



# FRIEDRICH-SCHILLER- UNIVERSITÄT JENA

## **Charakterisierung der Bioaktivität von Thiopeptid-Antibiotika**

### **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

**M. Sc. Sophia Walter**

geboren am 20.02.1990 in Altdöbern

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der Verteidigung: 26.01.2022

# Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt für die Möglichkeit dieses Thema bearbeitet zu haben danken. Die eigenständige Bearbeitung eines bis dato für mich fachfremden Projekts in einem relativen jungen Labor machte es mir nicht immer einfach. Doch das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit das Projekt und auftretende Probleme im Laboralltag selbstständig zu meistern, förderten immens meine persönliche, technische und fachliche Entwicklung während der Promotion.

Weiterhin möchte Prof. Dr. Erika Kothe für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachters für die vorliegende Arbeit danken, sowie für die konstruktiven Besprechungen im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 1127 „*Chemical Mediators in Complex Biosystems*“.

Innerhalb des Sonderforschungsbereiches hatte ich die Möglichkeit mit vielen begnadeten und wissenshungrigen Doktoranten und Postdoktoranten aus verschiedenen Forschungsrichtungen zusammenzuarbeiten. Allem voran möchte ich mich in diesem Sinne bei Thomas Krauß, Marlene Höller und Dr. Tina Netzker für die zahlreichen anregenden Unterhaltungen bei verschiedenen Zusammenkünften bedanken.

Ein großer Dank richtet sich an die gesamte Arbeitsgruppe Arndt, ohne die die Mittags- und Kaffeepausen nicht halb so lustig und unterhaltsam gewesen wären. Der große kollegiale Zusammenhalt innerhalb der Gruppe hat mir oft die Bewältigung des Laboralltags vereinfacht.

Als letztes möchte ich Dr. René Winkler und Dr. Ferenc Liedl für die Hilfsbereitschaft und Ausdauer des Korrekturlesens am Ende der Arbeit danken.

# Zusammenfassung

Die komplexen makrozyklischen Thiopeptid-Antibiotika werden vorrangig von spezifischen Thiopeptid-resistenten, grampositiven *Streptomyces*-Bodenbakterien („Emitter“-Stämme) ribosomal produziert und zeigen eine hohe antibiotische Aktivität gegenüber anderen grampositiven Bakterien durch die Inhibierung der ribosomalen Translationselongation.

Neben ihrer antibiotischen Wirkung können die Thiopeptide in subminimal hemmenden Konzentrationen die Expression von mindestens zwei Thiostrepton-induzierten Proteinen (TIP) fördern. Dabei binden sie analog sekundärer Botenstoffe in Thiopeptid-sensitiven *Streptomyces* spp. („Responder“-Stämme) als Ligand an den Transkriptionsfaktor Thiostrepton-induziertes Protein A „*large form*“ (TipAL). Dadurch wird sowohl die Transkription des Transkriptionsfaktors selbst als auch die des stärker exprimierten Thiostrepton-induzierten Protein A „*short form*“ (TipAS) induziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Kombination von bioinformatischen, mikrobiologischen, molekularbiologischen und proteinbiochemischen Versuchsdurchführungen die biologische Relevanz der Thiopeptid-Antibiotika als interzellulären Signalstoff in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aufgezeigt. Zum einen konnte durch eine ausführliche BLAST-Suche in der Domäne der Bakterien weitere *tipA*-ähnlichen Gene identifiziert werden und deren vermutliche funktionelle Relevanz auch außerhalb der *Streptomyces* spp. aufdecken. Zum anderen konnte durch die Generierung und Charakterisierung einer *tipA*-Knockout-Mutante, sowie Expressionsanalysen der TipA-Proteine die Rolle des TIP-Thiopeptid-Komplexes im „Responder“-Stamm *S. coelicolor* A3(2) nachvollzogen werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass Thiopeptid-Antibiotika an den Stress-Resilienz-fördernden Mechanismen aktiv beteiligt sind, die aber nicht direkt zur Resistenz führen.

# Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den .....2022

.....

Sophia Walter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1	Die Relevanz von neuartigen Antibiotika-Klassen	1
1.2	Thiopeptid-Antibiotika	2
1.2.1	Klassen der Thiopeptide	3
1.2.2	Biosynthese der Thiopeptide	6
1.2.3	Biologische Aktivität von Thiopeptiden	10
1.2.4	Anwendung	14
1.3	Thiostrepton-induzierte Proteine	15
1.3.1	Thiostrepton-induziertes Protein A „ <i>large form</i> “ (TipAL)	15
1.3.2	Thiostrepton-induziertes Protein A „ <i>short form</i> “ (TipAS)	18
1.3.3	Spezifisches Bindemotiv der Thiopeptid-Antibiotika in <i>S. lividans</i>	19
1.3.4	Expression und Regulation der <i>tipA</i> Gene in <i>Streptomyces lividans</i>	21
1.4	TIP-Thiopeptid Komplexe als sekundäre Botenstoffe	23
1.5	Zielsetzung	24
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
2.1	Identifizierung von <i>tipA</i> -ähnlichen Genen in anderen Bakterien als <i>Streptomyces lividans</i>	27
2.2	Biochemischer Teil	30
2.2.1	Charakterisierung von natürlich vorkommenden Thiopeptiden auf ihre biologischen Aktivitäten	30
2.2.2	Charakterisierung von selektiven Thiopeptid-Derivaten	33
2.3	Molekularbiologischer Teil	39

2.3.1	Herstellung und Charakterisierung einer <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante .....	39
2.3.2	Die Komplementierung der <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante...	48
2.3.3	Generierung einer <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <i>tipA</i> <sup>2</sup> Mutante .....	53
2.3.4	Untersuchung des Expressionsverhaltens der TipA Proteine .....	60
<b>3</b>	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>65</b>
3.1	Vorkommen und biologische Relevanz von Thiostrepton-induzierten Proteinen	65
3.2	Strukturelle Bedingungen der Thiopeptide für ihre biologischen Funktionen .....	67
3.3	TIP-Thiopeptid Komplex als Resistenzmechanismus.....	77
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>88</b>
5.1	Geräte .....	88
5.2	Software und Datenbank .....	89
5.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	89
5.3.1	Verbrauchsmaterialien.....	89
5.3.2	Kits .....	90
5.3.3	Chemikalien .....	90
5.3.4	Antibiotika .....	91
5.3.5	Elektrophorese-Größenstandard.....	91
5.3.6	Enzyme .....	91
5.4	Plasmide.....	92
5.5	Antikörper.....	92
5.6	Oligonukleotide.....	93
5.7	Bakterienstämme.....	94
5.8	Thiopeptide und Derivate .....	94
5.8.1	Lagerung und Konzentrationsbestimmung von Thiopeptiden.....	95

5.9	Molekularbiologische Methoden .....	95
5.9.1	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	95
5.9.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>Streptomyces</i> .....	96
5.9.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	97
5.9.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	97
5.9.5	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	97
5.9.6	Standard-/Gradienten-/Kolonie-PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	98
5.9.7	Hydrolytische Spaltung von DNA .....	99
5.9.8	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	100
5.9.9	Ausfällung von DNA mit Natriumacetat.....	100
5.9.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	101
5.9.11	Herstellung von chemisch-kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	101
5.9.12	Herstellung von elektro-kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	102
5.9.13	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	103
5.9.14	Sequenzierung von DNA .....	104
5.9.15	Herstellung einer Glycerinkultur.....	105
5.9.16	Konjugation von <i>Escherichia coli</i> Plasmid-DNA .....	105
5.9.17	Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde.....	106
5.9.18	Southern- und Dot-Blot .....	107
5.10	Proteinbiochemische Methoden.....	111
5.10.1	Aufschluss und Isolierung eines bakteriellen Zellysats.....	111
5.10.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	112
5.10.3	SDS-PAGE nach Laemmli <sup>[192]</sup> .....	112
5.10.4	Anfärbung von Proteinen.....	113
5.10.5	Western-Blot .....	114
5.11	Mikrobiologische Methoden.....	116



5.11.1	Herstellung einer <i>Streptomyces</i> -Glycerinkultur .....	116
5.11.2	Konzentrationsbestimmung einer <i>Streptomyces</i> Glycerinkultur.....	117
5.11.3	Bestimmung des bakteriellen Wachstums von <i>Streptomyces</i> .....	117
5.11.4	Bestimmung der MIC (minimal inhibierende Konzentration).....	118
5.11.5	Bestimmung der MINC (minimal induzierende Konzentration) .....	118
5.12	Bioinformatische Methoden .....	119
5.12.1	Identifizierung homologer <i>tipA</i> Gene .....	119
5.12.2	Sequenzalignment.....	119
<b>6</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>

# Abkürzungsverzeichnis

2xYT	„Yeast Extract Tryptone“
aa-tRNA	Aminoacyl Transfer-Ribonukleinsäure
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BGC	Biosynthese-Gen-Cluster
bp	Basenpaar
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	„Double Distilled Water“
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP (dTTP, dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
<i>et al.</i>	„et alii“
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
kbp	1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
LB	„Lysogeny Broth“
MCS	„Multiple Cloning Site“
MDR	„Multi-Drug-Resistance“
MerR	“Mercuric Resistance Operon Regulatory Protein”
MIC	minimal inhibierende Konzentration
MINC	minimal induzierende Konzentration

MM	Minimalmedium
mRNA	„messenger“- Ribonukleinsäure
MS	D-Mannitol-Sojamehl
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>ptipA</i>	<i>tipA</i> Promotor
RiPP	Ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung/ min (U/min)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SET	Natriumchlorid-EDTA-TRIS
SOB	„Super Optimal Broth“
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrate
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
$T_{Hyp}$	Hybridisierungstemperatur
TIP	Thiostrepton-induzierte Proteine
TipAL	Thiostrepton-induziertes Protein A „large form“
TipAS	Thiostrepton-induziertes Protein A „short form“

$T_m$	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSB	„ <i>Tryptic Soy Broth</i> “
U	Enzymeinheit, $1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \triangleq 16.67 \text{ nkat}$
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	„ <i>volume per volume</i> “
Vol.	Volumen
w/v	„ <i>weight per volume</i> “

# Darstellungsverzeichnis

## Abbildungen

<b>Abbildung 1.1</b> Chemische Struktur von Micrococcin P1.....	3
<b>Abbildung 1.2</b> Einteilung der Thiopeptid-Antibiotika basierend auf der Oxidationsstufe des zentralen Pyridin-Ringes (rot) in fünf Klassen (a-e).....	4
<b>Abbildung 1.3</b> Einteilung der Thiopeptide basierend auf der Größe des ersten (A) makrozyklischen Rings.....	5
<b>Abbildung 1.4</b> ClustalW-Alignment der Vorläufer-Proteinsequenzen von Thiostrepton (TsrA), Nosiheptid (NosM), GG2270 (TpdA) und Lactazol A (LazaA).....	7
<b>Abbildung 1.5</b> Wirkmechanismus der 26- und 29-gliedrigen Thiopeptide.....	12
<b>Abbildung 1.6</b> Struktur der beiden semi-synthetischen Derivate LFF571 und CB-06-01 (NAI-003) vom Thiopeptid GE2270 mit gekennzeichneteter Modifikation (rot).....	14
<b>Abbildung 1.7</b> Model des MerR-Transkriptionsfaktor-Dimers BmrR von <i>B.subtilis</i> mit markierter Einteilung in die <i>N</i> -terminale DNA-Bindedomäne, die <i>C</i> -terminale Liganden-Bindedomäne und die „Coiled-Coil“-Dimerisierungsdomäne (PDB:3IAO). <sup>[128]</sup> .....	16
<b>Abbildung 1.8</b> Überblick der <i>N</i> -terminalen DNA-Bindedomäne (rot) von TipAL in Verbindung mit der adressierten Promotor-DNA (grau) ( PDB: 2VZ4). <sup>[130]</sup> .....	17
<b>Abbildung 1.9</b> Struktureller Aufbau von TipAS.....	19
<b>Abbildung 1.10</b> Chemische Strukturen bekannter Thiopeptide mit markierten Erkennungselementen für die TIP-Bindung an der Liganden-Bindedomäne (rot) nach Habazettl <i>et al.</i> <sup>[135]</sup> .....	20
<b>Abbildung 2.1</b> BLAST-Ergebnis der <i>tipA</i> -ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien.....	28
<b>Abbildung 2.2</b> BLAST-Ergebnis der <i>tipA</i> -ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien.....	28
<b>Abbildung 2.3</b> BLAST-Ergebnis der <i>tipAS</i> -ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien.....	29
<b>Abbildung 2.4</b> Verwendete natürlich vorkommende Thiopeptide.....	31

<b>Abbildung 2.5</b> Charakterisierung der natürlich vorkommenden Thiopeptide auf ihre biologischen Funktionen.....	33
<b>Abbildung 2.6</b> Molekulare Struktur von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) mit farblich markierten zugänglichen Gruppen für die Derivatisierung (rot).....	34
<b>Abbildung 2.7</b> Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre biologischen Funktionen.....	35
<b>Abbildung 2.8</b> Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre biologischen Funktionen. ....	37
<b>Abbildung 2.9</b> Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate mit Ringschlussmetathese auf ihre biologischen Funktionen.....	39
<b>Abbildung 2.10</b> Restriktionsanalyse mit KpnI von positiven Transformanten aus <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790.....	41
<b>Abbildung 2.11</b> Kolonie-PCR zur Identifizierung von positiven Transformanten aus <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790/ptipAcosmid mit den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R. ....	42
<b>Abbildung 2.12</b> Identifizierung von <i>S. coelicolor</i> A3(2) Exkonjuganten mit einem sauberen Knockout vom <i>tipA</i> Gen mit den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R.....	43
<b>Abbildung 2.13</b> Genotypisierung der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante mittels Southern Blot. ....	44
<b>Abbildung 2.14</b> Genotypisierung der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante mittels Southern Blot. ....	44
<b>Abbildung 2.15</b> Wachstumsverhalten von <i>S. coelicolor</i> A3(2) (A) und der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante (B) mit steigender Konzentration von Thiostrepton (3) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden. ....	46
<b>Abbildung 2.16</b> Wachstumsverhalten von <i>S. coelicolor</i> A3(2) (A) und der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante (B) mit steigender Konzentration von Nosiheptid (4) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden. ....	46
<b>Abbildung 2.17</b> Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber dem <i>S. coelicolor</i> A3(2) Wildtypstamm und der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante. ....	47
<b>Abbildung 2.18</b> Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber dem <i>S. coelicolor</i> A3(2) Wildtypstamm und der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante. ....	48

<b>Abbildung 2.19</b> Identifizierung von komplementierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ Mutanten mit den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R. ....	49
<b>Abbildung 2.20</b> Genotypisierung der komplementierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ tipA Mutante mittels Southern Blot. ....	50
<b>Abbildung 2.21</b> Wachstumsverhalten der komplementierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ tipA Mutante mit steigender Konzentration von Thiostrepton (A) und Nosiheptid (B) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden. ....	51
<b>Abbildung 2.22</b> Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der komplementierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ tipA Mutante. ....	52
<b>Abbildung 2.23</b> Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der komplementierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ tipA Mutante. ....	53
<b>Abbildung 2.24</b> Restriktionsanalyse mit XhoI von positiven Transformanten mit integrierten pTipAL in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . ....	55
<b>Abbildung 2.25</b> Restriktionsanalyse mit HindIII von positiven Transformanten mit integriertem ptipAHisTag in <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002. ....	55
<b>Abbildung 2.26</b> Identifizierung von <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutanten mit den Primern tipAHisTag-F/R. ....	56
<b>Abbildung 2.27</b> Genotypisierung der <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutante mittels Southern Blot. ....	57
<b>Abbildung 2.28</b> Wachstumsverhalten der <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutante mit steigender Konzentration von Thiostrepton (A) und Nosiheptid (B) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden. ....	58
<b>Abbildung 2.29</b> Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutante. ....	59
<b>Abbildung 2.30</b> Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutante. ....	60
<b>Abbildung 2.31</b> Expressionsnachweis der TipA Proteine der vier validierten <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutanten mittels Westernblot unter Verwendung eines $\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. ....	61
<b>Abbildung 2.32</b> Expressionsnachweis der TipA Proteine der <i>S. coelicolor</i> A3(2) tipA <sup>2</sup> Mutante mittels Westernblot unter Verwendung eines $\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. ....	62

<b>Abbildung 2.33</b> Expressionsnachweis der TipA Proteine der <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>tipA</i> <sup>2</sup> Mutante mittels Westernblot unter Verwendung eines $\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. ....	63
<b>Abbildung 2.34</b> Expressionsnachweis der TipA Proteine der <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>tipA</i> <sup>2</sup> Mutant mittels Westernblot unter Verwendung eines $\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. ....	64
<b>Abbildung 3.1</b> Selektive Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate mit farblich markierten Modifikationen (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Wert. ....	69
<b>Abbildung 3.2</b> Struktureller Aufbau vom 35-gliedrigen Radamycin (2) und dem 26-gliedrigeren Promothiocin B (5) mit farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und der mutierten Sequenz zwischen Position 3 und 4 (Rechteck).....	70
<b>Abbildung 3.3</b> Thiostrepton-Derivate mit schrittweise abgebauter Seitenkette (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten. ....	71
<b>Abbildung 3.4</b> Thiostrepton-Derivate mit strukturellen Modifikationen am ersten (A) und zweiten (B) makrozyklischen Ringsystem (Rechteck), farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten. ....	72
<b>Abbildung 3.5</b> <i>In vitro</i> Bindestudien zwischen TipAS Mutanten und Thiostrepton-Derivate (3a-b), Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4).....	73
<b>Abbildung 3.6</b> Nosiheptid-Derivate mit Modifikationen am zweiten (B) makrozyklischen Ring (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten. ....	74
<b>Abbildung 3.7</b> Nosiheptid-Derivate mit strukturellen Modifikationen am ersten (A) makrozyklischen Ringsystem (Rechteck), farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten. ....	75
<b>Abbildung 3.8</b> Überblick der wichtigsten Struktur motive von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) für die antibiotische Aktivität (Kreis) und die <i>tipA</i> -Induktion (Rechteck)...	76
<b>Abbildung 3.9</b> <i>In vitro</i> Bindestudien zwischen TipAS und Thiostrepton (3).....	81
<b>Abbildung 5.1</b> Apparaturaufbau eines absteigenden Kapillarblots.....	108
<b>Abbildung 5.2</b> Apparaturaufbau eines Semi-Dry-Blots. ....	115
<b>Abbildung 7.1</b> ClustalW-Alignment bekannter homologer TipA-Proteine der MerR-Transkriptionsfaktoren.....	ix



# Schemata

<b>Schema 1.1</b> Biosynthese-Gen-Cluster von Thiostrepton mit verkürzter schematischer Darstellung der ribosomalen, posttranslationalen Biosynthese. ....	8
<b>Schema 1.2</b> Biosynthese-Gen-Cluster von Nosiheptid mit schematischer Darstellung der ribosomalen und posttranslationalen Biosynthese.....	9
<b>Schema 1.3</b> Übersicht der prokaryotischen Proteinelongation der Translation. ....	11
<b>Schema 1.4</b> Übersicht der Expression und Regulation des <i>tipA</i> Gens (schematisch). ....	22
<b>Schema 1.5</b> Übersicht der Thiopeptid-induzierten Kommunikation im <i>Streptomyces</i> -Konsortium.....	25
<b>Schema 2.1</b> Generierung der <i>S. coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipA</i> Mutante angelehnt an dem „PCR targeting system“ von Gust <i>et al.</i> <sup>[152]</sup> .....	40
<b>Schema 2.2</b> Generierung einer <i>S. coelicolor</i> A3(2) <i>tipA</i> <sup>2</sup> Mutante.....	54
<b>Schema 3.1</b> „Proximity induced covalent capture“ (PICC)-Experimente zur Identifizierung der Bindestellen von Thiostrepton (TS) und Nosiheptid (NH) innerhalb des ternären Komplexes von Thiopeptid, L11 ribosomalen Protein und 23S rRNA.....	71
<b>Schema 3.2</b> Schematische Darstellung der <i>in cellulo</i> Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Thiopeptide am Ribosom (grau), unter der Verwendung einer Fluoreszenz-markierten Thiopeptid-Sonde (PDB: 3CF3). <sup>[71]</sup> .....	76
<b>Schema 3.3</b> Konstruktion der <i>tipA</i> Knockdown-Mutante. ....	78
<b>Schema 4.1</b> Ideenansätze für die weiterführende Arbeit, basierenden auf den erhaltenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.....	87
<b>Schema 5.1</b> Schematische Darstellung des Luciferase-Assays. ....	119

# Tabellen

<b>Tabelle 2.1</b> Spezies mit <i>tipAS</i> -ähnlichen Gen, die kein <i>tipAL</i> -ähnliches Gen tragen. ....	30
<b>Tabelle 2.2</b> Thiostrepton-Derivate die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden. .....	35
<b>Tabelle 2.3</b> Nosiheptid-Derivate die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden. .....	36
<b>Tabelle 2.4</b> Nosiheptid-Derivate mit unterschiedlichen Ringschlussmetathesen des zweiten (B) makrozyklischen B-Ringsystems, die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden.....	38
<b>Tabelle 3.1</b> <i>Streptomyces</i> Spezies mit homologen <i>tipA</i> Gen und nachgewiesener Thiopeptid- Produktion. ....	66
<b>Tabelle 5.1</b> Reaktionsansatz einer Standard-/ Kolonie-PCR.....	98
<b>Tabelle 5.2</b> Programmabfolge einer Standard-/Kolonie-PCR.....	99
<b>Tabelle 5.3</b> Reaktionsansatz einer spezifischen hydrolytischen Spaltung von DNA. ....	99
<b>Tabelle 5.4</b> Herstellung eines rekombinanten Plasmids mittels kovalenter Ligation. ....	101
<b>Tabelle 5.5</b> Überblick der durchgeführten Transformationen pro Ansatz. ....	104
<b>Tabelle 5.6</b> PCR-Ansatz zur Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde.....	106
<b>Tabelle 5.7</b> Verdünnungsreihe der DIG-markierten DNA-Sonde in Dot-Blot-Puffer. ....	111
<b>Tabelle 7.1</b> Überblick der 95 <i>tipA</i> -ähnlichen Gene. ....	i
<b>Tabelle 7.2</b> Zusammengetragene „Emitter“-Stämme aus der ThioFinder-Datenbank mit dazugehörigen synthetisierten Thiopeptid. ....	vi
<b>Tabelle 7.3</b> Rohdaten der bestimmen MIC-Werte (antibiotische Aktivität) und MINC-Wert (Promotor-Induktion) der Thiopeptide/Thiopeptid-Derivate gegenüber unterschiedliche <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) Stämme. ....	x

# 1 Einleitung und Grundlagen

## 1.1 Die Relevanz von neuartigen Antibiotika-Klassen

Die Entdeckung von Penicillin in den späten 20 igern läutete das goldene Zeitalter der Antibiotika-Entdeckung, -Entwicklung und -Optimierung aus natürlichen Quellen ein.<sup>[1]</sup> Zwischen 1940 und 1990 wurden mehrere Antibiotika-Klassen und deren Derivate auf dem Markt gebracht, darunter die Klasse der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, die Aminoglykosid-Antibiotika, die Tetracycline und die Makrolid-Antibiotika.<sup>[2]</sup> Durch den gegebenen Selektionsdruck und die schnelle fehleranfällige Zellteilung der Bakterien entwickelten sich jedoch zu jedem etablierten Antibiotikum eine natürliche bakterielle Resistenz nach ca. 2-16 Jahren.<sup>[3]</sup> Daher ist eines der größten Probleme des 21. Jahrhunderts das Vorhandensein von Antibiotika-resistenten und sogar multiresistenten Pathogenen, die schon längst außerhalb des Gesundheitswesens mitten in unserer Gesellschaft angekommen sind.<sup>[4]</sup>

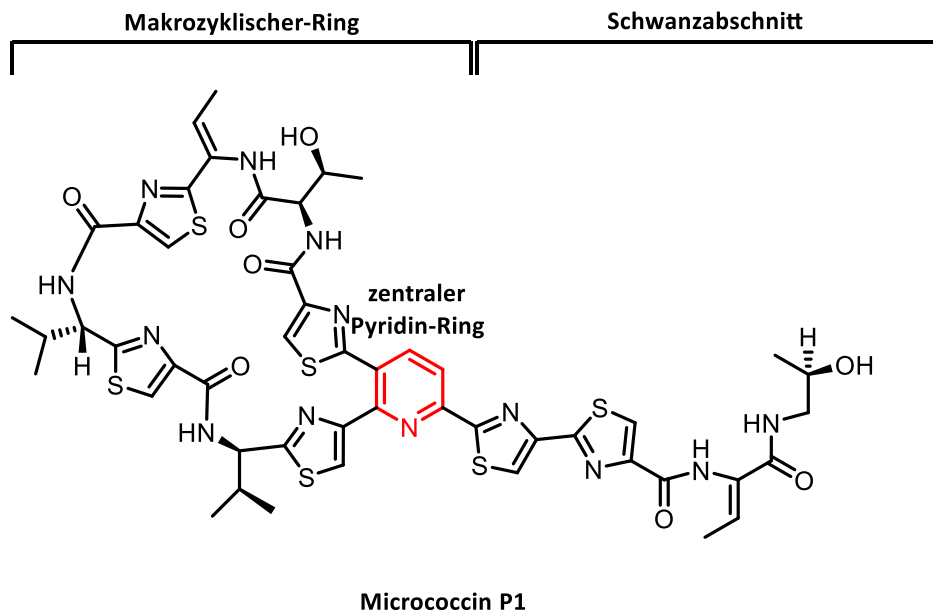
Ein Lösungsansatz besteht darin, Antibiotika mit neuartigen chemischen Grundgerüsten auf Basis von neuidentifizierten Naturstoffen oder bereits etablierten Verbindungen zu entwickeln, die durch andersgeartete Wirkungsweisen gegen bereits resistente Bakterienstämme antibiotisch aktiv sind. Diese müssen sowohl Kreuzresistenzen mit bestehenden Antibiotika vermeiden und strukturell für weitere Derivatisierungen zugänglich sein.<sup>[5]</sup> So könnte die Basis an verfügbaren Substanzen erweitert werden.

Eine nach wie vor zuverlässige Quelle antibiotisch wirksamer Substanzen stellen Mikroorganismen dar. Besonders die Bakterien-Ordnung der *Actinomycetales* sticht hervor, da sie bis jetzt ca. 45 % aller biologisch aktiven Stoffe aus Mikroben liefert.<sup>[6]</sup> Darunter befinden sich auch Antibiotika-Klassen mit Grundstrukturen die noch keine humane Anwendung finden. Ein Vertreter davon stellt die Klasse der Thiopeptid-Antibiotika dar. Dabei handelt es sich um Naturstoffe mit größtenteils hoher antibiotischer Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien, die in laufenden Untersuchungen auch klinisch getestet werden.<sup>[7],[8]</sup>

## 1.2 Thiopeptid-Antibiotika

Bei Thiopeptid-Antibiotika handelt es sich um natürlich vorkommende, strukturell hochkomplexe makrozyklische Peptide mit ribosomalem Ursprung.<sup>[7]</sup> Diese biologisch aktiven Verbindungen werden hauptsächlich von grampositiven, Mycel-bildenden und sporulierenden Bodenbakterien der *Actinomycetales*-Ordnung als sekundäre Metabolite produziert. Besonders die Gattung der *Streptomyces* spp. sekretieren einen Großteil der bekannten Thiopeptide.<sup>[9],[10]</sup> Alle Vertreter dieser Antibiotika-Klasse teilen sich dabei drei allgemeine Strukturmerkmale, die sie von anderen Peptid-abgeleitenden Naturstoffen unterscheiden. Sie enthalten alle einen zentralen Pyridin-Ring, mindestens einen Makrozyklus und einen sogenannten Schwanzabschnitt.<sup>[11]</sup> Der makrozyklische Ring ist durch den zentralen Pyridin-Ring miteinander verbunden, während der Schwanzabschnitt mit dem Makrozyklus verknüpft ist. Beide Strukturen können mit unterschiedlichen nicht-proteinogenen Aminosäuren, Dehydroaminosäuren, Thiazolen, Oxazolen und Thiazolinen ausgestattet vorliegen (**Abbildung 1.1**).<sup>[12]</sup> Mehrere Thiopeptide weisen eine erhöhte Komplexität durch das Vorhandensein eines zweiten makrozyklischen Ringsystems auf. Durch ihre besondere chemische Struktur gehört die Klasse, nach Bérdy's Klassifikation der Antibiotika, zu den Thiazolyl-Peptiden.<sup>[13]</sup>

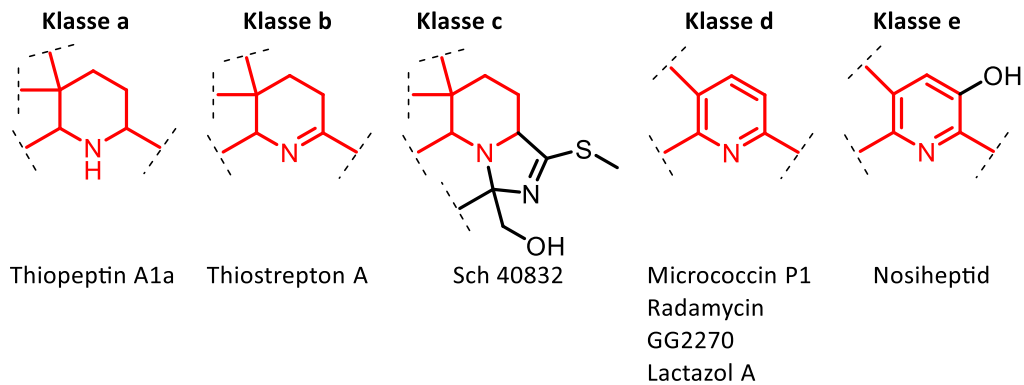
Das erste identifizierte Thiopeptid wurde 1948 in den Abwässern der Stadt Oxford des Vereinigten Königreichs Großbritannien und Nordirland isoliert.<sup>[14]</sup> Als Produzent wurde die Gattung der *Micrococcus* Bakterien charakterisiert und der isolierte Naturstoff als Micrococcin P1 bezeichnet (**Abbildung 1.1**). Micrococcin P1 wies sowohl antibiotische Aktivität gegenüber weiteren grampositiven Bakterien auf, als auch gegen gramnegative Bakterien. Bis heute wurden mehr als 100 Thiopeptide aus unterschiedlichen Lebensräumen isoliert.<sup>[15],[16],[17],[18]</sup> Aktuelle bioinformatische Studien schätzen, dass es mehr als 400 unentdeckte Thiopeptide in der *Actinomycetales*-Ordnung gibt.<sup>[19]</sup>



**Abbildung 1.1** Chemische Struktur von Micrococcin P1. Allgemeine Strukturmerkmale der Thiopeptide eingeteilt in den makrozyklischen Ring, den Schwanzabschnitt und den zentralen Pyridin-Ring (rot).

### 1.2.1 Klassen der Thiopeptide

Allgemein können Thiopeptid-Antibiotika auf zwei unterschiedliche Weisen in Klassen aufgeteilt werden. Die erste Systematik richtet sich nach dem chemischen Identifikationssystem, basierend auf der Oxidationsstufe des zentralen Pyridin-Ringes.<sup>[7]</sup> Dabei werden die bekannten Thiopeptide in fünf Klassen (a-e) eingeteilt (**Abbildung 1.2**). Das Thiopeptid Thiopeptin und seine neun identifizierten Analoga besitzen einen vollkommen reduzierten zentralen Piperidin-Ring und werden dementsprechend zur Klasse a zugeordnet.<sup>[20]</sup> Bei den Thiopeptiden der Klasse b liegt der Heterozyklus als 1,2-Dehydropiperidin-Ring vor.<sup>[21]</sup> Für die Klasse c ist derzeit nur ein Vertreter bekannt. Das Thiopeptid Sch 40832 besitzt einen ungewöhnlichen Piperidin-Ring, welcher mit einer Imidazolin-Einheit anelliert vorliegt.<sup>[22]</sup> Die Klasse d der Thiopeptide repräsentiert die größte Gruppe und umfasst eine Vielzahl an bedeutenden biologisch aktiven Substanzen, welche alle einen 2,3,6-trisubstituierten Pyridin-Ring aufweisen. Die höchste Oxidationsstufe des Piperidin-Ringes besitzen die Thiopeptide der Klasse e. Bei Vertretern wie Nosiheptid liegt der Heterozyklus als trisubstituiertes 3-Hydroxypyridin vor.<sup>[23]</sup>

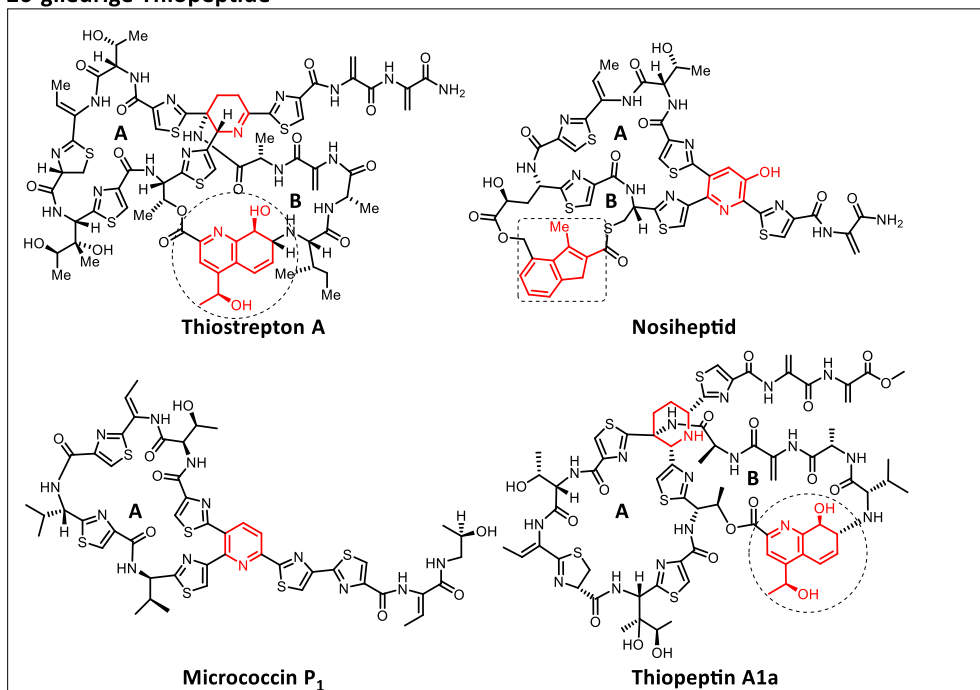


**Abbildung 1.2** Einteilung der Thiopeptid-Antibiotika basierend auf der Oxidationsstufe des zentralen Pyridin-Ringes (rot) in fünf Klassen (a-e).

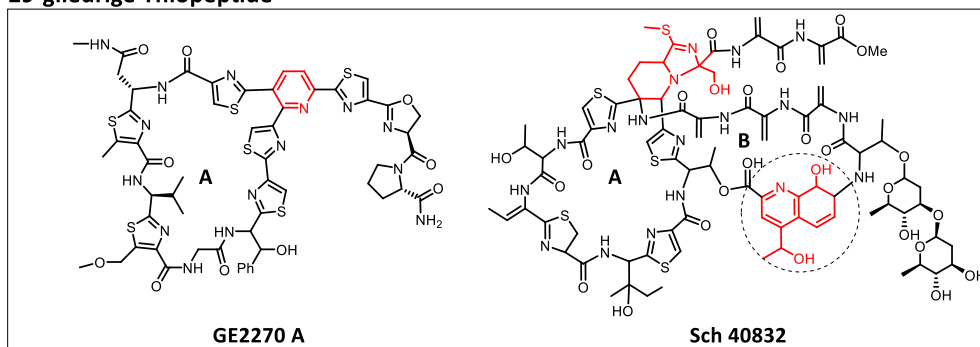
Neben dem ersten (A) makrozyklischen Ring besitzen Thiopeptide der Klasse a-c und e noch einen weiteren zweiten (B) makrozyklischen Ring. Bei den Vertretern der Klassen a-c enthält dieser eine markante Chinaldinsäure-Einheit, während bei Thiopeptiden der Klasse e der makrozyklische Ring direkt über eine modifizierte ab wird.<sup>[21]</sup> Thiopeptide der Klasse d weisen ausschließlich einen einzelnen makrozyklischen Ring auf.

Die zweite Systematik richtet sich nach der Größe des ersten (A) makrozyklischen Ringes (**Abbildung 1.3**).<sup>[7]</sup> Dabei werden die Thiopeptide in vier Gruppen eingeteilt, entsprechend der Anzahl an Atome, die mit den zentralen Pyridin-Ring den Makrozyklus bilden. Die Gruppen setzen sich zusammen aus 26-, 29-, 32- und 35-gliedrigen Thiopeptiden. Im Unterschied zur ersten Systematik werden hier Thiopeptide der unterschiedlichen Klassen (a-d) zusammengelegt. So gehören Thiopeptin, Thiostrepton, Nosiheptid und Micrococcin P1, trotz der unterschiedlichen Oxidationsstufe des zentralen Pyridin-Ringes, zur gleichen Gruppierung der 26-gliedrigen Thiopeptide. Das Thiopeptid GG2270 der Klasse d und das Thiopeptid Sch 40832 der Klasse c werden zu den 29-gliedrigen Thiopeptiden zugerechnet.

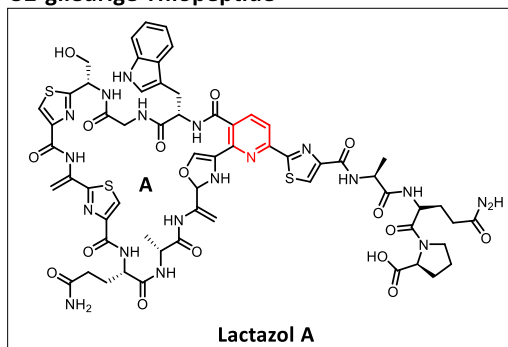
26-gliedrige Thiopeptide



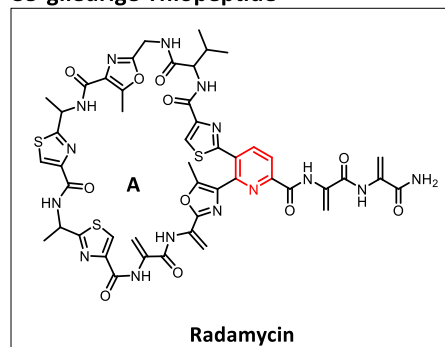
29-gliedrige Thiopeptide



32-gliedrige Thiopeptide



35-gliedrige Thiopeptide



**Abbildung 1.3** Einteilung der Thiopeptide basierend auf der Größe des ersten (A) makrozyklischen Rings. Die Klassen richten sich nach der Anzahl der Reste, die den zentralen Pyridin-Ring (rot) umgeben. Die Chinaldinsäure-Einheit (rot, Kreis) und die modifizierte 3,4-Dimethylindolsäure-Einheit (rot, Rechteck) im zweiten (B) makrozyklischen Ring der Klassen a-c Thiopeptide wurden farblich hervorgehoben.

## 1.2.2 Biosynthese der Thiopeptide

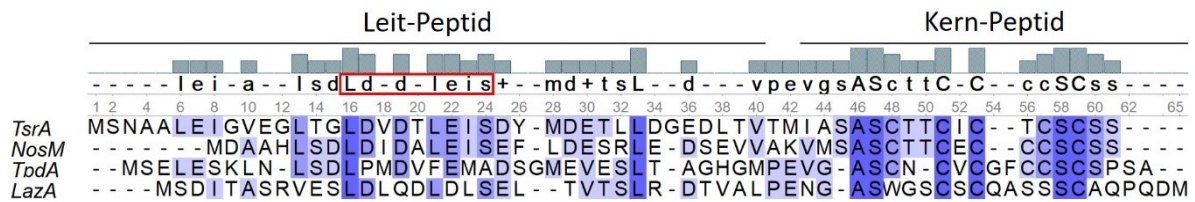
Hochkomplexe makrozyklische Peptide können auf zwei unterschiedliche Wege entstehen, entweder mittels Synthese durch ribosomale Translation oder schrittweise zusammengesetzt durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). Obwohl die meisten hoch modifizierten peptidischen Naturstoffe von NRPS produziert werden, wurden lange keine eindeutigen Hinweise zur Thiopeptid-Biosynthese gefunden.

Vor ca. 10 Jahren wurde von mehreren unabhängigen Forschergruppen gleichzeitig das Thiopeptid Vorläufer-Gen nachgewiesen.<sup>[24],[25],[26],[27]</sup> Dieses liegt im Genom kodiert vor und wird ribosomal translatiert, inklusive der strukturbildenden Peptidsequenz. Durch folgende mehrfache posttranslationale Modifikationen wird daraus der Naturstoff enzymatisch erzeugt. Damit gehören die Thiopeptid-Antibiotika zu der Gruppe der ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptide (RiPP).<sup>[28]</sup>

Weiterführende bioinformatische Analysen und „*genome mining*“-Ansätze führten schrittweise zu der Identifizierung der Gene des Vorläufer-Peptids und der Enzyme für dessen weiterführende Modifikation.<sup>[29],[30],[31],[32],[33]</sup> Es stellte sich heraus, dass in der Regel alle benötigten Enzyme innerhalb eines gemeinsamen Biosynthese-Gen-Clusters (BGC) angeordnet sind.<sup>[34],[35],[36]</sup>

Abhängig vom kodierten Thiopeptid variiert die Aminosäuresequenz und die Länge des Vorläufer-Peptids zwischen 50 und 60 Aminosäuren, das sich in zwei Sequenzabschnitte aufteilt (**Abbildung 1.4**). Zum einen das aus 12 bis 17 Aminosäureresten bestehende Kern-Peptid am C-Terminus und zum anderen das aus 30-40 Aminosäureresten bestehende Leit-Peptid am N-Terminus. Fast alle charakterisierten Thiopeptid-Vorläuferpeptide weisen ein hoch konserviertes Motiv im Leit-Peptid auf (LXX DX LEIS). Diese Aminosäuren dienen als Erkennungssequenz für die biosynthetischen Enzyme im gemeinsamen BGC und werden nach Abschluss der posttranslationalen Modifikationen abgespalten. Die Aminosäurereste des Kern-Peptids dienen als Substrat der enzymatischen Modifikationen und führen schlussendlich zum entsprechenden Thiopeptid.





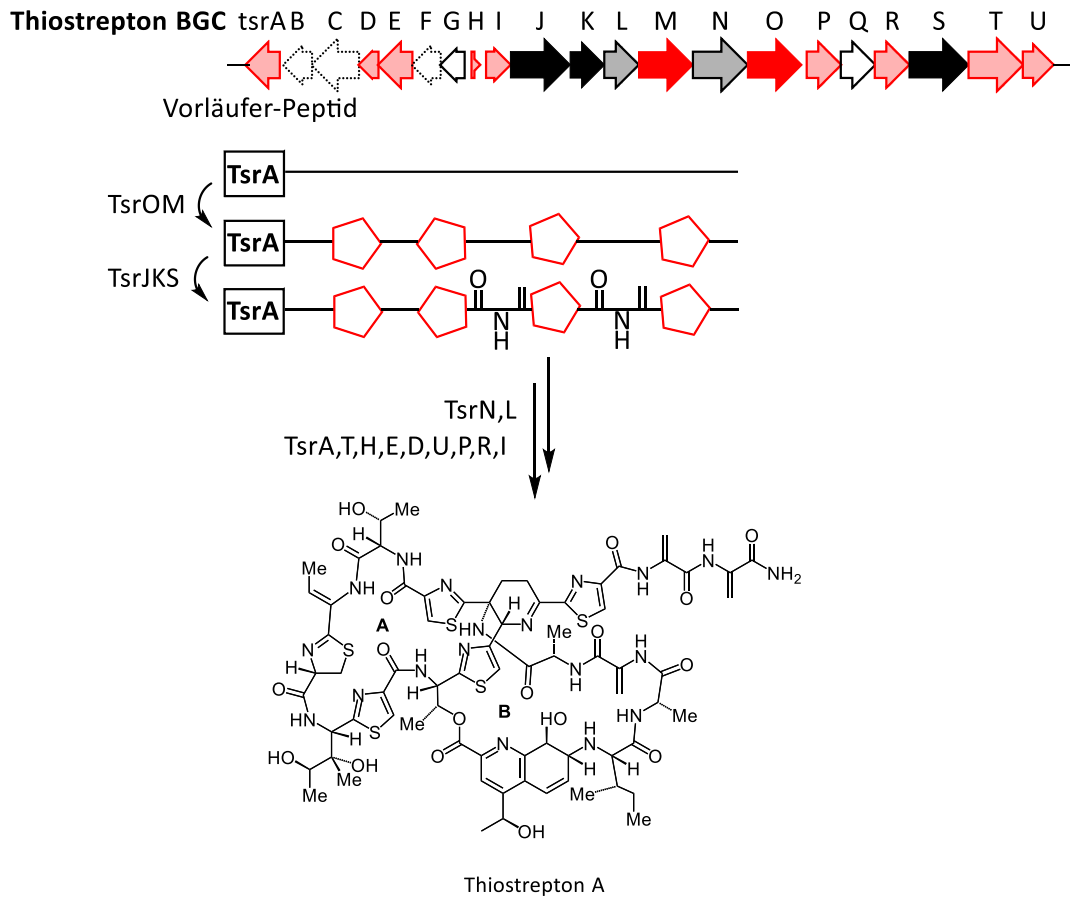
**Abbildung 1.4** ClustalW-Alignment der Vorläufer-Proteinsequenzen von Thiostrepton (TsrA), Nosiheptid (NosM), GG2270 (TpdA) und Lactazol A (LazA). Das Vorläufer-Peptid besteht aus einem Leit-Peptid am *N*-Terminus, gefolgt vom Kern-Peptid am *C*-Terminus. Ein hoch konserviertes Motiv (LXX DX LEIS) befindet sich im Leit-Peptid (rotes Rechteck). Die Konsensussequenz wird oberhalb des Alignments dargestellt. Großbuchstaben geben darin die höchste Homologie über alle Sequenzen an. Je intensiver die Blaufärbung der Aminosäuren, desto öfter wurde diese in mehreren Vorläufer-Peptiden an derselben Position identifiziert.

Im Folgenden soll näher auf die Biosynthese von Thiostrepton und Nosiheptid eingegangen werden.

### Thiostrepton

Die ribosomale Biosynthese von Thiostrepton beginnt mit der Transkription und nachfolgender Translation des Vorläufer-Peptids TsrA (**Schema 1.1**).<sup>[26],[37],[27]</sup> Darauf folgend katalysieren die Dehydratase TsrO und die Dehydrogenase TsrM die Bildung und Zyklisierung der Thiazole und Thiazoline, ausgehend von den Cysteinen, Serinen und Threoninen des Kern-Peptid. Danach werden die Dehydroalanin-Einheiten an Serin- und Threonin-Resten durch die Dehydratasen TsrJ, K, S aufgebaut. Nachfolgend wird der erste (A) makrozyklische Ring geschlossen. Die kodierten Enzyme der *tsrN* und *tsrL* Gene katalysieren dabei die Zyklisierung durch eine [4+2]-Zykloaddition zwischen zwei auf der Sequenz separierten Dehydroalanin-Resten, welche den zentralen Dehydropiperidin-Ring bilden. Diese außerordentlich ungewöhnliche Umsetzung konnte durch enzymatische Studien des Thiopeptids Thiomuracin erhellt werden.<sup>[38],[39]</sup> Die Bildung des zweiten (B) makrozyklischen Rings erfolgt enzymatisch durch mehrere posttranslationale Modifikationen, kodiert durch die neun Gene *tsrT, H, E, D, U, I* des BGC.<sup>[40],[41],[42],[43]</sup> Eine abschließende Hydrolyse führt zur Abspaltung der Leit-Peptidsequenz und zur Schließung des zweiten Makrozyklus.<sup>[44]</sup> Der *C*-terminale Schwanzabschnitt kann vor und nach der Bildung des ersten (A) makrozyklischen Rings ausgebildet werden, wobei hierbei die Rolle des Leit-Peptids noch nicht ganz geklärt ist.<sup>[45]</sup> Bis zum jetzigen Zeitpunkt und trotz intensiver Forschung gilt die ribosomale Biosynthese von Thiostrepton noch nicht als

vollständig verstanden. Es gibt immer noch Gene im BGC, deren Rolle während der Biosynthese noch nicht vollständig charakterisiert ist.

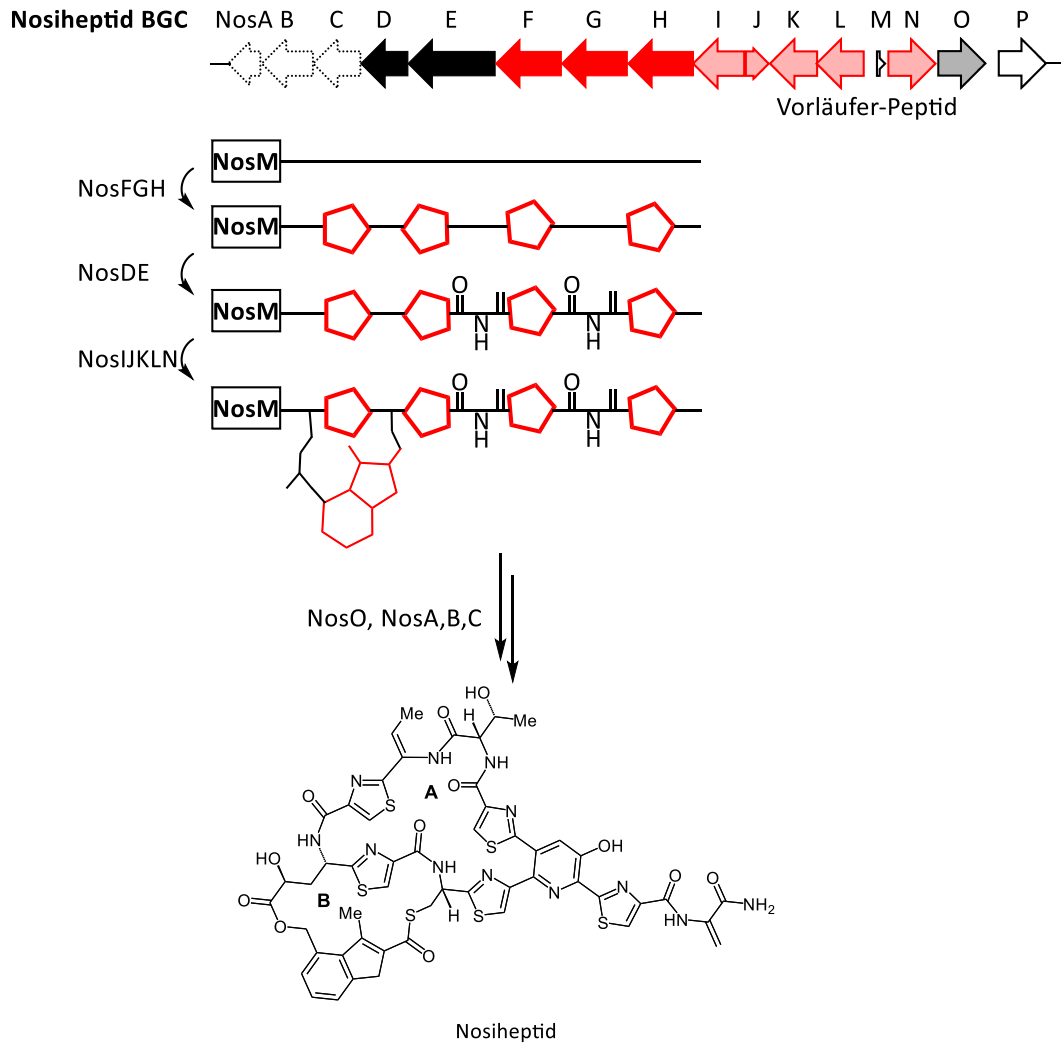


**Schema 1.1** Biosynthese-Gen-Cluster von Thiostrepton mit verkürzter schematischer Darstellung der ribosomalen, posttranslationalen Biosynthese. Das Vorläufer-Peptid TsrA wird ribosomal translatiert. Formierung der Thiazole und Thioazoline, katalysiert durch die kodierten Enzyme TsrO, M (rot). Ausbildung der Dehydroalanin-Reste durch die Dehydratase TsrJ, K, S (schwarz). Schließung des ersten (A) und zweiten (B) makrozyklischen Rings durch die kodierten Proteine der *tsrN, L* (grau) und *tsrA, T, H, E, D, U, P, R, I* (hellrot) Gene. Die Proteine TsrB, C, F sind in der Ausbildung des C-terminalen Schwanzes involviert (weiß gestrichelt). Bei TsrG, Q handelt es sich um noch nicht vollständig charakterisierte Proteine (weiß).

## Nosiheptid

Das BGC von Nosiheptid kodiert 16 Proteine (**Schema 1.2**). Darunter befindet sich das Gen *NosM*, welches das Vorläufer-Peptid exprimiert. Nach dessen ribosomaler Translation erfolgt die Bildung der Thiazol-Ringe durch die Dehydratase und Dehydrogenase NosF, G, H aus den im Kern-Peptid enthaltenen Cystein-Resten.<sup>[32]</sup> Die anschließende Bildung der Dehydroalanin-Einheiten erfolgt durch die Dehydratase NosD und E.<sup>[46]</sup> Im Gegensatz zu

Thiostrepton erfolgt der Aufbau des kleinen (B) makrozyklischen Ringes wohl vor der Bildung des ersten (A) makrozyklischen Ringes.<sup>[12]</sup>



**Schema 1.2** Biosynthese-Gen-Cluster von Nosiheptid mit schematischer Darstellung der ribosomalen und posttranslationalen Biosynthese. Das Vorläufer-Peptid NosM wird ribosomal translatiert. Bildung der Thiazole durch die kodierten Enzyme NosF, G, H (rot). Ausbildung der Dehydroalanin-Reste durch die Dehydratasen NosD, E (schwarz). Bildung der modifizierten 3,4-Dimethylindolsäure-Einheit und Schließung des zweiten (B) makrozyklischen Rings durch die kodierten Proteine NosI, J, K, L, N (hellrot) Zyklisierung des ersten (A) makrozyklischen Rings durch NosO (grau). Die Proteine NosA, B, C sind an der Ausbildung des C-terminalen Schwanzes beteiligt (gestrichelt). Bei NosP handelt es sich um einen transkriptionellen Regulator der *nos* Gene (weiß).

Die Synthese und Integration der modifizierten 3,4-Dimethylindolsäure-Einheit des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems wird durch die kodierten Proteine NosI, J, K, L, N realisiert.<sup>[47], [48],[49],[50],[51],[52]</sup> Ausgehend von der Aminosäure L-Tryptophan wird diese stark modifiziert und durch eine Esterbindung an den makrozyklischen Ring gekoppelt. Die

Ausbildung des zentralen Pyridin-Ringes und die Schließung des ersten (A) makrozyklischen Rings wird durch das Protein NosO katalysiert.<sup>[53],[54]</sup> Die Makrozyklisierung erfolgt vermutlich durch eine [4+2]-Zykloaddition drei räumlich benachbarter Dehydroalanin-Resten. Abschließend wird die Leit-Peptidsequenz abgespalten. Das C-terminale Carboxamid von Nosiheptid entsteht bei der Spaltung des Dehydroalanin-Restes durch die Amidase NosA.<sup>[55],[56]</sup> Aktuelle Studien identifizierten das NosP Protein als übergeordneten transkriptionellen Regulator aller strukturellen *nos* Gene.<sup>[57]</sup>

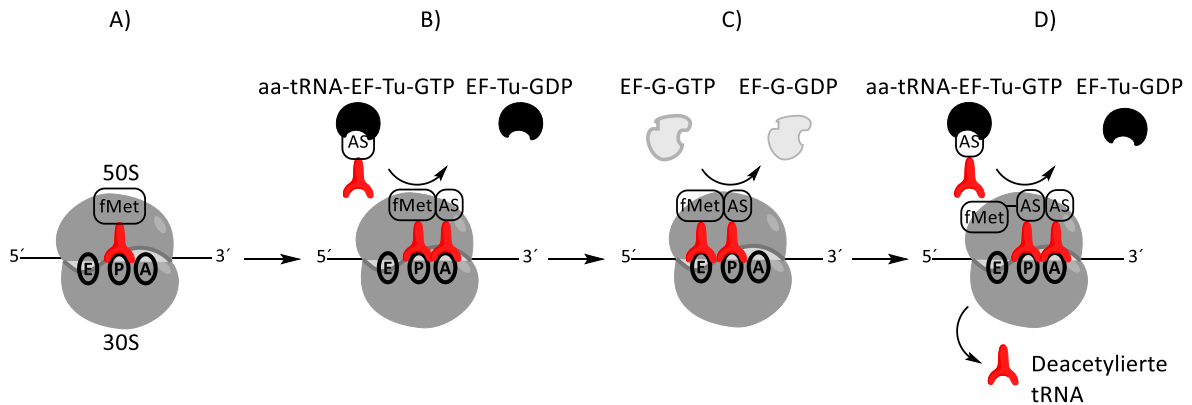
### 1.2.3 Biologische Aktivität von Thiopeptiden

Seit ihrer Entdeckung in den 50er Jahren geriet die Klasse der Thiopeptid-Antibiotika vermehrt durch ihre potente antibiotische Wirkung gegen eine Vielzahl von pathogenen Erregern in den Fokus der Forschung. Über die Jahre wurde deren wachstumshemmende Wirkung gegen prokaryotische und eukaryotische pathogene Erregern untersucht und die biologischen Eigenschaften systematisch charakterisiert.<sup>[21]</sup>

#### **Antibakterielle Wirkung**

Ihre antibakterielle Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien ist dabei die am besten aufgeklärte biologische Funktion. Abhängig von ihrer chemischen Struktur kann es sich bei den unterschiedlichen Thiopeptiden entweder um bakteriostatische oder bakterizide Substanzen handeln.<sup>[58],[59],[60]</sup> Jedoch wird immer die ribosomale Proteinelongation der Translation inhibiert (**Schema 1.3**).<sup>[61]</sup>

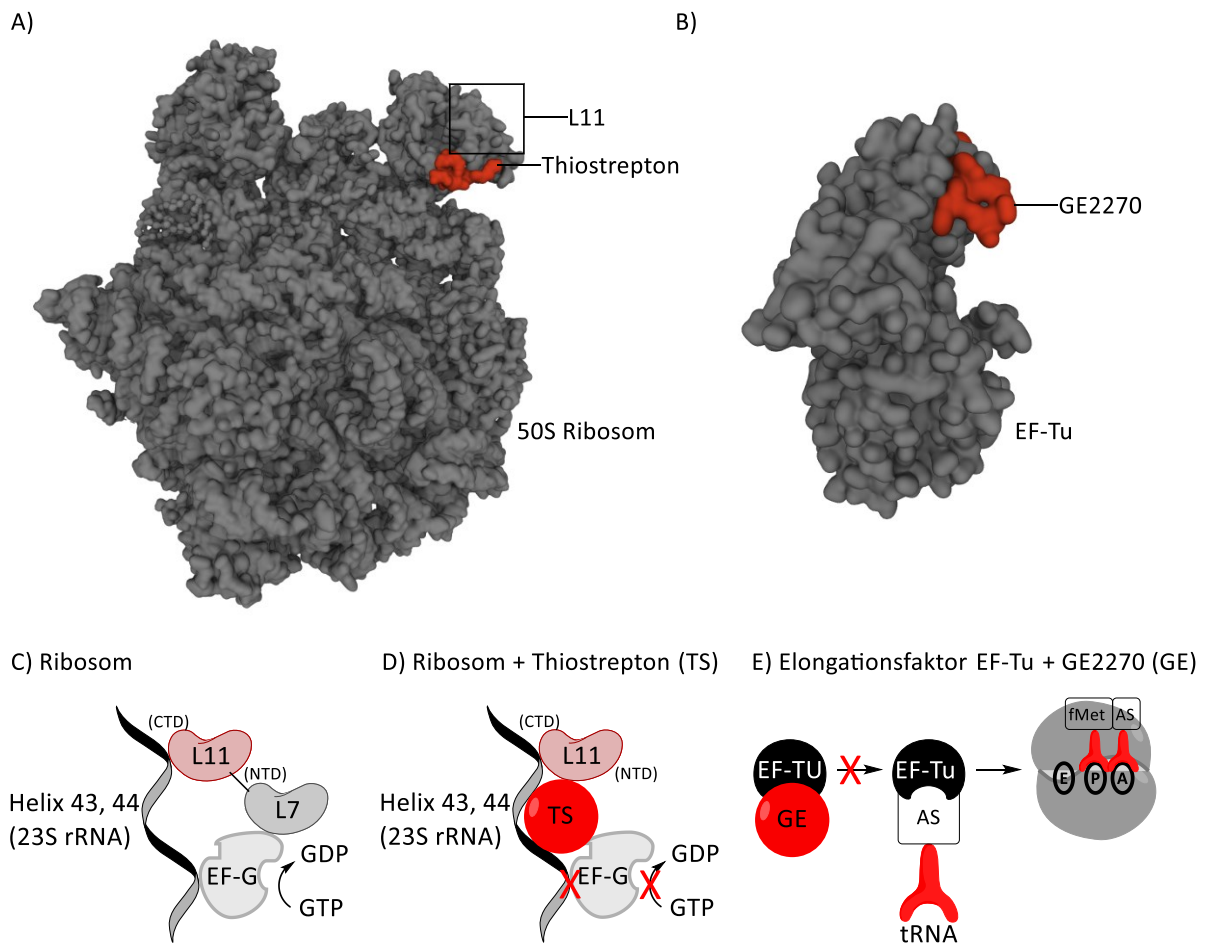
Der exakte Wirkmechanismus ist abhängig von der Größe des ersten (A) makrozyklischen Ringsystems.<sup>[7]</sup> Am Beispiel von Thiostrepton wurde in den letzten Jahrzehnten der zugrunde liegende Mechanismus der 26- und 35-gliedrigen Thiopeptide eingehend charakterisiert (**Abbildung 1.5 (A, D)**).<sup>[62]</sup>



**Schema 1.3** Übersicht der prokaryotischen Proteinelongation der Translation. A) Initiator-tRNA (fMet) bindet an die P-Stelle der 50S ribosomalen Untereinheit. B) Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) wird mit Hilfe des Elongationsfaktors EF-Tu an die A-Stelle transportiert, woraufhin die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren ausgebildet wird. C) Der Elongationsfaktor EF-G befördert die Translokation der Peptid-tRNA zur P-Stelle. D) Eine neue aa-tRNA bindet an die A-Stelle und die deacetylierte tRNA an der E-Stelle wird aus dem Komplex entlassen.

Diese Klassen der Thiopeptide binden zwischen dem ribosomalen Protein L11 und der 23S ribosomalen RNA an der bakteriellen 50S ribosomalen Untereinheit.<sup>[63],[64],[65]</sup> Durch die Bindung des Antibiotikums wird sowohl die Bindung des Elongationsfaktors G (EF-G) an das hoch konservierte GTPase-assoziierte Zentrum als auch dessen biologische Aktivität unterbunden und somit die Elongation der Proteinbiosynthese unterbunden.<sup>[66],[67],[68],[69],[70],[71]</sup>

Im Gegensatz dazu inhibiert die Klasse der 29-gliedrigen Thiopeptide den Elongationsfaktors Tu (EF-Tu) (**Schema 1.5 (B, E)**).<sup>[72]</sup> Dieses hoch konservierte und für die Translation essentielle GTPase-Enzym ist verantwortlich für die Erkennung und Einbindung der Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) an die A-Stelle des bakteriellen Ribosoms.<sup>[73]</sup> Das 29-gliedrige Thiopeptid GG2270 bindet durch seine sterische Komplementarität an die Guanosindiphosphat (GDP)-Konformation des Elongationsfaktors und verhindert so essentielle Regeneration von GDP zu GTP.<sup>[74],[75]</sup> Dadurch kommt es zu keiner Ausbildung des stabilen Ternär-Komplexes, bestehend aus aa-tRNA, EF-Tu und GTP. Interessanterweise weist die Klasse der 32-gliedrigen Thiopeptide keine antibiotische Wirkung auf.<sup>[76]</sup>



**Abbildung 1.5** Wirkmechanismus der 26- und 29-gliedrigen Thiopeptide. A) Kristallstruktur der Bindung von Thiostrepton (rot) an die 50S ribosomale Untereinheit (grau) (PDB: 3CF5).<sup>[71]</sup> B) Kristallstruktur der Bindung von GE2270 (rot) mit dem Elongationsfaktor EF-Tu (grau) (PDB:1D8T).<sup>[75]</sup> C) Grundzustand des prokaryotischen Ribosoms. Die C-terminale Domäne vom L11 Protein interagiert mit der Helix 43 und 44 der 23S rRNA. Die N-terminale Domäne des Proteins bindet an das L7 Protein. Der Elongationsfaktor EF-G interagiert mit dem N-terminalen Ende von L7 und der Helix 43 und 44. EF-G katalysiert GTP zu GDP für die Translokation der Peptid-tRNA. D) Thiostrepton verhindert die Bindung des Elongationsfaktors EF-G und dessen Aktivität. E) GE2270 inhibiert die Bildung des aa-tRNA-EF-Tu Komplexes.

### Weitere biologische Wirkungen

Neben der potenten antibakteriellen Wirkung weist die Klasse der Thiopeptid-Antibiotika weitere Aktivitäten gegenüber anderen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen auf. Das 26-gliedrige Thiostrepton gilt als eines der am besten untersuchten Thiopeptide. *In vitro* Studien mit der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 scheinen eine pro-apoptotische Wirkung durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors „Forkhead box M1“ (FoxM1) und des 20S Proteasoms zu haben.<sup>[77],[78],[79],[80],[81],[82]</sup>

Weiterhin wurde eine Aktivität gegenüber *Plasmodium falciparum*, dem pathogenen Erreger von Malaria, identifiziert.<sup>[83]</sup> Thiostrepton stoppt das Wachstum des Erregers in mehreren Entwicklungsstadien durch die Inhibierung der Zellteilung und des Proteasoms.<sup>[84],[85]</sup>

Basierend auf der fehlenden Wachstumshemmung von *Escherichia coli* unter Laborbedingungen wurde jahrzehntelang eine antibakterielle Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien ausgeschlossen. Neueste Studien konnten jedoch eine antibakterielle Wirkung von Thiostrepton und Thiocillin gegenüber zwei medikamentenresistenten gramnegativen Bakterien aufzeigen.<sup>[86],[87]</sup> Die Thiopeptide sind in der Lage, bei Eisen-Mangel die äußere Membran im mikromolaren Konzentrationsbereich zu durchdringen, durch die Nutzung der dann vermehrt exprimierten Siderophor-Pyoverdine-Rezeptoren.

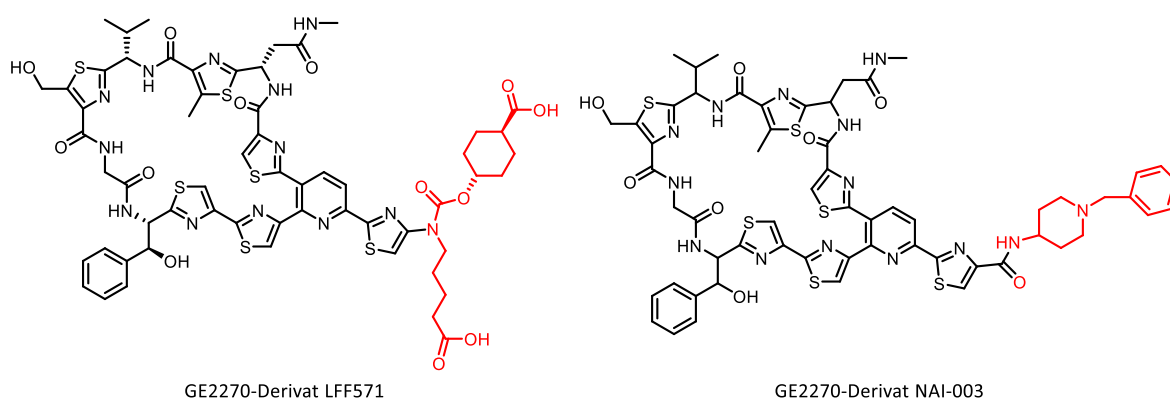
Weitere *in vitro* Studien konnten eine Aktivität von Thiostrepton und Micrococin P1 gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* nachweisen.<sup>[88],[80]</sup>

Auch andere Thiopeptide wurden auf ihre biologische Funktion untersucht. Das 26-gliedrige Thiopeptid Siomycin inhibiert die Antikörperproduktion muriner B-Zellen.<sup>[89]</sup> Das strukturell einzigartige Cyclothiazomycin A wurde als Renin-Inhibitor charakterisiert, während Cyclothiazomycin B1 sowohl antifungale als auch inhibierende Aktivitäten gegenüber der Bakteriophagen-RNA-Polymerase im mikromolaren Konzentrationsbereich aufweist.<sup>[90],[91],[92]</sup>

Umfassende Studien zum menschlichen Mikrobiom konnten das BGC von Lactocillin, einer Thiocillin-ähnlichen Verbindung, in einer Vielzahl von *Firmicutes* and *Actinobacteria* identifizierten.<sup>[93]</sup> Das Thiopeptid soll dabei eine bedeutende Rolle zur Erhaltung und Ausbildung bakterieller Nischen aufzeigen. Das Berninamycin-ähnliche Thiopeptid Cutimycin wird von dem auf der Haut lebenden Kommensalen *Cutibacterium acnes* produziert und wirkt gegen eine Besiedelung der pathogenen Erreger *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*.<sup>[94],[95]</sup> Die symbiotisch lebenden Bakterien in der Ameise *Trachymyrmex septentrionalis* produzieren das Thiopeptid GE37468, um gegen andere konkurrierenden Bakterien entgegenzuwirken.<sup>[96]</sup>

### 1.2.4 Anwendung

Das antibiotische Profil gegenüber einer Vielzahl von diversen pathogenen Erregern *in vitro* zog die Aufmerksamkeit sowohl der akademischen als auch der industriellen Welt auf die Klasse der Thiopeptid-Antibiotika. Durch ihren bislang nicht genutzten Wirkmechanismus könnten sie eine Alternative zu bekannten Antibiotikaklassen sein, um aufkommende Antibiotikaresistenzen von humanpathogenen Erregern zu überwinden. Thiopeptide wie Nosiheptid und Nocathiacin zeigen zum Beispiel eine starke wachstumshemmende Wirkung gegenüber dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stamm, dem Vancomycin-resistenten *Enterococcus* Stamm und dem Penicillin-resistenten *Streptococcus pneumonia* Stamm.<sup>[60],[97]</sup> Dennoch besitzen sie bislang ungelöste Nachteile, etwa eine schlechte systemischen Verteilung *in vivo*, geringe metabolischen Stabilität und sehr geringe Wasserlöslichkeit, was eine Anwendung als Medikament bisher verhindert. Allerdings werden die semi-synthetischen Derivate LFF571 und CB-06-01 vom 29-gliedrigen Thiopeptid GE2270 in klinischen Studien untersucht (**Abbildung 1.6**).



**Abbildung 1.6** Struktur der beiden semi-synthetischen Derivate LFF571 und CB-06-01 (NAI-003) vom Thiopeptid GE2270 mit gekennzeichnete(r) Modifikation(en) (rot).

Ersteres wurde von der Firma Novartis entwickelt und richtet sich gegen den Vancomycin-sensitiven *Clostridium difficile* Stamm.<sup>[98],[99]</sup> Leider scheiterte die Studie in der zweiten Phase an der geringen Bioverfügbarkeit des Thiopeptids, weshalb die weitere Entwicklung eingestellt wurde.<sup>[100],[101],[102]</sup> Das Derivat CB-06-01 (NAI-003) wurde von den beiden italienischen Firmen Cassiopea und Naicons Laboratories entwickelt und lizenziert.<sup>[103]</sup> Für die Behandlung von moderater bis schwerer Akne durchlief das Thiopeptid die zweite Phase



der klinischen Studie und konnte diese erfolgreich abschließen.<sup>[104]</sup> Als nächster Schritt soll die Formulierung angepasst werden und mit konzentrationsabhängigen Versuchsreihen begonnen werden (Stand 1. Quartal 2020).<sup>[105]</sup>

Einzig Thiostrepton und Nosiheptid befinden sich im Gebrauch, in der Veterinärmedizin. Thiostrepton wird in der Tiermedizin als ein Bestandteil einer topischen Salbe zur Behandlung von Hautinfektionen verwendet.<sup>[106]</sup> Nosiheptid wird in geringer therapeutischer Konzentration als wachstumsförderndes Nahrungsergänzungsmittel in der Viehzucht im asiatischen Raum eingesetzt.<sup>[107],[108],[109],[110]</sup>

## 1.3 Thiostrepton-induzierte Proteine

Bei Thiopeptiden wie dem 35-gliedrigen Radamycin oder dem 32-gliedrigen Lactazol A, konnte überraschenderweise keine antibakterielle Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien nachgewiesen werden.<sup>[76],[111],[112],[111]</sup> Die fehlende antibiotische Wirkung legte andere biologische Eigenschaften und eine eventuelle ökologische Rolle in bakteriellen Gemeinschaften nahe. Die Hypothese wurde durch Kultivierungsexperimente von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) mit Thiocillin bestärkt.<sup>[113]</sup> Die Zugabe des Thiopeptids in einer subminimalen hemmenden Konzentration induziert die Bildung eines Biofilms, unabhängig von der antibakteriellen Wirkung des Antibiotikums.

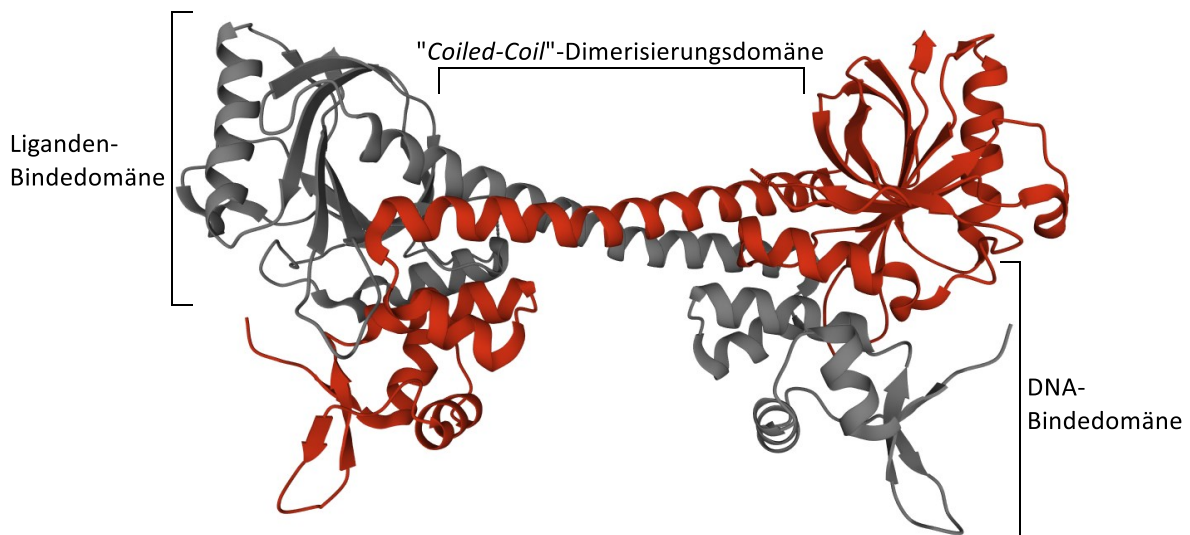
Bereits 1989 wurde von *in cellulo* Experimenten mit *Streptomyces lividans* 66 (*S. lividans*) und Thiostrepton berichtet.<sup>[114]</sup> In Gegenwart von Thiostrepton wurde die Expression von mindestens vier Proteinen nachgewiesen, den sogenannten Thiostrepton-induzierten Proteinen (TIP). Die charakteristische Fähigkeit von Thiopeptiden, die Expression der TIP zu fördern, wurde in den letzten Jahrzehnten dazu verwendet, neue Thiopeptide zu identifizieren. Dies führte unter anderem zur Entdeckung von Promothiocin A und B, Geninthiocin, Thiotipin und Thioxamycin.<sup>[115],[116],[117],[118]</sup>

### 1.3.1 Thiostrepton-induziertes Protein A „large form“ (TipAL)

Eines der ersten identifizierten TipA Proteine war das 28 kDa schwere Thiostrepton-induzierte Protein A „large form“ (TipAL), bestehend aus 253 Aminosäuren.<sup>[119]</sup> Das Protein setzt sich aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne, einer „Coiled-Coil“

Dimerisierungsdomäne und einer C-terminalen Liganden-Bindedomäne zusammen (**Abbildung 1.7**).<sup>[120]</sup>

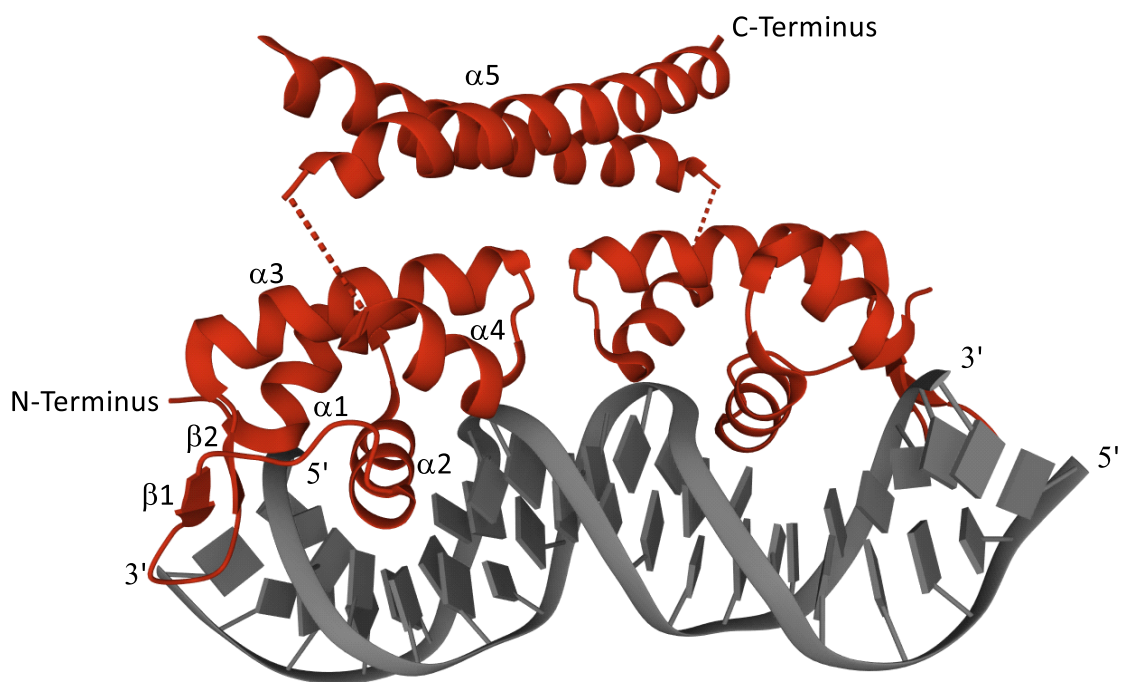
Anhand bioinformatischer Studien konnte sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die Dimerisierungsdomäne der Familie der „*Mercuric resistance operon regulatory protein*“ (MerR)-Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden.<sup>[121],[122]</sup> Zu den MerR-Transkriptionsfaktoren mit hoher Homologie zu TipA gehören zum Beispiel der multiresistente Regulator Mta aus *Bacillus subtilis*, das Regulatorprotein PmrA in *Streptococcus pneumoniae*, das SkgA Protein aus *Caulobacter crescentus* und das Albicidin-Bindeprotein Alba aus dem gramnegativen Bakterium *Klebsiella oxytoca*.<sup>[123],[124],[125],[126],[127]</sup>



**Abbildung 1.7** Model des MerR-Transkriptionsfaktor-Dimers BmrR von *B. subtilis* mit markierter Einteilung in die N-terminale DNA-Bindedomäne, die C-terminale Liganden-Bindedomäne und die „Coiled-Coil“-Dimerisierungsdomäne (PDB:3IAO).<sup>[128]</sup>

Die hohe Sequenzhomologie weist für die N-terminale Domäne ein hoch konserviertes „*Helix-turn-Helix*“ DNA-Bindemotiv aus. Die C-terminale Domäne konnte anfänglich keiner bekannten Proteinfamilie zugeordnet werden.<sup>[129]</sup> Durch die Homologie zu den MerR-Transkriptionsfaktoren wurde jedoch angenommen, dass es sich um eine Liganden-Bindedomäne handelt.

Die *N*-terminale DNA-Bindedomäne besteht aus fünf Alpha-Helices und zwei Beta-Faltblattstrukturen (**Abbildung 1.8**).<sup>[130]</sup> Die Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  repräsentieren dabei das „*Helix-turn-Helix*“ Bindemotiv und stehen in direkten Kontakt mit der großen Furche der adressierten Promotor-DNA. Die benachbarte kleine Furche der DNA wird von den beiden Beta-Faltblattstrukturen gebunden. Kristallografie und Modellierung konnten die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA als instabiles Dimer charakterisieren. Die Dimerisierung wird vermutlich durch die Bildung einer antiparallelen „*Coiled-Coil*“ Struktur der Alpha 5 Helices von zwei TipAL Monomeren vermittelt und konnte auch ohne DNA-Präsenz nachgewiesen werden.<sup>[120]</sup> Weitere Protein-DNA-Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren die Bindung zwischen dem Phosphat-Rückgrat der DNA und dem Protein-Grundgerüst.



**Abbildung 1.8** Überblick der *N*-terminalen DNA-Bindedomäne (rot) von TipAL in Verbindung mit der adressierten Promotor-DNA (grau) ( PDB: 2VZ4).<sup>[130]</sup>

Basierend auf der hohen Sequenzähnlichkeit der DNA-Bindedomäne zu den MerR-Transkriptionsfaktoren wurde angenommen, dass die Bindung von TipAL an den Promotor zu einer Verdrehung und Biegung der DNA führt. Dies begünstigt in der Regel bei diesen

Transkriptionsfaktoren die Bindung der RNA-Polymerase und initiiert die folgende Translation.<sup>[131],[132],[133]</sup> Jedoch wurde in Modelstudien gezeigt, dass allein die *N*-terminale DNA-Bindedomäne von TipAL nicht in der Lage ist, den Promotor strukturell die transkriptionelle aktive Form zu geben.<sup>[130]</sup>

### 1.3.2 Thiostrepton-induziertes Protein A „*short form*“ (TipAS)

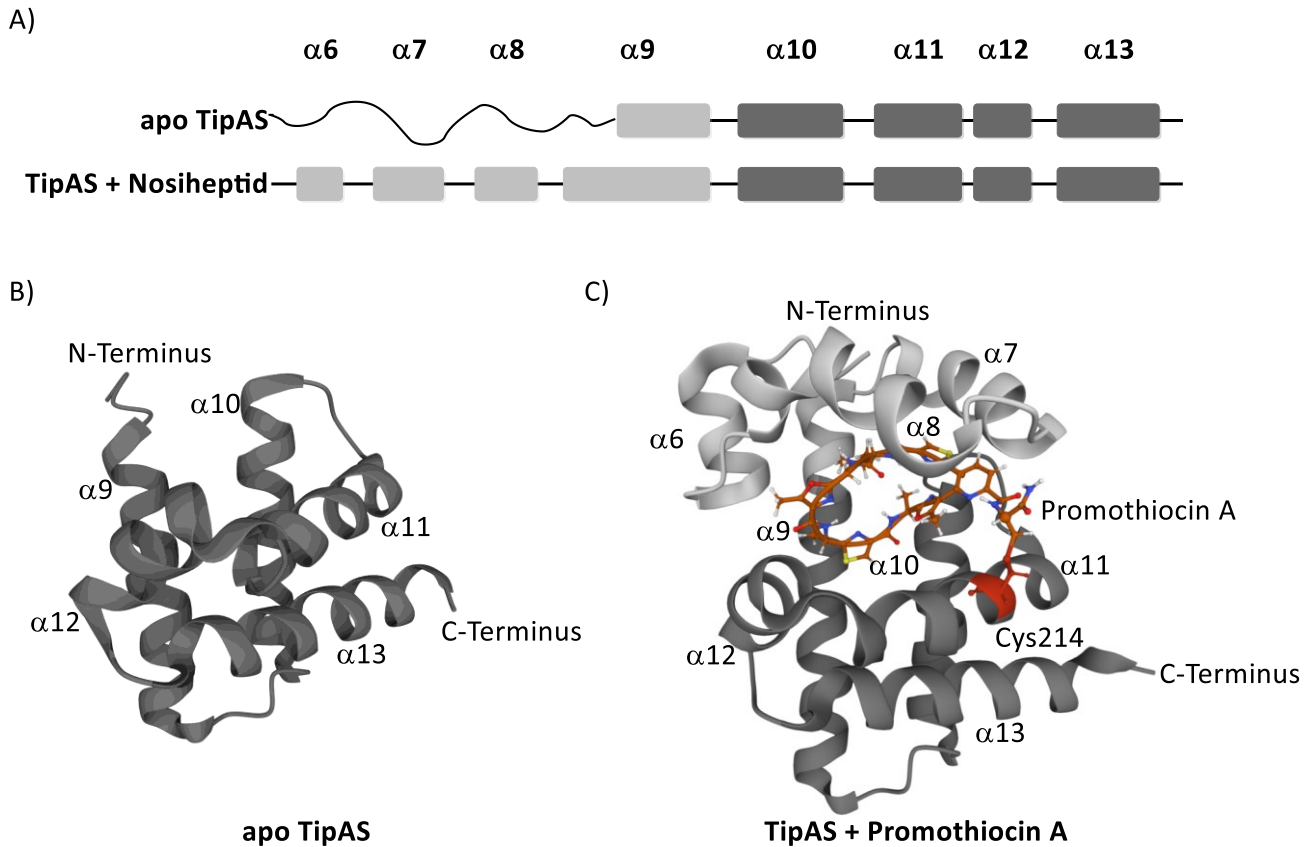
Nach der Inkubation von *S. lividans* 66 mit Thiostrepton fiel ein TIP besonders durch seine hohe Expression auf.<sup>[114]</sup> Das 16 kDa schwere Thiostrepton-induzierte Protein A „*short form*“ (TipAS) umfasst 144 Aminosäuren und bildet eine eigene Unterfamilie der MerR-Transkriptionsfaktoren. Eine Sequenzhomologie zu bekannten Proteinstrukturen besteht nicht.<sup>[129],[119]</sup> Mittels bioinformatischer Studien wurde TipAS als die *C*-terminale Liganden-Bindedomäne von TipAL identifiziert.

Das ungebundene apo TipAS liegt als Monomer vor und besteht aus einem größtenteils unstrukturierten, flexiblen *N*-Terminus und einem alpha-helikalen *C*-Terminus (**Abbildung 1.9** (A, B)).<sup>[120],[134]</sup> Sowohl TipAL als auch TipAS sind in der Lage mit einer Vielzahl von Thiopeptid-Antibiotika zu interagieren. NMR-Studien von TipAS mit Nosiheptid und Promothiocin zeigten die strukturelle Veränderung des Proteins durch Ligandenbindung.<sup>[135]</sup> Dabei befindet sich die Verbindung in einer tiefen hydrophoben Bindetasche, ausgebildet von den Alpha-Helices 9-13 des *C*-Terminus (**Abbildung 1.9** (B)). Die Bindung des Liganden führt zu einer Arretierung der vorher flexiblen hydrophoben Bindetasche und einer Konformationsänderung des unstrukturierten, flexiblen *N*-Terminus. Dies führt zur Ausbildung von drei neuen Alpha-Helices ( $\alpha 6$ - $\alpha 8$ ) und eine Erweiterung der Helix  $\alpha 9$  um zwei zusätzliche *N*-terminale Windungen. Die neu gebildeten Helices  $\alpha 7$ - $\alpha 8$  umschließen den Liganden obenauf (**Abbildung 1.9** (A, C)).

Wegen der gleichartigen Struktur von apo TipAS und Globin werden die TipAS-ähnlichen Proteine zur Globin-Protein-Familie gezählt. Das Thiopeptid-Antibiotikum befindet sich in einer ähnlichen Position wie das Fe-Protoporphyrin IX (Häm b) in Hämoglobin, dessen Bindung ebenfalls zu einer Ausbildung von neuen Alpha-Helices im Globin führt.<sup>[134]</sup>

Weiterhin wurde von einer irreversiblen kovalente Bindung zwischen dem letzten *C*-terminalen Dehydroalanin im Schwanzabschnitt des Thiopeptids und dem Cystein214 von TipAS im Zentrum der hydrophoben Tasche *in vitro* berichtet.<sup>[129],[136],[137]</sup> Diese Sulfa-

*Michael-Addition* können die Ausrichtung des Liganden unterstützen und ihn in der hydrophoben Bindetasche irreversibel einschließen.

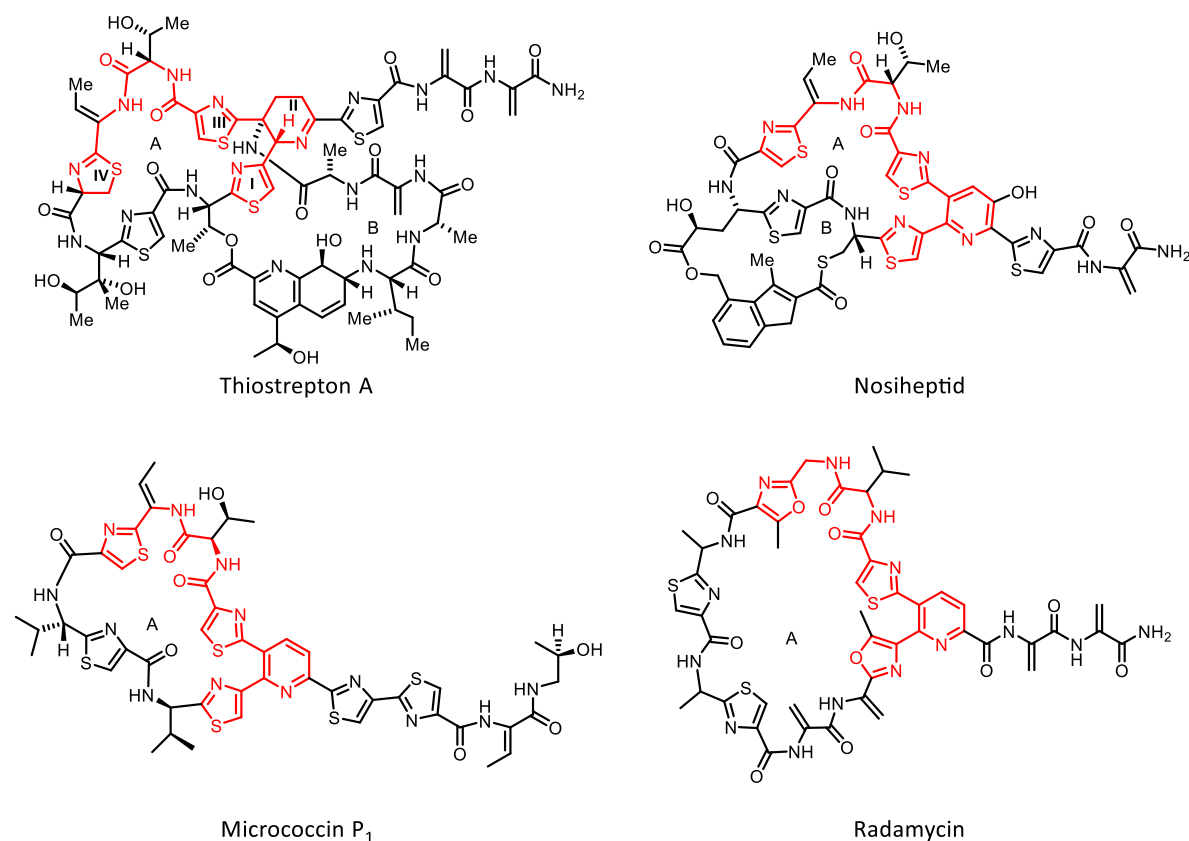


**Abbildung 1.9** Struktureller Aufbau von TipAS. A) Übersicht der Alpha-Helices und deren Anordnung mit und ohne Nosiheptid. B) Bändermodell von apo TipAS (dunkelgrau) (PDB: 1NY9).<sup>[135]</sup> C) Bändermodell von TipAS im Komplex mit Promothiocin A (Stäbchenmodell) (PDB: 2MBZ).<sup>[135]</sup> Die Ligandenbindung wird begünstigt durch eine kovalente Bindung zwischen dem Dehydroalanin-Schwanz des Thiopeptids und dem Cystein214 von TipAS (rot). Die Interaktion induziert die Entstehung neuer Alpha-Helices am N-Terminus (α6-α8, hellgrau).

### 1.3.3 Spezifisches Bindemotiv der Thiopeptid-Antibiotika in *S. lividans*

Strukturelle Vergleiche von interagierenden TIP mit Thiopeptiden, führten zum Vorschlag eines konservierten Erkennungsmotivs (**Abbildung 1.10**).<sup>[134, 136]</sup> Der konservierte Teil des Thiopeptids umfasst ein Thia- oder Oxazol (Position I), ein Pyridyl oder Piperidyl (Position II), ein Thiazol (Position III) und schlussendlich einen Thia- oder Oxazol-Ring (Position IV) der einen Hälfte des ersten (A) makrozyklischen Ringsystems.<sup>[135]</sup> In den bisher berichteten Bindestudien wiesen alle TIP-Thiopeptid Komplexe eine ähnliche Orientierung des Liganden und gleiche Interaktionen in der hydrophoben Bindetasche auf. Dabei gehen die Positionen

I, II und III in direkten Kontakt mit Aminosäureresten im Zentrum der Bindetasche, während Position IV mit den Aminosäuren des unstrukturierten *N*-Terminus interagiert und so dessen Faltung oberhalb der Liganden-Bindetasche induziert. Der zweite (B) makrozyklische Ring liegt in einem innen liegenden Hohlraum der hydrophoben Tasche vor, ohne die induzierte Faltung des *N*-Terminus zu stören.



**Abbildung 1.10** Chemische Strukturen bekannter Thiopeptide mit markierten Erkennungselementen für die TIP-Bindung an der Liganden-Bindedomäne (rot) nach Habazettl *et al.*<sup>[135]</sup>

In der Kristallstruktur von Thiostrepton und Nosiheptid mit der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*) wurde ein ähnlicher Bindemechanismus des ersten (A) makrozyklischen Ringsystems der Thiopeptide am Ribosom abgeleitet (**Abbildung 1.5** (A,D)).<sup>[71]</sup> Das Antibiotikum bindet mit dem konservierten Bindemotiv in der hydrophoben Tasche zwischen dem ribosomalen Protein L11 und den Helices H43 und H44 der 23S rRNA. Dabei gehen die Thiazolringe von Position III und IV in direkten Kontakt mit der 23S rRNA, während das Thiazol- und Pyridin- oder Piperidin-Einheiten der Positionen I und II im Kontakt mit dem ribosomalen Protein L11

stehen. Der nicht konservierte Teil der Thiopeptide befindet sich auch hier in einem nichtselektiven Hohlraum und geht keine wichtige Bindung ein. Thiopeptide, die nicht dieses Erkennungsmotiv in ihrer chemischen Struktur beinhalten, scheinen nicht in der Lage zu sein, mit dem Transkriptionsfaktor TipAL an die Promotor-DNA zu binden.<sup>[135]</sup> Einschränkend ist allerdings zu bemerken, dass es zu dieser vermuteten Ähnlichkeit der Bindung an das Ribosom und an TipAL bislang keine systematischen Untersuchungen gab.

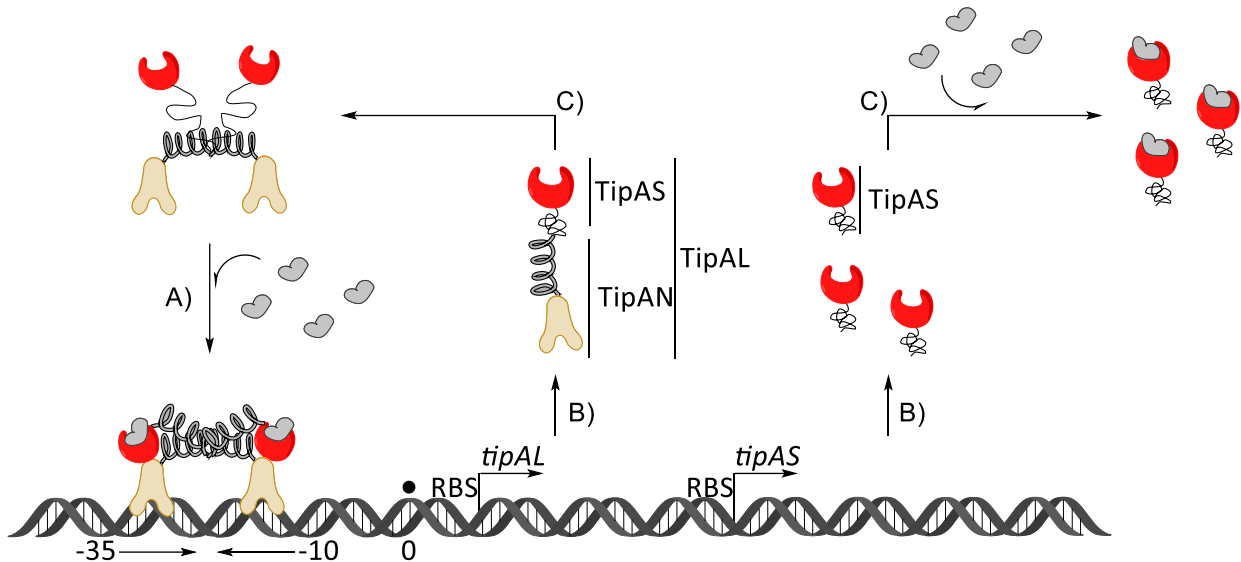
### 1.3.4 Expression und Regulation der *tipA* Gene in *Streptomyces lividans*

Nach Sequenzanalyse von *tipAL* und *tipAS* wurden beide Gene als unabhängige Expressionsprodukte eines gemeinsamen offenen Leserahmens identifiziert (**Schema 1.4**).<sup>[119]</sup> Dieser zeigt einen Transkriptionsstartpunkt, besitzt jedoch scheinbar zwei ribosomale Bindestellen mit je einem eigenen Translationsstart. Die Transkription der monocistronischen mRNA erfolgt durch die Bindung des Transkriptionsfaktors TipAL als Dimer an ein Motiv aus zwei invertierten Erkennungssequenzen des eigenen Promotors (*ptipA*).<sup>[136],[120]</sup> Diese befinden sich in einem 19 bp langen Zwischenraum der RNA-Polymerase-Bindestellen zwischen Position -35 und -10 vor dem Transkriptionsstart des *tipA* Gens.

Bei Anwesenheit der Thiopeptide erfolgt deren Bindung an die Liganden-Bindedomäne des Dimers und die Ausbildung des TIP-Thiopeptid-Komplexes. *In vitro* Bindestudien zeigten eine stärkere Assoziation des Transkriptionsfaktors mit dem *tipA* Promotor nach Bindung des Liganden und gleichzeitig eine Senkung der Dissoziationsrate von TipAL von der DNA.<sup>[120]</sup> Der ternäre DNA-TipAL-Thiopeptid-Komplex konnte bislang nicht strukturell charakterisiert werden.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von TipAL zu den MerR-Transkriptionsfaktoren scheint folgende Annahme plausibel: Bei der Dimerisierung zweier TipAL Monomere liegt die *N*-terminale Domäne des Transkriptionsfaktors als symmetrischer Dimer in einer überkreuzten Konfiguration vor, sodass sich die *N*-terminale DNA-Bindedomäne eines Monomers in Verbindung mit der *C*-terminalen Liganden-Bindedomäne des zweiten Monomers befindet.<sup>[138]</sup> Ausgehend von der Kristallstruktur der *C*-terminalen Domäne von BmrR mit einem Tetraphenylphosphonium-Liganden wird angenommen, dass nach der

Ligandenbindung die Faltung des teils unstrukturierten *N*-Terminus der Liganden-Bindedomäne apo TipAS ausgelöst wird.<sup>[139]</sup>



**Schema 1.4** Übersicht der Expression und Regulation des *tipA* Gens (schematisch). A) Der Transkriptionsfaktor TipAL bindet als Dimer an zwei Erkennungssequenzen. Diese befinden sich zwischen den RNA-Polymerase-Bindestellen der Positionen -35 und -10 vor dem Transkriptionsstart (schwarzer Punkt). Die kovalente Bindung des Thiopeptid-Liganden (grau) führt zu einer Strukturierung des *N*-Terminus von TipAL und einer Konformationsänderung der DNA. Die RNA-Polymerase-Bindestellen kommen in räumliche Nähe, die Polymerase bindet und initiiert die Transkription. B) Beide TIP sind Produkte eines gemeinsamen offenen Leserahmens, mit vermutlich eigenständigen ribosomalen Bindestellen und Translationsstartseiten (RBS). TipAS wird laut Literatur mit einem 20-fach höheren Überschuss expriemiert als TipAL.<sup>[114]</sup> C) Der Transkriptionsfaktor reguliert in einer autoregulatorischen Rückkopplungschleife die eigene Transkription, während TipAS durch Bindung der Thiopeptide die verfügbare Menge des Liganden herabgesetzt.

Der gefaltete, globulinähnliche alpha-helikale *N*-terminus steht in Verbindung mit der DNA-Bindedomäne des angrenzenden zweiten Monomeres von TipAL durch die „Coiled Coil“ Dimerisierungsdomäne, was zu einer gegenseitigen Versteifung führt.<sup>[130]</sup> Dies sollte eine Konformationsänderung von TipAL und eine klammerartigen Bindung der DNA-Bindedomäne um die DNA auslösen.<sup>[140]</sup> Durch die resultierende Verdrillung der DNA-Doppelhelix gelangen die beiden Bindestellen der RNA-Polymerase in räumliche Nähe.<sup>[134],[141]</sup> *In vitro* Bindestudien zeigten bei Anwesenheit des TipAL-Thiopeptid-Komplexes eine 100-fach erhöhte Affinität der Polymerase zum Promotor auf, resultierend in der Initiierung der Transkription.<sup>[120]</sup>

Obwohl TipAL auch ohne Ligand in der Lage ist die Expression des *tipA* Gens zu induzieren, erhöht sich die Rate in Anwesenheit der Thiopeptid-Antibiotika um das 200-fache.<sup>[114]</sup> Es



wurde berichtet, dass dann 20 x mehr TipAS als TipAL exprimiert werden soll.<sup>[119]</sup> In einer autoregulatorischen Rückkopplungsschleife induziert der translatierte Transkriptionsfaktor TipAL seine eigene Expression. Es wird vermutet, dass die vermehrte Expression von TipAS und dessen möglicherweise kovalente Bindung von Thiopeptid-Antibiotika einer natürlichen Regulation der *tipA* Transkription durch Verringerung der intrazellulären Ligandenkonzentration in einer negativen Rückkopplungsschleife dienen könnte.<sup>[142]</sup> Weitere funktionelle Konsequenzen und regulatorische Wirkung von TipAL oder TipAS auf andere Gene wurden bislang nicht beschrieben.

## 1.4 TIP-Thiopeptid Komplexe als sekundäre Botenstoffe

In einer Vielzahl von prokaryotischen und eukaryotischen Lebensformen entwickelten sich über die Zeit sogenannte Multi-Drug-Resistance (MDR)-Systeme. Sie dienen dazu, auf unterschiedliche zytotoxische Verbindungen zu reagieren und diese entweder durch Abtransport oder enzymatische Modifizierung zu inaktivieren.<sup>[135]</sup> Die Abwehrmechanismen richten sich meist gegen unterschiedliche chemische Verbindungen, sind daher nicht sehr selektiv. Bei den durch Studien am besten charakterisierten MDR-Mechanismen handelt es sich um die Inaktivierung und Ausschleusung von Krebsmedikamenten oder antimikrobiellen Substanzen durch Bindung an sogenannte MDR-Transporter. Die Expression dieser Transporter-Proteine wird oft durch einen Transkriptionsfaktor reguliert, der auf die Anwesenheit eines spezifischen Substrats reagiert und eine Bindetasche zur Interaktion aufweist.<sup>[143]</sup> Diese ist oftmals hydrophob.

Der Transkriptionsfaktor TipAL zeigt, von der spezifischen Erkennung bis hin zur Bindung, einige Parallelen zu einem MDR-System. Aufgrund der Sequenzhomologie zu den MerR-MDR-Transkriptionsregulatoren rechnen manche Autoren sowohl TipAL als auch TipAS zu den MDR-Transportern.<sup>[134]</sup> Die spezifische Bindung der Thiopeptid-Antibiotika und die ausgelöste autoregulatorische Rückkopplungsschleife bei Anwesenheit des Liganden führte zu der Annahme, dass die TIP Resistenz gegenüber den Thiopeptiden vermitteln.<sup>[114]</sup>

Diese naheliegende Annahme greift jedoch nicht generell. Analysen von unterschiedlichen *Streptomyces* Stämmen konnten die Expression von *tipA* Genen nicht in allen getesteten Organismen nachweisen.<sup>[142]</sup> Dabei handelte es sich um Stämme, die Thiopeptid-Antibiotika synthetisieren („Emitter“-Stämme). Diese tragen durch die Expression einer 23S rRNA-

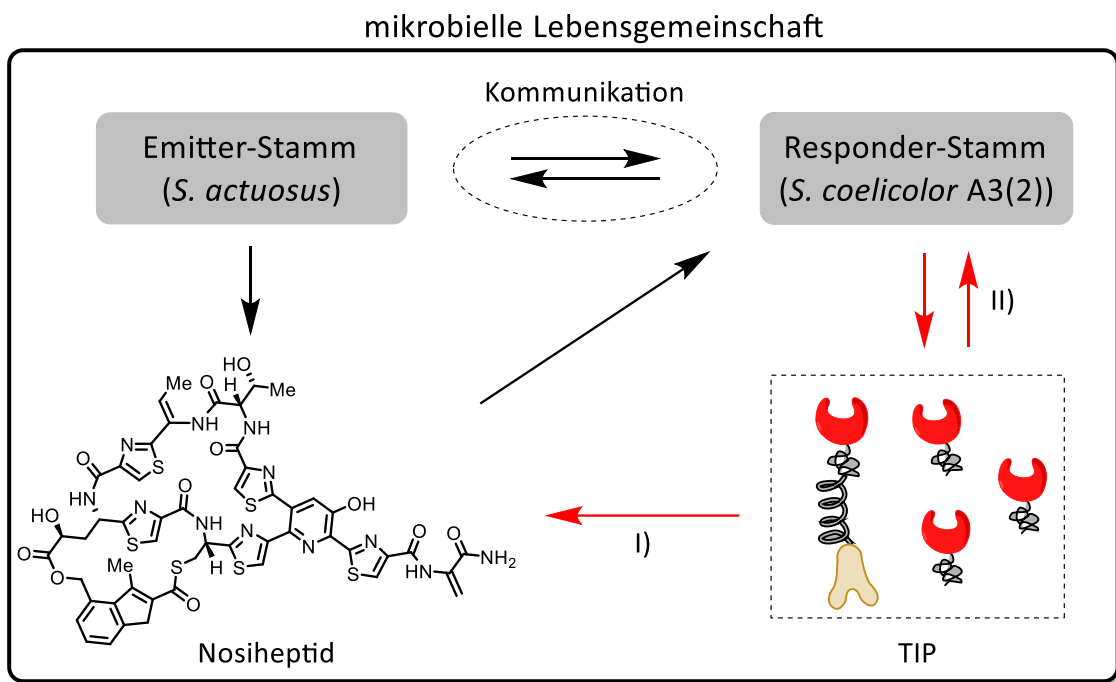
Methyltransferase (*tsr* Gen) einen hochwirksamen Resistenzmechanismus.<sup>[144],[145]</sup> Im Gegensatz dazu wurde mittels Southern Blot in *Streptomyces*-Stämmen mit enthaltenem *tipA* Gen keine Produktion von Thiopeptiden oder deren Resistenzgen nachgewiesen („Responder“-Stämme).<sup>[142]</sup> Die offenkundige Trennung von Thiopeptid-Produzenten und TIP-Produzenten in der Gattung der *Streptomyces* könnte eine Thiopeptid-basierte Kommunikation zwischen unterschiedlichen Organismen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften ermöglichen (**Schema 1.5**). Das Thiopeptid-Antibiotikum könnte dabei als interzellulärer Botenstoff dienen und bei Anwesenheit in den „Responder“-Stämmen die Expression der TIP auslösen.<sup>[7]</sup> Durch die geringe Löslichkeit würden sich sekretierte Thiopeptide sogar zur Musterbildung im Lebensraum der Mikroorganismen eignen. Der TIP-Thiopeptid-Komplex vermittelt in *S. lividans* nachweislich nicht nur die eigene Expression, sondern auch die von weiteren uncharakterisierten Genen.<sup>[114]</sup> Mindestens ein weiterer Peptid-Biosyntheseweg wird nach Thiopeptid-Inkubation transkriptionell aktiviert.<sup>[119]</sup>

## 1.5 Zielsetzung

Seit Anbeginn des 21. Jahrhunderts fokussierte sich die Forschung intensiv auf die Thiopeptid-Biosynthese, aber vernachlässigte den TIP-Thiopeptid-Komplex und dessen biologische Rolle.<sup>[11]</sup> 1989 wurde weitgehend durch Analogiebetrachtungen die Hypothese aufgestellt, dass die TIP eine Rolle in der Resistenzvermittlung gegenüber Thiostrepton spielen können. Jedoch wurde diese These nie experimentell untersucht oder näher betrachtet.

Mit der vorliegenden Arbeit soll das Wissen über die TIP und deren Effekte nach Thiopeptidinduktion in den *Streptomyces*-„Responder“-Stämmen erweitert werden (**Schema 1.5**). Im Zuge der vorgelegten Arbeit sollten die beiden folgenden Hypothesen näher untersucht werden:

- I) Stellt der TIP-Thiopeptid-Komplex einen direkten oder indirekten Resistenzmechanismus der *Streptomyces*-„Responder“-Stämme dar?
- II) Dient der TIP-Thiopeptid-Komplex als sekundärer Botenstoff zur Regulation von weiteren Genen in den *Streptomyces*-„Responder“-Stämmen?



**Schema 1.5** Übersicht der Thiopeptid-induzierten Kommunikation im *Streptomyces*-Konsortium. Die „Emitter“-Stämme synthetisieren die Thiopeptide, welche eine antibiotische Wirkung gegenüber den „Responder“-Stämmen aufweisen (schwarz). Die „Responder“-Stämme produzieren nach Kontakt mit den Antibiotika vermehrt die TIP (rot). Entweder dienen diese einem direkten oder indirekten Resistenzmechanismus gegenüber den Thiopeptiden (I) oder dienen als sekundäre Botenstoff für die Regulation weiterer Gene im „Responder“-Stamm (II).

Zuerst war unter Verwendung der kodierenden DNA von *tipAL* und *tipAS* eine bioinformatische Studie zur Verbreitung der TIP in der Domäne der Bakterien geplant, um deren Vorkommen und Relevanz innerhalb verschiedener Bakterien genauer zu charakterisieren. Anschließend werden in Zusammenarbeit mit M.Sc. Thomas Winkler und Dr. Veselin Nasufovic' semisynthetische Derivate von Thiostrepton und Nosiheptid auf ihr Profil einer selektiven biologischen Wirkung hin untersucht. Ziel war eine funktionelle

Trennung zu finden, idealerweise die Identifizierung einer Verbindung mit antibiotischer Wirkung ohne funktionelle *tipA*-Induktion, sowie einer Verbindung ohne antibiotische Aktivität mit *tipA*-Induktion. Durch die Kultivierung mit dem „Responder“-Stamm *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor* A3(2)) sollen beide biologische Funktionen unabhängig voneinander in verschiedenen Experimenten untersucht werden. Daraufhin könnten weiterführende Bindepartner von TIP-Thiopeptid-Komplexen als auch weitere Signalwege nach der *tipA*-Induktion charakterisiert werden, unabhängig vom antibiotischen Stresssignal. Zur weiteren Klärung der aufgestellten Hypothese sollte eine Knockout-Mutante des *tipA* Gens in *S. coelicolor* A3(2) hergestellt und charakterisiert werden. Anschließend sollten phänotypische Veränderungen der Mutante in Kultivierungsansätzen mit sowohl natürlich vorkommenden Thiopeptiden als auch den Derivaten von Thiostrepton und Nosiheptid untersucht werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erika Kothe (FSU-Jena) sollte die Mutante für weiterführende Proteomik- und Transkriptomik-Experimente verwendet werden. Im Gegenzug dazu soll ebenfalls eine *S. coelicolor* A3(2) Mutante mit zwei kodierenden Sequenzen des *tipA* Gens generiert und validiert werden. Neben der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens mit unterschiedlichen Thiopeptiden könnte diese Mutante für weiterführende Expressionsanalysen verwendet werden. Die zweite Variante sollte einen C-terminalen Polyhistidin-Tag tragen, wodurch Expressionsmuster von TipAL und TipAS unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden könnten.

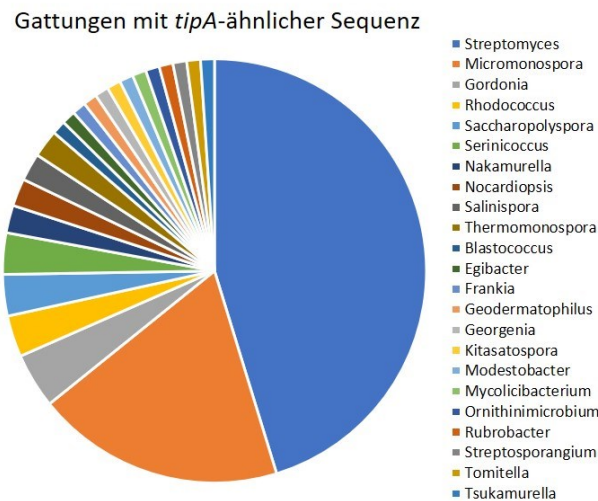
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Identifizierung von *tipA*-ähnlichen Genen in anderen Bakterien als *Streptomyces lividans*

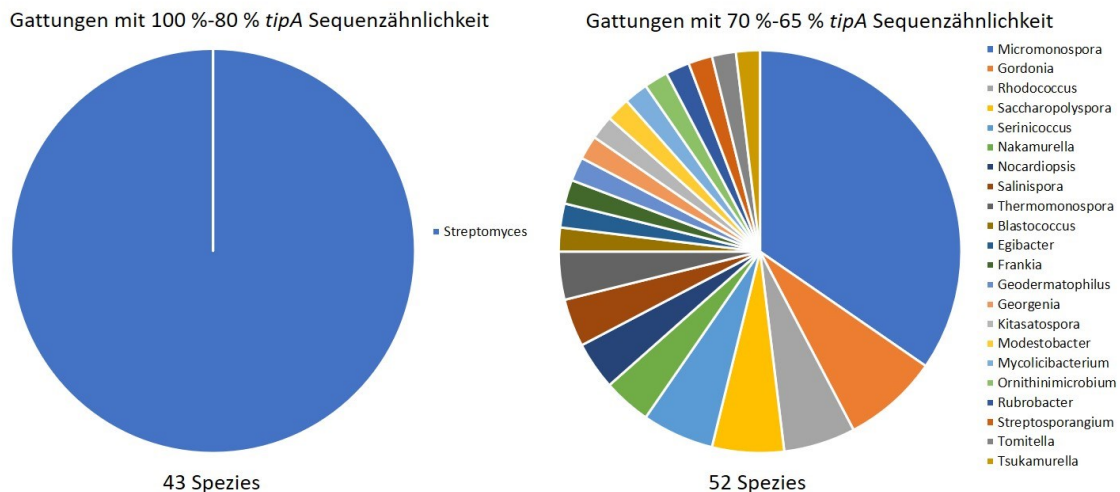
Ursprünglich wurde das *tipA* Gen in *Streptomyces lividans* 66 (*S. lividans* 66) identifiziert. Weitere *tipA*-ähnlichen Gene wurden in anderen Spezies der Gattung der *Streptomyceten* gefunden, unter anderem im nahverwandten Modelorganismus *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor* A3(2)). Um einen Überblick über das Vorkommen und die Verbreitung des *tipA* Gens zu bekommen wurde mit der kodierenden Sequenz des *tipA* Gens von *S. coelicolor* A3(2) eine weitumfassende BLAST-Suche gegen die gesamte Domäne der Bakterien durchgeführt (Kapitel 5.12.1). Der erhaltene Datensatz wurde mit Hilfe des multiplen Sequenzalignments in ClustalW analysiert und auf die wesentlichen Sequenzen reduziert (Kapitel 5.12.2).<sup>[146]</sup>

Es wurden von über 3 Millionen bakteriellen Genen insgesamt 95 Gene identifiziert, die über die gesamte Länge der Sequenz, eine über 65 % ige Sequenzähnlichkeit mit *tipA* aufwiesen (**Abbildung 2.1**). Die Sequenzen konnten zu 95 verschiedenen Spezies zugeordnet werden, die wiederum 23 verschiedenen Gattungen angehörten (**Tabelle 7.1**). Bei allen Gattungen handelte es sich um grampositive, aerob lebende Bakterien mit mesophilen Lebensstil, die dem Stamm der Actinobacteria zugeordnet werden konnten.

Über die Hälfte der *tipA*-ähnlichen Sequenzen wurden allein in den Gattungen der *Streptomyces* (43 Spezies) und *Micromonospora* (18 Spezies) Bakterien identifiziert. Jedoch zeigten nur die *tipA*-ähnlichen Gene der *Streptomyces* Bakterien die höchste *tipA* Sequenzähnlichkeit mit bis zu 80 % Homologie (**Abbildung 2.2**). Darunter befanden sich eine Vielzahl von Antibiotika-Produzenten, zum Beispiel *S. albogriseolus* (Neomycin), *S. ambofaciens* (Spiramycin, Netropsin), *S. hawaiiensis* (Thiostrepton), *S. hygroscopicus* (Hygromycin B, Cyclothiazomycin B1/B2), *S. kanamyceticus* (Kanamycin), *S. lincolnensis* (Lincomycin), *S. pristinaespiralis* (Pristinamycin), *S. venezuelae* (Chloramphenicol) und *S. antibioticus* (Nosiheptid). Weiterhin war *S. parvulus*, der Produzent des Zytostatikum Actinomycin D, und *S. rapamycinicus*, der Produzent des Immunsuppressivum Rapamycin im Datensatz enthalten.



**Abbildung 2.1** BLAST-Ergebnis der *tipA*-ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien.



**Abbildung 2.2** BLAST-Ergebnis der *tipA*-ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien. (A) Alle Gattungen mit einer Sequenzähnlichkeit von 100-80 % zum *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2). (B) Alle Gattungen mit einer Sequenzähnlichkeit von 70-65 % zum *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2).

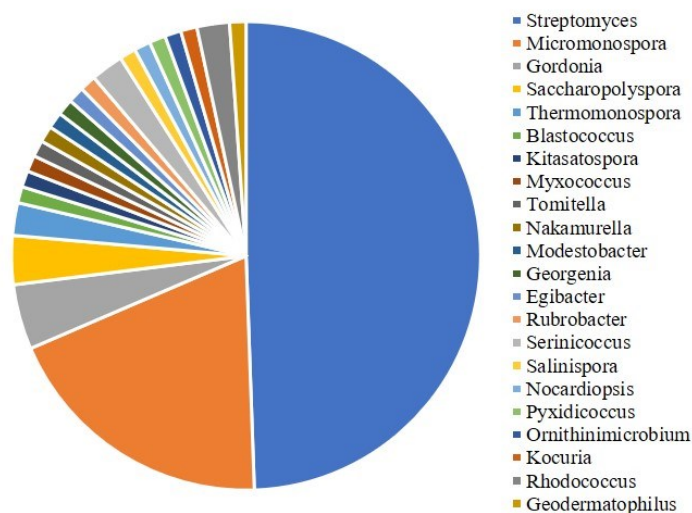
Die verbleibenden Gattungen wiesen eine Sequenzähnlichkeit von 65 %-70 % auf, wobei Spezies der Gattung der *Micromonospora* mit über 25 % vertreten waren (**Abbildung 2.2**, **Tabelle 7.1**). Darunter befanden sich ebenfalls bekannte Antibiotika-Produzenten, unter anderem *Micromonospora echinospora* (Gentamycin) und *Saccharopolyspora erythraea* (Erythromycin). Jedoch auch humane Krankheisterreger wie *Nocardiosis dassonvillei* und die Stickstofffixierer *Frankia inefficax* und *Micromonospora aurantiaca*. Bereits charakterisierte *tipA*-ähnliche Gene von *Bacillus subtilis* (Mta), *Caulobacter vibrioides* (SkGA), *Streptococcus pneumoniae* (PmrA) und *Klebsiella oxytoca* (Alba) wurden nicht im

zusammengetragenen Datensatz gefunden.<sup>[123],[125],[124],[126]</sup> Vermutlich liegt die Sequenzähnlichkeit unter 65 %, sodass angenommen werden darf, dass noch erheblich mehr Mikroorganismen funktionelle *tipA* Gene besitzen.

Ein direkter Vergleich der beschriebenen „Emitter“-Stämmen aus der Web-basierten Suchmaschine Thiofinder mit den 95 vermutlichen identifizierten „Responder“-Stämmen zeigte eine Überlappung bei drei *Streptomyces* Spezies (**Tabelle 7.2**). *Streptomyces antibioticus* (Nosiheptid), *Streptomyces haiwaiiensis* (Thiostrepton) und *Streptomyces hygroscopicus* (Cyclothiatomycin B1/B2) zählen zu den Thiopeptid-Produzenten, wiesen jedoch auch ein *tipA*-ähnliches Gen mit einer über 65 % Sequenzähnlichkeit auf. In einer weiterführenden BLAST-Analyse konnte in allen drei Stämmen die resistenzvermittelte 23S rRNA-Methyltransferase (*tsr* Gen) nicht gefunden werden.

Eine gesonderte BLAST-Suche mit der kodierenden Sequenz von *tipAS* identifizierte 89 unterschiedliche Spezies mit einem über 65 %igen homologen *tipAS*-ähnlichen Gen (**Abbildung 2.3**).

Gattungen mit *tipAS*-ähnlicher Sequenz



**Abbildung 2.3** BLAST-Ergebnis der *tipAS*-ähnlichen Sequenzen aus der Domäne der Bakterien.

Sowohl die Gattung der *Streptomyces* als auch die Gattung der *Micromonospora* gehörten wiederholt zu den häufigsten Vertretern. Überraschenderweise wurden zwischen dem *tipAS*-Datensatz und den *tipA*-Datensatz Unterschiede gefunden. 16 Spezies aus der *tipAS*-Ähnlichkeits-Suche fanden sich nicht in der *tipAL*-Ähnlichkeits-Suche (**Tabelle 2.1**). Zwei

davon, *Myxococcus hansupus* und *Pyxidicoccus fallax*, gehörten zum Stamm der Proteobakterien und sind gramnegative Bakterien.

Auf Grund der bioinformatischen Daten kann angenommen werden, dass das *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2) neben den *Streptomyces* in einer Vielzahl von Bakterien vorkommt.

**Tabelle 2.1** Spezies mit *tipAS*-ähnlichen Gen, die kein *tipAL*-ähnliches Gen tragen.

Spezies	Gram-Färbung	Homologie [%]	Inventarnummer
<i>Gordonia iterans</i>	(+)	66.75	CP027433.1
<i>Kocuria rosea</i>	(+)	66.90	CP035103.1
<i>Pyxidicoccus fallax</i>	(-)	67.23	MH048639.1
<i>Myxococcus hansupus</i>	(-)	69.01	CP012109.1
<i>Streptomyces luteoverticillatus</i>	(+)	72.38	CP034587.1
<i>Streptomyces armeniacus</i>	(+)	74.53	CP031320.1
<i>Streptomyces alfalfae</i>	(+)	75.06	CP065959.1
<i>Streptomyces subrutilus</i>	(+)	75.12	CP023701.1
<i>Streptomyces cattleya</i>	(+)	75.64	CP003219.1
<i>Streptomyces spectabilis</i>	(+)	76.22	CP040916.1
<i>Streptomyces sampsonii</i>	(+)	76.42	CP016824.1
<i>Streptomyces violascens</i>	(+)	76.42	CP029377.1
<i>Streptomyces koyangensis</i>	(+)	76.90	CP031742.1
<i>Streptomyces rectiverticillatus</i>	(+)	77.07	CP040752.1
<i>Streptomyces vinaceus</i>	(+)	77.18	CP023692.1
<i>Streptomyces peucetius</i>	(+)	78.87	CP022438.1

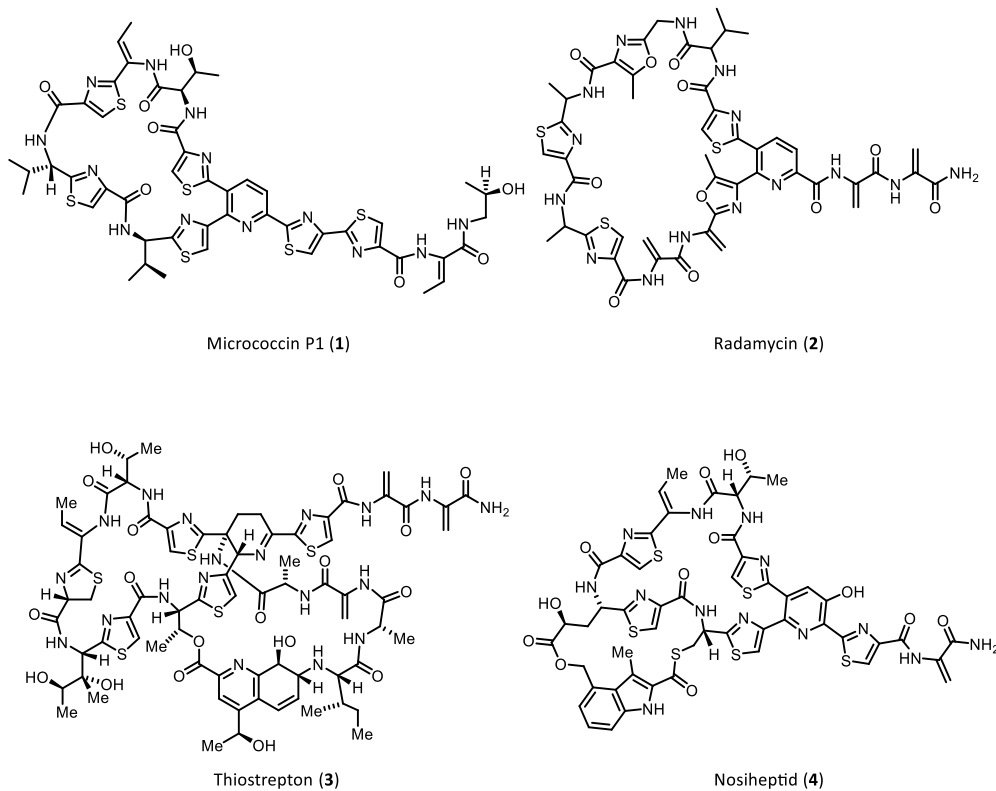
## 2.2 Biochemischer Teil

### 2.2.1 Charakterisierung von natürlich vorkommenden Thiopeptiden auf ihre biologischen Aktivitäten

Für die Identifizierung weiterer Bindepartner des TIP-Thiopeptid-Komplexen als auch weiterer Signalwege nach der *tipA*-Induktion sollte eine Thiopeptid-Verbindung ohne



antibiotische Aktivität mit *tipA*-Induktion, sowie eine Verbindung mit antibiotischer Wirkung ohne funktionelle *tipA*-Induktion als Kontrolle gefunden werden. Durch die funktionelle Trennung sollten die nachfolgenden Effekte der *tipA*-Induktion unabhängig vom antibiotischen Stresssignal untersucht werden.



**Abbildung 2.4** Verwendete natürlich vorkommende Thiopeptide.

Auf der Suche nach natürlich vorkommenden Thiopeptiden, die ein selektives biologisches Profil aufzeigen, wurden mehrere Vertreter mit unterschiedlichem strukturellen Aufbau und Größe untersucht. Micrococcin P1 (**1**) und Radamycin (**2**) wurden als Beispiele von Thiopeptiden mit nur einem makrozyklischen Ringsystem und mit jeweils unterschiedlichen Ringgrößen untersucht, wohingegen Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) als Beispiel für Thiopeptide mit zwei makrozyklischen Ringsystemen dienen (**Abbildung 2.4**).

### Minimal inhibierende Konzentration (MIC)

Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung der minimalen inhibierenden Konzentration (MIC) gegenüber *S. coelicolor* A3(2) bestimmt (Kapitel 5.11.4, Tabelle 7.3).

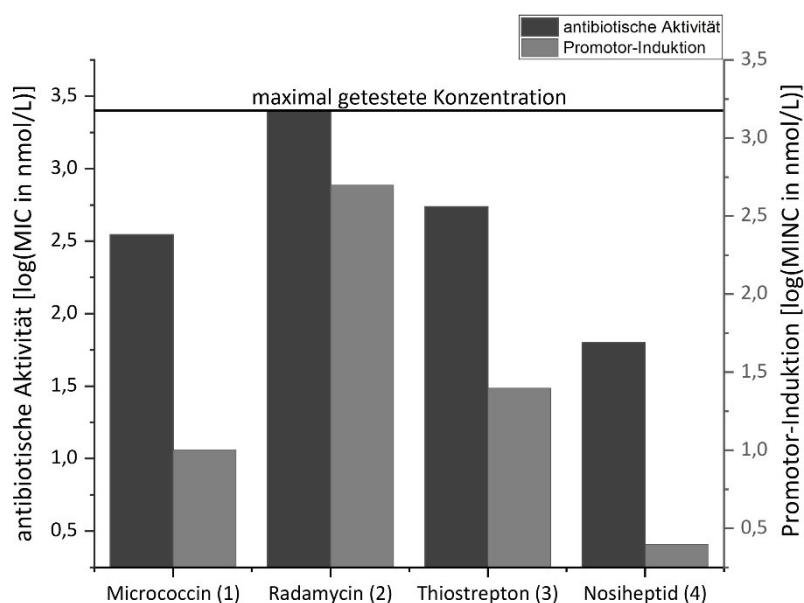
Der MIC-Wert eines Antibiotikums gegen einen *Streptomyces*-Stamm, gibt die niedrigste antibiotische Konzentration an, bei der augenscheinlich kein Bakterienwachstum mehr erfolgt. Hierbei wurde durch das nicht homogene Mycelwachstum der *Streptomyces*-Bakterien mit Festmedium anstatt mit Flüssigmedium gearbeitet und die Wasserlöslichkeit der Thiopeptide durch die Zugabe von 5 % DMSO im Endvolumen erhöht.

### **Minimal induzierende Konzentration (MINC)**

Zur Charakterisierung der Promotor-Induktion wurde die minimale induzierende Konzentration (MINC) mit Hilfe eines Luciferase-Reportersystems in *S. coelicolor* A3(2) untersucht (Kapitel 5.11.5, Tabelle 7.3).<sup>[147]</sup> Entgegen des Vorgehens von Ali *et al.* wurde hier Vollmedium verwendet, das Gesamtvolumen auf 150 µl halbiert und die Kultivierungszeit auf 27 h festgelegt. Die Wasserlöslichkeit der Thiopeptide wurden durch Zugabe des nichtionischen Detergens Pluronic®F-127 (0.3 %) und DMSO (2 %) erhöht und somit eine maximale Konzentration von 1 µmol/L ermöglicht. Die Kultivierung in einer Duetz-System Halterung (Kuhner) erlaubte die Reduktion von Kreuzkontaminationen und Verdunstung innerhalb der 96-Well-Mikrotiterplatte, sowie einen verbesserten Sauerstofftransfer.

Micrococcin P1 (**1**), Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) erwiesen sich als stark wachstumshemmend gegenüber *S. coelicolor* A3(2) im nanomolaren Bereich (**Abbildung 2.5**). Bei Nosiheptid (**4**) handelte es sich um das wirksamste Antibiotikum, mit einer 10-fach höheren Aktivität als Thiostrepton (**3**) und Micrococcin P1 (**1**). Im Falle von Radamycin (**2**) konnte, im Einklang mit der Literatur, keine antibiotische Wirkung bis in den mikromolaren Bereich gefunden werden.<sup>[112]</sup>

Alle getesteten natürlich vorkommenden Thiopeptide induzierten den *tipA* Promotor in *S. coelicolor* A3(2). Radamycin (**2**) benötigte im Vergleich zu Nosiheptid (**4**) eine 200-fach höhere Konzentration, um eine Promotor-Induktion auszulösen, und eine 10-fach höhere Konzentration im Vergleich zu Thiostrepton (**3**) und Micrococcin P1 (**1**).



**Abbildung 2.5** Charakterisierung der natürlich vorkommenden Thiopeptide auf ihre biologischen Funktionen. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes gegenüber *S. coelicolor* A3(2) bestimmt. Die Promotor-Induktion wurde mit Hilfe des MINC-Wertes in *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen.

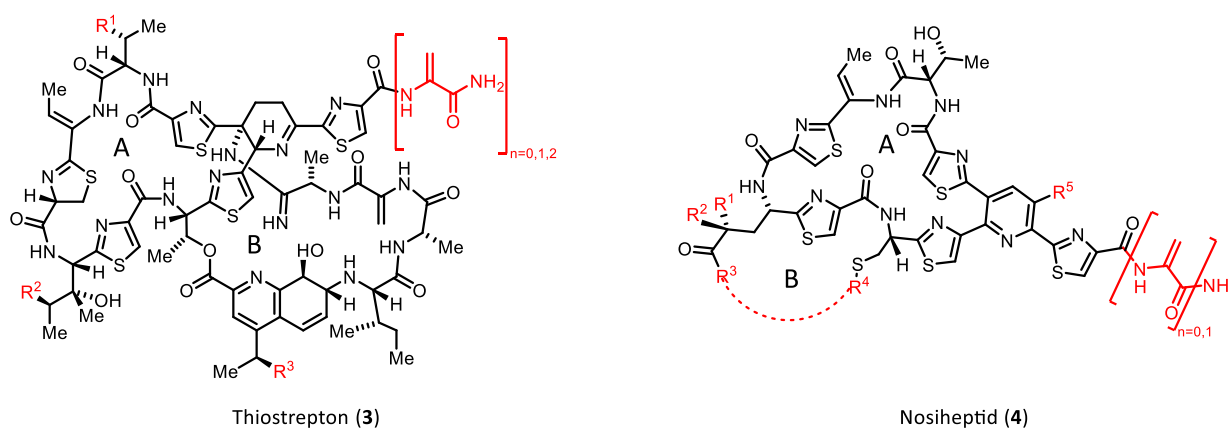
## 2.2.2 Charakterisierung von selektiven Thiopeptid-Derivaten

Die merklichen Unterschiede zwischen den Naturstoffen zeigte, dass es möglich sein könnte, die Potenz der *tipA*-Induktion von der antibiotischen Potenz zu trennen. Dies könnte sowohl Werkzeugverbindungen zum Studium der *tipA*-Funktion liefern als auch Antibiotika mit besseren Resistenzprofil zugänglich machen helfen. Idealerweise könnte also sowohl ein Vertreter mit antibiotischer Wirkung, jedoch fehlender *tipA* Induktion, und ein Thiopeptid ohne antibiotische Wirkung, aber mit stärkerer *tipA* Induktion als Radamycin (2) gefunden und charakterisiert werden.

In Zusammenarbeit mit M. Sc. Thomas Winkler und Dr. Veselin Nasufovic' wurde sich auf Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) als Grundgerüst für mögliche Derivatisierungen konzentriert. Beide Substanzen waren bereits in ihrer molekularen Struktur, Biosynthese und antibiotischer Wirkungsweise eingehend charakterisiert worden.<sup>[148],[149],[26],[59],[63],[32]</sup> Die erfolgreiche Totalsynthese von beiden Thiopeptiden erleichterte die Derivatisierung.<sup>[150],[151]</sup> Von M.Sc. Thomas Winkler und Dr. Veselin Nasufovic' wurden strukturell veränderte Derivate von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) synthetisiert. Die eingeführten Modifikationen konzentrierten sich dabei besonders auf die Dehydroalanin-Seitenkette, die

zugänglichen freien Hydroxylgruppen und Änderungen am zweiten (B) makrozyklischen Ringsystem (**Abbildung 2.6**).

Alle Thiopeptid-Derivate wurden auf ihre antibiotische Aktivität gegenüber *S. coelicolor* A3(2) und auf ihre Bindungseigenschaft an den Transkriptionsfaktor TipAL mit einem Luciferase-Reportersystem in *S. coelicolor* A3(2) untersucht (**Tabelle 2.2**, **Tabelle 2.3**, **Tabelle 2.4**) (Kapitel 5.11.4, Kapitel 5.11.5).



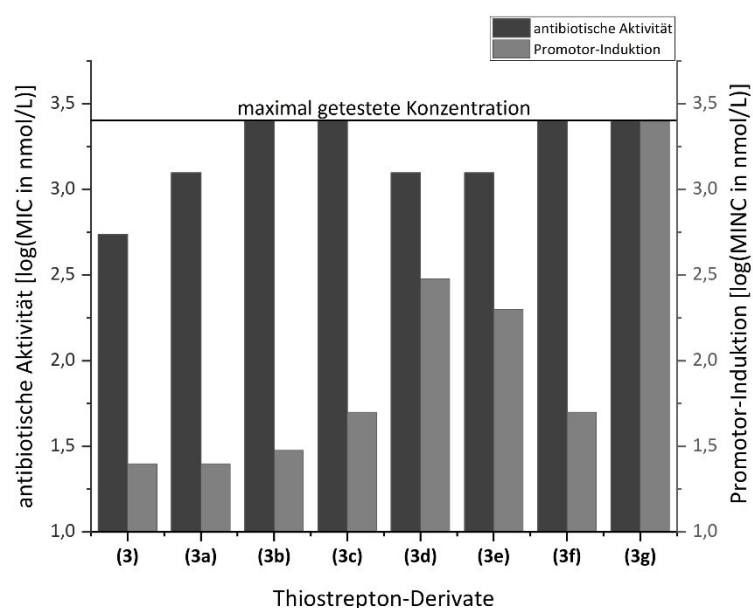
**Abbildung 2.6** Molekulare Struktur von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) mit farblich markierten zugänglichen Gruppen für die Derivatisierung (rot).

### Thiostrepton:

Der stufenweise Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette von Thiostrepton (3) hatte zur Folge, dass die antibiotische Wirkung gegenüber *S. coelicolor* A3(2) sank, bis hin zum vollständigen Verlust unter den Messbedingungen. Die *tipA* Promotor-Induktion blieb jedoch unverändert (**Tabelle 2.2**, **Abbildung 2.7 (3a,b)**). Das gleiche Aktivitätsprofil zeigte sich bei den Derivaten mit einer Modifikation an einen der beiden makrozyklischen Ringsysteme (**Abbildung 2.7 (3c-f)**). Die Addition eines Acylrests an eine der freien Hydroxylgruppen am ersten (A) makrozyklischen Ring führte jedoch ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Induktion von *tipA* (**Abbildung 2.7 (3d-e)**). Die Öffnung des zweiten (B) makrozyklischen Rings führte sowohl zum Verlust der antibiotischen Wirkung als auch zur ausbleibenden Induktion des *tipA*-Promotors (**Abbildung 2.7 (3g)**).

**Tabelle 2.2** Thiostrepton-Derivate die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden. Das Vorhandensein des zweiten (B) makrozyklischen Ringes zeigen „+“ und „-“ auf.

	Thiostrepton (3)	(3a)	(3b)	(3c)	(3d)	(3e)	(3f)	(3g)
R <sup>1</sup>								
R <sup>2</sup>								
R <sup>3</sup>								
n	2	1	0	2	2	0	2	2
B-Ring	+	+	+	+	+	+	+	-



























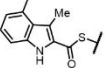
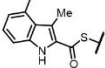
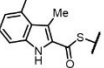
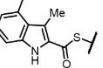


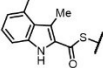
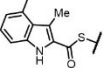






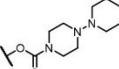
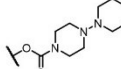
**Abbildung 2.7** Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre biologischen Funktionen. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes gegen *S. coelicolor* A3(2) bestimmt. Die Promotor-Induktion wurde mit Hilfe des MINC-Wertes in *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen.

Alle Modifikationen verringerten die antibiotische Wirkung der Thiostrepton-Derivate gegenüber *S. coelicolor* A3(2). Die *tipA* Promotor-Induktion wurde jedoch weniger beeinflusst. Einzig die Öffnung des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems führte zum völligen Ausbleiben der Induktion. Mit den Verbindungen **3b-c** und **3f** konnten Thiostrepton-

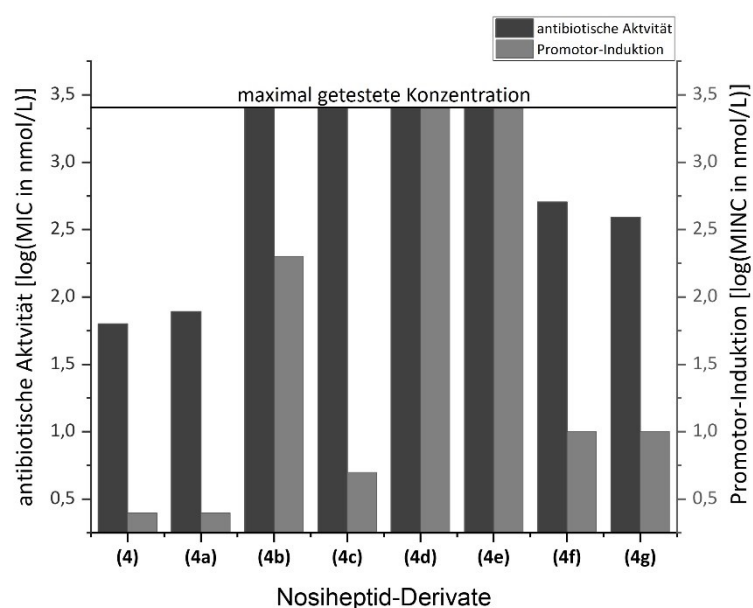
Derivate identifiziert werden mit fehlender antibiotischer Wirkung, aber guter *tipA* Promotor-Induktion (**Abbildung 2.7 (3b-c, f)**).

### Nosiheptid:

**Tabelle 2.3** Nosiheptid-Derivate die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden.

Rest	Nosiheptid (4)	(4a)	(4b)	(4c)	(4d)	(4e)	(4f)	(4g)
R <sup>1</sup>								
R <sup>2</sup>								
R <sup>3</sup>								
R <sup>4</sup>								
R <sup>5</sup>								
n	1	0	1	0	1	0	1	0

Im Fall von Nosiheptid (4) zeigte der Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette weder Einfluss auf die antibiotische Wirkung noch auf die Promotor-Induktion (**Tabelle 2.3, Abbildung 2.8 (4a)**). Dagegen führte der Austausch der -OH-Gruppe am zweiten (B) makrozyklischen Ring gegen ein Azid zu einem Verlust der antibiotischen Aktivität gegenüber *S. coelicolor* A3(2) und einer Minderung der Induktion von *tipA* (**Abbildung 2.8 (4b)**). Überraschenderweise konnte durch den gleichzeitigen Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette die Promotor-Induktion wiederhergestellt werden (**Abbildung 2.8 (4c)**). Die Öffnung des zweiten (B) makrozyklischen Rings führte zum Verlust beider biologischer Funktionen, wobei hier der Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette keinen Unterschied machte (**Abbildung 2.8 (4d-e)**). Funktionalisierung des Hydroxypyridins verringerte die antibiotische Wirkung und verschlechterte die Promotor-Induktion (**Abbildung 2.8 (4f-g)**).



**Abbildung 2.8** Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre biologischen Funktionen. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes gegen *S. coelicolor* A3(2) bestimmt. Die Promotor-Induktion wurde mit Hilfe des MINC-Wertes in *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen.

Auch im Fall von Nosiheptid (4) führten die Modifikationen an beiden makrozyklischen Ringen zu Veränderungen im biologischen Aktivitätsprofil. Einzig der Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette hatte keinen direkten Einfluss auf die antibiotische Wirkung und die Promoter-Induktion. Das Fehlen der Seitenkette konnte sogar die reduzierte Promotor-Aktivitäten wieder verstärken, obwohl nur die Anwesenheit des Dehydroalanins zur kovalenten Reaktion führen kann. Die Öffnung des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems führte jeweils zum Verlust beider biologischer Funktionen.

Da das zweite (B) makrozyklische Ringsystem offenbar eine tragende Rolle für beide biologische Funktionen innehatte, sollte mittels weiterer gezielter Synthese überprüft werden, inwieweit die antibiotische Aktivität gegenüber *S. coelicolor* A3(2) und die *tipA* Promotor-Induktion wiederhergestellt werden kann (**Tabelle 2.4**).

**Tabelle 2.4** Nosiheptid-Derivate mit unterschiedlichen Ringschlussmetathesen des zweiten (B) makrozyklischen B-Ringsystems, die auf ihre biologischen Funktionen untersucht wurden.

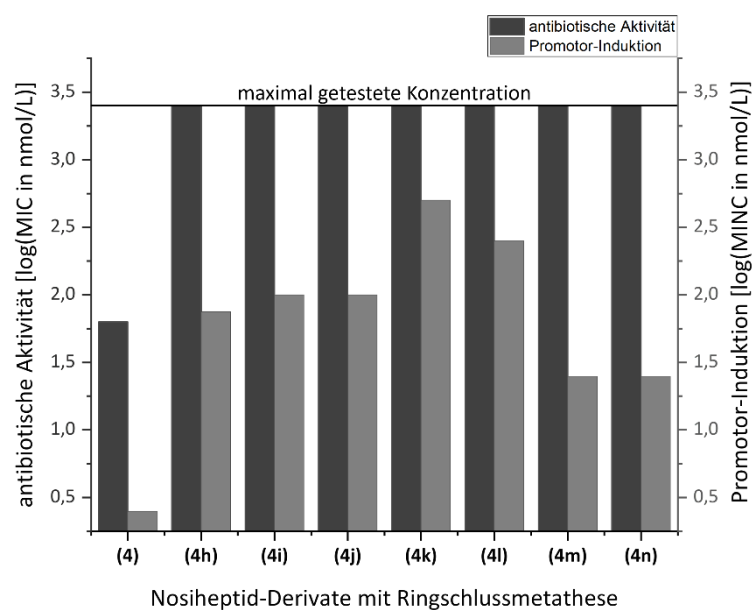
Rest	Nosiheptid (4)	(4h)	(4i)	(4j)	(4k)	(4l)	(4m)	(4n)
R <sup>1</sup>								
R <sup>2</sup>								
R <sup>3</sup>								
R <sup>4</sup>								
R <sup>5</sup>								
n	1	0	0	0	0	0	0	0

Bereits die Anknüpfung einer Indol-Gruppe am abgebauten zweiten (B) makrozyklischen Ring führte zu einer Wiederherstellung der Promotor-Induktion (**Abbildung 2.9 (4h)**). Der Ringschluß mit unterschiedlichen  $\alpha$ -Aminosäuren bewirkte ebenfalls eine gesteigerte Bindungsaffinität zum Transkriptionsfaktor (**Abbildung 2.9 (4i-k)**). Am vielversprechendsten waren die Derivate mit unterschiedlich großen aliphatischen Brücken, die durch Ringschlussmetathese zugänglich waren (**Abbildung 2.9 (4l-n)**). Je kleiner diese gewählt wurden, desto schwächer wurde die *tipA* Promotor-Induktion (**Abbildung 2.9 (4l)**). Dagegen zeigten Derivate mit einer Ringgröße im Bereich von Nosiheptid (4) das beste Induktionsvermögen, vergleichbar zu Thiostrepton (3) (**Abbildung 2.9 (4m-n)**). Alle Brücken hatten keinerlei Auswirkung auf die verlorene antibiotische Wirkung gegenüber *S. coelicolor* A3(2).

Allerdings konnten die verbrückten Analoga des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems die *tipA* Promotor-Induktion wieder auslösen. Weiterhin wurden Thiopeptid-Derivate identifiziert, welche nur noch eine biologische Funktion besaßen (**Abbildung 2.9 (4m-n)**). Mit Hilfe solcher selektiven *tipA*-Induktoren sollte in weiteren Experimenten gezielt auch Veränderung gesucht werden können, die nur durch die Bindung des Liganden an den Transkriptionsfaktor ausgelöst werden und die Auswirkungen des Antibiotikums ausschließen.

Unter den getesteten Verbindungen befand sich jedoch kein Derivat mit intakter antibiotischer Wirksamkeit, das den *tipA*-Promotor nicht induzierte.





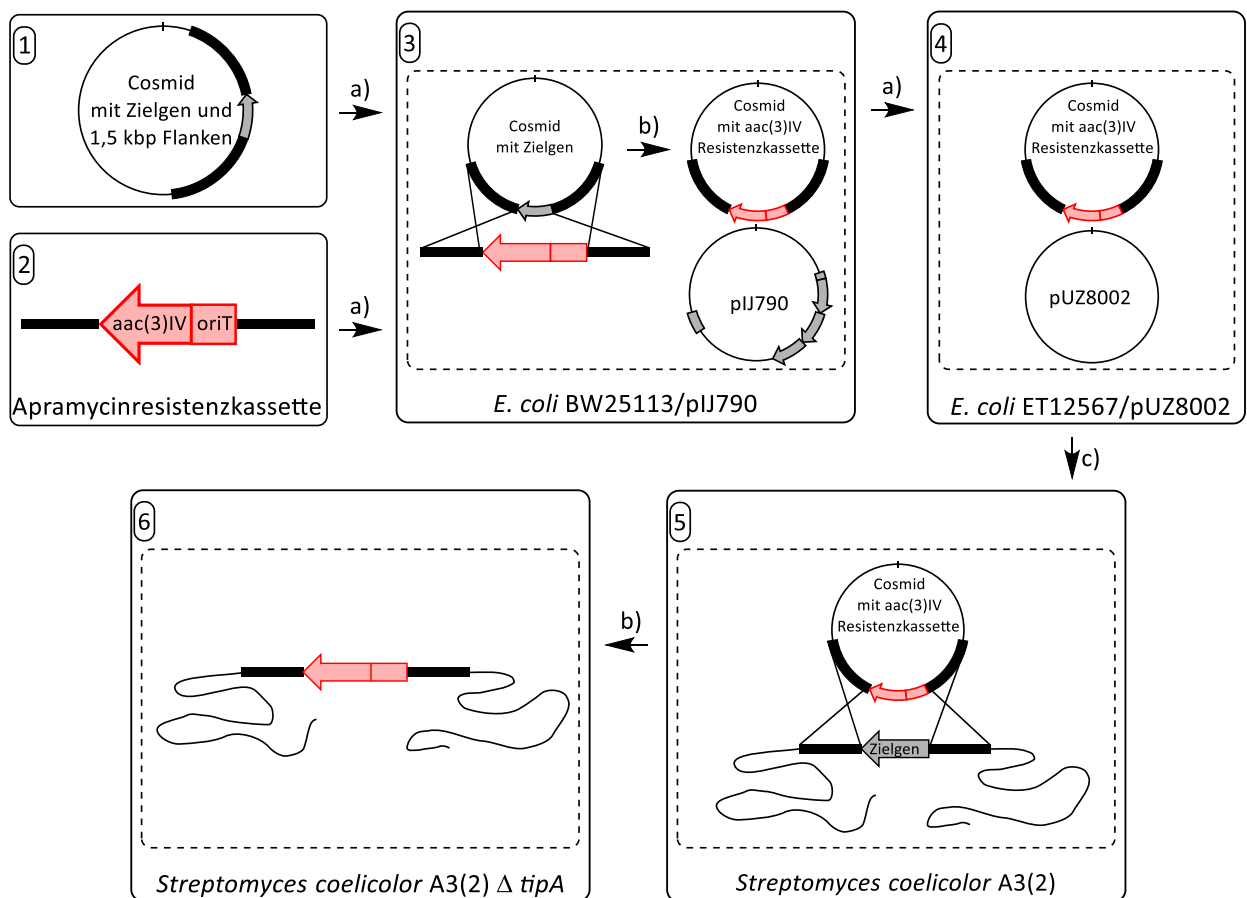
**Abbildung 2.9** Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate mit Ringschlussmetathese auf ihre biologischen Funktionen. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes gegen *S. coelicolor* A3(2) bestimmt. Die Promotor-Induktion wurde mit Hilfe des MINC-Wertes in *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen.

## 2.3 Molekularbiologischer Teil

### 2.3.1 Herstellung und Charakterisierung einer *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta tipA$ Mutante

Zur Klärung der Funktion der TIP und deren Effekte nach der Thiopeptidinduktion sollte das *tipA* Gen in den *Streptomyces*-„Responder“-Stamm *S. coelicolor* A3(2) ausgeschaltet werden. Die Mutante sollte für weitere Experimente genutzt werden, um phänotypische Veränderung in Kultivierungsansätzen mit Thiopeptiden und Veränderungen auf Protein- und Transkriptomebene zu untersuchen. Die Knockout-Mutante wurde nach dem Prinzip des „PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ Protokolls von Gust *et al.* generiert (**Schema 2.1**).<sup>[152]</sup> Dabei wird das Zielgen mit umliegender genomischer Sequenz in ein *Streptomyces* Cosmid transformiert und eine Apramycinresistenzkassette mittels PCR mit 39 Nukleotiden der angrenzenden genomischen Sequenz des Zielgens homolog verlängert. Im *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm BW25113/pIJ790 erfolgt durch die Hilfe von kodierten Rekombinasen die homologe Rekombination zwischen dem Zielgen im Plasmid und der Resistenzkassette als PCR-Produkt. Das resultierende *Streptomyces* Cosmid beinhaltet

anstatt des *tipA* Gens die Resistenzkassette mit umliegender genomischer DNA des Zielgens. Nach Transformation in den nicht-DNA-methylierten *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 erfolgt die intergenerische Konjugation mit *S. coelicolor* A3(2). Dabei wird auf chromosomaler Ebene das native *tipA* Gen mit der Apramycinresistenzkassette durch homologe Rekombination ausgetauscht und so die *Streptomyces coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante erzeugt.

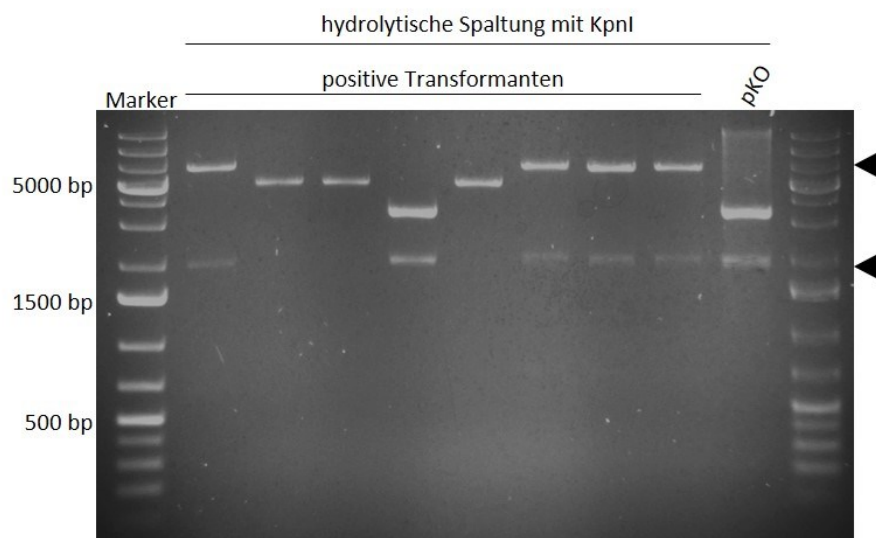


**Schema 2.1** Generierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante angelehnt an dem „PCR targeting system“ von Gust *et al.*<sup>[152]</sup> a) Transformation, b) Homologe Rekombination, c) Konjugation

### A) Klonierungsstrategie zur Herstellung *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta tipA$ Mutante

Das native *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2) wurde mit jeweils 1.5 kbp umliegender chromosomaler Sequenz mit den Primern *tipA*<sup>+</sup>-F und *tipA*<sup>+</sup>-R amplifiziert (Kapitel 5.9). Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRV hydrolytisch gespalten und gereinigt. Zur Herstellung des *Streptomyces* Cosmids

wurde der Klonierungsvektors pKO ebenfalls mit BamHI und EcoRV geschnitten und mit dem PCR-Produkt des *tipA* Gens ligiert (**Schema 2.1** (1)). Das resultierende Plasmid ptipAcosmid wurde in elektrokompente *E. coli* BW25113/pIJ790 transformiert. Nach einer Analyse von acht positiven Transformanten durch Restriktionsverdau wiesen vier davon das zu erwartende DNA-Bandenmuster von ca. 6602 bp und 1922 bp auf. Eine Transformante enthielt das Ursprüngliche Plasmid pKO. Die restlichen drei zeigten eine ungeklärte DNA-Bande bei ca. 5000 bp (**Abbildung 2.10**).

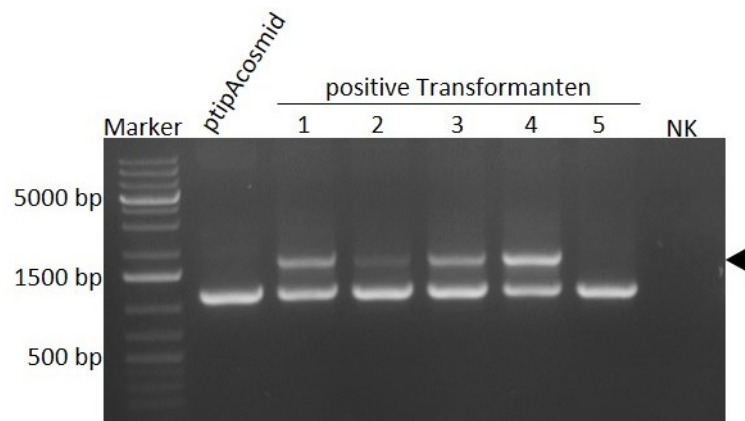


**Abbildung 2.10** Restriktionsanalyse mit KpnI von positiven Transformanten aus *E. coli* BW25113/pIJ790. Plasmid-DNA des Klonierungsvektors pKO diente als Vergleichsprobe. Transformanten mit integrierten ptipAcosmid erzeugten ein spezifisches Bandenmuster (schwarzer Pfeil). Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“, (Thermo Scientific).

Die *tipA* Sequenzierung mit dem Primer tipAcosmid-F lieferte eine Transformante ohne Mutation in der kodierenden Sequenz des Gens. Diese wurde für die weiteren Schritt zur Generierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante verwendet.

Die Apramycinresistenzkassette wurde aus dem Trägerplasmid pIJ773 mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII herausgeschnitten und die zugehörig DNA mit einem Agarosegel gereinigt. Mit den Primern aac(3)IV-F und aac(3)IV-R wurde die Kassette mit 39 Nukleotiden der umgebenden Sequenz des *tipA* Gens verlängert (**Schema 2.1** (2))

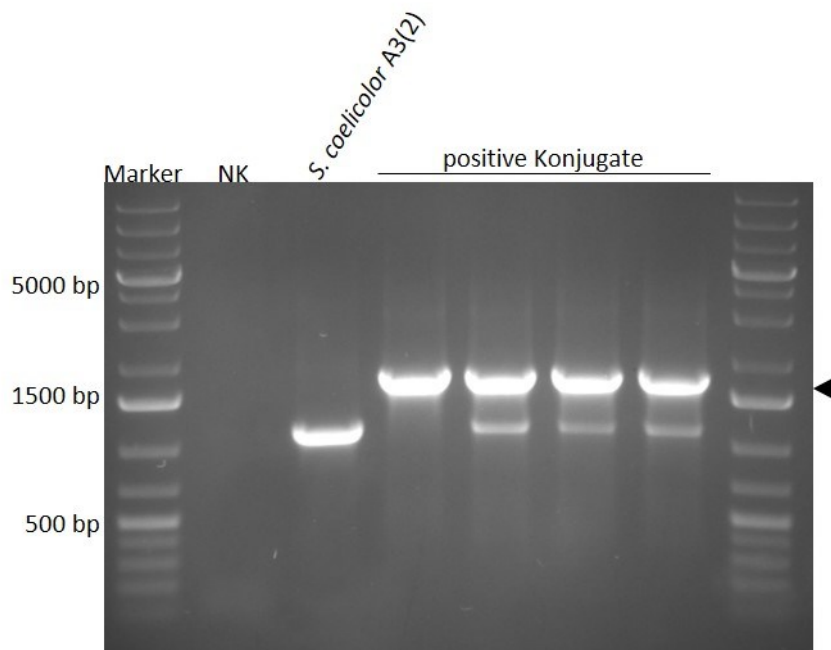
Anschließend wurde die so angepasste Apramycinresistenzkassette in den kompetenten *E. coli* Stamm BW25113/pIJ790/ptipAcosmid transformiert. Aufgrund der Temperatursensitivität des  $\lambda$  RED Rekombinationsplasmids pIJ790 wurden alle Schritte bei 30 °C durchgeführt. Die kodierten Gene *gam*, *bet* und *exo* auf dem Plasmid verhinderten den Abbau der linearen Apramycinresistenzkassette und förderten den Austausch des *tipA* Gens mit der Kassette durch homologe Rekombination (**Schema 2.1** (3)). Das entstandene Plasmid ptipAKO wurde mittels Kolonie-PCR und den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R nachgewiesen (**Abbildung 2.11**). Von den fünf getesteten positiven Transformanten wies nur einer die Bande für das native *tipA* Gen auf und war somit falsch positiv (**Abbildung 2.11** (5)). Die anderen vier enthielten sowohl das ursprüngliche *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2) als auch die Apramycinresistenzkassette. Auffällig waren die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen beiden PCR-Produkten. Die zweite getestete Transformante hatte einen geringeren Anteil an homolog rekombinierten ptipAKO Plasmid als die restlichen (**Abbildung 2.11** (2)). Dagegen enthielt die vierte getestete Transformante große Mengen an ptipAKO (**Abbildung 2.11** (4)). Für den weiteren Verlauf wurde daher mit diesem Transformanten weitergearbeitet.



**Abbildung 2.11** Kolonie-PCR zur Identifizierung von positiven Transformanten aus *E. coli* BW25113/pIJ790/ptipAcosmid mit den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA-Templat (NK). Plasmid-DNA von ptipAcosmid diente als Positivkontrolle. Das Plasmid ptipAKO lieferte ein PCR-Produkt von ca. 1716 bp (schwarzer Pfeil) und die Amplifikation des nativen *tipA* Gens eine Bande von ca. 1103 bp. Die Proben wurden auf einem 1 %iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

Das erfolgreich rekombinierte Plasmide ptipAKO wurde in den nicht-DNA-methylierten, elektrokompenten *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 integriert (**Schema 2.1** (4)) und für

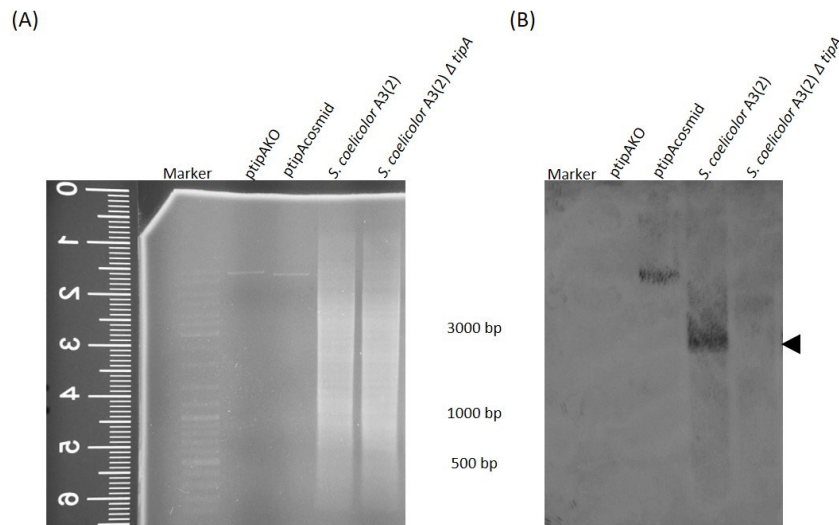
die intergenerische Konjugation mit *S. coelicolor* A3(2) verwendet (**Schema 2.1** (5)).<sup>[153]</sup> Die Einbringung des ptipAKO Plasmids führte auf chromosomaler Ebene zum Austausch des nativen *tipA* Gens mit der Apramycinresistenzkassette durch homologe Rekombination (**Schema 2.1** (6)). Positive Exkonjugante wurden auf 2xYT-Festmedium mit Apramycin selektiert und mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer tipAcosmid-F und tipAcosmid-R identifiziert (**Abbildung 2.12**). Von zehn getesteten Exkonjuganten wies einzig ein Vertreter eine saubere Deletion des *tipA* Gens auf.



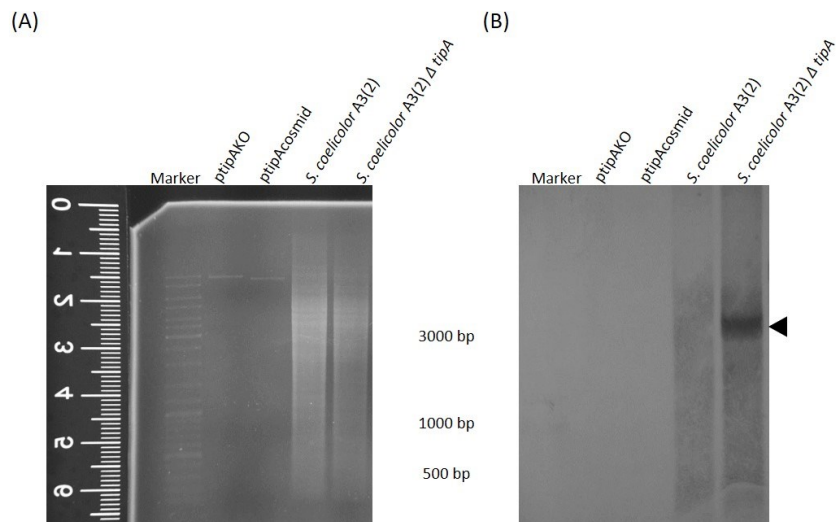
**Abbildung 2.12** Identifizierung von *S. coelicolor* A3(2) Exkonjuganten mit einem sauberen Knockout vom *tipA* Gen mit den Primern tipAcosmid-F und tipAcosmid-R. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA-Templat (NK). Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von *S. coelicolor* A3(2) verwendet. Eine saubere Deletion zeigte ein PCR-Produkt von ca. 1716 bp auf (schwarzer Pfeil). Die Amplifizierung des nativen *tipA* Gens erzeugte eine Bande von ca. 1103 bp. Die Proben wurden auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

### B) Validierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta$ *tipA* Mutante

Die Genotypisierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante erfolgte mittels Southern Blot (Kapitel 5.9). Dafür wurde die genomische DNA des Stammes mit dem Restriktionsenzym ApaI hydrolytisch gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 2.13** (A), **Abbildung 2.14** (A)). Zum Nachweis der integrierten Apramycinresistenzkassette wurde die Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonde aac(3)IV-Sonde-F/aac(3)IV-Sonde-R hergestellt und verwendet.



**Abbildung 2.13** Genotypisierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mittels Southern Blot. (A) Hydrolytische Spaltung der genomischen DNA und gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 1 % igen Agarosegel. (B) Signaldetektion der Apramycinresistenzkassette mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde aac(3)IV-Son-F/aac(3)IV-Son-R auf einer positiv geladenen Nylonmembran. Plasmid-DNA von ptipAKO diene als Negativkontrolle und ptipAcosmid als Positivkontrolle. Als Marker diene der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).



**Abbildung 2.14** Genotypisierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mittels Southern Blot. (A) Hydrolytische Spaltung der genomischen DNA und gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 1 % igen Agarosegel. (B) Signaldetektion des nativen *tipA* Gens mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde tipA-Son-F/tipA-Son-R auf einer positiv geladenen Nylonmembran. Plasmid-DNA von ptipAKO diene als Negativkontrolle und ptipAcosmid als Positivkontrolle. Als Marker diene der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“, (Thermo Scientific).

Nach der Signaldetektion mit dem Anti-DIG Antikörper wurde in der Mutante eine klare Bande für die Apramycinresistenzkassette nachgewiesen, wobei im *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm kein Signal identifiziert werden konnte (**Abbildung 2.13 (B)**).

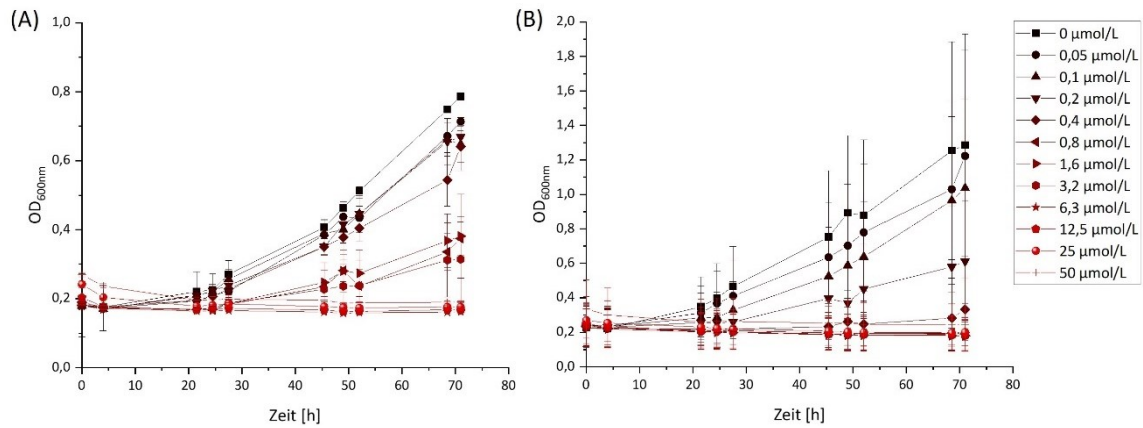
Als Kontrolle wurde das native *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2) ebenfalls mittels Southern Blot unter der Verwendung der DIG-Sonde tipA-Sonde-F/tipA-Sonde-R nachgewiesen. Dabei zeigte nur der Wildtyp-Stamm eine entsprechende Bande für das ursprüngliche *tipA* Gen auf. Die Mutante konnte kein signifikantes Signal aufweisen. (**Abbildung 2.14 (B)**). Das *tipA* Gen von *S. coelicolor* A3(2) konnte erfolgreich mit einer Apramycinresistenzkassette auf chromosomaler Ebene ausgetauscht werden. Mit diesem validierten Stamm konnten weitere Experimente zur Charakterisierung der biologischen Funktion des *tipA* Gens durchgeführt werden.

### C) Charakterisierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta$ *tipA* Mutante

Zur Charakterisierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante wurde sowohl das Wachstumsverhalten mit steigender Konzentration von Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**), als auch die antibiotische Aktivität der Thiopeptide und deren Derivate gegenüber der Mutante untersucht (Kapitel 5.11.3, Kapitel 5.11.4).

Im Fall von Thiostrepton (**3**) zeigte der Wildtypstamm *S. coelicolor* A3(2) ein signifikantes Wachstum bis zu einer Konzentration von 0.4  $\mu\text{mol/L}$  und ein minimales nachweisbares Wachstum ab einer Konzentration von 3.2  $\mu\text{mol/L}$ . Nach ca. einem Tag gelangten die Bakterien in die exponentielle Wachstumsphase, wobei nach 72 Stunden noch keine stationäre Wachstumsphase erreicht war (**Abbildung 2.15 (A)**).

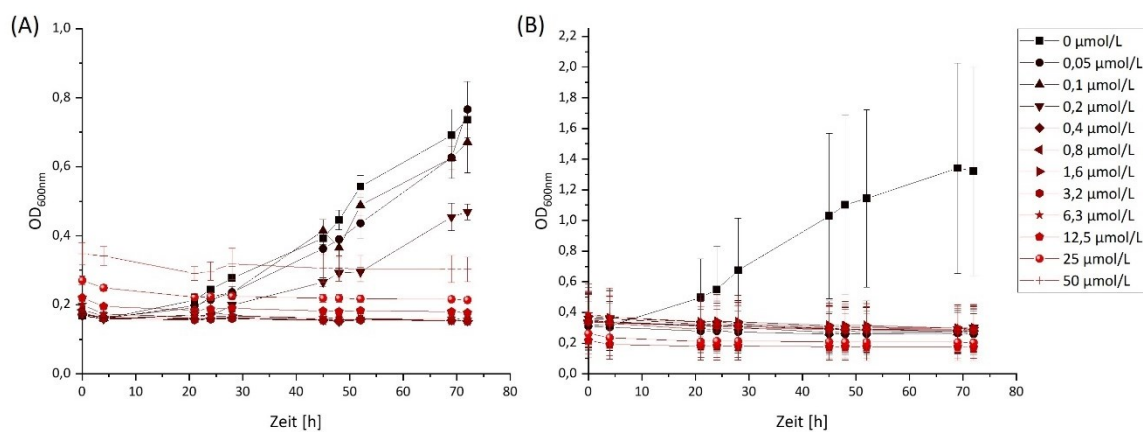
Im Vergleich dazu wurde bei der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante ein signifikantes Wachstum bis zu einer Konzentration von 0.1  $\mu\text{mol/L}$  Thiostrepton (**3**) beobachtet. Ab einer Konzentration von 0.8  $\mu\text{mol/L}$  wurde kein Zellwachstum über den getesteten Zeitrahmen festgestellt. Nach ca. 24 Stunden gingen die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase über (**Abbildung 2.15 (B)**). Einzig bei der Sporenbildung auf MS-Festmedium wurde eine zeitliche Verzögerung um mehrere Tage wahrgenommen.



**Abbildung 2.15** Wachstumsverhalten von *S. coelicolor* A3(2) (A) und der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  tipA Mutante (B) mit steigender Konzentration von Thiostrepton (3) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden.

Das Wachstumsverhalten mit Nosiheptid (4) zeigte eine stärkere Veränderung auf. Beim Wildtypstamm *S. coelicolor* A3(2) konnte ab einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{mol/L}$  kein signifikantes Wachstum festgestellt werden (Abbildung 2.16 (A)). Im Fall der Mutante zeigte einzig die Negativkontrolle ohne Nosiheptidkonzentration ein signifikantes Wachstum über die Inkubationszeit von 72 Stunden (Abbildung 2.16 (B)). Der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erfolgte ebenfalls nach ca. 24 Stunden, wobei nach 72 Stunden keine stationäre Wachstumsphase erreicht wurde.

Die erhöhten Fehlerbalken lassen sich durch das inhomogene Mycelienwachstum der *Streptomyces* Stämme erklären.



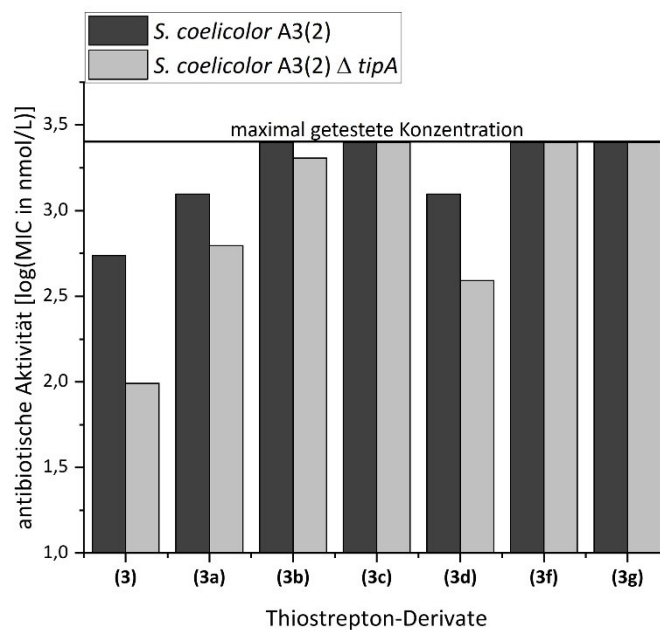
**Abbildung 2.16** Wachstumsverhalten von *S. coelicolor* A3(2) (A) und der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  tipA Mutante (B) mit steigender Konzentration von Nosiheptid (4) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden.



Zur Konkretisierung des Wachstumsverhaltens wurde der MIC-Wert der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante gegenüber Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) bestimmt.

Der MIC-Wert von Thiostrepton (3) im Deletionsstamm zeigte eine 5-fach höhere antibiotische Aktivität im Vergleich zum Wildtypstamm auf (Abbildung 2.17 (3)). Thiostrepton-Derivate mit stufenweisem Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette zeigten eine doppelt so effektive Wirkung gegenüber der Mutante auf (Abbildung 2.17 (3a-b)). Modifikationen am ersten (A) makrozyklischen Ringsystem von Thiostrepton (3) erhöhten die antibiotische Wirkung gegenüber der Mutante um ein 3-faches (Abbildung 2.17 (3d)). Derivate, die ihre antibiotische Aktivität im Zuge der Modifikation verloren hatten, wiesen keine Veränderung auf (Abbildung 2.17 (3c, 3f-g)).

Die MIC-Werte spiegelten das Wachstumsverhalten der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm wider. Die Mutante zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber Thiostrepton (3) und einzelnen Derivaten mit antibiotischer Wirkung.

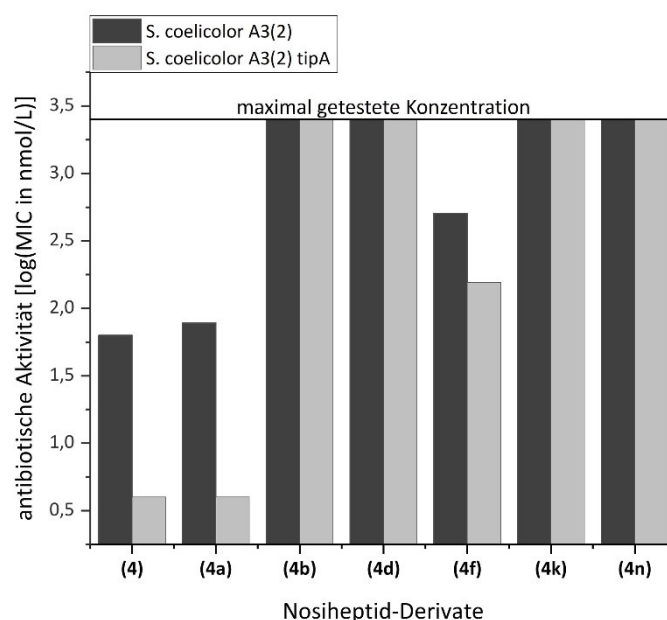


**Abbildung 2.17** Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber dem *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm und der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

Im Fall von Nosiheptid (4) zeigte der MIC-Wert eine 16-fach höhere antibiotische Aktivität gegenüber der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm auf (Abbildung 2.18 (4)). Der Abbau der Dehydroalanin-Seitenkette

veränderte das Profil nicht (**Abbildung 2.18 (4a)**). Modifikationen am großen makrozyklischen Ringsystem (A) zeigten eine 3-fach höhere antibiotische Wirkung gegenüber dem Knockout-Stamm im Vergleich zum Wildtyp (**Abbildung 2.18 (4f)**). Antibiotisch inaktive Derivate wiesen keine Änderungen in ihrem Aktivitätsprofil auf (**Abbildung 2.18 (4b, 4d, 4k, 4n)**).

Die charakterisierten MIC-Werte stehen im engen Zusammenhang mit dem beobachteten Wachstumsverhalten der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mit Nosiheptid (4). Die Mutante schien um ein Mehrfaches sensitiver gegen den Naturstoff und seinen Derivaten zu sein als der Wildtyp.



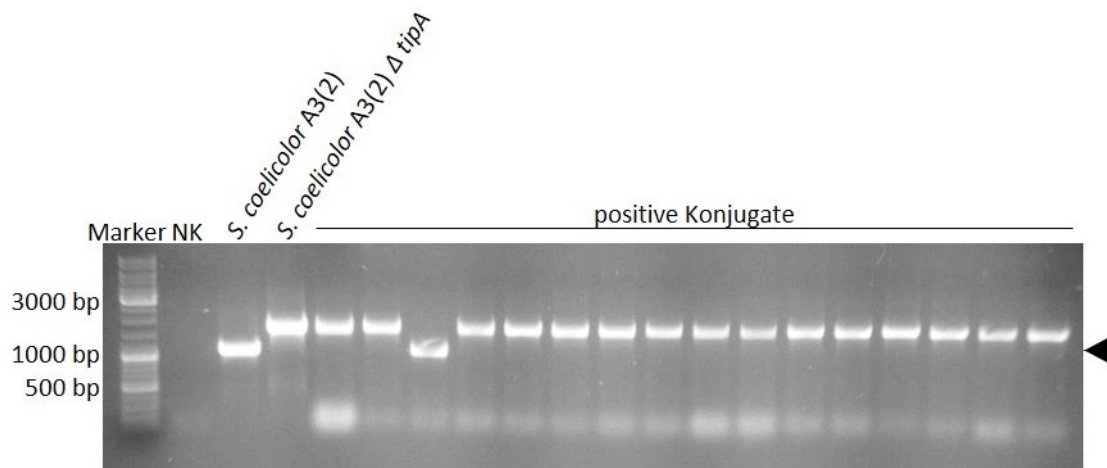
**Abbildung 2.18** Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber dem *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm und der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante. Die antibiotische Wirkung wurden durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

### 2.3.2 Die Komplementierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta$ *tipA* Mutante

Mit Hilfe einer komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante sollte überprüft werden, ob der beobachtete Phänotyp der Mutante seinen Ursprung ausschließlich im Fehlen des *tipA* Gens hat. Zur Überprüfung wurde das native *tipA* Gen wieder in den ursprünglichen Genlokus integriert und charakterisiert.

### A) Klonierungsstrategie zur Generierung der komplementierten *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta$ *tipA* Mutante

Für die Komplementierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante wurde das *Streptomyces* Cosmid p*tipA*cosmid in den nicht-DNA-methylierten *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 transformiert und für die intergenerische Konjugation mit der Mutante verwendet (Kapitel 5.9, **Schema 2.1** (1, 4)). Mittels homologer Rekombination wurde das native *tipA* Gen mit der Apramycinresistenzkassette ausgetauscht und somit die komplementierte Mutante hergestellt (**Schema 2.1** (5, 6)) Positive Exkonjugante wurden unter Verwendung des Primerpaares *tipA*cosmid-F und *tipA*cosmid-R in einer Kolonie-PCR auf Vorhandensein des *tipA* Gens untersucht (**Abbildung 2.19**).

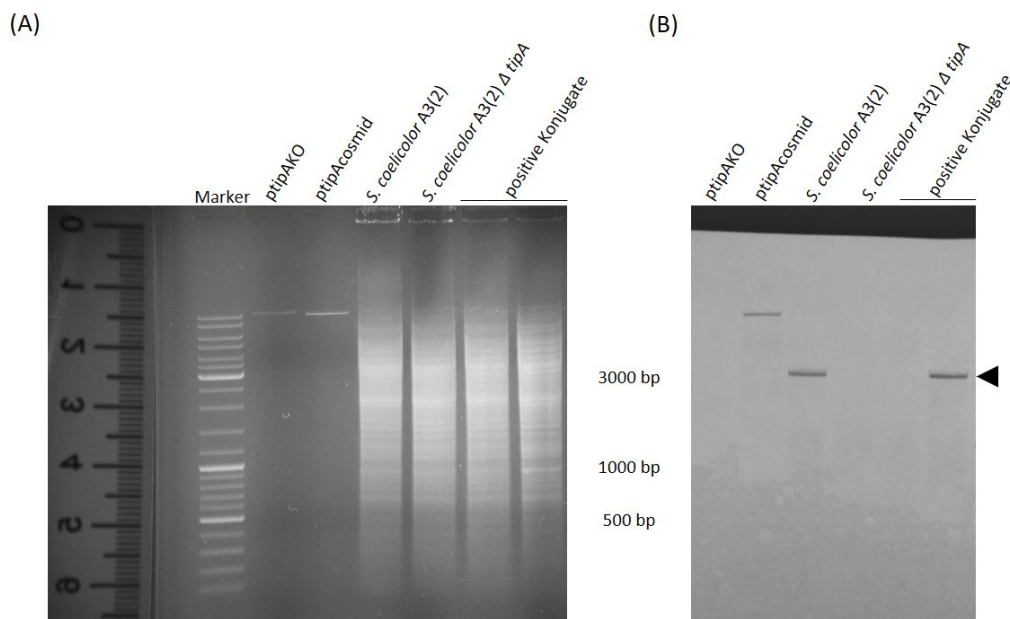


**Abbildung 2.19** Identifizierung von komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  Mutanten mit den Primern *tipA*cosmid-F und *tipA*cosmid-R. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA-Templat (NK). Als Positivkontrolle wurde genomische DNA von *S. coelicolor* A3(2) und *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* verwendet. Eine komplementierte Mutante zeigte ein PCR-Produkt von ca. 1103 bp auf (schwarzer Pfeil). Die Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette erzeugte eine Bande von ca. 1716 bp. Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

Das Fehlen eines spezifischen Selektionsdrucks erschwerte die erfolgreiche Identifizierung einer komplementierten Mutante. Es mussten bis zu 40 Exkonjugante getestet werden um zwei positive Kandidaten nachzuweisen.

### B) Validierung der komplementierten *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta tipA$ Mutante

Zum Nachweis des erfolgreich reintegrierten nativen *tipA* Gens wurde die genomische DNA beider positiver Exkonjugante hydrolytisch mit der Restriktionsendonuklease *ApaI* geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 2.20** (A)). Die Genotypisierung erfolgte mittels Southern Blot (Kapitel 5.9) unter der Verwendung der Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde *tipA*-Sonde-F/*tipA*-Sonde-R.



**Abbildung 2.20** Genotypisierung der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante mittels Southern Blot. (A) Hydrolytische Spaltung der genomischen DNA mit *ApaI* und gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 1 %igen Agarosegel. (B) Signaldetektion des nativen *tipA* Gens mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde *tipA*-Sonde-F/*tipA*-Sonde-R auf einer positiv geladenen Nylonmembran. Plasmid-DNA von *ptipAKO* diente als Negativkontrolle und *ptipAcosmid* als Positivkontrolle. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

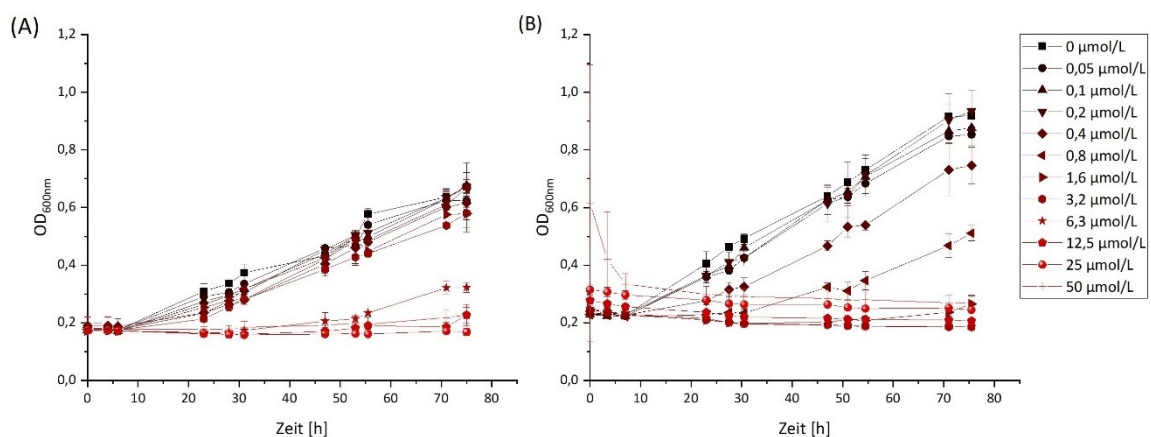
Nach der Signaldetektion konnte nur bei einem der beiden positiven Exkonjugante eine klare Bande für das *tipA* Gen nachgewiesen werden. In der zugrunde liegenden Mutante konnte kein Signal identifiziert werden (**Abbildung 2.20** (B)).

Von 40 getesteten und zwei positiven Exkonjuganten, konnte nur einer davon die erfolgreiche Integration des nativen *tipA* Gens aufweisen und somit als komplementierte *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante gelten.

### C) Charakterisierung der komplementierten *Streptomyces coelicolor* A3(2) $\Delta$ *tipA* Mutante

Für die Charakterisierung der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante wurde wiederholt das Wachstumsverhalten mit steigender Konzentration von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) als auch die antibiotische Aktivität der Thiopeptide und deren Derivate gegenüber der Mutante untersucht (Kapitel 5.11.3, Kapitel 5.11.4).

Das Wachstumsverhalten der komplementierten Mutante mit Thiostrepton (3) zeigte einen veränderten Phänotyp im Vergleich zur *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante auf. Ein anfängliches reduziertes Wachstum wurde erst ab einer Konzentration von 6.3  $\mu\text{mol/L}$  beobachtet, während bei der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante ein reduziertes Wachstum bereits ab einer Konzentration von 0.2  $\mu\text{mol/L}$  eintrat (Abbildung 2.15 (B), Abbildung 2.21 (A)). Im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp zeigte der komplementierte Stamm eine 8-fach höhere Toleranzgrenze gegenüber Thiostrepton (3) auf (Abbildung 2.15 (A)).



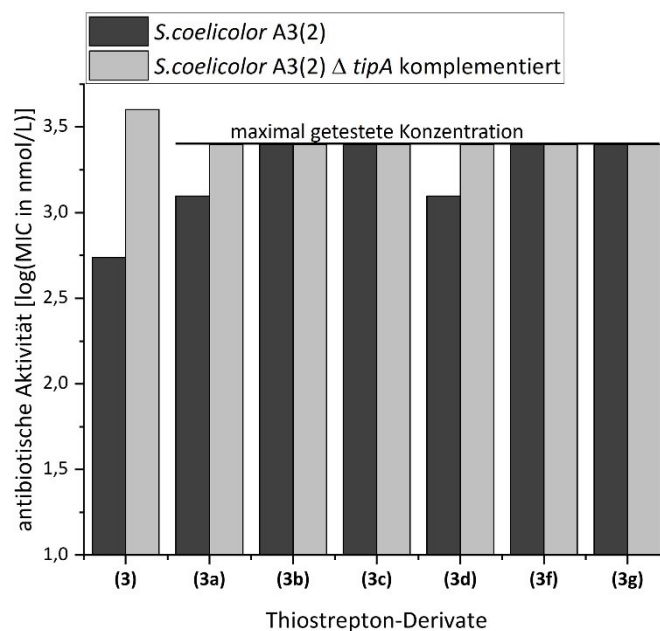
**Abbildung 2.21** Wachstumsverhalten der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mit steigender Konzentration von Thiostrepton (A) und Nosiheptid (B) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden.

Bei Kultivierungsansätzen mit Nosiheptid (4) konnte erst ab einer Konzentration von 1.6  $\mu\text{mol/L}$  keine bakterielle Zellteilung über 72 Stunden beobachtet werden (Abbildung 2.21 (B)). Demzufolge wies der komplementierte Stamm eine deutlich erhöhte Toleranz gegenüber Nosiheptid (4) auf als der Knockout-Stamm, sowie eine 2-fach höhere Resilienz im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp (Abbildung 2.16).

Sowohl die Knockout-Mutante als auch die komplementierte Mutante unterschieden sich nicht in ihrer Teilungsrate und den Übergang in die exponentielle Wachstumsphase. Nach ca. 24 Stunden gingen die Bakterien in die log-Phase über, wobei nach 72 Stunden keine stationäre Wachstumsphase erreicht wurde.

Die Bestimmung des MIC-Wertes von Thiostrepton (**3**), Nosiheptid (**4**) und deren Derivate gegenüber der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante bestätigte und konkretisierte den beobachteten Phänotyp im Wachstumsverhalten.

Der MIC-Wert von Thiostrepton (**3**) war im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm ein 6-faches höher und überstieg die maximal getestete Konzentration von 2.5  $\mu\text{mol/L}$  (**Abbildung 2.22 (3)**).

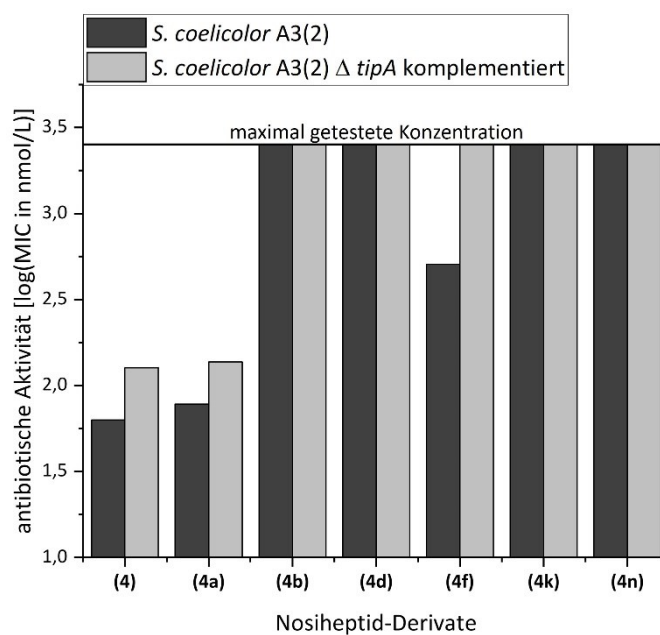


**Abbildung 2.22** Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

Alle weiteren getesteten antibiotisch aktiven Derivate wiesen ebenfalls einen MIC-Wert oberhalb der getesteten Konzentration auf (**Abbildung 2.22 (3a-b, d)**). Aufgrund begrenzter Stoffmenge konnten jedoch keine höheren Konzentrationen untersucht werden. Derivate, die ihre antibiotische Aktivität im Zuge der Modifikation verloren hatten, wiesen keine Veränderungen auf (**Abbildung 2.22 (3c, f-g)**). Bei Nosiheptid (**4**) stieg der MIC-Wert um das doppelte im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp. (**Abbildung 2.23 (4)**). Eine

gesteigerte Toleranz der komplementierten Mutante wurde auch gegenüber weiteren antibiotisch aktiven Nosiheptid-Derivaten festgestellt (**Abbildung 2.23 (4a,f)**). Antibiotisch inaktive Moleküle wiesen keine Änderungen in ihrem Aktivitätsprofil auf (**Abbildung 2.23 (4b, d, k, n)**).

Die komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante wies eine erhöhte Toleranz gegenüber den Naturstoffen und deren Derivaten auf. Obwohl der Southern Blot die einmalige Integration des ursprünglichen *tipA* Gens anzeigte, konnte nicht der Phänotyp des *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstammes beobachtet werden.



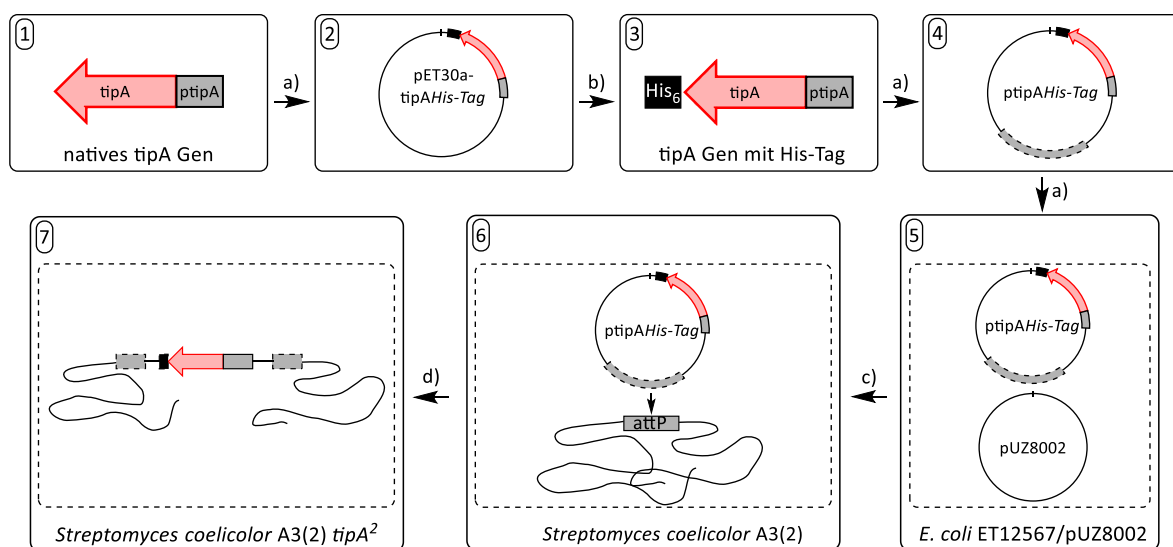
**Abbildung 2.23** Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der komplementierten *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

### 2.3.3 Generierung einer *Streptomyces coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante

Da der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Stamm eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Thiopeptiden zeigte, sollte auch ein *S. coelicolor* A3(2) Stamm untersucht werden, der ein zusätzliches *tipA* Gen im Genom integriert hat. Für einen immunochemischen Nachweis wurde das zweite *tipA* Gen mit einem Polyhistidin-Tag am C-Terminus versehen.

### A) Klonierungsstrategie zur Generierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante

Anfänglich wurde sowohl der *tipA* Promotor als auch die kodierende Sequenz des *tipA* Gens aus der genomischen DNA des *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstammes mit dem Primerpaar tipAL-F/ tipAL-R amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und HindIII hydrolytisch gespalten (**Schema 2.2** (1), Kapitel 5.9). Für die Insertion des Amplicons in den Klonierungsvektor pET30a(+), wurde dieser ebenfalls mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten.

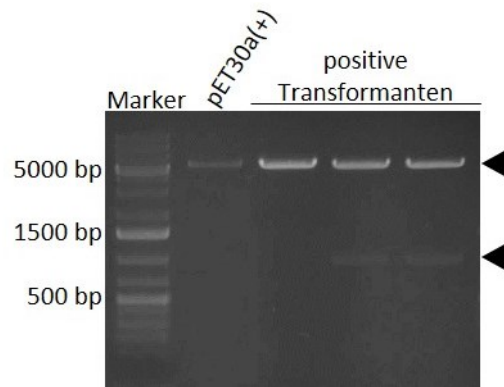


**Schema 2.2** Generierung einer *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante. a) Transformation, b) Amplifikation, c) Konjugation, d) Integration; Bakteriophagen Integrase  $\Phi C31$  (grau gestrichelt)

Das entstandene Plasmid enthielt das *tipA* Gen mit Polyhistidin-Tag am C-Terminus und dem vorgestellte *tipA* Promotor (**Schema 2.2** (2)). Zwischen Gen und Tag wurde eine 21 Nukleotid lange Linkersequenz eingefügt. Mittels Restriktionsanalyse mit dem Enzym XhoI wurden positive Transformanten identifiziert (**Abbildung 2.24**). Es wurden drei positive Transformanten auf Selektionsmedium nachgewiesen, von denen zwei das gewünschte Plasmid enthielten.

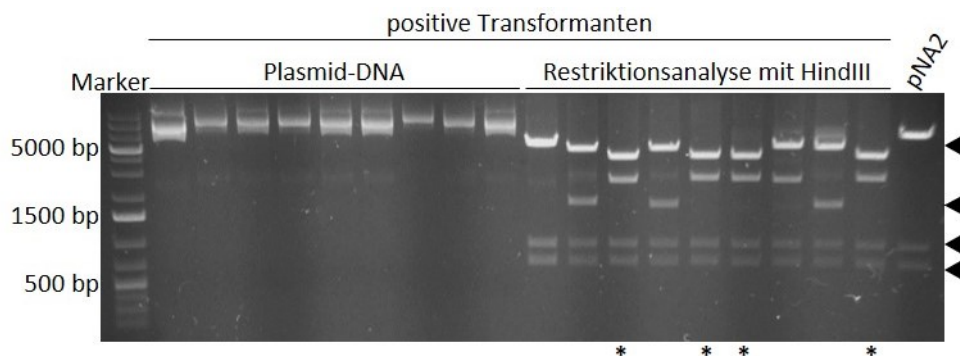
Darauffolgend wurde das Polyhistidin-markierte *tipA* Konstrukt mit dem Primern tipAHisTag-F/ tipAHisTag-R aus dem Plasmid amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym ApaI gespalten (**Schema 2.2** (3)).





**Abbildung 2.24** Restriktionsanalyse mit XhoI von positiven Transformanten mit integrierten pTipAL in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid-DNA vom Klonierungsvektor pET30a(+) diente als Vergleichsprobe. Positive Transformanten erzeugten ein Bandenmuster bei ca. 5300 bp und 916 bp (schwarzer Pfeil). Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“, (Thermo Scientific).

Das Amplicon wurde in das Trägerplasmid pNA2 integriert, welches ebenfalls mit ApaI hydrolytisch gespalten wurde. Das entstandene Plasmid ptipAHisTag (**Schema 2.2** (4)) wurde in den nicht-DNA-methylierenden *E. coli* Stamm ET12567/pUZ8002 transformiert (**Schema 2.2** (5)) und mittels Restriktionsanalyse mit der Endonuklease HindIII analysiert (**Abbildung 2.25**).

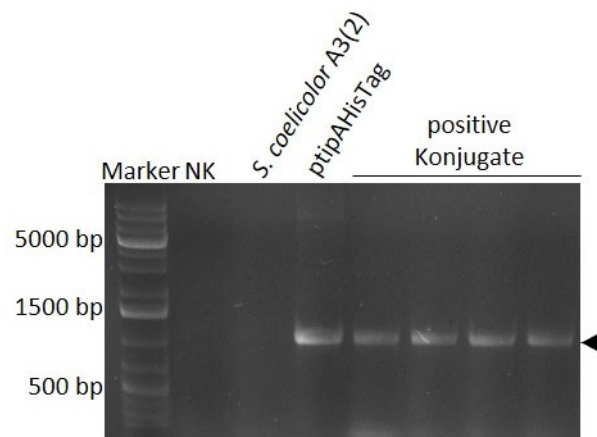


**Abbildung 2.25** Restriktionsanalyse mit HindIII von positiven Transformanten mit integriertem ptipAHisTag in *E. coli* ET12567/pUZ8002. Plasmid-DNA von pNA2 diente als Vergleichsprobe. Positive Transformanten erzeugten ein Bandenmuster bei ca. 723 bp, 969 bp, 1775 bp und 5214 bp bei einer Integration in 5`-3`-Richtung (schwarzer Pfeil). Die Inserierung des Inserts in 3`-5`-Richtung erzeugte die Banden 723 bp, 969 bp, 2664 bp, 4325 bp (schwarzer Stern). Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

Von den neun getesteten Transformanten enthielten drei davon das Polyhistidin-markierte *tipA* Konstrukt in 5`-3`-Richtung und vier das Insert in 3`-5`-Richtung. Nach der

Sequenzierung mit dem Primern tipAHisTag-F/R wurde jedoch nur eine Transformante ohne Mutationen in der kodierenden Sequenz des *tipA* Gens identifiziert. Dieser enthielt das Konstrukt in 5`-3`-Richtung.

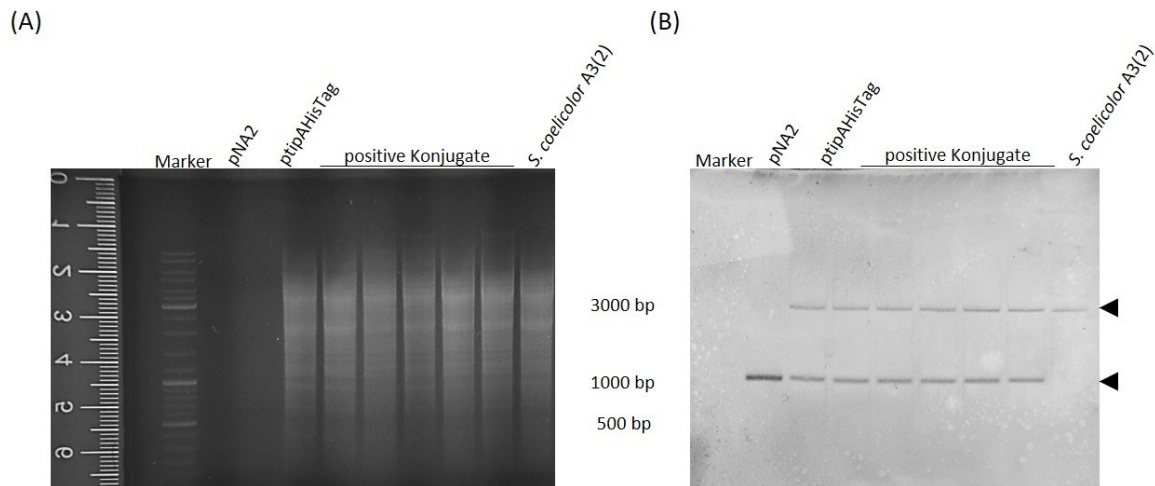
Anschließend wurde das Plasmid ptipAHisTag mittels Konjugation in den Wildtypstamm *S. coelicolor* A3(2) integriert (**Schema 2.2 (6)**).<sup>[153]</sup> Die im Plasmid kodierte Bakteriophagen-Integrase  $\Phi$ C31 vermittelte die unidirektionale, ortsspezifische Rekombination zwischen der enthaltenden Phagen-Erkennungssequenz *attP* und der Erkennungssequenz *attB* im bakteriellen Genom. Das Plasmid wurde dabei linearisiert und als Ganzes an der *attB* Sequenz integriert (**Schema 2.2 (7)**). Mittels Kolonie-PCR und dem Primerpaar tipAHisTag-F/R wurde das Polyhistidin-markierte *tipA* Konstrukt in allen getesteten Exkonjuganten identifiziert (**Abbildung 2.26**).



**Abbildung 2.26** Identifizierung von *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutanten mit den Primern tipAHisTag-F/R. Als Negativkontrolle diente ein PCR-Ansatz ohne DNA-Templat (NK) und mit genomischer DNA von *S. coelicolor* A3(2). Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA von ptipAHisTag verwendet. Eine positive Mutante zeigte ein PCR-Produkt von ca. 1047 bp auf (schwarzer Pfeil). Die Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

### B) Validierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante

Die Integration des ptipAHisTag Plasmids in den *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm wurde mittels Southern Blot gezeigt (Kapitel 5.9). Dafür wurde die genomische DNA der vier positiven Stämme hydrolytisch mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und KpnI geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 2.27 (A)**). Zum Nachweis des *tipA* Gens wurde die Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonde tipA-Sonde-F/tipA-Sonde-R verwendet.



**Abbildung 2.27** Genotypisierung der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mittels Southern Blot. (A) Hydrolytische Spaltung der genomischen DNA mit BamHI und KpnI und gelelektrophoretische Auftrennung auf einem 1 %igen Agarosegel. (B) Signaldetektion der beiden *tipA* Gene mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde tipAHisTag-Sonde-F auf einer positiv geladenen Nylonmembran. Plasmid-DNA von pNA2 diente als Negativkontrolle und ptipAHisTag als Positivkontrolle. Als Marker diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

Das *tipA* Gen wurde, nach erfolgreicher Signaldetektion mit dem Anti-DIG Antikörper, in allen Exkonjuganten in doppelter Ausführung identifiziert. Im Vergleich mit dem zugrundeliegendem Wildtypstamm und dem Plasmid ptipAHisTag wurde ein Signal dem ursprünglichen *tipA* Gen zugeordnet und das andere dem Polyhistidin-markierten *tipA* Konstrukt (**Abbildung 2.27** (B)).

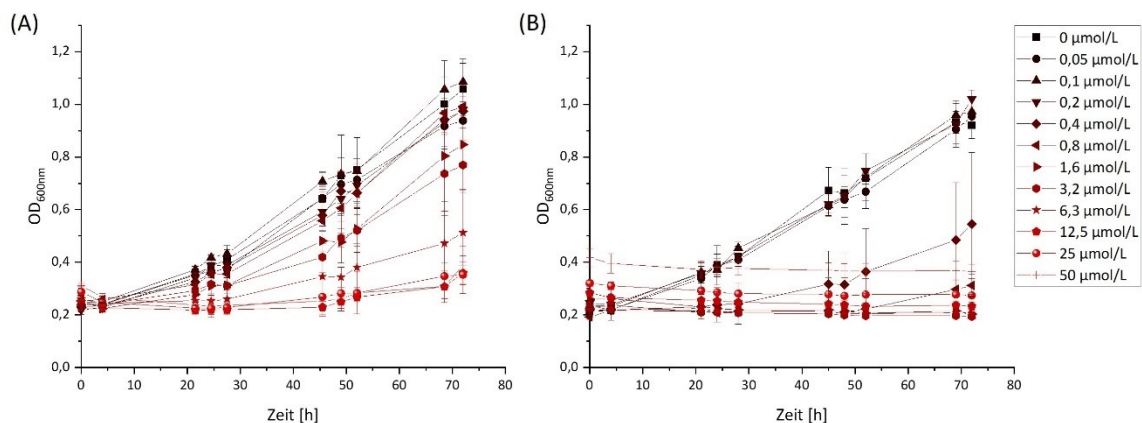
Es konnte erfolgreich eine *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante generiert werden, die das *tipA* Gen zwei Mal trägt, wobei eines davon mit einem Polyhistidin-Tag am C-Terminus versehen war.

### C) Charakterisierung der *Streptomyces coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante

Die Charakterisierung der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante erfolgte durch die Untersuchung des Wachstumsverhaltens mit steigender Konzentration von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4), sowie die Analyse der antibiotischen Aktivität der Thiopeptide und deren Derivate (Kapitel 5.11.3, Kapitel 5.11.4).

In Gegenwart von Thiostrepton (3) wies die *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante ein typisches Wachstum bis zu einer Konzentration von 0.8 µmol/L auf und ein anfängliches reduziertes Wachstum ab einer Konzentration von 1.6 µmol/L. Im Gegensatz zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm wurde ein schwaches Zellwachstum bei der höchsten getesteten

Thiostreptonkonzentration von 50  $\mu\text{mol/L}$  gefunden (**Abbildung 2.28 (A)**). Das Einbringen der zweiten kodierten *tipA* Sequenz führte zu einem veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildtypstamm. Es wurde eine leicht höhere Toleranz gegenüber Thiostrepton (**3**) identifiziert. Dennoch wies die Mutante keine Verschiebung der vier Wachstumsphasen auf. Nach ca. 24 Stunden wurde die exponentielle Phase erreicht, wobei nach 72 Stunden keine stationäre Wachstumsphase erreicht wurde.

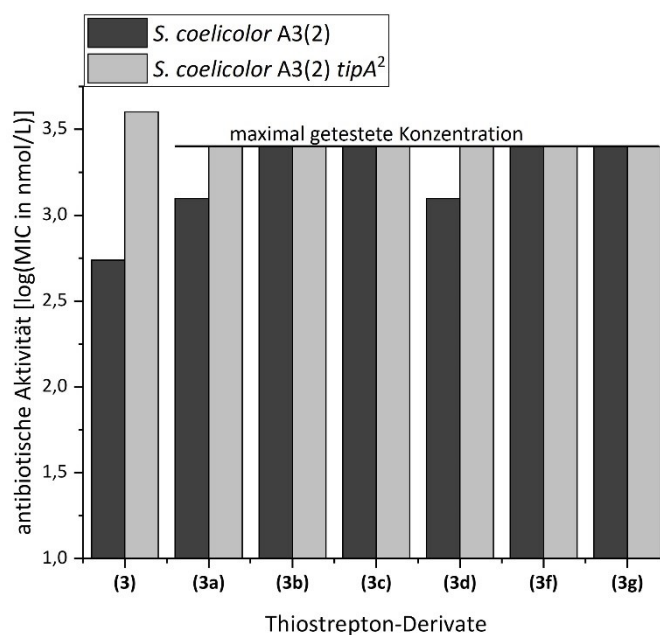


**Abbildung 2.28** Wachstumsverhalten der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mit steigender Konzentration von Thiostrepton (A) und Nosiheptid (B) über eine Inkubationszeit von 72 Stunden.

Mit Nosiheptid (**4**) wies die *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante ein signifikantes Wachstum bis zu einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{mol/L}$  auf und ein reduziertes Wachstum ab einer Konzentration von 0,4  $\mu\text{mol/L}$ . Erst ab einer Konzentration von 1,6  $\mu\text{mol/L}$  Nosiheptid (**4**) wurde keine bakterielle Zellteilung über 72 Stunden beobachtet (**Abbildung 2.28 (B)**). Demzufolge wies die Mutante eine 2-fach höhere Toleranz gegenüber Nosiheptid (**4**) auf im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm (**Abbildung 2.16 (A)**). Der Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erfolgte nach ca. 24 Stunden, wobei nach 72 Stunden keine stationäre Wachstumsphase erreicht wurde.

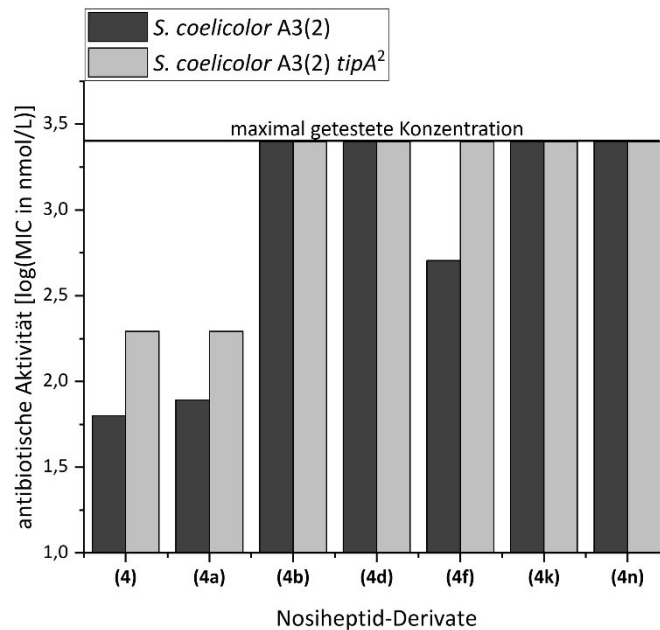
Die Bestimmung des MIC-Wertes von Thiostrepton (**3**) gegenüber der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante veranschaulichte den beobachteten Phänotypen im Wachstumsverhalten. Der MIC-Wert war im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm ein 7-faches höher und überstieg die maximal getestete Konzentration von 2,5  $\mu\text{mol/L}$  um das Anderthalbfache (**Abbildung 2.29 (3)**). Die gleiche steigende Toleranz zeigte die Mutante bei weiteren Thiostrepton-Derivaten. Unabhängig von ihrer Modifikation wiesen alle getesteten Moleküle

einen MIC-Wert oberhalb der getesteten Konzentration auf (**Abbildung 2.29 (3a, 3d)**). Aufgrund begrenzter Stoffmengen konnten keine höheren Konzentrationen untersucht werden. Derivate, ohne antibiotischer Aktivität wiesen keine Veränderungen in ihrem biologischen Profil auf (**Abbildung 2.29 (3b-c, 3f-g)**).



**Abbildung 2.29** Charakterisierung der Thiostrepton-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

Der MIC-Wert mit Nosiheptid (**4**) stieg um das 3-fache im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm und zeigte daher eine höhere Toleranz der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante gegenüber dem Thiopeptid auf (**Abbildung 2.30 (4)**). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei dem Nosiheptid-Derivat mit abgebauter Dehydroalanin-Seitenkette festgestellt (**Abbildung 2.30 (4a)**). Moleküle mit einer Addition am ersten (A) makrozyklischen Ringsystem zeigten einen 5-fache höheren MIC-Wert auf (**Abbildung 2.30 (4f)**). Antibiotisch inaktive Moleküle wiesen keine Änderungen in ihrem Aktivitätsprofil auf (**Abbildung 2.30 (4b, d, k, n)**).



**Abbildung 2.30** Charakterisierung der Nosiheptid-Derivate auf ihre antibiotische Wirkung gegenüber der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante. Die antibiotische Wirkung wurde durch die Bestimmung des MIC-Wertes bestimmt.

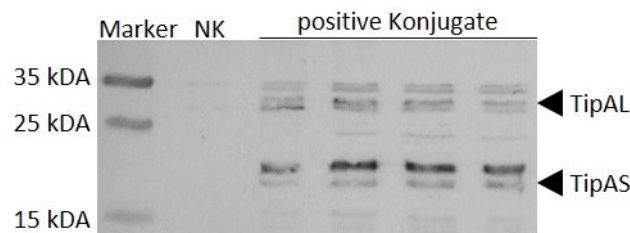
Die gefundenen MIC-Werte korrespondierten mit dem beobachteten Wachstumsverhalten der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mit Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4). Die Mutante mit doppelter Anzahl der kodierenden *tipA* Sequenz wies eine erhöhte Toleranz gegenüber den Naturstoffen und deren Derivaten auf als der Wildtypstamm, ohne jedoch volle Resistenz zu zeigen.

### 2.3.4 Untersuchung des Expressionsverhaltens der TipA Proteine

Beide TIP sind Expressionsprodukte eines offen Leserahmens des *tipA* Gens. Zur Klärung, ob beide TIP unter der Kontrolle des *tipA*-Promotors stehen und vermutlich durch zwei unabhängig ribosomale Bindestellen exprimiert werden, sollte das Expressionsverhalten von TipAL und TipAS untersucht werden. Dafür wurde die *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen im TSB-Vollmedium angeimpft und deren bakterielles Zelllysate extrahiert (Kapitel 5.9, Kapitel 5.10). Mittels Westernblot wurden die integrierten Polyhistidin-markierten Proteine am C-Terminus mit einem  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalen Maus IgG Antikörper nachgewiesen.

### A) Etablierung des Immunoblots zur Detektion der Polyhistidin-markierten TipA Proteine

Vier, durch Southern Blot validierte, *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup>-Stämme wurden auf ihre Polyhistidin-markierte *tipA* Expression untersucht, um etwaige Unterschiede zwischen den Stämmen festzustellen und mit der Mutante mit der vielversprechendsten Expression weiterzuarbeiten. Dafür wurden die Stämme mit 10 µmol/L Thiostrepton (**3**) inkubiert und für den Immunoblot aufbereitet. Es wurde die Expression sowohl von TipAL (ca. 28 kDa) als auch TipAS (ca. 16 kDa) nachgewiesen (**Abbildung 2.31**).

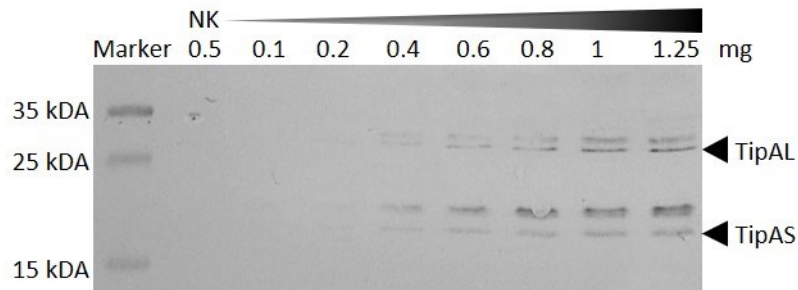


**Abbildung 2.31** Expressionsnachweis der TipA Proteine der vier validierten *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutanten mittels Westernblot unter Verwendung eines  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein Stamm ohne Thiostreptoninduktion (NK). Die Stämme wurden mit 10 µmol/L Thiostrepton (**3**) inkubiert. Es wurde jeweils 500 µg Zelllysate aufgetragen. Als Marker diente der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

Neben ihrer freien Form lagen beide Proteine auch in ihrer kovalent-gebundenen Form mit Thiostrepton (**3**) vor, gekennzeichnet durch eine leichte Bandenverschiebung um ca. 2 kDa. Alle vier getesteten *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutanten wiesen ein ähnliches Expressionsmuster auf. Daher wurde der Stamm mit der höchsten Wachstumsdichte für anschließende Arbeiten weiterverwendet.

Im Folgenden wurde das Detektionslimit des Antikörpers charakterisiert. Dafür wurde die Mutante wiederholt mit 10 µmol/L Thiostrepton (**3**) inkubiert und mit steigender Zelllysatkonzentration elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Signaldetektion wurde sowohl TipAL als auch TipAS nachgewiesen, sowie der jeweilige kovalent-gebundene TIP-Thiopeptid-Komplex. Bis zu einer Konzentration von 200 µg Lysat induzierter Zellen wurden keine signifikanten Signale der TipA Proteine identifiziert. Demzufolge lag das Detektionslimit des Antikörpers bei 400 µg induzierten Zelllysate und entsprach einer relativ schwachen Expressionsrate der TIP mit Thiopeptid-Ligand. Die Bandenintensitäten stiegen

bis zu einer Konzentration von 1 mg und stagnierten danach (**Abbildung 2.32**). Daher wurde 1 mg Zellysate als optimale Ladung für weitere Experimente bestimmt.



**Abbildung 2.32** Expressionsnachweis der TipA Proteine der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mittels Westernblot unter Verwendung eines  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. Als Negativkontrolle diente der Stamm ohne Thiostreptoninduktion (NK). Der Stamm wurde mit 10  $\mu$ mol/L Thiostrepton (**3**) inkubiert. Es wurde 100  $\mu$ g bis 1.25 mg Zellysate aufgetragen. Als Marker diente der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

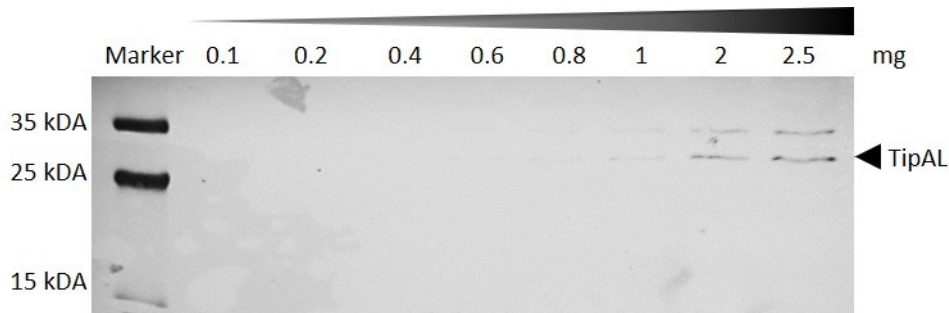
### B) Expression der TipA Proteine ohne Thiopeptid-Ligand

Mit der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante sollte anfänglich die Expression beider TipA Proteine ohne Anwesenheit eines Thiopeptids als potenzieller Ligand untersucht werden. Jedoch wurden keine Banden bei 1 mg Zellysate beobachtet. Daher wurde die Konzentration bis zu 2.5 mg Zellysate erhöht.

Es wurde die Expression von freien TipAL auf einem sehr niedrigen Niveau nachgewiesen. Erst ab einer Beladung von 2 mg Zellysate wurde ein signifikantes Signal vom Protein detektiert und eine unbekannte Bande auf der Höhe von ca. 32 kDa. Eine Expression von TipAS konnte selbst bei der höchsten Konzentration von 2.5 mg nicht beobachtet werden (**Abbildung 2.33**).

Dementsprechend konnte einzig für den Transkriptionsfaktor TipAL eine basale Expression ohne Thiopeptid-Ligand nachgewiesen werden. Eine Expression von TipAS wurde ohne Ligand nicht aufgezeigt.





**Abbildung 2.33** Expressionsnachweis der TipA Proteine der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mittels Westernblot unter Verwendung eines  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. Es wurde 100  $\mu$ g bis 2.5 mg Zellysate aufgetragen. Als Marker diente der „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

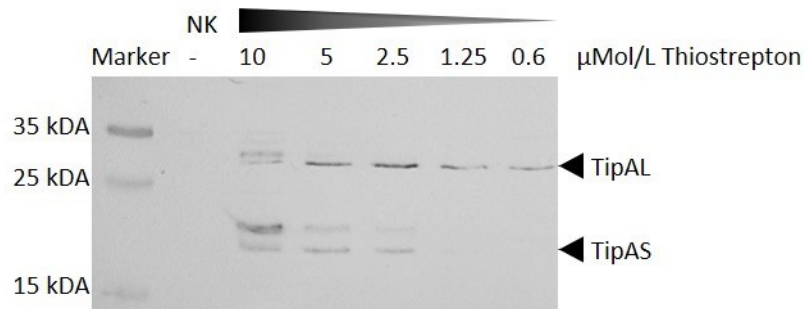
### C) Expression der TipA Proteine mit Thiopeptid-Ligand

Im Folgenden wurde die Expression der TipA Proteine mit steigender Thiostrepton-Konzentration von 0.6  $\mu$ mol/L bis zu 10  $\mu$ mol/L untersucht. Von den einzelnen Kultivierungsansätzen wurden jeweils 1 mg Zellysate geelektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der Signaldetektion mit dem  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper wurde in jeder Probe eine signifikante Bande für die freie Form des Transkriptionsfaktors TipAL nachgewiesen. Das Expressionsniveau von TipAL blieb dabei jeweils gleich. Erst ab einer sehr hohen Thiostreptonkonzentration von 10  $\mu$ mol/L wurde die leichte Bandenverschiebung um ca. 2 kDa für die gebundene Liganden-Form detektiert (**Abbildung 2.34**).

Im Gegensatz zu TipAL wurde ab einer Thiostreptonkonzentration von 2.5  $\mu$ mol/L ein signifikantes Signal sowohl für das freie Protein als auch für den TIP-Thiopeptid-Komplex von TipAS beobachtet. Die freie Form blieb mit steigender Ligandenkonzentration auf einem ähnlichen Expressionslevel, wobei für den Komplex eine Steigerung der Bandenintensität auftrat.

Die gleichbleibende Expression von TipAL und die vermehrte Thiostrepton-abhängige Expression von TipAS lassen auf eine unabhängige Transkription beider TIP unter der Regulation des *tipA* Promotors vermuten. Die Korrelation zwischen erhöhter Ligandenkonzentration und TipAS scheint für eine gezielte Expression, ab einer bestimmten Konzentration von Thiopeptid-Antibiotikum zu sprechen.



**Abbildung 2.34** Expressionsnachweis der TipA Proteine der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutant mittels Westernblot unter Verwendung eines  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonalem Maus IgG Antikörper. Als Negativkontrolle diente der Stamm ohne Thiostreptoninduktion (NK). Der Stamm wurde mit 10  $\mu$ mol/L-0.6  $\mu$ mol/L Thiostrepton (3) inkubiert. Es wurde eine Konzentration von 1 mg Zellysate aufgetragen. Als Marker diente der „Page Ruler Prestained Protein“ (Thermo Scientific).

## 3 Diskussion und Ausblick

### 3.1 Vorkommen und biologische Relevanz von Thiostrepton-induzierten Proteinen

Die Funktion der Thiostrepton-induzierte Proteine (TIP) und ihrer Verwandten ist bislang weitgehend unbekannt. Nur wenige funktionell exprimierte TIP sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt ausserhalb der Gattung *Streptomyces* in der Literatur beschrieben. Die Beispiele gehören zu den Gattungen *Rhodococcus*, *Amycolatopsis* und *Nocardia*.<sup>[154],[155]</sup> Um die biologische Relevanz der TIP sowohl innerhalb als auch außerhalb der Gattung *Streptomyces* abzuschätzen, wurde ihr Vorkommen auf bioinformatischer Ebene untersucht. Mit Hilfe einer umfangreichen BLAST-Suche mit der kodierenden Sequenz des *tipA* Gens wurden in dieser Arbeit 95 Bakterienarten mit einer *tipA*-ähnlichen Sequenz identifiziert. Darunter befanden sich mehrere Spezies, die antibiotisch aktive Verbindungen als sekundäre Metabolite produzieren, sowie symbiotisch wirkende biotische Stickstofffixierer.<sup>[156],[157],[158],[159],[160]</sup> Die unterschiedlichen Spezies konnten wiederum zu 23 Gattungen der Actinobacteria zugeordnet werden. Besonders auffallend war der große Anteil an *Streptomyces* spp. und *Micromonospora* spp. Mit einem Anteil von 45 % wurden die meisten *tipA*-ähnlichen Sequenzen in der Gattung der *Streptomyces* nachgewiesen, während die Gattung der *Micromonospora* einen Anteil von 20 % aufwies.

Seit 2012 steht die „*Protein families database*“ (Pfam) zur Verfügung, als eine umfassende Sammlung von Protein-Domänen und -Familien.<sup>[161]</sup> In der Datenbank werden alle Aminosäuresequenzen gemäß ihrer Homologie in die dazugehörigen Protein-Familien eingeordnet. Zum Zeitpunkt 06/2021 werden in der Datenbank 6578 Spezies und 39274 Sequenzen zu der Familie der MerR-Proteinfamilie gezählt (PF13411). Davon zählen 2595 Sequenzen zu der TipA-Unterfamilie. Im Vergleich mit den eingetragenen TipA-Sequenzen von Pfam wird mit den hier verwendeten BLAST-Kriterien nur ein geringer Teil der bereits beschriebenen Vertreter identifiziert. MerR-Transkriptionsfaktoren von *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Caulobacter crescentus* und *Klebsiella oxytoca* sind nicht in dem vorliegenden Datensatz enthalten.<sup>[123],[125],[124],[127],[126]</sup> Wahrscheinlich ist dies bedingt durch ihre relativ hohe

Sequenzhomologie mit der *N*-terminalen DNA-Bindedomäne von TipAL (24-40 %), aber geringe Homologie zum *C*-Terminus (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.).<sup>[130]</sup> Durch die Einschränkung auf eine über 65 %ige Sequenzhomologie wurden gezielt die *tipA*-ähnlichen Sequenzen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit der funktionellen Geneexpression herausgefiltert. Einzig das bereits charakterisierte *tipA*-ähnliche Gen von *Rhodococcus opacus*, mit einer Sequenzähnlichkeit von 68.9 %, befindet sich in dem so erhaltenen Datensatz (**Tabelle 7.1**).<sup>[154]</sup>

Ein Abgleich der charakterisierten Spezies mit der 2012 veröffentlichten Web-basierten Suchmaschine ThioFinder identifizierte *Streptomyces* spp., die Thiopeptid-Naturstoffe produzieren (**Tabelle 3.1**).<sup>[15]</sup> *Streptomyces hawaiiensis* (*S. hawaiiensis*) ist einer der „Emitter“-Stämme von Thiostrepton (**3**), erstmals charakterisiert als sein Synonym Bryamycin.<sup>[162]</sup> Das Bakterium *Streptomyces antibioticus* (*S. antibioticus*) stellt Nosiheptid (**4**) her, auch Multhiomycin genannt, während das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* (*S. hygroscopicus*) für die Produktion des Thiopeptids Cyclothiazomycin B1/B2 verantwortlich ist.<sup>[63],[35]</sup> Dies steht im Kontrast zu der ursprünglichen Annahme, dass es eine eindeutige Trennung von „Responder“- und „Emitter“-Stämmen in der Gattung der *Streptomyces* gibt. Weiterhin widerspricht das Vorhandensein eines *tipA*-ähnlichen Gens in einem *Streptomyces*-„Emitter“-Stamm der Hypothese des spezifischen Thiopeptid-Resistenzmechanismus der *Streptomyces* „Responder“-Stämme, besonders da alle drei „Emitter“-Stämme anscheinend kein eigenständiges kodiertes Thiostrepton-Resistenzgen (*tsr* Gen) enthalten. Eine genauere Untersuchung der funktionellen Expression des bioinformatisch identifizierten *tipA* Gens in *S. antibioticus*, *S. hawaiiensis* und *S. hygroscopicus* sollte in Zukunft angegangen werden. Dafür könnte sowohl mit quantitativer Echtzeit-PCR als auch mit einem geeigneten Immunoblot-Verfahren die transkriptionelle und translationale Expression charakterisiert werden.

**Tabelle 3.1** *Streptomyces* Spezies mit homologen *tipA* Gen und nachgewiesener Thiopeptid-Produktion.

Spezies	Inventarnummer	<i>tipA</i> -Homologie in %	produziertes Thiopeptid
<i>S. antibioticus</i>	CP050692.1	80.94	Nosiheptid (Multhiomycin) <sup>[163]</sup>
<i>S. hawaiiensis</i>	CP021978.1	81.88	Thiostrepton (Bryamycin) <sup>[162]</sup>
<i>S. hygroscopicus</i>	CP018627.1	82.72	Cyclothiazomycin B1/B2 <sup>[35]</sup>

Bei der ergänzenden BLAST-Suche mit der kodierenden Sequenz von *tipAS* wurden 89 unterschiedliche Spezies mit einem über 65 %igen homologen *tipAS*-ähnlichen Gen aufgefunden. Die 22 dazugehörigen Gattungen gehören ebenfalls vorrangig zum Stamm der Actinobacterien. Überraschenderweise fanden sich darunter 16 Vertreter nicht im Datensatz der *tipAL*-BLAST-Suche. Zwei davon gehören zum Stamm der Proteobacteria, und werden in die Familie der *Myxococcaceae* eingeordnet. Bei *Myxococcus hansupus* (*M. hansupus*) und *Pyxidicoccus fallax* (*P. fallax*) handelt es sich um gramnegative, sporulierende Bodenbakterien, die eine Fülle von sekundären Metaboliten produzieren.<sup>[164],[165],[166]</sup> Der Modelorganismus *Myxococcus xanthus* ist in der Lage komplexe Peptide der RiPP-Familie zu synthetisieren, deren benötigten Gene in einem gemeinsamen BGC angeordnet sind.<sup>[167]</sup> Das Vorhandensein eines Vorläufer-Peptids für die weiterführenden enzymatischen Modifikationen ähnelt stark der Thiopeptid-Synthese. Währenddessen produziert *P. fallax* ein sogenanntes Pentapeptid-Wiederholungsprotein, welches in einem Resistenzmechanismus gegenüber bakterieller und menschlicher Topoisomerasen involviert ist.<sup>[168]</sup> Bei beiden Spezies handelt es sich um die einzigen gramnegativen Bodenbakterien, die bislang Arbeit identifiziert wurden. Eine Charakterisierung der funktionellen Expression der identifizierten *tipAS*-ähnlichen Gene könnte beim Nachweis von TIP in gramnegativen Bakterien und gegebenenfalls in spezifischen „Responder“-Stämmen helfen.

Das hohe Aufkommen von *tipA*-ähnlichen Sequenzen in anderen Bakterien als *S. lividans* lässt auf vielfältige, möglicherweise diversifizierte Funktionen gegenüber lipophilen Antibiotika, Toxinen oder auch Stresssignalen innerhalb der verschiedenen bakteriellen Spezies schließen. Die hohe Sequenzhomologie legt eine systemische Funktion des *tipA* Gens und der kodierten TIP anstatt eines evolutionären Artefakts nahe, wobei die jeweiligen Liganden unterschiedlich sein können.

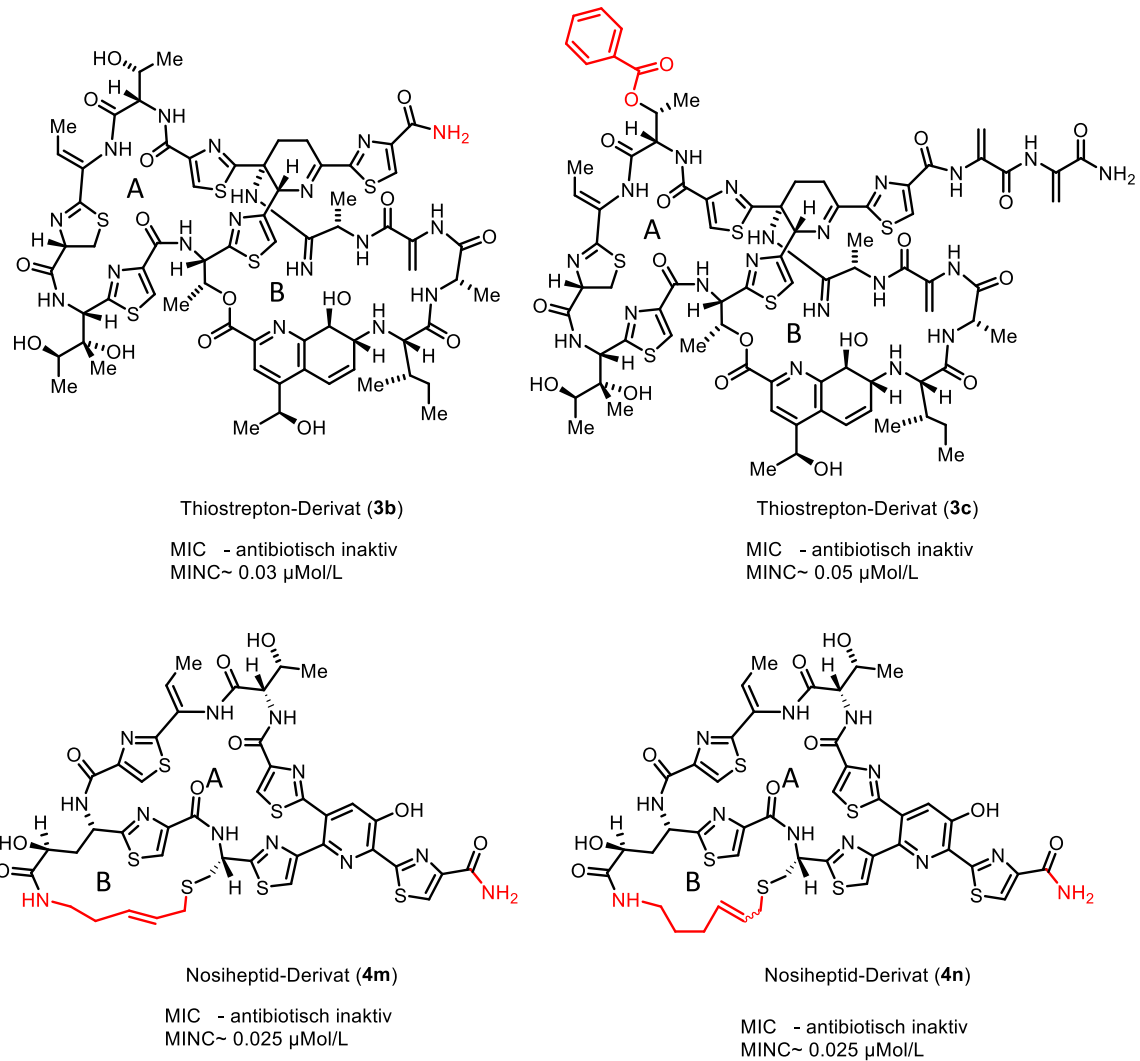
### 3.2 Strukturelle Bedingungen der Thiopeptide für ihre biologischen Funktionen

Für die Erforschung der nachgeschalteten Effekte des TIP-Thiopeptid-Komplexes nach der *tipA*-Induktion in *Streptomyces* sollte die primäre antibiotische Aktivität der Thiopeptid-Antibiotika blockiert werden und somit unabhängig vom antibiotischen Stresssignal weitere Bindepartner des Komplexes und beeinträchtigte Signalwege im Mikroorganismus zu

charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden semisynthetische Thiopeptid-Derivate von Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) auf ihre biologischen Funktionen gegenüber dem „Responder“-Stamm *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor* A3(2)) untersucht. Das Ziel war die Identifikation von Molekülen ohne antibiotische Wirkung bei gleichzeitig intakter *tipA*-Induktion, sowie von Kontroll-Molekülen mit antibiotischer Funktion und fehlender *tipA*-Induktion. Dafür wurden unterschiedliche Thiostrepton- und Nosiheptid-Analoga von M. Sc. Thomas Winkler (unpubliziert Arbeit) und Dr. Veselin Nasufovic' (Dissertation 2021) hergestellt. Die Dehydroalanin-Seitenkette und die freizugänglichen Hydroxylgruppen des ersten (A) und zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems wurden dazu strukturell modifiziert.

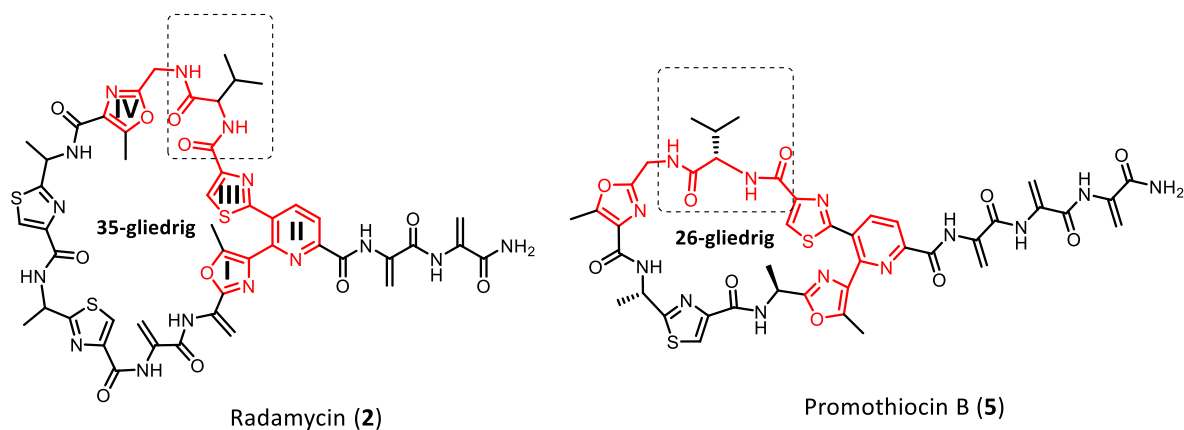
Für Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) konnten dadurch selektive Derivate mit fehlender antibiotischer Wirkung und effizienter *ptipA*-Induktion identifiziert werden (**Abbildung 3.1 (3b, 3c, 4m, 4n)**). Im Gegensatz dazu konnten innerhalb der hergestellten Verbindungen keine Moleküle mit intakter antibiotischer Funktion und fehlender Induktion identifiziert werden. Bisher wurden keine weiterführenden Experimente mit den selektiven Derivaten durchgeführt. Um jedoch die spezifischen Effekte der TIP-Thiopeptid-Komplexbildung auf nachgeschaltete Signalwege oder die Identifizierung von weiteren Thiopeptid-Bindepartnern in *S. coelicolor* A3(2) näher zu charakterisieren sollten Kultivierungsansätze mit den selektiven, nicht mehr antibiotisch aktiven Derivaten durchgeführt werden und mit darauffolgenden Analysen auf Proteom-, Metabolom, und Transkriptomebene Veränderungen identifiziert werden.

Bei der Charakterisierung der natürlich vorkommenden Thiopeptide konnte die hochpotente antibiotische Wirkung und die effektive *ptipA*-Induktion der 26-gliedrigen Thiopeptide Thiostrepton (**3**), Nosiheptid (**4**) und Micrococcin P1 (**1**) bestätigt werden.<sup>[14, 59, 114, 136, 148]</sup> Weiterhin wurde der bereits bekannte selektive Charakter des 35-gliedrigen Radamycin (**2**) bekräftigt.<sup>[112]</sup>



**Abbildung 3.1** Selektive Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate mit farblich markierten Modifikationen (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Wert.

Es konnte keine antibiotische Wirkung gegenüber *S. coelicolor* A3(2) nachgewiesen werden, jedoch eine geringe *tipA*-Induktion. Die fehlende antibiotische Aktivität resultiert vermutlich aus der veränderten Sequenz zwischen Position III und IV des konservierten Erkennungsmotivs der Thiopeptide (**Abbildung 3.2**).<sup>[21]</sup>



**Abbildung 3.2** Struktureller Aufbau vom 35-gliedrigen Radamycin (2) und dem 26-gliedrigen Promothiocin B (5) mit farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und der mutierten Sequenz zwischen Position 3 und 4 (Rechteck).

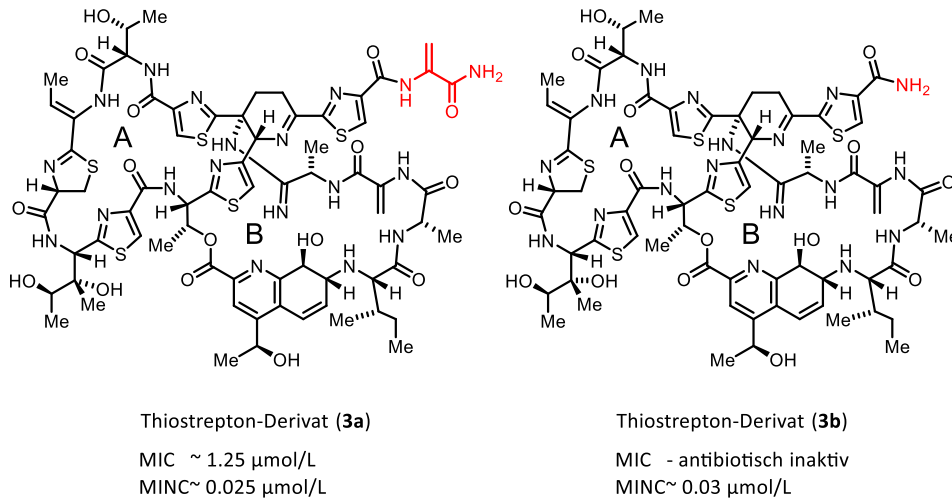
Obwohl die gleiche strukturelle Veränderung beim 26-gliedrigen Thiopeptid Promothiocin B (5) vorliegt, zeigt diese Verbindung keinen Verlust der antibiotischen Wirkung.<sup>[115]</sup> Es scheint, dass neben funktionellen Strukturmotiven auch die Ringgröße der Thiopeptidantibiotika maßgeblich für ihre biologische Funktion entscheidend ist. Eine geringere Größe begünstigt wahrscheinlich die räumliche Bindung des Antibiotikum in der hydrophoben Tasche zwischen den L11 ribosomalen Protein und der 23S rRNA.

Die Untersuchung der Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate zeigte eine Diskrepanz zwischen den diskutierten Daten und dem bisher vorgeschlagenen strukturellen Erkennungsmotiv der Thiopeptide auf.<sup>[135]</sup> Die Erkennung und Bindung der Thiopeptide, sowohl für die antibiotische Wirkung als auch für die *tipA*-Induktion ist möglicherweise abhängig von der Präsenz eines Erkennungsmotivs im ersten (A) makrozyklischen Ringsystems.<sup>[135]</sup> Im Gegensatz dazu führten alle Modifikationen an Thiostrepton (3), sowohl an der Dehydroalanin-Seitenkette als auch an den beiden makrozyklischen Ringsystemen, zu einer Verringerung der antibiotischen Aktivität (Verbindungen 3a-3g). Die reduzierte Wirkung der Thiostrepton-Derivate mit schrittweise abgebauter Dehydroalanin-Seitenkette ist wahrscheinlich zurückzuführen auf fehlende Interaktionen innerhalb des ternären Komplexes von Antibiotika, L11 und 23S rRNA (Verbindungen 3a-b, **Abbildung 3.3**).

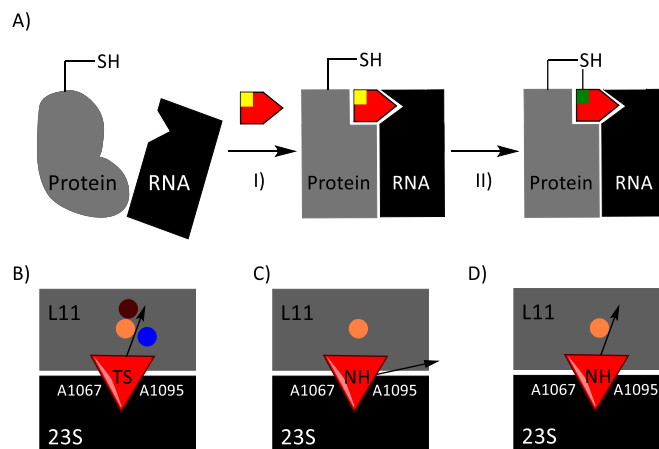
Durchgeführte „proximity induced covalent capture“-Experimente mit Thiostrepton (3) und L11-Mutanten von *Thermus thermophilus* konnten die Ausrichtung der Dehydroalanin-Seitenkette direkt in den ternären Komplex nachweisen (**Schema 3.1** (A, B)).<sup>[169]</sup> Dafür wurde die 1,4-Michael-Addition von rekombinant eingebrachten Cystein-Resten im



ribosomalen Protein L11 und den enthaltenen Dehydroalanin-Resten im Schwanzabschnitt der Thiopeptide genutzt.



**Abbildung 3.3** Thiostrepton-Derivate mit schrittweise abgebauter Seitenkette (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten.

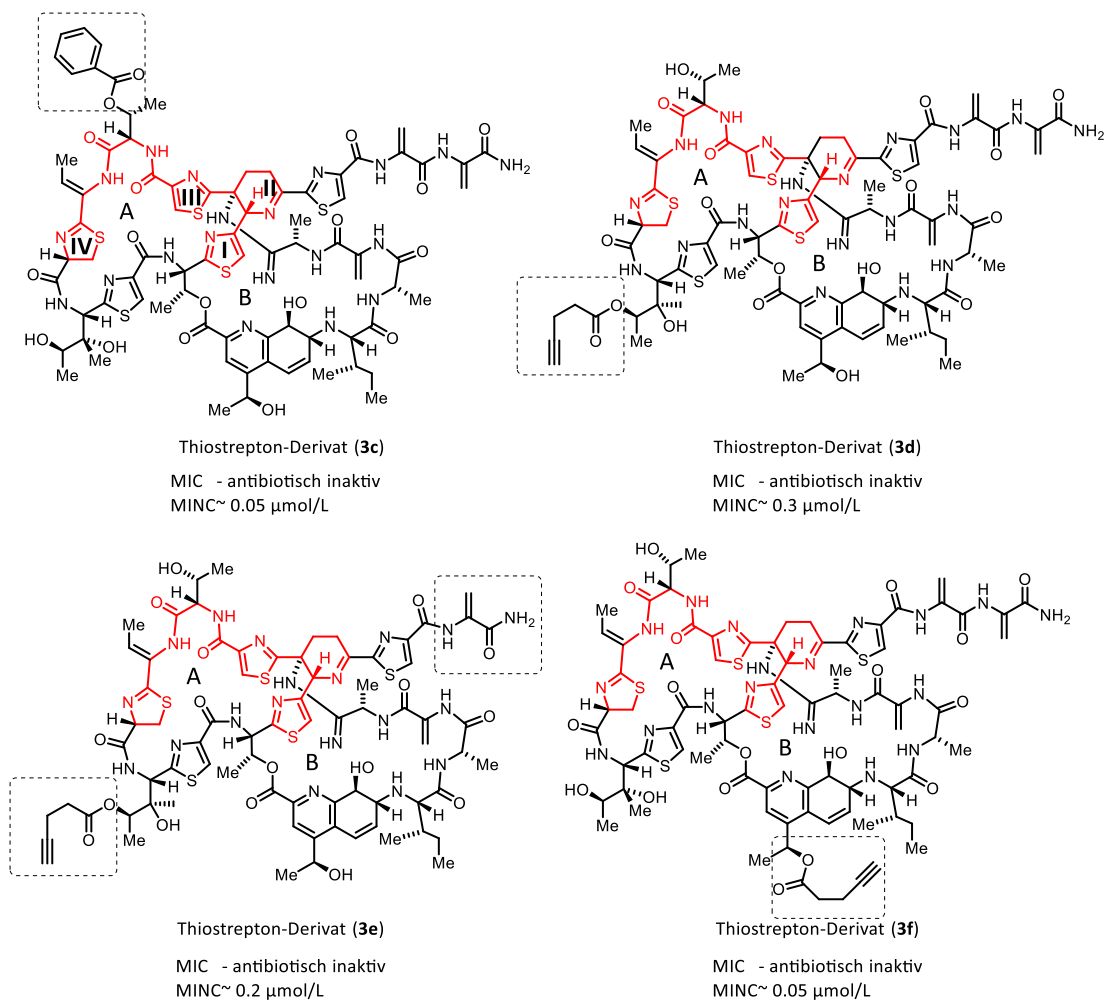


**Schema 3.1** „Proximity induced covalent capture“ (PICC)-Experimente zur Identifizierung der Bindestellen von Thiostrepton (TS) und Nosiheptid (NH) innerhalb des ternären Komplexes von Thiopeptid, L11 ribosomalen Protein und 23S rRNA. A) Schematische Darstellung der PICC-Experimente eines Protein/RNA/Ligand-Komplexes. I) Die Ligandenbindung induziert eine mögliche strukturelle Veränderung des Proteins. II) Gefolgt von der kovalenten Bindung zwischen Protein und Ligand (Rot) durch eine 1,4-Michael-Addition (Gelb/Grün). B) Postulierte Bindung von Thiostrepton und Ausrichtung der Dehydroalanin-Seitenkette (Pfeil) nach Harms *et al.*<sup>[71]</sup> C) Postulierte Bindung von Nosiheptid und Ausrichtung der Dehydroalanin-Seitenkette (Pfeil) nach Harms *et al.*<sup>[71]</sup> D) Postulierte Bindung von Nosiheptid und Ausrichtung der Dehydroalanin-Seitenkette (Pfeil) nach M. Sc. I. Rztsou (unpubliziert). Aminosäurerest G24 in Orange, I34 in Braun und Q29 in Blau.

Kristallstrukturanalysen an der 70S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* konnten ebenfalls die Ausrichtung von Thiostrepton (**3**) zwischen dem ribosomalen Protein

L11 und den Helices 43 und 44 der 23S rRNA identifizieren.<sup>[71]</sup> Die erhaltenen Ergebnisse stimmten mit den publizierten PICC-Experimente überein.

Der Dehydroalanin-Schwanzabschnitt von Thiostrepton (**3**) scheint nicht nur eine Orientierungsfunktion innezuhaben, sondern ist wahrscheinlich an der Thiopeptid-Bindung beteiligt. Strukturelle Veränderungen zwischen Position III und IV des konservierten Erkennungsmotives der Thiopeptide, sowie Modifikationen außerhalb des konservierten Motives am ersten (A) makrozyklischen Ringsystem führen zu einem Verlust der antibiotischen Wirkung (Verbindungen **3c**, **3d-f**, **Abbildung 3.4**).

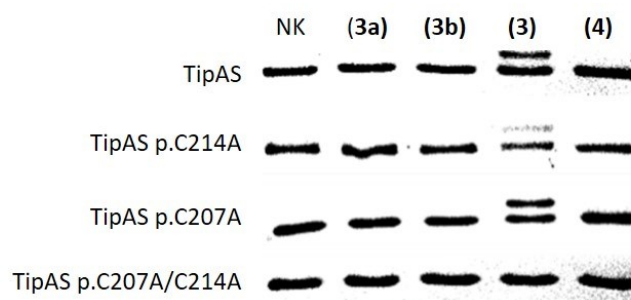


**Abbildung 3.4** Thiostrepton-Derivate mit strukturellen Modifikationen am ersten (A) und zweiten (B) makrozyklischen Ringsystem (Rechteck), farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten.

Überraschenderweise zeigten besonders Thiostrepton-Derivate mit strukturellen Modifikationen am zweiten (B) makrozyklischen Ring einen kompletten Verlust der

antibiotischen Wirkung gegenüber *S. coelicolor* A3(2) (Verbindung **3g**). Diese Beobachtungen stehen jedoch im Kontrast zu der beschriebenen Position des nicht-konservierten Teils des Thiopeptids im ternären Komplex. Kristallstrukturanalysen konnten die Positionierung des nicht-konservierten Teils in einem nichtselektiven Hohlraum der hydrophoben Tasche zeigen.<sup>[71]</sup>

Anders verhielt es sich bei der Überprüfung der *ptipA*-Induktion. Der schrittweise Abbau der Seitenkette führte zu keinem Effekt auf die *ptipA*-Induktion (Verbindungen **3a-b**, **Abbildung 3.3**). Dies steht im Einklang mit Chiu *et al.* welcher berichtete, dass die kovalente Bindung zwischen der Dehydroalanin-Seitenkette und dem Cystein 214 des Transkriptionsfaktor TipAL keine tragende Rolle in der *tipA*-Induktion spielt.<sup>[136]</sup> Die kovalente Bindung konnte jedoch durch laborinterne *in vitro* Bindestudien zwischen TipAS Mutanten mit einem Alanin-Rest anstatt eines Cysteins an Position 207/214 und Thiostrepton (**3**) bestätigt werden sowie das Cystein 214 als Hauptbindepartner für die Reaktion identifizieren (unveröffentlichte Arbeiten von Dr. Claudia Rößler, **Abbildung 3.5 (3, 3a-b)**).



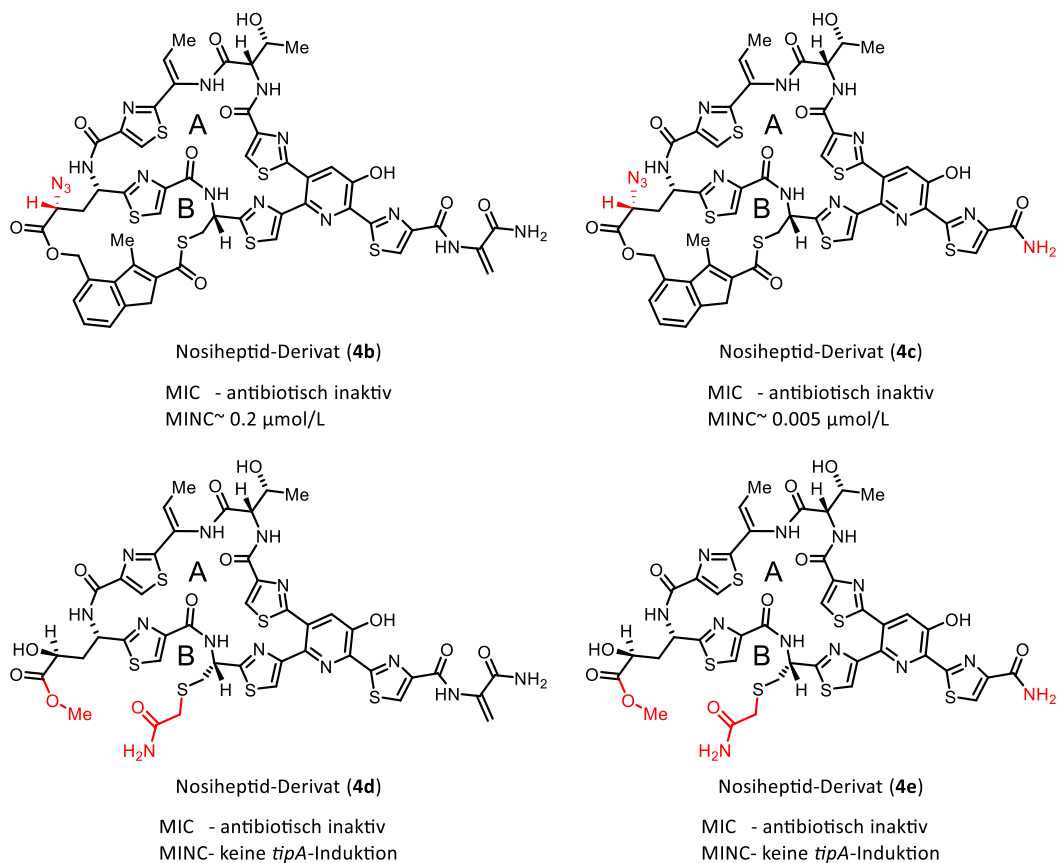
**Abbildung 3.5** *In vitro* Bindestudien zwischen TipAS Mutanten und Thiostrepton-Derivaten (**3a-b**), Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**). Aufgetragen auf einem 12 %igen SDS-Gel mit nachfolgender Coomassie-Färbung. Als Kontrolle diente gereinigtes TipAS ohne Thiopeptid (NK).

Die direkte kovalente Reaktion zwischen der Dehydroalanin-Seitenkette und TipAS konnte durch die nicht vorhandene Interaktion zwischen den Thiostrepton-Derivaten mit schrittweise abgebauter Seitenkette und dem Protein nachvollzogen werden (Verbindungen **3a-b**). Einzig die Öffnung des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems führte wiederholt zum Verlust der Aktivität (Verbindung **3g**).

Im Gegensatz zu Thiostrepton (**3**) spielte die Dehydroalanin-Seitenkette bei Nosiheptid (**4**) keine wesentliche Rolle für die antibiotische Aktivität gegenüber *S. coelicolor* A3(2) (**Schema 3.1 (C)**, Verbindung **4a**). Unveröffentlichten Arbeiten von M. Sc. I. Raztsou zeigten

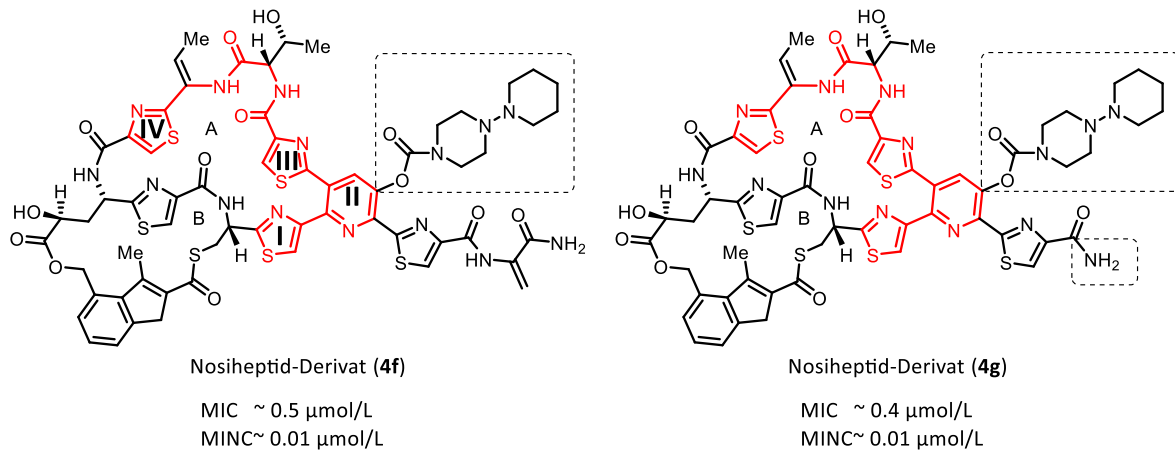
jedoch durch PICC-Experimente *in cellulo* mit dem 70S Ribosom des *E. coli* Stammes BW25113  $\Delta$  *rplk* und heterolog exprimierten L11-Proteinen, dass für Nosiheptid (**4**) eine Thiostrepton-ähnliche Bindung und Ausrichtung vorliegen sollte (**Schema 3.1 (D)**). Weitere laborinterne *in vitro* Bindestudien konnten ebenfalls keine kovalente Reaktion zwischen TipAS und Nosiheptid (**4**) nachweisen, womit der geringe Einfluss der Nosiheptid-Derivate mit abgebauter Dehydroalanin-Seitenkette auf die *tipA*-Induktion zu erklären ist (unveröffentlichte Arbeiten von Dr. Claudia Rößler, **Abbildung 3.5 (4)**).

Dagegen führten Modifikationen am zweiten (B) makrozyklischen Ring und deren Öffnung zur Minderung bis zum Verlust der antibiotischen Wirkung und der *tipA*-Induktion (Verbindungen **4b-e**, **Abbildung 3.6**).



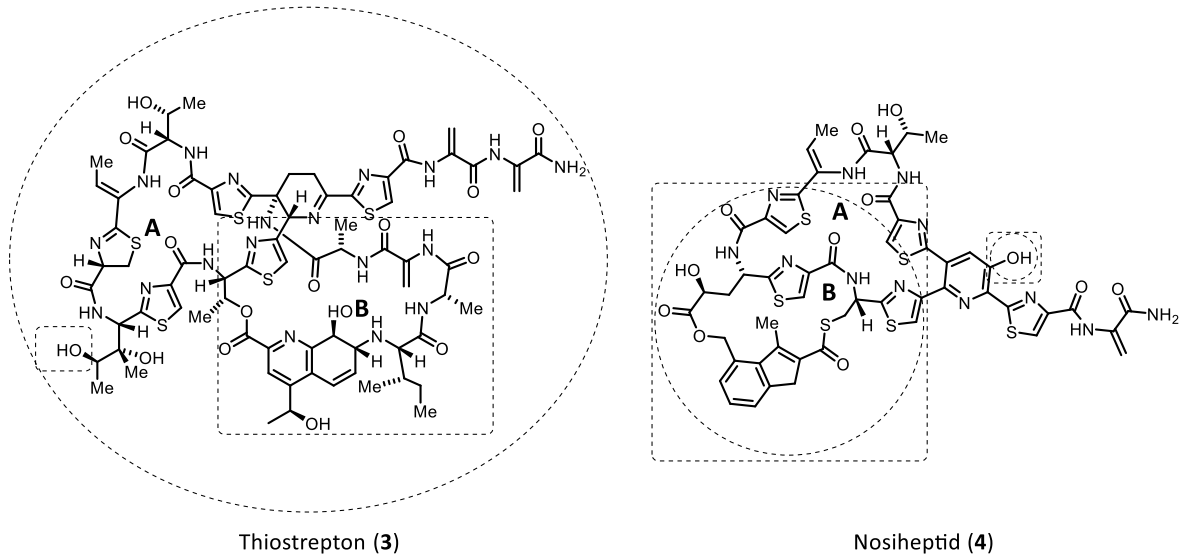
**Abbildung 3.6** Nosiheptid-Derivate mit Modifikationen am zweiten (B) makrozyklischen Ring (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten.

Überraschenderweise zeigte die Modifikation an der Position II des beschriebenen konservierten Erkennungsmotives keine signifikante Veränderung im Aktivitätsprofil beider biologischer Funktionen (Verbindung **4f-g**, **Abbildung 3.7**).



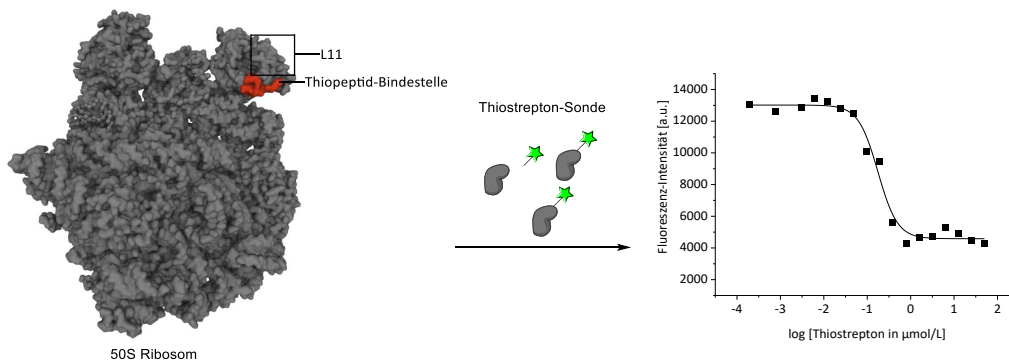
**Abbildung 3.7** Nosiheptid-Derivate mit strukturellen Modifikationen am ersten (A) makrozyklischen Ringsystem (Rechteck), farblich markierten konservierten Erkennungsmotiv (rot) und charakterisierten MIC und MINC-Werten.

Laut den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint nicht nur der hoch konservierte Teil des ersten (A) makrozyklischen Ringsystems an der Erkennung und Bindung des Thiopeptids beteiligt zu sein. Der zweite (B) makrozyklische Ring spielt sowohl eine Rolle für die ribosomale Interaktion als auch für die Bindung an den Transkriptionsfaktor TipAL. Die Ringschlussmetathesen des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems von Nosiheptid (**4**) stützen diese Vermutung (Verbindungen **4h-n**). Es konnte in allen Ansätzen die *tipA*-Induktion wiederhergestellt werden. Der zweite makrozyklische Ring (B) scheint ein wichtiges Strukturmotiv für die Ausbildung des TIP-Thiopeptid-Komplexes und der darauffolgenden Promotor-Bindung zu sein. Eine nennenswerte antibiotische Wirkung konnte für diese Analoga allerdings nicht gefunden werden. Weiterhin machen die unterschiedlichen Aktivitäts-Profile der Thiopeptid-Derivate von Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) ein gemeinsames Erkennungsmotiv für die antibiotische Wirkung und *tipA*-Induktion unwahrscheinlich. Für die wachstumshemmende Wirkung scheint durchaus der erste (A) makrozyklische Ring von Thiostrepton (**3**) und die Dehydroalanin-Seitenkette eine tragende Rolle zu spielen, jedoch gilt dies nicht für Nosiheptid (**4**) und die *tipA*-Induktion im Allgemeinen (**Abbildung 3.8**).



**Abbildung 3.8** Überblick der wichtigsten Struktur motive von Thiostrepton (3) und Nosiheptid (4) für die antibiotische Aktivität (Kreis) und die *tipA*-Induktion (Rechteck).

Der Verlust oder die reduzierte Wirkung beider biologischer Funktionen kann zwei Ursachen haben. Entweder das Thiopeptid gelangt nicht mehr in die Zelle, oder die Derivatisierung führt zu einer verringerten Bindeaffinität des Antibiotikum. Für die antibiotische Wirkung am Ribosom könnte die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Thiopeptide mit Hilfe einer Fluoreszenz-markierten Thiostrepton-Sonde und intakten prokaryotischen Ribosom *in cellulo* zur Klärung beitragen (Schema 3.2).<sup>[170]</sup>



**Schema 3.2** Schematische Darstellung der *in cellulo* Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Thiopeptide am Ribosom (grau), unter der Verwendung einer Fluoreszenz-markierten Thiopeptid-Sonde (PDB: 3CF3).<sup>[71]</sup>

Für die Promotor-Induktion wurde der MINC-Wert bestimmt. Dieser gab Aufschluss über die Empfindlichkeit der Aktivierung des *tipA*-Promotors durch den TIP-Thiopeptid-

Komplexes, jedoch nicht über die Stabilität des Komplexes. Auch hier könnte die Bestimmung der Bindeaffinität der Thiopeptide an die TIP mittels Verdrängungs-Titration zusätzliche Daten liefern. Diese Form der Titration kann nur mit Thiopeptid-Derivaten durchgeführt werden, die keine kovalenten Reaktionen eingehen. Im Gegensatz dazu kann die beschriebene kovalente Bindung für einfache Bindestudien mit den TIP genutzt werden. Eine qualitative Analyse ist wahrscheinlich mittels SDS-Gelelektrophorese und Proteinfärbung realisierbar.

Unterstützende NMR-Studien mit isolierten TIP und den selektiven Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivaten könnten zusätzlich weitere Einblicke in die noch nicht gänzlich geklärten strukturellen Bedingungen der Thiopeptid-Bindung für die transkriptionelle Aktivierung liefern.

### 3.3 TIP-Thiopeptid Komplex als Resistenzmechanismus

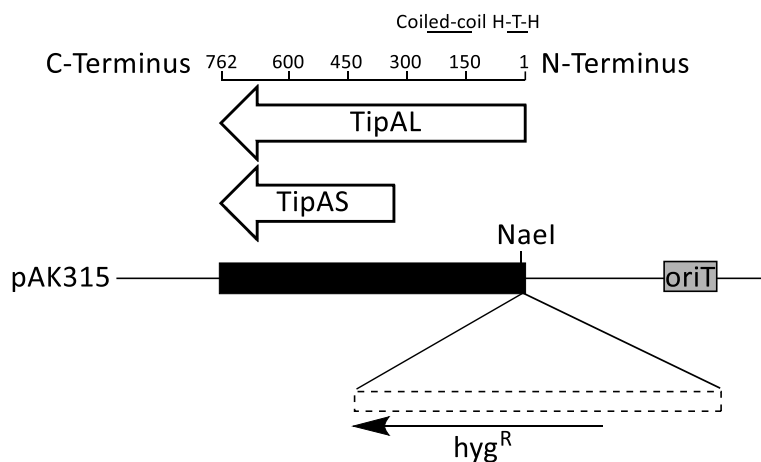
Seit der Identifizierung der TIP wurde ihre Beteiligung an spezifischen Resistenzmechanismen vermutet.<sup>[114]</sup> Insbesondere wurde angenommen, dass das überexprimierte TipAS Protein durch die Ausbildung stabiler, gegebenenfalls kovalenter TIP-Thiopeptid-Komplexe im Zytosol die Antibiotika bindet und so die antibiotische Wirkung unterbinden könnte.<sup>[136, 142]</sup> Diese Hypothese wurde jedoch nie eindeutig durch experimentelle Daten gestützt. Die starke Trennung zwischen *Streptomyces* spp. „Emitter“- und „Responder“-Stämme bekräftigte die Vermutung einer TIP-vermittelten Resistenz, speziell für die „Responder“-Stämme. Besonders da die „Emitter“- Stämme bereits eine hochwirksame Resistenz gegen Thiopeptid-Antibiotika besitzen, durch die Expression einer 23S rRNA-Methyltransferase, welche in den „Responder“- Stämmen fehlt.

Zur experimentellen Untersuchung der Hypothese eines direkten Resistenzmechanismus wurde in dieser Arbeit eine Knockout-Mutante des *tipA* Gens im *Streptomyces* „Responder“-Stamm *S. coelicolor* A3(2) hergestellt. Hierbei wurde erstmals das Prinzip des „PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ auf das *tipA* Gen angewendet und dieses gegen eine Apramycinresistenzkassette ausgetauscht (**Schema 2.1**). Die Mutante konnte mittels Southern Blot validiert und durch Wachstumsexperimente mit Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) charakterisiert werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zeigte die *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta tipA$  Mutante in beiden Fällen eine bis zu 4-fach höhere Sensitivität

gegenüber den beiden Thiopeptiden auf, wobei im generellen Wachstumsverlauf keine Änderung beobachtet werden konnte (**Abbildung 2.15**,

**Abbildung 2.16**). Bei Nosiheptid (**4**) war der Effekt auf die Mutante am stärksten erkennbar, da einzig in der Kontrolle mit DMSO ein Wachstum beobachtet werden konnte.

Um die antibiotische Aktivitäten besser vergleichen zu können wurden bezüglich der Knockout-Mutante die MIC-Werte der Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate bestimmt (**Abbildung 2.17**, **Abbildung 2.18**). Die jeweiligen MIC-Werte zeigten einen ähnlichen Trend wie die Wachstumsexperimente. Im Fall von Thiostrepton (**3**) konnte eine 5-fach höhere antibiotische Wirkung auf die Knockout-Mutante im Vergleich zum *S. coelicolor* A3(2) Wildtypstamm nachgewiesen werden. Bei Nosiheptid (**4**) und dessen Derivaten (Verbindung **4a**, **4f**) konnte sogar eine Steigerung der wachstumshemmenden Wirkung um den Faktor 20 festgestellt werden. Dieselbe Tendenz zeigte außerdem die einzig bekannte *tipA*-Mutante im „Responder“-Stamm *Streptomyces lividans* (*S. lividans*).<sup>[136]</sup> Bei dieser Mutante wurde das *tipA* Gen durch die Insertion des Hygromycinresistenzgens in die kodierende Sequenz der DNA-Bindedomäne unterbrochen (**Schema 3.3**).



**Schema 3.3** Konstruktion der *tipA* Knockdown-Mutante. Das Hygromycinresistenzgen wurde an der NaeI-Restriktionsstelle des *tipA* Gens inseriert. Das resultierende Plasmid pAK315 (ursprünglich pUC19) beinhaltet neben dem unterbrochenen *tipA* Gen noch den „Origin of Transfer“ (oriT) für die intergenerische Konjugation in *S. lividans*.

Auch hier zeigte die Störung des *tipA* Gens im „Responder“-Stamm eine 5-fach höhere Sensitivität gegenüber Thiostrepton (**3**), Nosiheptid (**4**) und Berninamycin in einem durchgeführten Agardiffusionstest.



Zur Bestätigung, dass der Knockout des *tipA* Genes die einzige Ursache für den beobachteten Phänotyp ist, sollte die Mutante durch Integration des nativen *tipA* Genes im ursprünglichen Genlokus komplementiert werden. Die Erzeugung dieser Mutante war aufgrund eines fehlenden spezifischen Selektionsdrucks nach dem Austausch der Apramycinresistenzkassette mit dem *tipA* Gen experimentell aufwendig. Ein neuartiger Ansatz durch die Integration des nativen *tipA* Genes mittels Integrase in einen anderen Locus im Genom sowie das Einbringen weiterer Selektionsmarker, etwa durch die Resistenzgene gegen Spektinomycin-Streptomycin oder Viomycin, könnte die Komplementierung der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante ermöglichen.

Die nachfolgende Genotypisierung mittels Southern Blot und einer eigens hergestellten Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde gegen *tipA* gestattete die Validierung. Im Vergleich zum ursprünglichen Wildtyp wies die komplementierte Mutante bei den Wachstumsexperimenten und den minimal inhibitorischen Konzentrationsbestimmungen (MIC) mit Thiostrepton (**3**), Nosiheptid (**4**) und deren Derivaten eine bis zu 6-fach höhere Toleranz gegenüber den Thiopeptiden auf (**Abbildung 2.21**, **Abbildung 2.22**, **Abbildung 2.23**). Begründet werden könnte dies entweder durch eine Mehrfach-Einbringung des *tipA* Genes in den ursprünglichen Locus durch homologe Rekombination oder durch die zusätzliche Integration des Genes an unspezifischen Positionen im Genom. Die komplementierte Knockout-Mutante wurde für weitere „Omik“-Experimente bisher nicht verwendet.

Mit der generierten Knockout-Mutante wurden sowohl Untersuchungen des Metaboloms und Proteoms durchgeführt. Die Untersuchung des Metaboloms erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. Nico Überschaar (FSU-Jena). Es wurden Flüssigkulturen der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mit und ohne Thiostrepton (**3**) inkubiert und sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Metabolite isoliert. Die Untersuchungen zeigten nach mehrfacher Wiederholung jedoch keine charakteristischen Veränderungen des Metaboloms, weshalb auf eine Detailanalyse verzichtet wurde.

Weiterhin wurde die Knockout-Mutante in einer umfangreichen Proteom- und Transkriptomanalyse in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Erika Kothe (FSU-Jena) und von Prof. Dr. Axel A. Brakhage (HKI-Jena) untersucht. Dafür wurde der Wildtypstamm und die *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante mit und ohne Thiostrepton (**3**) kultiviert und das entsprechende Proteom/Transkriptom aufbereitet. Die Auswertung dieser

Experimente ist bislang noch nicht völlig abgeschlossen. Besonders die Analyse transkriptioneller Veränderungen könnte Hinweise hinsichtlich weiterer Gene geben, die durch das Thiopeptid-Antibiotikum oder den Transkriptionsfaktor TipAL im bakteriellen „Responder“ Stamm *S. coelicolor* A3(2) beeinflusst werden.

In den durchgeführten Wachstumsexperimenten mit der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante konnten im vegetativen Wachstum des *Streptomyces*-Myceles keine phänotypischen Veränderungen beobachtet werden. Ein Einfluss des TipA-Thiopeptid-Komplexes auf die Sporenbildung und auf die Ausbildung des Luftmyceles ist jedoch nicht auszuschließen. Auch könnte Thiostrepton (**3**) als Signalstoff wirken und durch die Bindung an den Transkriptionsfaktor TipAL irreversible Entwicklungsschritte einleiten.<sup>[129]</sup> Dafür spricht eine beobachtete zeitliche Verzögerung der Sporulation der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante um mehrere Tage gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Für eine weitere Untersuchung dieser Beobachtung wäre die Echtzeit-Dokumentation des gesamten Lebenszyklus von *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp und Mutante bei der Inkubation mit und ohne Thiopeptid von Vorteil.

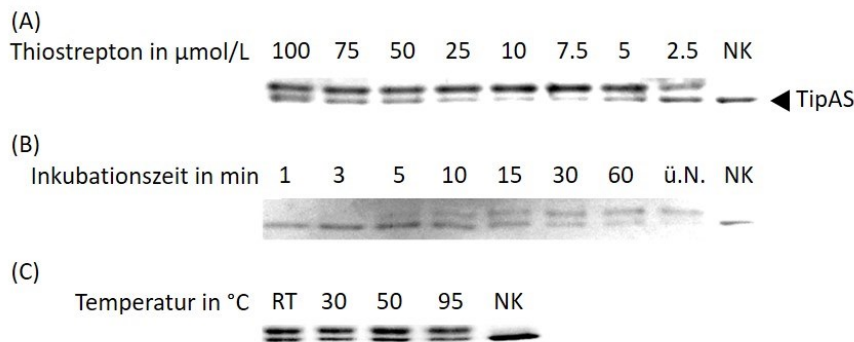
Für die Expressionsanalyse von TipAL und TipAS wurde erfolgreich eine *S. coelicolor* A3(2) Mutante mit einem zusätzlichen *tipA* Gen im Genom generiert. Neben dem nativen *tipA* Gen wurde für die weitere Expressionsanalyse eine Kopie mit C-terminalen Polyhistidin-Tag eingebracht (**Schema 2.2**). Bei der Charakterisierung dieser Mutante wurde eine bis zu 7-fach höhere Toleranz gegen Thiostrepton (**3**) und Nosiheptid (**4**) beobachtet (**Abbildung 2.28, Abbildung 2.29, Abbildung 2.30**).

Die komplementierte *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante und die *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante ähneln sich stark in ihrem beobachteten Phänotyp. Der direkte Vergleich des Wachstumsverhaltens und der MIC-Werte führte zu der Schlussfolgerung, dass wahrscheinlich bei der komplementierten Mutante durch homologe Rekombination mehrfach das *tipA* Gen im Genom integriert wurde. Obgleich mittels Southernblot die Präsenz nur eines *tipA* Gens nachgewiesen wurde (**Abbildung 2.20**). Dementsprechend ist die Herstellung der komplementierten *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mit einem anderen Komplementierungsverfahren nötig.

Für weiterführende Analysen wurden zuerst die durch Southern Blot validierten *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup>-Stämme mit 10  $\mu$ mol/L Thiostrepton (**3**) bis in die stationäre Wachstumsphase kultiviert. Durch die erhöhte Toleranz der Mutanten gegenüber den Thiopeptiden konnte die

Konzentration vergleichsweise hoch gewählt werden. Dadurch überstieg jedoch die gewählte Konzentration von 10  $\mu\text{mol/L}$  die Wasserlöslichkeit und damit die natürlich vorkommende Konzentration der Antibiotika im mikrobiellen Lebensraum ( $\text{MIC}_{\text{TS}}$ : 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ). Mittels Immunoblot konnte in allen getesteten Exkonjuganten die funktionelle Expression beider Tip-Proteine nachgewiesen werden, wobei signifikante Signale erst bei hohen Zellysatkonzentrationen im Milligramm-Bereich detektiert werden konnten (**Abbildung 2.31, Abbildung 2.32**).

Interessanterweise lagen beide Proteine gleichzeitig in ihrer freien Form als auch in ihrer kovalent an Thiostrepton (**3**) gebundenen Form vor. Bisher unveröffentlichte *in vitro* Bindungsstudien konnten zeigen, dass die kovalente Bindung zwischen Thiostrepton (**3**) und den TIP recht schnell innerhalb weniger Minuten gebildet werden kann, jedoch nie vollständig wird (unveröffentlichte Arbeiten von Dr. Claudia Rößler, **Abbildung 3.9**).



**Abbildung 3.9** *In vitro* Bindestudien zwischen TipAS und Thiostrepton (**3**). Aufgetrennt auf einem 12 %igen SDS-Gel mit nachfolgender Coomassie-Färbung. (A) Mit unterschiedlichen Konzentrationen von Thiostrepton (**3**) und einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur. (B) Mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Thiostrepton (**3**) und unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur. (C) Mit 10  $\mu\text{mol/L}$  Thiostrepton (**3**) und einer Stunde Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Als Kontrolle diente gereinigtes TipAS ohne Thiopeptid (NK).

Wahrscheinlich wird bei Anwesenheit von Thiostrepton (**3**) die Expression des *tipA* Gens durch den gebundenen Transkriptionsfaktor TipAL verstärkt. Die nachfolgende erhöhte Expression von TipAS und die Ausbildung des TIP-Thiostrepton-Komplexes könnte zu einer Verringerung der intrazellulären Ligandenkonzentration führen. Die resultierende negative, autoregulatorische Rückkopplungsschleife durch TipAS führt vermutlich zu einer Anhäufung neu exprimierter TIP in ungebundener Form.

Bei Kultivierungsansätzen ohne Thiopeptid-Ligand konnte wiederholt bei hohen Zellysatkonzentrationen im Milligramm-Bereich eine basale Expression des

Transkriptionsfaktor TipAL, jedoch nicht von TipAS nachgewiesen werden (**Abbildung 2.33**). Dies widerspricht der Annahme, dass es sich bei dem *tipA* Gen um ein stilles Gen handelt, das erst bei Anwesenheit des Liganden exprimiert wird.<sup>[155]</sup>

Die Expressionsanalysen mit unterschiedlichen Thiostreptonkonzentrationen im mikromolaren Bereich zeigten ein differenzierteres Bild (**Abbildung 2.34**). Der Transkriptionsfaktor TipAL konnte schon bei geringen Konzentrationen von 0.625 µmol/L Thiostrepton (**3**) in seiner freien Form nachgewiesen werden. Erst bei der sehr hohen Konzentration von 10 µmol/L Thiostrepton (**3**) wurde neben dem freien Protein auch der kovalent gebundene TipAL-Thiopeptid-Komplex identifiziert. Trotz steigender Ligandenkonzentration blieb die Expression von TipAL dabei durchweg auf einem ähnlichen Niveau. Im Gegensatz dazu konnte TipAS, sowohl in seiner freien Form als auch in der kovalent gebundenen Form, erst ab einer Konzentration von 2.5 µmol/L Thiostrepton (**3**) überhaupt detektiert werden. Weiterhin zeigte sich eine Abhängigkeit der TipAS Expression von steigender Ligandenkonzentration. Die Vermutung liegt nahe, dass TipAS bedarfsabhängig exprimiert wird und somit zu den unterschiedlichen Verhältnis von TipAL und TipAS führt. Auslöser könnten entweder eine negative Regulation der *tipA* Transkription oder die hohen Thiopeptidkonzentration sein.

Die relativ konstante Expression von TipAL und die erst bei steigender Thiostreptonkonzentration einsetzende Expression von TipAS führt zu der Annahme, dass beide Proteine unabhängig voneinander exprimiert werden. Unklar ist, wie das unterschiedliche Verhältnis zwischen TipAL und TipAS zustande kommt, da es nur eine kodierende Sequenz für beide Proteine gibt. Unter Umständen wird die unterschiedliche Expression beider TIP durch die zwei unabhängigen ribosomalen Bindestellen kontrolliert. Als Ursache kann entweder eine grundgelegene Differenz in der Translation-Initiations-Effizienz auf Ebene der Primärsequenz sein oder die Abgrenzung und Destabilisierung mindestens einer der beiden ribosomalen Bindestellen durch sekundär-ausgebildete Haarnadelstrukturen innerhalb der mRNA-Sequenz. Interessanterweise befindet sich einzig das alternative Translationsstartcodon GUG von *tipAL* innerhalb solch einer Haarnadelstruktur.<sup>[119]</sup> Möglicherweise wirkt auch das ligandenfreie TipAL Protein am *tipA*-Promotor unterschiedlich im Vergleich zum Ligand-gebundenen Transkriptionsfaktor.

Eine nähere Betrachtung der Expressionsverhältnisse beider TIP in den unterschiedlichen Wachstumsphasen der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante mit Thiostrepton (**3**) als Ligand

sollte weitere Einblicke in die zeitliche Abfolge der Proteinexpression geben. Weiterhin wäre die voneinander getrennte Charakterisierung beider TIP von Vorteil, um die unabhängige Expression der TIP zu untersuchen und weiterführende Funktionen von TipAS ohne TipAL zu identifizieren. Dafür kann beispielsweise die *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante verwendet werden und jeweils mit den einzelnen kodierenden Sequenzen von *tipAL* oder *tipAS* mit C-terminalem Polyhistidin-Tag komplementiert werden.

Die Klasse der Thiopeptidantibiotika weist, neben ihrer inhibitorischen Aktivität, eine biologische Aktivität in rivalisierenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften auf. Dabei ist ihre Reichweite als interzellulärer Signalstoff durch ihre geringe Wasserlöslichkeit auf die unmittelbare Nähe des „Emitter“-Stammes reduziert, möglicherweise sogar gezielt lokalisiert.

Neben der *tipA*-Induktion scheinen die Thiopeptide auch eine regulatorische Aktivität für Stresssignale zu besitzen. Thiostrepton (**3**) vermittelt zum Beispiel gesteigerte Resistenz gegenüber anderen Antibiotika mit unterschiedlichen zellulären Wirkmechanismen im „Responder“-Stamm *S. lividans*.<sup>[171],[172]</sup> Zu den prominenten Beispielen gehören das Antikrebsmedikament Daunorubicin, das Antibiotika Sparsomycin und das 29-gliedrige Thiopeptid GE2270 A.<sup>[173],[174],[175],[176],[177]</sup> Die Kultivierung einer Thiostrepton-resistenten *tipA* Knockdown-Mutante in *S. lividans* stützte diese These.<sup>[136]</sup> Bei Anwesenheit von Thiostrepton (**3**) wurde die Biosynthese von bislang nicht weiter charakterisierten Proteinen beeinflusst und somit weitere Reaktionen im Mikroorganismus ausgelöst. Möglicherweise ist dies auf unspezifische Reaktivität des Dehydroalanin-Schwanzabschnittes der Thiopeptide gegenüber Cysteinhaltigen Proteinen oder auch niedermolekularen Thiol-Verbindungen zurückzuführen. Zelluläre Thiole sind essenziell sowohl für die Aufrechterhaltung des zytoplasmatischen Redoxpotentials als auch für die native Proteinkonformation und die Regulation von Enzymaktivitäten.<sup>[178],[179],[180]</sup> Die erhöhte Resistenz gegenüber anderen Antibiotika in *S. lividans* könnte damit zusammenhängen, da die beeinflussten Antibiotika Daunorubicin und Sparsomycin erwiesenermaßen das zytoplasmatische Redoxpotential der Zelle stören.<sup>[181],[182],[183]</sup>

Basierend auf dem Phänotyp der *S. coelicolor* A3(2)  $\Delta$  *tipA* Mutante und den TIP Expressionsanalysen scheinen die induzierten Proteine TipAL und TipAS in einen direkten, in sich geschlossenen, kurzlebigen Stressresistenzmechanismus des „Responder“-Stammes

*S. coelicolor* A3(2) eingebunden zu sein. Die basale zytoplasmatische Expression des Transkriptionsfaktors TipAL kann dabei als ein ständig aktives Kontrollsystem des Organismus betrachtet werden, welches eine schnelle Reaktion auf eine zunehmende toxische Umgebung ermöglicht.<sup>[120]</sup> Die vermehrte Expression von TipAS dient einerseits als Negativregulator der *tipA*-Transkription und möglicherweise auch als Inaktivator der Antibiotika durch die Ausbildung von kovalenten TIP-Thiopeptid-Komplexen. Allerdings zeigten Arbeiten in der Gruppe eindeutig, dass hochpotente Thiopeptid-Antibiotika wie Nosiheptid (**4**) und dessen synthetische Derivate, die die Expression vom *tipA* Gen ebenso induzieren, nicht kovalent mit TipAS reagieren. Die Charakterisierung funktionell exprimierter TIP in weiteren Gattungen der Bakterien unterstützt die Vermutung, dass es sich bei der Induktion des *tipA* Gens durch den TIP-Thiopeptid-Komplex um eine nicht völlig spezifische Stressantwort handelt, um geringen Konzentrationen von TipA-Liganden entgegenzuwirken.<sup>[155],[154]</sup> Eine damit verknüpfte Signalfunktion ist damit durchaus vorstellbar, gerade in evolutionär ferner stehenden *tipA*-Varianten.

## 4 Zusammenfassung

Die komplexen, makrozyklischen Thiopeptid-Antibiotika werden hauptsächlich als Sekundärmetabolite von Thiopeptid-resistenten Bodenbakterien der *Streptomyces*-Gattung („Emitter“-Stämme) produziert und weisen eine hochpotente antibiotische Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien auf. Neben ihrer antibiotischen Wirkung können die Thiopeptidantibiotika in subminimal hemmenden Konzentrationen als sekundärer Botenstoffe die Expression von mindestens zwei Thiostrepton-induzierten Proteinen (TIP) fördern. Der Transkriptionsfaktor Thiostrepton-induziertes Protein A „*large form*“ (TipAL) und das stärker exprimierte Thiostrepton-induzierte Protein A „*short form*“ (TipAS) regulieren zusammen in Thiopeptid-sensitiven *Streptomyces* spp. („Responder“-Stämme) die Expression des eigenen kodierenden *tipA* Gens.

Durch eine weitreichende BLAST-Suche in der Domäne der Bakterien konnten 95 *tipA*-sequenzähnliche Gene, mit einer Sequenzhomologie über 65 % verteilt auf 23 unterschiedlichen bakteriellen Gattungen, identifiziert werden. Besonders die Gattung *Streptomyces* und *Micromonospora* waren am meisten vertreten. Die drei *Streptomyces*-Spezies *S. antibioticus*, *S. hawaiiensis* und *S. hygroscopicus* stachen besonders hervor, da sie in der Literatur als Thiopeptid-Produzenten charakterisiert wurden, jedoch vermutlich ein *tipA*-ähnliches Gen enthalten. Daneben wurde erstmals ein *tipAS*-ähnliches Gen in den zwei gramnegativen Bodenbakterien *Myxococcus hansupus* und *Pyxidicoccus fallax* nachgewiesen.

Für die Identifizierung weiterer nachgeschalteter Effekte des TIP-Thiopeptid-Komplexes sollten selektive Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate charakterisiert werden, welche in der Lage sind die Transkription des *tipA* Gens zu induzieren aber nicht mehr antibiotisch aktiv sind. Dafür wurde zum einen die minimalste inhibierende Konzentration der Antibiotika auf Festmedium und die *ptipA*-Induktion durch ein neu etabliertes Luciferase-Reportersystems gegen dem „Responder“-Stamm *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor* A3(2)) untersucht. Es konnten erfolgreich Thiopeptid-Derivate identifiziert werden, welche ihre antibiotische Wirkung verloren hatten, jedoch in der Lage waren die *tipA* Expression einzuleiten. In Folge der Charakterisierung ergaben sich neue Einsichten in die strukturellen

Bindeverhältnisse des TIP-Thiopeptid-Komplexes und der unterschätzten Rolle des zweiten (B) makrozyklischen Ringsystems der Thiopeptidantibiotika.

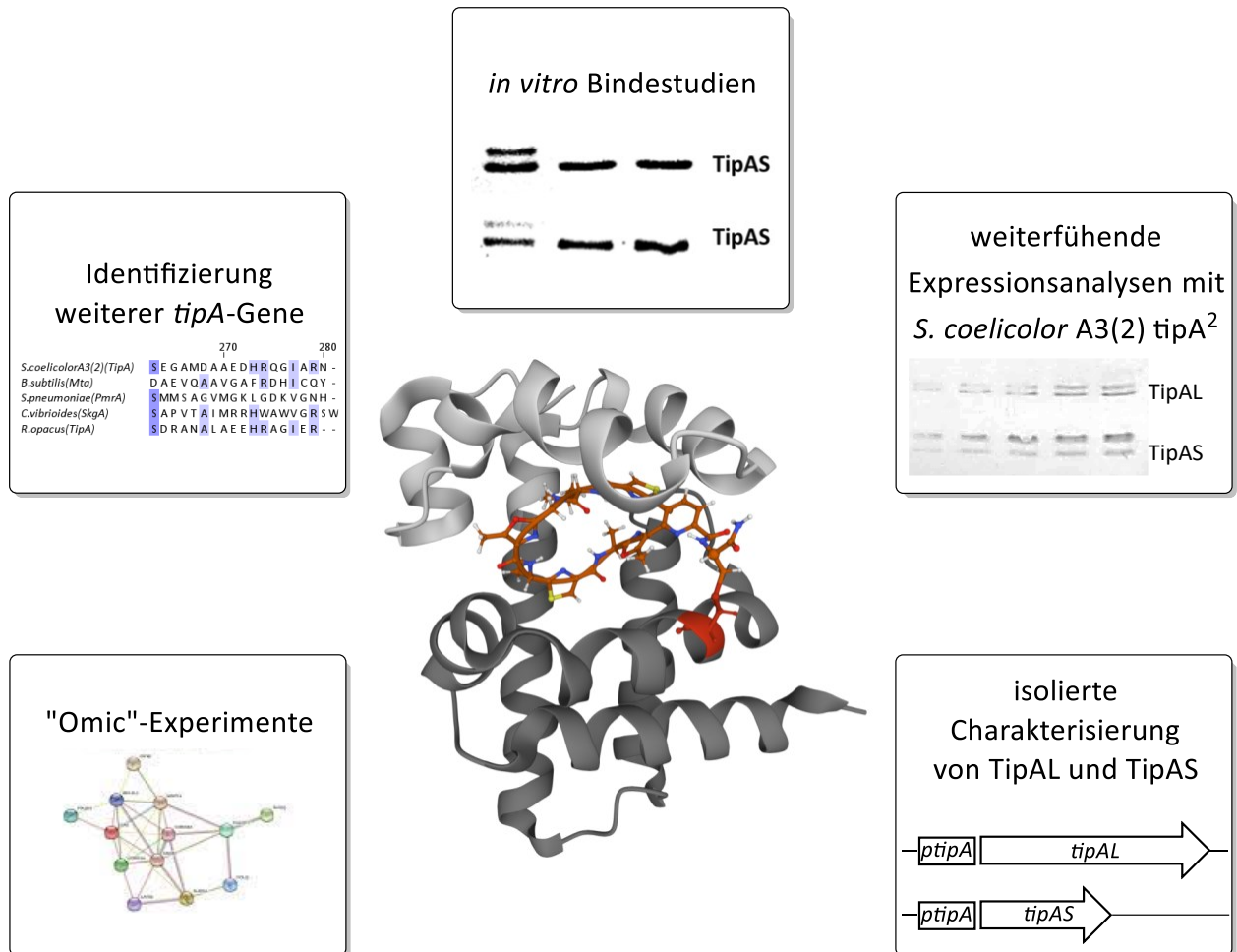
Die Charakterisierung einer erfolgreich generierten *tipA* Knockout-Mutante des „Responder“-Stammes *S. coelicolor* A3(2) wies eine bis zu 5-fach höhere Sensitivität gegenüber Thiopeptiden im Vergleich zum Wildtyp-Stamm auf. Im Gegenzug zeigte eine *S. coelicolor* A3(2) Mutante mit zwei funktionell exprimierten *tipA* Genen im Genom eine 7-fach höhere Toleranz gegenüber den Antibiotika auf. Abschließende Expressionsanalysen mit einem Polyhistidin-markierten *tipA* Gen zeigten eine stets basale Expression des Transkriptionsfaktors TipAL, eine unabhängige Expression beider TIP und eine Korrelation zwischen steigender Thiopeptidkonzentration und der Expression von TipAS auf.

Die zugrundeliegenden Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Thiopeptidantibiotika neben ihrer antibiotischen Aktivität eine biologische Relevanz als interzelluläre Signalstoffe in mikrobiellen Lebensgemeinschaften haben. Die Ausbildung des TIP-Thiopeptid-Komplexes und der einhergehenden vermehrten autoregulatorischen Expression der TIP scheinen zum derzeitigen Forschungsstand Teil eines direkten, in sich geschlossenen und kurzlebigen Resistenzmechanismus des „Responder“-Stammes *S. coelicolor* A3(2) zu sein. Die basale zytoplasmatische Expression des Transkriptionsfaktors TipAL kann dabei als ein stets bereites Kontrollsystem betrachtet werden, welches auf zunehmende Antibiotikakonzentrationen reagieren kann. Die bioinformatische Identifizierung von *tipA*-ähnlichen Sequenzen in weiteren bakteriellen Gattungen unterstützt die These einer funktionellen Relevanz der TIP auch außerhalb der *Streptomyces* spp.

Im weiteren Verlauf kann auf Basis der BLAST-Ergebnisse nach weiteren funktionell exprimierten *tipA* Genen gesucht und deren Effekte in anderen Systemen charakterisiert werden (**Schema 4.1**). Die charakterisierten Thiostrepton- und Nosiheptid-Derivate können derweil für weiterführende *in vitro* Bindestudien des TIP-Thiopeptid-Komplexes verwendet werden, um deren strukturellen Bindeeigenschaften näher zu studieren. In Kombination mit der validierten *tipA* Knockout-Mutante können die Derivate sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptomebene genutzt werden, um etwaige weiter induzierte Gene und Bindepartner zu identifizieren. Auf proteinbiochemischer Ebene können die Expressionsanalysen mit der *S. coelicolor* A3(2) *tipA*<sup>2</sup> Mutante weiter fortgeführt werden, sowie die voneinander losgelöste Expressionsanalyse der TIP zur Klärung der weiterführenden Funktion von TipAS.



Die in dieser Arbeit dargestellten Methoden legen damit den Grundstein für die Überprüfung der Hypothese hinsichtlich der Thiopeptide als Signalmolekül im mikrobiellen Konsortium.



**Schema 4.1** Ideenansätze für die weiterführende Arbeit, basierenden auf den erhaltenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Bändermodell von TipAS im Komplex mit Promothiocin A (Stäbchenmodell) (PDB: 2MBZ)<sup>[135]</sup>

# 5 Material und Methoden

## 5.1 Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav D-65	Systec
BioDocAnalyse digital Basis-Set	Analytik Jena
Biologische Sicherheitswerkbank Safe 2020	ThermoFisher Scientific
BioPhotometer plus 6131	Eppendorf
Dri-block heater DB-2D	Techne
Duetz-System-Halterung	Kuhner
Eporator®	Eppendorf
FlexCycler <sup>2</sup> PCR Thermal Cycler	Analytik Jena
HeraTherm™ Mikrobiologischer Inkubator	ThermoFisher Scientific
MiniSpin®	Eppendorf
Orbitalschüttler KS 125 basic	IKA
PerfectBlue™ Gelsystem	Peqlab
PerfectBlue™ Semi-Dry Elektrobloetter Sedec M	Peqlab
PerfectBlue™ Vertikal Doppel Gelsystem	Peqlab
Plattenlesegerät Infinite® 200 pro	Tecan
Sonoplus HD 2070 Homogenisator	Bandelin
Stuart Rotator SB3	VWR
Truhen-Orbitalschüttler MaxQ™ 436 HP	ThermoFisher Scientific
Ultratiefkühlschrank HERAfreeze	ThermoFisher Scientific
Wasserbad VWB 18	VWR
Zentrifuge 5408 R	Eppendorf

## 5.2 Software und Datenbank

NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Jalview	<a href="https://www.jalview.org/">https://www.jalview.org/</a>
Unipro UGENE	<a href="http://ugene.net/">http://ugene.net/</a>

## 5.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

### 5.3.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Blottingpapier ROTILABO® Dicke 1.5 mm	Carl-Roth
Elektroporationsküvetten 2mm	Biozym
Injekt® Solo 2-teilige Einmalspritzen (20 mL)	Braun
kanonische Zentrifugalröhrchen (15 mL, 50 mL)	VWR
Medizinische Wattestäbchen	Boettger
Mikrotiterplatten BRANDplates® 96-Well	Brand
Petrischalen mit Belüftungsnocken	Carl-Roth
Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL)	Greiner Bio-One
schwarze 96-Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
Transfermembran ROTI® Nylon plus	Carl-Roth
Transfermembran ROTI® PVDF 0.2 µm	Carl-Roth
transparente 96-Well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten steril, 24 Wells	Carl-Roth

### 5.3.2 Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Scientific
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
Opti-4CN Goat Anti-Mouse Detection Kit	BIO-RAD

### 5.3.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien für Medien und Puffersysteme wurden von der Firma Carl-Roth, Grüssing und ARCOS Organics bezogen. Alle Lösungsmittel wurden im HPLC-Reinheitsgrad von der Firma VWR erworben.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1) 30%	Applichem
Agarose Low Melt	Carl-Roth
Ammoniumpersulfat	SIGMA-Aldrich
BCIP/NBT Color Development Substrate	Promega
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich
Coomassie Brilliantblau G	SIGMA-Aldrich
Decanal	SIGMA-Aldrich
DIG-11-dUTP	Jena Bioscience
Dimethylsulfoxid	Carl-Roth
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Scientific
dNTP Mix (10 mmol/L each)	Thermo Scientific
Electran® Agarose DNA Grade	VWR
Essigsäure 99.7 %	Fisher Scientific
Ethidiumbromid	Carl-Roth
Midori Green Advance	Nippongenetics
Natriumactetat	Carl-Roth
Pluronic® F-127	SIGMA-Aldrich

Ponceau S	Carl-Roth
ROTI <sup>®</sup> Nanoquant	Carl-Roth
Sojamehl	DM-Drogeriemarkt
TEMED	Carl-Roth

### 5.3.4 Antibiotika

Produkt	Stammlösung	Arbeitslösung	Hersteller
Ampicillin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/mL	Carl-Roth
Kanamycin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	30 µg/mL	Carl-Roth
Chloramphenicol	34 mg/mL in EtOH (100 %)	25 µg/mL	Carl-Roth
Nalidixinsäure	50 mg/mL in 0.3 mol/L NaOH	25 µg/mL	Carl-Roth
Apramycin	50 mg/mL in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/mL	SIGMA-Aldrich
Thiostrepton	50 mg/mL in DMSO	50 µg/mL	Calbiochem

### 5.3.5 Elektrophorese-Größenstandard

Produkt	Hersteller
GeneRuler 1 kbp DNA Ladder	Thermo Scientific
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

### 5.3.6 Enzyme

Produkt	Hersteller
DreamTaq DNA Polymerase (+ 10 x Puffer)	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific
FastDigest Enzyme (+ 10 x Puffer)	Thermo Scientific
Lysozym	VWR
Proteinase K	Carl-Roth
RNase A (DNA-frei)	Applichem
T4 DNA Ligase (+ 10x Puffer, 50 % PEG 4000)	Thermo Scientific

## 5.4 Plasmide

<b>Produkt</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Herkunft</b>
pET30a(+)	Expressionsvektor, MCS unter der Kontrolle des T7-Promotors, N- und C-terminaler His-Tag	Novagen
pTipAL	pET30a(+)-Derivat, tipAL Gen mit C-terminalen His-Tag	diese Arbeit
pNA1	pSET152-Derivat <sup>[184]</sup> , ptipA-lux-AB Konstrukt, Thiostrepton-Resistenzgen	Ali <i>et al.</i> <sup>[147]</sup>
pNA2	pSET152-Derivat <sup>[184]</sup> , ohne ptipA-lux-AB Konstrukt und Thiostrepton-Resistenzgen	diese Arbeit
ptipAHisTag	pNA1-Derivat, ohne ptipA-lux-AB Konstrukt, tipA Gen mit C-terminalem His-Tag, Kanamycin-Resistenzgen	diese Arbeit
pKO	Klonierungsvektor	HKI, Dr. Tina Netzker, AG Brakhage
ptipAcosmid	pKO-Derivat, tipA Gen mit jeweils 1500 bp umliegender genomischer DNA	diese Arbeit
ptipAKO	ptipAcosmid-Derivat, tipA Gen mit aac(3)IV-Resistenzkassette ausgetauscht	diese Arbeit
pIJ773	P1-FRT-oriT-aac(3)IV-FRT-P2	Gust <i>et al.</i> <sup>[152]</sup>
pIJ790	$\lambda$ -RED (gam, bet, exo), cat, araC, rep101ts	Gust <i>et al.</i> <sup>[152]</sup>
pUZ8002	tra, neo, RP4	Paget <i>et al.</i> <sup>[185]</sup>

## 5.5 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	1:1000	Roche
Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat	1:5000	Bio-Rad
$\alpha$ -His <sub>6</sub> monoklonaler Maus IgG	1:1000	SIGMA-Aldrich

## 5.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics Germany GmbH synthetisiert bezogen.

### Für Klonierungsarbeiten

Name des Primers	Sequenz (5'-3')
tipAL-F	GTACATATGTGGTTCCTCCCGACGATCTG
tipAL-R	CGTCCGGCACACCCCAAGCTTGTA
tipAHisTag-F	TAGGGCCCGCTTCCTTTCGGGCTTTG
tipAHisTag-R	CAGATCGTCGGGAGGAAGGGCCCTA
tipA+-F	TCGGA GGATCCTCTCCCGGCTGTTCTGAAG
tipA+-R	CTACCGTCGGTCGCATGTCAGATATCTAATC
aac(3)IV-F	GAGGCAGCGTGGACGGCGTCAGAGAAGGGAGCGGAAGT GATTCCGGGGATCCGTCGACC
aac(3)IV-R	GAAGCAGCTCCAGCCTACATGAGCGGTGGTCGTGGCCCG GGTCTCCCGCCCGGTCTCA
tipAcosmid-F	CGGTGCTGTCCTTCCGTTTC
tipAcosmid-R	CAGATCGTCGGGAGGAACCA

### Sonden

Name des Primers	Sequenz (5'-3')
tipA-Sonde-F	TGTTCTACCGGGAGCTGGGCTTC
tipA-Sonde-R	CGACTGCGGGTACGAGATGCACA
aac(3)IV-Sonde-F	GGCCACTTGGACTGATCGAG
aac(3)IV-Sonde-R	CAGAAGGAAGGTCCAGTCGG

## 5.7 Bakterienstämme

### *Escherichia coli*

Stamm	Beschreibung
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )
<i>E. coli</i> BW25113	acI <sup>q</sup> rrnB <sub>T14</sub> ΔlacZ <sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD <sub>AH33</sub> ΔrhaBAD <sub>LD78</sub>
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ-
<i>E. coli</i> ET12567	F <sup>-</sup> dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR zjj202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtl1 glnV44

### *Streptomyces coelicolor*

Stamm	Beschreibung
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Wildtyp (FSU, AG Kothe)

## 5.8 Thiopeptide und Derivate

Bezeichnung	Quelle
Thiostrepton	Calbiochem
Thiostrepton-Derivate	Dr. Veselin Nasufovic', unpubliziert
Nosiheptid	Isolat (M. Sc. Thomas Winkler)
Nosiheptid-Derivate	M. Sc. Thomas Winkler, unpubliziert
Micrococцин P1	Spende, Labor Prof. Kazuo Shin-Ya, AIST, Tokio, Japan
Radamycin	Spende, Labor Prof. Ramon I. Santamaría, CSIC/USAL, Spanien



### 5.8.1 Lagerung und Konzentrationsbestimmung von Thiopeptiden

Alle verwendeten Thiopeptide und Thiopeptid-Derivate wurden für die langfristige Lagerung entweder lösungsmittelfrei oder in 100 %igen TFE gelöst und bei -20 °C gelagert. Bei schwach wasserlöslichen Substanzen wurde stattdessen zur Lagerung 100 %iges DMSO verwendet.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm am UV-Spektrometer (BioPhotometer plus 6131, Eppendorf):

$$\text{Lambert – Beer: } c = \frac{E}{d \cdot \epsilon}$$

$c$ : Konzentration;  $E$ : Extinktion;  $d$ : Küvettendicke;  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient.

Thiostrepton und Derivate:  $\epsilon_{280} = 0.027 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol/L}^{-1}$ ;

Nosiheptid und Derivate:  $\epsilon_{280} = 0.039 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol/L}^{-1}$ ;

Micrococcin P1:  $\epsilon_{280} = 0.034 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol/L}^{-1}$ .<sup>[186]</sup>

## 5.9 Molekularbiologische Methoden

### 5.9.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Für molekularbiologische Arbeiten wurden zunächst alle verwendeten Bakterienstämme unter sterilen Bedingungen im Flüssigmedium kultiviert. Dabei unterschieden sich die Anzuchtbedingungen zwischen *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) Stämmen grundlegend.

***Escherichia coli*:** Für die Flüssigkultur (3-200 mL) wurde LB-Komplexmedium (Carl Roth) mit einer vereinzelt Kolonie oder einer 1/100 Verdünnung einer bestehenden Glycerinkultur versetzt (Kapitel 5.9.15). Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika dem Medium zugesetzt und die Mischung über Nacht im Orbital-Schüttler (MaxQ 436 HP, Thermo Scientific) bei 37 °C und 200 rpm inkubiert (Kapitel 5.3.4).

***Streptomyces coelicolor***: Für die Flüssigkultur (30 mL) wurde TSB-Komplexmedium (Carl Roth) verwendet und mit  $10^6$ - $10^8$  Sporen/mL versetzt. Jeder Kultur wurde das Antibiotikum Nalidixinsäure beigelegt, sowie zur Selektion gegebenenfalls weitere Antibiotika (Kapitel 5.3.4). Die Inkubationszeit betrug 72 h bei 28 °C und 200 rpm im Orbital-Schüttler (MaxQ 436 HP, Thermo Scientific).

### 5.9.2 Isolation von genomischer DNA aus *Streptomyces*

Genomische DNA wurde mit einer modifizierten Variation des „*Salting out procedure*“ Protokolls isoliert.<sup>[187]</sup> Die Zellen einer angesetzten Flüssigkultur wurden dazu in einem konischen 50 mL Zentrifugenröhrchen pelletiert (Eppendorf, 1100 rpm, 10 min, RT) und das Pellet in frisch vorbereiteten 5 mL SET-Puffer resuspendiert. 1 mg/mL Lysozym (VWR) und 20 µg/mL RNase A (Applichem) wurden zugegeben und die Mischung bei 37 °C, 30-60 min lang inkubiert (Kapitel 5.9.1). Nach Zugabe von 0.5 mg/mL Proteinase K (Carl-Roth) und 1 %igen [w/v] SDS wurde für weitere 2 h bei 55 °C inkubiert. Nach dem Zellaufschluss wurden 2 mL einer 5 mol/L NaCl-Lösung zugegeben und durch Umdrehen des Gefäßes gemischt. Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte durch die Zugabe von 0.6 Vol. 100 %igen Chloroform und ständigem Wenden des Gefäßes (Stuart Rotator SB3, 30 rpm) für 30 min. Nach Zentrifugation (Eppendorf, 6500 rpm, 15 min, RT) wurde die wässrige Phase in ein neues 50 mL Zentrifugalröhrchen überführt, mit 0.6 Vol. 100 %igen Isopropanol versetzt und für 3 min durch Gefäßwenden gemischt. Die ausgefallene genomische DNA wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen, in 5 mL 70 %igen [v/v] Ethanol überführt und durch Zentrifugation sedimentiert (Eppendorf, 6500 rpm, 15 min, RT). Der DNA-Niederschlag wurde vom Überstand getrennt, luftgetrocknet und in 1-2 mL TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### **SET-Puffer**

4.4 g NaCl

50 mL 0.5 mol/L EDTA Dinatriumsalz Dihydrat pH 8.0

20 mL 1 mol/L TRIS-Puffer pH 7.5

in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**TE-Puffer**

12.1 g TRIS

3.7 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat pH 8.0

in 1 L ddH<sub>2</sub>O

dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

**5.9.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Escherichia coli**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe des „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Scientific). Je nach Plasmidkopienzahl wurden 3-5 mL Flüssigkultur verwendet (Kapitel 5.9.1). Um die Plasmidausbeute zu maximieren wurde die adsorbierte DNA von der Kieselgelsäule zwei Mal mit je 25 µL Elutionspuffer eluiert. Alle weiteren Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

**5.9.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde am BioPhotometer plus 6131 (Eppendorf) durchgeführt. Sie beruhte auf der Messung des Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Extinktionskoeffizienten von 50 für doppelsträngige DNA.

**5.9.5 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese**

Als Medium der gelelektrophoretischen Auftrennung diente ein erkaltetes 1 %iges Agarosegel (VWR) in 1 x TAE-Laufpuffer, versehen mit dem Interkalationsfarbstoff Midori Green Advance (Nippongenetics) in einem Verhältnis von 1:1000. Die isolierten DNA Proben wurden mit DNA-Gelladepuffer (Thermo Scientific) versetzt. Die elektrophoretische Größenauftrennung erfolgte im PerfectBlue™ Gelsystem (Peqlab), bei einer Feldstärke von 10 V/cm in 1 x TAE-Laufpuffer. Durch die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes in die DNA wurde diese mittels UV-Licht bei 312 nm im BioDOC Analyze digital Basis-Set (Analytik Jena) visualisiert. Als Größenstandard diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific).

**1x TAE-Laufpuffer**

4.8 g TRIS

1.2 mL Essigsäure

0.4 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat

in 1 L ddH<sub>2</sub>O**5.9.6 Standard-/Gradienten-/Kolonie-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Die gezielte *in vitro* Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts wurde mit thermostabilen DNA-Polymerasen (Thermo Scientific) durchgeführt. Ein Ansatz bestand aus einem Gesamtvolumen von 25 µL und folgenden Komponenten:

**Tabelle 5.1** Reaktionsansatz einer Standard-/ Kolonie-PCR.

Reagens (Stammkonzentration)	Volumen	Endkonzentration
DNA-Templat	x	100 ng
10 x DreamTaq Puffer	2.5 µL	1 x
DMSO	1.25 µL	5 %
dNTPS (je 2 mmol/L)	2.5 µL	je 200 µmol/L
forward Primer (10 µmol/L)	0.5 µL	0.2 µmol/L
reverse Primer (10 µmol/L)	0.5 µL	0.2 µmol/L
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0.25 µL	1.25 U
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µL auffüllen	

Zur Klärung einer erfolgreichen Transformation/Exkonjugation wurde eine Kolonie-PCR mit positiven Transformanten/Exkonjuganten durchgeführt (Kapitel 5.9.13, Kapitel 5.9.16). Dafür wurde statt des DNA-Templates eine vereinzelte Bakterienkolonie vom Selektionsmedium entnommen.

Die PCR wurde im FlexCycler<sup>2</sup>PCR Thermal Cycler (Analytik Jena) durchgeführt mit folgendem Programm:

**Tabelle 5.2** Programmabfolge einer Standard-/Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	3 -10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 20-35
Anlagerung	$T_m-5$ °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/ $\leq$ 2 kbp	
Finale Elongation	72 °C	15 min	1

Die Anlagerungstemperatur wurde an das verwendete Primerpaar und deren Schmelztemperatur ( $T_m$ ) angepasst. Die Schmelztemperatur wurde mit dem Programm „Clone Manager 9“ berechnet. Die Elongationszeit von Amplifikationsprodukten bis zu 2 kbp betrug 1 min. Für größere Produkte wurde die Zeit pro 1 kbp auf eine 1 min erhöht. Im Fall der Gradienten-PCR wurden verschiedene Anlagerungstemperaturen zwischen 50 °C und 70 °C verwendet

Für die Kolonie-PCR wurde die initiale Denaturierung für 10 min durchgeführt. Zur Größenkontrolle wurden 5 µL des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 5.9.5).

### 5.9.7 Hydrolytische Spaltung von DNA

Für Klonierungsarbeiten und Restriktionsanalysen wurde ein DNA-Templat mittels Restriktionsendonukleasen Typ II spezifisch gespalten. Alle verwendeten Enzyme wurden von Thermo Scientific als „FastDigest“-Version bezogen. Die Spaltung wurde nach Herstellerangaben wie folgt auf Eis angesetzt:

**Tabelle 5.3** Reaktionsansatz einer spezifischen hydrolytischen Spaltung von DNA.

Reagens	Volumen	Endkonzentration
DNA-Templat	x	0.5 µg-20 µg
10 x FastDigest Puffer	2 µL	1 x
FastDigest Restriktionsenzym (20 U/µL)	1 µL	1 U
optional: Alkaline Phosphatase (1 U/µL)	1 µL	1 U
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µL auffüllen	

Das eingesetzte DNA-Volumen überstieg nicht 50 % des Gesamtvolumens. Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C, 5-15 min lang im Wasserbad (VWB 18, VWR) inkubiert.

Optional wurde eine Dephosphorylierung des 5'-Phosphat-Endes des verwendeten Klonierungsvektors mit einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase (Thermo Scientific) durchgeführt. Die so erzeugten charakteristischen DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert (Kapitel 5.9.5).

### 5.9.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur weiteren Klonierung wurden die entstandenen DNA-Fragmente auf einem 1 %igen niedrigschmelzenden Agarosegel (Carl Roth) elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 5.9.5, Kapitel 5.9.7). Die entsprechenden DNA-Stränge wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mittels dem „GeneJET Gel Extraction Kit“ (Thermo Scientific) extrahiert. Zur Größenkontrolle wurden die Nukleinsäuren gelelektrophoretisch ausgewertet und die Konzentration bestimmt (Kapitel 5.9.4).

### 5.9.9 Ausfällung von DNA mit Natriumacetat

Die Ausfällung von DNA erfolgte durch die Zugabe von 0.1 Vol. einer 3 mol/L Natriumacetat-Lösung und 0.7 Vol. 100 %igen Isopropanols. Nach einer Inkubation von 2 h bei -20 °C wurde die DNA sedimentiert (Eppendorf, 12000 rpm, 30 min, 4 °C). Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µL eiskaltem 70 %igen [v/v] Ethanol und erneute Zentrifugation (Eppendorf, 12000 rpm, 30 min, 4 °C). Der DNA-Niederschlag wurde vom Überstand getrennt, an der Luft getrocknet, in 50 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Nukleinsäure-Konzentration bestimmt und die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 5.9.4, Kapitel 5.9.5).

### 5.9.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung eines rekombinanten Plasmids wurde ein hydrolytisch gespaltenes Trägerplasmid (Vektor) mit einem hydrolytisch gespaltenen PCR-Produkt (Insert) mittels einer T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) kovalent verknüpft (Kapitel 5.9.7, Kapitel 5.9.8). Dafür wurde ein Reaktionsansatz nach Herstellerangaben angesetzt:

**Tabelle 5.4** Herstellung eines rekombinanten Plasmids mittels kovalenter Ligation.

Reagens	Volumen	Endkonzentration
Vektor	x	20-100 ng
Insert	x	5:1 molares Verhältnis
10 x T4 DNA-Ligase Puffer	2 µL	1 x
optional: 50 % PEG 4000	2 µL	5 %
T4 DNA Ligase (5 U/µL)	0.2 µL	1 U
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µL auffüllen	

Die Menge des einzusetzenden Inserts [ng] ergab sich durch folgende Formel:

$$\frac{m(\text{Insert}) \times \text{Länge}(\text{Insert})}{\text{Länge}(\text{Vektor})} \times 5$$

Bei Restriktionsendonukleasen, die „blunt-end“ Fragmente erzeugten, wurden 2 µL PEG 4000 zugegeben. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Zugabe des Inserts. Nach 1 h Inkubationszeit bei RT wurde der Reaktionsansatz mittels „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Scientific) gereinigt, in 20 µL Elutionspuffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.9.11 Herstellung von chemisch-kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Für die Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen wurde eine 3 mL LB-Flüssigkultur angesetzt und über Nacht inkubiert (Kapitel 5.9.1). Am darauffolgenden Tag wurde 1 mL der Vorkultur verwendet, um 50 mL LB-Flüssigmedium steril anzuimpfen.

Diese wuchs bei 37 °C und ständigem schütteln (200 rpm) für 3-4 h bis eine optische Dichte von 0.5-0.8 bei 600 nm (BioPhotometer plus 6131, Eppendorf) erreicht war. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen sedimentiert (Eppendorf, 5000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit eiskalten 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (5 mL) gewaschen. Die Sedimentierung der Zellen wurde wiederholt (Eppendorf, 5000 rpm, 10 min, 4 °C), ebenso die Aufnahme des Pellets in eiskaltem 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (20 mL). Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (Eppendorf, 5000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in eiskalten 50 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (2 mL) aufgenommen und 15 min lang auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µL 86 %igen [v/v] Glycerin wurden die kompetenten Zellen in 100 µL Aliquote geteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit und von etwaigen Kontaminationen wurde ein Aliquot auf verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert, über Nacht bei 37 °C im Inkubator vermehrt und ausgewertet.

#### 5.9.12 Herstellung von elektro-kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Es wurde 100 mL LB-Flüssigmedium mit einer *E. coli* Einzelkolonie angesetzt und über Nacht kultiviert (Kapitel 5.9.1). Daraufhin wurden 100 mL SOB-Flüssigmedium mit 1 mL der Vorkultur steril versetzt und bei 37 °C und ständigem schütteln (200 rpm) inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0.6 bei 600 nm (BioPhotometer plus 6131, Eppendorf) wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen sedimentiert (Eppendorf, 4000 rpm, 5 min, 4 °C), der Überstand verworfen und in 100 mL eiskalten 10 %igen [v/v] Glycerin resuspendiert. Die Sedimentierung (Eppendorf, 4000 rpm, 5 min, 4 °C) und das Waschen der Zellen wurde mit 50 mL eiskalten 10 %igen [v/v] Glycerin wiederholt. Nach Zentrifugation (Eppendorf, 4000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 1 mL eiskaltem 10 %igen [v/v] Glycerin resuspendiert, in 50 µL Aliquote geteilt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit und von etwaigen Kontaminationen wurde ein Aliquot auf verschiedenen Selektionsmedien ausplattiert, über Nacht bei 37 °C im Inkubator vermehrt und ausgewertet.



**SOB-Medium**

20 g Trypton

5 g Hefeextract

0.6 g NaCl

0.2 g KCl

in 1 L ddH<sub>2</sub>O dampfsterilisiert (121°C, 20 min),danach Zugabe von 10 mL sterilen 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O und 10 mL sterilen 1 mol/LMgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O**5.9.13 Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen**

Die Einbringung von Fremd-DNA wurde je nach Bakterienstamm mittels zweier unterschiedlicher Methoden in kompetente *E. coli* Zellen durchgeführt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

**Hitzeimpuls:** Die chemisch-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 100 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µL rekombinantes Plasmid (Kapitel 5.9.10, Kapitel 5.9.11) hinzugefügt. Nach vorsichtigen wendeln des Gefäßes wurde die Zellsuspension auf Eis für 30 min inkubiert. Nach einem 1-minütigen Hitzeimpuls bei 42 °C (Dri-block heater DB-2D, Techne) wurden die Zellen 2 min lang auf Eis abgekühlt. Für die Zellregeneration wurden 500 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOB-Flüssigmedium mit 20 mmol/L Glukose hinzugegeben und die Zellsuspension bei 37 °C, unter schütteln (200 rpm) für 45 min inkubiert. Danach wurden jeweils 200 µL des Transformationsansatzes auf LB-Festmedium ohne bzw. mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

**Elektroimpuls:** Die elektro-kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. 2 µL rekombinantes Plasmids (Kapitel 5.9.10, Kapitel 5.9.12) versetzt. Nach leichtem Mischen wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (Biozym) überführt und einem elektrischen Impuls (Eppendorf Eporator®, 2.5 kV, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Schnellstmöglich wurden 1 mL auf 37 °C vorgewärmtes SOB medium mit 20 mmol/L Glukose zugegeben. Die Zellen wurden in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß transferiert und bei 37 °C, 200 rpm für 1 h (MaxQ 436 HP, Thermo

Scientific) inkubiert. Nach der Regeneration wurden jeweils 200 µL Suspension auf LB-Festmedium mit oder ohne Antibiotika als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

Es wurden mehrere Kontrollen durchgeführt. Sie dienten dazu, sowohl die Lebensfähigkeit der Zellen nach der Transformation zu überprüfen, als auch um etwaige Kontaminationen auszuschließen. Ein Ligationsansatz ohne Insert diente als Negativkontrolle (Kapitel 5.9.10). Die durchgeführten Transformationen im Überblick:

**Tabelle 5.5** Überblick der durchgeführten Transformationen pro Ansatz.

<i>E. coli</i> Zellsuspension	LB-Festmedium	Hintergrund
ohne DNA Zugabe	ohne selektierenden Antibiotikum	Positivkontrolle
ohne DNA Zugabe	mit selektierenden Antibiotikum	Kontaminationskontrolle
Ligationsansatz ohne Insert	mit selektierenden Antibiotikum	Negativkontrolle
rekombinantes Plasmid	mit selektierenden Antibiotikum	Transformationsansatz
pUC19 Plasmid-DNA	mit 100 µg/mL Ampicillin	Transformationseffizienz

Die Transformationseffizienz wurde durch einbringen von 100 ng pUC19 Plasmid-DNA am darauffolgenden Tag mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien [cfu]} \times \text{Gesamtvolumen } [\mu\text{L}]}{\text{ausplattiertes Volumen } [\mu\text{L}] \times \text{Verduennung} \times \text{DNA } [\mu\text{g}]} = \text{Effizienz } \left[ \frac{\text{cfu}}{\mu\text{g}} \text{ DNA} \right]$$

#### 5.9.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics Germany GmbH nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.*<sup>[188]</sup> Die zu analysierende DNA wurde in einer Konzentration von 50-100 ng/µL in einem Endvolumen von 15 µL eingeschickt. Passende Sequenzierprimer wurden zur firmeninternen Synthese angegeben. Die Auswertung der DNA-Sequenz wurde mit dem Programm Jalview als multiples Sequenzalignment durchgeführt.<sup>[189]</sup>

### 5.9.15 Herstellung einer Glycerinkultur

Zur langfristigen Lagerung eines generierten GVOs wurden 3 mL LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika und einer bakteriellen Einzelkolonie beimpft (Kapitel 5.9.1). Nach der Inkubation über Nacht, wurden 750 µL der Kultur mit 750 µL sterilem 44%igen [v/v] Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

### 5.9.16 Konjugation von *Escherichia coli* Plasmid-DNA

Für die Einbringung von Fremd-DNA in *Streptomyces* wurde die Konjugation nach dem Protokoll von Flett *et al.* durchgeführt.<sup>[153]</sup> In den Donor-Stamm *E. coli* ET12567/pUZ8002 wurde das zu übertragende rekombinante Plasmid eingebracht (Kapitel 5.9.13), und mittels Restriktionsanalyse sowie auch Sequenzierung validiert (Kapitel 5.9.7, Kapitel 5.9.14). Für die Konjugation wurde unter sterilen Bedingungen eine 10 mL Vorkultur des Donor-Stammes in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C und schütteln bei 200 rpm kultiviert (Kapitel 5.9.1). Eine 1/9 Verdünnung der Vorkultur wurde verwendet, um eine 10 mL Hauptkultur anzupflanzen. Diese wuchs bei 37 °C und schütteln bei 200 rpm bis nach 4-5 h eine optische Dichte von 0.4-0.6 bei 600 nm erreicht war. Die Zellen wurden sedimentiert (Eppendorf, 6000 rpm, 3 min, 4 °C) und in 10 mL LB-Flüssigmedium resuspendiert. Die Pelletierung der Zellen und das Waschen wurde wiederholt (Eppendorf, 6000 rpm, 3 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 0.1 Vol. LB-Flüssigmedium aufgenommen. Zeitgleich wurden  $10^6$ - $10^8$  Sporen/mL des „Responder“ *Streptomyces* Stammes in 500 µL 2xYT-Flüssigmedium bei 50 °C, 10 min lang (Dri-block heater DB-2D, Techne) inkubiert und auf Eis gekühlt. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils 500 µL des Donor- und Empfängerstammes in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß zusammengegeben, kurz invertiert und sedimentiert (Eppendorf MiniSpin®). Der Großteil des Überstandes wurde verworfen und das Zellpellet resuspendiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$ - $10^{-4}$  mit 2xYT-Flüssigmedium pipettiert und je 100 µL davon auf MS-Festmedium mit 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 16-20 h bei 28 °C wurden die Kultivierungsplatten mit 0.5 mg Nalidixinsäure und 1 mg eines selektiven Antibiotikum überzogen. Potenzielle Exkonjugante wurden nach mehreren Tagen Inkubation bei 28 °C auf 2xYT-Festmedium vereinzelt.

**2xYT-Medium**

16 g Trypton  
 10 g Hefeextract  
 5 g NaCl  
 20 g bakteriologischer Agar-Agar  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

**MS-Medium**

10 g Manitol  
 10 g Sojamehl  
 10 g bakteriologischer Agar-Agar  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert(121 °C, 21 min),  
 danach Zugabe von 10 mL sterilen  
 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

**5.9.17 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde**

Die Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde wurde mit einem modifizierten PCR-Ansatz auf Eis durchgeführt. Bei der Amplifizierung wurde neben dTTP, Digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience) in einem Verhältnis von 65 % zu 35 % zugegeben. Als Negativkontrolle diente eine Standard PCR ohne die Zugabe von Digoxigenin-11-dUTP (Kapitel 5.9.6).

**Tabelle 5.6** PCR-Ansatz zur Herstellung einer DIG-markierten DNA-Sonde.

Reagens	Volumen	Endkonzentration
DNA-Templat	x	1 µg
10 x DreamTaq Puffer	5 µL	1 x
DMSO	2.5 µL	5 %
dATP, dCTP, dGTP (je 2 mmol/L)	5 µL	je 200 µmol/L
dTTP (2 mmol/L)	3.2 µL	130 µmol/L
DIG-11-dUTP (1 mmol/L)	3.5 µL	70 µmol/L
forward Primer (10 µmol/L)	1 µL	0.2 µmol/L
reverse Primer (10 µmol/L)	1 µL	0.2 µmol/L
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0.5 µL	2.5 U
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µL auffüllen	

Der Reaktionsansatz wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 20-35
Anlagerung	$T_m - 5$ °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/≤ 2 kbp	
Finale Elongation	72 °C	15 min	1

Die Anlagerungstemperatur wurde individuell an das verwendete Primerpaar und deren Schmelztemperatur ( $T_m$ ) angepasst, sowie die Elongationszeit an das spezifische Amplifikationsprodukt. Zur Größenkontrolle wurden 5  $\mu$ L des PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit dem „GeneJET PCR Purification Kit“ (Thermo Scientific) aufgereinigt, die Nukleinsäurekonzentration bestimmt und bei -20 °C gelagert (Kapitel 5.9.4, Kapitel 5.9.5).

### 5.9.18 Southern- und Dot-Blot

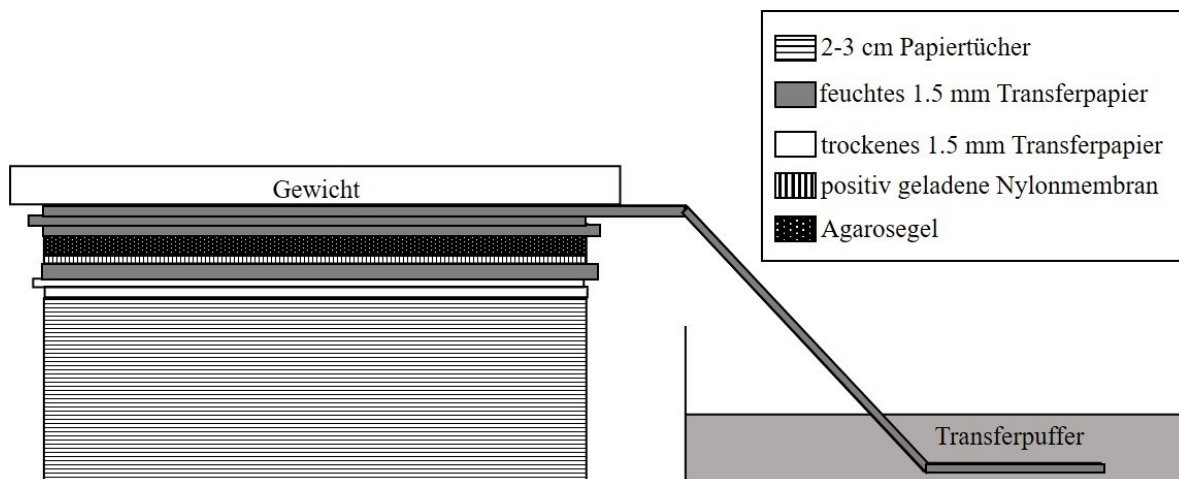
Das tatsächliche Einbringen und die Kopieanzahl von Fremd-DNA in einem Genom wurde mittels Southern Blot überprüft.<sup>[190]</sup> Dafür wurde ein spezifischer Abschnitt der integrierten DNA amplifiziert und mit DIG markiert (5.9.17).

**Vorbereitung der genomischen DNA:** Die zu untersuchende genomische DNA wurde mit spezifischen Restriktionsendonukleasen hydrolytisch gespalten, zur Größenkontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt und konzentriert (Kapitel 5.9.5, Kapitel 5.9.7, Kapitel 5.9.9). Nach erneuter Resuspendierung in ddH<sub>2</sub>O wurde für die weitere Bearbeitung die Nukleinsäurekonzentration bestimmt (Kapitel 5.9.4).

**Auftrennung und absteigender Kapillar-Blot:** Die aufgearbeitete genomische DNA wurde auf einem 10 x10 cm großen 1 %igen Agarosegel (VWR) gelelektrophoretisch mit einer Feldstärke von 10 V/cm für 75 min aufgetrennt (Kapitel 5.9.5). Optional wurde das Gel danach 5 min lang in einem Ethidiumbromidbad (0.25-0.5  $\mu$ g/mL) inkubiert und unter UV-

Licht bei 312 nm analysiert (BioDOC Analyse digital Basis-Set, Analytik Jena). Als Größenstandard diente der „GeneRuler 1 kbp DNA Ladder“ (Thermo Scientific). Anschließend wurde das Agarosegel für 20 min in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt.

Für die Vorbereitung des Nukleinsäuretransfers wurden alle notwendigen Materialien auf die Größe des Agarosegels zugeschnitten. Das Gel wurde für 20 min unter leichtem Schwenken auf einem Orbitalschüttler (IKA KS 125 basic) in Transferpuffer inkubiert, sowie vier von sechs der zugeschnittenen 1.5 mm dicken Transferpapiere (Carl Roth). Die positiv geladene Nylon-Transfermembran (Carl-Roth) wurde in ddH<sub>2</sub>O für 5 min lang äquilibriert. Der absteigende Kapillarblot wurde aufgebaut (**Abbildung 5.1**), entstandene Luftbläschen mit einem sauberen Glasstab entfernt und die Apparatur mit einem geringen Gewicht (ca. 20 g) beschwert.



**Abbildung 5.1** Apparaturaufbau eines absteigenden Kapillarblots.

Der Transfer erfolgte für  $\geq 2$  h. Danach wurde die Membran mit 2 x SSC-Puffer gespült und entweder weiter behandelt oder an der Luft getrocknet und bei 4 °C gelagert. Zur Kontrolle wurde das Agarosegel erneut im Ethidiumbromidbad inkubiert und mit UV-Licht visualisiert.

**Transferpuffer**

16 g NaOH  
in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**20 x SSC-Puffer**

175.3 g NaCl  
88.2 g tri-Natriumcitrat Dihydrat  
in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
pH 7.0 mit HCl  
dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

**Hybridisierung:** Der Hybridisierungspuffer wurde auf die, nach dem „*DIG Application Manual for Filter Hybridisation*“ (Roche) kalkulierte Hybridisierungstemperatur ( $T_{Hyb}$ ) der DNA-Sonde aufgeheizt und in einem Volumen von 10 mL/100 cm<sup>2</sup> zur Membran gegeben.

$$T_m = 16.6 \log[Mol Na^+] + 0.41(G + C\%) + 81.5$$

$$T_{Hyb} = [T_m - 0.72 \text{ } ^\circ\text{C}(50\%)] - 25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Mol Na<sup>+</sup>: molare Konzentration von Natrium im Hybridisierungspuffer;  
(G+C%): prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin in der DNA-Sonde

Nach 30 min Inkubation wurde der Hybridisierungspuffer erneuert. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde bei 100 °C für 10 min denaturiert und in einer Konzentration von 5-25 µg/mL zum Puffer gegeben (Kapitel 5.9.17). Die Anlagerung der DNA-Sonde an den komplementären DNA-Abschnitt erfolgte für 6-12 h lang bei leichten Schwenken auf dem Orbitalschüttler (IKA KS 125 basic).

Für die Entfernung nicht gebundener Sonde wurde die Membran zwei Mal in niederstringentem Puffer bei RT jeweils 5 min lang gewaschen und danach zwei Mal mit 68 °C heißen hochstringentem Puffer jeweils 15 min lang. Die Membran wurde entweder weiterbearbeitet oder an der Luft getrocknet und bei 4 °C gelagert.

<b>Hybridisierungspuffer</b>	<b>niederstringenter Puffer</b>	<b>hochstringenter Puffer</b>
70 g SDS	100 mL 20 x SSC- Puffer	5 mL 20 x SSC- Puffer
500 mL Formamid deionisiert	1 g SDS	1 g SDS
250 mL 20 x SSC-Puffer	in 1 L ddH <sub>2</sub> O	in 1 L ddH <sub>2</sub> O
1 g <i>N</i> -Lauroylsarcosin		
50 mL 1 mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0		
in 1 L ddH <sub>2</sub> O		

**Signaldetektion:** Zur Detektion der gebundenen DIG-markierten DNA-Sonde wurde die positiv geladene Nylonmembran (Carl Roth) in 1 x Waschpuffer 2 min lang und danach in Blockierungspuffer 30 min lang bei RT und leichtem Schütteln auf dem Orbitalschüttler inkubiert (IKA KS 125 basic). Die Blockierungslösung wurde erneuert und mit dem Anti-DIG-Antikörper (Roche) in einer Verdünnung von 1:10<sup>4</sup> versehen. Nach weiteren 30 min bei RT wurde die Membran zwei Mal jeweils 15 min lang in 1 x Waschpuffer gespült und 3 min lang in 1 x Detektionspuffer equilibriert. Die Detektion erfolgte in 1 x Detektionspuffer mit der Zugabe von 0.66 mg/mL NBT und BCIP (Promega) als Substrate der konjugierten Alkalischen Phosphatase des Anti-DIG-Antikörpers. Nach maximal 1 h Inkubation ohne Lichtzufuhr wurde die Membran in 1 x TE-Puffer gewaschen, luftgetrocknet und photographisch dokumentiert.

**10 x Maleinsäure- Puffer**

116 g Maleinsäure  
 87.7 g NaCl  
 pH 7.5 mit HCl  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert  
 (121 °C, 20 min)

**1 x Waschpuffer**

100 mL 10 x Maleinsäure-Puffer  
 3 mL Tween 20  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**Blockierungs-Puffer**

100 mL 10 x Maleinsäure-  
 Puffer  
 50 g Milchpulver  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**10 x Detektions-Puffer**

121.1 g TRIS  
 87.7 g NaCl  
 2 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
 pH 9.0  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert  
 (121 °C, 20 min)

**10 x TE-Puffer**

12.1 g TRIS  
 3.7 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat  
 pH 8.0 mit HCl  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert  
 (121 °C, 20 min)



**Dot-Blot:** Zur Konzentrationsbestimmung der DIG-markierten DNA-Sonde wurde eine vereinfachte Form des Southern-Blots durchgeführt. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 1 ng/μL in 1 x TE-Puffer bei 100 °C für 10 min reversibel denaturiert (Dri-block heater DB-2D, Techne). Mit 1 x TE-Puffer wurde folgende Verdünnungsreihe angefertigt:

**Tabelle 5.7** Verdünnungsreihe der DIG-markierten DNA-Sonde in Dot-Blot-Puffer.

Verdünnung	Sonden Volumen	Verdünnungs- ansatz	Puffer Volumen	Verdünnung	Endkonzentration
D1	50 μL	-	-	-	1 ng/μL
D2	2 μL	D1	198 μL	1:100	10 pg/μL
D3	15 μL	D2	35 μL	1:330	3 pg/μL
D4	5 μL	D2	45 μL	1:1000	1 pg/μL
D5	5 μL	D3	45 μL	1:3300	0.3 pg/μL
D6	5 μL	D4	45 μL	1:10 <sup>4</sup>	0.1 pg/μL
D7	5 μL	D5	45 μL	1:33000	0.03 pg/μL
D8	5 μL	D6	45 μL	1:10 <sup>5</sup>	0.01 pg/μL
D9	-	-	50 μL		0

Auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Carl Roth) wurden maximal 30 μL pro Verdünnung pipettiert und luftgetrocknet. Nach der Adsorption wurden die Nukleinsäuren bei 120 °C 30 min lang an die Membran fixiert und in 2 x SSC-Puffer 5 min lang bei RT gespült. Die Hybridisierung mit dem Anti-DIG-Antikörper und die Signaldetektion wurde nach Standardprotokoll durchgeführt.

## 5.10 Proteinbiochemische Methoden

### 5.10.1 Aufschluss und Isolierung eines bakteriellen Zelllysats

Es wurde eine bakterielle Zellkultur sedimentiert (Eppendorf, 5000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet in 0.5 g/mL eiskalten Lysispuffer resuspendiert (Kapitel 5.9.1). Die Zellen wurden mit einem Sonopuls HD 2070 Ultrasonichomogenizer (Bandelin) mit Mikrospritze (ø 3 mm) 7 x 30 s mit 90 % Intensität auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation (11000 rpm, 30 min,

4 °C) wurden Zelltrümmer und unlöslichen Proteinbestandteile vom Zelllysat getrennt. Der Überstand wurde bei - 80 °C gelagert.

### **Lysispuffer**

2.4 g TRIS

2.3 g NaCl

pH 7.6

in 1 L ddH<sub>2</sub>O

dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

## **5.10.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Proteinquantifizierung eines Zellextrakts wurde angelehnt an der Methode von Bradford *et al.* durchgeführt.<sup>[191]</sup> Es wurden 50 µL der zu vermessenden Probe mit 200 µL 1 x ROTI<sup>®</sup> Nanoquant Lösung (Carl-Roth) versetzt. Nach einer 5 min langen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 590 nm und 450 nm im Plattenleser Infinite M200 Pro (Tecan) bestimmt und der Quotient  $A_{590\text{ nm}}/A_{450\text{ nm}}$  berechnet. Die Proteinkonzentration (mg/mL) wurde durch den Vergleich mit einer Rinderserumalbumin-Eichgerade bestimmt.

## **5.10.3 SDS-PAGE nach Laemmli<sup>[192]</sup>**

Für die diskontinuierliche Elektrophorese von Proteinen wurden die Proben 1:1 mit einem 2 x SDS-Ladepuffer versehen und 10 min lang bei 100 °C irreversibel denaturiert (Dri-block heater DB-2D, Techne) (Kapitel 5.10.1). Die Größenauftrennung erfolgte in einem 5 %igen Sammelgel, gefolgt von einem 15 %igen Trenngel bei einer Stromstärke von 25 mA/Gel, 1 h lang im PerfectBlue<sup>™</sup> Vertikalen Doppel-Gelsystem (Peqlab) mit 1 x Laufpuffer. Als Größenstandard diente der „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific).

**2 x SDS-Ladepuffer**

12.1 g TRIS pH 6.8  
 40 g SDS  
 2 g Bromphenolblau  
 200 mL Glycerin  
 15.6 ml 2-Mercaptoethanol  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**10 x Laufpuffer**

30.3 g TRIS  
 144.1 g Glycin  
 10 g SDS  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**5 %iges Sammelgel**

166.7 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)  
 83.3 mL 1.5 mol/L TRIS-Puffer pH 8.8  
 10 mL 10% [w/v] SDS  
 10 mL 10 % [v/v] Ammoniumpersulfat  
 1 mL TEMED  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**15 %iges Trenngel**

0.5 L 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)  
 375 mL 1 mol/L TRIS-Puffer pH 6.8  
 10 mL 10% [w/v] SDS  
 10 mL 10 % [v/v] Ammoniumpersulfat  
 0.4 mL TEMED  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**5.10.4 Anfärbung von Proteinen**

**Coomassie-Brilliantblau-Färbung:** Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einer Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung erhitzt und 20 min lang unter leichten schütteln auf dem Orbitalschüttler (IKA KS 125 basic) inkubiert (Kapitel 5.10.3). Die Färbelösung wurde zur Wiederverwendung dekantiert und durch Entfärberlösung ersetzt. Das Gel wurde so lange unter Hitze entfärbt bis deutlich klare Proteinbanden zur photographischen Dokumentation erkennbar waren.

**Färbelösung**

2 g Coomassie-Brilliantblau  
 100 mL Essigsäure  
 400 mL Methanol  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**Entfärberlösung**

50 mL Essigsäure  
 75 mL Methanol  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**Ponceau S-Färbung:** Für die reversible Anfärbung von Proteinen auf einer Transfermembran wurden diese in eine Ponceau S-Lösung gegeben und 10 min lang inkubiert (Kapitel 5.10.5). Zur Entfärbung wurde die Membran in ddH<sub>2</sub>O gespült, bis klare Proteinbanden sichtbar waren und photographisch dokumentiert werden konnten.

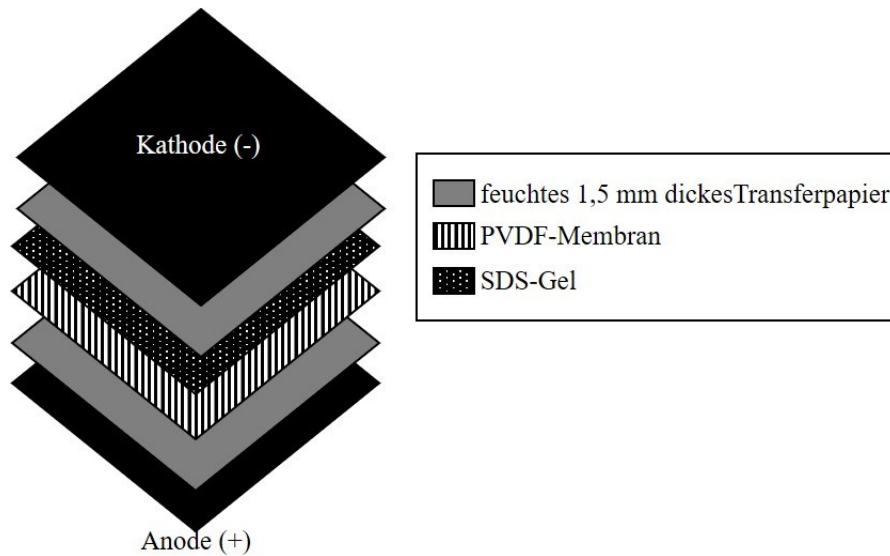
#### **Ponceau S-Lösung**

1 g Ponceau S  
50 mL Essigsäure  
in 1 L ddH<sub>2</sub>O

### 5.10.5 Western-Blot

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen in einem Zelllysat wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Trägermembran transferiert (Kapitel 5.10.1, Kapitel 5.10.3).

**Semi-Dry-Elektroblot:** Die Übertragung der Proteine erfolgte unter Anlegung einer elektrischen Spannung im halbtrockenen Blotverfahren (Semi-Dry-Elektroblot). Das 1.5 mm dicke Transferpapier (Carl Roth) und die Transfermembran ROTI<sup>®</sup> PVDF-Membran (Carl Roth) wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Die Membran wurde in 100 %igen Methanol 20 s lang aktiviert und darauffolgend in ddH<sub>2</sub>O 2 min lang inkubiert. Sowohl Transferpapier als auch Membran wurden im Towbin-Transferpuffer für mindestens 5 min äquilibriert. Die Apparatur wurde aufgebaut und zwischen den einzelnen Schichten entstandene Luftbläschen mit einem sauberen Glasstab entfernt (**Abbildung 5.2**). Der Transfer wurde bei konstanten 10 V, 60-90 min lang im PerfectBlue<sup>™</sup>Semi-Dry Elektroblotter (Peqlab) durchgeführt. Als Transferkontrolle wurden sowohl das Gel als auch die Membran angefärbt, letztere wurde entweder bei 4 °C gelagert oder weiterverwendet (Kapitel 5.10.4).



**Abbildung 5.2** Apparaturaufbau eines Semi-Dry-Blots.

### Towbin-Puffer

3 g TRIS

14.4 g Glycin

200 mL Methanol

pH 8.3

in 1 L ddH<sub>2</sub>O

**Immundetektion:** Die Membran wurde zwei Mal in 1 x PBST-Puffer jeweils 5 min lang auf dem Orbitalschüttler (IKA KS 125 basic) leicht geschwenkt. Zur Reduktion von unspezifischen Signalen wurde die Transfermembran in Blockierungslösung 1 h lang inkubiert und wiederholt zwei Mal in 1 x PBST-Puffer jeweils 5 min lang gespült. Die Inkubation mit dem primären  $\alpha$ -His<sub>6</sub> monoklonaler Maus IgG Antikörper erfolgte in Antikörperpuffer 1 h lang (Kapitel 5.5). Danach wurde die Membran drei Mal in 1 x PBST 10 min lang gewaschen, um nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Für den Nachweis von gebundenem primärem Antikörper wurde die Membran mit sekundärem Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat-Antikörper in Antikörperpuffer versetzt (Kapitel 5.5). Nach 1 h wurden nicht gebundene sekundäre Antikörper von der Transfermembran mit drei Waschschritten in 1 x PBST 10 min lang gespült. Die Detektion des Substratumsatzes der konjugierten Meerrettichperoxidase erfolgte mit dem „*Opti-4CN*™

Goat Anti-Mouse Detection Kit“ (BioRad) nach Herstellerangaben für 5-30 min. Nach der direkten irreversiblen Farbreaktion auf der Membran wurde diese 15 min lang in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, luftgetrocknet und photographisch dokumentiert.

<b>1 x PBST-Puffer</b>	<b>Blockierungslösung</b>	<b>Antikörperpuffer</b>
1 Tablette Roti®fair PBS 7.4	10 g Milchpulver	10 g BSA
1 mL Tween 20	in 1 L 1 x PBST-Puffer	in 1 L 1 x PBST-Puffer
in 1 L ddH <sub>2</sub> O		

## 5.11 Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Thermo Scientific™ Biologische Sicherheitswerkbank Safe 2020), um Kontaminationen auszuschließen.

### 5.11.1 Herstellung einer *Streptomyces*-Glycerinkultur

Die verwendeten *Streptomyces*-Stämme wurden, entweder als Mycel oder Glycerinkultur, auf MS-Festmedium mit einem Wattestäbchen ausgestrichen und bei 28°C im Inkubator für mindestens sieben Tage kultiviert. Gebildete Sporen wurden mit 5 mL ddH<sub>2</sub>O bedeckt und mit einem Wattestäbchen (Boettger) abgelöst. Die Sporensuspension wurde in eine 20 mL Spritze (Braun), gefüllt mit Wolle, überführt und in ein 50 mL konisches Zentrifugenröhrchen filtriert. Nach Zentrifugation (Eppendorf, 7000 rpm 5 min, RT), wurde das Sporenpellet in 20 %igem [v/v] Glycerin aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **MS-Medium**

10 g Manitol  
 10 g Sojamehl  
 10 g bakteriologischer Agar-Agar  
 in 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

### 5.11.2 Konzentrationsbestimmung einer *Streptomyces* Glycerinkultur

Zur Bestimmung der Anzahl der keimfähigen *Streptomyces*-Sporen wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  mit ddH<sub>2</sub>O angefertigt und jeweils 100 µL Sporensuspension als Triplikate auf 2xYT-Festmedium ausplattiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 28°C im Inkubator wurden die Einzelkolonien ausgezählt und anhand des Mittelwertes der Triplikate die Sporenkonzentration/mL bestimmt.

$$\text{Sporenkonzentration/mL} = \text{Mittelwert} \times 10 \times \text{Verduennungsfaktor}$$

#### **2xYT-Medium**

16 g Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

20 g bakteriologischer Agar-Agar

in 1 L ddH<sub>2</sub>O

dampfsterilisiert (121 °C, 20 min)

### 5.11.3 Bestimmung des bakteriellen Wachstums von *Streptomyces*

Zur Charakterisierung von genetisch veränderten *Streptomyces*-Stämmen wurde das bakterielle Wachstum mit dem des Wildtypstammes verglichen. Hierfür wurde eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte (Braun) mit einem Gesamtvolumen von 150 µL TSB-Flüssigmedium (Carl Roth) verwendet. Das Medium wurde mit einer Sporenkonzentration von  $10^6$ - $10^8$  Sporen/mL und einer effektiven Konzentration von selektivem Antibiotika versetzt (Kapitel 5.3.4). Für die Inkubation mit Thiopeptiden wurde die Löslichkeit der hydrophoben Verbindungen durch Zugabe des nichtionischen Detergens Pluronic®F-127 (Sigma-Aldrich) in DMSO mit einer Endkonzentration von 0.3 % [w/v] verbessert. Die verwendeten Thiopeptide wurden ebenfalls in DMSO gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nmol/L-50 nmol/L) dazugegeben, wobei die Gesamtkonzentration von 2 % DMSO im Endvolumen von 150 µl nicht überstiegen wurde. Jede Konzentration wurde als technisches Triplikat angesetzt. Zur Reduktion von Kreuzkontaminationen innerhalb der Platte, Verdunstungsschutz und verbesserten Sauerstofftransfer, wurde die Mikrotiterplatte

in die Duetz-System Halterung (Kuhner) eingebunden, bei 28 °C und 200 rpm im Orbital-Schüttler für 72 h inkubiert. Die optische Dichte wurde alle 2-4 h bei 600 nm mit dem Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (TECAN) als Mehrfachmessung pro Well (3x3) bestimmt und der Mittelwert der technischen Triplikate gebildet.

#### 5.11.4 Bestimmung der MIC (minimal inhibierende Konzentration)

Der MIC-Wert eines Antibiotikums gegen einen *Streptomyces*-Stamm gibt die niedrigste antibiotische Konzentration an, bei der augenscheinlich kein Bakterienwachstum mehr erfolgt.

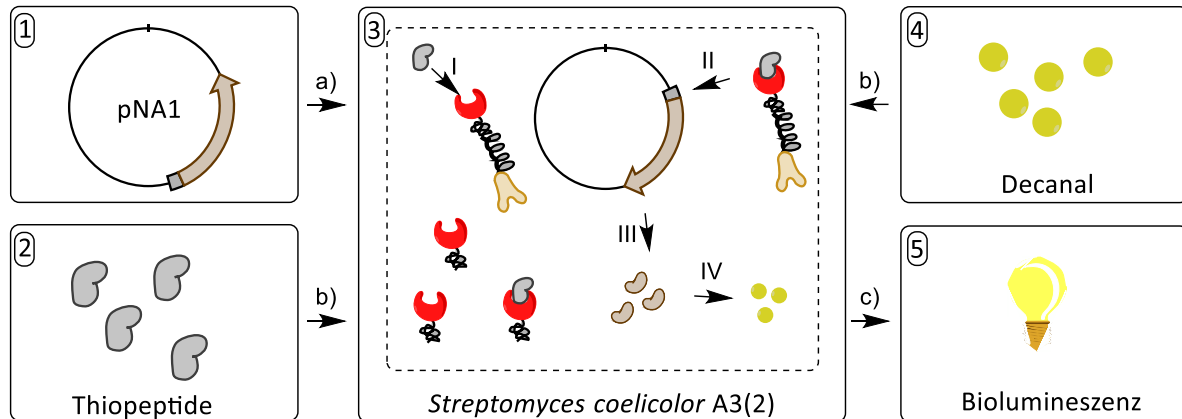
In 24-Well-Mikrotiterplatten (Carl-Roth) wurden jeweils 1.5 mL 60 °C warmes TSB-Festmedium (Carl Roth) vorgelegt. Die in DMSO gelösten Thiopeptide wurden in einer Konzentration von 0-10 µmol/L zugefügt, wobei die maximale DMSO-Konzentration 5 % nicht überstieg. Nach dem Erkalten des Agar-Agar-Nährmedium wurden 10<sup>8</sup> Sporen/mL/Well des *Streptomyces*-Stammes ausplattiert und bei 30 °C für 72 h im Inkubator kultiviert. Die Auswertung erfolgte in zwei biologischen Replikaten aus jeweils drei technischen Replikaten.

#### 5.11.5 Bestimmung der MINC (minimal induzierende Konzentration)

Die Aktivierungsfähigkeit von Thiopeptiden am *tipA*-Promotor wurde mit einem Luciferase-Reporterstamm in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten (Braun) charakterisiert (**Schema 5.1**). Dafür wurde das von Ali *et al* erhaltene Plasmid pNA1 in *S. coelicolor* A3(2) transferiert (Kapitel 5.9.16).<sup>[147]</sup> Dieses enthielt die Luciferase-Gene von *V. fischeri* unter der Kontrolle des nativen *tipA*-Promotors. Das Reaktionsvolumen von 150 µL TSB-Flüssigmedium (Carl Roth) enthielt 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> Sporen/mL, 0.3 % [w/v] des nichtionischen Detergens Pluronic®F-127 (Sigma-Aldrich), eine Gesamtkonzentration von 2 % DMSO und 0-1 µmol/L Thiopeptid. Die Platten wurden in die Duetz-System Halterung (Kuhner) eingebunden und bei 160 rpm, 30 °C für 27 h im Orbital-Schüttler (MaxQ 436 HP, Thermo Scientific) kultiviert. Nach der Zugabe von 1 µL Decanal (Sigma-Aldrich) je Well und Inkubation für 2 min wurde die entstehende Biolumineszenz mit dem Plattenleser Infinite M200 Pro (Tecan) detektiert. Alle Messungen wurden mit zwei biologischen Replikaten und jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Thiostrepton bzw. Nosiheptid dienten als



Positivkontrolle und als interner Standard. Die niedrigste Thiopeptid-Konzentration mit noch nachweisbarer TipA-Induktion wurde als MINC-Wert angenommen.



**Schema 5.1** Schematische Darstellung des Luciferase-Assays. (1) Das Plasmid pNA1 wurde in *S. coelicolor* A3(2) inseriert. (2) Der *S. coelicolor* A3(2) Stamm wurde mit Thiopeptiden kultiviert. (3) Bindung der Thiopeptide an die TipA Proteine (I) mit folgender Bindung an den *tipA*-Promotors im Plasmid pNA1 (II). Expression des Luciferase-Gens von *V. fischeri* (III). Umsetzung des zugegebenen Substrats Decanal durch die Luciferase (4, IV) (5) Detektion des entstandenen Biolumineszenzsignal. a) Transformation, b) Inkubation, c) Detektion

## 5.12 Bioinformatische Methoden

### 5.12.1 Identifizierung homologer *tipA* Gene

Die kodierenden Gensequenzen des TipAL Proteins von *S. coelicolor* A3(2) wurden aus der Gen-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) entnommen (Inventarnummer: AL939116.1:153964-154725). Mit dieser Suchsequenz wurden in der Datenbank „Nucleotide collection (nr/nt)“ eine spezifische BLAST-Suche durchgeführt. Als Organismus wurde die Domäne der Bakterien gewählt, mit und ohne *Streptomyces*. Die Sequenzen mit mehr als 60 % Sequenzähnlichkeit und dem geringsten E-Wert wurden als kodierende Sequenzen extrahiert und in einem Datensatz zusammengefasst.

### 5.12.2 Sequenzalignment

Der erstellte Nukleotid-Datensatz wurde in Programm Jalview eingelesen.<sup>[189]</sup> Dieses dienten als Basis für drei mögliche Methoden der multiplen Sequenzalignments ClustalW, Muscle

und, MAFFT (Kapitel 5.12.1).<sup>[146],[193],[194]</sup> Sequenzen, die zu kurz waren oder zu große Unterschiede zu den anderen Sequenzen aufwiesen, wurden aus dem Datensatz gelöscht.

## 6 Referenzen

- [1] A. Fleming, *Bull. W. H. O.* **2001**, *79*, 780-790.
- [2] S. J. Baker, D. J. Payne, R. Rappuoli, E. De Gregorio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2018**, *115*, 12887-12895.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html> **2013**.
- [4] D. Barcudi, E. J. Sosa, R. Lamberghini, A. Garnero, D. Tosoroni, L. Decca, L. Gonzalez, M. A. Kuyuk, T. Lopez, I. Herrero, P. Cortes, M. Figueroa, A. L. Egea, P. Ggetti, D. A. Fernandez Do Porto, A. Study Group of *S. aureus* in Cordoba, A. Corso, A. G. Turjanski, J. L. Bocco, C. Sola, *J. Infect.* **2020**, *80*, 24-37.
- [5] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089-1093.
- [6] J. Berdy, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 1-26.
- [7] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714.
- [8] M. J. LaMarche, J. A. Leeds, A. Amaral, J. T. Brewer, S. M. Bushell, G. Deng, J. M. Dewhurst, J. Ding, J. Dzink-Fox, G. Gamber, A. Jain, K. Lee, L. Lee, T. Lister, D. McKenney, S. Mullin, C. Osborne, D. Palestrant, M. A. Patane, E. M. Rann, M. Sachdeva, J. Shao, S. Tiamfook, A. Trzasko, L. Whitehead, A. Yifru, D. Yu, W. Yan, Q. Zhu, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2376-2387.
- [9] S. Li, X. Hu, L. Li, H. Liu, L. Yu, X. You, B. Jiang, L. Wu, *J. Antibiot.* **2019**, *72*, 106-110.
- [10] O. Schneider, N. Simic, F. L. Aachmann, C. Ruckert, K. A. Kristiansen, J. Kalinowski, Y. Jiang, L. Wang, C. L. Jiang, R. Lale, S. B. Zotchev, *Front Microbiol.* **2018**, *9*, 3139.
- [11] D. C. K. Chan, L. L. Burrows, *J. Antibiot.* **2021**, *74*, 161-175.
- [12] A. A. Vinogradov, H. Suga, *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 1032-1051.
- [13] J. Berdy, *Adv. Appl. Microbiol.* **1974**, *18*, 309-406.
- [14] T. L. Su, *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473-481.
- [15] J. Li, X. Qu, X. He, L. Duan, G. Wu, D. Bi, Z. Deng, W. Liu, H. Y. Ou, *PLoS One* **2012**, *7*, e45878.
- [16] B. J. Burkhart, C. J. Schwalen, G. Mann, J. H. Naismith, D. A. Mitchell, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 5389-5456.
- [17] X. Q. Shen, M. Mustafa, Y. Y. Chen, Y. Y. Cao, J. T. Gao, *Med. Chem. Res.* **2019**, *28*, 1063-1098.
- [18] M. C. Carnio, T. Stachelhaus, K. P. Francis, S. Scherer, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6390-6401.
- [19] C. J. Schwalen, G. A. Hudson, B. Kille, D. A. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9494-9501.
- [20] N. Miyairi, T. Miyoshi, H. Aoki, M. Kosaka, H. Ikushima, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 113-119.
- [21] X. Just-Baringo, F. Albericio, M. Alvarez, *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 317-351.
- [22] M. S. Puar, T. M. Chan, V. Hegde, M. Patel, P. Bartner, K. J. Ng, B. N. Pramanik, R. D. MacFarlane, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 221-224.
- [23] C. Pascard, A. Ducruix, J. Lunel, T. Prange, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6418-6423.

- [24] K. Engelhardt, K. F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjaervik, G. Klinkenberg, H. Sletta, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4969-4976.
- [25] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2549-2553.
- [26] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141-147.
- [27] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327-4334.
- [28] P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, P. D. Cotter, D. J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P. C. Dorrestein, K. D. Entian, M. A. Fischbach, J. S. Garavelli, U. Goransson, C. W. Gruber, D. H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A. R. Horswill, M. Jaspars, W. L. Kelly, J. P. Klinman, O. P. Kuipers, A. J. Link, W. Liu, M. A. Marahiel, D. A. Mitchell, G. N. Moll, B. S. Moore, R. Muller, S. K. Nair, I. F. Nes, G. E. Norris, B. M. Olivera, H. Onaka, M. L. Patchett, J. Piel, M. J. Reaney, S. Rebuffat, R. P. Ross, H. G. Sahl, E. W. Schmidt, M. E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Sussmuth, J. R. Tagg, G. L. Tang, A. W. Truman, J. C. Vederas, C. T. Walsh, J. D. Walton, S. C. Wenzel, J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108-160.
- [29] H. D. Arndt, S. Schoof, J. Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6770-6773.
- [30] C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153-164.
- [31] C. T. Walsh, M. G. Acker, A. A. Bowers, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27525-27531.
- [32] Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 855-864.
- [33] Y. Ding, Y. Yu, H. Pan, H. Guo, Y. Li, W. Liu, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1180-1185.
- [34] K. Engelhardt, K. F. Degnes, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 7093-7101.
- [35] J. Wang, Y. Yu, K. Tang, W. Liu, X. He, X. Huang, Z. Deng, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2335-2344.
- [36] T. S. Young, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13053-13058.
- [37] F. Zhang, W. L. Kelly, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 998-1009.
- [38] J. W. Bogart, N. J. Kramer, A. Turlik, R. M. Bleich, D. S. Catlin, F. C. Schroeder, S. K. Nair, R. T. Williamson, K. N. Houk, A. A. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 13170-13179.
- [39] D. P. Cogan, G. A. Hudson, Z. G. Zhang, T. V. Pogorelov, W. A. van der Donk, D. A. Mitchell, S. K. Nair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12928-12933.
- [40] Z. Lin, J. Ji, S. Zhou, F. Zhang, J. Wu, Y. Guo, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12105-12108.
- [41] L. Duan, S. Wang, R. Liao, W. Liu, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 443-448.
- [42] S. Pierre, A. Guillot, A. Benjdia, C. Sandstrom, P. Langella, O. Berteau, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 957-959.
- [43] N. D. Priestley, T. M. Smith, P. R. Shipley, H. G. Floss, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1135-1147.
- [44] Q. Zheng, S. Wang, P. Duan, R. Liao, D. Chen, W. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 14318-14323.
- [45] R. Liao, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2852-2855.
- [46] B. Wang, J. W. LaMattina, S. L. Marshall, S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5788-5797.

- [47] X. Ji, Y. Li, W. Ding, Q. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9021-9024.
- [48] W. Ding, W. Ji, Y. Wu, R. Wu, W. Q. Liu, T. Mo, J. Zhao, X. Ma, W. Zhang, P. Xu, Z. Deng, B. Tang, Y. Yu, Q. Zhang, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 437.
- [49] W. Ding, Y. Li, J. Zhao, X. Ji, T. Mo, H. Qianzhu, T. Tu, Z. Deng, Y. Yu, F. Chen, Q. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3857-3861.
- [50] W. Ding, Y. Wu, X. Ji, H. Qianzhu, F. Chen, Z. Deng, Y. Yu, Q. Zhang, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5235-5238.
- [51] J. W. LaMattina, B. Wang, E. D. Badding, L. K. Gadsby, T. L. Grove, S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17438-17445.
- [52] Y. Qiu, Y. Du, S. Wang, S. Zhou, Y. Guo, W. Liu, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1502-1505.
- [53] P. Amara, J. M. Mouesca, M. Bella, L. Martin, C. Saragaglia, S. Gambarelli, Y. Nicolet, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16661-16668.
- [54] E. D. Badding, T. L. Grove, L. K. Gadsby, J. W. LaMattina, A. K. Boal, S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5896-5905.
- [55] Y. Wang, S. Liu, P. Yao, Y. Yu, Y. Zhang, W. Lan, C. Wang, J. Ding, W. Liu, C. Cao, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct Biol. Commun.* **2015**, *71*, 1033-1037.
- [56] Y. Yu, H. Guo, Q. Zhang, L. Duan, Y. Ding, R. Liao, C. Lei, B. Shen, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16324-16326.
- [57] X. Wu, L. Jin, H. Zhang, R. Tong, M. Ma, Y. Chen, *FASEB J.* **2018**, *32*, 453-465.
- [58] M. H. Kim, Y. J. Kong, H. Baek, H. H. Hyun, *J. Food. Prot.* **2005**, *68*, 157-163.
- [59] F. Benazet, M. Cartier, J. Florent, C. Godard, G. Jung, J. Lunel, D. Mancy, C. Pascal, J. Renault, P. Tarridec, J. Theilleux, R. Tissier, M. Dubost, L. Ninet, *Experientia* **1980**, *36*, 414-416.
- [60] M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. DenBleyker, L. F. Discotto, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697-3701.
- [61] Y. S. Polikanov, N. A. Aleksashin, B. Beckert, D. N. Wilson, *Front. Mol. Biosci.* **2018**, *5*, 48.
- [62] N. Naaktgeboren, K. Roobol, J. Gubbens, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *70*, 39-47.
- [63] E. Cundliffe, J. Thompson, *J. Gen. Microbiol.* **1981**, *126*, 185-192.
- [64] J. Thompson, E. Cundliffe, M. J. Stark, *J. Gen. Microbiol.* **1982**, *128*, 875-884.
- [65] G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778.
- [66] W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943.
- [67] J. H. Highland, L. Lin, J. W. Bodley, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4404-4409.
- [68] J. W. Bodley, L. Lin, J. H. Highland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *41*, 1406-1411.
- [69] N. Clementi, N. Polacek, *RNA Biol.* **2010**, *7*, 521-527.
- [70] J. D. Walter, M. Hunter, M. Cobb, G. Traeger, P. C. Spiegel, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 360-370.
- [71] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.
- [72] A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6846-6857.
- [73] C. Maracci, M. V. Rodnina, *Biopolymers* **2016**, *105*, 463-475.
- [74] P. H. Anborgh, A. Parmeggiani, *EMBO J.* **1991**, *10*, 779-784.
- [75] S. E. Heffron, F. Journak, *Biochemistry* **2000**, *39*, 37-45.

- [76] S. Hayashi, T. Ozaki, S. Asamizu, H. Ikeda, S. Omura, N. Oku, Y. Igarashi, H. Tomoda, H. Onaka, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 679-688.
- [77] M. Kongsema, S. Wongkhieo, M. Khongkow, E. W. Lam, P. Boonnoy, W. Vongsangnak, J. Wong-Ekkabut, *Oncol. Rep.* **2019**, *42*, 953-962.
- [78] N. S. Hegde, D. A. Sanders, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 725-731.
- [79] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. D. Arndt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3317-3321.
- [80] Q. Zheng, Q. Wang, S. Wang, J. Wu, Q. Gao, W. Liu, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1002-1007.
- [81] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS One* **2009**, *4*, e6593.
- [82] B. Pandit, U. G. Bhat, A. L. Gartel, *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 43-47.
- [83] M. N. Aminake, S. Schoof, L. Sologub, M. Leubner, M. Kirschner, H. D. Arndt, G. Pradel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1338-1348.
- [84] C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181-191.
- [85] G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2046-2049.
- [86] M. R. M. Ranieri, D. C. K. Chan, L. N. Yaeger, M. Rudolph, S. Karabelas-Pittman, H. Abdo, J. Chee, H. Harvey, U. Nguyen, L. L. Burrows, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*.
- [87] D. C. K. Chan, L. L. Burrows, *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 2029-2039.
- [88] G. Degiacomi, Y. Personne, G. Mondesert, X. Ge, C. S. Mandava, R. C. Hartkoorn, F. Boldrin, P. Goel, K. Peisker, A. Benjak, M. B. Barrio, M. Ventura, A. C. Brown, V. Leblanc, A. Bauer, S. Sanyal, S. T. Cole, S. Lagrange, T. Parish, R. Manganeli, *Tuberculosis* **2016**, *100*, 95-101.
- [89] M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, H. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 590-596.
- [90] M. Aoki, T. Ohtsuka, M. Yamada, Y. Ohba, H. Yoshizaki, H. Yasuno, T. Sano, J. Watanabe, K. Yokose, H. Seto, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 582-588.
- [91] M. Hashimoto, T. Murakami, K. Funahashi, T. Tokunaga, K. Nihei, T. Okuno, T. Kimura, H. Naoki, H. Himeno, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8259-8270.
- [92] N. Mizuhara, M. Kuroda, A. Ogita, T. Tanaka, Y. Usuki, K. Fujita, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5300-5310.
- [93] M. S. Donia, P. Cimermancic, C. J. Schulze, L. C. W. Brown, J. Martin, M. Mitreva, J. Clardy, R. G. Linington, M. A. Fischbach, *Cell* **2014**, *158*, 1402-1414.
- [94] G. J. M. Christensen, C. F. P. Scholz, J. Enghild, H. Rohde, M. Kilian, A. Thürmer, E. Brzuszkiewicz, H. B. Lomholt, H. Brüggemann, *BMC Genomics* **2016**, *17*, 152.
- [95] J. Claesen, J. B. Spagnolo, S. F. Ramos, K. L. Kurita, A. L. Byrd, A. A. Aksenov, A. V. Melnik, W. R. Wong, S. Wang, R. D. Hernandez, M. S. Donia, P. C. Dorrestein, H. H. Kong, J. A. Segre, R. G. Linington, M. A. Fischbach, K. P. Lemon, *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*.
- [96] P. T. Chang, K. Rao, L. O. Longo, E. S. Lawton, G. Scherer, E. B. Van Arnem, *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 725-729.
- [97] N. M. Haste, W. Thienphrapa, D. N. Tran, S. Loesgen, P. Sun, S. J. Nam, P. R. Jensen, W. Fenical, G. Sakoulas, V. Nizet, M. E. Hensler, *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 593-598.
- [98] P. Lassalas, C. Berini, J. E. Y. Rouchet, J. Hedouin, F. Marsais, C. Schneider, C. Baudequin, C. Hoarau, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 526-530.

- [99] D. M. Citron, K. L. Tyrrell, C. V. Merriam, E. J. Goldstein, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2493-2503.
- [100] K. Mullane, C. Lee, A. Bressler, M. Buitrago, K. Weiss, K. Dabovic, J. Praestgaard, J. A. Leeds, J. Blais, P. Pertel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1435-1440.
- [101] S. G. Bhansali, K. Mullane, L. S. Ting, J. A. Leeds, K. Dabovic, J. Praestgaard, P. Pertel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1441-1445.
- [102] Kasumov A., Novartis Exits Antibiotics Research, cut 140 jobs in Bay Area. *Bloomberg*; **2018**.
- [103] A. Fabbretti, C. G. He, E. Gaspari, S. Maffioli, L. Brandi, R. Spurio, M. Sosio, D. Jabes, S. Donadio, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2015**, *59*, 4560-4568.
- [104] NAICONS Srl. Clinical efficacy and safety of NAI-Acne gel 3% applied twice-a-day to patients with facial acne vulgaris, *European Medicines Agency: EU Clinical Trials Register: Slovakia* **2020**.
- [105] Cassiopea SPA. Interim report as of and for the three months ended March 21,2020. *Cassiopea SPA*; **2020**.
- [106] Fougera Pharmaceuticals Inc. (for Dechra), ANIMAX<sup>®</sup> Ointment (nystatin-neomycin sulfate-thiostrepton-triamcinolone acetonide) safety data sheet. *Fougera Pharmaceuticals Inc; United States* **2015**.
- [107] G. Moulin, P. Cavalié, I. Pellanne, A. Chevance, A. Laval, Y. Millemann, P. Colin, C. Chauvin, *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 617-625.
- [108] F. Benazet, J. R. Cartier, *Poult. Sci.* **1980**, *59*, 1405-1415.
- [109] C. Pascal, C. Gaillard, M. O. Moreau, *J. AOAC Int.* **1979**, *62*, 976-981.
- [110] X. Song, J. Xie, Y. Su, A. Martin-Esteban, J. Qiu, X. Li, L. He, *J. Agric. Food. Chem.* **2019**, *67*, 10791-10799.
- [111] J. Castro Rodriguez, G. Gonzalez Holgado, R. I. Santamaria Sanchez, L. M. Canedo, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 391-395.
- [112] G. Gonzalez Holgado, J. Castro Rodriguez, L. M. Canedo Hernandez, M. Diaz, J. M. Fernandez-Abalos, I. Trujillano, R. I. Santamaria, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 383-390.
- [113] R. Bleich, J. D. Watrous, P. C. Dorrestein, A. A. Bowers, E. A. Shank, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2015**, *112*, 3086-3091.
- [114] T. Murakami, T. G. Holt, C. J. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459-1466.
- [115] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 510-514.
- [116] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 969-975.
- [117] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1541-1545.
- [118] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11659-11664.
- [119] D. J. Holmes, J. L. Caso, C. J. Thompson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3183-3191.
- [120] M. L. Chiu, P. H. Viollier, T. Katoh, J. J. Ramsden, C. J. Thompson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12950-12958.
- [121] S. Karlin, S. F. Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1990**, *87*, 2264-2268.
- [122] S. Karlin, S. F. Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, *90*, 5873-5877.
- [123] N. N. Baranova, A. Danchin, A. A. Neyfakh, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1549-1559.
- [124] P. S. Rava, L. Somma, H. M. Steinman, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6152-6159.
- [125] H. Tettelin, K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey,

- I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, C. M. Fraser, *Science* **2001**, *293*, 498-506.
- [126] A. Sikandar, K. Cirnski, G. Testolin, C. Volz, M. Brönstrup, O. V. Kalinina, R. Muller, J. Koehnke, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16641-16649.
- [127] L. Rostock, R. Driller, S. Grätz, D. Kerwat, L. von Eckardstein, D. Petras, M. Kunert, C. Alings, F. J. Schmitt, T. Friedrich, M. C. Wahl, B. Loll, A. Mainz, R. D. Süssmuth, *Nat Commun* **2018**, *9*, 3095.
- [128] M. Kumaraswami, K. J. Newberry, R. G. Brennan, *J.Mol.Biol* **2010**, *398*, 264-275.
- [129] M. L. Chiu, M. Folcher, P. Griffin, T. Holt, T. Klatt, C. J. Thompson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2332-2341.
- [130] M. G. Allan, *Dissertation* **2009**, University of basel.
- [131] A. O. Summers, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3097-3101.
- [132] A. Z. Ansari, M. L. Chael, T. V. O'Halloran, *Nature* **1992**, *355*, 87-89.
- [133] A. Z. Ansari, J. E. Bradner, T. V. O'Halloran, *Nature* **1995**, *374*, 371-375.
- [134] J. D. Kahmann, H. J. Sass, M. G. Allan, H. Seto, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1824-1834.
- [135] J. Habazettl, M. Allan, P. R. Jensen, H. J. Sass, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E5498-5507.
- [136] M. L. Chiu, M. Folcher, T. Katoh, A. M. Puglia, J. Vohradsky, B. S. Yun, H. Seto, C. J. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20578-20586.
- [137] C. L. Myers, J. Harris, J. C. Yeung, J. F. Honek, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 681-687.
- [138] E. E. Heldwein, R. G. Brennan, *Nature* **2001**, *409*, 378-382.
- [139] E. E. Zheleznova, P. N. Markham, A. A. Neyfakh, R. G. Brennan, *Cell* **1999**, *96*, 353-362.
- [140] K. J. Newberry, R. G. Brennan, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20356-20362.
- [141] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, J. L. Hobman, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 145-163.
- [142] B. S. Yun, T. Hidaka, T. Kuzuyama, H. Seto, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 375-378.
- [143] H. Wade, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 489-496.
- [144] E. Cundliffe, *Nature* **1978**, *272*, 792-795.
- [145] C. J. Thompson, R. H. Skinner, J. Thompson, J. M. Ward, D. A. Hopwood, E. Cundliffe, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 678-685.
- [146] J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673-4680.
- [147] N. Ali, P. R. Herron, M. C. Evans, P. J. Dyson, *Microbiology* **2002**, *148*, 381-390.
- [148] R. Donovan, J. F. Pagano, H. A. Stout, M. J. Weinstein, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 554-559.
- [149] B. Anderson, D. C. Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233-235.
- [150] K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, A. A. Estrada, S. H. Lee, M. Nevalainen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11176-11183.
- [151] K. P. Wojtas, M. Riedrich, J. Y. Lu, P. Winter, T. Winkler, S. Walter, H. D. Arndt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9772-9776.
- [152] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1541-1546.
- [153] F. Flett, V. Mersinias, C. P. Smith, *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *155*, 223-229.
- [154] L. Dong, N. Nakashima, N. Tamura, T. Tamura, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *237*, 35-40.
- [155] C. V. Kumar, J. F. Martin, *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *118*, 107-111.



- [156] R. G. Benedict, O. L. Shotwell, T. G. Pridham, L. A. Lindenfelser, W. C. Haynes, *Antibiot. Chemother.* **1954**, *4*, 653-656.
- [157] H. Huang, X. Wu, S. Yi, Z. Zhou, J. Zhu, Z. Fang, J. Yue, S. Bao, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2009**, *95*, 143-148.
- [158] J. M. Weber, R. Losick, *Gene* **1988**, *68*, 173-180.
- [159] H. Roh, G. C. Uguru, H. J. Ko, S. Kim, B. Y. Kim, M. Goodfellow, A. T. Bull, K. H. Kim, M. J. Bibb, I. G. Choi, J. E. Stach, *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 3391-3392.
- [160] M. E. Trujillo, R. Riesco, P. Benito, L. Carro, *Front Microbiol.* **2015**, *6*, 1341.
- [161] M. Punta, P. C. Coggill, R. Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournsnel, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy, A. Bateman, R. D. Finn, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D290-301.
- [162] M. J. Cron, D. G. Whitehead, I. R. Hooper, B. Heinemann, J. Lein, *Antibiot. Chemother.* **1956**, *6*, 63-67.
- [163] T. Endo, H. Yonehara, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 623-625.
- [164] G. Sharma, T. Narwani, S. Subramanian, *PLoS One* **2016**, *11*, e0148593.
- [165] F. Surup, K. Viehrig, K. I. Mohr, J. Herrmann, R. Jansen, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13588-13591.
- [166] S. Schieferdecker, S. König, C. Weigel, H. M. Dahse, O. Werz, M. Nett, *Chem.-Eur.J.* **2014**, *20*, 15933-15940.
- [167] J. J. Hug, J. Dastbaz, S. Adam, O. Revermann, J. Koehnke, D. Krug, R. Müller, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 2221-2231.
- [168] F. Panter, D. Krug, S. Baumann, R. Müller, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 4898-4908.
- [169] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [170] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.
- [171] J. W. George, S. Ghate, S. W. Matson, J. M. Besterman, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10683-10689.
- [172] R. Plater, J. A. Robinson, *Gene* **1992**, *112*, 117-122.
- [173] P. G. Guilfoile, C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8553-8557.
- [174] R. E. Monro, M. L. Celma, D. Vazquez, *Nature* **1969**, *222*, 356-358.
- [175] A. E. Herner, I. H. Goldberg, L. B. Cohen, *Biochemistry* **1969**, *8*, 1335-1344.
- [176] E. Selva, G. Beretta, N. Montanini, G. S. Saddler, L. Gastaldo, P. Ferrari, R. Lorenzetti, P. Landini, F. Ripamonti, B. P. Goldstein, et al., *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 693-701.
- [177] J. Kettenring, L. Colombo, P. Ferrari, P. Tavecchia, M. Nebuloni, K. Vekey, G. G. Gallo, E. Selva, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 702-715.
- [178] J. C. Bardwell, *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 199-205.
- [179] R. C. Fahey, A. R. Sundquist, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1991**, *64*, 1-53.
- [180] R. N. Perham, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8501-8512.
- [181] H. P. Hofs, T. D. Wagener, V. de Valk-Bakker, H. van Rennes, W. H. Doesburg, H. C. Ottenheijm, W. J. de Grip, *Anticancer Drugs* **1997**, *8*, 349-357.
- [182] G. Aubel-Sadron, D. Londos-Gagliardi, *Biochimie* **1984**, *66*, 333-352.
- [183] E. R. Bannister, D. E. Hunt, R. F. Pittillo, *Can. J. Microbiol.* **1966**, *12*, 595-604.
- [184] M. Bierman, R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, B. E. Schoner, *Gene* **1992**, *116*, 43-49.
- [185] M. S. Paget, L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, M. J. Buttner, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 204-211.

- [186] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245.
- [187] A. Pospiech, B. Neumann, *Trends Genet.* **1995**, *11*, 217-218.
- [188] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, *94*, 441-448.
- [189] M. Clamp, J. Cuff, S. M. Searle, G. J. Barton, *Bioinformatics* **2004**, *20*, 426-427.
- [190] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 503-517.
- [191] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [192] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [193] R. C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792-1797.
- [194] K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, T. Miyata, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3059-3066.

# 7 Anhang

**Tabelle 7.1** Überblick der 95 *tipA*-ähnlichen Gene.

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
<i>Blastococcus saxobsidens</i> DD2	(+)	72.3	FO117623.1:232227-232968
<i>Egibacter rhizosphaerae</i> strain EGI 80759	(+)	69.77	CP036402.1:2079550-2080287
<i>Frankia inefficax</i> strain EuI1c	(+)	67.5	CP002299.1:2981207-2981919
<i>Geodermatophilus obscurus</i> DSM 43160	(+)	72.92	CP001867.1:268748-269488
<i>Georgenia faecalis</i> strain ZLJ0423	(+)	68.77	CP033325.1:136771-137516
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247	(+)	67.39	CP001802.1:457741-458456
<i>Gordonia phthalatica</i> strain QH-11	(+)	67.76	CP011853.1:595953-596671
<i>Gordonia polyisoprenivorans</i> VH2	(+)	68.54	CP003119.1:5342099-5342816
<i>Gordonia terrae</i> strain RL-JC02	(+)	67.53	CP049836.1:5107459-5108180
<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054	(+)	72.7	AP010968.1:4189862-4190608
<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	(+)	74.76	CP002162.1:1081554-1082290
<i>Micromonospora auratinigra</i> strain DSM 44815	(+)	73.79	LT594323.1:6096853-6097586
<i>Micromonospora chokoriensis</i> strain DSM 45160	(+)	72.7	LT607409.1:198069-198805
<i>Micromonospora coriariae</i> strain DSM 44875	(+)	74.02	LT607412.1:1656030-1656766
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> strain DSM 43904	(+)	72.87	LT607750.1:5280358-5281094

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
<i>Micromonospora echinofusca</i> strain DSM 43913	(+)	77.13	LT607733.1:5259914-5260651
<i>Micromonospora echinospora</i> strain DSM 43816	(+)	71.7	LT607413.1:923509-924239
<i>Micromonospora inositola</i> strain DSM 43819	(+)	74.76	LT607754.1:777306-778042
<i>Micromonospora krabiensis</i> strain DSM 45344	(+)	72.63	LT598496.1:3588799-3589535
<i>Micromonospora narathiwatensis</i> strain DSM 45248	(+)	71.43	LT594324.1:6410524-6411260
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> strain DSM 43821	(+)	74.36	LT607410.1:6056187-6056923
<i>Micromonospora rifamycinica</i> strain DSM 44983	(+)	72.81	LT607752.1:3165926-3166662
<i>Micromonospora sagamiensis</i> JCM 3310	(+)	72.4	AP023438.1:4144486-4145216
<i>Micromonospora siamensis</i> strain DSM 45097	(+)	74.39	LT607751.1:1878666-1879406
<i>Micromonospora terminaliae</i> strain DSM 101760	(+)	73.21	CP045309.1:6613881-6614617
<i>Micromonospora tulbaghiaie</i> strain CNY-010	(+)	74.87	CP024087.1:4215446-4216182
<i>Micromonospora zamorensis</i> strain DSM 45600	(+)	72.04	LT607755.1:293127-293863
<i>Modestobacter marinus</i> str. BC501	(+)	71.43	FO203431.1:271713-272463
<i>Mycolicibacterium litorale</i> JCM 17423	(+)	67.57	AP022586.1:4723578-4724301
<i>Nakamurella multipartita</i> DSM 44233	(+)	70.15	CP001737.1:5224973-5225718
<i>Nakamurella panacisegetis</i> strain P4-7,KCTC 19426,CECT 7604	(+)	68.29	LT629710.1:833691-834439
<i>Nocardiosis dassonvillei</i> strain NCTC10488	(+)	69.55	LR134501.1:935197-935900
<i>Nocardiosis gilva</i> YIM 90087	(+)	68.59	CP022753.1:380212-380975
<i>Ornithinimicrobium flavum</i> strain CPEC 203535	(+)	67.16	CP038213.1:547149-547890

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
<i>Rhodococcus imtechensis</i> strain XM24D	(+)	68.65	CP051855.1:87320-88027
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	(+)	68.92	CP000431.1:3952311-3953020
<i>Rhodococcus opacus</i> B4	(+)	68.9	AP011115.1:3866371-3867087
<i>Rubrobacter radiotolerans</i> strain RSPS-4	(+)	68.53	CP007514.1:2841652-2842394
<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338	(+)	70.73	AM420293.1:8043502-8044238
<i>Saccharopolyspora pogona</i> strain NRRL30141	(+)	71.43	CP031142.1:6674596-6675338
<i>Saccharopolyspora spinosa</i> strain CCTCC M206084	(+)	72.1	CP061007.1:3298807-3299543
<i>Salinispora arenicola</i> CNS-205	(+)	69.58	CP000850.1:1092731-1093476
<i>Salinispora tropica</i> CNB-440	(+)	70.55	CP000667.1:1225700-1226440
<i>Serinicoccus hydrothermalis</i>	(+)	68.65	CP014989.1:1631276-1632016
<i>Serinicoccus marinus</i> DSM 15273	(+)	67.64	CP043808.1:404142-404883
<i>Serinicoccus profundus</i> strain CGMCC 4.5582	(+)	67.9	CP042862.1:510089-510826
<i>Streptomyces alboflavus</i> strain MDJK44	(+)	81.71	CP021748.1:5286026-5286773
<i>Streptomyces albogriseolus</i> strain LBX-2	(+)	89.24	CP042594.1:3867784-3868545
<i>Streptomyces albus</i> strain BK3-25	(+)	82.63	CP016825.1:3582590-3583337
<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	(+)	93.96	CP012382.1:4405414-4406175
<i>Streptomyces antibioticus</i> strain DSM 41481	(+)	80.94	CP050692.1:4804455-4805216
<i>Streptomyces antimycoticus</i> NBRC 100767	(+)	81.56	AP019620.1:5933014-5933765
<i>Streptomyces asterosporus</i> strain DSM 41452	(+)	93.44	CP022310.1:3985829-3986590
<i>Streptomyces aureovercillatus</i> strain HN6	(+)	80.98	CP048641.1:4143863-4144610

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
<i>Streptomyces autolyticus</i> strain CGMCC0516	(+)	81.03	CP019458.1:5383274-5384025
<i>Streptomyces cadmiisoli</i> strain ZFG47	(+)	81.71	CP030073.1:4250265-4251020
<i>Streptomyces chartreusis</i> strain ATCC 14922	(+)	81.97	CP023689.1:4437605-4438366
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	(+)	100	AL939116.1:153964-154725
<i>Streptomyces cyaneochromogenes</i> strain MK-45	(+)	90.44	CP034539.1:5724175-5724927
<i>Streptomyces cyaneogriseus</i> subsp. <i>noncyanogenus</i> strain NMWT 1	(+)	85.38	CP010849.1:3623350-3624107
<i>Streptomyces davawensis</i> strain JCM 4913	(+)	82.89	HE971709.1:4549570-4550324
<i>Streptomyces dengpaensis</i> strain XZHG99	(+)	82.28	CP026652.1:3900442-3901210
<i>Streptomyces ferrugineus</i> strain CCTCC AA2014009	(+)	88.85	CP063373.1:9501795-9502556
<i>Streptomyces fodineus</i> strain TW1S1	(+)	80.85	CP017248.1:4560687-4561454
<i>Streptomyces formicae</i> strain KY5	(+)	81.62	CP022685.1:5220158-5220906
<i>Streptomyces fungicidicus</i> strain TXX3120	(+)	81.66	CP023407.1:4251724-4252485
<i>Streptomyces glaucescens</i> strain GLA.O	(+)	82.36	CP009438.1:4277792-4278523
<i>Streptomyces hawaiiensis</i> strain ATCC 12236	(+)	81.88	CP021978.1:4885995-4886756
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> strain XM201	(+)	82.72	CP018627.1:6368695-6369446
<i>Streptomyces iranensis</i> genome assembly Siranensis	(+)	81.56	LK022848.1:6477388-6478139
<i>Streptomyces kanamyceticus</i> strain ATCC 12853	(+)	81.06	CP023699.1:4578010-4578761
<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> strain C34	(+)	85.66	LN831790.1:3853258-3854015
<i>Streptomyces lincolnensis</i> strain B48	(+)	81.71	CP046024.1:4378393-4379154

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
<i>Streptomyces lividans</i> (strain 66)	(+)	99.87	M24524.1:120-881
<i>Streptomyces malaysiensis</i> strain DSM 4137	(+)	81.19	CP029823.1:6090473-6091224
<i>Streptomyces nigra</i> strain 452	(+)	82.13	CP029043.1:4169647-4170402
<i>Streptomyces olivaceus</i> strain SCSIO T05	(+)	93.7	CP043317.1:3990318-3991079
<i>Streptomyces pactum</i> strain ACT12	(+)	96.06	CP019724.1:3995066-3995827
<i>Streptomyces parvulus</i> strain 2297	(+)	93.31	CP015866.1:3989776-3990537
<i>Streptomyces prasinus</i> strain ATCC 13879	(+)	83.15	CP023697.1:4395809-4396561
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> strain HCCB 10218	(+)	82.21	CP011340.1:4000119-4000870
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491	(+)	82.49	CP006567.1:6621797-6622548
<i>Streptomyces reticuli</i> genome assembly TUE45	(+)	81.88	LN997842.1:5528376-5529135
<i>Streptomyces solisilvae</i> strain HNM0141	(+)	81.03	CP065050.1:5436548-5437299
<i>Streptomyces tendae</i> strain 139	(+)	89.9	CP043959.1:374196-374957
<i>Streptomyces tuius</i> JCM 4255	(+)	80.36	AP023439.1:4192607-4193377
<i>Streptomyces venezuelae</i> strain ATCC 14585	(+)	81.43	CP029191.1:4485272-4486013 CP002994.1:10307769-
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113	(+)	82.38	10308520
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A strain ATCC 39115	(+)	86.47	CP023700.1:4666004-4666759
<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	(+)	68.92	CP001814.1:4958377-4959119
<i>Thermomonospora amylolytica</i> strain YIM 77502	(+)	72.85	CP032402.1:1523578-1524328
<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	(+)	71.83	CP001738.1:1383091-1383833

Spezies	Gram-Färbung	Sequenzhomologie [%]	Inventarnummer
Tomitella sp. HY188	(+)	68.36	CP041765.1:385920-386639
Tsukamurella paurometabola strain NCTC10741	(+)	67.49	LR131273.1:2479876-2480584
Verrucosispora maris AB-18-032	(+)	72.51	CP002638.1:1168759-1169495

**Tabelle 7.2** Zusammengetragene „Emitter“-Stämme aus der ThioFinder-Datenbank mit dazugehörigen synthetisierten Thiopeptid.

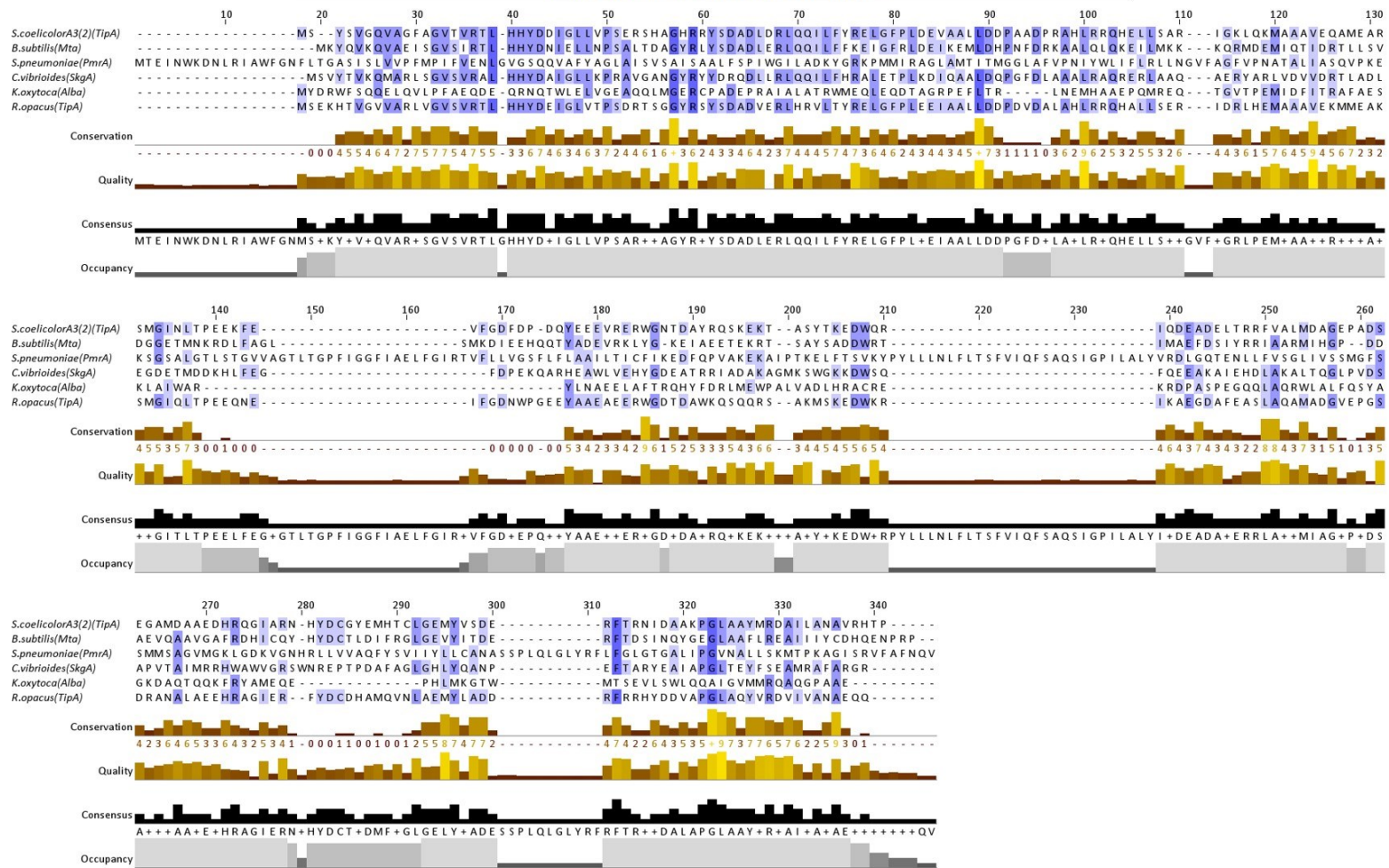
"Emitter"-Stämme	Thiopeptid
Amicolaptosis sp. ATCC 53771	Nocathiacin
Amicolaptosis sp. MI481-42F4	Amythiamicin
Amicolaptosis sp. MJ347-81F4	MJ347-81F4
Bacillus badius AR-91	Thiocillin II, III
Bacillus cereus ATCC 14579	Thiocillin
Bacillus cereus G-15	Thiocillin I, II
Bacillus cereus QN3323	YM-266183-4
Bacillus pumilus	Micrococcin
Bacillus sp. QN03323	QN3323
Micrococcus luteus	Neoberninamycin
Micrococcus varians	Micrococcin
Micromonospora arborensis	Sch 18640, 68-1147
Micromonospora carbonecea var. africana ATCC 39149	Sch 40832



"Emitter"-Stämme	Thiopeptid
<i>Micromonospora globosa</i> ATCC 31465	S-54832
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i> IFM 0757	Nocardithiocin
<i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099	Nocathiacin
<i>Nocardiosis</i> sp. TFS65-07	TP-1161
<i>Nonomuraea</i> sp. Bp3714-39	Thiomuracine
<i>Nonomuraea</i> sp. WU8817	GE2270A
<i>Planobispora rosea</i> ATCC 53773	GE2270
<i>Sebekia benihana</i> NRRL 21083	Glycothiohexid
<i>Staphylococcus equorum</i> WS2733	Micrococcin P2
<i>Streptomyces actuosus</i> ATCC 25421	Nosiheptid
<i>Streptomyces actuosus</i> NRRL 2954	Nosiheptid
<i>Streptomyces antibioticus</i> 8446-CC1	Nosiheptid
<i>Streptomyces azureus</i> ETH28555	Thiostrepton
<i>Streptomyces bernensis</i>	Berninamycin
<i>Streptomyces gardneri</i> NRRL 15537	A10255
<i>Streptomyces gardneri</i> NRRL 15922	A10255
<i>Streptomyces gardneri</i> NRRL 18260	A10255
<i>Streptomyces hawaiiensis</i>	Thiostrepton, Thiactin, Bryamycin, A-8506
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> 10-22	Cyclothiazomycin
<i>Streptomyces laurentii</i> ATCC 31255	Thiostrepton

"Emitter"-Stämme	Thiopeptid
<i>Streptomyces sioyaensis</i> ATCC 13989	Siomycin
<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 55365	GE37468
<i>Streptomyces</i> sp. ATCC 55365/O/5	GE37468
<i>Streptomyces</i> sp. DD84	Geninthiocin
<i>Streptomyces</i> sp. DP94	Thioactin, Thioxamycin
<i>Streptomyces</i> sp. DT31	Thiotipin
<i>Streptomyces</i> sp. HIL Y-9420704	Methylsulfomycin
<i>Streptomyces</i> sp. NR0516	Cyclothiazomycin
<i>Streptomyces</i> sp. PA-46025	Thioxamycin
<i>Streptomyces</i> sp. RI19	JBIR-83-4
<i>Streptomyces</i> sp. PA-46025	Thioxamycin
<i>Streptomyces</i> sp. RI19	JBIR-83-4
<i>Streptomyces</i> sp. RSF18	Geninthiocin
<i>Streptomyces</i> sp. RSP9	Methylsulfomycin, Radamycin
<i>Streptomyces</i> sp. SF2741	Promoinducin, Promothiocin
<i>Streptomyces tateyamensis</i>	Thiopeptin
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> MCRL-0368	Sulfomycin I
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> subsp. <i>sulfomycini</i> ATCC 29776	Sulfomycin

### Helix-turn-Helix DNA-Bindedomäne



**Abbildung 7.1** ClustalW-Alignment bekannter homologer TipA-Proteine der MerR-Transkriptionsfaktoren. Die höchste Sequenzähnlichkeit weist die DNA-Bindedomäne aller Proteine auf. Die Konsensussequenz wird unterhalb des Alignments dargestellt. Je intensiver die Blaufärbung der Aminosäuren, desto öfter wurde diese in mehreren Proteinen an derselben Position identifiziert.

**Tabelle 7.3** Rohdaten der bestimmten MIC-Werte (antibiotische Aktivität) und MINC-Wert (Promotor-Induktion) der Thiopeptide/Thiopeptid-Derivate gegenüber unterschiedliche *Streptomyces coelicolor* A3(2) Stämme.

Thiopeptid	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipaA</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipaA</i> komplementiert	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <i>tipa</i> <sup>2</sup>
	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	Promotor- Induktion (MINC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L
<b>Natürlich vorkommende Thiopeptide</b>					
(1) Micrococцин	351	10	-	-	-
(2) Radamycin	2500	500	-	-	-
(3) Thiostrepton	547	25	98	3125	4000
(4) Nosiheptid	63	2.5	4	127	196
<b>Thiostrepton-Derivate</b>					
(3a)	1250	25	625	2500	2500
(3b)	2500	30	2031	2500	2500
(3c)	2500	50	2500	2500	2500
(3d)	1250	300	391	2500	2500
(3e)	1250	200	-	-	-
(3f)	2500	50	2500	2500	2500
(3g)	2500	1000	2500	2500	2500
<b>Nosiheptid-Derivate</b>					
(4a)	78	2.5	4	137	196
(4b)	2500	200	2500	2500	2500

Thiopeptid	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipaA</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) $\Delta$ <i>tipaA</i> komplementiert	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <i>tipa</i> <sup>2</sup>
	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	Promotor- Induktion (MINC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L	antibiotische Aktivität (MIC) in nmol/L
<b>(4c)</b>	2500	5	-	-	-
<b>(4d)</b>	2500	1000	2500	2500	2500
<b>(4e)</b>	2500	1000	2500	-	-
<b>(4f)</b>	507	10	156	2500	2500
<b>(4g)</b>	390	10	156	-	-
<b>(4h)</b>	2500	75	2500	2500	2500
<b>(4i)</b>	2500	100	-	-	-
<b>(4j)</b>	2500	100	-	-	-
<b>(4k)</b>	2500	500	2500	2500	2500
<b>(4l)</b>	2500	250	-	-	-
<b>(4m)</b>	2500	25	-	-	-
<b>(4n)</b>	2500	25	2500	2500	2500

