

**Neue Arylomycine als Signalpeptidase
Typ I-Inhibitoren mittels heterologer Expression des
Biosynthese-Genclusters und Mutasyntese**

Dissertation

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

vorgelegt von
Philipp Jetter
aus Tübingen

Tübingen
2015

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	
I.1 Antibiotikaresistenz – das vernachlässigte Problem	1
I.2 Streptomyceten – leistungsfähige Antibiotika-Produzenten	3
I.3 Arylomycine – Lipopeptide aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	6
I.3.1 Signalpeptidase Typ I	6
I.3.2 Die Antibiotikaklasse der Arylomycine (10-31)	8
I.3.3 Aufgabenstellung	16
I.4 Caprazamycine – Liponucleoside aus <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	17
I.4.1 MraY Translocase	17
I.4.2 Caprazamycine (49-55)	18
I.4.3 Aufgabenstellung	20
II. Material und Methoden	
II.1 Material	
II.1.1 Geräte und Hilfsmittel	21
II.1.2 Verwendete Kits	22
II.1.3 Enzyme	23
II.1.4 Vektoren und Cosmide	24
II.1.5 Bakterienstämme	25
II.1.6 Synthetische Oligonukleotide	25
II.1.7 Materialien für die Chromatographie	27
II.1.8 Chemikalien	28
II.1.9 Kultivierungsmedien	29
II.1.10 Lösungen und Puffer	31
II.2 Methoden	
II.2.1 NMR-Analytik	32
II.2.1.1 ¹ H-NMR-Spektren	32
II.2.1.2 ¹³ C-NMR-Spektren	32
II.2.2 Chromatographische Methoden	32
II.2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	32
II.2.2.2 Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD-16	32
II.2.2.3 Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20	33
II.2.2.4 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	33
<i>Analytische HPLC mit DAD-Kopplung</i>	33
<i>Analytische HPLC mit DAD-ESI-MS-Kopplung</i>	33
<i>Analytische HPLC mit DAD-ESI-HRMS-Kopplung</i>	33

Inhaltsverzeichnis

<i>Präparative HPLC</i>	34
<i>HPLC-Säulen</i>	34
<i>HPLC-Programme</i>	34
II.2.3 Kultivierungsbedingungen	35
II.2.3.1 Kryokulturen	35
II.2.3.2 Schüttelkulturen	35
<i>Vorkulturen</i>	35
<i>Hauptkulturen</i>	35
II.2.3.3 Fermenterkulturen	36
<i>Vorkultur I</i>	36
<i>Vorkultur II</i>	36
<i>Hauptkulturen</i>	36
II.2.3.4 Fütterungsversuche	36
<i>Zufütterung von Aminosäuren</i>	36
<i>Zufütterung von Fettsäuren</i>	36
II.2.4 Probenentnahme und -analyse	37
II.2.4.1 Analyse der Schüttelkulturproben	37
<i>pH-Wert Bestimmung</i>	37
<i>Extraktion des Kulturfiltrats</i>	37
<i>Dünnschichtchromatographie der Kulturfiltratextrakte</i>	37
<i>HPLC-Analytik der Kulturfiltratextrakte</i>	37
II.2.4.2 Analyse der Fermenterproben	37
II.2.5 Isolierung der Arylomycine (10-15, 56, 57) und chemische Reindarstellung	38
II.2.5.1 Adsorptionschromatographie des Kulturfiltrates an Amberlite XAD-16	38
II.2.5.2 Extraktion des Mycels mit Methanol / Aceton	38
II.2.5.3 Extraktion mit Ethylacetat	38
II.2.5.4 Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20	38
II.2.5.5 Präparative HPLC	38
II.2.6 Molekulargenetische Methoden	39
II.2.6.1 Agarosegelelektrophorese	39
II.2.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
II.2.6.3 Aufreinigung von DNA Fragmenten	40
II.2.6.4 Restriktionsspaltung von DNA	40
II.2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten	40
II.2.6.6 DNA-Sequenzierung	40

II.2.6.7 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	40
II.2.6.8 Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA	41
II.2.6.9 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
II.2.6.10 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	42
II.2.6.11 Selektionsantibiotika	42
II.2.6.12 Erstellen und Screening einer Genbibliothek	42
II.2.6.13 Partieller Verdau der genomischen DNA	43
II.2.6.14 Präparation des Vektorcosmids SuperCos1	43
II.2.6.15 Ligation und Verpackung der DNA	44
II.2.6.16 Transduktion von <i>E. coli</i> SURE mit λ -Phagen, Titerbestimmung der Phagenbank und Lagerung der Genbibliothek	44
II.2.6.17 PCR Screening der Genbibliothek nach dem Arylomycin-Biosynthese- Gencluster	45
II.2.6.18 Zusammenbau (Stitching) des Arylomycin-Biosynthese-Genclusters aus zwei überlappenden Cosmiden mittels λ -RED-Rekombination	45
<i>Aufreinigung der Apramycin-Resistenzkassette</i>	46
<i>Aufreinigung der Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette</i>	46
<i>PCR-Amplifikation der Resistenzkassette mit homologen Bereichen für Rekombination</i>	46
<i>Transformation eines Cosmids in E. coli BW25113/pIJ790 durch Elektroporation</i>	47
<i>Einbringen einer Resistenzkassette in ein Cosmid durch λ-RED-Rekombination in E. coli BW25113/pIJ790</i>	47
<i>Ausschneiden der Spectinomycin/Streptomycin- Resistenzkassette (aadA) durch FLP-Rekombinase</i>	47
II.2.6.19 Transfer des Cosmids aryPJ07 in <i>Streptomyces coelicolor</i> mittels triparentaler Konjugation	48
II.2.7 Versuche zur Deacylierung der Arylomycine	49
II.2.7.1 Deacylierung durch immobilisierte <i>Actinoplanes utahensis</i> Zellen	49
II.2.7.2 Deacylierung von <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075 Kulturfiltratextrakt durch <i>A. utahensis</i> Kultur	49
II.2.7.3 Deacylierung von <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075 Kulturfiltrat durch <i>A. utahensis</i> Zellen	49
II.2.8 Bestimmung der minimalen Inhibitionskonzentration	49

III. Ergebnisse

III.1 Arylomycine – Lipopeptide aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	51
III.1.1 Arylomycin-Produktion in <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	51
III.1.1.1 Isolierung der Arylomycine (10-15, 56, 57)	51
III.1.1.2 Analytik der aufgereinigten Arylomycine (10-15, 56, 57)	52
<i>Hochauflösende Massenspektrometrie der Arylomycine (10-15, 56, 57)</i>	52
<i>NMR-Spektroskopische Untersuchungen der postulierten Arylomycine iso-A4 (56) und n-A5 (57)</i>	57
<i>Biologische Aktivität der Arylomycine (10-15, 56, 57)</i>	58
III.1.1.3 Fütterungsversuche	59
<i>Zufütterung von 3-Nitro-Tyrosin</i>	60
<i>Zufütterung von 3-Halogen-Tyrosin</i>	60
<i>Zufütterung von Valin (38)/ Leucin (39)/ Isoleucin (40)/ Tyrosin (36)</i>	61
<i>Zufütterung von Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure</i>	62
III.1.1.4 Arylomycin-Produktion im Fermenter	62
III.1.2 Isolierung des Arylomycin-Biosynthese-Genclusters	63
III.1.2.1 Erstellen einer Genbibliothek von <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	64
III.1.2.2 Screening der Genbibliothek von <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	64
III.1.2.3 Zusammenbau des Arylomycin-Biosynthese-Genclusters aus zwei überlappenden Cosmiden	66
<i>Einbringen der Apramycin-Resistenzkassette in Cosmid lac3</i>	68
<i>Einbringen der Apramycin-Resistenzkassette in Cosmid llae6</i>	69
<i>Einbringen der Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette in Cosmid armPJ02</i>	71
<i>Einbringen des DraI-Restriktionsfragmentes aus armPJ03 in Cosmid armPJ01</i>	72
<i>Entfernen der Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzkassette aus Cosmid armPJ04 durch die FLP-Rekombinase</i>	74
<i>Einbringen der Integrationskassette in Cosmid armPJ06</i>	76
III.1.3 Heterologe Expression des Arylomycin-Biosynthese-Genclusters in <i>Streptomyces coelicolor</i>	77
III.1.3.1 Untersuchungen zur heterologen Produktion der Arylomycine in <i>S. coelicolor</i>	78
III.1.4 Erstellen der $\Delta armC$ - und $\Delta armF$ -Deletionsmutanten	79
III.1.4.1 Erstellen der $\Delta armC$ -Deletionsmutante	80
<i>Deletion von armC in armPJ07</i>	80

Inhaltsverzeichnis

<i>Heterologe Expression des Cosmids armPJ07ΔarmC_Cre in S. coelicolor</i>	82
III.1.4.2 Erstellen der Δ armF-Deletionsmutante	83
<i>Deletion von armF in armPJ07</i>	83
<i>Heterologe Expression des Cosmids armPJ07ΔarmF_Spel in S. coelicolor</i>	85
III.1.5 Neue Arylomycin-Derivate durch Mutasynthese	86
III.1.5.1 Fütterung von <i>p</i> -Hydroxyphenylglycin (Hpg) (37)	86
III.1.5.2 Fütterung von Phenylglycin (58)	87
III.1.5.3 Fütterung von <i>p</i> -F-Phenylglycin (61)	88
III.1.5.4 Fütterung von <i>p</i> -Cl-Phenylglycin (64)	90
III.1.5.5 Fütterung von 2-F-Hydroxyphenylglycin (65)	90
III.1.5.6 Fütterung von 3-F-Hydroxyphenylglycin (68)	91
III.1.5.7 Fütterung von 2,3-F-Hydroxyphenylglycin (71)	91
III.1.6 Aufreinigung, Analytik und Biologische Aktivität der neuen 2-F-/ 2,3-F-Hydroxyphenyl-Arylomycin-Derivate	93
III.1.6.1 Aufreinigung der neuen 2-F-/2,3-F-Hydroxyphenyl-Arylomycin-Derivate (66, 67, 72-75)	93
<i>Aufreinigung der 2-F-Hpg-Arylomycin-Derivate (66, 67, 74)</i>	93
<i>Aufreinigung der 2,3-F-Hpg-Arylomycin-Derivate (72, 73, 75)</i>	93
III.1.6.2 Analytik der neuen 2-F-/2,3-F-Hydroxyphenylglycin-Arylomycin-Derivate (66, 67, 72-75)	94
<i>Analytik mittels hochauflösender Massenspektrometrie</i>	94
<i>Analytik mittels NMR-Spektroskopie</i>	103
III.1.6.3 Biologische Aktivität der neuen 2-F-/2,3-F-Hydroxyphenylglycin- Arylomycin-Derivate (66, 67, 72-75)	104
III.1.7 Versuche zur Deacylierung der Arylomycine	105
III.2 Caprazamycine - Liponucleoside aus <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	109
III.2.0 Aufreinigung der Caprazamycin Derivate (78-88)	110
III.2.1 Aufreinigung der Hydroxyacylcaprazole A (78) und E (79)	111
III.2.2 Aufreinigung der Caprazamycin Aglyka A (80) und E (81)	112
III.2.3 Aufreinigung von Acetyl-Acy caprazol E (82)	113
III.2.4 Aufreinigung von Butyryl-Acy caprazol E (83)	114
III.2.5 Aufreinigung von Hexanoyl-Acy caprazol E (84)	115
III.2.6 Aufreinigung des Sulfo-Caprazamycin Aglykon A (85)	116
III.2.7 Aufreinigung des Sulfo-Caprazamycin Aglykon E (86)	117
III.2.8 Aufreinigung von Sulfo-Hydroxyacylcaprazol A (87)	118
III.2.9 Aufreinigung von Sulfoacetyl-Acy caprazol A (88)	119

IV. Diskussion	
IV.1 Arylomycine – Lipopeptide aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	120
IV.1.1 Arylomycin-Produktion in <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	120
<i>Arylomycine iso-A₄ (56) und n-A₅ (57)</i>	120
<i>Startereinheit der Acylketten der Arylomycine (10-15)</i>	120
<i>Aminosäurebausteine der Arylomycine (10-15, 56, 57)</i>	121
<i>Arylomycin B-Serie (16-22)</i>	122
<i>Fluorierte Arylomycine</i>	122
IV.1.2 Isolierung des Arylomycin-Biosynthese-Genclusters und heterologe Expression in <i>Streptomyces coelicolor</i>	123
IV.1.3 Erstellen der $\Delta armC$ und $\Delta armF$ Deletionsmutanten und Erzeugung neuer Arylomycin Derivate durch Mutasynthese	124
<i>armC – Biarylkupplung</i>	124
<i>armF – p-Hydroxyphenylglycin (37)-Bereitstellung</i>	125
IV.1.4 Biologische Aktivität der Arylomycine und ihrer durch Mutasynthese erzeugten fluorierten Analoga	127
IV.1.5 Deacylierung der Arylomycine	128
IV.2 Caprazamycine - Liponucleoside aus <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	130
<i>Aufreinigung der Hydroxyacylcaprazole (78, 79), Caprazamycin Aglyka (80, 81) und ihrer chemoenzymatisch-synthetisierten Derivate (82-88)</i>	130
<i>Biologische Aktivität der Caprazamycin-Derivate (78-84)</i>	131
V. Zusammenfassung	
V.1 Arylomycine – Lipopeptide aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	135
V.2 Caprazamycine - Liponucleoside aus <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	136
VI. Summary	
VI.1 Arylomycins – Lipopeptides from <i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	138
VI.2 Caprazamycins - Liponucleosides from <i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	139
VII. Referenzen	141