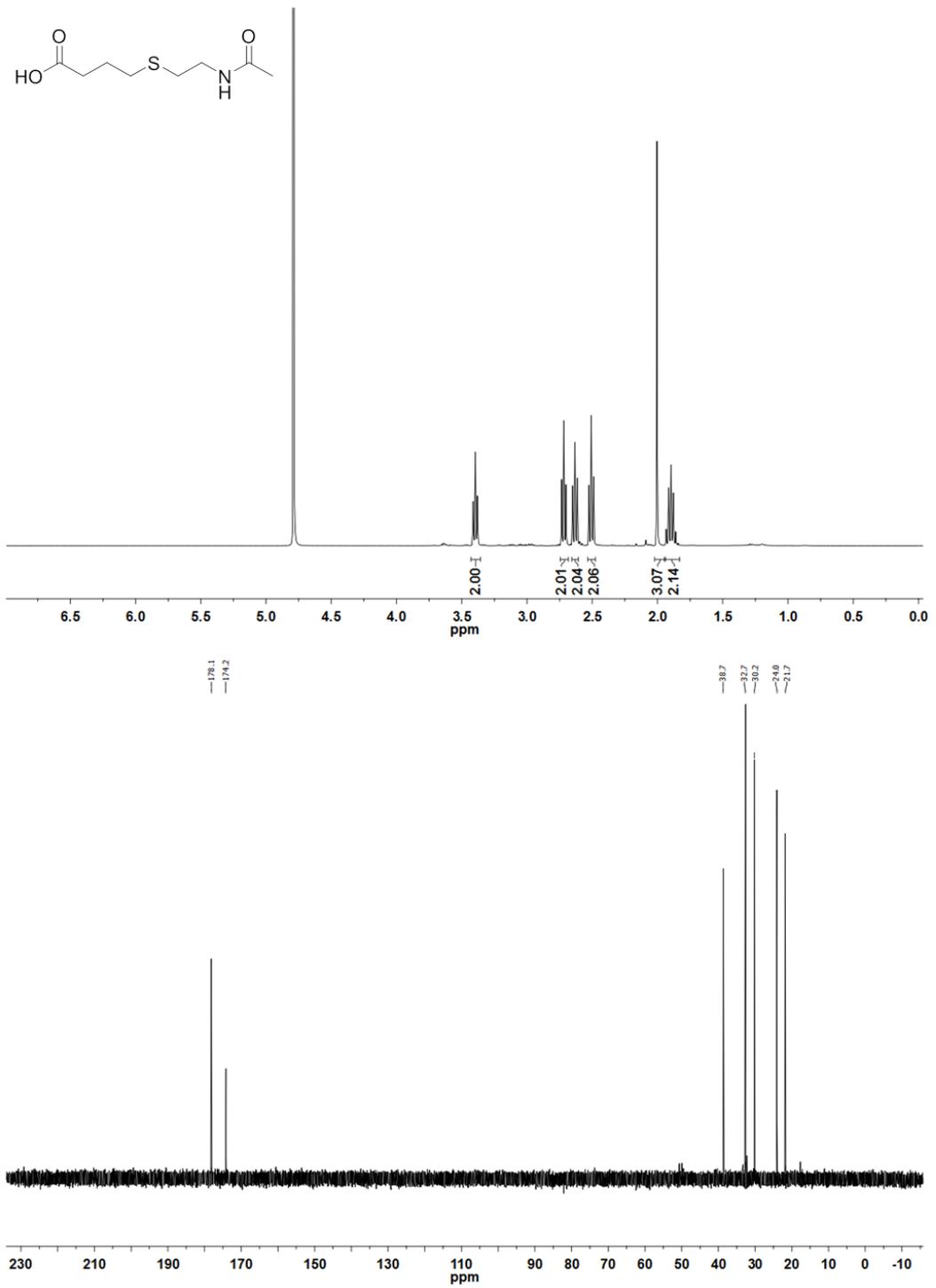
CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

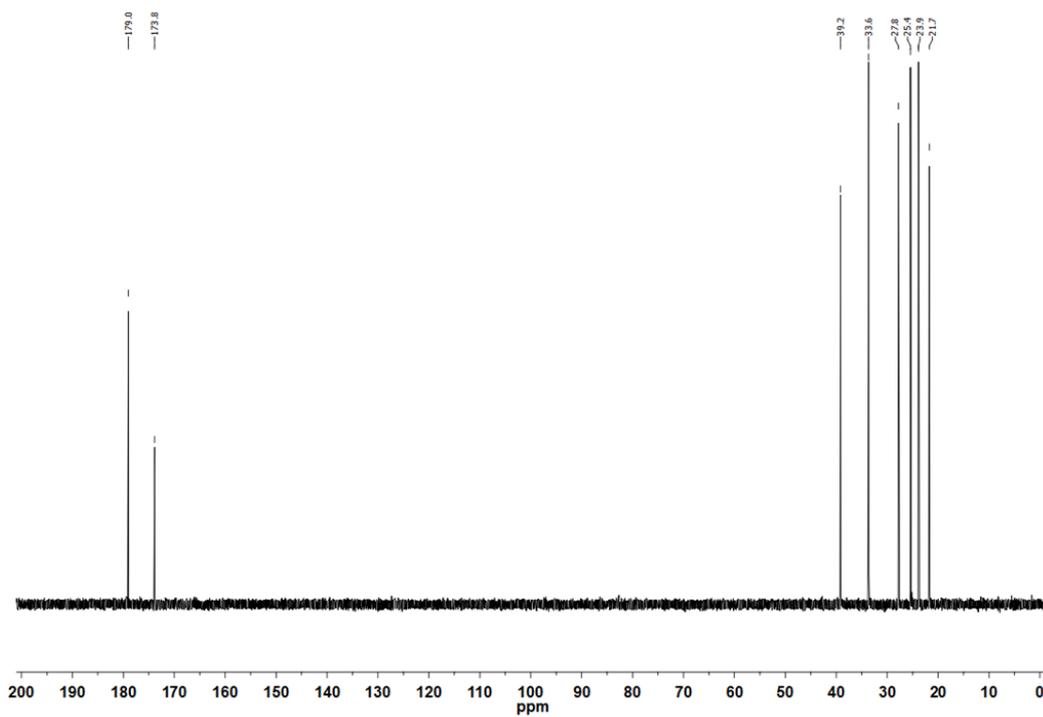
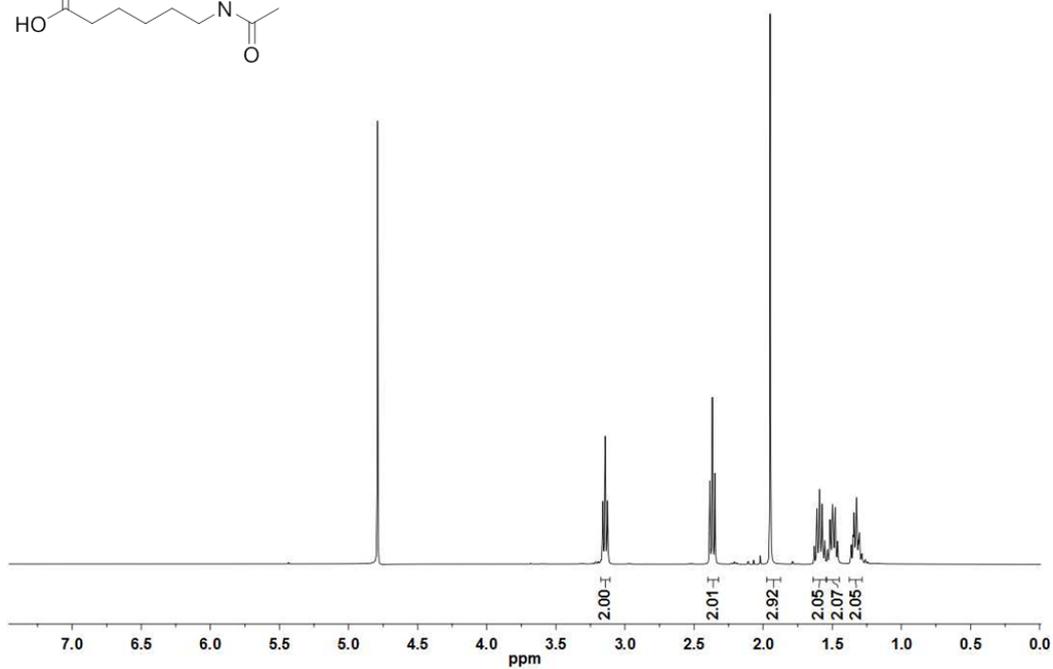
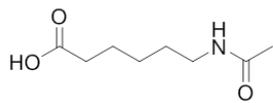


6 Anhang

D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

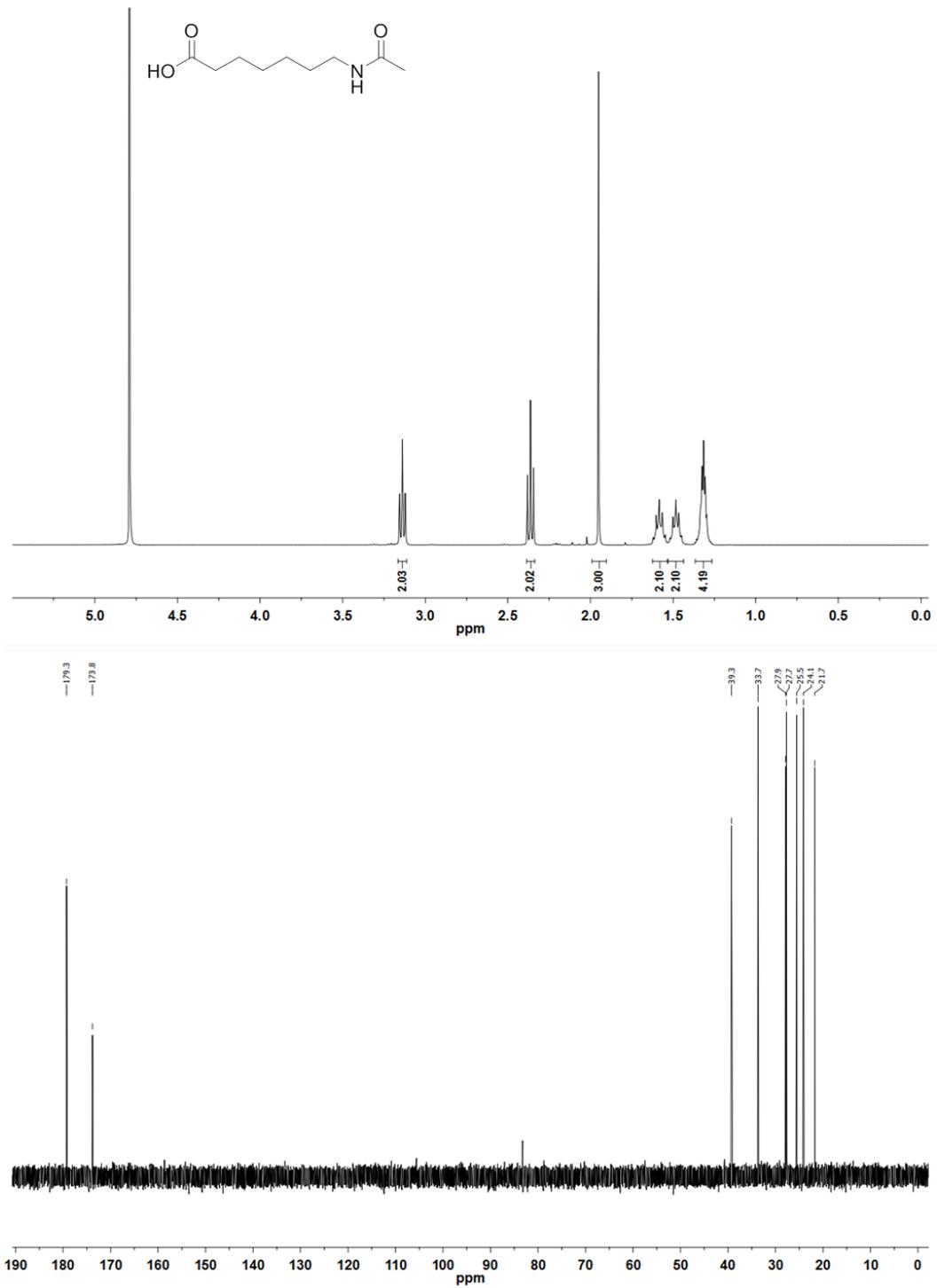


D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

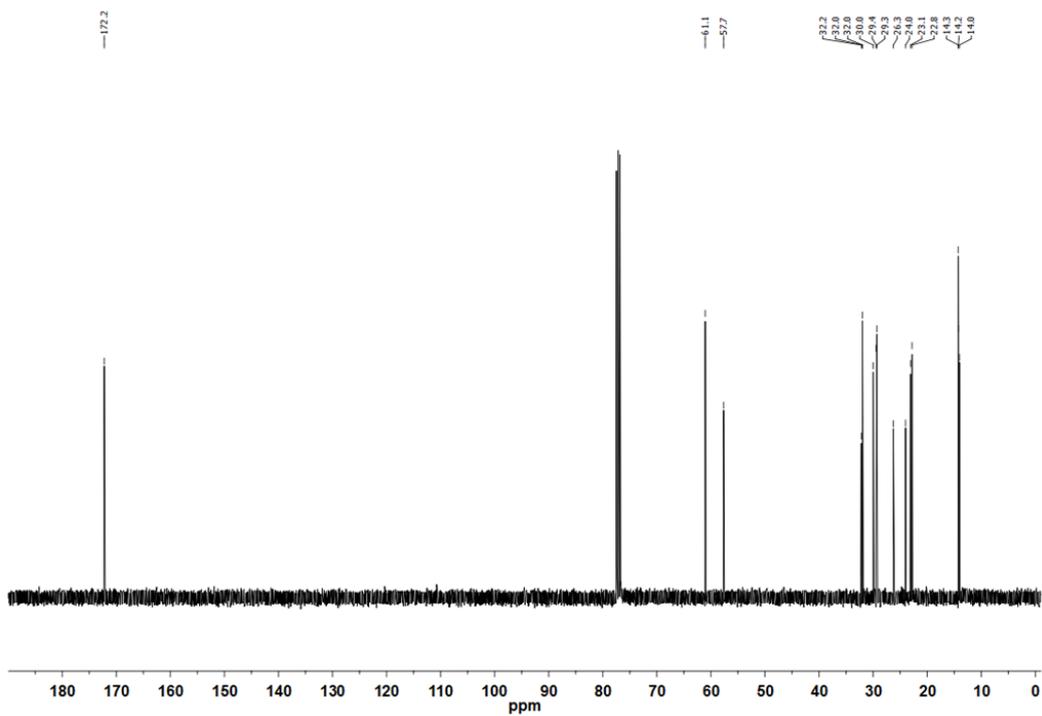
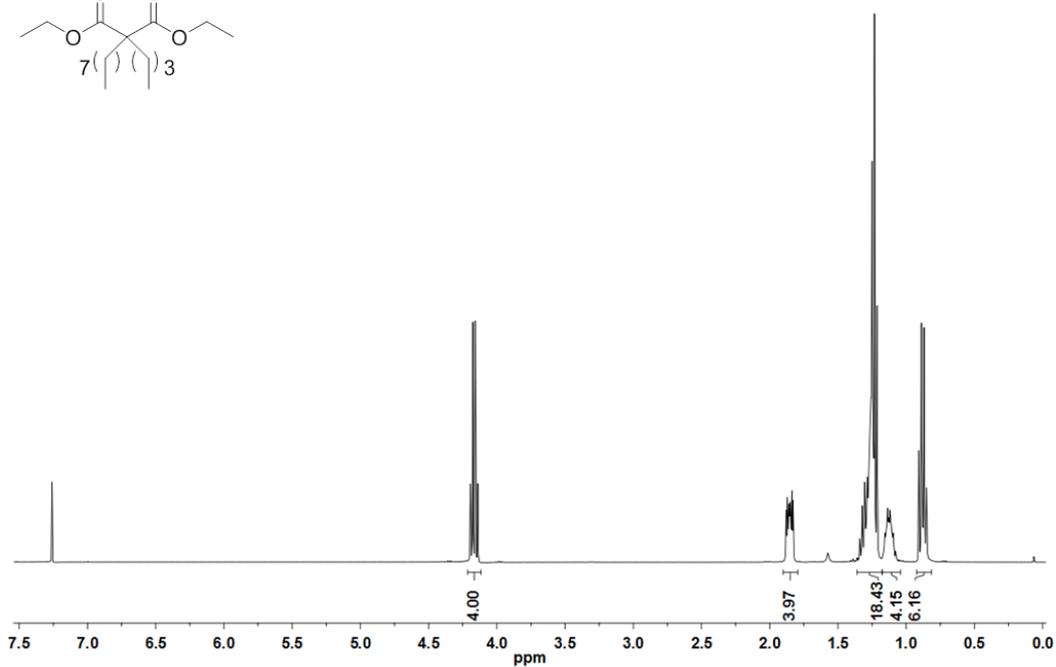
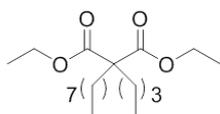


6 Anhang

D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

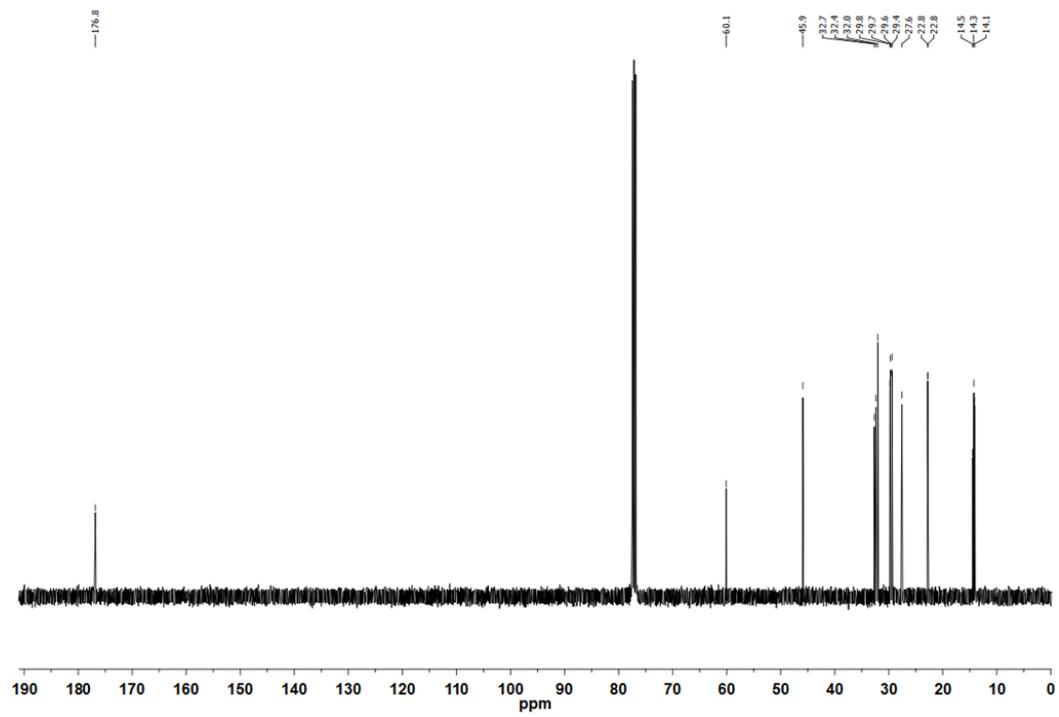
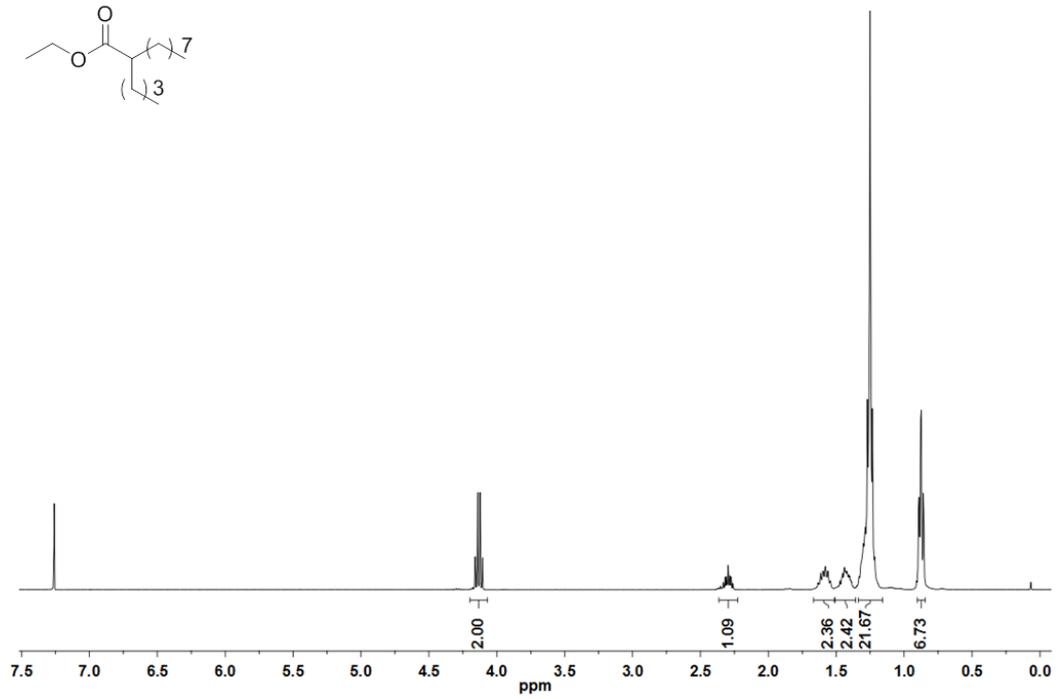
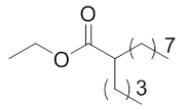


CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

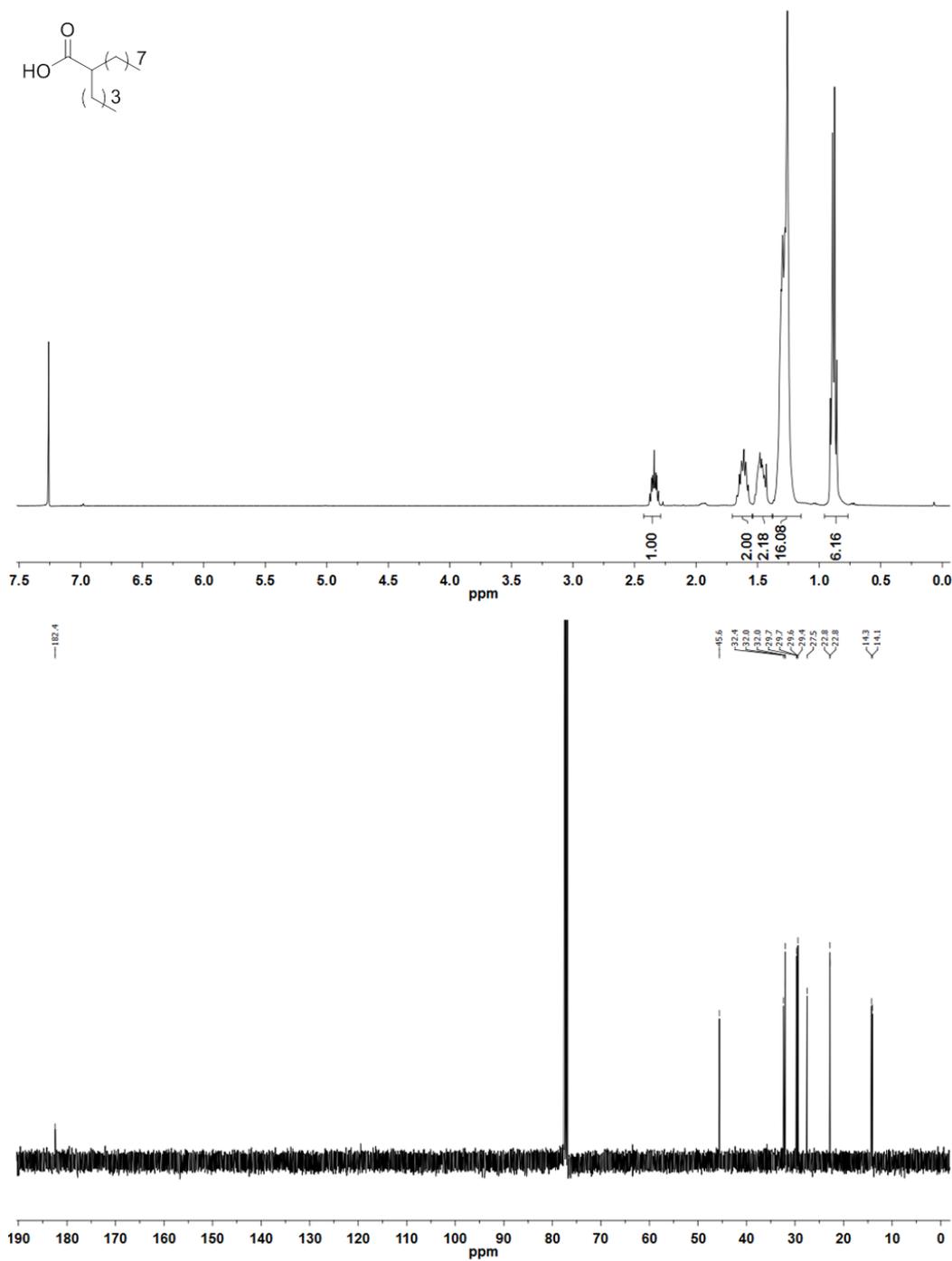


6 Anhang

CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

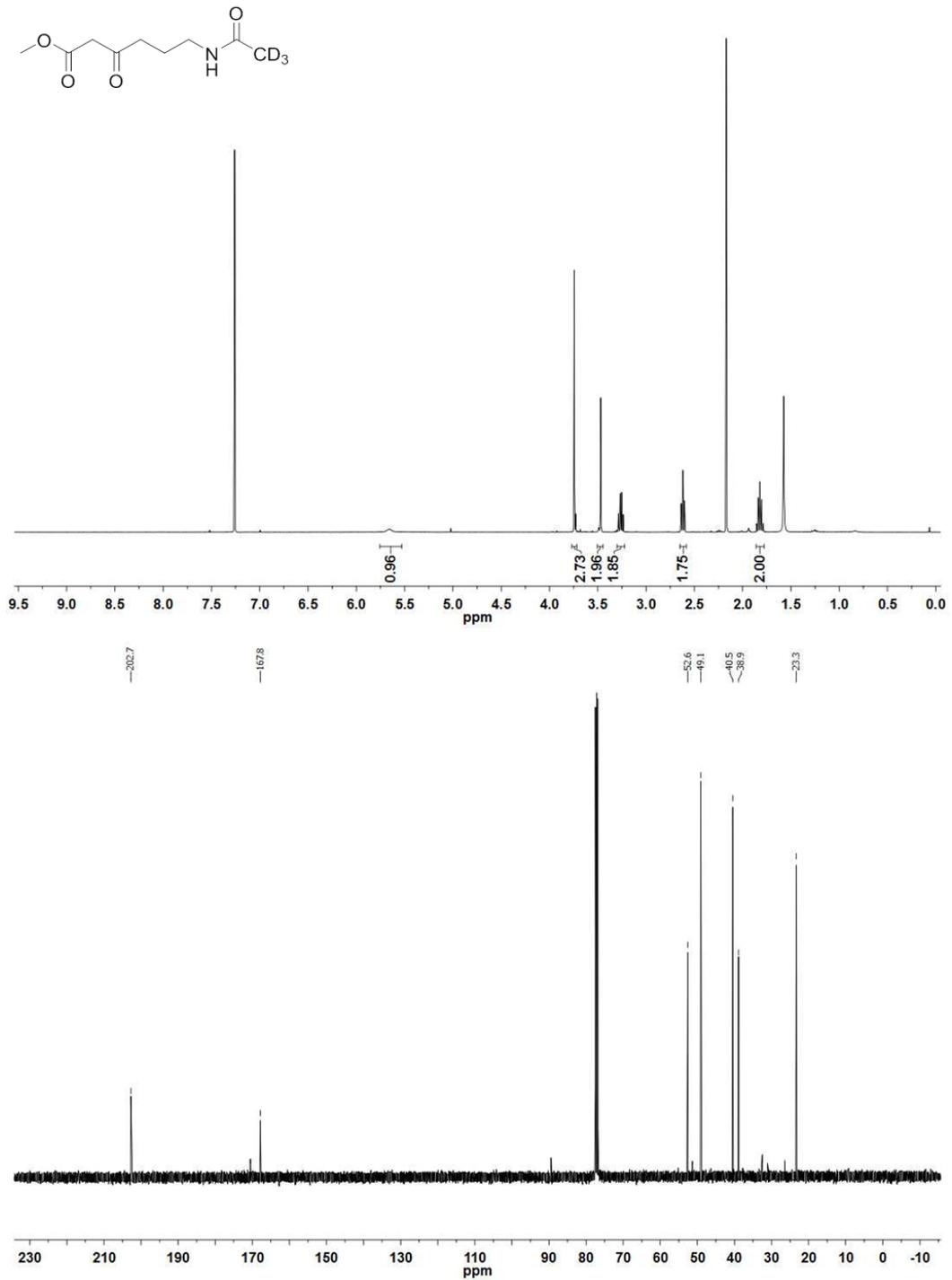


D<sub>2</sub>O, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

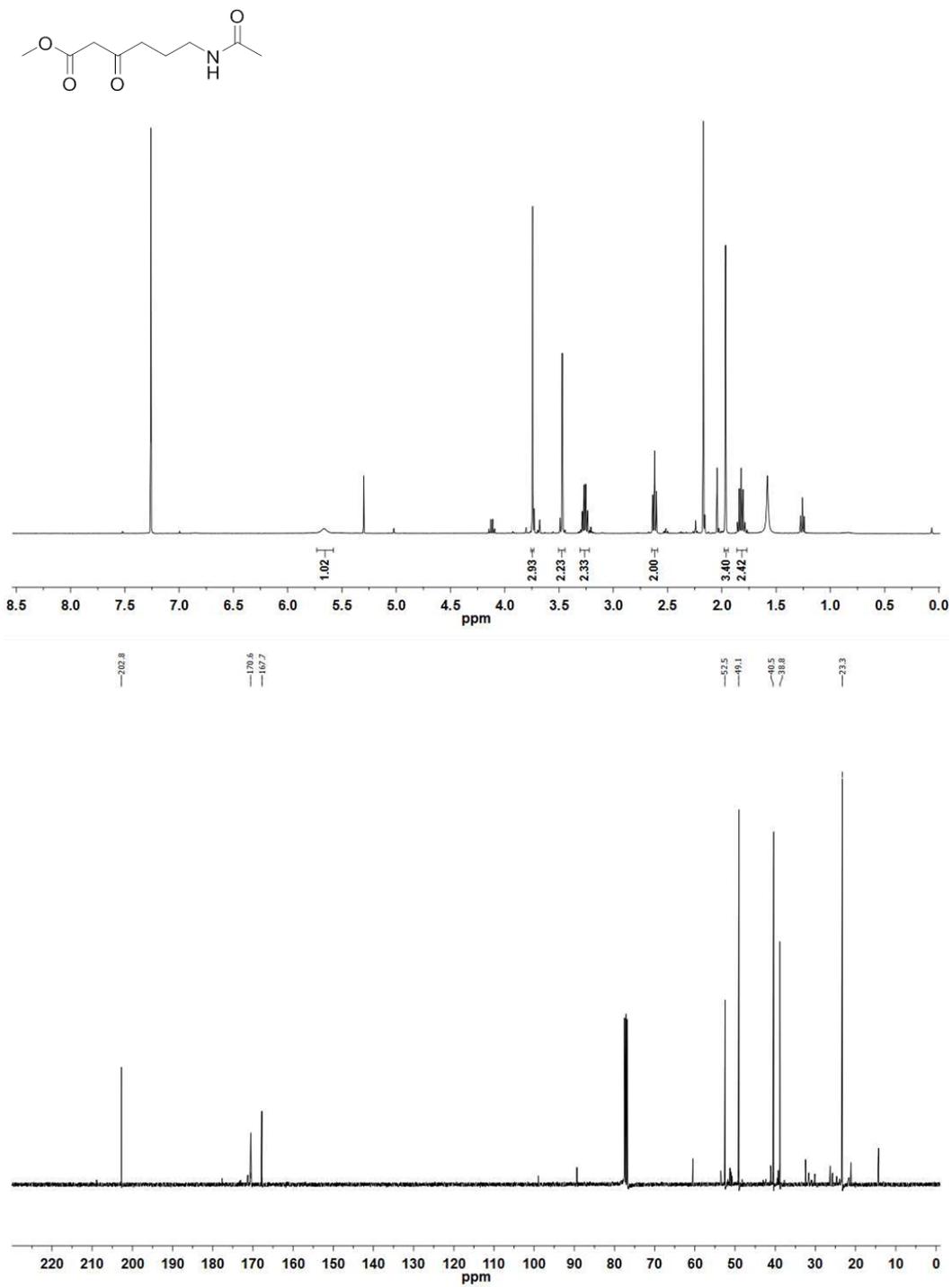


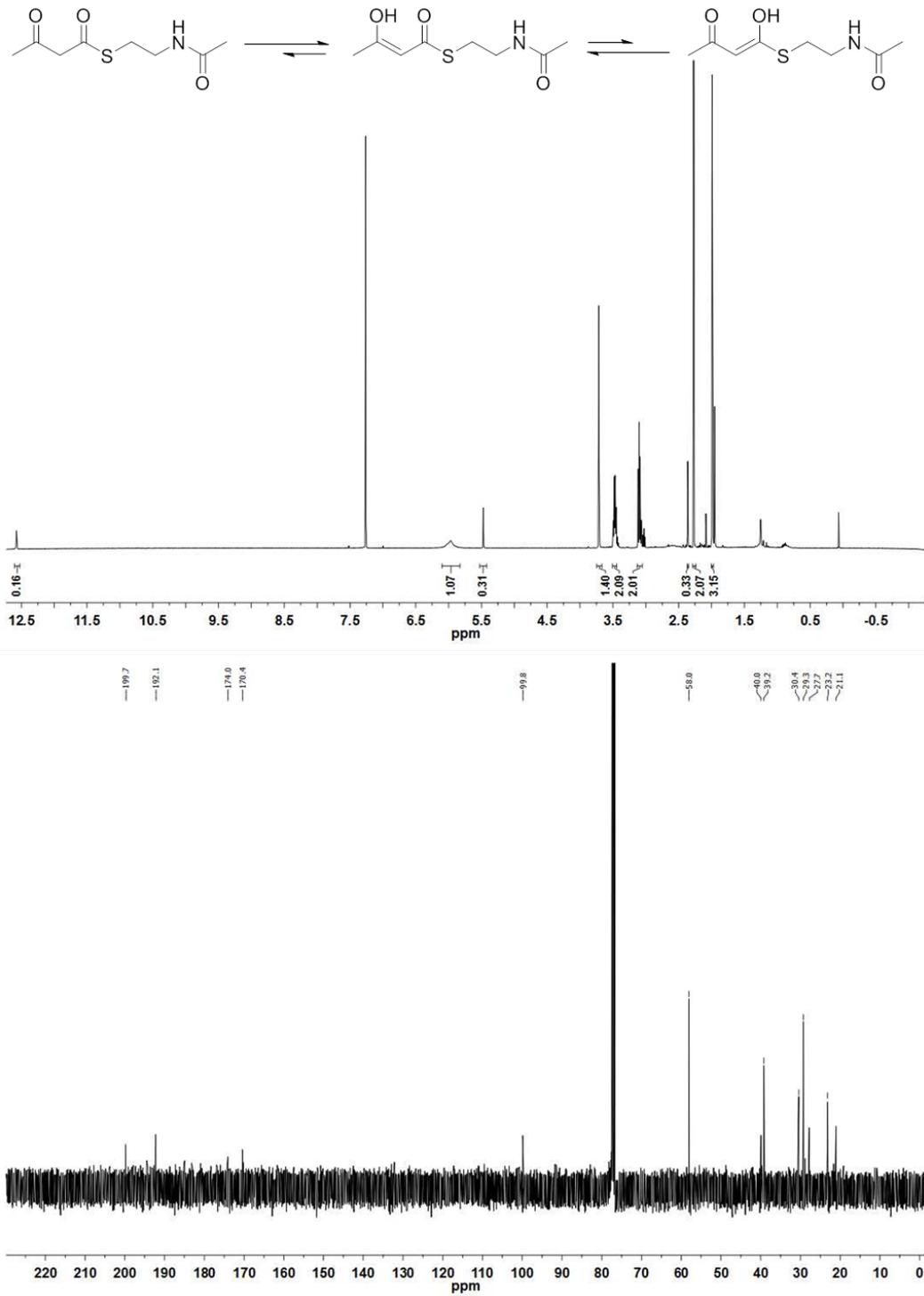
6 Anhang

$\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz)

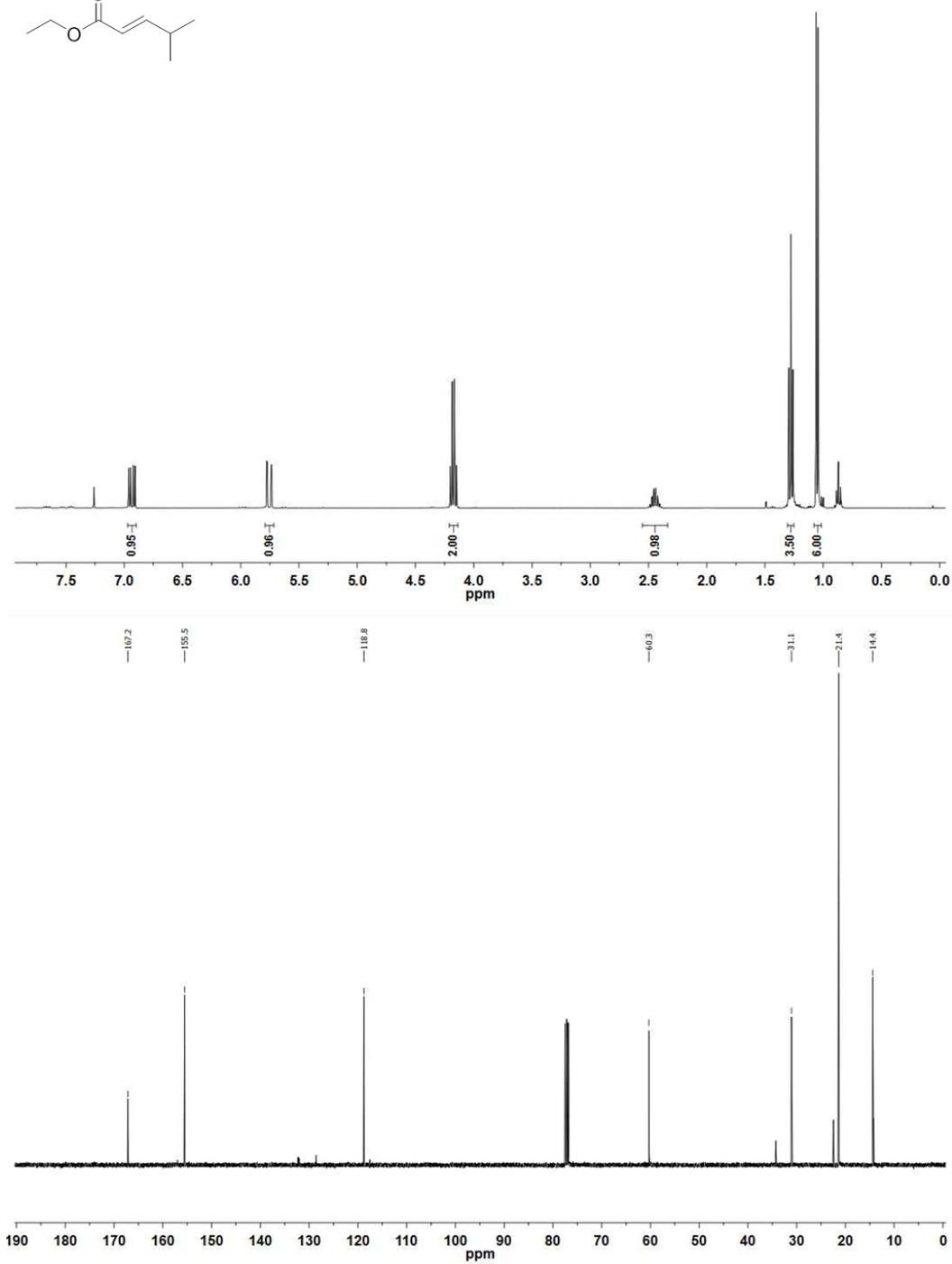
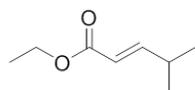


CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

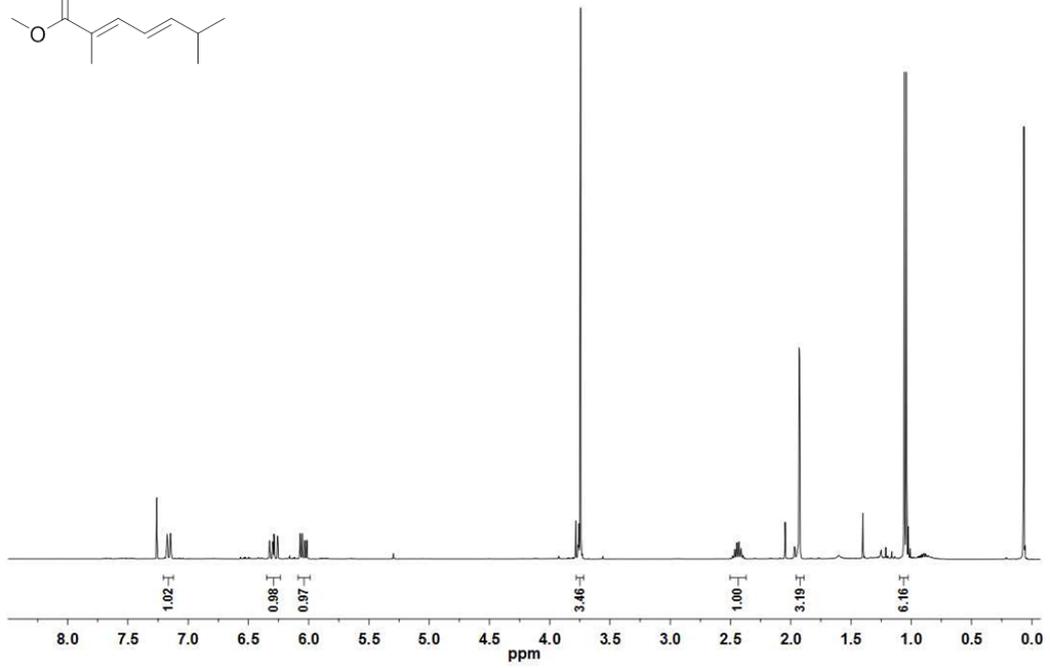
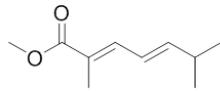


CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)

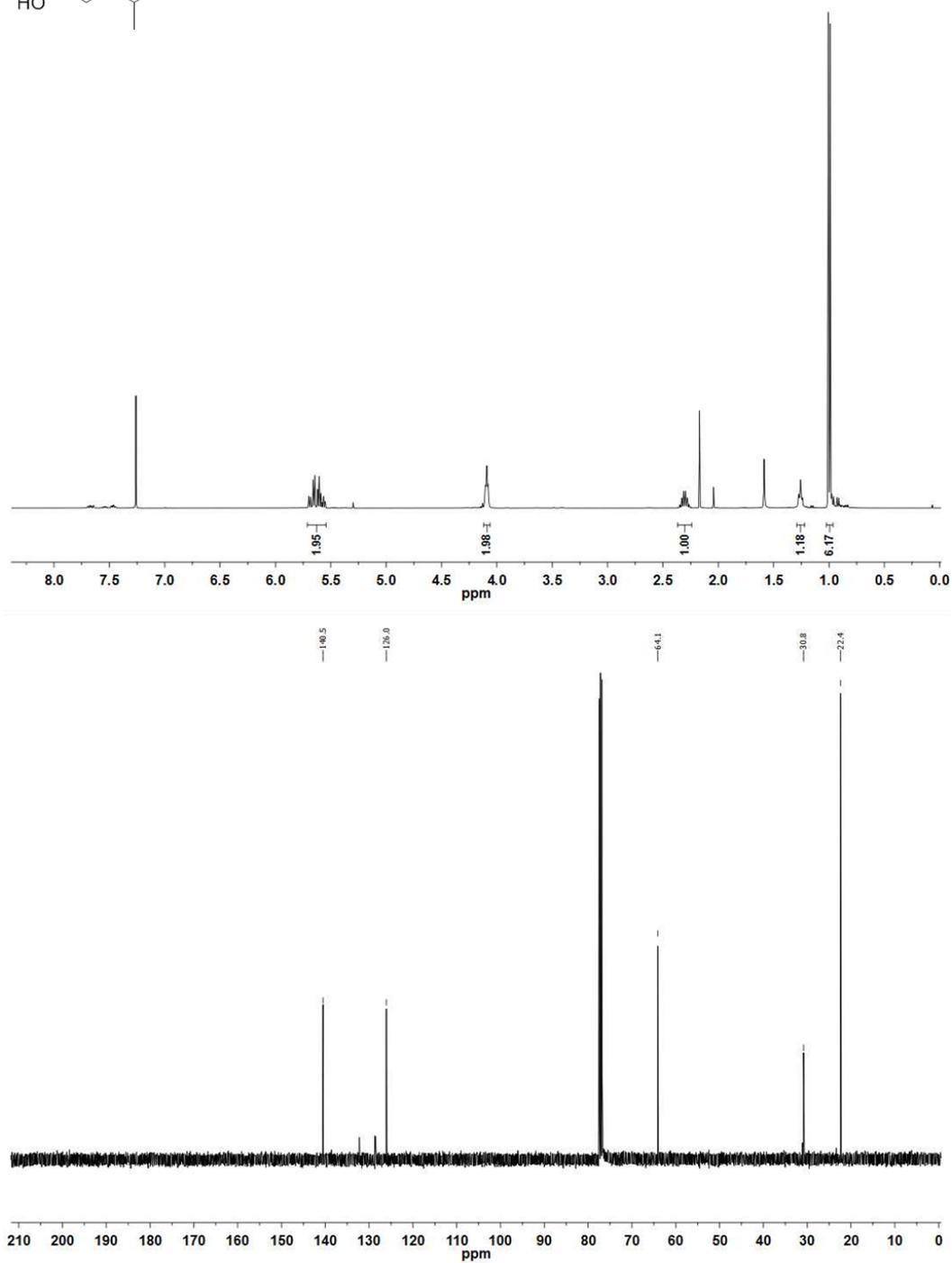
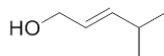
CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)



$\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz)



CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz)



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Frank Hahn für die interessante Themenstellung, seine Diskussionsbereitschaft und sein Verständnis in schwierigen Situationen.

Bei Prof. Dr. Andreas Kirschning bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats, gute Gespräche und die Eingliederung in seinen Arbeitskreis. Ich bedanke mich außerdem bei Dr. Gerald Dräger für sein offenes Ohr und die Hilfe in allen Belangen der Massenspektrometrie.

Den Mitarbeitern der Massenspektrometrie- und NMR-Abteilungen sei Dank für die schnellen Messungen von Proben. Beim „Mädchen für Alles“ Katja Körner und allen technischen Mitarbeitern bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mir stets den Rücken frei hielten bzgl. Medien, Material und Müll. Den Sekretariaten von OCI, BMWZ und der Uni Bayreuth danke ich für die Hilfe in allen organisatorischen Belangen.

Bei Prof. Dr. Russell Cox bedanke ich mich für hilfreiche fachliche Anregungen, die Schenkung des pENTR-YA-Vektors und seine persönliche Förderung. Bei Dr. Arie Gerlof bedanke ich mich für die Schenkung der Gateway™-Vektoren und bei Prof. Dr. Joachim Wink und Dr. Diana Telkemeyer für den So ce10-Stamm sowie ihre Unterstützung bei der Kultivierung. Dr. Holger Eubel (AK Braun) sei Dank für die Aminosäure-Sequenzierung und Johannes Wunderlich für die Synthese von Testsubstraten.

Für die praktische Einführung in die Chemie und ihre damit verbundene Geduld danke ich Frank, Stephan, Gesche, Janna, Dima und Egor. Für die unermüdlichen Korrekturen und Anmerkungen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich Dr. Stephan Cludius-Brandt, Jonas Ammermann, Janna Ehlert,

Hendrik Geise, Dr. Gerrit Jürjens und Karen Lebe.

Beim gesamten AK Hahn möchte ich mich für die stets gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Vor allem Gesche sei Dank aus unserer Zeit als Überbleibsel für ihre fachliche Hilfe, die Motivation und ihren Optimismus. In diesem Zuge danke ich ebenso allen AKs, die mich herzlich aufgenommen haben. Ich danke allen Parkspaziergängern und Kaffeetrinkern in alter und neuer Besetzung sowie meinen Freunden für fröhliche Stunden außerhalb des Labors.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und Stephan, da sie stets hinter mir standen, mich bei Tiefschlägen motiviert und sich bei Erfolgen mit mir gefreut haben.

# Lebenslauf

Franziska Hemmerling, M. Sc.

## Persönliche Daten

---

Geboren am 09.04.1988,  
in Hannover,  
ledig

## Studium und Ausbildung

---

- 04 / 2013 – 07 / 2017      **Promotion** an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität bei Prof. Dr. F. Hahn am Institut für Organische Chemie  
Thema: '*Untersuchung der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments*'
- 10 / 2010 – 02 / 2013      **Masterstudiengang Life Science** an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Note 1,0  
**Masterarbeit** bei Dr. T. Reinard am Institut für Pflanzengenetik  
Thema: '*Expression und Charakterisierung mimetischer Antikörper mittels Oberflächenplasmonresonanz*'; Note 1,0
- 01 / 2011 – 07 / 2011      **Auslandssemester** an der Linköpings Universität (Schweden),  
**Schwerpunktpraktikum** (3 Monate) bei Dr. A. Suska am Institute of Applied Physics: '*Entwicklung eines Zell-basierten optischen Biosensors*'
- 10 / 2007 – 09 / 2010      **Bachelorstudiengang Life Science** an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschlussnote 1,1  
**Bachelorarbeit** bei Prof. Ngezahayo am Institut für Biophysik  
Thema: '*Untersuchung von Expression und Transport von rCx46*';  
Note 1,0;
- 2000 – 2007      **Abitur**, Gymnasium Lutherschule Hannover, Abiturnote 1,1

## Stipendien

---

- 12 / 2007 – 10 / 2012      **Vollstipendium** der 'Studienstiftung des Deutschen Volkes e.V.'
- 10 / 2011 – 10 / 2012,  
10 / 2008 – 10 / 2009,  
und 10 / 2007 – 10 / 2008      **Studienbeitragsstipendien** 'Niedersachsenstipendium'
- 01 / 2011 – 07 / 2011      **ERASMUS Stipendium** für die Linköpings Universität (Schweden)
- 10 / 2010 – 10 / 2012      **Studienbeitragsstipendium** der 'Ernest Solvay Stiftung'

## Studien- und promotionsbegleitende Tätigkeiten

---

- Seit 04 / 2013      **Im Rahmen der Doktorarbeit:** Betreuung von Abschlussarbeiten und Praktika sowie Prüfungsbeisitz

11 / 2015	<b>Beteiligung am Videobeitrag</b> 'Chemoenzymatic Synthesis of Oxygen Heterocycles' für die Reihe 'Beilstein TV' des Beilstein Instituts
11 / 2014	<b>Organisatorische Leitung</b> und Durchführung einer Veranstaltung im Rahmen der 'Nacht, die Wissen schafft'
10 / 2012 – 04 / 2013	<b>Wissenschaftliche Hilfskraft</b> am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
04 / 2012 – 12 / 2012	<b>Studentische Hilfskraft für Lehre</b> am Institut für Pflanzengenetik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
06 / 2012 – 09 / 2012	<b>Studentische Hilfskraft</b> für das Projekt 'HannoverGEN'
08 / 2011 – 10 / 2011 und 08 / 2010 – 01 / 2011	<b>Studentische Hilfskraft</b> Institut für Biophysik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

### Posterbeiträge und Vorträge

---

- [1] *'The ANL-ACP-domain AmbG displays broad substrate tolerance and FAAL-like catalytic activity'*  
Poster bei der 'Directing Biosynthesis V' in Warwick (UK), 03 / **2017**
- [2] *'Biosynthetic Studies on the Formation of the Ambruticin Middle Fragment'*  
Vortrag beim 'JIC Young Microbiologist Symposium 2015' in Norwich (UK), 09 / **2015**
- [3] *'Studies on the Unprecedented Divinylcyclopropyl-Forming Mechanism in Ambruticin Biosynthesis'*  
Poster bei der 'Directing Biosynthesis IV' in Norwich (UK), 03 / **2015**
- [4] *'Biosynthetic Investigation on the Middle Fragment of the Ambruticins'*  
Poster und Kurzvortrag beim 'Biology of Natural Product-producing Microorganisms' - VAAM Workshop in Dresden, 10 / **2014**
- [5] *'Biosynthetic Investigations on the Ambruticin Middle Fragment'*  
Poster bei der 'First Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel' in Hannover, 01 / **2013**

### Publikationen

---

- [1] S. Friedrich, F. Hemmerling, F. Lindner, A. Warnke, J. Wunderlich, G. Berkhan, F. Hahn *Molecules* **2016**, *21*, 1443.
- [2] F. Hemmerling, F. Hahn *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512 – 1550.
- [3] F. Hemmerling, F. Hahn *GIT-Labor-Fachzeitschrift* **2014**, *5*, 48 – 51.
- [4] B. Schlingmann, P. Schadzek, F. Hemmerling, F. Schaarschmidt, A. Heisterkamp, A. Ngezahayo *J. Bioenerg. Biomembr.* **2013**, *45*, 59 – 70.