

Isolierung neuer Antibiotika-Produzenten aus indonesischen Bodenproben und Aktivierung stiller Antibiotika-Gencluster

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Janina Krause

aus Bochum

Tübingen 2019

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

25.10.2019

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Yvonne Mast

Zusammenfassung

Aktinomyceten haben sich als ergiebige Quelle neuer Antibiotika herausgestellt. Etwa 45% aller Antibiotika wurden aus Aktinomyceten isoliert oder von deren Naturprodukten abgeleitet. Einzigartige Habitats gelten als gute Quellen für antimikrobielle Spezies mit neuer Naturstoffchemie. Indonesien gehört zu den artenreichsten Ländern der Erde und könnte Heimat neuer Antibiotika-produzierender Aktinomyceten sein.

Im Zuge dieser Arbeit wurden neue indonesische Aktinomyceten-Stämme auf ihr Potential zur Antibiotikaproduktion hin untersucht. Dabei wurde auf Stämme der Tübinger Stammsammlung zurückgegriffen und es wurden neue Stämme aus indonesischen Bodenproben isoliert. Diese Stämme wurden durch Bioaktivitätstest sowie durch phylogenetische Analyse priorisiert und deren Gesamtgenom sequenziert. Eine Analyse mit dem Webtool AntiSMASH ergab, dass es sich bei *Kitasatospora* sp. Tü4103 um einen möglichen Phosphonat-Produzenten handelt. Diese Hypothese wurde durch Bioaktivitätstests gegen den Phosphonat-sensitiven *E. coli*-Stamm bestätigt, welcher sensitiv gegenüber dem Naturstoff aus Tü4103 ist, bestätigt. Transkriptionsanalysen zeigten, dass das Gen *pepM*, das für das essenzielle Protein der Phosphonat-Biosynthese, die Phosphoenolpyruvat-Mutase, kodiert, in Kulturen von Tü4103 transkribiert wird. Wirkort-spezifische Assays deuten darauf hin, dass ein Naturstoff von Tü4013 in den DNA-Metabolismus eingreift oder DNA-Schäden verursacht. Um das Potential der isolierten Aktinomyceten als Antibiotika-Produzenten voll auszuschöpfen, wurde eine Methode zur Aktivierung stiller Gencluster entwickelt. Viele Methoden zur Aktivierung „stiller“ Gencluster sind etabliert, doch sind diese entweder völlig ungerichtet oder involvieren aufwändige genetische Manipulation. In dieser Arbeit wurde der SARP-Aktivator PapR2 zur gezielten Aktivierung stiller Aktinomyceten-Gencluster eingesetzt. Mittels PatScan-Analyse wurden Stämme, die eine SARP-Erkennungssequenz tragen, detektiert. Als Modell wurde die Expression von Undecylprodigiosin in *S. lividans* ausgewählt. Ein PapR2-Überexpressionsstamm von *S. lividans* wurde hergestellt. Die vermehrte Produktion von Undecylprodigiosin in diesem Stamm wurde spektroskopisch nachgewiesen. In Bindestudien konnte gezeigt werden, dass PapR2 an die Promotorregionen der Undecylprodigiosin-Biosynthesegene *redP* und *redQ* bindet. Transkriptionsanalysen bestätigten die vermehrte Transkription der beiden Gene im *S. lividans* PapR2-Überexpressionsstamm. Für den neuen Aktinomycetenstamm *Streptomyces* sp. SHP22-7 konnte gezeigt werden, dass die Einbringung von *papR2* die Expression des Plicacetin-Clusters stimuliert. Die vermehrte Transkription des Plicacetin-Clusters konnte durch Transkriptionsanalysen nachgewiesen werden. Eine HPLC-Analyse bestätigte die erhöhte Produktion von Plicacetin im PapR2-Überexpressionsstamm.

Summary

Actinomycetes have turned out to be prolific sources for new antibiotics as 45% of all known antibiotics were derived from Actinomycetes. Unique habitats are suggested to be a good source for novel antimicrobial species that offer new natural compound chemistry. Indonesia is especially biodiverse and may be host to unknown antibiotic producing Actinomycetes.

In this work new Indonesian Actinomycete strains were tested on their potential to produce novel antibiotics. For screening purposes strains from the Tübingen strain collection as well as novel isolates from Indonesian soil samples have been used. These strains were prioritized based on their bioactivity and phylogeny and their genome has been sequenced. An analysis with the webtool AntiSMASH revealed that *Kitasatospora* sp. Tü4103 is a putative producer of a phosphonate antibiotic. This was validated via bioactivity tests against the phosphonate-sensitive strain *E. coli* WM6242, which is sensitive against a product of Tü4103. Transcriptional analyses demonstrated, that *pepM*, which codes for the essential gene for phosphonate-biosynthesis, the phosphoenolpyruvate mutase, is transcribed in cultures of Tü4103. Studies on the mode of action with genetically engineered strains indicate that a product of Tü4103, eventually the phosphonate, interferes in DNA metabolism.

To access the full potential of the Indonesian strains as antibiotic producers, a new strategy for activation of silent gene clusters was developed. Many methods have been established to activate "silent" gene clusters. However, they are either completely untargeted or involve elaborate genetic manipulation efforts. In this work the SARP-activator PapR2 was used for the targeted activation of silent Actinomycete gene clusters. Strains, that carry a SARP consensus motif were detected via PatScan analysis. As a model system the expression of the undecylprodigiosine biosynthetic gene cluster in *S. lividans* was chosen. A PapR2-overexpression strain of *S. lividans* was created. The increased production of undecylprodigiosine in this strain was validated spectroscopically. Binding studies demonstrated that PapR2 binds to the promotor region of the genes *redP* and *redQ*, that are involved in the undecylprodigiosine-biosynthesis. Transcriptional analyses verified the increased transcription of those genes in the *S. lividans* PapR2-overexpression strain. For the novel Indonesian Actinomycete strain SHP22-7 it was shown that the overexpression of PapR2 stimulates the expression of the plicacetin cluster. The increased transcription of this cluster was validated via transcriptional analysis. An HPLC analysis verified the elevated production of plicacetin in the PapR2-overexpression strain.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Geschichtlicher Überblick zur Antibiotika-Forschung	1
1.2	Biologie der Aktinomyceten	3
1.2.1	Die Gattung <i>Streptomyces</i>	4
1.2.2	Die Gattung <i>Kitasatospora</i>	4
1.3	Isolierung neuer Aktinomyceten aus Regionen mit großer Biodiversität	5
1.4	Aktivierung stiller Gencluster in Aktinomyceten.....	6
1.5	Phosphonate und Phosphonatantibiotika.....	8
1.5.1	Schlüsselenzyme der Phosphonat-Biosynthese	8
1.5.2	Medizinisch und landwirtschaftlich relevante Beispiele für Phosphonate	9
1.5.3	Die Klasse der Nukleosid-Phosphonate.....	12
2	Ziel der Arbeit.....	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Bakterienstämme	15
3.1.2	Nährmedien.....	16
3.1.3	Plasmide und Vektoren	21
3.1.4	Oligonukleotide	22
3.1.5	Puffer und Lösungen	23
3.1.6	Antibiotika und Zusätze zu Selektivplatten und -medien.....	25
3.1.7	Chemikalien	26
3.1.8	Kits.....	28
3.1.9	Enzyme	28
3.2	Isolierung von Aktinomyceten aus Bodenproben.....	29
3.2.1	Isolierung von Streptomyceten durch Trockenhitze	29
3.2.2	Isolierung von Streptomyceten durch die SDS-Hefemethode	29
3.3	Anzucht und Aufbewahrung.....	30
3.3.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.2	Anzucht von Aktinomyceten	30

3.3.3	Aufbewahrung in Glycerol.....	30
3.3.4	Isolierung von Streptomycetensporen.....	30
3.4	Bioaktivitätstests	31
3.4.1	Blöckchentest	31
3.4.2	Antibiotika-Extraktion aus Festmedien	31
3.4.3	Hemmhoftests mit Kulturextrakt und Agarüberstand	31
3.4.4	Herstellung von Testplatten für Agardiffusionstests.....	31
3.4.4.1	Herstellung von <i>Escherichia coli</i> K12-Testplatten	31
3.4.4.2	Herstellung von <i>Escherichia coli</i> WM6242-Testplatten	32
3.4.4.3	Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> -Testplatten	32
3.4.4.4	Herstellung von <i>Micrococcus luteus</i> -Testplatten	32
3.4.4.5	Herstellung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> -Testplatten	32
3.4.4.6	Herstellung von <i>Staphylococcus carnosus</i> -Testplatten	32
3.4.4.7	Herstellung von <i>Staphylococcus aureus</i> -Testplatten	32
3.4.4.8	Herstellung von <i>Candida albicans</i> -Testplatten	33
3.4.4.9	Herstellung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Testplatten	33
3.4.4.10	Herstellung von <i>Botrytis cinerea</i> -Testplatten.....	33
3.4.4.11	Herstellung von Aktinomyceten-Testplatten	33
3.4.5	Durchführung von wirkortspezifischen Bioassays.....	33
3.4.5.1	<i>B. subtilis</i> basierter Promotor-Reporter-Assay.....	33
3.4.5.2	SOS-Antwort Assay mit <i>S. lividans</i> TK64 Δ <i>recA</i>	34
3.5	DNA-Transfer bei Bakterien	34
3.5.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	34
3.5.2	Transformation von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.5.3	Blau-weiß-Selektion von pDrive-Transformanden	35
3.5.4	Protoplastierung und Polyethylenglycol-induzierte Protoplasten-transformation von Aktinomyceten	35
3.5.5	Transformation von Aktinomyceten durch Sporenkonjugation mit <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002.....	35
3.5.6	Transformation von Aktinomyceten durch Elektroporation.....	36
3.5.7	Blau-Weiß-Selektion von pGus21-Doppelcrossover-Mutanten.....	36
3.6	Isolierung von Nukleinsäuren.....	36
3.6.1	Isolierung genomischer DNA mit dem peqGold Bacterial DNA Kit	36

3.6.2	Isolierung genomischer DNA mit dem Genomic-tip 100/G-Kit	37
3.6.3	Reinigung von DNA durch Gelextraktion mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit.....	37
3.6.4	Aufreinigung von PCR Produkten mit Microspin S-400 HR Säulchen.....	37
3.6.5	RNA-Isolierung und reverse Transkription	38
3.6.5.1	Ernte der Zellen zur RNA-Isolierung aus Fest- und Flüssigkultur	38
3.6.5.2	Nukleinsäurefällung.....	38
3.6.5.3	DNA-Verdau.....	38
3.6.5.4	Reverse Transkription.....	39
3.7	Klonierungsexperimente	39
3.7.1	PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase	39
3.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.7.3	Ligation	40
3.7.4	pDrive Ligation.....	40
3.7.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse	41
3.7.6	Restriktion von DNA	41
3.8	Analytisch-chemische Methoden.....	41
3.8.1	Extraktion mit unpolaren organischen Lösungsmitteln	41
3.8.2	Extraktion mit polaren organischen Lösungsmitteln	42
3.8.3	HPLC Analyse	42
3.9	Bioinformatische Webtools.....	42
3.9.1	EzTaxon.....	42
3.9.2	Type Strain Genome Server.....	43
3.9.3	Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell.....	43
3.9.4	Antibiotic Resistance Target Seeker	43
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Charakterisierung und Priorisierung indonesischer Aktinomyceten	45
4.1.1	Screening der Tübinger Stammsammlung nach Antibiotika-Produzenten	45
4.1.1.1	Identifizierung geeigneter Anzuchtmedien und morphologische Charakterisierung	46
4.1.1.2	Beurteilung der Bioaktivität der Java-Stämme gegen Gram-positive und Gram-negative Testbakterien.....	47
4.1.1.3	Taxonomische Einordnung der Java-Stämme anhand der 16S rRNA.....	48
4.1.1.4	Etablierung eines Transformationsprotokolls zur genetischen Manipulation.....	49

4.1.1.5	Priorisierung von vier Java-Stämmen für weitere Studien und zur Gesamtgenom-Sequenzierung	50
4.1.1.6	Bioaktivität gegen die eukaryotischen Testorganismen <i>S. cerevisiae</i> und <i>B. cinerea</i>	50
4.1.1.7	Sensitivitätstests gegen Antibiotika, die zur Selektion eingesetzt werden	51
4.1.1.8	HPLC-Analyse zur Identifizierung bekannter Sekundärmetabolite	52
4.1.2	Isolierung und Charakterisierung neuer indonesischer Aktinomyceten	53
4.1.2.1	Isolierung von Aktinomyceten aus Bodenproben der Insel Lombok	54
4.1.2.2	Bioaktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze	54
4.1.2.3	Morphologische Charakterisierung	55
4.1.2.4	Ermittlung geeigneter Produktionsmedien	56
4.1.2.5	Sensitivitätstests gegen Antibiotika, die zur Selektion eingesetzt werden	60
4.1.2.6	<i>B. subtilis</i> -basierter Reporterassay zur Ermittlung des Wirkorts eines Wirkstoffes .	62
4.1.2.7	Taxonomische Einordnung anhand 16S rRNA Sequenzen	63
4.1.3	Priorisierung von Produzentenstämmen durch Analyse der Genom-Daten der selektierten Antibiotika-Produzenten	64
4.1.3.1	Sequenzierung, Assemblierung und Annotation der Genomdaten	64
4.1.3.2	Taxonomische Einordnung der genomsequenzierten Stämme durch TYGS	66
4.1.3.3	Cluster-Identifizierung durch AntiSMASH	67
4.1.4	Phosphonatdetektion mit I6 und Tü4103 durch Bioaktivitätstests gegen <i>E. coli</i> WM6242	69
4.2	Charakterisierung des Phosphonat-Antibiotikums aus Tü4103	71
4.2.1	Optimierung der Phosphonat-Produktionsbedingungen	71
4.2.1.1	Ermittlung geeigneter Produktionsmedien	71
4.2.1.2	Vergleich der Phosphonatproduktion in Flüssig- und Festmedien-Kulturen	72
4.2.2	Bioaktivitäts-geleitete Ansätze zur Anreicherung des Phosphonat-Antibiotikums	73
4.2.2.1	Test auf Thermostabilität des Phosphonat-Antibiotikums	73
4.2.2.2	Extraktion des Phosphonats mit organischen Lösungsmitteln	74
4.2.2.3	Sequenzielle Extraktion des Phosphonats mit Methanol	75
4.2.2.4	Ansäuerung des Phosphonat-haltigen Agarüberstands zur Extraktion mit unpolaren organischen Lösungsmitteln	75
4.2.3	Charakterisierung des putativen Phosphonat-Biosynthesegenclusters von Tü4103	76

4.2.3.1	Identifizierung der Cluster Grenzen.....	77
4.2.3.2	Identifizierung möglicher Genprodukte	78
4.2.3.2.1	Phosphonat-Biosynthesegene.....	78
4.2.3.2.2	Nukleosid/Nukleotid-Biosynthesegene.....	79
4.2.3.2.3	Weitere Biosynthesegene	82
4.2.3.2.4	DNA-Reparaturgene	82
4.2.3.2.5	Regulatorgene	83
4.2.3.2.6	Transportgene	84
4.2.3.2.7	Genprodukte mit für die Phosphonatsynthese unbekannter Funktion.....	84
4.2.3.2.8	Zusammenwirken der Genprodukte des Phosphonat-Clusters	84
4.2.4	Herstellung eines Konstruktes zur Inaktivierung des <i>kph18</i> -Gens in Tü4103	85
4.2.5	Analyse der Transkription von <i>kph18</i> und Korrelation zur Bioaktivität gegen <i>E. coli</i> WM6242 Transkription von <i>pepM</i> in Kulturen von Tü4103.....	87
4.2.5.1	Transkription von <i>kph18</i> in Tü4103.....	87
4.2.5.2	Korrelation der Gencluster-Transkription in Tü4103 mit der Bioaktivität gegen <i>E. coli</i> WM6242	87
4.2.6	Studien zum Wirkort des Phosphonat-Antibiotikums.....	90
4.2.6.1	Identifizierung von Resistenzgenen des Phosphonat-Clusters durch eine Analyse mit dem Webtool ARTS.....	90
4.2.6.2	Induktion des <i>B. subtilis</i> basierten Promotor-Reporter Assays durch den Agarüberstand von Tü4103.....	91
4.2.6.3	Wirkung des Agarüberstands von Tü4103 auf einen <i>recA</i> -defizienten Stamm von <i>S. lividans</i>	93
4.2.6.4	Resistenzübertragung durch Überexpression von <i>kph5</i>	95
4.2.6.4.1	Test verschiedener Aktinomycetenstämme auf Sensitivität gegen Tü4103.....	95
4.2.6.4.2	Heterologe Expression von <i>kph5</i> in <i>A. japonicum</i> und <i>S. coelicolor</i>	96
4.3	Aktivierung von Antibiotika-Gencluster durch Überexpression des SARP PapR2.....	97
4.3.1	Überexpression von PapR2 in den sequenzierten Stämmen der Tübinger Stammsammlung.....	97
4.3.2	Manuskript: "SARP-driven activation of antibiotic gene clusters"	99
4.3.2.1	Eigenanteil	99
4.3.2.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	99
5	Diskussion.....	101

5.1	Selektion neuer Antibiotika-produzierender Aktinomyceten	101
5.1.1	Indonesien als Quelle neuer bakterieller Antibiotika-Produzenten.....	101
5.1.2	Gesamtgenomsequenzierung mit der PacBio-Methode.....	102
5.2	Phosphonatproduktion durch Tü4103 und I6	103
5.2.1	Nachweis der Phosphonatproduktion von I6.....	104
5.2.2	Phosphonatproduktion von Tü4103.....	104
5.2.2.1	Variationen der Mutagenese-Methode	105
5.2.2.2	Methoden zur Phosphonat-Aufreinigung	105
5.2.2.3	Anwendung von Phosphonaten als Pro-Pharmaka	107
5.2.2.4	Voraussagen zur Struktur des Phosphonats anhand des Genclusters	108
5.2.2.5	Putative DNA-schädigende Wirkung des Phosphonats.....	109
5.3	PapR2 als Aktivator von stillen Antibiotika-Genclustern.....	111
6	Literatur	113
7	Anhang.....	131
7.1	Liste der Isolate von Lombok.....	131
7.2	AntiSMASH Output der sequenzierten indonesischen Stämme	134
7.3	Abgeleitete Funktionen der <i>orfs</i> des Phosphonat-Clusters von Tü4103 gemäß einer Analyse mit BlastP und BlastX.....	138
7.4	Gelbilder zur Analyse der Transkription des Phosphonat-Clusters.....	141
7.5	ARTS-Output der Analyse des Phosphonat-Clusters von Tü4103 (Auszug)	143
7.6	Plasmidkarten.....	144
7.7	Abkürzungen.....	144
7.8	Publikation.....	146
7.9	Manuskript	150

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Überblick zur Antibiotika-Forschung

Ohne Antibiotika wäre die moderne Medizin nicht denkbar (1). Nach der Einführung von Behandlungen mit Antibiotika wurden einige Infektionskrankheiten kontrollierbar, andere verschwanden fast vollständig (2). Die Gabe von Antibiotika ermöglicht nicht nur die direkte Bekämpfung von Infektionen, sondern auch indirekt Behandlungen wie z. B. chirurgische Eingriffe und Chemotherapie, da nur durch Gabe von Antibiotika Folgeinfektionen verhindert werden können (1).

Doch die Verwendung von Naturstoffen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten ist kein Phänomen des 20. Jahrhunderts. Tatsächlich haben Menschen, wenn auch ohne das Wissen um ihre Existenz, Naturstoffe aus Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen seit jeher für medizinische Zwecke verwendet. Die frühesten Aufzeichnungen werden um das Jahr 2600 v. Chr. datiert. In Keilschrift hielten Mesopotamier fest, dass sie Zeder, Zypresse, Süßholz, Myrrhe und Mohnblumensaft verwendeten, um eine Reihe von Krankheiten zu behandeln, von Erkältung und Husten über Entzündungen bis hin zu Infektionen durch Parasiten. Alle diese Mittel werden noch heute in der Medizin eingesetzt. Auch aus ägyptischen, chinesischen, indischen, griechischen und römischen Funden geht hervor, dass diese Völker für Heilzwecke auf hauptsächlich pflanzenbasierte Heilmittel zurückgriffen. Während dieses Wissen im mittelalterlichen Europa weitestgehend verloren ging, bewahrten und vermehrten die Araber die medizinischen Errungenschaften aus der Antike. Mit der Aufklärung etablierte sich auch die Forschung nach neuen Heilmitteln wieder in Europa (3).

Das medizinische Potential von Mikroorganismen wurde zuerst durch Alexander Fleming im Jahr 1929 erkannt, durch die Entdeckung des Pilzes *Penicillium rubens (notatum)* als Produzenten des Antibiotikums Penicillin (3). „Antibiotikum“ als Begriff wurde erst 1947 durch Selman Waksman geprägt (4). Er definierte Antibiotika als „niedermolekulare Stoffwechselprodukte ($M < 2000 \text{ Da}$) von Mikroorganismen, die in einer schrittweisen Biosynthese produziert werden und in niedrigen Konzentrationen ($< 200 \mu\text{g/ml}$) das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen“ (4).

Waksman erhielt 1952 für die Entdeckung des Streptomycins (5) den Nobelpreis (6). Zudem wurden in seiner Arbeitsgruppe u. a. auch Neomycin (7), Grisein (8), Streptocin (9), Rhodomycin (10), Fungicidin (11), Candicidin (12), Candidin (13) und Actinomycin (14) isoliert. Actinomycin war das erste aus Aktinomyceten isolierte Antibiotikum (14). Diese Ordnung der Bakterien und unter ihnen die Streptomyceten erwiesen sich als äußerst ergiebig: zwischen 1940 und 1970 waren 70% aller Antibiotika aus Aktinomyceten isoliert worden (15).

Waksmans Forschung löste einen Hype um die Suche nach neuen Wirkstoffen aus. Die Vorgehensweise war einfach: aus Bodenproben, die überall auf der Welt gesammelt wurden, wurden Mikroorganismen

isoliert und ihre Antibiotika-Produktionsfähigkeit in Agardiffusionstests, wie sie auch heute noch gebräuchlich sind, getestet. Dazu wurden mikrobielle Testorganismen einer Zellkultur oder einem Zellextrakt des potenziellen Antibiotika-Produzenten ausgesetzt. Inhibiert die Zellkultur oder der Zellextrakt das Wachstum des Testorganismus, deutet das auf antibiotische Aktivität hin. Auf Grundlage dieses Verfahrens wurden während des sogenannten „Goldenen Zeitalters der Antibiotikaforschung“ in den 1940er bis 60er Jahren über 1000 neue Naturstoffe entdeckt (16).

Nachdem die Wiederentdeckungsrate von Naturstoffen zunahm, wurden gezieltere Verfahren zur Suche nach neuen Wirkstoffen entwickelt, wie z. B. *in vitro* Assays, mit denen nach Inhibitoren für einen bestimmten, für den Mikroorganismus essenziellen Wirkort gesucht werden kann (*target-based approach*). In Hochdurchsatz-Screening-Verfahren wurden hunderte Stoffe gleichzeitig auf ihre Wirksamkeit hin getestet. Zeitgleich wurde begonnen die Strukturen biosynthetisch produzierter Stoffe zu variieren, z.B. durch semi-Synthese, mit der Naturprodukte mit Hilfe Synthese-chemischer Verfahren variiert wurden; oder durch Synthetische Biologie, indem noch im Organismus in die Produktion von Naturstoffen eingegriffen wurde, u.a. durch den Einsatz von Mutasyntese und kombinatorischer Biosynthese (16).

Zu Beginn des Jahrtausends bekam die Suche nach Antibiotika neuen Aufschwung durch bioinformatische Methoden und die Möglichkeit, ganze Genome mittels *next-generation sequencing* (NGS)-Technologien kostengünstig zu sequenzieren (17). In einem Biosynthese-Gencluster (*biosynthetic gene cluster*, BGC) sind alle für die Synthese des Sekundärmetaboliten relevanten Gene kodiert. Analysen von Gesamtgenomsequenzdaten zeigten, dass das Genom von Aktinomyzeten durchschnittlich etwa 20 Sekundärmetabolitcluster enthält (18), von denen aber nur ca. 10% exprimiert werden (19). Programme, wie das viel verwendete AntiSMASH (s. 3.9.1) wurden entwickelt, um die Genomsequenzen nach BGCs zu screenen (20).

Bioinformatische Methoden treiben auch aktuell die Suche nach Antibiotika voran: z. B. ermöglicht die Plattform GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) die Speicherung, Analyse und das Teilen von MS-MS-Daten (21). Durch GNPS-Clustering können die eigenen MS-MS-Daten mit einer Datenbank abgeglichen werden, in die die User ihre Daten einspeisen (21). Dadurch wird der Dereplikationsprozess erleichtert und die Wiederentdeckungsrate schon bekannter Substanzen verringert (21). Zudem wurden innovative Kultivierungsmethoden entwickelt, z.B. wird die natürliche Umgebung simuliert, um bisher nicht kultivierbare Mikroben im Labor anzuziehen (22). Das sogenannte *isolation chip* (iChip)-Verfahren beruht auf diesem Prinzip: Die Bakterien werden in einer Diffusionskammer angezogen, sodass ein Austausch von Metaboliten mit der Umgebung stattfinden kann und gleichzeitig Kontamination ausgeschlossen wird (23). Mit diesem Verfahren wurde Teixobactin aus *Eleftheria terrae* entdeckt (23). Außerdem werden die Kulturansätze miniaturisiert, sodass 100.000 Kulturen in kurzer Zeit im Hochdurchsatzverfahren gescreent werden können (24). Mit *Miniculture*

Droplet-Kultivierungen etwa können aus einer Bodenprobe die einzelnen Zellen separiert werden, sodass sie in separaten Picoliter-Kulturen angezogen werden können (25). Diese Methode kombiniert eine Miniaturisierung der Kultivierung mit einem Hochdurchsatz Screening nach Bioaktivität (25). Die Minikulturen können direkt für MS-MS-Analysen verwendet werden (25).

Doch trotz moderner Methoden zur Suche nach Antibiotika könnten in Zukunft diese für uns über Jahrtausende so wichtigen Stoffe bald ihre Wirksamkeit verlieren. Seit dem „Goldenen Zeitalter“ sinkt die jährliche Neuentdeckungsrate von Antibiotika konstant (26), auch weil die Wiederentdeckungsrate zunimmt (27, 28). Gleichzeitig entwickeln immer mehr Pathogene Resistenzen gegen bislang wirksame Antibiotika (26). Gegen einige Stämme sind sogar Reserveantibiotika, wie z.B. Daptomycin, Fosfomycin, Oxazolidinone, Polymyxine oder Tigecyclin (29), inzwischen wirkungslos (28). Hinzu kommt, dass die Industrie kaum Investitionen in die kostenintensive und wenig profitable Suche nach neuen Wirkstoffen tätigt (3, 26, 28). Das könnte fatale Folgen nach sich ziehen: Gemäß der Weltbank-Gruppe, könnten Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien einen ökonomischen Schaden verursachen, der gleichwertig mit der Finanzkrise von 2008 ist (30). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prophezeit in ihrem „Global Action Plan for Antimicrobial Resistance“ ein „post-antibiotisches Zeitalter“, in dem gewöhnliche Infektionen wieder tödlich sein können (31), sofern nicht globale Gegenmaßnahmen ergriffen werden (1). Dazu gehören neben Aufklärung über Resistenzen und Vermeidung von Infektionen auch Investitionen in Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika (1).

1.2 Biologie der Aktinomyceten

Die Familie der *Aktinomycetales* stellen die produktivsten Antibiotika-Produzenten unter den Bakterien (15). Sie sind Quelle für die wichtigsten Antibiotika-Klassen, wie Tetracycline, Rifamycine, Aminoglycoside, Macrolide, β -Lactame und Glycopeptide (28). Insgesamt sind über 10.000 bioaktive Moleküle als Produkte von Aktinomyceten bekannt. Das sind 45% aller mikrobiellen bioaktiven Substanzen (Stand 2005) (15).

Bei Aktinomyceten handelt es sich um Gram-positive Prokaryoten, die aerob leben und meist apathogen sind (18). Ihr Genom ist mit bis zu 10 Mbp für Prokaryoten ungewöhnlich groß (18) und weist einen hohen GC-Gehalt von über 70% auf (32). Sie sind unter dem Mikroskop gut an ihren unbeweglichen Filamenten zu erkennen (33). Aufgrund der Filamente wurden sie zunächst für ein Intermediat zwischen Pilzen und Bakterien gehalten (daher die Endung *-myces*, die auf das Pilz-ähnliche Myzel verweist) (32). Aktinomyceten existieren in vielen Milieus, bevorzugen aber Böden, die reich an organischer Materie sind (33). Optimale Wachstumsbedingungen liegen meist zwischen 25°C und 27°C und einem pH-Wert zwischen 6 und 9 (33).

1.2.1 Die Gattung *Streptomyces*

Streptomyceten stellen 95% aller bekannten Aktinomyceten-Stämme und damit die größte Gruppe innerhalb der *Aktinomycetales* (33). Sie sind besonders häufig in Böden zu finden. Da Streptomyceten nicht nur die Hälfte aller bekannten Antibiotika produzieren (34), sondern auch industriell relevante Enzyme (35), sind sie von besonderem Interesse für Medizin und Industrie (33).

Streptomyceten durchlaufen einen komplexen Lebenszyklus (**Abbildung 1**) (33). Er beginnt mit der Keimung einer Spore, die zu einer vegetativen, sich mitunter mehrfach verzweigenden Hyphe wächst (33, 36). Die Hyphen wachsen ausschließlich durch Verlängerung der Spitze (36). Jedes Kompartiment der Hyphen kann mehrere Kopien des Genoms enthalten (36). Bündel der vegetativen Hyphen bilden zusammen das Substratmycel (33). U.a. unter Nährstoffmangel wird das Luftmycel gebildet, was zum Teil zu Lasten des Substratmycels geschieht, das dabei autolysiert wird (33). Der Zeitpunkt der Differenzierung zum Luftmycel geht dabei häufig einher mit dem Beginn der Sekundärmetabolit-Produktion (33). Demnach sind morphologische und physiologische Differenzierung gekoppelt (33). Durch das Einziehen von Zellwänden innerhalb der Lufthyphie bilden sich unigenomische Sporen (33). Die Sporen sind resistent gegenüber verschiedenen Stressbedingungen wie Trockenheit und Hitze (18).

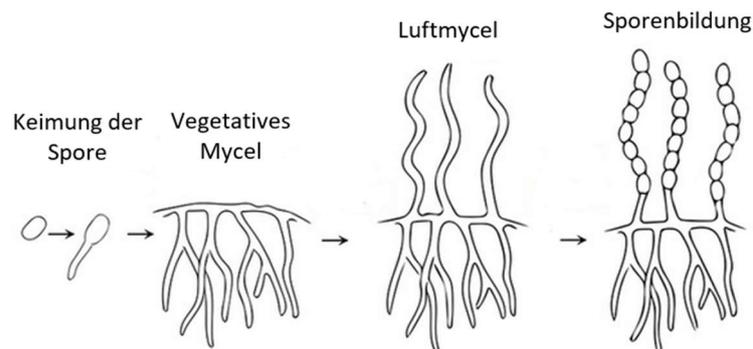


Abbildung 1: Lebenszyklus der Streptomyces. Modifiziert nach (37).

1.2.2 Die Gattung *Kitasatospora*

Wegen der sehr ähnlichen Morphologie wurden Vertreter der Kitasatosporae, die zu den seltenen Aktinomyceten gehören, zunächst den Streptomyceten zugeordnet (38). Doch aufgrund von Unterschieden in der Zusammensetzung der Zellwände, der Differenzierung und des Genoms wurde *Kitasatospora* 1982 als eigene Gattung beschrieben (38). Während die Zellwände der Streptomyceten ausschließlich das LL-Isomer enthalten, besitzen Kitasatosporae sowohl das meso- (im Mycel) als auch das LL-Isomer (in den Sporen) der Diaminopimelinsäure (39). Mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellwände gehen auch Unterschiede in der Sporenbildung einher: Die meisten Streptomyceten, die in Flüssigkultur sporulieren, lysieren zur Sporenbildung ihr Mycel, während bei Kitasatosporae das Mycel erhalten bleibt (40). Stattdessen bilden sich relativ früh submerse

Sporenzellen an den Spitzen der Hyphen aus, woraufhin Sporen und Mycel in Flüssigkultur co-existieren (40). Die unterschiedliche Differenzierung könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass zahlreiche regulatorischen Gene, die in Streptomyceten an der Zelldifferenzierung beteiligt sind (z.B. kodiert *bldB* für ein an der Zelldifferenzierung beteiligtes DNA-Bindeprotein (41), das Genprodukt von *mbI* ist vermutlich in die Sporenzellwandsynthese involviert (42) und *whiJ* kodiert einen Repressor der Zelldifferenzierung (43)), in Kitasatosporae fehlen (44). Kitasatosporae zeichnen sich außerdem durch Resistenz gegen Novobiocin aus, eine Eigenschaft, die auch zur gezielten Isolierung der Gattung aus Bodenproben genutzt wird (39).

Auch wenn bis heute nur 23 Spezies der Gattung *Kitasatospora* beschrieben sind, sind bereits über 50 bioaktive Stoffe diverser Strukturen aus Vertretern der Gattung isoliert worden (39), etwa Setamycin (nematizid, fungizid) aus *K. setae* und *K. griseola* (45) oder das Peptid-Phosphonat Phosalacin (herbizid) aus *K. phosalacinea* (46). Das Beispiel der Kitasatosporae zeigt, dass auch weniger ubiquitär vorkommende Gattungen der Aktinomyceten lohnende Antibiotikaquellen sein können.

1.3 Isolierung neuer Aktinomyceten aus Regionen mit großer Biodiversität

Ein Ansatz neue Antibiotika zu finden, besteht darin, nach bislang unbekanntem Aktinomyceten-Stämmen mit neuer Naturstoffchemie zu suchen (15). Dazu werden bisher wenig untersuchte oder extreme Habitate, wie Wüsten, Höhlen oder verschiedene marine Habitate beprobt (26–28). Insbesondere Mangrovenwälder rücken zunehmend in den Fokus bei der Suche nach neuen bakteriellen Spezies (47, 48). Sie bilden wegen des ab- und zunehmenden Wasserspiegels sowie der daraus resultierenden schwankenden Salzkonzentrationen ein extremes Habitat an der Interphase zwischen Land und Wasser (49).

Neu ist, dass besonders artenreiche Länder priorisiert werden (50). Indonesien gehört zu den artenreichsten Ländern der Welt (50), was auf die diversen Habitate zurückzuführen ist (51). Zum einen bieten die nativen Regenwälder einen größeren Reichtum an Arten als kultiviertes Land (52), zum anderen erweist sich Indonesien, als Inselstaat, reich an marinen Habitaten (53). Als Biodiversitäts-Hotspot beherbergt Indonesien eine Vielzahl endemischer Spezies (54). Auch viele Aktinomyceten-Stämme stammen aus indonesischen Habitaten (48, 55–61). Unter ihnen finden sich Produzenten von Sekundärmetaboliten (62) (wie Phenazine (63), Angucyclinone (64), Apoptolidine (65)) und industriell verwendbarer Enzyme (z.B. Inulin-Fructotransferase (66), Mannan-*endo*-1,4- β -Mannosidase (67)). Das von der WHO als *key access antibiotic* eingestufte Vancomycin (29) beispielsweise wurde aus dem Stamm *Streptomyces orientalis*, der aus Böden in Borneo isoliert wurde, gewonnen (68).

1.4 Aktivierung stiller Gencluster in Aktinomyceten

Im Jahr 2002 wurde das Gesamtgenom des Aktinomyceten *Streptomyces coelicolor* sequenziert (69). Bis dahin war bekannt, dass dieser Stamm Actinorhodin, Undecylprodigiosin, Methylenomycin sowie ein Calcium-abhängiges-Antibiotikum produziert (70). Die Sequenzierung enthüllte weitere 18 mögliche BGCs (69). Gesamtgenomdaten aus zahlreichen anderen Aktinomyceten demonstrieren das Potential von Aktinomyceten zur Produktion unbekannter Naturstoffe (27, 71). Solche Cluster, die zwar vorhanden sind, jedoch unter Laborbedingungen nicht, oder nur in geringem Maße exprimiert werden, werden als „stille“ oder „kryptische“ Cluster bezeichnet (70). Zu ihrer Aktivierung wurden bereits verschiedene Strategien entwickelt:

- **OSMAC (One Strain Many Compounds):** Die Kultivierung der Stämme unter verschiedenen Kulturbedingungen führt zur Produktion unterschiedlicher Sekundärmetabolite (27).
- **Stressoren:** Auch Stress, wie z.B. Temperaturschock (72), Sauerstoffarmut (73), Zugabe von organischen Lösungsmitteln (74, 75) oder seltenen Erden (76) kann die Naturstoffsynthese induzieren. So wird das Jadomycin B-Cluster aus *Streptomyces venezuelae* durch einen Hitzeschock von 42 °C aktiviert (72). Die Zugabe von Lanthan- und Scandiums Salzen zur Kultur regt *S. coelicolor* zur vermehrten Produktion von Actinorhodin an (76).
- **Elizitoren:** Die Zugabe von bakteriellen „Hormonen“ (77, 78) oder anderer organischer Moleküle (79) kann die Produktion von Sekundärmetaboliten anregen. In vielen Aktinomyceten wird die Antibiotikaproduktion von γ -Butyrolactonen (GBL) autoreguliert und die Zugabe von GBLs kann die Antibiotikaproduktion aktivieren (77, 78). Auch die natürlichen Elizitoren im wässrigem Extrakt aus der Erde des Habitats des Antibiotika-Produzenten können die Sekundärmetabolit-Synthese induzieren (80).
- **Co-Kultivierung:** Die Co-Kultivierung von zwei oder mehr Spezies von Mikroorganismen simuliert das natürliche Habitat des Antibiotika-Produzenten (81). Die Anwesenheit von Fressfeinden und Antagonisten soll die Abwehrmechanismen aktivieren, die aus der Sekretion von Antibiotika bestehen (81).
- **Heterologe Expression:** Wenn BGCs im natürlichen Wirt nicht exprimiert werden, können sie in einen heterologen Wirt inkloniert werden, was mitunter zu einer erfolgreichen Expression führt. Für die heterologe Expression von BGCs wurde z.B. *S. coelicolor* optimiert: Mutationen der RNA-Polymerase und der ribosomalen Untereinheiten, begünstigen die Bedingungen für die Expression des fremden Clusters (82). Zudem erleichtert die Inaktivierung der eigenen BGCs die Identifizierung neuer Naturstoffe, denn so verursachen die stamm-eigenen Sekundärmetabolite in Bioaktivitätstests oder in HPLC-Analysen keine Signale, die die Signale der heterolog exprimierten Sekundärmetabolite überlagern können (83).

- Regulatorische Elemente: Nicht nur externe Trigger können zur Aktivierung eingesetzt werden. Auch die Deletion eines Repressorgens (84) oder Überexpression eines Aktivators (85) kann die Biosynthese induzieren. In Aktinomyceten sind beispielsweise SARPs (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein) prominente Aktivatoren (70).

SARPs sind bisher ausschließlich in Aktinomyceten gefunden worden, in denen sie als Aktivatoren der Sekundärmetabolit-Biosynthese fungieren (86). Meist stehen sie ganz am Ende einer Signalkaskade und aktivieren direkt die Transkription des entsprechenden BGCs (87). SARPs sind mit verschiedenen Typen von BGCs assoziiert, etwa solchen, die für Typ I- (88–90) und Typ II-Polyketide (PK) (91–93), ribosomale (94, 95) und nicht-ribosomale Peptide (NRP) (96), für Polyketid/NRP-Hybride (97–101), Alkaloide (102, 103), β -Lactame (104, 105), Azachinone (106) und Azoxy-Verbindungen (107) kodieren. Bekannte SARPs sind beispielsweise ActII-ORF4 und RedD aus *S. coelicolor*, welche die Actinorhodin bzw. Undecylprodigiosin-Biosynthese aktivieren (87).

Für gewöhnlich sind SARP-Gene im jeweils zugehörigen Antibiotika-Biosynthesecluster lokalisiert (108, 109). Sie kodieren für Proteine mit einem „winged“ Helix-Turn-Helix-Motiv am N-Terminus, das aus drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern besteht (108, 109). Dieses Motiv bindet an eine konservierte heptamerische Erkennungssequenz in der großen Furche der Ziel-DNA (108, 109). Die Sequenz überlappt mit der -35-Region des Promotors (110). Es ist entscheidend, dass die SARPs die Polymerase an die richtige Stelle der DNA heranführen (110). Um das zu gewährleisten, sind die Erkennungssequenzen jeweils auf einer bestimmten Seite der DNA-Helix lokalisiert (110). Auf dieser Seite binden gleichzeitig zwei SARP-Monomere und dimerisieren, während die RNA-Polymerase an der gegenüberliegenden Seite bindet (110). Für die Rekrutierung der RNA-Polymerase ist vermutlich die C-terminale bakterielle Aktivierungsdomäne zuständig (110). So wird ein dreiteiliger Komplex, bestehend aus DNA, SARPs und RNA-Polymerase gebildet, der die Transkription startet (**Abbildung 2**) (110).

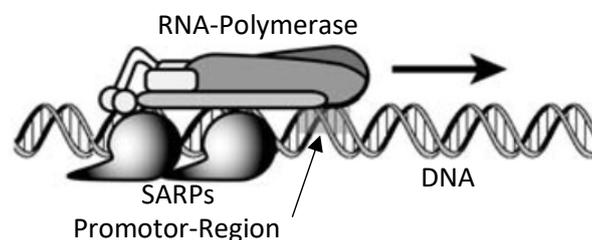


Abbildung 2: Transkriptionsinitiationskomplex bestehend aus DNA, SARPs und RNA-Polymerase. Modifiziert nach (110).

Ein typischer SARP-Aktivator ist PapR2, der als essenzieller Regulator der Pristinamycin-Biosynthese in *Streptomyces pristinaespiralis* identifiziert wurde. PapR2 ist hierbei Teil einer komplexen Regulationskaskade und fungiert als direkter Aktivator der Pristinamycin-Biosynthesegene. In *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (ESMAs) konnte gezeigt werden, dass PapR2 an die Promotorregionen der Pristinamycin-Strukturgene bindet. Ein konserviertes SARP-Bindemotiv konnte

innerhalb der PapR2-Targetpromotoren identifiziert werden. Eine *papR2*-Deletionsmutante von *S. pristinaespiralis* ist nicht in der Lage, Pristinamycin zu produzieren, während die PapR2-Überexpressionsmutante eine gesteigerte Produktion aufweist (97).

1.5 Phosphonate und Phosphonatantibiotika

Phosphonate sind eine wenig untersuchte Klasse von häufig bioaktiven Molekülen. Strukturell zeichnen sich Phosphonate durch eine direkte P-C-Bindung aus (**Abbildung 3 (a)**). Dadurch zeigen Phosphonate eine ähnliche Isosterie zu Phosphaten (**Abbildung 3 (b)**), deren strukturelles Merkmal eine P-O-C-Bindung ist. Allerdings ist die Phosphonatbindung stabiler und schwerer hydrolysierbar, wodurch Phosphonat-Verbindungen Temperaturen von 100°C und der Behandlung mit Säuren und Basen widerstehen können. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Phosphaten und auch zu Carboxylsäuren (**Abbildung 3 (c)**), können Phosphonate das aktive Zentrum von Phosphatasen und Peptidasen blockieren, ohne hydrolysiert zu werden. So wirken Phosphonatverbindungen bei Phosphorylierungen und Proteolysen als kompetitiver Inhibitor (111).

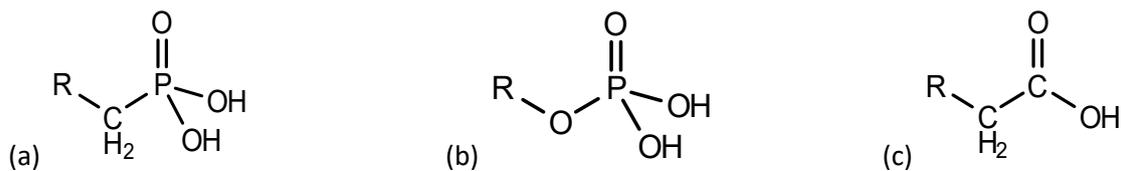


Abbildung 3: Chemische Struktur von (a) Phosphonaten, (b) Phosphaten und (c) Carboxylsäuren

1.5.1 Schlüsselenzyme der Phosphonat-Biosynthese

Der Initiationsschritt der Phosphonat-Biosynthese verläuft in fast allen Phosphonat-Produzenten identisch (111). Am Beginn der Synthese steht die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (Pep) zu Phosphonopyruvat (PnPy) (**Abbildung 4**), katalysiert durch die Phosphoenolpyruvat-Mutase (PepM) (112). Laut vorgeschlagenem Mechanismus erfolgt die Umwandlung durch einen dissoziativen Prozess: Die Phosphatgruppe spaltet sich von Pep ab, sodass sich ein Metaphosphat-Intermediat, das von der PepM stabilisiert wird, sowie eine Carboxylsäure mit einer C-C-Doppelbindung bildet (112). Die Bindung des Metaphosphat-Intermediates an die Carboxylsäure erfolgt durch einen nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom, sodass PnPy entsteht (112). Die Reaktion wird vom darauffolgenden Schritt angetrieben, der Umwandlung von PnPy in Phosphonoacetaldehyd durch die PnPy-Decarboxylase (PnpyD) unter Abspaltung von CO₂ (112).

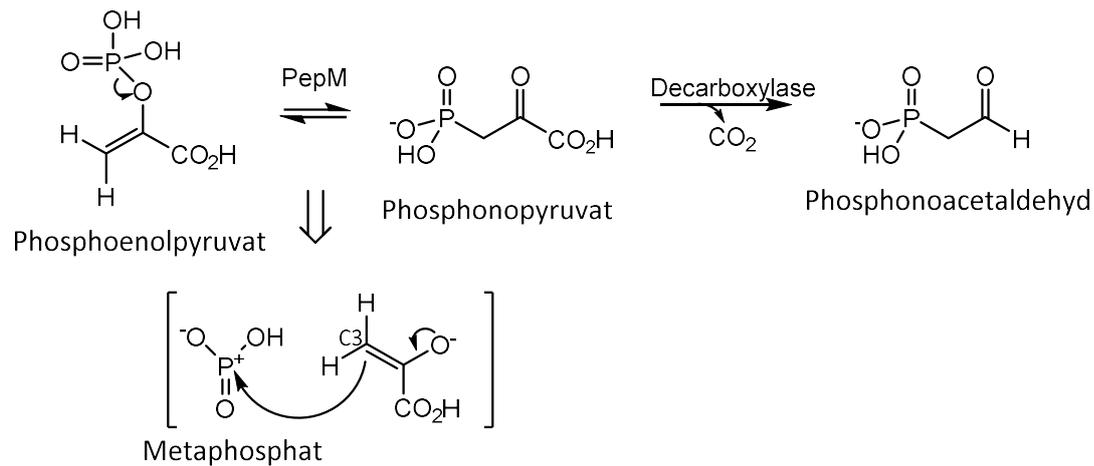


Abbildung 4: Initiation der Phosphonat synthese mit vorgeschlagenem Übergangszustand. PepM katalysiert die Konversion von Pep zu PnPy, wobei der Übergang über ein Metaphosphat-Intermediat erfolgt. Der Schritt wird von der nachfolgenden Decarboxylierung getrieben. *Modifiziert nach (112).*

Dadurch, dass der Initiationschritt der Phosphonat-Biosynthese fast immer gleich abläuft und von PepM katalysiert wird, kann nach dem Gen, das für PepM kodiert (*pepM*), gesucht werden, um Phosphonat-Verbindungen zu finden (113). Durch das Screening von 10.000 Aktinomycetenstämmen nach *pepM* und anschließende Analyse mit ^{31}P -NMR haben Ju *et al.* elf neue Phosphonatverbindungen entdeckt (113). 5% aller gescreenten Aktinomycetengenome enthielten Homologe von *pepM* (114).

1.5.2 Medizinisch und landwirtschaftlich relevante Beispiele für Phosphonate

Fosfomycin (Abbildung 5) ist ein Breitband-Antibiotikum, das die Zellwandsynthese inhibiert (115). Als Analogon des Phosphoenolpyruvats bildet Fosfomycin einen sehr stabilen Komplex mit der UDP-GlcNAc-3-Enolpyruvyl-Transferase, die den ersten Schritt der Zellwandsynthese katalysiert (115). Dadurch können UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) und Phosphoenolpyruvat nicht mehr zu UDP-GlcNAc-3-Enolpyruvyl-Ether umgesetzt werden (115). Die Aktivität von Fosfomycin ist allerdings nicht auf die Phosphonatgruppe, sondern auf den reaktiven Epoxidring zurückzuführen (115). Zum Eintritt in die Zelle nutzt Fosfomycin das L- α -Glycerophosphat-Transportsystem oder das Hexose-Phosphat Aufnahmesystem (115). Fosfomycin wurde erstmals aus *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096), *Streptomyces viridochromogenes* (ATCC21240) und *Streptomyces wedmorensis* (ATCC21239) isoliert (116). Die WHO hat Fosfomycin 2017 als Reserveantibiotikum eingestuft (117).

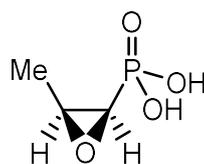


Abbildung 5: Chemische Struktur von Fosfomycin (115).

Dehydrophos (Abbildung 6) wurde erstmals aus *Streptomyces luridus* NRRL 15101 isoliert (118). Nach der Patentierung 1984 (118) wurde die Struktur mehrfach korrigiert und umbenannt, zuletzt 2007 (119). Dehydrophos ist ein O-methyliertes Vinylphosphonat, das über eine Amidbindung an ein Glycin-Leucin-Dipeptid gebunden ist (119). Vermutlich ist die Voraussetzung für die Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien die Hydrolyse der C-terminalen Amid-Bindung (120), wobei das freiwerdende Methylacetylphosphonat als Inhibitor der Pyruvat-Dehydrogenase und Pyruvat-Oxidase fungiert (120).

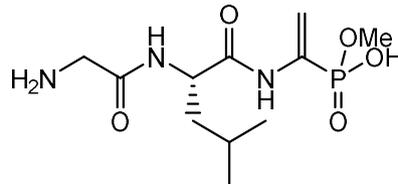


Abbildung 6: Chemische Struktur von Dehydrophos (119).

Phosacetamycin (Abbildung 7) zeigt Aktivität gegen Pilze, Gram-positive und Gram-negative Bakterien (121). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht aufgeklärt (121). Phosacetamycin wird von *Streptomyces aureus* NRRL B-2808 produziert. Die Verbindung wurde 2013 mithilfe einer auf Spektrometrie basierten Methode zum Screenen nach Phosphonaten entdeckt (121). Diese Methode beruht darauf, dass Phosphonate im Massenspektrum spezifische Peaks bei 63 (PO_2^-) und 79 (PO_3^-) m/z verursachen (121).

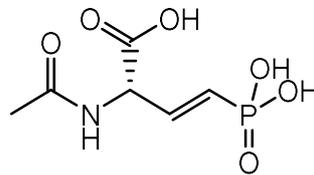


Abbildung 7: Chemische Struktur von Phosacetamycin (121).

Fosmidomycin (Abbildung 8 (a)) und **FR900098 (Abbildung 8 (b))** aus *Streptomyces rubellominus* gehören zur Gruppe der N-Hydroxypropylphosphonate (122). Diese attackieren die Reduktoisomerase der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) Synthese, die ein Zwischenschritt der Isoprensynthese ist (123). Klinische Studien zeigen, dass die Verbindungen bei geringer Zytotoxizität gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falsiparum* wirken (124).



Abbildung 8: Chemische Strukturen von (a) Fosmidomycin (125) und (b) FR900098 (126).

Das Tripeptid **K-26 (Abbildung 9)** besteht aus acetyliertem L-Isoleucin, L-Tyrosin und 1(R)-1-Amino-2-(4-hydroxyphenyl)-Ethylphosphonat (127). K-26 inhibiert das Angiotensin I-umsetzende Enzym (127).

Angiotensin I ist ein Hormon, das an der Regulierung des Blutdrucks beteiligt ist (128). Dementsprechend wird K-26 zur Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt (129). Die Isolierung erfolgte aus *Actinomyces* sp. K-26 (127). Im Gegensatz zu anderen Phosphonaten beginnt die Biosynthese von K-26 nicht mit Phosphoenolpyruvat (PEP, s. 1.5.1), sondern das Molekül leitet sich von Tyrosin ab (130).

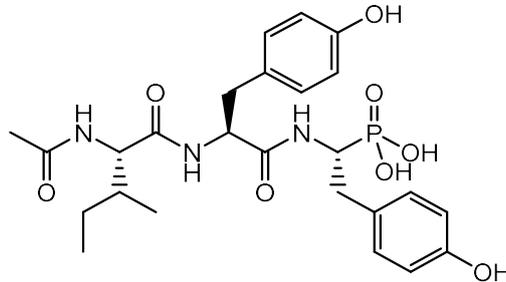


Abbildung 9: Chemische Struktur von K-26 (129).

Die **Phosphinothricin**gruppe kommt in verschiedenen Peptid-Verbindungen vor (111). Phosphinothricin-Verbindungen inhibieren als Glutamat-Analoga die Glutamin-Synthetase (131, 132). Aufgrund ihrer Rolle bei der pH-Homöostase in Pflanzen, wirken Phosphinothricine stark herbizid (133). Der herbizide Effekt ist mitunter auf die Akkumulation von Ammonium zurückzuführen (134, 135). Produziert wird Phosphinothricin u.a. von *Streptomyces viridochromogenes* als Phosphinothricintri-peptid (131) (PT-Ala-Ala, **Abbildung 10** (a)) und von *K. phosalacinea* als Phosalacin (PT-Ala-Leu, **Abbildung 10** (b)) (136). *S. hygroscopicus* ist ebenfalls in der Lage, PT-Ala-Ala zu produzieren (137). Außerdem produziert dieser Stamm das Tetrapeptid Trialaphos (PT-Ala-Ala-Ala, **Abbildung 10** (c)) (138).

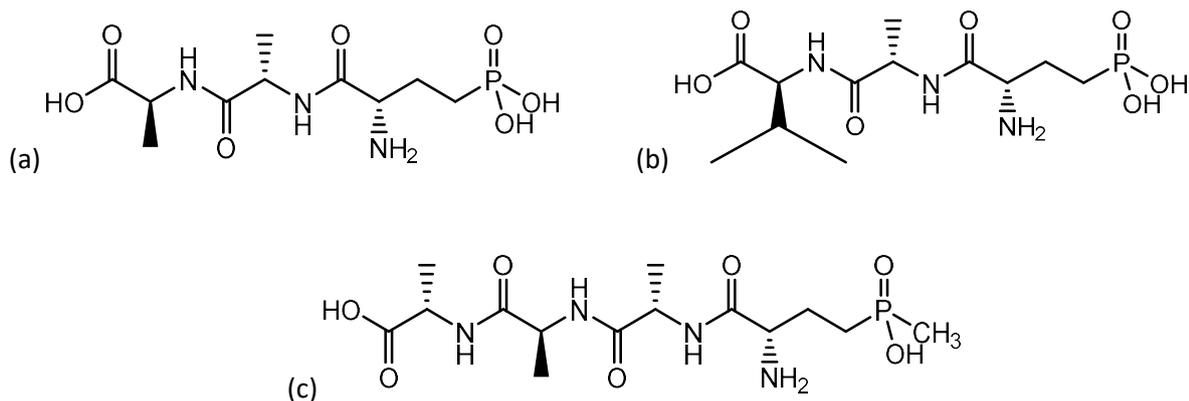


Abbildung 10: Chemische Strukturen von (a) Phosphinothricintri-peptid/Bialaphos (137), (b) Phosalacin (139) und (c) Trialaphos (138).

Das ebenfalls herbizid wirkende, allerdings synthetisch hergestellte **Glyphosat** (**Abbildung 11**) inhibiert als PEP-Analogen den Shikimat-Syntheseweg für aromatische Aminosäuren, indem es die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase blockiert (140). Da dieses Enzym nur in Pflanzen und einigen Mikroorganismen vorkommt, wirkt Glyphosat fast ausschließlich herbizid (140). Glyphosat wird unter

dem Namen „Roundup“ vom Saatguthersteller Monsanto (141), der seit 2018 zu Bayer gehört (142), vertrieben. Es ist das meistgenutzte Herbizid weltweit (140).

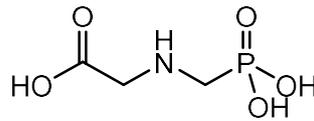


Abbildung 11: Chemische Struktur von Glyphosat (140).

1.5.3 Die Klasse der Nukleosid-Phosphonate

Eine in der Medizin häufig verwendete Therapeutikagruppe, die zur Bekämpfung viraler Infekte eingesetzt wird, sind die Nukleosid-Phosphonate (143). Die Wirkung von Nukleosid-Phosphonaten beruht auf der Ähnlichkeit zu Nukleotiden (144). Die virale DNA-Polymerase sowie die reverse Transkriptase inkorporieren Nukleosid-Phosphonate anstelle von Nukleotiden in die DNA (144). Die dadurch leicht veränderte DNA-Konformation führt zu falschen Basenpaarungen (144), woraus die Termination der Transkriptionsreaktion bzw. der DNA-Replikation resultiert (146). Nukleosid-Phosphonate zeigen eine höhere Affinität zur viralen gegenüber der zellulären DNA-Polymerasen im Vergleich zu Nukleotiden (145).

Ihr erster Vertreter, (*S*)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)adenin, (**(S)-HPMPA**, **Abbildung 12 (a)**), der 1986 synthetisiert wurde, zeigt ein breites Wirkspektrum gegen DNA-Viren (147).

1996 kam das erste Nukleosid-Phosphonat, ein Deoxycytidinphosphonat, (**Cidofovir**, **Abbildung 12 (b)**) auf den Markt (148), das noch heute zur Behandlung von diversen viralen Infektionen verwendet wird (143). Es wird insbesondere gegen den humanen Cytomegalovirus (CMV) eingesetzt (149), da es spezifisch die DNA-Synthese und -Replikation des CMV inhibiert (150). Daneben wurde auch eine antitumorale Aktivität von Cidofovir nachgewiesen (151–154).

Adefovir [9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin] (**Abbildung 12 (c)**) wirkt gegen DNA- und RNA-Viren und wird insbesondere gegen den Hepatitis B Virus eingesetzt (155). Zudem induziert es die Differenzierung verschiedener Tumorzellen (156) u.a. inhibiert es das Choriokarzinom-Wachstum (157). Das Deoxyadenosin **Tenofovir**, (*R*)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)adenin, (**Abbildung 12 (c)**) wirkt gegen Retroviren (158) und ist das erfolgreichste Medikament zur Behandlung von HIV Infektionen weltweit (145). Resistenzen haben sich seit Markteinführung kaum ausgebildet (145).

Bisher wurden alle Vertreter dieser Klasse synthetisch hergestellt. Es ist kein natürlicher Nukleosid-Phosphonat-Biosyntheseweg bekannt (143).

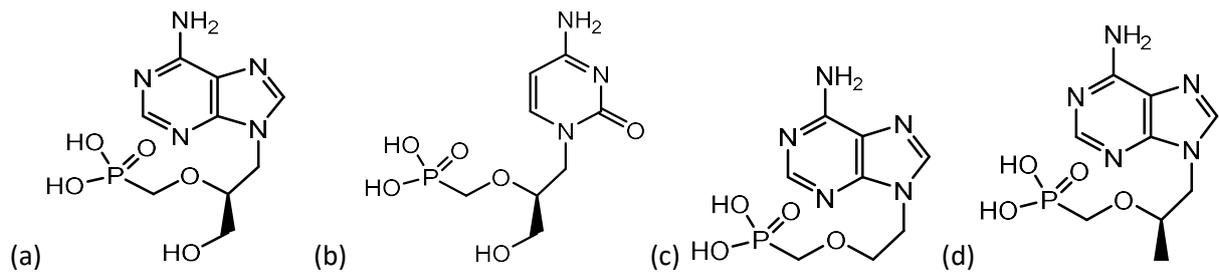


Abbildung 12: Strukturen der Nucleosid-Phosphonate (a) (S)-HPMPA, (b) Cidofovir, (c) Adefovir und (d) Tenofovir Modifiziert nach (143).

Bei der großen Anzahl an möglichen BGCs in Aktinomyceten, sollten bisher wenig untersuchte Stoffklassen wie Phosphonate priorisiert werden, um das Risiko von Wiederentdeckungen zu vermeiden. Die genannten Beispiele zeigen, welche strukturelle Vielfalt und unterschiedliche Wirkweisen Phosphonate aufweisen.

2 Ziel der Arbeit

Im ersten Teil des Projekts sollen zum Finden neuer Antibiotika unbekannte Aktinomycetenstämme in Indonesien isoliert werden. Zudem soll eine Pipeline etabliert werden, um potenzielle Antibiotika-Produzenten zu priorisieren. Dazu sollen die neu isolierten Stämme sowie die indonesischen Aktinomyceten der Tübinger Stammsammlung anhand ihrer Bioaktivität sowie ihrer taxonomischen Einordnung charakterisiert werden. Das Gesamtgenom der ausgewählten Stämme soll sequenziert und mithilfe von *Genome Mining* auf Antibiotikabiosynthesecluster untersucht werden. Bioaktive Sekundärmetabolite der potenziellen Antibiotika-Produzenten sollen mittels molekular- und mikrobiologischer Methoden ermittelt und seine Wirkweise näher bestimmt werden.

Im zweiten Teil des Projekts soll eine Methode entwickelt werden, um das volle Potential der Aktinomyceten in Form von stillen Genclustern zu erschließen. Zur Aktivierung der Expression stiller Gencluster soll der SARP-Regulator PapR2 aus *Streptomyces pristinaespiralis* in Testorganismen eingebracht werden. Die Aktivierung des Undecylprodigiosin-Biosynthesecluster in *Streptomyces lividans* durch PapR2 konnte bereits beobachtet werden und soll durch weitere Experimente auf genetischer Ebene untersucht werden. Des Weiteren soll die Funktion von PapR2 als Aktivator an den hier untersuchten Aktinomyceten nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Aktivierung stiller Biosynthesecluster soll hierbei als Machbarkeitsnachweis dienen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>		
Novablue	<i>endA1, hsdR17</i> ($r_{K12^-} m_{K12^+}$), <i>supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F'[proA⁺B⁺ lac^qZΔM15::Tn10]</i> (Tetracyclin ^R)	Merck Millipore
ET12567/pUZ8002	<i>F, dam-13::Tn9, dmc-6, hsdM, hsdR, lacY1, aphII</i>	Muth, pers. Mitt.
WM6242	<i>lacIq, rrnB3, del(lacZ4787), hsdR514, attP22(EcoB), del(araBAD)567, del(rhaBAD)568, rph-1, del(phnC-P), del(phoA), HK- attB::pJK077(del aadA-oriR6K), lambda-attB::pJK074(delcat-oriR6K)</i>	(159)
<i>Kitasatospora</i>		
Tü4103	WT	Tübinger Stammsammlung
Tü4103 pRM4	WT + pRM4, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4103 pRM4/ <i>papR2</i>	<i>papR2</i> -Überexpressionsstamm, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
<i>Streptomyces</i>		
Tü4097	WT	Tübinger Stammsammlung
Tü4097 pRM4	WT + pRM4, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4097 pRM4/ <i>papR2</i>	<i>papR2</i> -Überexpressionsstamm, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4100	WT	Tübinger Stammsammlung
Tü4100 pRM4	WT + pRM4, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4100 pRM4/ <i>papR2</i>	<i>papR2</i> -Überexpressionsstamm, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4106	WT	Tübinger Stammsammlung
Tü4106 pRM4	WT + pRM4, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
Tü4106 pRM4/ <i>papR2</i>	<i>papR2</i> -Überexpressionsstamm, <i>accIV</i>	Diese Arbeit
I1	WT	Diese Arbeit

13	WT	Diese Arbeit
14	WT	Diese Arbeit
15	WT	Diese Arbeit
16	WT	Diese Arbeit
17	WT	Diese Arbeit
18	WT	Diese Arbeit
19	WT	Diese Arbeit
110	WT	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> TK64	SLP2 ⁻ SLP3 ⁻ <i>pro-2 str-6</i>	(160)
<i>S. lividans</i> TK64 Δ <i>recA</i>	<i>aphII</i> , <i>bla</i> , Genunterbrechung in <i>recA</i>	(161)
<i>A. japonicum</i>	WT	E. Stegmann, pers. Mitt.
<i>A. japonicum</i> / <i>radAex</i>	WT + pRM4/ <i>radAex</i>	Diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> M145	A3(2) + chromosomale M145 DNA, prototroph	(162)
<i>S. coelicolor</i> / <i>radAex</i>	M145 + pRM4/ <i>radAex</i>	Diese Arbeit

3.1.2 Nährmedien

Alle Angaben pro 1 L H₂O_{deion.} Für Festmedien wurden 16 g/L Agar zugegeben.

Luria Broth (LB)

LB Pulver 8 g

R5

Saccharose 103 g
 Glucose 10 g
 K₂SO₄ 0,25 g
 MgCl₂ 10,12 g
 Casaminsäuren 0,1 g
 Hefeextrakt 5 g
 TES 5,73 g
 Spurenelementlösung 2 mL

In 955 mL H₂O_{deion.} lösen; pH 7,2; nach Autoklavieren getrennt zugeben:

1 M CaCl₂ 20 ml
 0,54% KH₂PO₄ 10 mL
 20% L-Prolin 15 mL

S

Pepton	4 g
Hefeextrakt	4 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Glycin	10 g

in 800 mL H₂O_{deion} lösen; nach Autoklavieren getrennt zugeben:

Glucose	10 g
MgSO ₄	0,5 g

YT

Trypton	16 g
Hefextrakt	10 g
NaCl	5 g

NL 19

Mannitol	20 g
Sojamehl vollfett	20 g

pH 7,5

NL200

Mannitol	20 g
Maisstärkepulver	20 g

pH 7,5

NL300

Mannitol	20 g
Baumwollsamensamen	20 g

pH 7,5

NL400

Glucose	10 g
Stärke	20 g
Bacto Peptone	3 g
Fleischextrakt	3 g
Hefeextrakt	5 g
CaCO ₃	3 g

pH 7,0

NL410

Glucose	10 g
Glycerin	10 g
Hafermehl	5 g
Sojamehl	10 g
Hefextrakt	5 g
Casaminosäuren	5 g
CaCO ₃	5 g
pH 7,3	

NL 500

Stärke (löslich)	10 g
Glucose	10 g
Glycerin	10 g
Fischmehl	15 g
Seesalz	10 g

pH auf 8,0 einstellen, nach 1 h auf pH 8,0 nachtitrieren; entspricht pH 6,6 nach Autoklavieren

NL 550

Stärke (löslich)	10 g
Glucose	10 g
Pepton aus Casein	5 g
Maisstärkepulver	2,5 g
CaCO ₃	2 g
Seesalz	10 g

pH auf 8,0 einstellen, nach 1 h auf pH 8,0 nachtitrieren; entspricht pH 6,6 nach Autoklavieren

NL800

Glucose	5 g
Glycerin	10 g
Stärke (löslich)	10 g
Sojamehl vollfett	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	1 g
pH 7,2	

OM

Hafermehl	20 g
Spurenelementlösung	5 mL
pH 7,3	

MS

Mannitol	20 g
Sojamehl vollfett (CaCl ₂)	20 g 2 g

SGG

Stärke (löslich)	10 g
Glucose	10 g
Glycerin	10 g
Maisstärkepulver	2,5 g
Bacto Pepton	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	3 g
pH7,3	

HM

Malzextrakt	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	4 g
pH 7,3	

YEME

Hefeextrakt	3 g
Bacto Pepton	5 g
Malzextrakt	3 g
Glucose	10 g
Saccharose	340 g
nach Autoklavieren zugeben: 2 mL 2,5 M MgCl ₂ x6 H ₂ O	

Minimalmedium (MM)

Asparagin	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
KOH	0,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
Glucose	10 g

HV

Huminsäure	1 g gelöst in 40 ml 0,4% NaOH
Thiamin-HCl	0,5 mg
Riboflavin	0,5 mg
Niacin	0,5 mg
Pyrodoxin-HCl	0,5 mg
Inositol	0,5 mg
Ca-Panθοtheinat	0,5 mg
p-Aminobenzoessäure	0,5 mg
Biotin	0,25 mg
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g
KCl	1.71 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05 g
Na ₂ HPO ₄	0,5 g
Cycloheximid	5 mg
Agar	18 g
pH 7,2	

SYP2

Stärke	1 g
Hefeextrakt	0,4 g
Pepton	0,2 g
NaCl	2 g
Cycloheximid	5 mg

SDS-Hefe

Phosphatpuffer pH 7,0	6 mL
Hefeextrakt	6 g
SDS	50 mg

Antibiotika-Testmedium für *B. subtilis*

KH ₂ PO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	7 g
Tri-Na-Citrat x 2 H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Glucose	2 g

Sporulationsmedium für *B. subtilis*

FeCl ₃ x 6 H ₂ O	1 mg
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	14,5 mg
NH ₄ Cl	540 mg
Na ₂ SO ₄	105 mg
KH ₂ PO ₄	87 mg
CaCl ₂	194,7 mg
NH ₄ NO ₃	96 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8,3 mg
Glucose	2 g
Na-L-Glutamat x H ₂ O	1,9 g
pH 7,1	

KIV

Malzextrakt	20 g
pH 6,0	

Müller-Hinton

Fleischextrakt	2 g
Caseinhydrolysat	17,5 g
Stärke	1,5 g
Agar	18 g
pH 7,0	

Saboraud

Dextrose	40 g
Pepton	10 g
Agar	18 g
pH 5,6	

NB-Weichagar

NB-Pulver	8 g
Agar	5 g

3.1.3 Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Relevante Eigenschaften	Größe (kb)	Referenz
pDrive	<i>aphII</i> , <i>aacIV</i> , <i>Plac</i> , <i>lacZ'</i>	3,9	QIAGEN
pGUS21	Kloniervektor, <i>aacIV</i> , <i>gusA</i>	5,4	(163)
pGUS21/ Δ <i>pepM</i>	pGUS21-Derivat, Deletionskonstrukt für <i>pepM</i>	7,9	Diese Arbeit
pK18	pUC-Derivat, <i>aphII</i> , <i>lacZ'</i> α -Komplementationssystem	2,7	(164)
pK18/ Δ <i>pepMthio</i>	pK18, <i>thio^R</i> , Mutationskonstrukt für <i>pepM</i>	6,2	Diese Arbeit

Plasmid/Vektor	Relevante Eigenschaften	Größe (kb)	Referenz
pRM4	Integrativer Kloniervektor, pSET152 <i>ermEp*</i> Derivat (Φ C31 <i>ermEp*</i> Promotor, <i>accIV</i>) mit artifizieller RBS	6,0	(165)
pRM4/ <i>radA</i>	pRM4-Derivat, Expression von <i>radA</i>	7,6	Diese Arbeit
pRM4/ <i>papR2</i>	pRM4-Derivat, Expression von <i>papR2</i>	7,4	Diese Arbeit

3.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden von der Firma Integrated DNA Technologies bezogen.

Primernamen	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Verwendung
16Sfw	CGGCCTTCGGGTTGTAACCTC	63	Nachweis von cDNA
16Srv	GCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	60	
27Fbac	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	53	Sequenzierprimer für taxonomische Einordnung
1492Runi	TACGGTTACCTTACGACTT	54	
RTpepMrv	CCTGAACGGTTCGAGGTCAT	60	Transkriptionsanalyse von <i>pepM</i>
RTpepMfw	TGGTACGAGCGGACCATGTG	60	
pepMupfw	ATGAATTCCTCCCGAGCTGGTGTCTG	62	Erzeugung des <i>pepM</i> -Deletionskonstrukts
pepMuprv	ATTCTAGAGGATGACCTCGGAACCGTTC	61	
pepMdofw	TTCTAGAGCGTGATCTACGCCAACCAG	61	Erzeugung des <i>pepM</i> -Deletionskonstrukts
pepMdorv	TTCTTGCCGCCATCTCCAG	63	
RadAfw	TGGCTGCCCGTACCAAGACCACCGCCAA	72	Erzeugung eines Konstrukts zur heterologen Expression
RadArv	ATAAGCTTTCAGCCCAGTTCGTCCGAGT	66	
RTpepMrv	CCTGAACGGTTCGAGGTCAT	60	Transkriptionsanalyse <i>pepM</i>
RTpepMfw	TGGTACGAGCGGACCATGTG	60	
RT_ <i>kph4_fw</i>	GAGCAGCTTCTGGAGGCC	59	Transkriptionsanalyse der <i>orfs</i> des Phosphonat-Clusters
RT_ <i>kph4_rv</i>	CTCCAAGTGGACGAGCTG	56	
RT_ <i>kph5_fw</i>	GAGACCTCCACCACCTTCATG	57	
RT_ <i>kph5_rv</i>	CAGGACATCTACACCGCCAC	58	
RT_ <i>kph6_fw</i>	GTGGTGGCGCTGTGGAGC	59	
RT_ <i>kph6_rv</i>	CCAGTCCACGTCCAGCAC	62	
RT_ <i>kph12_fw</i>	GGTTGTTGACCAGCTCGTGC	59	
RT_ <i>kph12_rv</i>	CAGACCCACAAGGGCGAG	59	
RT_ <i>kph13_fw</i>	CAGTTGGCGATATCGCTGC	57	
RT_ <i>kph13_rv</i>	CCAGCACCTGGTCGAGTTG	58	
RT_ <i>kph17_fw</i>	GATCTCGTTCAGCGCGCC	57	
RT_ <i>kph17_rv</i>	GTCGGCGTCTCCAATACTC	59	
RT_ <i>kph19_fw</i>	GTGAGTTGGCCGCGGTG	59	
RT_ <i>kph19_rv</i>	CACCTGCGGGTTCACCAG	62	

Primername	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Verwendung
RT_kph20_fw	CATCTGGTCGATCACCCGGG	61	
RT_kph20_rv	GCAGGCCGTGGTCTGATG	60	
RT_kph21_fw	CGGCTCCGGGTCGAACAG	62	
RT_kph21_rv	GCCGAGCCGCTGATCGTG	61	
RT_kph24_fw	GTCTGCACCTGCCTGCCG	62	
RT_kph24_rv	GAAGGCGGTGCCGGACAG	62	
RT_kph26_fw	GTTGTTGAGGTGGCAGACG	57	
RT_kph26_rv	GCGAGGAGTTCCACGACTAC	59	
RT_kph27_fw	GTGCAGGACATGTCGCC	62	
RT_kph27_rv	GCGTCTTCTCCCTGCGCG	59	
RT_kph28_fw	GTCAGTCCGGAGAGCTCGCC	61	
RT_kph28_rv	GGTGCTGGACGGTGACGAG	62	
RT_kph29_fw	CTGGTTGTAGCGCATCGGG	59	
RT_kph29_rv	GTCGCGCTCTGGGTCGAC	61	
RT_kph31_fw	CATCACGATCAGGTCGCTG	56	
RT_kph31_rv	GACCGGGACGAACTGGAG	58	

3.1.5 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Na-Acetat	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0	
Orange G-Auftragemix	Tris/HCl	10 mM
	Xylencyonol	0,03% w/v
	Orange G	0,2% w/v
	Glycerin	60% w/v
	EDTA	6 mM
	pH 7,5	
Ethidiumbromidfärbelösung	Ethidiumbromid (EtBr)	5 µg/mL in H ₂ O _{deion}
Herstellung kompetenter Zellen	CaCl ₂	100 mM
	Glycin	15% v/w

Puffer für alkalische Lyse	P1	Tris	50 mM
		EDTA	10 mM
		RNase A	10 µg/mL
		pH 8,0	
	P2	NaOH	0,2 M
		SDS	0,1%
P3	K-Acetat	3 M	
		pH 5,2	

P-Puffer	Saccharose	10%
	Spurenelementlösung	2%
	K ₂ SO ₄	1,4 mM
	MgCl ₂	10 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
	TES	25 mM
	Alle Lösungen werden getrennt autoklaviert.	

T-Puffer	PEG 2000	3 g
	P-Puffer	10 mL

Spurenelementlösung	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
	ZnCl ₃	40 mg
	auf 1 L mit H ₂ O _{deion} auffüllen	

Sporenisolierungslösung	Glycerin	20%
	Tween80	0,1%

TE-Puffer	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0	
RNase-Killer	NaOH	40 mM
	EDTA	1 mM
Kirby-Mix	N-Lauroylsarcosin	1% w/v
	Na-p-Aminosalicylsäure	6% w/v
	Phenol-Chloroform (1:1 pH 7)	6% w/v
	Tris/HCl	50 mM
	pH 8,3	
Phosphatpuffer	1 M KH ₂ PO ₄	67% v/v
	1 M K ₂ HPO ₄	33% v/v
	pH 7,0 mit 1 M KH ₂ PO ₄ einstellen	

3.1.6 Antibiotika und Zusätze zu Selektivplatten und -medien

Antibiotikum/Zusatz	Arbeitskonzentration	Lösungsmittel	Bezug
Actinomycin D	10 µg/mL	Methanol	Serva
Ampicillin	150 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
Apramycin	100 µg/mL für <i>E. coli</i> 50 µg/mL für <i>S. spp.</i>	H ₂ O _{deion}	Sigma
Bacitracin	100 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Applichem
Chloramphenicol	25 µg/mL	70% EtOH	Serva
Erythromycin	50 µg/mL	70% EtOH	Roth
Fosfomycin	50 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
Gentamycin	20 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
IPTG	200 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
Kanamycin	50 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
Nalidixinsäure	30 µg/mL	0,2 M NaOH	Applichem
Nystatin	50 µg/mL	MeOH	Calbiochem
Penicillin	50 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Roth

Antibiotikum/Zusatz	Arbeitskonzentration	Lösungsmittel	Bezug
PTT	200 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Alfa Aesar
Streptomycin	50 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
Tetracyclin	25 µg/mL	70% EtOH	Serva
Thiostrepton	50 µg/mL	DMSO	Sigma
Vancomycin	50 µg/mL	H ₂ O _{deion}	Sigma
X-Gal	20 µg/mL	DMF	Applichem

3.1.7 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agar	Sigma
Bacto Pepton	BD
Baumwollsamensamen	Merck
Bromphenolblau	Serva
CaCl ₂	Roth
CaCO ₃	Merck
Casaminsäuren	BD
Caseinhydrolysat	Sigma
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	Fluka
Cycloheximid	Serva
Dextrose	Roth
DMSO	Merck
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Ethylacetat	Merck
EtOH	Merck
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
Ficoll-400	Sigma
Fischmehl	Sigma
Fleischextrakt	Difco
Glucose	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Applichem
Hafermehl	Holo

Chemikalie	Bezugsquelle
Hefeextrakt	Oxoid
Huminsäure	Sigma
Inositol	Fluka
K ₂ HPO ₄	Fisher
K ₂ SO ₄	Riedel-de Haen
K-Acetat	Applichem
KCl	Sigma
KH ₂ PO ₄	Calbiochem
LB-Pulver	Sigma
L-Prolin	Applichem
Maisstärkepulver	Sigma
Malzextrakt	Oxoid
Mannitol	Merck
MeOH	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Fisher
MOPS	Roth
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na ₂ SO ₄	Sigma
Na-Acetat	Roth
NaCl	Sigma
NaOH	VWR
Natrium-L-Glutamat	Merck
Na-p-Aminosalicylsäure	Fluka
NB-Pulver	BD
NH ₄ Cl	Roth
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	Merck
NH ₄ NO ₃	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₂	Roth
p-Aminobenzoessäure	Merck
PEG 2000	Merck
Pepton	BD
Pepton aus Casein	Merck
Phenol-Chloroform (1:1 pH 7)	Roth

Chemikalie	Bezugsquelle
Riboflavin	Merck
Saccharose	Roth
Salzsäure	Fisher
SDS	Serva
Seesalz	Sigma
Sojamehl vollfett	Hensel
Stärke (löslich)	Sigma
TES	Appllichem
Thiamin-HCl	Serva
Tri-Na-Citrat x 2H ₂ O	Normapur
Tris	Fluka
Trypton	BD
ZnCl ₃	Merck

3.1.8 Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Genomic-tip 100/G-Kit	Isolierung genomischer DNA	Qiagen
Microspin S-400 HR Columns	Aufreinigung von PCR-Produkten	GE Healthcare
PCR Cloning Kit	Direktklonierung von <i>Taq</i> -generierten PCR Produkten	Qiagen
peqGold Bacterial DNA Kit	Isolierung genomischer DNA	peqlab
peqGold Gel Extraction Kit	Gelextraktion von DNA	peqlab
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Midipräp von Plasmiden	Promega
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Herstellung von cDNA	ThermoFisher
<i>Taq</i> DNA-Polymerase Kit mit Coral Load PCR-Puffer	PCR	Qiagen

3.1.9 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Achromopeptidase	Sigma
DNase I (RNase frei)	Fermentas
Hühnereiweißlysozym	Serva

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Roth
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher und New England Biolabs
RNAse A	Thermo Fisher
T4-Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Genaxxon

3.2 Isolierung von Aktinomyceten aus Bodenproben

Die eine Woche an der Luft getrocknete, unsterile Bodenprobe wird mit Mörser und Stößel zerkleinert und durch ein Sieb mit 500 μm großen Maschen gesiebt. 0,5 g der Probe wird in 5 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ suspendiert und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ auf das 10^{-1} -, 10^{-2} - und 10^{-3} -fache verdünnt. Jeweils 200 μL der Suspensionen werden auf HV-Agarplatten ausgestrichen und bei 27°C zwei bis drei Wochen inkubiert. Die Einzelklone werden auf SYP2-Agarplatten übertragen und können anschließend für Bioaktivitätstests eingesetzt werden. Durch die im Folgenden beschriebenen Methoden kann auf spezielle Aktinomyceten selektioniert werden. Die Vorbehandlungen finden vor dem Suspendieren der Bodenproben statt.

3.2.1 Isolierung von Streptomyceten durch Trockenhitze

Mit der Trockenhitzemethode können speziell Streptomyceten aus Bodenproben isoliert werden, da nur die hitzetoleranten Sporen die Hitze überleben.

Die Probe wird bei 100°C für 40 min inkubiert und in einem Desikkator auf 27°C abgekühlt. Eine Spatelspitze wird auf HV-Agarplatten verteilt und der Ansatz bei 27°C zwei bis drei Wochen inkubiert.

3.2.2 Isolierung von Streptomyceten durch die SDS-Hefemethode

Mit der SDS-Hefemethode können Streptomyceten aus Bodenproben isoliert werden, da nur Sporen die Behandlung mit dem Detergens SDS überleben. Der Hefeextrakt initiiert das Auskeimen der Spore.

0,5 g der Probe werden mit 5 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ vermischt und für 30 s gevortext. Die Probe wird für 30 s stehen gelassen, damit sich die festen Bestandteile absetzen. Daraufhin werden sofort 500 μL des Überstandes in 4,5 mL SDS-Hefemedium überimpft. Die Kultur wird für 20 min bei 40°C inkubiert, um die Sporenauskeimung zu induzieren, und dann mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ zeh-, 100- und 1000-fach verdünnt. Jeweils 200 μL der Suspensionen werden auf HV-Agarplatten ausgestrichen und bei 27°C zwei bis drei Wochen inkubiert.

3.3 Anzucht und Aufbewahrung

3.3.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Definierte Mengen LB Medium, bei Bedarf mit Antibiotika-Zugabe, werden im Reagenzglas oder im Erlenmeyerkolben mit einer *E. coli*-Flüssigkultur, einem Glycerinstock oder mit einer Einzelkolonie beimpft und ü/N bei 37°C und 180 rpm im Luftschüttler inkubiert.

Für Wachstum auf Festmedien werden *E. coli*-Zellen aus einer Flüssigkultur, einem Glycerinstock oder eine Einzelkolonie auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C ü/N inkubiert.

3.3.2 Anzucht von Aktinomycceten

Definierte Mengen Medium, bei Bedarf mit Antibiotika-Zusatz, werden im Erlenmeyerkolben mit Schikane und Metallspirale aus einer Flüssigkultur, einem Glycerinstock, einer Sporensuspension oder mit einem bewachsenen Agarblock beimpft und für ein bis sieben Tage bei 27°C und 180 rpm im Luftschüttler inkubiert.

Für Wachstum auf Festmedien werden Streptomycceten-Zellen aus einer Flüssigkultur, einem Glycerinstock, einer Sporensuspension oder eine Einzelkolonie auf Agarplatten ausgestrichen und bei 27°C für drei bis sieben Tage inkubiert.

3.3.3 Aufbewahrung in Glycerol

Eine Bakterienkultur wird im Verhältnis 4:1 mit 90%igem Glycerol gemischt und bei -20°C eingefroren.

3.3.4 Isolierung von Streptomyccetensporen

Die Streptomycceten werden auf MS-Platten ausgestrichen und bis zur Sporulation bei 27°C inkubiert. Auf die Agaroberfläche werden 5 mL einer Sporenisolierungslösung gegeben und die Sporen mit einer Glaspipette abgeschwemmt. Die Sporen werden durch sterile Watte filtriert, um Mycelreste abzutrennen, und anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min pelletiert. Die Sporen werden in 0,5-1 mL 50% Glycerin resuspendiert und können in Schraubdeckelgefäßen bei -20°C gelagert werden.

3.4 Bioaktivitätstests

3.4.1 Blöckchentest

Ein gängiger und einfacher Test, mit dem die Bioaktivität von Mikroorganismen getestet werden kann, ist der Blöckchentest. Zur Feststellung der Wirkstoffproduktion werden die zu testenden Stämme auf Agar angezogen und bewachsene runde Agarblöckchen (\varnothing 8 mm) herausgestochen. Die Blöckchen werden auf Bioassayplatten aufgelegt und inkubiert. Die Bioaktivität lässt sich an der Bildung von Hemmzonen ablesen. Der Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe wird vermessen.

3.4.2 Antibiotika-Extraktion aus Festmedien

Der zu untersuchende Streptomyccetenstamm wird auf Agarplatten mit Produktionsmedium ausgestrichen und sieben bis zehn Tage bei 27°C inkubiert. Anschließend wird der Agar in Blöckchen geschnitten und diese in 50 mL Falcon-Tubes überführt. Das Röhrchen wird für 30 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert und der wässrige Überstand abgenommen. Dieser wird in der Genevac EZ-2 Elite (SP Scientific) auf 20% des ursprünglichen Volumens eingengt. Der Überstand kann für Bioaktivitätstest oder HPLC-Analysen verwendet werden.

3.4.3 Hemmhoftests mit Kulturextrakt und Agarüberstand

Filterrondelle (\varnothing 6 mm) werden in eine Petrischale gelegt und dreimal mit 20 μ L Extrakt bzw. Überstand versetzt. Das Lösungsmittel wird bei RT verdampft. Die Filterrondelle werden auf die Testplatten aufgelegt und ü/N inkubiert. Der Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe wird vermessen.

3.4.4 Herstellung von Testplatten für Agardiffusionstests

3.4.4.1 Herstellung von *Escherichia coli* K12-Testplatten

In flüssigen LB-Agar werden Zellen einer ü/N Kultur *E. coli* K12 im Verhältnis 1:100 eingegossen und in Petrischalen pipettiert. Die Platten können bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.2 Herstellung von *Escherichia coli* WM6242-Testplatten

Eine ü/N Kultur von *E. coli* WM6242 wird auf eine $OD_{600}=0,8$ angezogen. Flüssiger LB-Agar wird mit 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ der Kultur sowie 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ IPTG versetzt und in Platten gegossen. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.3 Herstellung von *Bacillus subtilis*-Testplatten

Eine vier bis sieben Tage alte Kultur von *B. subtilis* wird geerntet (10 min, 5000 rpm, 4°C) und zweimal mit 20 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gewaschen. Nach Aufnahme in 15 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ wird die Suspension im 70°C warmen Wasserbad zur Abtötung verbleibender vegetativer Zellen inkubiert. 10 mL/L der Sporensuspension werden in *B. subtilis*-Testagar eingegossen. Die Agarplatten können bei 4°C gelagert werden. Die restlichen Sporen werden bei -20°C gelagert. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.4 Herstellung von *Micrococcus luteus*-Testplatten

M. luteus-Zellen werden von einer Platte abgekratzt und flächig auf HM-Agarplatten ausgestrichen. Diese Platten können direkt für Hemmhoftests verwendet werden. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 27°C inkubiert.

3.4.4.5 Herstellung von *Pseudomonas fluorescens*-Testplatten

P. fluorescens-Zellen werden von einer Platte abgekratzt und flächig auf HM-Agarplatten ausgestrichen. Diese Platten können direkt für Hemmhoftests verwendet werden. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 27°C inkubiert.

3.4.4.6 Herstellung von *Staphylococcus carnosus*-Testplatten

In flüssigen LB-Agar werden Zellen einer ü/N Kultur von *S. carnosus* im Verhältnis 1:100 eingegossen und in Petrischalen pipettiert. Die Platten können bei 4°C bis zu zwei Wochen aufbewahrt werden. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.7 Herstellung von *Staphylococcus aureus*-Testplatten

Eine Bodenschicht von 15 mL Müller-Hinton-Agar wird in Petrischalen gegossen und getrocknet. Die Bodenschicht wird mit 5 mL Müller-Hinton-Weichagar (Agar- $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ Mischung 1:1), der 0,5 v/v% einer ü/N Kultur in LB-Medium von *S. aureus* enthält, überschichtet. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.8 Herstellung von *Candida albicans*-Testplatten

Eine Bodenschicht von 15 mL Saboraud-Agar wird in Petrischalen gegossen und getrocknet. Die Bodenschicht wird mit 5 mL Saboraud-Weichagar (Agar-H₂O_{deion} Mischung 1:1), der 0,5 v/v% einer ü/N Kultur von *C. albicans* enthält, überschichtet. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

3.4.4.9 Herstellung von *Saccharomyces cerevisiae*-Testplatten

50 mL HM-Medium werden mit einem Glycerinstock *S. cerevisiae* beimpft und für zwei Tage als Standkultur bei 27°C inkubiert. 10 mL/L der Kultur werden in HM-Agar eingegossen. Die Agarplatten können bei 4°C gelagert werden. Für Bioassays werden die Platten für zwei Tage bei 27°C inkubiert.

3.4.4.10 Herstellung von *Botrytis cinerea*-Testplatten

Ein von *B. cinerea* bewachsenes Agarblöckchen wird auf eine KIV-Agarplatte aufgelegt. Diese Platten können direkt für Hemmhoftests verwendet werden. Für Bioassays werden die Platten für 14 Tage bei RT im Dunkeln inkubiert.

3.4.4.11 Herstellung von Aktinomyceten-Testplatten

Aktinomyceten-Zellen werden von einer Platte abgekratzt oder einem Glycerolstock bzw. einer Flüssigkultur entnommen und flächig auf HM-Agarplatten ausgestrichen. Diese Platten können direkt für Hemmhoftests verwendet werden. Für Bioassays werden die Platten ü/N bei 27°C inkubiert.

3.4.5 Durchführung von wirkortspezifischen Bioassays

3.4.5.1 *B. subtilis* basierter Promotor-Reporter-Assay

Die *B. subtilis* basierten Promotor-Reporter-Assays wurden in der AG Prof. H. Brötz-Oesterhelt (Universität Tübingen) durchgeführt. Sie dienen dazu, den Angriffsort von Antibiotika festzustellen.

B. subtilis-Zellen sind mit induzierbaren Promotoren transformiert worden. Diese werden jeweils von Antibiotika mit bestimmten Targets aktiviert. Daraufhin induzieren die Promotoren die Expression der nachgeschalteten *lacZ*-Gene. Um eine Blaufärbung der Zellen zu ermöglichen, wird in den Agar des Testplatte X-Gal und IPTG eingegossen. Zusätzlich wird das Wachstum der *B. subtilis*-Zellen durch antibiotische Aktivität der Probe inhibiert. So entsteht eine Hemmhofzone um die Probe. Wenn der Promotor induziert wird, färben sich nur die Zellen am Rand dieser Zone, da bis dorthin das Antibiotikum diffundiert ist, sodass ein blauer Ring um die Probe entsteht.

Folgende Promotoren sind entwickelt worden: Der Promotor *yorB* wird durch Substanzen induziert, welche in die DNA-Synthese eingreifen bzw. die Vorstufen für die DNA Synthese hemmen oder teilweise für Substanzen, welche in die DNA interkalieren. *pps* durch Substanzen wird induziert, welche in die RNA-Synthese eingreifen. *ypuA* und *lial* werden durch Substanzen induziert, welche Zellwandstress verursachen.

3.4.5.2 SOS-Antwort Assay mit *S. lividans* TK64 Δ *recA*

Das Enzym RecA ist Teil der SOS-Antwort in Bakterien. Der *S. lividans* Stamm TK64 Δ *recA* ist besonders anfällig für Antibiotika, die die DNA angreifen, da die Deletion die SOS-Antwort beeinflusst. Für einen Agardiffusionstest mit Agarblöckchen oder Agarüberstand wird TK64 Δ *recA* bzw. TK64 WT flächig auf HM-Festmedium ausgestrichen und für 10 s UV-C-Strahlung (280 bis 100 nm) ausgesetzt, um DNA-Schädigungen zu verursachen. Auf die so vorbereiteten Testplatten werden die Proben aufgelegt. Als Positiv-Kontrolle dient Actinomycin D oder der Actinomycin-Produzent *Streptomyces antibioticus*. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 27°C werden die Hemmhofzonen vermessen.

3.5 DNA-Transfer bei Bakterien

3.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der CaCl₂-Methode

50 mL LB Medium werden mit 1 mL einer *E. coli* Novablue ü/N Kultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 bei 180 rpm und im Luftschüttler bei 37°C angezogen. Die Zellen werden geerntet (10 min, 5000 rpm, 4°C) und das Pellet in 5 mL eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneutem Pelletieren werden die Zellen in 20 mL eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wird ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 2 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ + 15% Glycerin resuspendiert und der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Bis zur Transformation werden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

3.5.2 Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen

10 μ L plasmidhaltige Lösung oder ein Ligationsansatz werden zu 200 μ L auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42°C werden die Zellen für 1 h bei 37°C in 1 mL LB-Medium inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min bei 13000 rpm und RT) wird das Pellet in 100 μ L LB-Medium aufgenommen. Die Suspension wird auf Selektionsmedien ü/N bei 37°C inkubiert.

3.5.3 Blau-weiß-Selektion von pDrive-Transformanden

In LB-Platten werden mit 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 1 M IPTG und 55 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 1 M X-Gal sowie Kanamycin zur Selektion eingegossen und die transformierten *E. coli*-Zellen auf Festagar ausplattiert. Die Platten werden bei 37°C ü/N inkubiert. Im Anschluss werden die weißen Klone gepickt und für weitere Experimente angezogen.

3.5.4 Protoplastierung und Polyethylenglycol-induzierte Protoplasten-transformation von Aktinomyceten

50 mL einer in S-Medium angezogenen zwei Tage alten Aktinomyceten-Kultur wird für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 mL P-Puffer mit 1 mg/mL Lysozym resuspendiert und für 10 bis 30 min bei 37°C geschüttelt. Dabei wird der Grad der Protoplastierung alle 5 min unter dem Mikroskop überprüft. Mit ca. 20 mL eiskaltem P-Puffer wird die Reaktion gestoppt. Um Mycelreste abzutrennen, wird der Ansatz durch sterile Watte filtriert und das Filtrat bei 4°C für 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 mL P-Puffer resuspendiert und zu 200 μL aliquotiert. Die Protoplasten können sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Zu einem 200 μL -Aliquot protoplastierter Zellen werden 10 bis 50 μL Plasmidlösung gegeben sowie 500 μL T-Puffer. Das enthaltene Polyethylenglycol (PEG) erleichtert die Aufnahme freier DNA. Der Ansatz wird auf zwei R5-Platten ausgestrichen und trocknen gelassen. Nach ca. 16 h werden die Platten mit jeweils 2 mL NB Weichagar, der ein Antibiotikum zur Selektion der Transformanden enthält, überschichtet. Die Platten werden für zwei bis fünf Tage bei 27°C inkubiert.

3.5.5 Transformation von Aktinomyceten durch Sporenkonjugation mit *E. coli* ET12567/pUZ8002

CaCl₂-kompetente *E. coli* ET12567/pUZ8002-Zellen werden mit dem zu klonierenden Plasmid transformiert und ü/N in 100 mL LB angezogen. Das Medium enthält Kanamycin, Chloramphenicol, um auf pUZ zu selektieren, und das Selektionsantibiotikum, dessen Resistenzkassette auf dem Plasmid abgelegt ist. 10 mL LB inklusive der oben aufgeführten Antibiotika werden mit 1 mL der ü/N-Kultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C inkubiert. Währenddessen werden 500 μL YT Medium mit 10⁸ Aktinomyceten-Sporen versetzt. Die Ansätze werden für 10 min einem Hitzeschock von 45°C ausgesetzt und dann auf 27°C abgekühlt. 0,5 mL der *E. coli* Zellsuspension und 0,5 mL der Sporensuspension werden gemischt und für 1 min bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wird bis auf 50 μL abgenommen und das Pellet darin resuspendiert. Eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ wird in je 100 μL H₂O_{deion} angelegt und jede Verdünnung auf MS-Agar + 10 mM MgCl₂ ohne Antibiotika ausgestrichen. Die Platten werden bei 27°C für 16 bis 20 h inkubiert. Danach werden die Platten mit 1 mL H₂O_{deion} + 20 μL Nalidixinsäure + 25 μL Selektionsantibiotikum überschichtet. Nach fünf bis sieben

Tagen Inkubation bei 27°C werden die gewachsenen Kolonien auf MS-Agar + 10 mM MgCl₂-Replikplatten mit Nalidixinsäure, dem Selektionsantibiotikum sowie jeweils mit und ohne Kanamycin übertragen. Doppelcrossover-Mutanten sind Kanamycin-sensitiv und dem Selektionsantibiotikum gegenüber resistent. Diese werden auf MS-Festmedium + 10 mM MgCl₂ + Nalidixinsäure + Selektionsantibiotikum vereinzelt und die Anwesenheit des Plasmids in den Einzelklonen durch PCR verifiziert.

3.5.6 Transformation von Aktinomyceten durch Elektroporation

50 µL einer Sporensuspension wird mit 5 µL Plasmidlösung versetzt und in einer Elektroporationsküvette (1 mm Tiefe) einem elektrischen Puls von 1.75 kV (100 Ω und 25 µF) ausgesetzt. Der Ansatz wird mit 1 mL R5-Medium vermischt und für 3 h bei 27°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wird auf HM-Festmedium + 10 mM MgCl₂, sowie auf MS-Festmedium + 10 mM MgCl₂ + 8 mM CaCl₂ + Selektionsantibiotikum ausgestrichen und fünf bis sieben Tage inkubiert. Selektionsantibiotikum-resistente Klone werden vereinzelt und die Anwesenheit des Plasmids in den Einzelklonen durch PCR verifiziert.

3.5.7 Blau-Weiß-Selektion von pGus21-Doppelcrossover-Mutanten

Die Insertion eines pGus21-Derivats ins Genom von Aktinomyceten wird durch eine der aufgeführten Transformationsmethoden generiert (s. 3.5.4, 3.5.5, 3.5.6). Die Aktinomycetensporen der Singlecrossover-Mutanten werden unter nicht-selektiven Bedingungen geerntet und Verdünnungsreihen auf Festmedium ausgestrichen. Nach zweitägiger Inkubation bei 27°C werden die Platten mit 2,5 mg X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Glucuronsäure) in 1mL H₂O_{deion} überschichtet. Klone, die weiß bleiben und sich nicht blau färben, lassen auf ein Doppelcrossover-Ereignis schließen.

3.6 Isolierung von Nukleinsäuren

3.6.1 Isolierung genomischer DNA mit dem peqGold Bacterial DNA Kit

Von einer zwei Tage alten, in R5 Medium angesetzten Streptomyceskultur werden 2 mL für 10 min bei 6500 rpm und RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µL TE resuspendiert und 100 µL Lysozymlösung (10 mg/mL in TE Puffer) zugegeben. Daraufhin wird der Ansatz erst für 10 min bei 37°C geschüttelt und dann unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µL Lysis Puffer T resuspendiert und für 30 min bei 60°C inkubiert, wobei der Ansatz währenddessen dreimal invertiert wird. Es werden 200 µL Binding Buffer hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Der Ansatz wird

auf eine Silicamembran-Säule geladen und 1 min bei 10300 rpm zentrifugiert. Daraufhin werden zweimal 650 µL Wash Buffer zugegeben und für 1 min bei 10300 rpm zentrifugiert. Zum Trocknen wird die Säule für 2 min bei 10300 rpm zentrifugiert und danach für 5 min bei 60°C restliches EtOH entfernt. Die Säule wird in ein 1,5 mL Eppendorf Tube überführt und 50 µL H₂O_{deion} zugegeben. Der Ansatz wird zunächst für 3 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 5500 rpm zentrifugiert. Der letzte Schritt wird wiederholt. Die gDNA kann bei -20°C gelagert werden.

3.6.2 Isolierung genomischer DNA mit dem Genomic-tip 100/G-Kit

Zur Genomisolierung wurden die Stämme für zwei Tage in R5 Medium bei 27°C angezogen. Die Lyse erfolgte unter Zugabe von Lysozym (10 mg/mL) und Achromopeptidase (5 mg/mL) wie zuvor beschrieben (48, 60, 61) Die genomische DNA wurde mit Hilfe des Genomic-tip 100/G-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.6.3 Reinigung von DNA durch Gelextraktion mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit

Die DNA wird auf einem 2% Agarosegel mit frischem TAE Puffer 20 min laufen gelassen und 10 min im EtBr-Bad gefärbt. Die Banden werden unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Gelstücke werden in einem Eppendorf-Gefäß 1:1 mit Binding Buffer versetzt. Der Ansatz wird für 10 min bei 50°C inkubiert und ab und zu invertiert bis das Gel geschmolzen ist. Der pH wird, wenn nötig, mit 3 M NaAc-Lösung auf 5,2 gebracht. Der Ansatz wird auf eine Silicamembran-Säule aufgetragen und für 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert. 300 µL Binding Buffer werden auf die Säule gegeben und die Säule für 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert. 2 x 750 µL Wash Buffer werden zupipettiert und erneut zentrifugiert. Zum Trocknen wird die Säule 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Die Säule wird in ein frisches 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und 40 µL H₂O_{deion} aufgetragen. Die Elution erfolgt durch Zentrifugation für 1 min bei 3500 rpm.

3.6.4 Aufreinigung von PCR Produkten mit Microspin S-400 HR Säulchen

PCR-Produkte werden mittels Microspin S-400-Säulchen von Primern und Pufferzusätzen getrennt. Nach Herstellerangaben werden die Säulchen in ein Auffanggefäß gestellt und bei 280 rpm und RT für 1 min abzentrifugiert. Daraufhin wird der gesamte PCR-Ansatz auf das Säulchen gegeben und das Eluat während einer zweiminütigen Zentrifugation bei RT und 280 rpm in einem frischen 1,5 mL Eppendorfgefäß aufgefangen. Die gereinigten PCR-Produkte können zur Sequenzierung verwendet werden.

3.6.5 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Alle Materialien und Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNasen zweimal autoklaviert.

3.6.5.1 Ernte der Zellen zur RNA-Isolierung aus Fest- und Flüssigkultur

Von den bewachsenen Agarplatten wird eine dünne Schicht mit Mycel bewachsenen Agars mit dem Skalpell abgetrennt und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und auf das Pellet das gleiche Volumen TE-Puffer gegeben. Daraufhin wird der Ansatz für 30 min bei RT im Überkopf-Schüttler geschüttelt.

3.6.5.2 Nukleinsäurefällung

1 mL der Suspension wird in Schraubdeckelgefäße mit 0,5 g Glassbeads gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 14800 rpm und RT, wird der TE-Puffer vollständig abgenommen. Unter dem Abzug wird das Pellet in 700 µL Kirby-Mix (RT) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt mit der Precellys™ 24 (PeqLab). Beim verwendeten Programm werden die Zellen bei 6500 rpm zweimal für 20 s homogenisiert. Dies wird nach fünfminütigem Abkühlen auf Eis wiederholt. Daraufhin werden 500 µL einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Suspension (25:24:1; RT) zum Ansatz gegeben und die Homogenisierung mit anschließender Abkühlung dreimal wiederholt.

Alle folgenden Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Zelltrümmer werden pelletiert und die RNA-haltige, obere, wässrige Phase mit 1 ml Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) gewaschen. Der Waschschrift wird so lange wiederholt, bis keine Interphase durch Proteinverunreinigungen mehr zu sehen ist. Die Nukleinsäuren werden mit 75 µL 4 M Na-Acetat (pH 6) und 750 µL Isopropanol (100%) mindestens 1 h bei -20°C aus der wässrigen Phase gefällt.

Die ausgefällten Nukleinsäuren werden zweimal mit 70% EtOH gewaschen (10 min, 1300 rpm, 4°C) und danach in 50 µL H₂O_{deion} gelöst.

3.6.5.3 DNA-Verdau

Für den ersten DNA-Verdau werden 4 µL DNase I (1 U/1 µL) und 6 µL DNase-Puffer (10 x) zu den Proben gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wird eine Gelkammer mit RNase-Killer 10 min inkubiert und ein frisches 1% Agarosegel gegossen. Per Gelelektrophorese wird bestimmt, ob RNA und rRNA vorhanden sind. Die RNA-Konzentration wird mit dem Nanodrop gemessen. Für den zweiten DNA-Verdau werden zu 60 µg RNA 8 µL DNase I und 8 µL DNase-Puffer gegeben und mit H₂O_{deion} auf 80 µL aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37°C für 1 h inkubiert. Eine PCR mit Primern für *housekeeping*-Gene (16S) dient zur Kontrolle auf DNA-Spuren. Wenn eine PCR-Bande zu erkennen ist, muss der Verdau verlängert werden. Als Positiv-Kontrolle dient die gDNA des Stammes.

3.6.5.4 Reverse Transkription

Die Konzentration an isolierter RNA wird mithilfe des Nanodrops bestimmt. Die Reaktion erfolgt in drei Schritten. Zunächst werden 3 µg RNA mit 1 µL *Random Hexamere* gemischt und mit RNase-freiem H₂O_{deion} auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 5 min bei 70°C inkubiert. Auf Eis werden 4 µl Reaction Buffer, 1 µl dNTPs, 1 µl EDTA und 3 µl RNase freies H₂O_{deion} hinzu pipettiert. Darauf erfolgt eine weitere Inkubation für 5 min bei 25°C. Nachdem 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben wurde, wird der Ansatz für 10 min bei 25°C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Die durch die RT-Reaktion gewonnene cDNA wird entweder direkt für die finale PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.7 Klonierungsexperimente

3.7.1 PCR mit *Taq*-Polymerase

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Ansatz:

H ₂ O _{deion}	12 µL
Q-solution	4 µL
10xPuffer	2 µL
dNTPs	0,4 µL
Primer fw	0,4 µL
Primer rv	0,4 µL
Templat	0,4 µL
<i>Taq</i> -Pol	0,4 µL

Programm:

T	t in min:s	
92 °C	2:00	
92 °C	0:30	} 35 Zyklen
T _m	0:30	
72 °C	pro 500 bp Fragmentlänge muss für die Amplifikation mit 30 s gerechnet werden.	
72 °C	5:00	

Zur Ermittlung der T_m wird der T_m Calculator von Thermo Scientific (166) verwendet.

3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten werden diese in einem 1 oder 2%igem Agaroseflachbettgel (7 cm Länge) aufgetrennt. TAE-Puffer wird als Laufpuffer verwendet und eine Spannung von 100 V für 25 min angelegt. Pro Tasche werden 5 µL Probe aufgetragen. Als Ladepuffer dient 1 µL OrangeG oder der CoralLoad PCR Buffer (Qiagen). Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wird das Gel nach dem Lauf für 10 min im EtBr-Bad gefärbt. Als Standard wird der 1 kb Generuler™ von Thermo Fisher verwendet (**Abbildung 13**). Er beinhaltet DNA-Fragmente der Größen 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 bp.

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

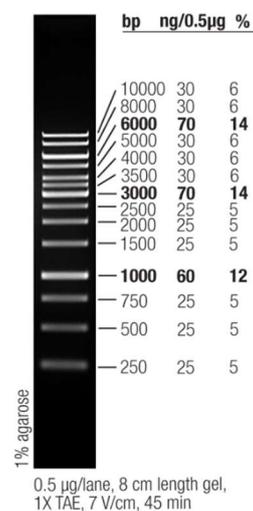


Abbildung 13: Generuler 1kb von Thermo Fisher.

3.7.3 Ligation

Alle weiteren Vektoren und Inserts werden zunächst enzymatisch verdaut und der Ligationsansatz wie folgt angesetzt:

H ₂ O _{deion}	3 µl
Ligasepuffer	2 µL
T4-DNA-Ligase	1 µL
Insert+Vektor	4 µl

Es werden pro Ligation drei Ansätze gemacht, wobei Insert und Vektor im Verhältnis 3:1, 5:1 und 7:1 gemischt werden. Die Ligation erfolgt bei RT ü/N.

3.7.4 pDrive Ligation

Als *E. coli*-Klonierungsvektor wird pDrive verwendet. pDrive liegt bereits linearisiert vor und trägt U-Überhänge an den 5'-Enden. PCR-Produkte können ohne weitere Restriktion mit pDrive ligiert werden,

da die *Taq*-Polymerase A-Überhänge generiert. Für die Ligation wird ein Mastermix aus T4-Ligase und Ligase-Puffer verwendet.

pDrive Vektor (linearisiert)	1 µL
2xpDrive Mastermix	4 µL
PCR Amplifikat	5 µL

Die Ligation erfolgt ü/N bei RT.

3.7.5 Plasmidisolierung aus *E. coli* durch alkalische Lyse

1 mL einer ü/N Kultur werden für 1 min bei 13000 rpm pelletiert und in 300 µL P1 resuspendiert. 300 µL P2 werden zugegeben und der Ansatz invertiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden 300 µL P3 zugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Nach weiterem Zentrifugieren für 15 min bei 13000 rpm erfolgt die Fällung der Plasmide aus dem Überstand durch Zugabe von 750 µL Isopropanol. Der Ansatz wird für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 500 µL 70% EtOH gewaschen. Nach dreiminütiger Zentrifugation wird das Pellet für 5 min bei 60°C getrocknet und anschließend in 30 µL H₂O_{deion} aufgenommen. Plasmide werden bei -20°C gelagert.

3.7.6 Restriktion von DNA

Für Restriktionen werden 2 µL 10xPuffer, 1 µL Plasmid- oder gDNA-Lösung und 1 µL Restriktionsenzym-Lösung eingesetzt und der Ansatz mit H₂O_{deion} auf 20 µL aufgefüllt. Die Restriktion erfolgt für mind. 1 h bei 37°C, bzw. nach Angaben des Herstellers.

3.8 Analytisch-chemische Methoden

3.8.1 Extraktion mit unpolaren organischen Lösungsmitteln

5 mL einer drei bis sieben Tage alten Kultur oder Agarüberstands werden 1:1 mit organischem Lösungsmittel versetzt und 30 min auf dem Über-Kopf-Schüttler geschüttelt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und RT wird der organische Überstand in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40°C und 0 mbar verdampft. Der Rückstand wird in 500 µL des eingesetzten Lösungsmittels gelöst. Die Lösung kann für HPLC-Analysen oder Bioaktivitätstests eingesetzt werden.

3.8.2 Extraktion mit polaren organischen Lösungsmitteln

5 mL einer drei bis sieben Tage alten Kultur oder Agarüberstands werden komplett eingeeengt und 1:1 mit organischem Lösungsmittel versetzt. Zunächst wird der Ansatz 15 min im Ultraschallbad resuspendiert und dann durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und RT wird der organische Überstand in einen Kolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40°C und 0 mbar verdampft. Der Rückstand wird in 500 µL des eingesetzten Lösungsmittels gelöst. Die Lösung kann für HPLC-Analysen oder Bioaktivitätstests eingesetzt werden.

3.8.3 HPLC Analyse

Chromatograph: HP 1090 M mit Diodenarray Detektionssystem und thermostatiertem Autosampler (Hewlett Packard, Waldborn)

Software: ChemStation for LC 3D, Rev. A08.03, Agilent Technologies

Stationäre Phase: Nucleosil C18,5 µm, 125 mm x 4,6 mm I.D. mit Vorsäule 20 mm x 4,6 mm I.D. (Grom)

Detektion: Mehrwellenlängen Detektion bei 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 und 500 nm

Injektionsvolumen: 5 µl

Fluss: 850 µl/min

Eluent: A: 0,1%ige Phosphorsäure
B: Acetonitril

Gradient:

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	95,5	4,5
15	0	100
18	0	100

Posttime: 5 min 0,45% B

3.9 Bioinformatische Webtools

3.9.1 EzTaxon

EzTaxon (167) ist ein Tool der EzBioCloud-Plattform, das die taxonomische Einordnung von *Bacteria* und *Archaea* anhand der 16S rRNA-Sequenz ermöglicht. Die phylogenetische Analyse erfolgt anhand von hierarchischer Klassifizierung und basiert auf der 16S-*maximum likelihood* Phylogenie. Dabei wird auf die Sequenzen der eigenen Genomdatenbank zurückgegriffen. Die Genomsequenzen werden zur

bestmöglichen Vergleichbarkeit nach demselben Verfahren annotiert. Dem Benutzer wird als Output der Stamm mit der größten Ähnlichkeit zur Suchsequenz angezeigt (167).

<https://www.ezbiocloud.net/identify>

3.9.2 Type Strain Genome Server

Mithilfe des **Type Strain Genome Server** (TYGS) (168) können Prokaryoten anhand ihrer Genomsequenz klassifiziert und identifiziert werden. Die phylogenetische Einordnung mittels TYGS basiert auf einer Genomdatenbank, in der die genomischen, taxonomischen und nomenklatorischen Daten von derzeit 9064 Typ-Stämmen hinterlegt sind. Die Datenbank wird ständig aktualisiert. Zur Einordnung eines oder mehrerer Genomsequenzen in einen phylogenetischen Stammbaum und der Bestimmung der zehn nächstverwandten Typ-Stämme anhand der 16S rRNA Sequenz aus dem Gesamtgenom, führt TYGS eine digitale DNA-DNA-Hybridisierung durch und bestimmt den GC-Gehalt. Der Spezies-*cutoff* liegt dabei bei 70% (168).

<https://tygs.dsmz.de/>

3.9.3 Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell

Das Ziel des Webtools **Antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell** (AntiSMASH) (169) ist die Integration aller verfügbaren Vorhersagemethoden zur Sekundärmetabolit-Biosynthese in einer einzigen benutzerfreundlichen Plattform. Dazu werden die identifizierten Regionen auf Genclusterlevel zu ihren nächsten Verwandten aus einer Datenbank, die alle bekannten Gencluster enthält, *aligned*. Dabei werden viele verfügbare Sekundärmetabolit-spezifische Genanalysemethoden in eine interaktive Darstellung integriert oder verlinkt. AntiSMASH liefert eine Vorhersage über die Anzahl der BGCs, deren Grenzen und die Antibiotika-Klasse. Außerdem gibt AntiSMASH Auskunft über die Ähnlichkeit zu anderen Clustern. Die einzelnen Cluster können im Detail auf Genebene angeschaut werden (169). Für diese Arbeit wurden die Grundeinstellungen verwendet.

<https://AntiSMASH.secondarymetabolites.org/#!/start>

3.9.4 Antibiotic Resistance Target Seeker

Das Ziel des Webtools **Antibiotic Resistance Target Seeker** (ARTS) (170) ist, große Mengen sequenzierter Daten automatisch zu filtern, um Antibiotika-Produzenten zu priorisieren. Dazu integriert ARTS *Target Directed Genome Mining* Methoden, Vorhersagen zu Antibiotika-Genclustern sowie *Essential Gene Screening*. Dabei wird ausgenutzt, dass Antibiotika-Produzenten sich gegen ihre eigenen Genprodukte schützen. Daher wird nach bekannten und putativen Resistenzmechanismen gesucht. Kriterien hierfür

sind die Duplikation von Genen, die Lokalisation der Gene innerhalb eines BGCs sowie horizontaler Gentransfer. Die Analyse erfolgt auf Basis des Outputs von AntiSMASH (s. 3.9.1). Die Ergebnisse werden interaktiv dargestellt (170).

Für diese Arbeit wurden der *Exploration Mode* verwendet, der auch Gene in die Analyse einschließt, die ursprünglich aus dem Primärmetabolismus stammen worden sind und im Sekundärmetabolismus dupliziert worden sind (170).

<https://arts3.ziemertlab.com/index>

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung und Priorisierung indonesischer Aktinomyceten

Ziel der Arbeit ist das Finden neuer Antibiotika aus unbekanntem indonesischen Aktinomyceten. Anhand indonesischer Stämme der Tübinger Stammsammlung sollten Protokolle zur genetischen Manipulation sowie zum Screening nach Antibiotika-Produzenten entwickelt und potenzielle Antibiotika-Produzenten charakterisiert werden. Zusätzlich wurden Habitats auf der indonesischen Insel Lombok beprobt und aus den Proben Aktinomyceten isoliert. Unter den neuen Isolat wurde ebenfalls nach Antibiotika-Produzenten gesucht.

4.1.1 Screening der Tübinger Stammsammlung nach Antibiotika-Produzenten

Die Tübinger Stammsammlung enthält 13 aus Java, Indonesien, stammende Aktinomyceten. Um aussichtsreiche Produzenten zu selektieren, wurde ein Auswahlverfahren durchlaufen, in dem die Stämme auf bereits bekannte Metabolite, Morphologie, taxonomische Einordnung, Bioaktivität und genetische Manipulierbarkeit hin untersucht wurden. Das Genom der so selektierten Stämme sollte sequenziert und mit bioinformatischen Methoden analysiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Schritte im Detail dargestellt.

Zehn der 13 Stämme der Tübinger Stammsammlung wurden als *Streptomyces* sp. klassifiziert, zwei als *Actinomyces* sp. und einer als *Micromonospora* sp. (**Tabelle 1**). Von Tü4099 ist bereits bekannt, dass er SEK 15 (171), SEK 43 (172) und Cosmomycin (173) produziert. Tü4134 produziert Questiomycin A (174) und Zink-Coproporphyrin (175). Da die Wirkstoffe dieser beiden Stämme bereits bekannt waren, wurden diese nicht für die Genomsequenzierung in Betracht gezogen.

Tabelle 1: Java-Stämme der Tübinger Aktinomyceten-Stammsammlung.

Tü-Nr.	Putatives Genus	Bekannte Sekundärmetabolite
Tü4097	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4099	<i>Streptomyces</i> sp.	SEK 15, SEK 43, Cosmomycin
Tü4100	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4101	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4103	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4104	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4106	<i>Streptomyces</i> sp.	-

Tü-Nr.	Putatives Genus	Bekannte Sekundärmetabolite
Tü4107	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4108	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4127	<i>Actinomyces</i> sp.	-
Tü4128	<i>Streptomyces</i> sp.	-
Tü4133	<i>Micromonospora</i> sp.	-
Tü4134	<i>Actinomyces</i> sp.	Questiomycin A, Zink-Coproporphyrin

4.1.1.1 Identifizierung geeigneter Anzuchtmedien und morphologische Charakterisierung

Um die phänotypischen Eigenschaften der Stämme zu untersuchen, wurden sie auf HM-, MS- und R5-Festmedium angezogen, welche Standardmedien für die Anzucht von Aktinomyceten darstellen. Neben Wachstum und Sporulation wurde auch die Pigmentierung der Stämme dokumentiert, da viele Sekundärmetabolite, wie z.B. Actinorhodin (176) oder Undecylprodigiosin (177) aus *S. coelicolor* (69), an ihrer charakteristischen Farbe zu erkennen sind. Sowohl die Pigmentierung der Sporen als auch die Farbstoffe, die ins Medium sekretiert werden, können also Hinweise auf die Biosynthese von Sekundärmetaboliten geben.

Alle Stämme wuchsen auf HM-, MS- und R5-Medium. Tü4103, Tü4133 und Tü4134 wuchsen besser auf HM und MS als auf R5. Tü4128 bildete auf R5 kein Luftmycel.

Tü4097 bildete gelbbraune Sporen und sekretierte ebenfalls braunen Farbstoff in das Festmedium. Die Sporen von Tü4099 waren schwach grün pigmentiert, während sich das Festmedium um die Zellen dunkelgrün verfärbte. Graubraunes Pigment färbte die Sporen von Tü4100, der dem umgebenden Medium einen gelben Ton verlieh. Tü4101 bildete dunkelgraue Sporen und sekretierte braunen Farbstoff ins Medium. Die Sporen von Tü4103 waren hellgrau pigmentiert, während sich das Festmedium um die Zellen gelb verfärbte. Graues Pigment färbte die Sporen von Tü4104, der dem umgebenden Medium einen gelben Ton verlieh. Zudem bildeten sich Flüssigkeitstropfen auf dem Bakterienrasen. Tü4106 bildete hellgraue Sporen und sekretierte intensiv blauen Farbstoff ins Medium. Die Sporen von Tü4107 waren dunkelbraun pigmentiert, während sich das Festmedium um die Zellen orange verfärbte. Graues Pigment färbte die Sporen von Tü4108, der dem umgebenden Medium einen dunkelorange-farbenen Ton verlieh. Tü4127 bildete grau-gelbe Sporen und sekretierte gelben Farbstoff in Medium. Die Sporen von Tü4128 waren dunkelgrau pigmentiert, während sich das Festmedium um die Zellen orange verfärbte. Tü4133 bildete kein Luftmycel, da es sich um eine *Micromonospora* sp. handelt, bildete aber orangefarbenes und schwarzes Pigment. Tü4134 bildete dunkelgraue Sporen und sekretierte dunkelorange-farbenen Farbstoff ins Medium (**Abbildung 14**).

Für weitere Experimente konnten nachgewiesen werden, dass alle Stämme auf HM-, MS- oder R5-Festmedium angezogen werden können. Besonders auffällig waren das grüne Pigment von Tü4099

sowie die intensive Blaufärbung des Pigments von Tü4106. Die Färbung deutet auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hin.



Abbildung 14: Morphologie der untersuchten javanischen Stämme auf HM-Agar.

4.1.1.2 Beurteilung der Bioaktivität der Java-Stämme gegen Gram-positive und Gram-negative Testbakterien

Ein wichtiges Kriterium zur Priorisierung der zu sequenzierenden Stämme war ihre Bioaktivität gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Testbakterien. Um die Bioaktivität der 13 Java-Stämme zu untersuchen, wurden sie auf R5-, HM- und MS-Agar bei 27°C für fünf Tage inkubiert und dann in Blöckchentests auf ihre Aktivität gegen die Gram-positiven Bakterien *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus carnosus* und *Bacillus subtilis* sowie gegen den Gram-negativen Organismus *Escherichia coli* getestet. Als Nachweis der Bioaktivität galt die Bildung eines Hemmhofs um das Agarblöckchen. Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde bestimmt.

Keiner der getesteten Stämme bildete einen Hemmhof gegen *E. coli*. Tü4097, Tü4103 und Tü4134 zeigten Aktivität gegen alle getesteten Gram-positiven Organismen (**Tabelle 2**). Dabei zeigten Tü4097 und Tü4103 fast ausschließlich Aktivität, wenn sie auf R5 gewachsen waren. Kulturen von Tü4134 zeigten nur Aktivität, wenn sie auf HM- oder MS-Festmedium gewachsen waren. Tü4100 und Tü4128 bildeten Hemmhöfe gegen *B. subtilis* und *M. luteus* unabhängig vom Medium, auf dem sie gewachsen waren. Tü4101 und Tü4106 zeigen jeweils nur gegen *M. luteus* Aktivität und Tü4104 nur gegen *B. subtilis*, unabhängig vom Medium. Tü4099 zeigt Aktivität gegen *B. subtilis*, wenn der Stamm auf HM oder R5 angezogen wurde. Tü4107 und Tü4108 zeigten nur gegen *M. luteus* Aktivität. Der einzige Stamm ohne antibiotische Aktivität war Tü4133, der in früheren Studien als *Micromonospora* identifiziert worden war (**Tabelle 2**).

Bis auf Tü4133 weisen alle untersuchten Stämme Bioaktivität gegen mindestens einen der Gram-positiven Testorganismen auf. Tü4133 wurde daher in weiteren Versuchen ausgelassen. Für alle Stämme wurde mindestens ein Medium gefunden, auf dem eine bioaktive Substanz produziert wurde. Allerdings konnte bei keinem der Stämme Aktivität gegen das Gram-negative *E. coli* detektiert werden. Die beste

Bioaktivität zeigten Tü4097, Tü4100, Tü4103, Tü4128 und Tü4134, da sie ein breites Wirkspektrum und gleichzeitig Hemmhöfe mit großem Durchmesser aufwiesen. Sie kommen daher in die engere Auswahl zur Gesamtgenomsequenzierung.

Tabelle 2: Größe der Hemmhofzonen in mm, die die Java-Stämme gegen *B. subtilis*, *M. luteus* und *S. carnosus* verursachen.

Stamm	<i>B. subtilis</i>			<i>M. luteus</i>			<i>S. carnosus</i>		
	HM	R5	MS	HM	R5	MS	HM	R5	MS
Tü4097	0	19	0	0	13	0	0	15	0
Tü4099	11	19	0	0	0	0	0	0	0
Tü4100	15	11	14	0	0	12	0	0	0
Tü4101	0	0	0	1	1	12	0	0	0
Tü4103	14	0	11	0	11	0	0	13	0
Tü4104	14	11	15	0	0	0	0	0	0
Tü4106	0	0	0	12	18	8	0	0	0
Tü4107	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Tü4108	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Tü4127	12	23	0	0	0	0	0	0	0
Tü4128	13	0	19	0	13	0	0	0	0
Tü4133	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tü4134	18	0	19	2	0	17	0	0	12

Die Stämme wurden auf den Festmedien HM, MS und R5 angezogen. Grau hervorgehoben sind die Stämme mit der besten Bioaktivität.

4.1.1.3 Taxonomische Einordnung der Java-Stämme anhand der 16S rRNA

Zur taxonomischen Einordnung wurde die genomische DNA der Stämme mit dem peqGold Bacterial DNA Kit isoliert und die 16S rRNA-Sequenzen mit den Primern 27Fbac und 1492Runi amplifiziert. Die Fragmente wurden mit Microspin S-400 HR Säulchen aufgereinigt und die gereinigten Produkte in pDrive eingebracht. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit den Konstrukten transformiert. Die Plasmide wurden aus *E. coli* isoliert und sequenziert (MWG Eurofins). Die 16S Sequenz wurde mit Hilfe des Webtools EzTaxon auf ihre taxonomische Einordnung hin untersucht.

Die Analyse mit EzTaxon ergab, dass es sich bei allen Stämmen um *Streptomyces* sp. handelt, außer Tü4103, der als *Kitasatospora* klassifiziert wurde (Tabelle 3). Als seltenen Aktinomyceten macht ihn das für diese Arbeit besonders interessant.

Tabelle 3: Taxonomische Einordnung der javanischen Stämme mittels EzTaxon.

Stamm	Ähnlichkeit	Top Hit Strain
Tü4097	99,59%	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475(T)
Tü4099	99,45%	<i>Streptomyces iakyrus</i> NRRL ISP-5482(T)
Tü4100	99,93%	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812(T)
Tü4101	99,58%	<i>Streptomyces violaceorectus</i> NBRC13102(T)

Stamm	Ähnlichkeit	Top Hit Strain
Tü4103	99,15%	<i>Kitasatospora cheerisanensis</i> KCTC 2395(T)
Tü4104	99,47%	<i>Streptomyces koyangensis</i> VK-A60(T)
Tü4106	99,78%	<i>Streptomyces hokutonensis</i> R1-NS-10(T)
Tü4107	99,17%	<i>Streptomyces mirabilis</i> NBRC 13450(T)
Tü4108	99,67%	<i>Streptomyces virginiae</i> NRRL ISP-5094(T)
Tü4127	99,79%	<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475(T)
Tü4128	99,89%	<i>Streptomyces malachitospinus</i> NBRC 101004(T)
Tü4134	99,57%	<i>Streptomyces enissocaelsilis</i> B-16365(T)

4.1.1.4 Etablierung eines Transformationsprotokolls zur genetischen Manipulation

Für spätere Klonierungen sollte ein für die Java-Stämme geeignetes Transformationsprotokoll entwickelt werden. Als Testplasmid für die Transformation diente der *E. coli-Streptomyces* Shuttle-Vektor pGM190. Für die Transformation wurde ein etabliertes Protokoll zur PEG-induzierten Protoplastentransformation in folgenden Punkten variiert:

1. Anzuchtmedium: R5 oder S
2. Anzuchtzeit: 1 bis 3 Tage
3. Zelllyse: 5 bis 30 min
4. PEG: 1000 oder 2000

Zur Anzucht eignete sich S-Medium für Tü4097, Tü4099, Tü4100, Tü4103, Tü4104, Tü4107 und Tü4134 am besten. Tü4101, Tü4106, Tü4108, Tü4127 und Tü4128 konnten nur in R5-Medium angezogen werden (**Tabelle 4**). Im Durchschnitt konnten alle Stämme nach zwei Tagen geerntet und im Anschluss lysiert werden. In der benötigten Zeit für die Lyse mit Lysozym unterschieden sich die Stämme am meisten. Tü4099, Tü4101, Tü4106 und Tü4108 benötigten bis zu 30 min, um zu lysieren. Tü4127 und Tü4128 waren nach 15 min lysiert. Bei Tü4097, Tü4100, Tü4103, Tü4107, und Tü4134 erfolgte die Lyse innerhalb von 10 min. Für alle Stämme eignete sich zur Transformation PEG2000 besser als PEG1000. Alle Transformanden regenerierten auf R5-Festmedium. Die Selektion erfolgte auf LB-Festmedium + Kanamycin. Für jeden Stamm konnten Kanamycin-resistente Klone erhalten werden. Demnach waren alle Stämme genetisch manipulierbar. Ein für alle Stämme anwendbares Protokoll konnte nicht entwickelt werden, da sich die Stämme in ihrem Anzuchtmedium und in der Lysezeit deutlich unterscheiden. Gemein haben alle Protokolle eine Anzuchtzeit von zwei Tagen und den Einsatz von PEG2000. Das ermöglicht spätere Klonierungsversuche.

Tabelle 4: Optimale Protoplastierungs-, Transformations- und Selektionsbedingungen für die javanischen Stämme.

Protoplastenherstellung				Transformation		Selektion
Stamm	Flüssigmedium	Anzucht	Lysezeit	PEG	Regeneration	
Tü4097	S	2-3 Tage	5-10 min	2000	R5	LB
Tü4099	S	2-3 Tage	20-30 min	2000	R5	LB
Tü4100	S	2-3 Tage	5-10 min	2000	R5	LB
Tü4101	R5	1-2 Tage	20-30 min	2000	R5	LB
Tü4103	S	2-3 Tage	5-10 min	2000	R5	LB
Tü4104	S	1-2 Tage	5-10 min	2000	R5	LB
Tü4106	R5	1-2 Tage	20-30 min	2000	R5	LB
Tü4107	S	2-3 Tage	5-10 min	2000	R5	LB
Tü4108	R5	1-2 Tage	30 min	2000	R5	LB
Tü4127	R5	1-2 Tage	15 min	2000	R5	LB
Tü4128	R5	1-2 Tage	15 min	2000	R5	LB
Tü4134	S	1-2 Tage	5-10 min	2000	R5	LB

4.1.1.5 Priorisierung von vier Java-Stämmen für weitere Studien und zur Gesamtgenom-Sequenzierung

Vier der 13 Stämme wurden für weitere Studien und eine Gesamtgenom-Sequenzierung ausgewählt. Da Tü4099 und Tü4134 zwar eine sehr gute Bioaktivität aufwiesen, aber schon in früheren Studien näher charakterisiert wurden und die Sekundärmetabolite, die sie produzieren, bekannt sind, wurden diese beiden Stämme ausgeschlossen. Tü4097 und Tü4100 zeigten ebenfalls eine sehr gute Bioaktivität. Beide wurden bisher nicht näher charakterisiert. Tü4106 wurde wegen seiner Bioaktivität und der intensiv blauen Pigmentierung, die vermutlich auf die Produktion eines Sekundärmetaboliten zurückzuführen ist, ausgewählt. Tü4103 ist nicht nur wegen seiner guten Bioaktivität ein aussichtsreicher Antibiotika-Produzent, sondern auch weil er als *Kitasatospora* sp. zu den seltenen Aktinomyceten gehört. Da die seltenen Aktinomyceten weniger ubiquitär und weniger erforscht sind als Streptomyceten (2), lohnt es sich, die Vertreter dieser Gruppe näher zu untersuchen.

4.1.1.6 Bioaktivität gegen die eukaryotischen Testorganismen *S. cerevisiae* und *B. cinereae*

Um die Bioaktivität nicht nur gegen prokaryotische (s. 4.1.1.2), sondern auch gegen eukaryotische Organismen zu untersuchen, wurden Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 in Blöckchentests auf ihre Wirkung auf *S. cerevisiae* und *B. cinereae* als Modellorganismen für Eukaryoten und Pilze getestet. Dazu wurden die vier Stämme in drei Replikaten auf MS-Festmedium ausgestrichen und fünf Tage inkubiert.

Die Agarblöckchen wurden auf die Testplatten der beiden Modellorganismen aufgelegt und die *S. cerevisiae*-Testplatten für zwei Tage bei 27°C, die *B. cinereae*-Testplatten für 16 Tage ohne Lichteinwirkung bei 27°C inkubiert.

Tü4100 verursachte auf *S. cerevisiae*-Testplatten Hemmhöfe von durchschnittlich 21 mm. Tü4103 bildete auf *S. cerevisiae*-Testplatten durchschnittlich Hemmhöfe von 20 mm Durchmesser. Tü4097 und Tü4106 zeigten keine Aktivität gegen *S. cerevisiae*.

Tü4097 verursachte auf *B. cinereae*-Testplatten keine Hemmhöfe. Allerdings wurde das Blöckchen auch nicht vom Pilz überwachsen, wie es bei Tü4100 der Fall war. Tü4100 zeigte keine Aktivität gegen *B. cinereae*. Die Agarblöckchen von Tü4103 verursachten auf *B. cinereae*-Testplatten Hemmhöfe von durchschnittlich 23 mm. Von Tü4106 zeigte nur eines der drei Blöckchen Aktivität gegen *B. cinereae*. Dieser Hemmhof hatte einen Durchmesser von 40 mm.

Die Bioaktivitätstests gegen die beiden eukaryotischen Modellorganismen zeigten, dass Tü4103 eine fungizid wirkende Substanz produziert. Auch Tü4106 hat das Potential zur Produktion eines Fungizids, das allerdings unter den durchgeführten Bedingungen kaum produziert wurde.

Tabelle 5: Hemmhofdurchmesser in mm in Blöckchentests von Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 gegen die eukaryotischen Organismen *S. cerevisiae* und *B. cinereae*.

		Tü41097	Tü4100	Tü4103	Tü4106
<i>S. cerevisiae</i>	1	0	22	20	0
	2	0	22	20	0
	3	0	20	19	0
	Mittelwert	0	21	20	0
	Standardabweichung	0	0,94	0,47	0
		Tü41097	Tü4100	Tü4103	Tü4106
<i>B. cinereae</i>	1	0	0	20	0
	2	0	0	25	0
	3	0	0	25	40
	Mittelwert	0	0	23	13
	Standardabweichung	0	0,00	2,36	18,86

4.1.1.7 Sensitivitätstests gegen Antibiotika, die zur Selektion eingesetzt werden

Um zu prüfen, welche Antibiotika zur Selektion bei Klonierungsexperimenten eingesetzt werden können, wurden Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 auf MS-Festmedium mit Antibiotikazusatz ausgestrichen. Es wurde auf Resistenz gegen Penicillin, Ampicillin, Vancomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycin, Streptomycin, Kanamycin, Apramycin, Bacitracin, Thiostrepton und Fosfomycin getestet. Unter dieser Auswahl befinden sich die am häufigsten zur Selektion bei Klonierungsexperimenten verwendeten Antibiotika. Außerdem bilden diese Antibiotika ein breites Spektrum verschiedener Antibiotikaklassen ab. Nach vier bzw. sieben Tagen Inkubation bei 27°C wurde das Wachstum der javanischen Stämme dokumentiert.

Alle vier Stämme wuchsen schon nach vier Tagen auf Penicillin, Ampicillin, Chloramphenicol und Fosfomycin (**Tabelle 6**). Resistenz gegen diese Antibiotika ist für Aktinomyzeten nicht ungewöhnlich. Eingeschränkt zu Klonierzwecken einsetzbar sind Vancomycin, Tetracyclin, Streptomycin, Bacitracin und Thiostrepton, da jeweils mindestens einer der vier Stämme Resistenz gegen diese Antibiotika aufweist. Alle vier Stämme sind sensitiv gegenüber Kanamycin und Apramycin.

Es können also Plasmide zu Klonierzwecken verwendet werden, die eine Resistenz gegen Kanamycin oder Apramycin vermitteln.

Tabelle 6: Test auf Sensitivität der vier ausgewählten Java-Stämme gegen Selektionsantibiotika.

Antibiotikum	Tü4097	Tü4100	Tü4103	Tü4106
Penicillin	darkgray	darkgray	darkgray	darkgray
Ampicillin	darkgray	darkgray	darkgray	darkgray
Vancomycin	white	darkgray	darkgray	white
Chloramphenicol	darkgray	lightgray	lightgray	lightgray
Tetracyclin	white	darkgray	darkgray	white
Erythromycin	darkgray	darkgray	darkgray	white
Streptomycin	darkgray	lightgray	white	lightgray
Kanamycin	white	white	white	white
Apramycin	white	white	white	white
Bacitracin	white	darkgray	darkgray	lightgray
Thiostrepton	white	darkgray	white	white
Fosfomycin	darkgray	darkgray	darkgray	darkgray

weiß=kein Wachstum (Sensitivität).

hellgrau=Wachstum nach sieben Tagen (Resistenz)

dunkelgrau=Wachstum nach vier Tagen (Resistenz)

4.1.1.8 HPLC-Analyse zur Identifizierung bekannter Sekundärmetabolite

Die Wiederentdeckung bereits bekannter Antibiotika stellt ein Risiko bei der Suche nach neuen Wirkstoffen dar. Häufig werden Zeit und Ressourcen auf die Identifizierung eines bekannten Stoffes verschwendet. Um auszuschließen, dass die Stämme Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 bereits bekannte Antibiotika produzieren, wurde eine HPLC-Analyse mit Kulturextrakten der vier Stämme durchgeführt. Hierzu wurden Kulturen der Stämme in OM- bzw. NL19-Flüssigmedium angezogen. 5 mL der Hauptkulturen wurde mit Ethylacetat extrahiert und einer HPLC-Analyse unterzogen. Durch einen Abgleich mit der hauseigenen Datenbank wurden die Extrakte auf das Vorhandensein bekannter Sekundärmetabolite hin untersucht.

Der Großteil der Peaks in den HPLC-Spektren wurde durch Medienbestandteile hervorgerufen. In den HPLC-Spektren von Tü4097 und Tü4106 konnten keine Peaks detektiert werden, die auf die Produktion

von in der Datenbank hinterlegten Sekundärmetaboliten hindeuten. Prominent im Kulturextrakt von Tü4100, angezogen in OM-Medium, war der Peak bei 11,75 min Retentionszeit, der α -Lipomycin zuzuordnen ist (**Abbildung 15**). In beiden Kulturen von Tü4103 konnte das Nukleosid-Antibiotikum Angustmycin A bei einer Retentionszeit von 1,33 min identifiziert werden (178).

Ethylacetat ist in der Lage, ein breites Spektrum an Stoffen zu extrahieren, aber sehr polare Stoffe verbleiben im Agarüberstand. Zudem erhebt die Datenbank keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Daher werden wahrscheinlich von Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 noch weitere Sekundärmetabolite produziert, die mit dieser Methode nicht detektiert werden können. Da sowohl α -Lipomycin als auch Angustmycin A gegen Gram-positive Bakterien wirken (179, 180), könnte die Bioaktivität von Tü4100 und Tü4103 gegen *B. subtilis* und *M. luteus* (s. 4.1.1.2) auf diese beiden Substanzen zurückzuführen sein. Allerdings liegt der Peak von Angustmycin A im hydrophilen Bereich des HPLC-Spektrums zwischen 0 min und 2 min Retentionszeit, in dem eine Zuordnung der Peaks zu bekannten Sekundärmetaboliten nicht zuverlässig erfolgen kann. Auf die Produktion des gelb-orange gefärbten α -Lipomycins dagegen deutet auch die gelbe Färbung der Kulturen von Tü4100 hin (181). Dass Tü4100 α -Lipomycin produziert, kann als gesichert angesehen werden.

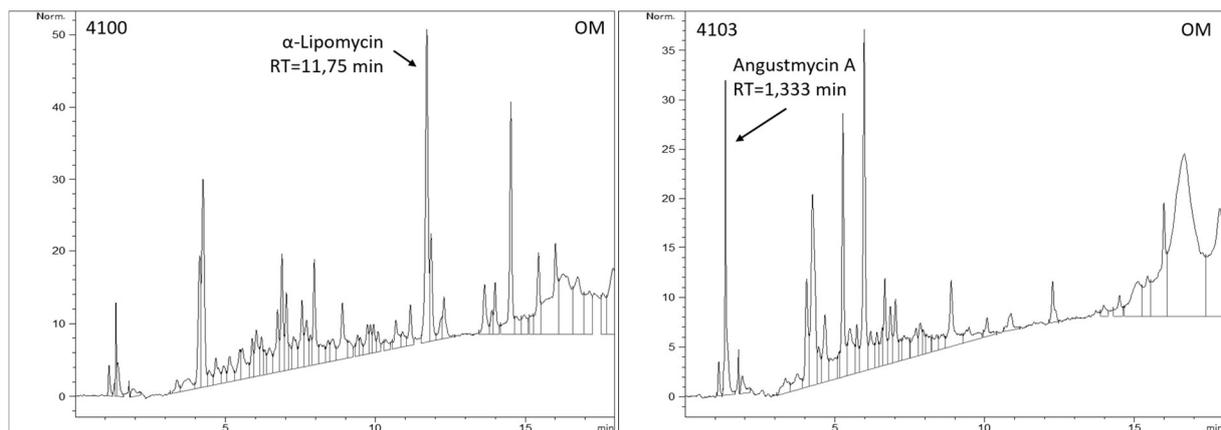


Abbildung 15: HPLC-Spektren der Kulturextrakte von Tü4100 und Tü4103. Markiert sind die Peaks von α -Lipomycin und Angustmycin A und deren Retentionszeit ist angegeben.

4.1.2 Isolierung und Charakterisierung neuer indonesischer Aktinomyceten

Die an den Stämmen der Tübinger Stammsammlung erprobte Methode zur Priorisierung der Stämme sollte an neuen indonesischen Isolaten angewendet werden. Da Indonesien artenreich ist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dort neue Spezies zu finden, die unbekannte Wirkstoffe produzieren (s. 1.3).

Aktinomyceten sollten aus indonesischen Bodenproben isoliert und auf Morphologie, taxonomische Einordnung und Bioaktivität hin untersucht werden. Das Genom der selektierten Stämme sollte sequenziert und mit bioinformatischen Methoden analysiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Schritte dargestellt.

4.1.2.1 Isolierung von Aktinomyceten aus Bodenproben der Insel Lombok

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Habitate auf der indonesischen Insel Lombok beprobt, um aus diesen Proben neue Antibiotika produzierende Aktinomyceten zu isolieren.

Aus zehn verschiedenen Bodenproben, die von vier Sammelorten (**Abbildung 16**) stammten, wurden 25 Isolate durch Verdünnung und Ausstrich auf dem Selektivmedium HV gewonnen. 18 Isolate wurden durch zusätzliche Vorbehandlung mit der Trockenhitzemethode und 11 Isolate mit der SDS-Hefemethode gewonnen. Proben wurden von Seesand (10 Isolate), Mangrovensediment (15 Isolate), Laub unter einem Kakaobaum (11 Isolate), Laub unter einem Kaffeebaum (12 Isolate), Erde unter einem Kakaobaum (2 Isolate) und Erde unter einem Kaffeebaum (6 Isolate) genommen.

ihrer Morphologie nach zu schließen handelt es sich bei den Isolaten Nr. 12, 13 und 24 nicht, wie zunächst angenommen, um Aktinomyceten, daher wurden sie nicht in die Auflistung aufgenommen. Insgesamt wurden 56 aktinomycetische Isolate gewonnen (s. 7.1).

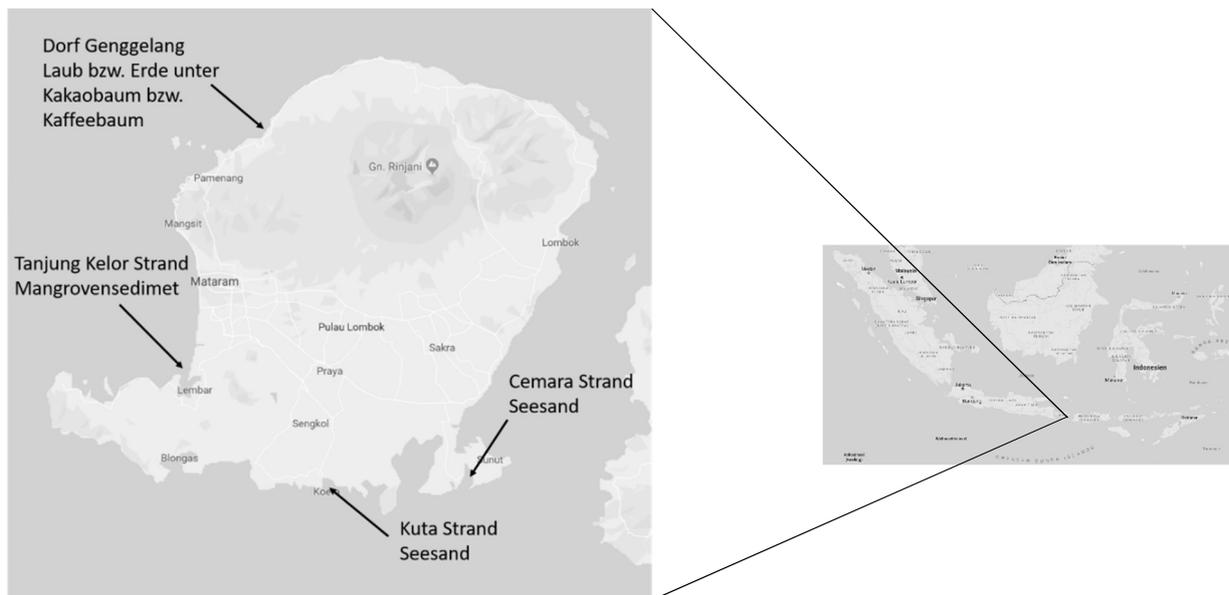


Abbildung 16: Lokalisation der Insel Lombok im indonesischen Inselstaat. Die Probenentnahmestellen auf Lombok sind mit Pfeilen markiert. Angegeben ist unter der Ortsbezeichnung auch die Art der Probe.

4.1.2.2 Bioaktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Pilze

Zur Priorisierung der 56 isolierten Stämme gemäß ihrer Bioaktivität wurden alle Isolate noch in Indonesien in Agardiffusionstests gegen *E. coli*, *C. albicans*, *M. luteus*, *S. aureus* und *B. subtilis* getestet. Alle Isolate wurden für sieben Tage bei 27°C auf SYP2-Festmedium inkubiert und in Blöckchentests auf Testplatten der Teststämmen aufgelegt.

Zehn Isolate wurden ausgewählt, die gegen mindestens drei der fünf Teststämmen Aktivität zeigten. Unter diesen wurden die Isolate priorisiert, die Hemmhöfe mit dem größten Durchmesser aufwiesen. Dazu gehörten die Isolate Nr. 1 und Nr. 8, die mit Aktivität gegen vier der fünf Teststämmen, *M. luteus*,

B. subtilis, *E. coli* und *S. aureus*, ein besonders breites Wirkspektrum zeigten. Außerdem wurden die Isolate Nr. 5, 16, 19, 20, 26, 27 und 30 ausgewählt, da ihre überdurchschnittliche Hemmhofgröße entweder auf gute Produktion oder starke antibiotische Aktivität der produzierten Antibiotika schließen ließ. Zudem sind diese Isolate gegen *B. subtilis*, *E. coli* und *S. aureus* aktiv, also sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Teststämme. Isolat Nr. 18 wurde ausgewählt, weil es das einzige Isolat war, das gegen *C. albicans* Aktivität zeigte.

Zur einfacheren Handhabung und eindeutigen Kennzeichnung der Stämme wurde den ausgewählten Isolaten eine neue Bezeichnung gegeben, die sich aus „I“ für Indonesien und einer fortlaufenden Nummer zusammensetzt. Die ausgewählten Stämme wurden als Glycerinstock an der Universität Tübingen einer näheren Charakterisierung unterzogen.

Tabelle 7: Umbenennung und Probennahmestellen der ausgewählten Isolate.

Nr.	Neue Bezeichnung	Probennahmestelle
1 →	I1	Seesand vom Cemara Strand, West-Lombok
5 →	I2	Seesand vom Kuta Strand, Süd-Lombok
8 →	I3	Mangrovensediment vom Tanjung-Kelor Strand, Ost-Lombok
16 →	I4	Mangrovensediment vom Tanjung-Kelor Strand, Ost-Lombok
18 →	I5	Mangrovensediment vom Tanjung-Kelor Strand, Ost-Lombok
19 →	I6	Mangrovensediment vom Tanjung-Kelor Strand, Ost-Lombok
20 →	I7	Mangrovensediment vom Tanjung-Kelor Strand, Ost-Lombok
26 →	I8	Seesand vom Kuta-Strand, Süd-Lombok
27 →	I9	Seesand vom Kuta-Strand, Süd-Lombok
30 →	I10	Laub unter Kakaobaum aus dem Dorf Genggelang, Nord-Lombok

4.1.2.3 Morphologische Charakterisierung

Um die phänotypischen Eigenschaften der Isolate zu untersuchen, wurden diese auf den Standardmedien HM-, MS- und R5-Festmedium angezogen. Neben Wachstum und Sporulation wurde die Pigmentierung der Stämme dokumentiert, da viele Sekundärmetabolite an ihrer charakteristischen Farbe zu erkennen sind. Die Isolate wurden auf Festmedien ausgestrichen und für fünf Tage bei 27°C inkubiert.

Bei I2 erwies sich der Glycerinstock als kontaminiert. Daher wurde dieser Stamm aus den weiteren Studien ausgeschlossen. Alle anderen Stämme konnten auf allen drei Medien wachsen und sporulieren. Wachstum auf MS-Medium führte am schnellsten zu Sporulation. I1, I3 und I4 bildeten graue Sporen, während sich das Medium um die Zellen grau färbte. I5 bildete graue Sporen und sekretierte braunen Farbstoff ins Medium. I6 färbte das umgebende Medium rot und bildete graue Sporen. I7 bildete gelbe Sporen und sekretierte orangen Farbstoff ins Medium. I8 färbte das umgebende Medium grünlich und bildete grau-grüne Sporen. I9 bildete graue Sporen, ohne das Medium zu verfärben. Die Sporen von I10 waren weiß-gelb und das Medium um die Zellen nahmen einen ebenfalls gelben Ton an (**Abbildung 17**).

Während graue und gelbe Sporen bzw. graues und gelbes Pigment bei Aktinomyceten häufig vorkommen, ist die rötliche Färbung von I6 ungewöhnlich.



Abbildung 17: Morphologie der isolierten indonesischen Stämme auf HM-Agar.

4.1.2.4 Ermittlung geeigneter Produktionsmedien

Um die Bioaktivität zu reproduzieren und geeignete Medien zur Antibiotikaproduktion zu bestimmen, wurden die neun ausgewählten Stämme auf zwölf verschiedenen Medien ausgestrichen, für sieben Tage bei 27°C inkubiert und mit den Kulturen Blöckchentests durchgeführt. Als Testorganismen dienten *P. fluorescens*, *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. carnosus* und *S. cerevisiae*.

I1 zeigte in diesem Bioaktivitätstest, im Gegensatz zum im Indonesien durchgeführten Bioassay (s. 4.1.2.2), keine Aktivität gegen *M. luteus* (Abbildung 18). Die Aktivität gegen *E. coli*, *S. carnosus* und *B. subtilis* konnte reproduziert werden. Zudem zeigte I1 Aktivität gegen *P. fluorescens*. Die beste Aktivität zeigte I1 auf R5, OM und NL19.

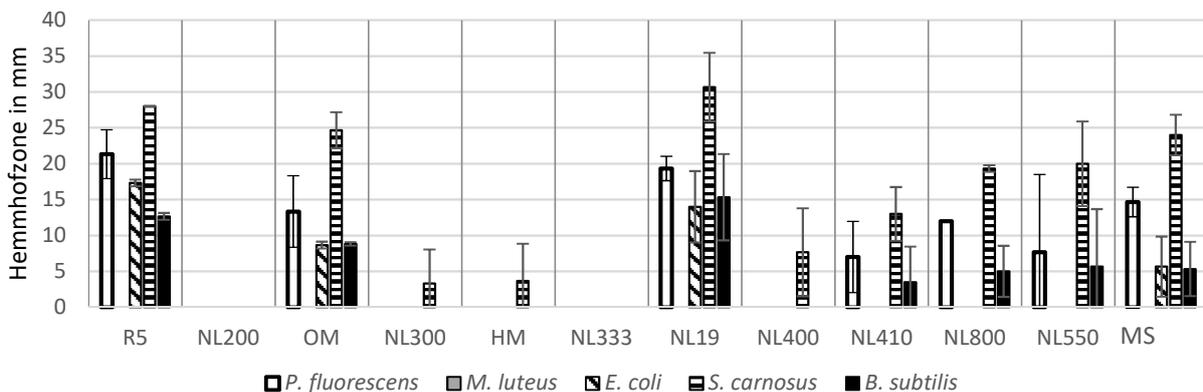


Abbildung 18: Bioaktivität von I1. I1 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

I3 zeigte sehr gute Aktivität gegen die Gram-positive Teststämme *S. carnosus* und *B. subtilis* (Abbildung 19). Die Aktivität gegen *B. subtilis* wurde schon zuvor beobachtet (s. 4.1.2.2). Die höchste Aktivität zeigte I3 auf NL550. I3 war aus einem marinen Habitat (Mangrovensediment) isoliert worden NL550 enthält Fischmehl und Seesalz, da es für marine Aktinomyceten optimiert wurde. Auch NL200 und R5 können als Produktionsmedien verwendet werden.

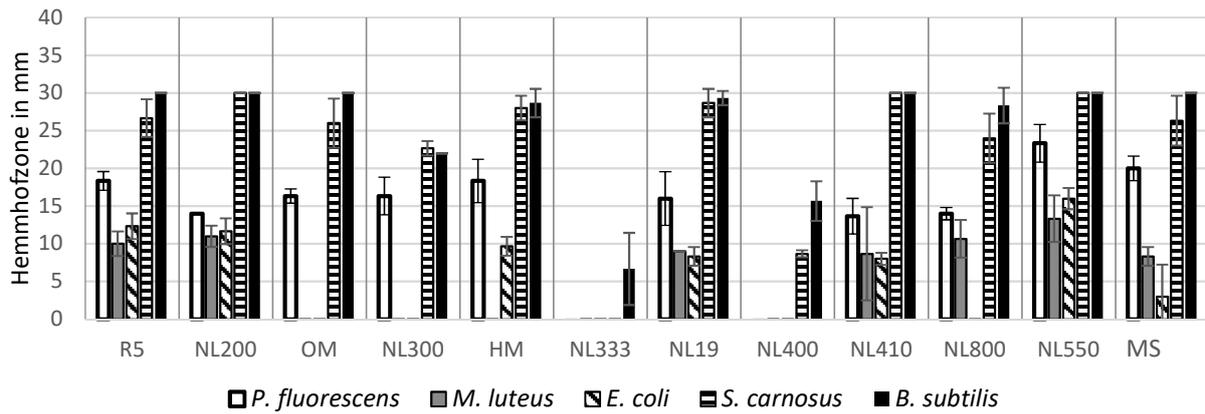


Abbildung 19: Bioaktivität von I3. I3 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

I4 zeigte auf den meisten Medien Aktivität gegen *P. fluorescens*, *M. luteus*, *S. carnosus* und *B. subtilis* (**Abbildung 20**). Nur NL333 und NL400 sind für diesen Stamm als Produktionsmedien nicht geeignet. Wie auch bei I3 war die Produktion auf NL550, wenn man von der Größe der Hemmhöfe ausgeht, am besten. Auch I4 wurde aus Mangrovensediment isoliert.

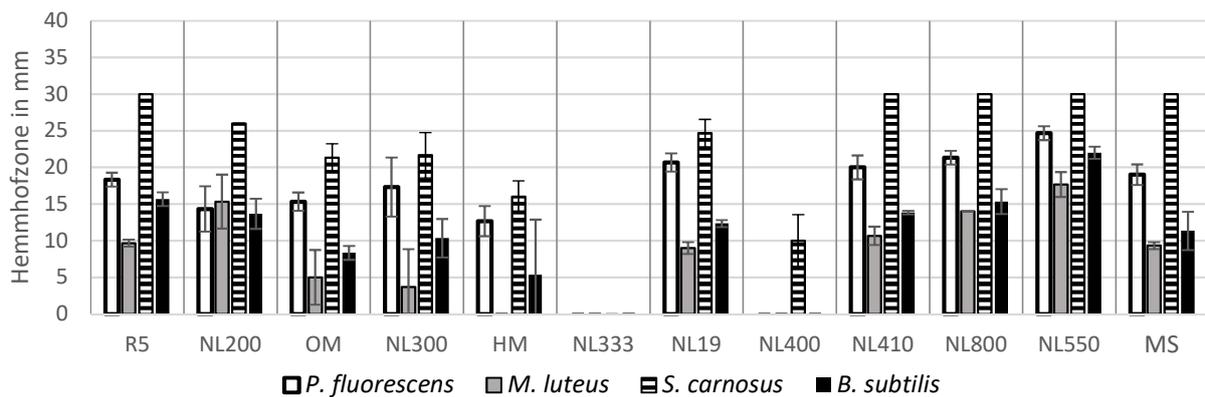


Abbildung 20: Bioaktivität von I4. I4 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

I5 zeigte Aktivität gegen *M. luteus*, *S. carnosus*, *B. subtilis* und *E. coli* auf R5, NL400 und MS (**Abbildung 21**). Dieser Stamm zeigte ausschließlich auf NL19 Aktivität gegen *P. fluorescens*. Vermutlich produziert I5 das gegen *P. fluorescens* wirksame Antibiotikum nur auf NL19.

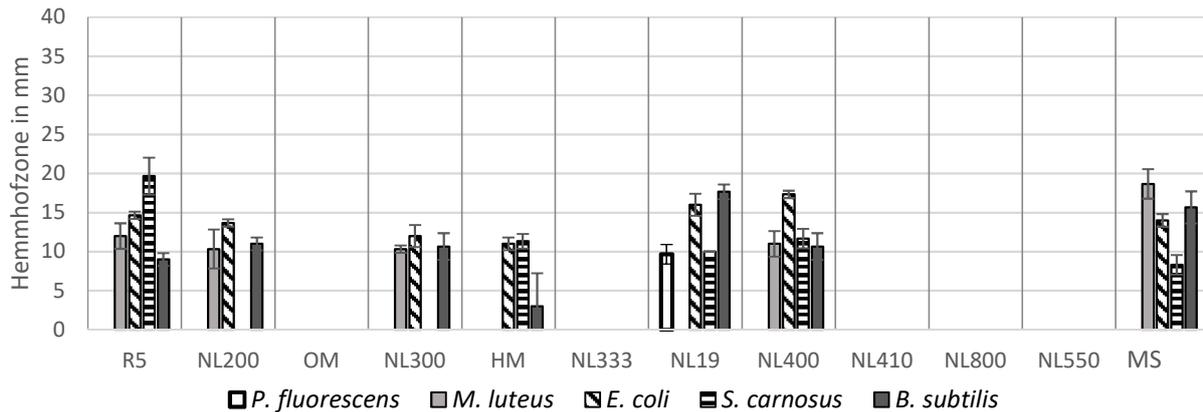


Abbildung 21: Bioaktivität von I5. I5 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

I6 produzierte auf den meisten Medien eine bioaktive Substanz. Für die Anzucht stehen R5, OM, NL19, NL200, NL300, NL410 und MS zur Verfügung (**Abbildung 22**). Kulturen von I6, die auf NL400, NL550 und NL800 gewachsen sind, zeigen keine Aktivität gegen *E. coli*. Möglicherweise werden zwei Substanzen produziert, von denen eine Aktivität gegen *E. coli* zeigt und die andere nicht.

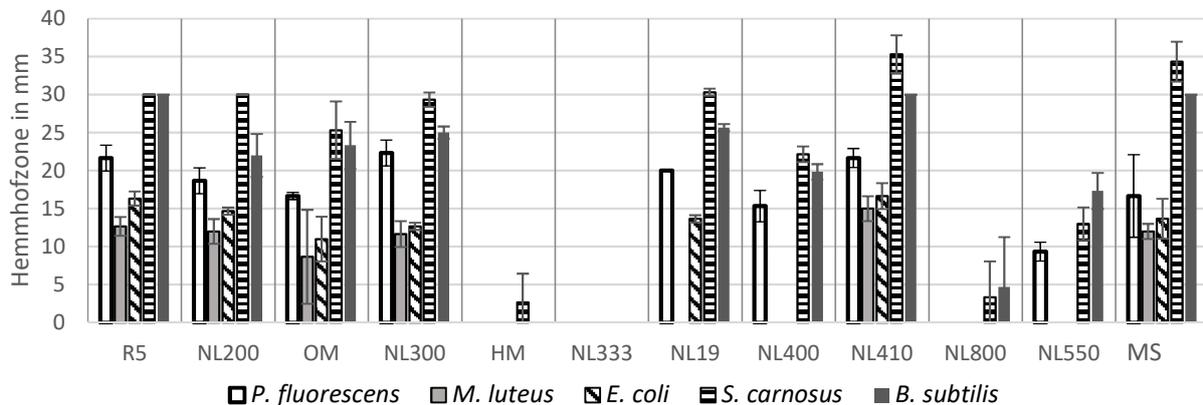


Abbildung 22: Bioaktivität von I6. I6 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

Die besten Produktionsmedien für I7 sind R5, OM, NL200 und NL300 (**Abbildung 23**). Auf diesen Medien zeigte I7 Aktivität gegen *M. luteus*, *S. carnosus*, *B. subtilis* und *E. coli*. Auf den anderen Medien war das Aktivitätsspektrum jeweils eingeschränkt. Gegen *P. fluorescens* ist keine Aktivität zu erkennen.

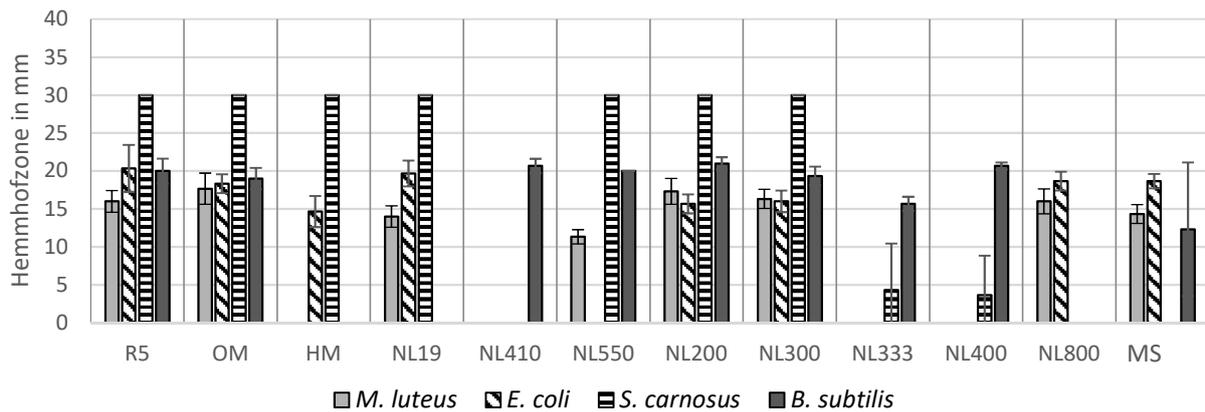


Abbildung 23: Bioaktivität von 17. 17 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

18 zeigte ausschließlich bei Anzucht auf HM Aktivität gegen alle Testorganismen (**Abbildung 24**). Nur auf HM zeigt der Stamm Aktivität gegen *S. carnosus* und *P. fluorescens*. Im Gegensatz dazu war im ersten Bioaktivitätstest, in dem ausschließlich SYP2-Medium verwendet wurde, gute Aktivität gegen *E. coli*, *S. carnosus* und *B. subtilis* beobachtet worden (s. 4.1.2.2).

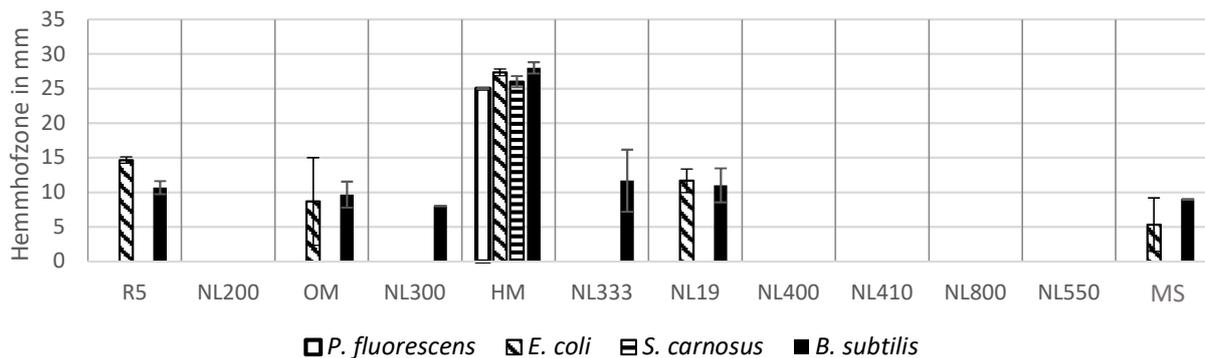


Abbildung 24: Bioaktivität von 18. 18 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

Für 19 ist eine breite Auswahl an Medien zur Kultivierung geeignet (**Abbildung 25**). Der Stamm zeigte Aktivität gegen *M. luteus*, *S. carnosus*, *B. subtilis* und *E. coli* auf den Medien R5, MS, NL300 und NL400. Es war keine Aktivität auf OM und NL800 zu erkennen.

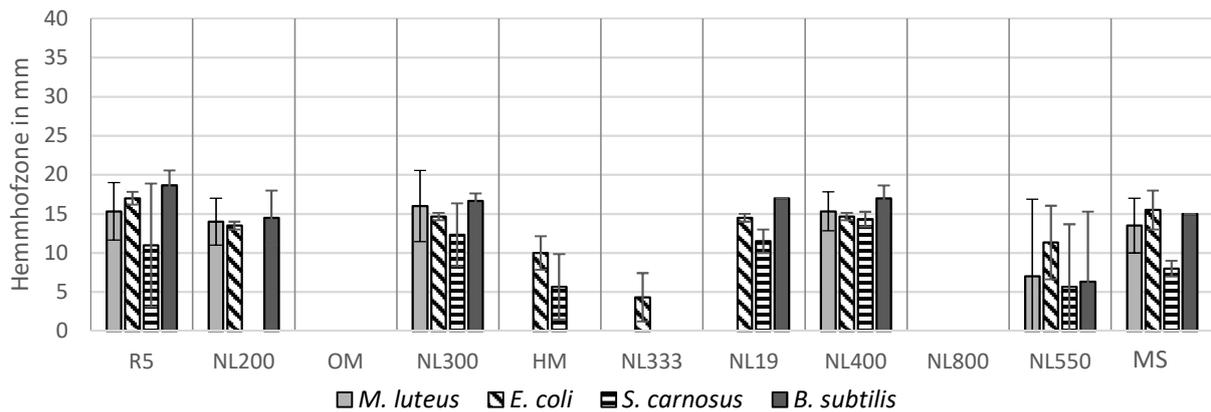


Abbildung 25: Bioaktivität von I9. I9 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

Auch für I10 stehen viele Produktionsmedien zur Auswahl (**Abbildung 26**). Verwendbar sind HM, NL400, NL410, NL550 und NL800. Besonders fällt die gute Aktivität gegen *B. subtilis* auf, die schon zuvor beobachtet werden konnte (s. 4.1.2.2). Im Gegensatz zu den meisten anderen Stämmen zeigt I10 nur eingeschränkte Aktivität auf MS.

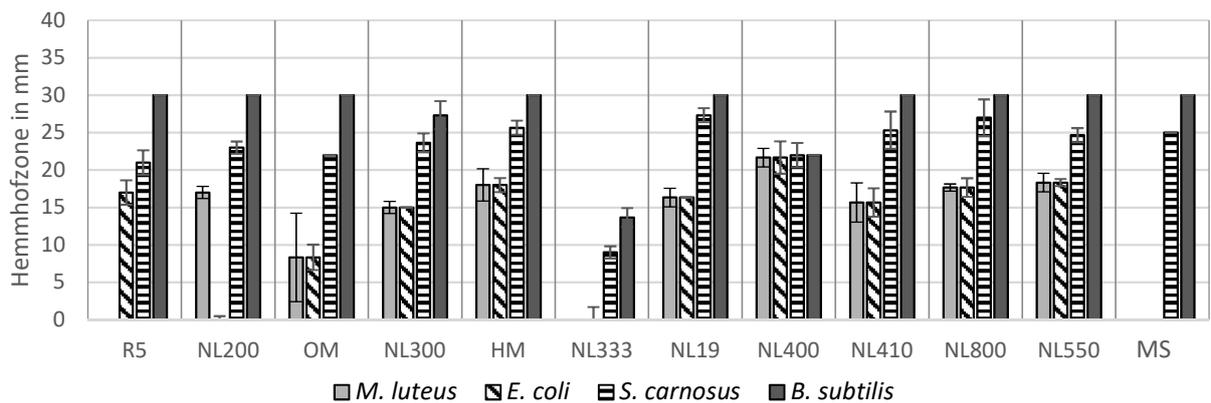


Abbildung 26: Bioaktivität von I10. I10 wurde auf zwölf verschiedenen Festmedien angezogen. Mit den Kulturen wurden Blöckchentests mit fünf Testorganismen durchgeführt. Im Diagramm ist der Durchmesser der Hemmhöfe aufgeführt. n=3

Die Aktivität gegen die Testorganismen konnte für alle Stämme reproduziert werden. Zudem konnte für jeden Stamm mindestens ein geeignetes Produktionsmedium bestimmt werden. Sehr gute Aktivität zeigen die Stämme I3, I4, I6 und I10. Für fast alle Stämme sind R5-, NL19- und MS-Medium zur Anzucht geeignet

4.1.2.5 Sensitivitätstests gegen Antibiotika, die zur Selektion eingesetzt werden

Um zu prüfen, welche Antibiotika zur Selektion bei Klonierungsexperimenten eingesetzt werden können, wurden die vier ausgewählten Stämme auf MS-Festmedium mit Antibiotikazusatz ausgestrichen. Es wurde auf Resistenz gegen Penicillin, Ampicillin, Vancomycin, Chloramphenicol,

Antibiotikum	I1	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10
Fosfomycin									

weiß=kein Wachstum (Sensitivität)

hellgrau=Wachstum nach 12 Tagen (evtl. Resistenz)

mittelgrau=Wachstum nach fünf Tagen (Resistenz)

dunkelgrau=Wachstum nach drei Tagen (Resistenz)

4.1.2.6 *B. subtilis*-basierter Reporterassay zur Ermittlung des Wirkorts eines Wirkstoffes

Mit dem *B. subtilis*-basierten Reporterassay können Antibiotika-Produzentenstämme auf den Wirkort ihrer antibiotisch wirksamen Substanzen hin untersucht werden. Der Test wurde in der AG H. Brötz-Oesterheld (Universität Tübingen) durchgeführt.

Die neun indonesischen Stämme wurden jeweils auf den zuvor ermittelten Produktionsmedien (s. 4.1.2.4) ausgestrichen und sieben Tage bei 27°C inkubiert. Agarblöckchen der Kulturen wurden auf Agarplatten aufgelegt, in denen die *B. subtilis*-Reporterstämme sowie X-Gal und IPTG eingegossen waren. Die Reporterstämme enthalten jeweils ein Plasmid, das einen der induzierbaren Promotoren *yorB*, *lial*, *pps* oder *ypuA* trägt. Es wurde festgestellt, dass diese Promotoren als Reaktion auf Störungen von Metabolismus und Zellstrukturen, wie durch Antibiotika, induziert werden. Werden die Promotoren induziert, starten sie die Transkription der *downstream* auf dem Plasmid liegenden *lacZ*-Gene. Das Genprodukt β -Galactosidase setzt X-Gal zu einem blauen Produkt um. So kann von der Blaufärbung der Reporterzellen auf die Induktion des Promotors geschlossen werden. Je nach Promotor deutet das auf den Wirkort der von den indonesischen Stämmen produzierten Antibiotika hin. Zusätzlich zeigt sich die Bioaktivität der indonesischen Stämme durch die Ausbildung eines Hemmhofes. Da die bioaktive Substanz um die Probe herum kreisförmig nach außen diffundiert, entsteht ein blauer Ring, wo die Konzentration der bioaktiven Substanz zu gering ist, um die Reporterzellen zu töten, aber noch hoch genug, um den Reporterpromotor zu induzieren.

I3 bildet einen blauen Pigmentring im Test gegen *B. subtilis*-Zellen, die *yorB* enthalten (**Tabelle 9**). Der Promotor *yorB* zeigt eine Wirkung auf die DNA-Synthese an. I5 und I9 verursachen beide einen blauen Ring auf den Zellen, die den *yorB*- bzw. *pps*-Promotor (Wirkort: RNA-Synthese) enthalten. I6 induziert zwar den *ypuA*-Promotor, der durch Zellwandstress aktiviert wird, allerdings bildet sich kein Hemmhof. Der *lial*-Promotor wird ebenfalls durch Zellwandstress induziert. I6 verursacht auf *lial*-Reporterzellen zwar einen Hemmhof, jedoch keinen blauen Ring. Der blaue Ring, den I6 auf *ypuA*-Reporterzellen verursacht, könnte auch von I6 selbst durch die Bildung einer stammeigenen β -Galactosidase hervorgerufen worden sein. I7 verursacht auf *ypuA*-Reporterzellen einen blauen Ring. I10 induziert den *yorB*-Promotor. I1, I4 und I8 zeigen zwar Aktivität gegen *B. subtilis*, induzieren aber keinen der Reporter-Promotoren. Sie haben demnach auf andere Wirkorte als auf die hier getesteten oder einen unspezifischen Wirkmechanismus.

Vier der Stämme (I3, I5, I9, I10) produzieren eine Substanz, die die DNA-Synthese beeinflusst. Die RNA-Synthese wird von den Produkten der beiden Stämme I5 und I9 beeinflusst. Die beiden Wirkorte von I5 und I9 könnten auf eine Substanz mit breitem Wirkspektrum oder auf die Produktion zweier verschiedener Substanzen zurückzuführen sein. I7 verursacht Zellwandstress.

Tabelle 9: Blaue Ring- und Hemmhofbildung in *B. subtilis*-basierten Promotorassays der indonesischen Stämme.

	Promotor	<i>yorB</i>	<i>pps</i>	<i>ypuA</i>	<i>lial</i>
Stamm	Wirkort	DNA-Synthese	RNA-Synthese	Zellwand	Zellwand
	Medien				
I1	R5, MS	+	+	-	-
I3	NL300, NL550	+	+	+	+
I4	NL300, NL550, NL800	+	-	-	-
I5	R5, MS	+	+	+	+
I6	R5, OM, NL400	-	-	-	+
I7	R5	+	-	+	+
I8	HM	+	-	+	+
I9	NL200, NL300	+	+	+	+
I10	HM, NL410, NL500	+	-	+	+

- = kein Hemmhof

+ = Hemmhof

grau hinterlegt = blauer Ring

4.1.2.7 Taxonomische Einordnung anhand 16S rRNA Sequenzen

Die neun Stämme sollten anhand der 16S Sequenzen taxonomisch eingeordnet werden. Aus den Stämmen wurde die genomische DNA mit dem peqGold Bacterial DNA Kit isoliert und die 16S rRNA-Sequenz mit den Primern 27Fbac und 1492Runi amplifiziert. Das Fragment wurde mit Microspin S-400 HR Säulchen aufgereinigt und das gereinigte Produkt durch Ligation in pDrive eingebracht. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit den Konstrukten transformiert. Die Plasmide wurden aus *E. coli* isoliert und sequenziert (MWG Eurofins). Die Sequenzen wurden mit dem Webtool EzTaxon analysiert.

Bei I3, I4, I5, I6, I8, I9 und I10 handelt es sich um *Streptomyces* sp. Nur I1 wurde dem Genus *Isoptericola* zugeordnet. Damit handelte sich um einen seltenen Aktinomyceten. Allerdings besteht nur eine Ähnlichkeit von 76,14% zum *Top Hit Strain*, was die Einordnung zweifelhaft macht. Auch I9 zeigt mit 77,18% eine sehr geringe Ähnlichkeit zum *Top Hit Strain Streptomyces longispororuber*. Bei einem Spezies-ANI (*average nucleotide identity*) cutoff von 95% (167) gehören diese beiden Stämme vermutlich nicht den Aktinomyceten an. Womöglich handelt es sich um ein neues Genus. I10 wurde mit 100% Ähnlichkeit als der Actinomycin-Produzent *Streptomyces antibioticus* NBRC 12838(T) (182) identifiziert.

Die Produktion von Actinomycin erklärt die Bioaktivität in den Agardiffusionstests (s. 4.1.2.2) sowie die Induktion von *yorB* in den wirkortspezifischen Promotorassays (s. 4.1.2.5). Für I7 konnte kein *Top Hit Strain* identifiziert werden. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass das Genus dieses Stammes nicht in der EzBioCloud hinterlegt ist (167).

Tabelle 10: Taxonomische Einordnung der indonesischen Stämme mittels EzTaxon.

Stamm	Ähnlichkeit	Top Hit Strain
I1	76,14%	<i>Isoptericola hypogaeus</i> HKI 0342(T)
I3	99,54%	<i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC 13488 (T)
I4	99,89%	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316(T)
I5	99,31%	<i>Streptomyces viridodiasticus</i> NBRC13106
I6	98,96%	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042(T)
I7	-	-
I8	99,8%	<i>Streptomyces spongiicola</i> HNM0071(T)
I9	77,18%	<i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC13488(T)
I10	100,00%	<i>Streptomyces antibioticus</i> NBRC 12838(T)

Die taxonomische Einordnung der Stämme lässt weitere Priorisierung zu: I1, I7 und I9 wurden von der Sequenzierung ausgenommen, da sie nicht eindeutig den Aktinomyceten zugeordnet werden können. I10 ist schon bekannt und wurde daher ebenfalls nicht sequenziert. Im Folgenden wurde das Genom der Stämme I3, I4, I5 und I6 sequenziert, da sie als Aktinomyceten, genauer Streptomyceten identifiziert wurde, jedoch als Stamm noch nicht beschrieben wurden sind und somit die Wahrscheinlichkeit, dass sie neue Sekundärmetabolite produzieren, höher ist als bei bekannten Stämme, wie I10. I8 wurde zunächst ausgeschlossen, da seine Bioaktivität sehr begrenzt ist (s. 4.1.2.4).

4.1.3 Priorisierung von Produzentenstämmen durch Analyse der Genom-Daten der selektierten Antibiotika-Produzenten

4.1.3.1 Sequenzierung, Assemblierung und Annotation der Genomdaten

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Gesamtgenom der Stämme Tü4097, Tü4100, Tü4103, Tü4106, I3, I4, I5 und I6 für anschließende *Genome Mining*-Studien zur Identifizierung potenzieller Sekundärmetabolit-Gencluster sequenziert.

Die Isolierung des Gesamtgenoms von Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 erfolgte mit dem peqGOLD Bacterial DNA Kit (Pqlab). Die Sequenzierung aller Stämme wurde von der Firma Macrogen, Südkorea mit der PacBioRSII-Sequenzieretechnologie durchgeführt. Die Assemblierung und Annotation der

Sequenzen wurde von Daniel Wibberg (Arbeitsgruppe Jörn Kalinowski, CeBiTec Bielefeld) durchgeführt. Das Gesamtgenom von I3, I4, I5 und I6 wurde mit dem Genomic-tip 100/G Kit (Qiagen) isoliert. Die Assemblierung und Annotation wurde von der Firma Macrogen, Südkorea durchgeführt.

Die Genomgrößen liegen zwischen ~7,0 Mbp (Tü4097) und ~8,7 Mbp (Tü4100) und damit im durchschnittlichen Bereich für Streptomyceten-Genome (**Tabelle 11, Tabelle 12**) (183, 184). Auch der hohe GC-Gehalt um 73% entspricht einem für Streptomyceten (durchschnittlich 74% (185)) üblichen Wert (186). Die *Coverage*-Zahl beschreibt die Häufigkeit, mit der eine einzelne Base durchschnittlich sequenziert wurde. Dass diese Zahl bei allen Stämmen sehr hoch ist (123 bei Tü4103 bis 196 bei I5), spricht für die hohe Qualität der Sequenz. Durch die PacBio-Methode konnten lange *contigs* generiert werden. Dadurch ist die Methode besonders für *de novo* Sequenzierungen geeignet, da hochreplikative Sequenzen am Stück abgelesen werden. Durch die PacBio-Sequenzierung war eine Erfassung des gesamten Genoms in zwei (I6) bis sieben (I3, I4) langen *contigs* möglich (s. 5.1.2).

Tabelle 11: Genomeigenschaften der Stämme Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106.

Merkmal	Tü4097	Tü4100	Tü4103	Tü4106
Genomgröße in Mbp	7,03	8,74	7,91	7,34
Anzahl sequenzierter Basen in Gbp	1,34	1,09	0,97	1,15
<i>Coverage</i>	191-fach	125-fach	123-fach	157-fach
Anzahl sequenzierter <i>reads</i>	96.990	91.089	84.432	88.638
N ₅₀ in bp	18.098	19.744	15.153	18.805
Anzahl <i>contigs</i>	3	3	3	3
GC-Gehalt in %	73,41	72,11	74,05	72,45
Anzahl Protein-kodierender Gene	6.164	7.943	7.274	7.004
Anzahl Chromosomen	1	1	1	1
Anzahl Plasmide	0	0	2	2

Tabelle 12: Genomeigenschaften der Stämme I3, I4, I5 und I6

Merkmal	I3	I4	I5	I6
Genomgröße in Mbp	7,64	7,71	7,61	7,05
Anzahl sequenzierter Basen in Gbp	1,49	1,20	1,49	1,16
<i>Coverage</i>	195-fach	155-fach	196-fach	165-fach
Anzahl sequenzierter <i>reads</i>	149.251	148.917	159.023	119.346
N ₅₀ in bp	14.163	10.776	13.014	13.548
Anzahl <i>contigs</i>	7	7	4	2
GC-Gehalt in %	72,26	72,26	72,27	72,47

Merkmal	I3	I4	I5	I6
Anzahl Protein-kodierender Gene	7.394	6.877	6.842	6.005
Anzahl Chromosomen	1	1	1	1
Anzahl Plasmide	0	0	7	1

4.1.3.2 Taxonomische Einordnung der genomsequenzierten Stämme durch TYGS

Zusätzlich zur taxonomischen Einordnung der Stämme mittels 16S rRNA Analyse erfolgte nach der Gesamtgenom-Sequenzierung eine taxonomische Analyse der Stämme durch das phylogénomische Tool TYGS (s. 3.9.2). Im Gegensatz zur 16S-Analyse ermöglicht TYGS, durch die Kombination von 16S Blast-Analyse, digitaler DNA-DNA-Hybridisierung basierend auf dem Gesamtgenom und Bestimmung des GC-Gehalts, eine sehr präzise Klassifizierung. Damit ist die Analyse mit TYGS aussagekräftiger als eine reine 16S-basierte Einordnung. Die phylogenetisch nächsten Typ-Stämme zu I3, I4, I5, I6, Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 wurden identifiziert und die acht Stämme in einen Stammbaum eingeordnet. Die Ähnlichkeit der Stämme zu einem Typ-Stamm wird als d_4 -Wert angegeben, der sich aus der Länge intergenomisch übereinstimmender Sequenzen und der Summe identischer Basenpaare in diesen Sequenzen errechnet (187).

Tü4097 wird mit $d_4=88,8\%$ dem Typ-Stamm *Streptomyces sampsonii* NBRC 13083 zugeordnet. Nur die Zuordnung von Tü4097 liegt über dem Spezies-*cuttoff* von 70%. Dementsprechend stellt Tü4097 keine potenziell neue Spezies dar. Bei Tü4100, Tü4103, Tü4106, I3, I4, I5 und I6 handelt es sich um potenziell neue Stämme. Tü4100 ist am nächsten mit *Streptomyces rubrogriseus* NBRC 15455 verwandt ($d_4=51,0\%$). Der nächst-verwandte Stamm von Tü4103 ist *Kitasatospora cineracea* DSM 44780 ($d_4=43,0\%$). I6 ist gemäß TYGS-Analyse am nächsten mit *Streptomyces spongiicola* HNM0071 verwandt ($d_4=51,5\%$). I3, I4, I5 und Tü4106 werden demselben *Clade* zugeordnet (**Abbildung 27**) und sind somit wahrscheinlich sehr nahe verwandt. Der nächstverwandte Typ-Stamm aller vier Stämme ist *Streptomyces capillispiralis* DSM 41695 mit $d_4=31,4\%$ (Tü4106 und I4) bzw. $d_4=31,5\%$ (I3 und I6). Eine Ähnlichkeit untereinander von $d_4=99,6\%$ lässt darauf schließen, dass I3 und I4 sehr wahrscheinlich der gleichen Spezies angehören.

Mit I3 bzw. I4, I5, I6, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 wurden in dieser Arbeit sechs potenziell neue Aktinomyceten-Spezies identifiziert. Alle Stämme, außer Tü4103, gehören den Streptomyceten an. Tü4103 ist von besonderem Interesse, da dieser dem seltenen Aktinomyceten-Genus *Kitasatospora* zugehörig ist.

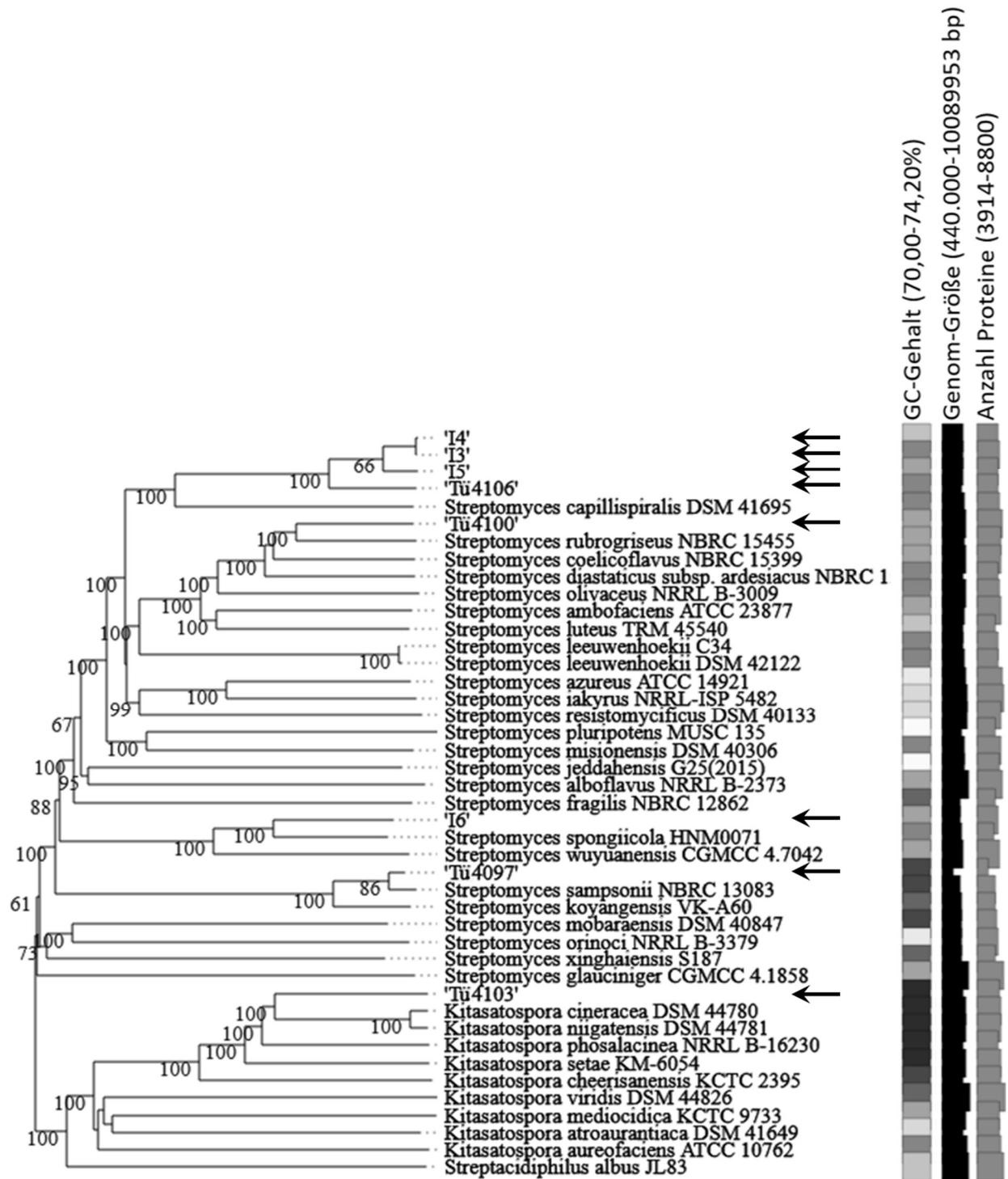


Abbildung 27: Phylogenetischer Stammbaum der Stämme Tü4097, Tü4100, Tü4103, Tü4106, I3, I4, I5 und I6 und der nächstverwandten Typ-Stämme gemäß Analyse mit TYGS. Die Werte an den Verzweigungen bezeichnen die Konfidenz der Abzweigung. Bzgl. des GC-Gehalts bedeutet weiß 70,00% und schwarz 74,20%. An der Länge der entsprechenden Balken lässt sich die Genom-Größe und die Anzahl codierter Proteine ablesen.

4.1.3.3 Cluster-Identifizierung durch AntiSMASH

Die Gesamtgenomsequenzen der indonesischen Stämme wurden mit AntiSMASH Version 3.0 (Tü4097, Tü4100, Tü4103, Tü4106) bzw. Version 4.0 (I3, I4, I5, I6) analysiert, um BGCs für Sekundärmetabolite zu finden (Outputs s. 7.2). Die Übereinstimmung, auf die in diesem Abschnitt Bezug genommen wird,

bezieht sich auf die Anzahl der Gene, die Ähnlichkeit aufweisen. In der AntiSMASH-Analyse werden zwei Gene als ähnlich angesehen, wenn ein Alignment durch eine BLAST-Analyse einen *e-value* von unter 10^{-5} ergibt und die Identität der Nukleotid-Sequenzen über 30% beträgt. Zudem muss das kürzeste BLAST-Alignment über 25% der Sequenz umfassen. Wenn zu allen Genen eines bekannten Clusters ähnliche Gene im Such-Cluster zu finden sind, wird die Übereinstimmung der beiden Cluster als 100% angesehen. Eine geringere Übereinstimmung ergibt sich, wenn nicht allen Gene des bekannten Clusters ein ähnliches Gegenstück im Such-Cluster zuzuordnen ist oder sich die Reihenfolge der Gene abweicht (188). Mit AntiSMASH wurden im Genom von Tü4097 24 mögliche Cluster identifiziert. Sechs davon zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit den Clustern von Antimycin, FR-008, Desferrioxamin B, Ectoin, SAL-2242 und SGR_PTMs. Alle weiteren zeigten weniger als 70% Übereinstimmung zu bekannten Clustern. Sie kodierten für drei Polyketide, einen Terpen-Bacteriocin-Hybrid, einen Siderophor, fünf nicht-ribosomale Peptide, einen Aminoglycosid-Butyrolacton-Hybrid, ein Thiopeptid, vier Terpene, zwei Bacteriocine und ein nicht-ribosomales Peptid-Polyketid-Hybrid.

Im Genom von Tü4100 wurden mit AntiSMASH 26 mögliche Biosynthesegencluster identifiziert. Davon zeigten fünf 100%ige Übereinstimmung zu den Clustern von Coelichelin, Isorenieraten, SapB, Lipomycin und Albaflavenon. Dass Tü4100 α -Lipomycin produziert, wurde schon durch die HPLC-Analyse (s. 4.1.1.8) gezeigt. Drei Cluster zeigten mehr als 80% Übereinstimmung zu den Clustern für Desferrioxamin B, Paenibactin und Coelibactin. Die Übrigen kodierten voraussichtlich für sechs Polyketide, zwei Bacteriocine, drei Terpene, zwei nicht-ribosomale Peptide, einen Siderophor, ein Indol, ein Ectoin, ein Melanin und ein Cluster, das sich keiner Kategorie zuordnen lässt.

Für Tü4103 wurden mit AntiSMASH 26 mögliche Cluster identifiziert. Zwei davon zeigten 100% Übereinstimmung zu den Clustern von Alkylresorcinol und 2-Methylisoborneol. Zwei weitere zeigten über 80% Übereinstimmung zu Isorenieraten und Fuscachelin. Die übrigen kodierten voraussichtlich für drei Terpene, zwei Bacteriocine, vier nicht-ribosomale Peptide, ein Indol, einen Siderophor und ein Phosphonat. Des Weiteren wurden mit AntiSMASH viele Hybridgencluster gefunden: ein Ectoin-Bacteriocin-Polyketid-Hybrid, zwei nicht-ribosomale Peptid-Polyketide-Hybride, ein Lanthipeptid-Ladderan-Hybrid, ein Hybrid aus Butyrolacton, Polyketid, nicht-ribosomalem Peptid, Lanthipeptid und Bacteriocin, ein Polyketid-Bacteriocin-Hybrid und ein Lanthipeptid-Terpen-Hybrid.

Für die BGCs von Tü4106 s. O.

Im Genom von I3 wurden mit AntiSMASH 17 Gencluster gefunden. Fünf davon wurden mit 100%iger Übereinstimmung als die Cluster von Albaflavenon, Desferrioxamin B, Ectoin, Alkylresorcinol und Naphthrydiomycin bestimmt. Zwei weitere Cluster zeigten über 80% Übereinstimmung mit den Clustern eines Sporenpigments und von Hopen. Des Weiteren wurden mit AntiSMASH Cluster gefunden, die für einen Siderophor, zwei Terpene, zwei Bacteriocine, ein Lassozeptid, ein Polyketid-Hybrid, ein

Aminoglycosid, ein Butyrolacton-Polyketid-Ectoin-nicht-ribosomales Peptid-Hybrid und ein Cluster, das keiner bekannten Familie zugeordnet werden konnte, kodieren.

Im Genom von I4 wurden mit AntiSMASH 19 Gencluster identifiziert. Acht davon wurden mit 100% Übereinstimmung als die Cluster von Albaflavenon, Venezuelin, Desferrioxamin B, Ectoin, SAL-2242, Alkylresorcinol, Ectoin und Naphthyridinomycin bestimmt. Zwei weitere Cluster zeigen über 80% Übereinstimmung mit den Clustern eines Sporenpigments und von Hopfen. Des Weiteren wurden mit AntiSMASH Cluster gefunden, die für einen Siderophor, zwei Terpene, zwei Bacteriocine, ein Lassozeptid, ein nicht-ribosomales Peptid, ein Polyketid-Hybrid und ein Aminoglycosid kodieren.

Mit AntiSMASH wurden im Genom von I5 16 Biosynthesegencluster identifiziert. Fünf von ihnen zeigten 100% Übereinstimmung zu den Clustern von Alkylresorcinol, Ectoin, Desferrioxamin B, Venezuelin und Albaflavenon. Drei weitere zeigten über 80% Übereinstimmung zu den Clustern von Resistomycin, Hopfen und eines Sporenpigments. Die anderen Cluster kodierten voraussichtlich für zwei Terpene, ein nicht-ribosomales Peptid, einen Siderophor, ein Lassozeptid und zwei Bacteriocine.

Im Genom von I6 wurden mit AntiSMASH 23 Biosynthesegencluster gefunden. Fünf von ihnen zeigten 100% Übereinstimmung zu den Clustern von Tirandamycin, Isorenieraten, Desferrioxamin B, Scabichelin und Stauropsorin. Eines der Cluster zeigte 88% Übereinstimmung zum Echinomycin Gencluster. Die anderen Cluster kodierten voraussichtlich für zwei Terpene, zwei Thiopeptide, zwei Bacteriocine, ein Polyketid, ein Linaridin, ein Melanin, ein Polyketid-Siderophor-Hybrid, ein Phosphonat-nicht-ribosomales Peptid-Hybrid, ein Polyketid-Lanthipeptid-Polyketid-Hybrid, ein Butyrolacton-Polyketid-nicht-ribosomales Peptid-Hybrid sowie drei weitere Sekundärmetabolitcluster, die sich keiner bekannten Kategorie zuordnen ließen.

Die AntiSMASH-Analyse zeigte viele Zielcluster für nähere Untersuchungen auf. Zudem bestätigt sich hier durch die nahezu identischen Gencluster, dass es sich bei I3 und I4 um denselben Stamm handelt. Tü4103 und I6 zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Hybrid- bzw. nicht zuzuordnenden Clustern aus. Das impliziert, dass die beiden Stämme für mehr Sekundärmetabolite kodieren, als Cluster durch die Analyse mit AntiSMASH identifiziert werden konnten. Die beiden Stämme sind außerdem wegen ihrer Phosphonat-Cluster von besonderem Interesse, da Phosphonate eine wenig untersuchte Klasse von Sekundärmetaboliten mit breitem Wirkspektrum darstellen. Die Folgenden Arbeiten konzentrierten sich auf diese beiden Cluster.

4.1.4 Phosphonatdetektion mit I6 und Tü4103 durch Bioaktivitätstests gegen *E. coli* WM6242

Phosphonate können aufgrund ihrer Polarität die lipophile Zellwand von Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, gewöhnlich nicht durchdringen. Auch der Laborstamm *E. coli* K12 ist resistent gegen zahlreiche Phosphonatantibiotika. Der Stamm *E. coli* WM6242 wurde als Detektorstamm für

Phosphonatantibiotika entwickelt (159). *E. coli* WM6242 exprimiert ein Phosphonat-Aufnahmesystem (*phnCDE*-Operon), welches ihn sensitiv gegenüber Phosphonaten macht. Das *phnCDE*-Operon steht unter der Kontrolle des *Ptac* Promotors, der durch IPTG induziert wird. Durch Bioaktivitätstests gegen *E. coli* K12 und *E. coli* WM6242 sollten Tü4103 und I6 auf die Produktion eines Phosphonat-Antibiotikums hin untersucht werden.

Tü4103 und I6 wurden auf HM-Festmedium, I6 zusätzlich auf MS-Festmedium ausgestrichen und für sieben Tage bei 27°C inkubiert. Der Agarüberstand wurde gewonnen und auf Filterrondelle pipettiert. Als Positiv-Kontrolle wurde das Phosphonat-Antibiotikum PTT verwendet. PTT zeigt keine Aktivität gegen Gram-negative Bakterien und sollte daher nur einen Hemmhof auf *E. coli* WM6242 verursachen. Der Überstand von HM- und MS-Festmedium diente als Negativ-Kontrolle. Die Filterrondelle wurden auf Testplatten mit *E. coli* K12 bzw. *E. coli* WM6242 + 1 mM IPTG aufgelegt und die Platten ü/N bei 37°C inkubiert.

PTT verursachte auf *E. coli* WM6242-Testplatten einen Hemmhof, auf *E. coli* K12-Testplatten jedoch nicht. Die Negativ-Kontrolle zeigte weder gegen *E. coli* K12 noch gegen *E. coli* WM6242 Aktivität. Der Agarüberstand von I6, der aus HM-Platten gewonnen worden war, zeigte weder Aktivität gegen *E. coli* K12 noch gegen *E. coli* WM6242 (**Abbildung 28**). Dagegen zeigte der Agarüberstand von I6, der aus MS-Platten gewonnen worden war, Aktivität gegen sowohl gegen *E. coli* K12 als auch gegen *E. coli* WM6242. Da I6 generelle Aktivität gegen *E. coli* aufweist, kann mit Hilfe dieses Tests die Frage, ob I6 ein Phosphonat-Antibiotikum produziert, also nicht beantwortet werden. Weitere Tests wären notwendig, um nachzuweisen, dass ein Phosphonat produziert wird (s. 5.2.1).

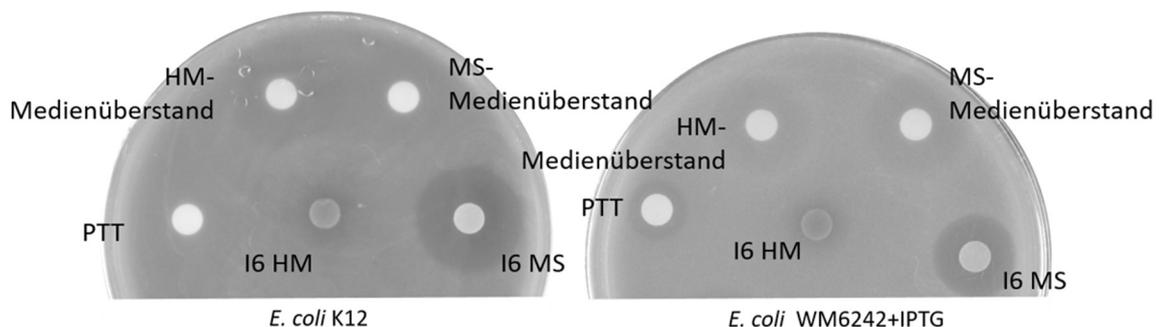


Abbildung 28: Agardiffusionstests des Agarüberstands von I6 gegen *E. coli* K12 und den Phosphonat-sensitiven *E. coli*-Stamm WM6242.

Gegen *E. coli* K12 verursachte der Agarüberstand von Tü4103 keinen Hemmhof (**Abbildung 29**). Wird der Agarüberstand auf *E. coli* WM4262-Testplatten getestet, bildet sich ein Hemmhof. Die Aktivität des Agarüberstandes von Tü4103 gegen den Phosphonat-sensitiven *E. coli*-Stamm WM6242 und die fehlende Aktivität gegen *E. coli* K12 zeigt, dass Tü4103 ein Phosphonat-Antibiotikum produziert. Da es sich zudem bei Tü4103 als *Kitasatospora* sp. um einen seltenen Aktinomyceten handelt, konzentrierte sich die weitere Arbeit auf die Untersuchung der Phosphonatproduktion von Tü4103 statt auf jene von I6.

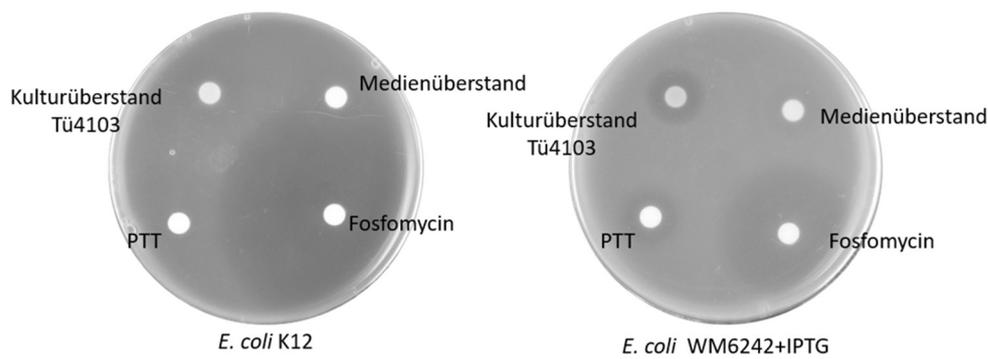


Abbildung 29: Agardiffusionstests des Agarüberstands von Tü4103 gegen *E. coli* K12 und den Phosphonat-sensitiven *E. coli*-Stamm WM6242.

4.2 Charakterisierung des Phosphonat-Antibiotikums aus Tü4103

4.2.1 Optimierung der Phosphonat-Produktionsbedingungen

4.2.1.1 Ermittlung geeigneter Produktionsmedien

Um die optimalen Bedingungen für die Produktion des Phosphonat-Antibiotikums durch Tü4103 zu bestimmen, wurde die Produktion auf verschiedenen Standardmedien getestet. Tü4103 wurde in drei Replikaten auf den Festmedien R5, HM, MS und OM ausgestrichen und für 13 Tage inkubiert. Es wurden Blöckchen der bewachsenen Festmedien ausgestochen und auf *E. coli* WM6242-Testplatten aufgelegt. Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Blöckchen der unbewachsenen Festmedien. Als Positiv-Kontrolle wurde PTT eingesetzt. Nach Inkubation der Testplatten ü/N wurde die Hemmhofbildung dokumentiert. Bei keiner der Negativ-Kontrollen wurde ein Hemmhof auf den *E. coli* WM6242-Testplatten beobachtet, wohingegen die Positiv-Kontrolle einen Hemmhof verursachte (Daten nicht gezeigt). Die Tü4103-Kulturen, die auf R5 gewachsen waren, zeigten keine Aktivität (**Abbildung 30**). Die größten Hemmhöfe von durchschnittlich 18,7 mm bildeten sich um die Blöckchen der mit Tü4103 bewachsenen HM-Platten. Um die Blöckchen der MS- und OM-Kulturen bildeten sich durchschnittlich kleinere Hemmhöfe (MS: 14,7 mm, OM: 10,3 mm). Eines der Replikate der OM-Kulturen zeigte keine Aktivität. Da Blöckchen der Kulturen, die auf HM angezogen worden waren, die beste Bioaktivität zeigten, wurde für weitere Kultivierungen HM-Medium verwendet.

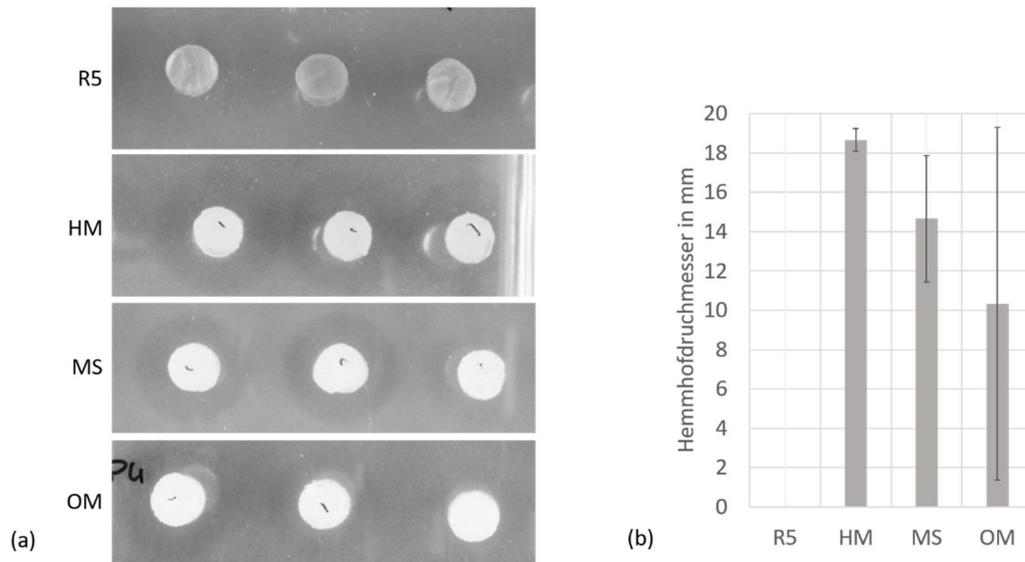


Abbildung 30: Bioaktivitätstests von Kulturen von Tü4103 auf R5-, HM-, MS- und OM-Festmedium gegen *E. coli* WM6242. (a) Hemmhöfe von Kulturen von Tü4103 auf R5-, HM-, MS- und OM-Festmedium gegen *E. coli* WM6242. (b) Durchschnittlicher Hemmhofdurchmesser in mm von Kulturen von Tü4103 auf R5-, HM-, MS- und OM-Festmedium mit Standardabweichung.

4.2.1.2 Vergleich der Phosphonatproduktion in Flüssig- und Festmedien-Kulturen

Es wurde beobachtet, dass Flüssigkulturen von Tü4103 keine stabile Aktivität gegen *E. coli* WM6242 aufweisen. Vermutlich wird das Phosphonat-Antibiotikum in Flüssigmedium nicht stabil produziert. Daher sollte getestet werden, ob Tü4103 auf Festmedien zuverlässig Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigt. Dazu wurde Tü4103 in vier Kulturen mit HM-Flüssigmedium angesetzt bzw. auf vier Platten HM-Festmedium ausgestrichen. Nach der Inkubation der Kulturen wurden die Kultur- bzw. Agarüberstände gewonnen. Die Agarüberstände wurden mittels Filterrondellen auf *E. coli* WM6242- und K12-Testplatten aufgelegt und ü/N inkubiert. Als Positiv-Kontrolle diente PTT und als Negativ-Kontrolle der Medienüberstand des HM-Flüssig- bzw. Festmediums.

Die Negativ-Kontrollen verursachten keine Hemmhöfe. Die Positiv-Kontrolle zeigte Aktivität gegen *E. coli* WM6242, nicht aber gegen *E. coli* K12. Die Kulturüberstände aus den Flüssigkulturen verursachten keine Hemmhöfe, weder auf *E. coli* WM6242- noch auf *E. coli* K12-Testplatten. Die Agarüberstände der Festkulturen zeigten Aktivität gegen *E. coli* WM6242, jedoch nicht gegen *E. coli* K12 (**Abbildung 31**).

Dass Tü4103 ausschließlich als Festkultur Hemmhöfe auf *E. coli* WM6242-Testplatten verursacht, deutet darauf hin, dass das Phosphonat-Antibiotikum nur auf Festmedium produziert wird. Daher sollte Tü4103 zur Gewinnung des Phosphonat-Antibiotikums auf Festmedium angezogen werden. Doch auch wenn Tü4103 auf Festmedium das Phosphonat zuverlässig produziert, erschwert die Gewinnung des Agarüberstands aus Festmedium die Isolation aus großen Volumina. Zudem ist Wasser als Lösungsmittel schlecht geeignet, da es erst bei hohen Temperaturen und geringem Druck evaporiert. Außerdem enthält der Agarüberstand noch viele Medienbestandteile, die eine spätere Aufreinigung des Phosphonats durch chromatografische Trennmethode erschweren (s. 5.2.2.2).

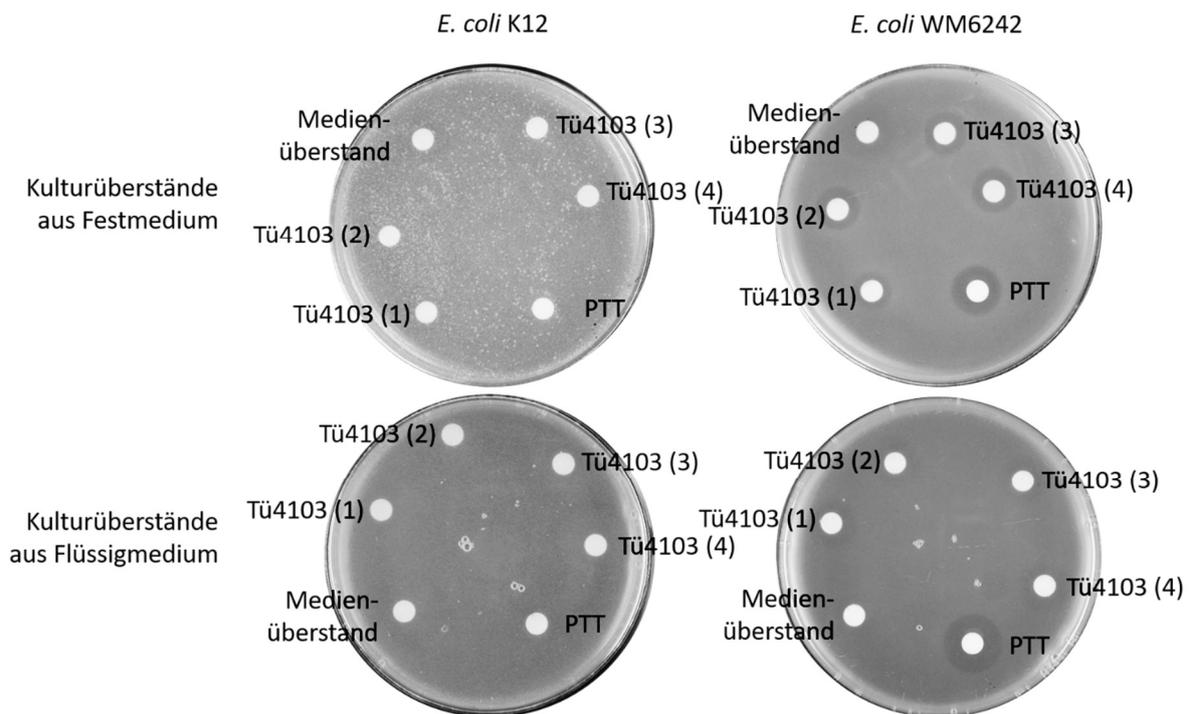


Abbildung 31: Hemmhoftests der Agarüberstände von Flüssig- und Festkulturen von Tü4103. Die Überstände wurden gegen *E. coli* WM6242 und *E. coli* K12 getestet.

4.2.2 Bioaktivitäts-geleitete Ansätze zur Anreinigung des Phosphonat-Antibiotikums

Zur Strukturaufklärung und für spezifische Aktivitätstests sollte das Phosphonat-Antibiotikum in Reinform vorliegen. Die vollständige Aufreinigung und Strukturaufklärung wird vom Projektpartner (AG H. Groß, Universität Tübingen) durchgeführt werden. Mit einer HILIC-Säule ist es bereits gelungen, den Agarüberstand von Tü4103 zu fraktionieren und das Phosphonat in einer Fraktion durch ^{31}P -NMR nachzuweisen (Aziz, pers. Mitt.).

In der vorliegenden Arbeit sollten Vorversuche durchgeführt werden, die eine Abtrennung des Phosphonat-Antibiotikums von weiteren Bestandteilen des Agarüberstands ermöglichen. Als Positiv-Kontrolle diente dabei jeweils der unbehandelte Kulturüberstand von Tü4103. Als Negativ-Kontrollen wurden die reinen Lösungsmittel bzw. unbehandelter Medienüberstand verwendet.

4.2.2.1 Test auf Thermostabilität des Phosphonat-Antibiotikums

Zur Anreinigung des Phosphonats wurde der Agarüberstand von Tü4103 mehrfach unter hohen Temperaturen und/oder geringem Druck eingengt, um das wässrige Lösungsmittel zu evaporieren und so die bioaktive Substanz in eine feste Phase zu überführen. Daher sollte im Vorfeld die Stabilität der Bioaktivität unter intensiver Hitzeeinwirkung getestet werden. Die Stabilität der Bioaktivität ermöglicht zudem lange Lagerungszeiten ohne Einbußen der Bioaktivität.

Zwölf Ansätze des gegen *E. coli* WM6242 aktiven Agarüberstands von Tü4103 wurden bei 27°C, 39°C, 55°C und 100°C jeweils 1 h, 8 h und 24 h inkubiert und danach erneut die Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 bestimmt. Als Positiv-Kontrolle diente ein unbehandelter Ansatz des Agarüberstandes. Als Negativ-Kontrolle wurde der Überstand des Kulturmediums verwendet.

Alle Proben bildeten nach der Inkubation Hemmhöfe gegen *E. coli* WM6242 aus, das heißt, die Bioaktivität der Agarüberstände blieb in jedem der Ansätze erhalten (Daten nicht gezeigt). Eine Probe zeigte sogar nach 24-stündiger Inkubation bei 100°C noch Aktivität. Das von Tü4103 produzierte Phosphonat-Antibiotikum ist also stabil gegenüber thermischer Belastung. Diese Eigenschaft ist vermutlich auf die Stabilität der P-C-Bindung zurückzuführen (111). Die Stabilität hat den Vorteil, dass lange Lagerungszeiten ohne Aktivitätsverlust möglich sind. Außerdem kann das wässrige Lösungsmittel unter diesen Umständen bei hohen Temperaturen und geringem Druck evaporiert werden.

4.2.2.2 Extraktion des Phosphonats mit organischen Lösungsmitteln

Zur Anreicherung des Phosphonat-Antibiotikums sollte getestet werden, ob es sich mit gängigen organischen Lösungsmitteln aus dem Agarüberstand von Tü4103 extrahieren lässt. Dazu wurde der aktive Agarüberstand mit den unpolaren organischen Lösungsmitteln Chloroform, Ethylacetat, Dichlormethan, Butanol, Toluol bzw. Diethylether extrahiert. Die Extrakte wurden eingeeengt und auf Filterrondelle aufgetragen. Die Filterrondelle wurden für Agardiffusionstests auf *E. coli* WM6242-Testplatten aufgelegt und die Platten ü/N inkubiert.

Polare organische Lösungsmittel bilden Emulsionen mit Wasser. Daher kann der Agarüberstand nicht als wässrige Lösung mit polaren organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Um Emulsionen zu vermeiden, wurde der bioaktive Agarüberstand vollständig eingeeengt und der Rückstand mit Methanol, Ethanol, Isopropanol bzw. Aceton und als Positiv-Kontrolle mit H_2O_{deion} resuspendiert. Die Suspensionen wurden in Agardiffusionstests gegen *E. coli* WM6242 getestet.

Nach Inkubation der Testplatten bildete sich um die Negativ-Kontrollen kein Hemmhof (**Abbildung 33** (a)). Die Positiv-Kontrolle verursachte einen Hemmhof gegen *E. coli* WM6242 (**Abbildung 33** (b)). Ausschließlich der Methanol-Extrakt zeigte Aktivität gegen *E. coli* WM6242 (**Abbildung 32** (c)). Demnach eignet sich Methanol als Extraktionsmittel für das Phosphonat-Antibiotikum.

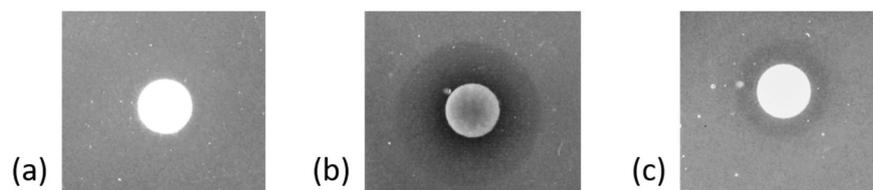


Abbildung 32: Hemmhofstests zur Extraktion des Agarüberstands von Tü4103 mit Methanol. (a) reines Methanol (b) Agarüberstand von Tü4103 (c) Methanol-Extrakt.

4.2.2.3 Sequenzielle Extraktion des Phosphonats mit Methanol

Um festzustellen, ob das Phosphonat-Antibiotikum vollständig in Methanol überführt werden kann, wurde der aktive Agarüberstand komplett eingengt und in Methanol resuspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert und das organische Lösungsmittel abgenommen. Daraufhin wurde das Pellet erneut mit der gleichen Menge frischen Methanols gewaschen und die Extraktion wiederholt. Auf diese Weise wurde das Pellet viermal mit Methanol gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gelöst, um zu testen, ob Bioaktivität in der wässrigen Phase verblieben ist. Die Extrakte wurden auf Filterrondelle gegeben und auf *E. coli* WM6242-Testplatten aufgelegt. Die Testplatten wurden ü/N inkubiert.

Die Positiv-Kontrolle verursachte einen Hemmhof mit einem Durchmesser von 16 mm, während die Negativ-Kontrolle keine Aktivität zeigte. Um die mit Methanol extrahierten Proben bildeten sich Hemmhöfe. Dabei nahm der Durchmesser der Hemmhöfe mit jedem Waschschriff etwas ab, beginnend bei 10 mm, über 9,5 mm bis 9 mm. Der Hemmhof mit dem größten Durchmesser bildete sich um die wässrige Lösung (16 mm). Das zeigt, dass sich zwar eine gewisse Menge des Phosphonat-Antibiotikums in Methanol löst, aber die Kapazität dieses Lösungsmittels schnell erreicht ist. Zudem löst Methanol das Phosphonat-Antibiotikum nicht so effektiv wie $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$.

Tabelle 13: Sequenzielle Extraktion des Phosphonat-Antibiotikums aus dem Kulturüberstand von Tü4103 mit Methanol.

	Hemmhofdurchmesser in mm
1. Extraktion	10
2. Extraktion	9.5
3. Extraktion	9
4. Extraktion	9
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$	16

Durchmesser der Hemmhöfe in mm in Bioaktivitätstests gegen *E. coli* WM6242.

4.2.2.4 Ansäuerung des Phosphonat-haltigen Agarüberstands zur Extraktion mit unpolaren organischen Lösungsmitteln

Der pH-Wert beeinflusst die Löslichkeit von schwachen Säuren, zu denen auch die Phosphonate zählen. Bei saurem pH werden die Hydroxygruppen protoniert und die Säure wird unpolarer. Das erleichtert die Überführung in unpolare organische Lösungsmittel. Bei basischem pH liegt die Säure als Anion vor und ist somit polar. Hier verbleibt das Molekül nach der Extraktion in der wässrigen Phase (Brilisauer, pers. Mitt.) (189–191).

Um zu testen, ob sich das Phosphonat-Antibiotikum nach Ansäuerung des Agarüberstands mit unpolaren organischen Lösungsmitteln extrahieren lässt, wurden je 3 mL des aktiven Agarüberstands von Tü4103 mit Salzsäure bzw. Natriumhydroxid auf pH-Wert 3, 7 bzw. 11 eingestellt. Von jedem Ansatz wurde je 1 mL mit Ethylacetat, Butanol bzw. Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen und jeweils die wässrige und die organische Phase auf 100 μL eingengt. Die organischen

und wässrigen Phasen wurden in Agardiffusionstests auf Aktivität gegen *E. coli* WM6242 getestet. Überstand des reinen Mediums, der auf die pH-Werte 3, 7 bzw. 11 eingestellt worden war wurde als Negativ-Kontrolle verwendet.

Keine der Negativ-Kontrollen zeigte Aktivität gegen *E. coli* WM6242. Unabhängig vom Lösungsmittel und dem pH-Wert verursachten ausschließlich die wässrigen Proben Hemmhöfe (**Abbildung 33**). Die organischen Extrakte zeigten keine Aktivität. Das Phosphonat-Antibiotikum lässt sich also auch bei vorheriger Protonierung nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahieren.

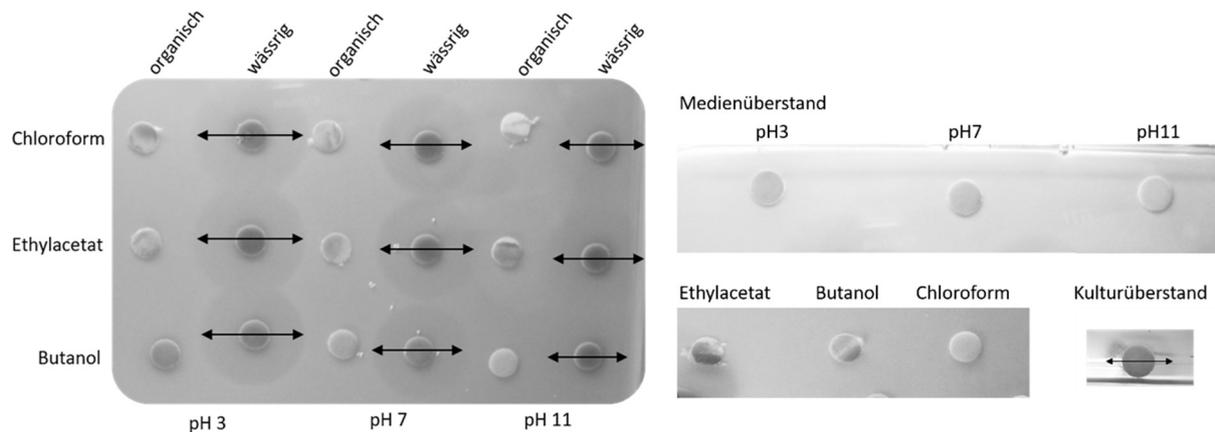


Abbildung 33: Agardiffusionstests gegen *E. coli* WM6242 mit den Extrakten und den wässrigen Phasen eines Agarüberstands von Tü4103. Der Agarüberstand wurde auf die pH-Werte 3, 7 und 11 eingestellt. Als Positiv-Kontrolle diente der unbehandelte Agarüberstand von Tü4103. Überstand des reinen Mediums, der auf die pH-Werte 3, 7 und 11 eingestellt worden war, sowie reines Ethylacetat, Butanol bzw. Chloroform wurden als Negativ-Kontrolle verwendet.

4.2.3 Charakterisierung des putativen Phosphonat-Biosynthesegenclusters von Tü4103

Das Gesamtgenom von Tü4103 umfasst 7.913.726 bp. Durch eine Analyse mit AntiSMASH wurde ein Cluster entdeckt, das für ein putatives Phosphonat kodiert (Cluster Nr. 9). Auf dem Genom liegt Cluster Nr. 9 im Bereich 3.383.515 bp bis 3.424.408 bp und umfasst damit etwa ca. 40 kb bzw. 0,5% des Genoms. Gemäß AntiSMASH-Auswertung besteht Cluster Nr. 9 aus 37 *open reading frames* (*orfs*). Die *orfs* wurden nach dem Stamm *Kitasatospora* und dem vermuteten Produkt, **Phosphonat**, mit *kph* bezeichnet. Die Nummerierung erfolgte beginnend mit *kph1* beim ersten *orf*, das AntiSMASH dem Phosphonat-Cluster zuordnet. *Orfs downstream* von *kph1* werden im negativen Zahlenbereich nummeriert, *orfs upstream* von *kph37* werden fort nummeriert.

Die Basensequenzen der identifizierten *orfs* innerhalb des Clusters und außerhalb der Ränder des Clusters Nr. 9 wurden mit der Datenbank BlastP abgeglichen, um funktionell ähnliche Proteine zu identifizieren und die Clustergrenzen zu bestimmen. Das Phosphonat-Cluster von Tü4103 wurde mit dem von *K. setae* (NCBI Accession Nr. NC_016109) und *K. phosalacinea* (NCBI Accession Nr. JNYYE00000000) verglichen, da *K. setae* als Typstamm des Genus *Kitasatospora* definiert wurde und *K.*

phosalacinea der Produzent des Phosphonat-Antibiotikums Phosalacin ist. Viele der Genprodukte des Phosphonat-Clusters von Tü4103 zeigen hohe Identität (76% bis 99%) zu Genprodukten von *K. setae* und *K. phosalacinea* (s. 0). Nicht nur die abgeleiteten Genprodukte von Cluster Nr. 9, sondern auch die Randbereiche außerhalb des von AntiSMASH identifizierten Clusters zeigen die höchste Identität ($\geq 95\%$) zu den putativen Genprodukten des Stammes *Streptomyces* sp. 4121.5 (NCBI Accession Nr. PHTW00000000). Hohe Identität besteht auch zwischen den Genprodukten von *kph17* bis *kph42* und denen des *pepM* enthaltenen Clusters der beiden Spezies *Streptomyces* spp. 31A4 und MMG1121 (NCBI Accession Nr. KF386877 und LGDV00000000) (48% bis 89%). Die beiden Stämme wurden in einer Studie von Ju *et al.* (113) als potenzielle Phosphonat-Produzenten identifiziert. Das zugehörige Phosphonat wurde allerdings noch nicht beschrieben. Die Tatsache, dass Tü4103, *Streptomyces* sp. 4121.5, *Streptomyces* sp. 31A4 und *Streptomyces* sp. MMG1121 ein BGC mit hoher Identität besitzen, lässt darauf schließen, dass die vier Stämme ein ähnliches oder das gleiche bislang unbekannte Phosphonat produzieren.

4.2.3.1 Identifizierung der Cluster Grenzen

Durch die Analyse mit BlastP und BlastX wurden auch die von AntiSMASH identifizierten Cluster Grenzen überprüft. *Downstream* von *kph42* zeigen die kodierten Genprodukte keine Ähnlichkeit mehr zu denen von *Streptomyces* sp. MMG1121 oder *Streptomyces* sp. 31A4. Zudem werden *downstream* von *kph42* ausschließlich hypothetische Proteine kodiert. Daher bildet *kph42* wahrscheinlich den rechten Rand des Clusters.

Upstream von *kph-23* finden sich vermehrt *orfs*, deren Genprodukte hypothetisch sind. Daher könnte es sich bei *kph-23* um die linke Cluster Grenze handeln. Aufgrund der Verortung der hypothetischen Genprodukte *upstream* von *kph-23* und *downstream* von *kph42* könnte das Cluster aber den viel größeren Bereich *kph-23* bis *kph42* umfassen. Allerdings muss es sich bei diesem DNA-Abschnitt nicht um ein einziges großes Cluster handeln. Stattdessen könnten zwei oder mehr kleinere Cluster im Genom in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Das Hinzufügen von 5, 10 oder 20 kb an die Ränder identifizierter Cluster ist eine gängige Funktion bei AntiSMASH, um akzessorische Gene zu erfassen (188). Durch die AntiSMASH-Analyse werden daher häufig zwei benachbarte Gencluster als ein einziges identifiziert oder flankierende Gene, die keinem Cluster zugehörig sind, werden dem eigentlichen BGC zugeordnet.

Das durch eine AntiSMASH-Analyse identifizierte Phosphonat-Cluster zeigt nur im Bereich von *kph17* bis *kph42* hohe Identität zu den Phosphonat-Biosynthesegenclustern der Stämme *Streptomyces* sp. MMG1121 und *Streptomyces* sp. 31A4, während *upstream* von *kph17* keine Identität existiert. *kph17* bis *kph42* liegen unidirektional vor. Das würde die Kontrolle durch einen gemeinsamen Regulator erleichtern. Im Gegensatz dazu zeigen *kph-23* bis *kph16* keine einheitliche Leserichtung. Der linke Rand

des Phosphonat-Clusters liegt demnach vermutlich bei *kph17* statt bei *kph-23*. Das eigentliche Phosphonat-Cluster, in dem die Enzyme zur Synthese der Gesamtstruktur des Phosphonat-Antibiotikums von Tü4103 kodiert sind, umfasst also wahrscheinlich *kph17* bis *kph42* bzw. den Bereich zwischen 3.401.998 bp und 3.433.971 bp. Das sind 31.973 bp bzw. 0,4% des Gesamtgenoms (Liste der *orfs* mit abgeleiteten Genprodukten s. 0).

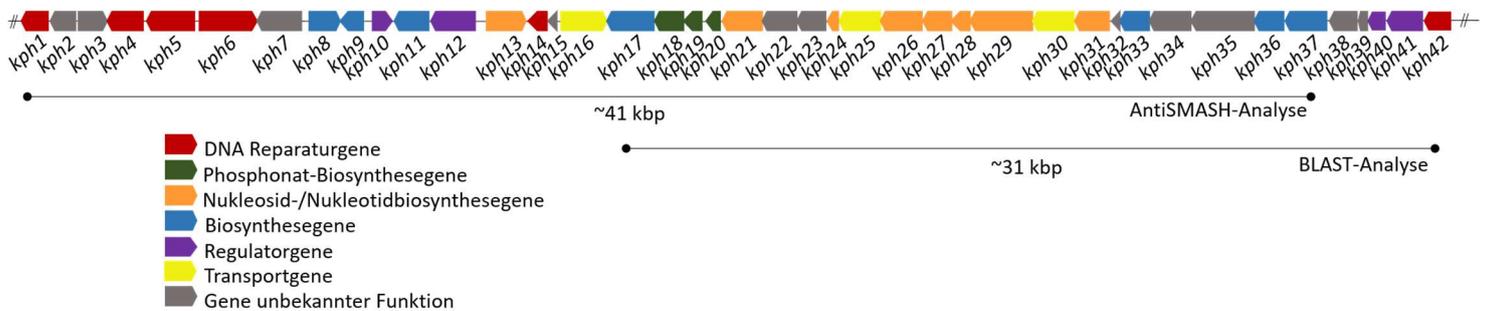


Abbildung 34: Schematische Darstellung der *orfs* des Phosphonat-Clusters von Tü4103. Die Linien markieren die Regionen, die in der AntiSMASH- sowie in der BLAST-Analyse als Phosphonat-Cluster identifiziert wurden.

4.2.3.2 Identifizierung möglicher Genprodukte

kph17 bis *kph42* sowie ausgewählte *orfs* außerhalb des Phosphonat-Clusters sollten im Folgenden anhand der putativen Genprodukte auf eine mögliche Rolle in der Phosphonat-Biosynthese hin analysiert werden. Dabei sind die Referenzprodukte der *orfs*, auf die sich bezogen wird, noch nicht funktionell charakterisiert. Die Funktionsgruppierung orientierte sich an den von AntiSMASH verwendeten Kategorien Biosynthese-, Transport-, regulatorische und weitere Gene. Die Biosynthesegene wurden bereits ihrer putativen Funktionalität für die Biosynthese nach unterteilt in Phosphonat-Biosynthesegene und Nukleosid-/Nukleotid-Biosynthesegene sowie Biosynthesegene unbekannter Funktion. Als weitere Kategorie wurde die der DNA-Reparaturgene eingeführt, die vermehrt zu finden sind und Hinweise auf einen möglichen Wirkort des Phosphonats liefern.

4.2.3.2.1 Phosphonat-Biosynthesegene

In allen Phosphonat-Produzenten finden sich die drei Gene *pepM*, *pnpYD1* und *pnpYD2*, die für die essenziellen Enzyme zur Phosphonatproduktion (PepM und PnPyD) kodieren (**Abbildung 35**, s. 1.5.1). *kph18* kodiert für eine putative PepM, die zu 86% PepM aus *Streptomyces* sp. MMG1121 entspricht. Die Genprodukte von *kph19* und *kph20* kodieren für eine putative α - bzw. β -Untereinheit einer putativen PnPyD, die den entsprechenden Untereinheiten aus *Streptomyces* sp. 31A4 zu 89% bzw. 85% gleichen. Die putativen Genprodukte von *kph18*, *kph19* und *kph20* sind ein starker Hinweis, dass Tü4103 ein Phosphonat produzieren kann.

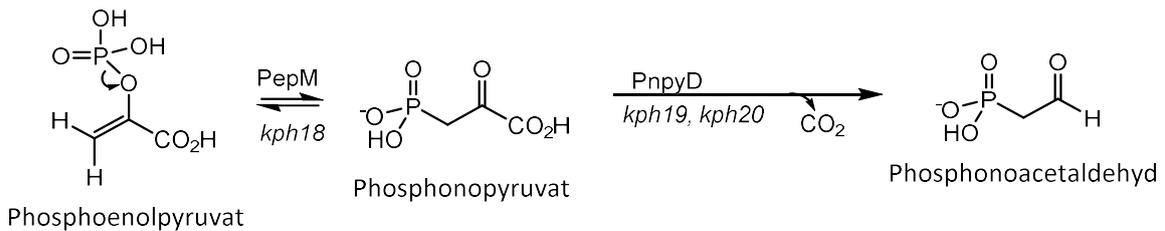


Abbildung 35: Umsetzung von Phosphoenolpyruvat zu Phosphoacetaldehyd über Phosphonopyruvat durch PepM bzw. PnPyD.

4.2.3.2.2 Nukleosid/Nukleotid-Biosynthesegene

PepM und PnPyD sind die Enzyme, die die Phosphonatgruppe synthetisieren. Weitere Enzyme können die restliche Struktur des Phosphonat-Antibiotikums bilden.

kph13 kodiert für eine mögliche Carbamoylphosphat-Synthetase, welche der putativen Carbamoylphosphat-Synthetase aus dem Phosalacin-Produzenten *K. phosalacinea* zu 92 % gleicht. Die Carbamoylphosphat-Synthetase katalysiert den ersten Schritt der Pyrimidin-Biosynthese, indem Carbamoylphosphat (1) und L-Aspartat (2) zu *N*-Carbamoylaspartat (3) umgesetzt wird (**Abbildung 36**) (192). Die Carbamoyl Phosphat-Synthetase gehört außerdem zu den ATP-Grasp-Domänen Proteinen, die die Bildung von Amidbindungen in Peptiden katalysieren (192). Da *kph13* außerhalb der definierten Clustergrenzen liegt, spielt das Genprodukt aber möglicherweise keine Rolle in der Phosphonat-Biosynthese.

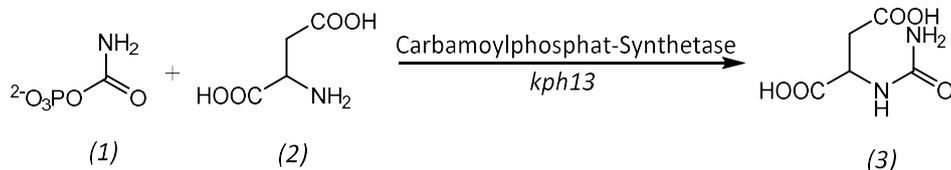


Abbildung 36: Der erste Schritt der Pyrimidin-Synthese. Umsetzung von (1) und (2) zu (3) durch die Carbamoylphosphat-Synthetase (192).

kph21 kodiert für eine putative Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase, die der aus *Streptomyces* sp. MMG1121 zu 79% entspricht. Die Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase addiert 5-Phospho-β-D-Ribosylamin (4) zu Glycin (5), wodurch ein Glycinribonukleotid (6) entsteht (**Abbildung 37**) (193).

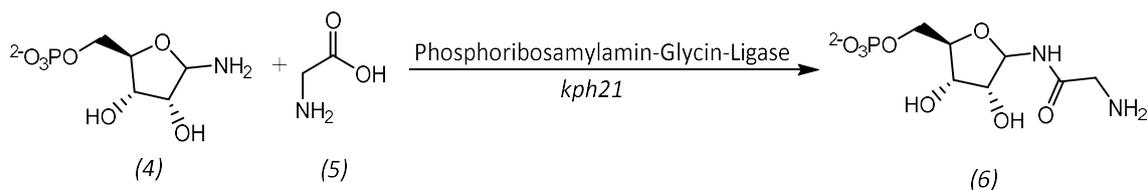


Abbildung 37: Umsetzung von (4) und (5) zu (6) durch die Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase (193).

kph31 kodiert für eine putative Aspartat-Carbamoyl-Transferase, die derjenigen aus *Streptomyces* sp. MMG1121 zu 88% gleicht. In einem späteren Schritt der Purin-Biosynthese verbindet die Aspartat-

Carbamoyl-Transferase Carbamoylphosphat (7) und ein Aspartat-Molekül (8) zu N-Carbamoyl-L-Aspartat (9) (**Abbildung 38**) (194). Die Enzyme, die die Umwandlung von (6) zu (7) katalysieren, sind im Phosphonat-Cluster nicht kodiert.

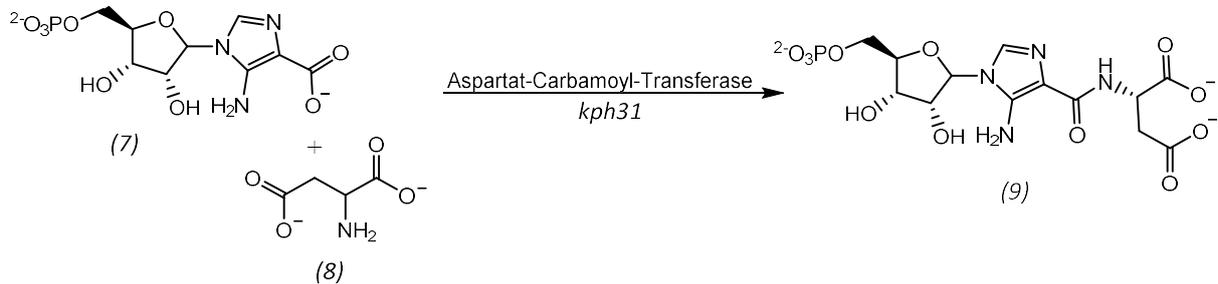


Abbildung 38: Umsetzung von (7) und (8) zu (9) durch die Aspartat-Carbamoyl-Transferase (194).

kph24 trägt die Information für eine mögliche Adenylylsulfat-Kinase, die der putativen Adenylylsulfat-Kinase aus *Streptomyces* sp. MMG1121 zu 52% entspricht. *kph28* kodiert für eine weitere Adenylylsulfat-Kinase, die einer Adenylylsulfat-Kinase aus *K. phosalacinea* ähnelt (82%). *kph26* und *kph27* tragen die Informationen für die Untereinheit 1 bzw. 2 einer putativen Sulfatadenylyl-Transferase. Diese entsprechen zu 95% bzw. 93% der Untereinheit 1 bzw. 2 einer Sulfatadenylyl-Transferase aus *K. phosalacinea*. *kph29* kodiert für ein Genprodukt, das zu 74% einer 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat-Phosphatase aus *Streptomyces* sp. MMG1121 entspricht. Diese drei Enzyme katalysieren die drei aufeinander folgenden Reaktionen der Sulfataktivierung (195). Die Sulfatadenylyl-Transferase addiert eine Sulfatgruppe (10) an das 5'-Phosphat (11), woraufhin die Adenylylsulfat-Kinase einen Phosphatrest an die 3'-Hydroxygruppe des entstandenen Adenosin-5'-Phosphosulfat (12) anhängt, sodass 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (13) gebildet wird (**Abbildung 39**) (195). Das so aktivierte Sulfat kann in den Sulfat-Metabolismus eingehen (195). Dazu überträgt die 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat-Phosphatase die Sulfatgruppe wieder auf einen organischen Träger (14) (195). Als Nebenprodukt entsteht ein Pyrophosphat (15) (195).

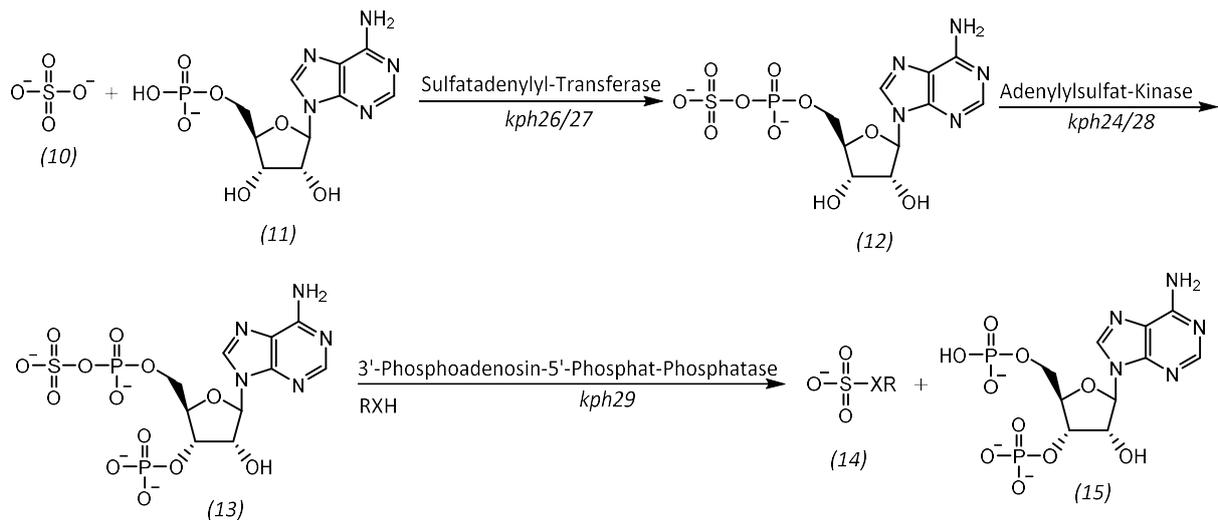


Abbildung 39: Darstellung der drei aufeinander folgenden Schritte zur Sulfataktivierung (195).

Auch in den Biosyntheseclustern der interkalierenden, DNA-schädigenden Antibiotika Mitomycin (**Abbildung 40 (a)**), (196, 197) Medermycin (198) (**Abbildung 40 (b)**) und Azinomycin B (**Abbildung 40 (c)**) (199) finden sich *orfs*, deren Genprodukte der Adenylylsulfat-Kinase und der Sulfatadenylyl-Transferase gleichen. Ihre Funktion in diesen Clustern ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Gemäß einer MultiGeneBlast-Analyse finden sich jedoch in keinem anderen Cluster die Gene zur Aktivierung von Schwefel in direkter Nachbarschaft zu Purin- und Pyrimidin-Biosynthesegenen. Möglicherweise tragen die drei Enzyme zur Biosynthese DNA-schädigender Sekundärmetabolite bei.

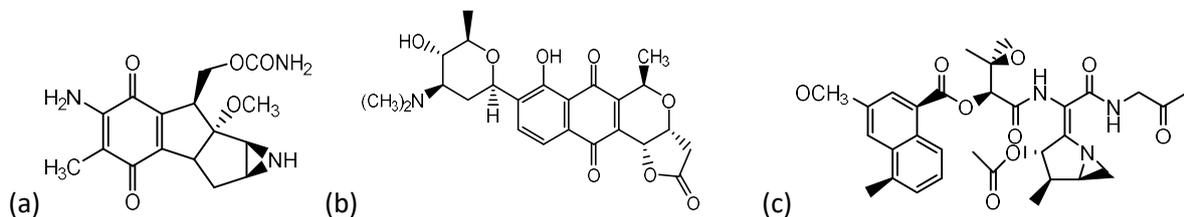


Abbildung 40: Strukturformeln von (a) Mitomycin (196, 197), (b) Medermycin (198) und (c) Azinomycin B (199).

Die vermehrte Anwesenheit von *orfs*, die für putative Enzyme kodieren, die an der Biosynthese von Pyrimidinen und Purinen beteiligt sind, in direkter Nachbarschaft zu den Phosphonat-Biosynthesegenen führte zu der Hypothese, dass Nukleotide oder Nucleoside Teil der Struktur des Phosphonats von Tü4103 sind. Für die herkömmliche Purin-Biosynthese sind 17 verschiedene Enzyme erforderlich (193). Daher sind die im Phosphonat-Cluster kodierten Genprodukte (Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase und Aspartat-Carbamoyl-Transferase) für sich nicht in der Lage, ein komplettes Purinmolekül zu synthetisieren. Möglicherweise wird der Nucleosidanteil des Phosphonats aus dem Primärmetabolismus rekrutiert (s. 5.2).

4.2.3.2.3 Weitere Biosynthesegene

Durch die AntiSMASH-Analyse wurden weitere im Cluster situierte *orfs* identifiziert, deren putative Genprodukte eine Funktion in der Biosynthese des Phosphonats haben können. *kph17* kodiert für eine Aldehyd-Dehydrogenase, die zu 82% der Aldehyd-Dehydrogenase aus *Streptomyces* sp. MMG1121 gleicht. Aldehyd-Dehydrogenasen spielen eine Rolle in der Biosynthese diverser Biomoleküle, wie Retinolsäure, Betain und γ -Butyro-Buttersäure (200). *kph33* kodiert für ein Genprodukt, das zu 82% der Dioxygenase aus dem Taurin-Metabolismus von *Streptomyces* sp. MMG1121 entspricht. Mit Hilfe dieses Enzyms kann Schwefel aus Taurin gewonnen werden (201). *kph36* enthält die Information für eine Histidinol-Phosphat-Amino-Transferase, die der aus *Streptomyces* sp. MMG1121 zu 77% ähnelt. In der Histidin-Biosynthese transferiert dieses Enzym eine Aminogruppe auf L-Histidinol-Phosphat (202). Das Genprodukt von *kph37* entspricht zu 68% einer Phenylacetat-CoA-Ligase aus *Streptomyces* sp. MMG1121. Die Phenylacetat-CoA-Ligase aktiviert Phenylacetat durch die Ligation mit CoA im Phenylacetat-Katabolismus (203). *Streptomyces* sp. MMG1121 wurde in einer Studie von Ju *et al.* (113) als potenzieller Phosphonat-Produzent identifiziert. Das zugehörige Phosphonat wurde allerdings bislang noch nicht beschrieben.

Die identifizierten Enzyme entstammen alle verschiedenen Biosynthesewegen, daher haben sie in der Phosphonat-Biosynthese eventuell gar keine Funktion. Die Phenylacetat-CoA-Ligase könnte, wie im Phenylacetat-Katabolismus, auch im vorliegenden Phosphonat-Biosyntheseweg die Starter-Einheit aktivieren. An erster Stelle im Cluster steht *kph42*, dessen putatives Genprodukt zu 71% einer Phosphatase der Nudix-Familie aus *Streptomyces* sp. 31A4 gleicht. Die Enzyme dieser Familie hydrolysieren Nukleosid-Diphosphat-Derivate, um die Akkumulation toxischer Metabolite und Intermediate zu verhindern (204). In Tü4103 könnten diese Phosphatasen die Zelle vor in der Zelle verbleibendem Phosphonat-Antibiotikum schützen.

4.2.3.2.4 DNA-Reparaturgene

Upstream von *kph17* des Phosphonat-Clusters befinden sich sechs *orfs*, die für bekannte DNA-Reparaturproteine kodieren. *kph1* kodiert für ein Genprodukt, das zu 95% einer putativen A-/G-spezifischen Adenin-Glykosylase aus *K. phosalacinea* ähnlich ist. Die A-/G-spezifische Adenin-Glykosylase schützt die DNA der Zelle durch *base excision repair* gegen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale (205). *kph4* kodiert für das DNA-Integrität-scannende Protein DisA. Dieses Genprodukt entspricht zu 99% dem DisA-ähnlichen Genprodukt aus *K. setae*. DisA repariert DNA-Schäden, die durch UV-Strahlung verursacht wurden (206). Zwar wurde DisA zuerst in *B. subtilis* entdeckt (207), es sind aber auch Homologe aus Streptomyceten bekannt, (208) deren Funktionalität nachgewiesen worden ist. Das Genprodukt von *kph5* gleicht zu 96% einem dem DNA-Reparaturprotein RadA ähnlichen Genprodukt aus

K. phosalacinea. Bei RadA handelt es sich um eine archaische Rekombinase, die DNA-Doppelstrangbrüche repariert. RadA ist in allen Lebewesen hoch konserviert (209). *kph6* kodiert für eine putative Sigma-Faktor-Untereinheit der RNA-Polymerase, die zu 96% der Sigma-Faktor-Untereinheit der RNA-Polymerase aus *K. phosalacinea* entspricht. Diese Untereinheit ist für die Rekrutierung der RNA-Polymerase zu Beginn der Transkription verantwortlich (210). Damit ist der Sigma-Faktor kein Reparaturprotein, könnte aber in den DNA-Reparaturprozess eingebunden sein, indem der Faktor die Polymerase rekrutiert, um reparierte Gene erneut abzulesen (211). *kph14* kodiert für ein putatives Genprodukt, das zu 87% einem DNA-Protein-Cystein-Methyltransferase-ähnlichen Genprodukt aus *K. phosalacinea* entspricht. Diese Methyltransferasen reparieren O⁶-Alkylierungsaddukte der DNA (212). Die aufgeführten Genprodukte vermitteln alle Resistenz gegen DNA-Schädigungen. Daher könnten diese Genprodukte als Schutz gegen eine vom Cluster kodierte DNA-schädigende Substanz fungieren. Sie sind allerdings nicht spezifisch in Produzenten DNA-schädigender Substanzen vorhanden, sondern dienen generell als Schutz gegen DNA-Schäden durch Umwelteinflüsse.

4.2.3.2.5 Regulatorgene

Im Phosphonat-Cluster von Tü4103 finden sich drei *orfs*, die für Genprodukte kodieren, die an der Regulation beteiligt sein könnten: *kph10* kodiert für einen TetR-Regulator, der zu 94% einem TetR-Regulator aus *K. phosalacinea* entspricht. TetR ist ein in Aktinomyeten häufig vorkommender Repressor, der metabolische Prozesse, *Quorum Sensing* und den Export kleiner Moleküle kontrolliert (213). Eine besondere Funktion fällt TetR-ähnlichen Regulatoren bei der Regulation der Antibiotika-Synthese zu (213). Unter anderem vermittelt der TetR-ähnliche Regulator ActR Selbstresistenz gegen Actinorhodin in *S. coelicolor* (213).

kph12 kodiert für das cAMP-Rezeptor-Protein Crp. Crp fungiert hauptsächlich als Aktivator, der ein breites Spektrum an physiologischen Prozessen reguliert, wie Aminosäuren-Metabolismus, Transportprozesse oder die Produktion von Toxinen (214). In Streptomyeten aktiviert Crp die Produktion von Sekundärmetaboliten (215). Allerdings fungiert Crp als globaler, nicht als Cluster-assoziiertes Regulator (215).

Die Genprodukte von *kph40* und *kph41* zeigen 89% bzw. 76% Identität zu Helix-Turn-Helix-Motiv enthaltenden Transkriptionsregulatoren der *Streptomyces* spp. MMG1121 und 31A4. 84% aller aus einer Komponente bestehenden Transkriptionsfaktoren beinhalten ein Helix-Turn-Helix-Motiv, das somit eine zentrale Rolle in Regulationsprozessen spielt (216).

4.2.3.2.6 Transportgene

Das Genprodukt von *kph25* entspricht zu 73% einem Natrium-/Wasserstoff-Antiporter aus *Streptomyces* sp. MMG1121. Antiporter sind in der Zellmembran lokalisiert und regulieren den pH-Wert der Zelle durch den Austausch von einem Natrium- gegen ein Wasserstoff-Ion (217). Obwohl Natrium-/Wasserstoff-Antiporter mit Antibiotika-Genclustern assoziiert sein können, wurde bisher kein Zusammenhang zur Bioaktivität festgestellt (218). *kph30* kodiert für einen MFS (*major facilitator superfamily*)-Transporter, der zu 77% einer Permease aus *Streptomyces* sp. MMG1121 ähnelt. MFS Transporter erlauben den passiven Transport von Molekülen durch die Zellmembran, unter anderem von Toxinen und Medikamenten, und können auf diese Weise Resistenz vermitteln (219). Die Permease könnte als Exporter des Phosphonat-Antibiotikums aus der Zelle dienen.

4.2.3.2.7 Genprodukte mit für die Phosphonatsynthese unbekannter Funktion

kph34 kodiert für ein eine TPR (*tetrarico peptide repeat*)-Domäne enthaltene Protein, das zu 85% dem aus *Streptomyces* sp. MMG1121 entspricht. TPR-Domänen sind ubiquitär vorkommende Peptide, die die Bildung von α -helikalen Bindungen zwischen Proteinen vermitteln, wobei sie in verschiedenste zelluläre Prozesse (u.a. Kontrolle des Zellzyklus, Transkriptionsrepression, Stress-Antwort, Inhibition von Proteinkinasen, mitochondrialer und peroxisomaler Proteintransport) involviert sind (220). Das Genprodukt von *kph35* gleicht zu 68% einer Prolyl-Oligopeptidase aus *Streptomyces* sp. MMG1121. Prolyl-Oligopeptidasen sind Serin-Proteasen, die insofern eine wichtige biologische Rolle im Abbau von Peptiden spielen, als diese, anders als gewöhnliche Peptidasen, in der Lage sind, Prolin-Reste zu hydrolysieren (221).

Zudem kodieren fünf *orfs* für hypothetische Proteine, deren Funktion nicht näher bekannt ist. Diese Proteine zeigen ebenfalls hohe Identität (99%) zu putativen hypothetischen Proteinen aus den *Streptomyces* spp. MMG1121 und 31A4.

4.2.3.2.8 Zusammenwirken der Genprodukte des Phosphonat-Clusters

Aus den einzelnen Genprodukten lässt sich ein stimmiges Bild der Funktionalität des Phosphonat-Clusters entwerfen. Der Transkriptionsstart wird von Helix-Turn-Helix-Motiv enthaltene Transkriptionsregulatoren eingeleitet und möglicherweise von einem TetR-Regulator co-reguliert. Ein Nucleosid- oder Nucleotid-Phosphonat wird produziert. Das Phosphonat wird statt Nucleotidphosphaten in die DNA eingebaut, was zum Abbruch der Replikation oder Transkription führt. Um sich gegen das selbst produzierte Antibiotikum zu schützen, werden zusammen mit dem Phosphonat-Antibiotikum DNA-Reparaturgene, wie RadA, exprimiert. Nach dem Entfernen eines

fälschlicherweise eingebauten Nucleosid-Phosphonats rekrutiert die Sigma-Faktor-Untereinheit die Polymerase, um das Gen erneut abzulesen. Der MFS Transporter dient dem Transport des Phosphonat-Antibiotikums aus der Zelle, während die Nudix-Pyrophosphatase verbleibendes Phosphonat hydrolysiert und somit unschädlich macht.

4.2.4 Herstellung eines Konstruktes zur Inaktivierung des *kph18*-Gens in Tü4103

Um nachzuweisen, dass das Phosphonat-Cluster für die Phosphonat-Antibiotikum-Biosynthese verantwortlich ist, sollte eine *kph18*-Mutante hergestellt werden und diese in Bioassays mit dem *E. coli* WM6242-Teststamm auf Verlust der Bioaktivität hin untersucht werden. Der Verlust der Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 der Mutante würde darauf hindeuten, dass ohne *kph18* bzw. ohne das Phosphonat-Cluster keine Phosphonatproduktion möglich ist.

Genomische DNA von Tü4103 als Templat und die Primer *pepMupfw/rv* bzw. *pepMdofw/rv* wurden verwendet, um die beiden Fragmente *pepMup* (1413 bp) bzw. *pepMdo* (1028 bp) zu amplifizieren. Diese Fragmente enthielten jeweils einen ~1 kb großen *up-* bzw. *downstream*-Bereich von *kph18*, die für die homologe Rekombination ins Tü4103-Chromosom entscheidend sind. *pepMup* und *pepMdo* wurden in den Kloniervektor pDrive eingefügt (**Abbildung 41**). Die erhaltenen Plasmide pDrive/*pepMup* bzw. pDrive/*pepMdo* wurden in *E. coli* Novablue-Zellen eingebracht und die Transformanten durch die Blau-Weiß-Methode selektiert. Das isolierte Plasmid pDrive/*pepMup* wurde mit *EcoRI* und *XbaI* bzw. pDrive/*pepMdo* mit *XbaI* und *HindIII* geschnitten. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden in einer Drei-Fragmenten-Ligation mit dem *EcoRI/HindIII* linearisierten pK18-Vektor ligiert, woraus das Konstrukt pK18/ Δ *pepM* (5450 bp) resultierte. Das 2496 bp große Δ *pepM*-Deletionsfragment wurde als *EcoRI/HindIII*-Fragment aus pK18/ Δ *pepM* isoliert und in das mit *EcoRI* und *HindIII* linearisierte Plasmid pGus21 eingefügt, woraus pGus21/ Δ *pepM* entstand. Mittels Restriktionsverdau wurde verifiziert, ob es sich um das korrekte Konstrukt handelte. Nach Spaltung mit *EcoRI* und *HindIII* wurde im 1%igen Agarosegel ein 5,4 kb- sowie ein 2,8 kb-großes Fragment nachgewiesen (Kontrollspaltung **Abbildung 42(a)**; Plasmidkarte s. 0).

Im Konstrukt pK18/ Δ *pepM* befindet sich eine *XbaI*-Schnittstelle, in welche die Thiostrepton-Resistenzkassette (*thio*) inkloniert wurde. Die *thio*-Kassette wurde als *XbaI*-Fragment aus dem *XbaI*-geschnittenen Vektor pDrive*thio* isoliert und in das *XbaI*-linearisierte Plasmid pK18/ Δ *pepM* eingefügt. Daraus resultierte das Endkonstrukt pK18/ Δ *pepMthio*. Die Kontrollspaltung mit *XbaI* ergab die korrekten Fragmente der Größen 5,5 kb und 1,1 kb (Kontrollspaltung **Abbildung 42(b)**, Plasmidkarte s. 0).

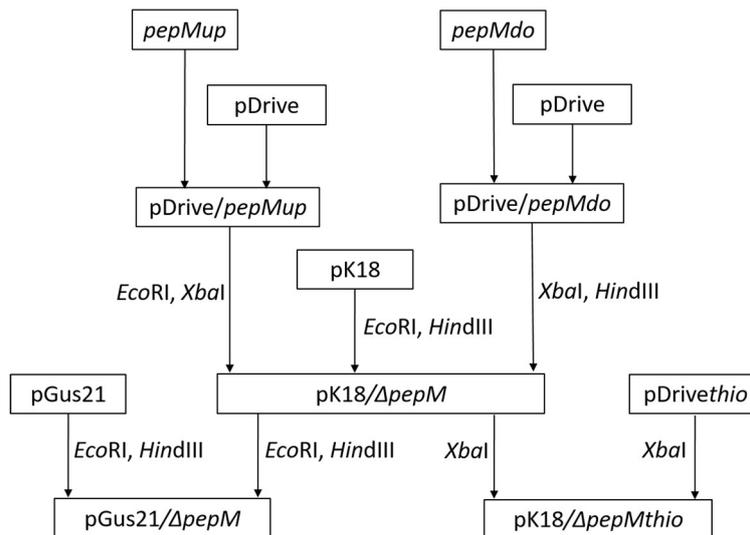


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Konstruktion der Plasmide *pGus21/ΔpepM* und *pK18/ΔpepMthio*.

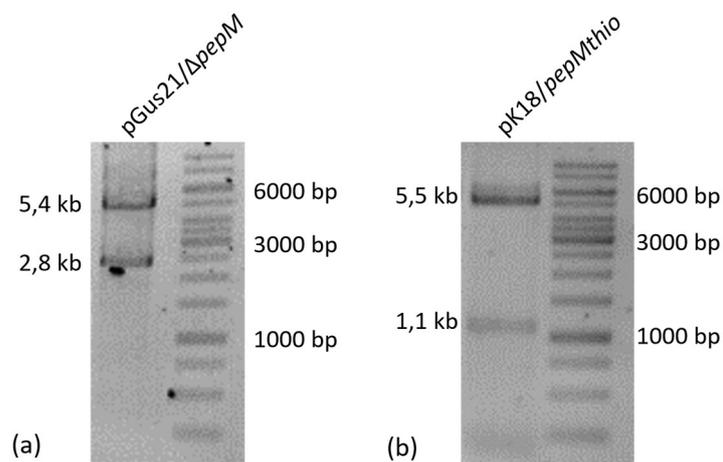


Abbildung 42: Kontrollspaltung von (a) *pGus21/ΔpepM* mit *EcoRI/HindIII* und (b) *pK18/ΔpepMthio* mit *XbaI*. Auftrennung der Fragmente in einem 1% Agarosegel.

Zur Transformation von Tü4103 mit *pGus21/ΔpepM* und *pK18/ΔpepMthio* wurden Protoplasten-Transformation, Konjugation und Elektroporation angewendet (s. 3.5.4, 3.5.5, 3.5.6). Die entstehenden Singlecrossover-Mutanten Tü4103*pGus21/ΔpepM* und Tü4103*pK18/ΔpepMthio* hätten mit Hilfe der plasmidvermittelten Apramycin-Resistenz selektioniert werden sollen. Allerdings konnten durch keine der Methoden Transformanden erhalten werden. In zukünftigen Arbeiten wird ein geeignetes Protokoll zur genetischen Manipulation von *Kitasatospora* Tü4103 entwickelt werden (s. 5.2.2.1).

4.2.5 Analyse der Transkription von *kph18* und Korrelation zur Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 Transkription von *pepM* in Kulturen von Tü4103

4.2.5.1 Transkription von *kph18* in Tü4103

kph18 kodiert für PepM, das essenzielle Enzym für die Phosphonat-Biosynthese. Durch eine Transkriptionsanalyse sollte gezeigt werden, dass Kulturen von Tü4103 *kph18* transkribieren.

Die RNA aus Kulturen von Tü4103 in zwei Replikaten wurde isoliert und als Templat zur Generierung von cDNA mittels der RT-Reaktion verwendet. Die erfolgreiche Generierung von cDNA wurde durch eine PCR mit dem RT-Reaktionsansatz und den Primern 16Sfw/rv nachgewiesen, da das 16S rRNA-Gen als *housekeeping* Gen konstitutiv exprimiert wird. Die cDNA wurde als Templat für eine PCR mit den Primern RTpepMfw/rv, die an interne Sequenzen von *pepM* binden, verwendet. Das so amplifizierte Fragment sollte eine Länge von 270 bp aufweisen. Als Positiv-Kontrolle diente die gDNA von Tü4103. In der Negativ-Kontrolle, in der aus Tü4103 isolierte RNA als Templat eingesetzt wurde, sollte kein Amplifikat gebildet werden. Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

In der Negativ-Kontrolle war kein Amplifikat vorhanden (**Abbildung 43**). In der Positiv-Kontrolle wurde ein Fragment der Größe 270 bp amplifiziert. In den cDNA-Proben von Tü4103 wurden Fragmente gleicher Länge amplifiziert. Die Transkriptionsanalyse zeigt, dass *kph18* in Kulturen von Tü4103 transkribiert wird.

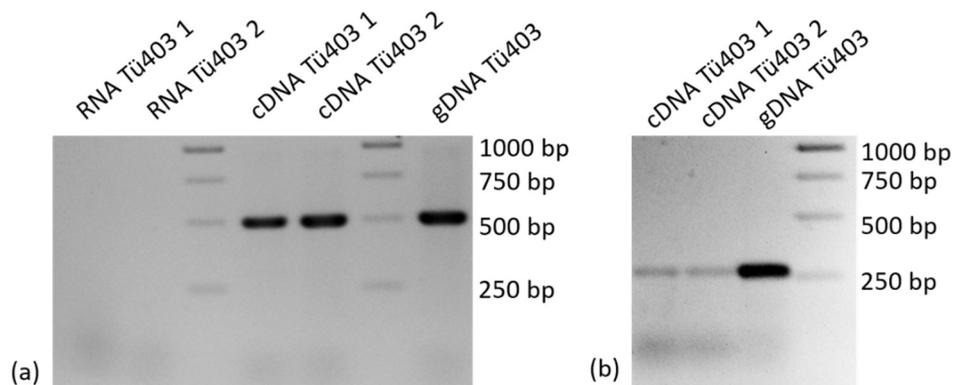


Abbildung 43: Transkriptionsanalyse von Tü4103. (a) Nachweis der Eliminierung von DNA bzw. erfolgreicher Generierung von cDNA mit den Primern 16Sfw/rv in einem 2%igen Agarosegel. (b) Nachweis des RT-PCR-Amplifikats mit cDNA von Tü4103 als Templat und den Primern RTpepMfw/rv in einem 2%igen Agarosegel.

4.2.5.2 Korrelation der Gencluster-Transkription in Tü4103 mit der Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242

Mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten sollte untersucht werden, ob die Transkription des Phosphonat-Clusters von Tü4103 mit der antibakteriellen Aktivität gegen den Teststamm *E. coli* WM6242 korreliert. Dies würde darauf hindeuten, dass das vorgeschlagene Gencluster (Cluster Nr. 9) für die Phosphonat-

Biosynthese verantwortlich ist. Hierzu sollte untersucht werden, welche Gene des Phosphonat-Clusters transkribiert werden. Insbesondere die Transkription von *kph18*, welches für das Phosphonat-Biosynthese charakteristische Enzym PepM kodiert, sollte untersucht werden.

Die antibakterielle Aktivität von elf Tü4103-Festkulturen gegen *E. coli* WM6242 wurde in Hemmhoftests bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die RNA der Kulturen wurde isoliert und als Templat zur Generierung von cDNA mittels der RT-Reaktion verwendet. Die erfolgreiche Generierung von cDNA wurde durch eine PCR mit dem RT-Reaktionsansatz und den Primern 16Sfw/rv nachgewiesen. Die cDNA wurde als Templat für eine PCR mit Primern, die an interne Sequenzen der zu untersuchenden Gene des Phosphonat-Clusters binden (s. 3.1.4), verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente die gDNA von Tü4103. Als Negativ-Kontrolle wurde isolierte RNA aus Tü4103 verwendet. Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Sieben der elf Kulturen von Tü4103 verursachten Hemmhöfe in den *E. coli* WM6242-Bioassays, während bei vier der Proben keine Hemmhöfe detektiert wurden. In vorangegangenen Experimenten wurde die Transkription von *kph18* nachgewiesen (s. 4.2.5.1). In diesem Versuch konnte das zu erwartende Amplifikat mit einer Größe von 270 bp in den elf Ansätze nicht nachgewiesen werden, unabhängig von der Aktivität der Kulturen gegen *E. coli* WM6242 (**Abbildung 44**).

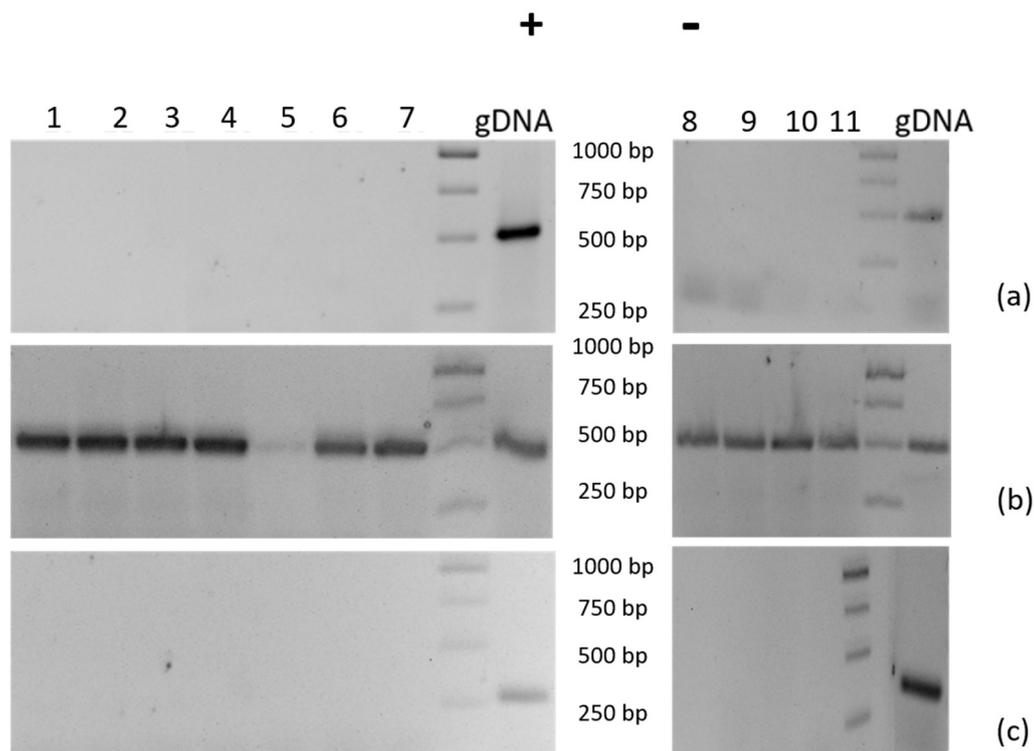


Abbildung 44: Analyse von Tü4103 auf Transkription von *kph18*. „+“ auf der linken Seite bezeichnet die Kulturen, die Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigten, „-“ auf der rechten Seite die Kulturen, die keine Aktivität zeigten. (a) RNA-Negativ-Kontrolle. (b) Nachweis erfolgreiche Generierung von cDNA mit den Primern 16Sfw/rv. (c) Ergebnis der RT-PCR mit cDNA und den Primern RTpepMfw/rv. Die Auftrennung der PCR-Ansätze erfolgte jeweils in einem 2%igen Agarose-Gel.

Um zu prüfen, ob andere *orfs* des Phosphonat-Clusters von Tü4103 in Kulturen mit und ohne Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 transkribiert werden, wurde RT-PCRs mit der generierten cDNA (s.o.) und Primern, die an interne Sequenzen ausgewählter *orfs* binden (s. 3.1.4), durchgeführt. Insbesondere wurden die *orfs* auf Transkription untersucht, deren putative Genprodukte an der Nukleosid-/Nukleotid-Synthese bzw. am DNA-Reparaturmechanismus beteiligt sein könnten. Banden der Größen 250 bp, 333 bp und 276 bp wurden detektiert, die den Amplifikaten von *kph12* (Crp Transkriptionsregulator), *kph21* (Glycin-Ligase) und *kph26* (Sulfat-Adenylyltransferase) entsprechen (**Tabelle 14**, Gelbilder s. 7.4). Das Phosphonat-Cluster wird also nicht vollständig transkribiert.

Tabelle 14: Transkriptionsanalyse ausgewählter Gene des Phosphonat-Clusters von Tü4103.

Kultur Nr. <i>orf</i>	Aktivität gegen <i>E. coli</i> WM6242							Keine Aktivität gegen <i>E. coli</i> WM6242				gDNA	Hypothetisches Genprodukt	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
<i>kph4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	DisA
<i>kph5</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	RadA
<i>kph6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	RNA Polymerase Sigma Faktor
<i>kph12</i>	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	Transkriptions- regulator Crp
<i>kph17</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	Aldehyd Dehydrogenase
<i>kph19</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Phosphonopyruvat Decarboxylase a
<i>kph20</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Phosphonopyruvat Decarboxylase b
<i>kph21</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Glycin Ligase
<i>kph24</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Adenylylsulfat Kinase
<i>kph26</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	Sulfat Adenylyl- transferase
<i>kph27</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Sulfatadenylyl- Transferase
<i>kph28</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Adenylylsulfat Kinase
<i>kph29</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Pyrophosphatase
<i>kph31</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Aspartat Carba- moyltransferase

„+“ bezeichnet die Anwesenheit einer Bande, „-“ bezeichnet die Abwesenheit einer Bande.

Basierend auf den Ergebnissen der Transkriptionsanalysen kann kein Zusammenhang zwischen der Transkription des Phosphonat-Clusters und der Bioaktivität von Tü4103 gegen *E. coli* WM6242 abgeleitet

werden. Da die Bedingungen für die Transkription des Clusters und insbesondere von *kph18* noch nicht aufgeklärt worden sind, kann aber an diesem Punkt der Untersuchungen noch nicht ausgeschlossen werden, dass das Phosphonat-Cluster für das Phosphonat-Antibiotikum kodiert.

4.2.6 Studien zum Wirkort des Phosphonat-Antibiotikums

4.2.6.1 Identifizierung von Resistenzgenen des Phosphonat-Clusters durch eine Analyse mit dem Webtool ARTS

Um einen möglichen Wirkmechanismus des Phosphonat-Antibiotikums zu ermitteln, wurde eine Analyse mit dem bioinformatischem Tool ARTS durchgeführt. Mit ARTS wird im Genom nach bekannten und putativen Resistenzgenen gesucht. Kriterien hierfür sind die Duplikation von Genen, die Lokalisation der möglicher Resistenzgene innerhalb eines BGCs sowie Gene, die im Vergleich zum Rest des Genoms durch Differenzen im *Codon-Usage* oder im GC-Gehalt, auf horizontalen Gentransfer hindeuten. Die Gesamtgenomsequenz von Tü4103 wurde mit ARTS analysiert. Für die Suche wurde der *Exploration Mode* verwendet.

Durch die Analyse wurden drei mögliche *orfs* im Phosphonat-Cluster von Tü4103 identifiziert, deren Genprodukte Resistenz vermitteln können (**Tabelle 15**, s. 7.4). (i) *kph5* kodiert für RadA, der seiner Lokalisation nach mit dem Phosphonat-Cluster assoziiert ist. RadA ist als DNA-Reparaturprotein bekannt, das Doppelstrangbrüche repariert (209). *kph5* liegt außerhalb des vorgeschlagenen Phosphonat-Clusters (s. 4.2.1.1), könnte aber mit dem Phosphonat-Antibiotikum co-exprimiert werden. (ii) Der *orf* für die Adenylyl-Sulfatkinase B liegt dupliziert vor (*kph24*, *kph28*) und kommt aufgrund der Lokalisation im Cluster als Resistenzgen in Frage. Allerdings ist die Duplikation innerhalb eines Clusters ein Sonderfall: ARTS zielt eigentlich auf Duplikationen ab, die im Genom verteilt sind. Es ist bekannt, dass die Adenylyl-Sulfatkinase B in den Resistenzmechanismus gegen Cr(VI) involviert ist (222). Cr(VI) verursacht unter anderem oxidative Schäden an der DNA (222). (iii) *kph31*, der für eine Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase kodiert, wurde in der ARTS-Analyse als bekanntes Resistenzgen identifiziert. Eine Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* vermittelt Eigenresistenz gegen Phaseolotoxin und Octicidin, die andere Ausprägungen der Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase hemmen (223–226).

Durch die Analyse des Phosphonat-Clusters von Tü4103 mit ARTS wurden drei putative Resistenzgene identifiziert. Die Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase vermittelt sehr spezifisch Eigenresistenz gegen Phaseolotoxin. Aufgrund dieser Spezifität hat das Genprodukt von *kph31* vermutlich keine Funktion in Bezug auf einen Resistenzmechanismus von Tü4103 gegen das Phosphonat-Antibiotikum, sondern ist nur Teil der Biosynthese. RadA und die Adenylyl-Sulfatkinase sind in Resistenzmechanismen gegen DNA-Schäden involviert. Das deutet darauf hin, dass auch das in Cluster Nr. 9 kodierte

Phosphonat-Antibiotikum DNA-Schäden verursacht und die Genprodukte von *kph5* sowie *kph24* und *kph28* an der Ausbildung der Eigenresistenz beteiligt sind.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der ARTS-Analyse des Phosphonat-Clusters.

<i>orf</i>	Duplikation	Lokalisation	Horizontaler Gentransfer	Bekannte Resistenzmechanismen	Genprodukt	Funktion
<i>kph5</i>	-	x	-	-	DNA Reparaturprotein RadA	DNA Metabolismus
<i>kph24</i> , <i>kph28</i>	x	x	-	-	Adenylyl-Sulfatkinase B	Zentraler Zwischenstoffwechsel
<i>kph31</i>	-	x	-	x	Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase	Purine, Pyrimidine, Nukleoside, und Nukleotide

Durch „x“ wird markiert, ob die *orfs* dupliziert sind, ob die Lokalisation im Cluster auf einen Resistenzmechanismus hindeutet, ob die Phylogenie der *orfs* Hinweise auf horizontalen Gentransfer liefert und ob die Genprodukte bekannte Resistenzen vermitteln. „-“ bedeutet, dass die aufgeführten Indikatoren für Resistenz nicht gefunden wurden. Zudem ist aufgeführt, für welches Genprodukt sie kodieren und in welche Zellfunktionen sie involviert sind.

4.2.6.2 Induktion des *B. subtilis* basierten Promotor-Reporter Assays durch den Agarüberstand von Tü4103

Um weitere Hinweise auf den möglichen Wirkort des Produkts von Tü4103 zu bekommen, wurde Tü4103 in einem *B. subtilis* basierten Promotor-Reporter-Assay getestet, der von Ira Handayani und Katharina Wex, AG Prof. Brötz-Oesterhelt (Tübingen), durchgeführt wurde (s. auch 4.1.2.6). Tü4103 wurde auf den Agarplatten der Produktionsmedien MM1, HM, R5, SGG und OM angezogen und ausgestochene Agarblöckchen auf Reporter-Assay-Platten gelegt. Hemmhöfe deuten auf Bioaktivität hin. Die Induktion der Reporter-Promotoren *yorB*, *ypuA*, *lial*, *pps* und *yheI* liefert Hinweise auf einen möglichen Wirkort der bioaktiven Substanz (s. 3.4.5.1).

Die Blöckchen von Tü4103 bildeten auf den Testplatten aller fünf Reporter-Stämmen Hemmhöfe, unabhängig vom Anzuchtmedium. Blaue Ringe entstanden ausschließlich um die Blöckchen auf den Platten, in denen *yorB*-Reporterzellen eingegossen waren (**Abbildung 45**). *yorB* reagiert auf Substanzen, welche in die DNA-Synthese eingreifen bzw. die Vorstufen für die DNA-Synthese hemmen und teilweise auf Substanzen, welche in die DNA interkalieren. Die Ringe entstanden um die Blöckchen der Medien R5, OM und SGG. Am intensivsten war die Färbung des Ringes um das R5-Agarblöckchen von Tü4103. Die Ursache liegt vermutlich in der vermehrten Bildung der Aktinomyeten-eigenen β -Galactosidase auf R5-Medium (Wex, pers. Mitt.). Aber die blauen Ringe um das OM- und SGG-Blöckchen deuten darauf

hin, dass das Produkt von Tü4103 den *yorB*-Promotor induziert. Der Versuch liefert also einen weiteren Hinweis darauf, dass Tü4103 eine Substanz produziert, die die DNA-Synthese beeinflusst.

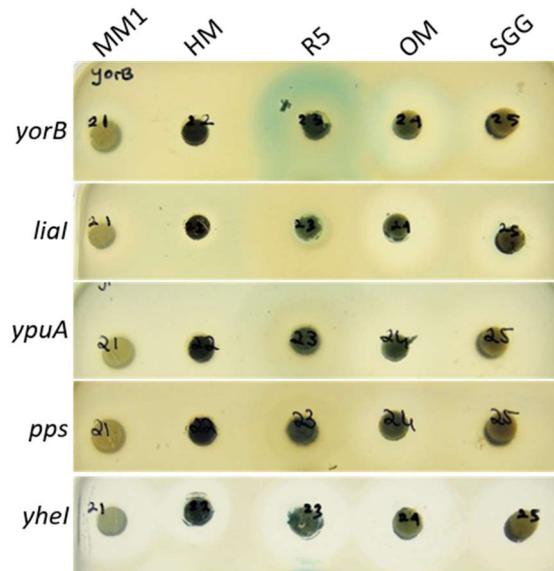


Abbildung 45: Blöckchentest von Tü4103 im *B. subtilis* basiertem Promotor-Reporter Assay. Angezogen wurde Tü4103 auf den Festmedien MM1, HM, R5, SGG bzw. OM.

Nach der Feststellung, dass ein Metabolit von Tü4103 *yorB* induziert, sollte die Korrelation zwischen der Aktivität gegen *E. coli* WM6242 und der Induktion von *yorB* festgestellt werden. Eine Korrelation wäre ein Hinweis darauf, dass das Phosphonat DNA-schädigend wirkt oder die DNA-Synthese inhibiert. Dazu wurden vier Agarüberstände, die Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigten, bzw. vier Agarüberstände, die keine Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigten, im Reporterassay (*yorB*) getestet. Als Negativ-Kontrolle diente der Medienüberstand von HM. HM wurde als Anzuchtmedium verwendet, weil es sich am besten als Produktionsmedium für das Phosphonat eignet (s. 4.2.1.1).

Die Negativ-Kontrolle verursachte keinen blauen Ring. Bis auf einen erzeugten alle Agarüberstände, die gegen *E. coli* WM6242 aktiv waren, einen blauen Ring. Von den Agarüberständen ohne Aktivität gegen *E. coli* WM6242 verursachte keiner einen blauen Ring. Die Aktivität gegen *E. coli* WM6242 korreliert demnach mit der Aktivierung von *yorB*, was nahelegt, dass das Phosphonat-Antibiotikum DNA-Schäden oder die Inhibition der DNA-Synthese verursacht.

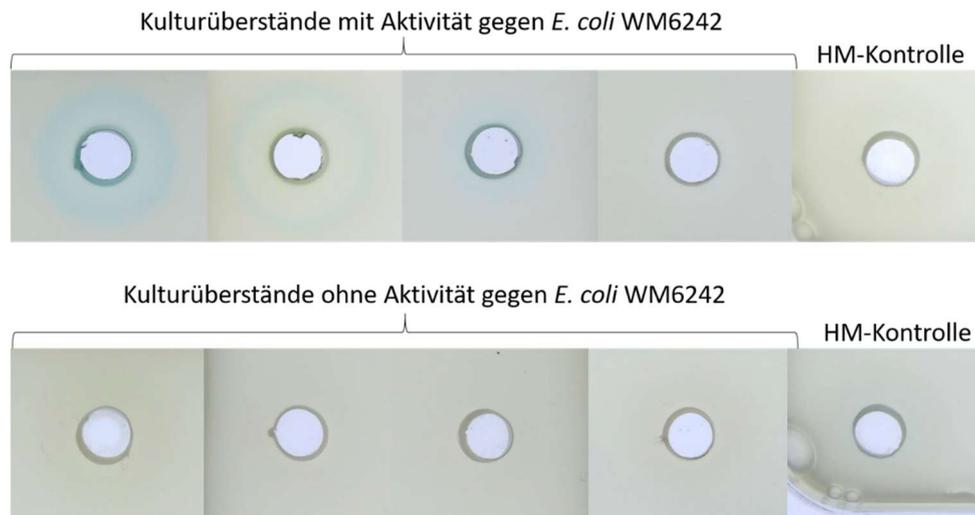


Abbildung 46: Agardiffusionstests auf *B. subtilis* basierendem *yorB* Promotor-Reporter Assay mit Agarüberständen von Tü4103.

4.2.6.3 Wirkung des Agarüberstands von Tü4103 auf einen *recA*-defizienten Stamm von *S. lividans*

Rekombinasen der RecA-Familie sind essenziell für die homologe Rekombination und erhalten die Integrität des Genoms, indem sie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen einleiten und kollabierte Replikationsgabeln wiederherstellen (209). Der RecA-defiziente Stamm *S. lividans* TK64 Δ *recA* (161) ist daher besonders sensitiv gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. Um die Wirkung des Produkts von Tü4103 auf *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK64 Δ *recA* zu vergleichen, wurden Agardiffusionstests mit dem Agarüberstand von Tü4103 gegen *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK64 Δ *recA* durchgeführt. Dazu wurden *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK64 Δ *recA* auf Festmedium ausgestrichen und für 10 s UV-C-Strahlung (280 bis 100 nm) ausgesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde *Streptomyces antibioticus* verwendet, der den DNA- und RNA-Syntheseinhibitor Actinomycin D (227) produziert, dessen Wirkung auf Interkalation in die DNA beruht (227). Da *S. lividans* TK64 Δ *recA* besonders sensitiv gegenüber DNA-schädigenden Substanzen ist, sollte *Streptomyces antibioticus* auf *S. lividans* TK64 keinen oder einen kleineren Hemmhof als auf *S. lividans* TK64 Δ *recA* verursachen. Als Negativ-Kontrolle diente *S. coelicolor* M145, der kein Antibiotikum produziert, das in die DNA-Synthese eingreift.

Um die Blöckchen von *S. coelicolor* bildeten sich keine Hemmhöfe. Das zeigt, dass die Deletion von *recA* in *S. lividans* TK64 Δ *recA* nicht zu einer generell erhöhten Sensitivität gegenüber Antibiotika führt. Keine der Proben zeigte Aktivität gegen *S. lividans* TK64. Dagegen verursachten das Blöckchen von *S. antibioticus* und der Agarüberstand von Tü4103 auf *S. lividans* TK64 Δ *recA* Hemmhöfe (**Abbildung 47**). *S. lividans* TK64 Δ *recA* ist also im Gegensatz zu *S. lividans* TK64 sensitiv gegenüber *S. antibioticus*, was wahrscheinlich auf die DNA-schädigende Wirkung von Actinomycin D zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass auch der Agarüberstand von Tü4103 Aktivität gegen *S. lividans* TK64 Δ *recA* zeigt, lässt vermuten, dass Tü4103 ebenfalls eine DNA-schädigende Substanz produziert.

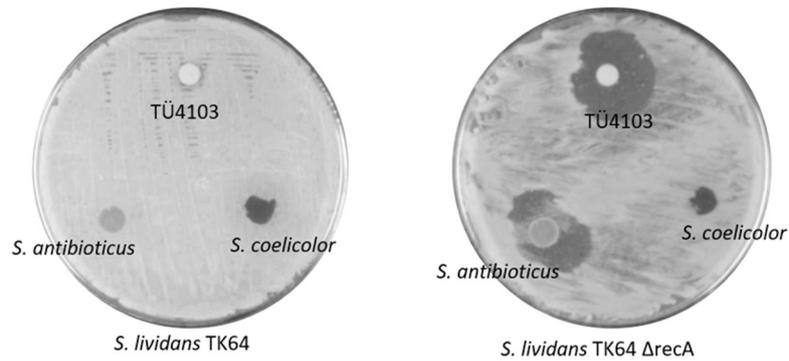


Abbildung 47: Hemmhoftests des Agarüberstands von Tü4103 gegen *S. lividans* TK64 und *S. lividans* TK64 Δ recA. Als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienten der Actinomycin D-Produzent *S. antibioticus* bzw. *S. coelicolor*, der kein in die DNA-Synthese eingreifendes Antibiotikum produziert.

Auch wenn der obige Test darauf hindeutet, dass Tü4103 eine DNA-schädigende Substanz produziert, lässt sich daraus nicht schließen, dass es sich bei dieser Substanz um das Phosphonat handelt. Daher wurde untersucht, ob die Aktivität des Agarüberstands von Tü4103 gegen *E. coli* WM6242 mit der Aktivität gegen *S. lividans* TK64 Δ recA korreliert. Dazu wurde der *recA*-Assay mit Agarüberständen von Tü4103 durchgeführt, die gegen *E. coli* WM6242 getestet worden waren (Daten nicht gezeigt). Es wurde jeweils ein Agarüberstand mit und einer ohne Aktivität gegen *E. coli* WM6242 eingesetzt. Als Kontrollen wurden Actinomycin D, bzw. der Medienüberstand von HM-Festmedium verwendet.

Der Agarüberstand, der Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigt, verursacht keinen Hemmhof auf *S. lividans* TK64-Testplatten. Auf *S. lividans* TK64 Δ recA-Testplatten bildet sich ein Hemmhof um diese Probe. Der Agarüberstand ohne Aktivität gegen *E. coli* WM6242 verursachte auf *S. lividans* TK64 Δ recA einen Hemmhof mit deutlich größerem Durchmesser. (**Abbildung 48**). Zudem verursacht diese Probe auch auf *S. lividans* TK64 eine leichte Wachstumsinhibition. Der Hemmhof ist allerdings diffus, ohne klar umrissene Ränder. Das deutet darauf hin, dass es nicht ausschließlich das Phosphonat-Antibiotikum ist, welches gegen *S. lividans* TK64 Δ recA aktiv ist. Möglicherweise bildet Tü4103 eine zweite bioaktive Substanz, die *S. lividans* TK64 Δ recA hemmt.

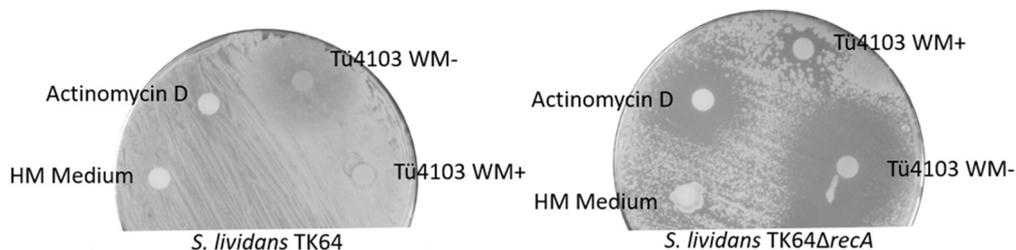


Abbildung 48: Hemmhoftests von Agarüberständen von Tü4103, die Aktivität oder keine Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigen, gegen *S. lividans* TK64 und den *recA* defizienten Stamm TK64 Δ recA. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten Actinomycin D und der Agarüberstand des Festmediums. WM+ bedeutet, dass der Agarüberstand gegen *E. coli* WM6242 Aktivität zeigte; WM- bedeutet, dass der Agarüberstand keine Aktivität gegen *E. coli* WM6242 zeigte.

Auch in Hemmhoftests gegen *B. subtilis* bildeten sich um die Agarüberstände von Tü4103 zwei qualitativ unterschiedliche Hemmhöfe. Einerseits bildete sich ein klar umrissener Hemmhof mit geringem

Durchmesser, andererseits ein diffuser mit deutlich größerem Durchmesser (**Abbildung 49**). Teilweise überlagerten sich die beiden Typen von Hemmhöfen sogar, sodass ein Ring um den Agarüberstand entstand. Die beiden andersartigen Hemmhöfe deuten ebenfalls auf die Produktion einer zweiten bioaktiven Substanz durch Tü4103 hin.

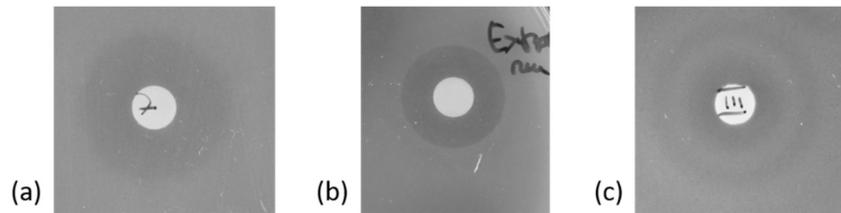


Abbildung 49: Hemmhöftests des Agarüberstands von Tü4103 auf *B. subtilis*. Es bilden sich drei verschiedene Hemmhöftypen: (a) groß und diffus; (b) klein und klar; (c) ringförmig.

4.2.6.4 Resistenzübertragung durch Überexpression von *kph5*

Um für Untersuchungen zum Resistenzverhalten gegenüber Tü4103 geeignete sensitive Teststämme zu identifizieren, wurden verschiedene Aktinomycetenstämme auf Sensitivität bzw. Resistenz gegen Tü4103 getestet. In diese Stämme sollte *kph5*, der für ein RadA-homologes Protein kodiert, eingebracht werden. RadA ist ein DNA-Reparaturprotein, das falsche Basenpaarungen durch homologe Rekombination zweier DNA-Einzelstränge korrigiert (209). Somit sollte getestet werden, ob durch die heterologe Expression von *kph5* Resistenz gegen das Produkt von Tü4103 vermittelt werden kann.

4.2.6.4.1 Test verschiedener Aktinomycetenstämme auf Sensitivität gegen Tü4103

Um generell sensitive Stämme gegen Produkte von Tü4103 zu identifizieren, wurde Tü4103 auf HM-Festmedium inkubiert und die Kultur in Blöckchentests eingesetzt. Die Agarblöckchen wurden auf frisch ausgestrichene Platten der Teststämme *Streptomyces albus*, *Streptomyces lividans*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus jostii*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces collinus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces tendae*, *Streptomyces ghanaensis*, *Streptomyces coelicolor* und *Amycolatopsis japonicum* aufgelegt und drei Tage inkubiert.

Um das Agarblöckchen von Tü4103 bildete sich ausschließlich auf den Testplatten von *A. japonicum* und *S. coelicolor* ein Hemmhof (**Abbildung 50**). Diese beiden Stämme wurden verwendet, um *kph5* zu überexprimieren.

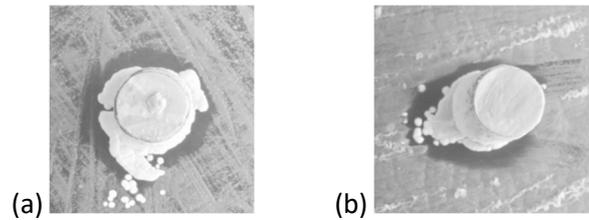


Abbildung 50: Hemmhofstests von Tü4103 gegen (a) *S. coelicolor* und (b) *A. japonicum*

4.2.6.4.2 Heterologe Expression von *kph5* in *A. japonicum* und *S. coelicolor*

Um zu testen, ob die Überexpression von *kph5* *A. japonicum* und *S. coelicolor* gegen das Produkt von Tü4103 resistent macht, wurde *kph5* in *A. japonicum* und *S. coelicolor* überexprimiert.

Mit genomischer DNA von Tü4103 als Templat wurde das Fragment *radA* (1534 bp) in einer PCR amplifiziert. Am 3'-Ende des Vorwärts-Primers (*radAfw*) wurde eine *NdeI*-Schnittstelle und am 5'-Ende des Rückwärts-Primers (*radArv*) eine *HindIII*-Schnittstelle künstlich eingefügt. *radA* wurde in den Kloniervektor pDrive inseriert. Das entstandene Plasmid pDrive/*radA* (5385 bp) wurde in *E. coli* Novablue eingebracht und die Transformanten durch die Blau-Weiß-Methode selektioniert. Das Plasmid pDrive/*radA* wurde mit *NdeI* und *HindIII* geschnitten und *radA* isoliert. *radA* wurde mit dem *NdeI*/*HindIII* linearisierten Vektor pRM4 ligiert. Aus der Ligation resultierte das Konstrukt pRM4/*radA* (7582 bp, **Abbildung 51**). pRM4/*radA* wurde durch Protoplastentransformation in *A. japonicum* und *S. coelicolor* eingebracht, woraus die Stämme *A. japonicum*/*radAex* und *S. coelicolor*/*radAex* resultierten.

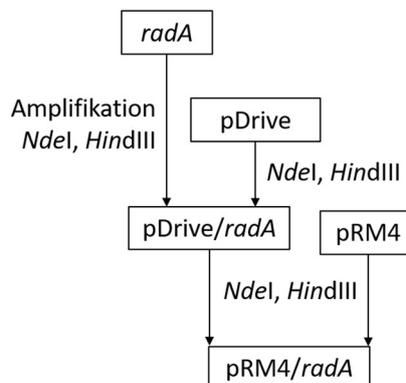


Abbildung 51: Schematische Darstellung der Konstruktion des für die Überexpression verwendeten Plasmids pRM4/*radA*.

Agarblöckchen einer Kultur von Tü4103 wurden auf Agartestplatten mit den Stämmen *A. japonicum*, *S. coelicolor*, *A. japonicum*/*radAex* und *S. coelicolor*/*radAex* aufgelegt und drei Tage inkubiert.

Auf allen vier Testplatten verursachte das Agarblöckchen von Tü4103 einen Hemmhof (**Abbildung 52**). Das zeigt, dass weder *A. japonicum*/*radAex* noch *S. coelicolor*/*radAex* durch die Überexpression von *kph5* Resistenz gegen ein Produkt von Tü4103 ausbilden konnte. Das kann daran liegen, dass nicht das Phosphonat die Aktivität von Tü4103 gegen *A. japonicum* und *S. coelicolor* verursacht, sondern ein

potenzielles zweites Antibiotikum (s. 4.2.6.3). Möglich ist auch, dass das Genprodukt von *kph5* nicht bzw. nicht allein für die Resistenz gegen Tü4103 verantwortlich ist. Im Phosphonat-Cluster gibt es noch sechs weitere *orfs*, deren Genprodukte an der Ausbildung von Resistenz beteiligt sein können (s. 4.2.3.2.4). In weiteren Experimenten sollten Expressionsstämme für alle putativen Resistenzgene hergestellt und auf Sensitivität gegen Tü4103 getestet werden. Um zu testen, ob speziell das Phosphonat die hemmende Wirkung auf *A. japonicum* und *S. coelicolor* hat, muss es isoliert werden und als Reinsubstanz in den Tests eingesetzt werden.

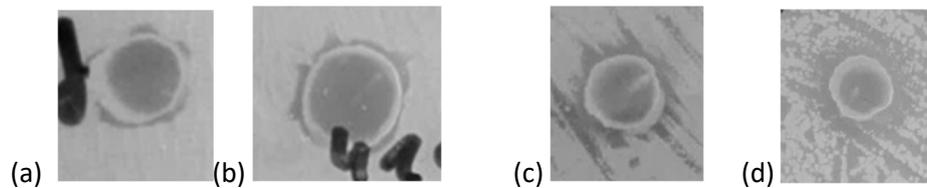


Abbildung 52: Hemmhoftests von Tü4103 gegen (a) *A. japonicum*, (b) *A. japonicum* pRM4/radex, (c) *S. coelicolor* und (d) *S. coelicolor* pRM4/radex.

4.3 Aktivierung von Antibiotika-Genclustern durch Überexpression des SARP PapR2

4.3.1 Überexpression von PapR2 in den sequenzierten Stämmen der Tübinger Stammsammlung

Aktinomyceten enthalten durchschnittlich 25-50 BGCs, die für potenzielle Sekundärmetabolite kodieren (17). Jedoch werden nur ca. 10% tatsächlich exprimiert (71). Es wurden bereits verschiedene Methoden zur Aktivierung stiller Gencluster beschrieben (s. 1.2.1). SARPs sind generelle, Cluster-situierte Aktivatoren (86). Für das stille Undecylprodigiosin-Cluster in *S. lividans* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des SARP-Aktivators PapR2 aus *S. pristinaespiralis* die Produktion von Undecylprodigiosin aktiviert (s. 4.3.2). Es ist anzunehmen, dass auch die in dieser Arbeit untersuchten Aktinomyceten für Antibiotika kodieren, die unter Standard-Bedingungen kaum oder nicht produziert werden. Um das volle Potential der Stämme Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 auszuschöpfen, sollte geprüft werden, ob die Voraussetzungen zur Induktion der Transkription durch SARPs gegeben waren. Daher wurde im Genom der vier zuerst sequenzierten indonesischen Stämme der Tübinger Stammsammlung durch eine Analyse mit dem Webtool PatScan (228) nach SARP-Bindestellen gesucht sowie der AntiSMASH-Output auf SARP-Gene hin untersucht.

In allen vier Stämmen konnten Cluster gefunden werden, die jeweils ein SARP-Gen enthalten. Cluster Nr. 1 von Tü4100 enthält sogar zwei SARP-Gene. Zusätzlich wurden in Cluster Nr. 1 von Tü4100 fünf SARP-Bindemotive und in den Clustern Nr. 5 bzw. 8 von Tü4103 ein bzw. drei SARP-Bindemotive detektiert.

Tabelle 16: Identifizierung von SARP-Genen und –Bindestellen in Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106.

Stamm	Anzahl Gencluster	SARP-Motiv enthaltende Gencluster: Anzahl (Typ)	Anzahl SARP-Gene	Anzahl SARP-Bindestellen
Tü4097	24	1 (T1PKS)	1	0
		2 (Lanthipeptid-NRPS-T1PKS)	1	0
		13 (Thiopeptid)	1	0
		19 (andere KS)	1	0
		23 (NRPS)	1	0
		24 (Terpen)	1	0
Tü4100	26	1 (andere KS-T2PKS-T1PKS)	2	5
Tü4103	26	5 (T1PKS-NRPS)	1	1
		8 (NRPS)	1	3
		10 (Indol)	1	0
		11 (Lanthipeptid-Ladderan)	1	0
		12 (Terpen)	1	0
		18 (andere KS-Butyrolacton)	1	0
		20 (Lanthipeptid)	1	0
Tü4106	18	3 (NRPS)	1	0
		18 (andere KS-T2PKS)	1	0

Da in allen vier Stämmen SARP-Gene zu finden waren, SARPs als Regulatoren in diesen Stämmen also vermutlich eine Rolle spielen, sollten PapR2-Überexpressionsstämme generiert werden. Durch Protoplasten-Transformation mit pRM4/papR2 wurden PapR2-Überexpressionsstämme von Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 generiert (Herstellung des Konstrukts s. 0). Daraus resultierten die Stämme Tü4097papR2-OE, Tü4100papR2-OE, Tü4103papR2-OE und Tü4106papR2-OE. Als Kontrollen dienten die mit pRM4 transformierten WT-Stämme Tü4097pRM4, Tü4100pRM4, Tü4103pRM4 und Tü4106pRM4. Die Bioaktivität wurde durch Agardiffusionstests gegen *B. subtilis* getestet, indem die Stämme auf R5-Agar inkubiert und Agarblöckchen auf *B. subtilis*-Testplatten aufgelegt wurden. Nach Inkubation bei 37°C ü/N wurden die Hemmhof-Durchmesser ausgemessen und verglichen. Außerdem wurden je 100 mL R5-Flüssigmedium mit Agarblöckchen der vier Stämme inokuliert und die Kulturen für fünf Tage bei 27°C auf dem Schüttler inkubiert. Je 5 mL der Kulturen wurden mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. In den Extrakten der mit pRM4/papR2 transformierten Stämme sollte durch HPLC-Analyse nach im Vergleich zum WT neu produzierten Stoffen gesucht werden.

Im Vergleich zu den Kontroll-Stämmen zeigte keiner der Überexpressionsstämme eine erhöhte Bioaktivität gegen *B. subtilis*. Auch durch die HPLC-Analyse der Ethylacetat-Extrakte waren keine neuen Stoffe zu detektieren. Somit konnte mit diesen Methoden für keines der Cluster eine Aktivierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das könnte, statt auf die fehlende Aktivierung der Expression der Cluster, auch auf fehlende Aktivität des produzierten Stoffes gegen *B. subtilis* zurückzuführen sein oder das entstandene Produkt ist durch die verwendete HPLC-Methode nicht detektierbar.

Die gleiche Methode zur Aktivierung stiller Gencluster sollte an weiteren Stämmen getestet werden. Daher wurden Stämme der zweiten Generation Genom-sequenzierter, neu aus indonesischen Böden isolierter Aktinomyceten einer AntiSMASH- und PatScan-Analyse unterzogen und PapR2-Überexpressionsstämme generiert. In Stamm SHP22-7 konnte die Produktion von Plicacetin signifikant erhöht werden (s. 4.3.2).

4.3.2 Manuskript: “SARP-driven activation of antibiotic gene clusters“

Das vollständige, unveröffentlichte Manuskript findet sich unter 7.9.

4.3.2.1 Eigenanteil

Die Stämme *SLpGM190* und *SLpapR2-OE* wurden von Y. Mast hergestellt. Die Bandshift Assays führte V. Kübler durch. Alle qualitativen und quantitativen Transkriptionsanalysen wurden von mir durchgeführt. Die bioinformatischen Analysen wurden von Y. Mast durchgeführt. Der pRM4/*papR2*-Vektor wurde von mir hergestellt, während I. Handayani den Vektor in SHP22-7 einbrachte. Die Bioaktivität von SHP22-7 wurde von I. Handayani getestet. Die HPLC-Analysen wurden von A. Kulik, H. Saad und I. Handayani durchgeführt. Das Manuskript wurde von mir, Y. Mast und I. Handayani verfasst.

4.3.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Cluster zur Synthese des roten Pigments Red (Undecylprodigiosin) in *Streptomyces lividans* T7, das unter Kontrolle des Aktivators RedD steht, ist unter Standardlaborbedingungen still. Es wurde jedoch beobachtet, dass ein PapR2-Überexpressionsstamm von *S. lividans* (*SLpapR2-OE*) ein rotes Pigment bildet. Die Absorption der Agarüberstände an den beiden Maxima 533 nm im Sauren und 468 nm im Basischen bestätigten, dass es sich bei dem Pigment um Undecylprodigiosin handelt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit Hilfe der Datenbank BlastP zeigte, dass RedD und PapR2 zu 44% identisch und zu 55% ähnlich sind. Die bioinformatische Analyse des Undecylprodigiosin-Clusters mit dem Tool PatScan lieferte zwei konservierte SARP-Bindemotive in den Promotorregionen der Undecylprodigiosin-Biosynthesegene *redP* und *redQ*. Bandshift Experimente mit den Promotorregionen und aufgereinigtem His-PapR2 bestätigten, dass PapR2 an diese Promotorregionen bindet. Daher wurde vermutet, dass PapR2 die Funktion von RedD übernimmt und die Expression des Undecylprodigiosin-Clusters induziert. Eine Transkriptionsanalyse zeigte, dass *redP* und *redQ* in *SLpapR2-OE* vermehrt transkribiert werden. Zur Transkriptionsanalyse wurde RNA aus dem Kontrollstamm und dem Überexpressionsstamm isoliert und daraus cDNA generiert. Semiquantitative Transkriptionsanalysen zeigten, dass *redP* und *redQ* ausschließlich in *SLpapR2-OE* transkribiert wurden. Zur Quantifizierung dieses Ergebnisses wurde eine *real-time* qPCR durchgeführt. Als Referenzgen für die Berechnung des relativen Expressionslevels mit

der $\Delta\Delta$ -Methode (229) diene *hrdB*. So konnte ermittelt werden, dass in *SlpapR2-OE redP* im Durchschnitt um das Siebenfache und *redQ* um das 20-fache stärker transkribiert wird als im Kontrollstamm.

Die Stämme der Tübinger Stammsammlung konnten durch Überexpression von *papR2* nicht zur vermehrten Antibiotika-Produktion angeregt werden (s. 4.3.1). Daher wurde der Stamm SHP22-7, der zu Beginn dieser Arbeit aus einer indonesischen Bodenprobe isoliert worden war, mit pRM4 und pRM4/*papR2* transformiert. Aus der Transformation resultierten die Stämme SHP22-7pRM4 und SHP22-7*papR2-OE*. Die Bioaktivität gegen *B. subtilis* war in SHP22-7*papR2-OE* erheblich erhöht, wie Blöckchentests zeigten. Daraufhin wurde in den von AntiSMASH vorgeschlagenen Biosyntheseclustern mit PatScan nach SARP-Bindemotiven gesucht und in Cluster Nr. 3, 5, 9, 10 und 15 der insgesamt 25 Cluster gefunden. Eine semiquantitative Transkriptionsanalyse zeigte, dass Cluster Nr. 9 in SHP22-7*papR2-OE* vermehrt transkribiert wurde. Dieses Cluster kodiert für die Antibiotika Plicacetin bzw. Amicetin, das sich von Plicacetin durch eine zusätzliche Methylserin-Gruppe unterscheidet. In der Promotorregion des ersten Gens (*amiA*) des unidirektionalen Clusters findet sich die SARP-Bindestelle, die 65,5% Ähnlichkeit zum vorgeschlagenen SARP-Konsensusmotiv aufweist. Per HPLC- und MS/MS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von Plicacetin sowie eines Plicacetin-Isomers im PapR2-Überexpressionstamm erhöht ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des SARP-Aktivators PapR2 die Antibiotikaproduktion in Streptomycceten induzieren bzw. erhöhen kann. Die Überexpression von PapR2 bietet die Möglichkeit, nur durch Kenntnis der Genomsequenz ein Cluster spezifisch zu aktivieren. Diese Methode wird dazu beitragen, das Potential, das stille Aktinomyceten-Gencluster darstellen, zu nutzen.

5 Diskussion

5.1 Selektion neuer Antibiotika-produzierender Aktinomyceten

5.1.1 Indonesien als Quelle neuer bakterieller Antibiotika-Produzenten

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung neuer Aktinomyceten und die Selektion von Antibiotika-Produzenten durch ein Bioaktivitäts-geleitetes Screening. 56 Aktinomycetenstämme wurden neu aus indonesischen Bodenproben isoliert. Indonesien wurde für diese Studie zur Beprobung ausgewählt, da dieses Land sich schon in früheren Studien als artenreich und gute Quelle für neue Aktinomyceten erwiesen hat (48, 55–61). Allerdings ist die Aussage, dass Indonesien insgesamt reich an bakteriellen Spezies ist, eine Hypothese, die auf der Annahme basiert, dass eine Korrelation der mikrobiellen Diversität mit der Makrobiodiversität besteht. Doch im Gegensatz zur globalen Diversität und Verteilung von Pilzen (230–234) sowie der Makrobiodiversität (235) gibt es bislang kaum Studien zur Verteilung der Biodiversität von Bakterien.

2019 verglichen Cameron *et al.* (236) Daten zur Gesamtzahl aller Spezies in und über der Erde. Die Gruppe kam zu dem Schluss, dass in den Tropen und Subtropen eine große Diversität über der Erde mit jener in der Erde korreliert. Teile Indonesiens, darunter Java, wurden als Biodiversitäts-*Hotspots* in beiden Habitaten identifiziert. Allerdings bezieht sich die Biodiversität unter der Erde in dieser Studie nicht ausschließlich auf Bakterien, sondern auch auf Pilze und makroskopische Organismen.

In einer Studie von 2018 kommen Bahram *et al.* (237) zu dem Schluss, dass speziell die bakterielle Diversität in gemäßigten, nicht in tropischen Habitaten am höchsten ist. Zudem hängt die genetische Variabilität von Bakterien stärker davon ab, wie sehr sich deren Habitate unterscheiden, und weniger, wie weit sie geografisch auseinander liegen (238). Insbesondere Schwankungen im pH beeinflussen die Diversität in den bakteriellen Gemeinschaften. Daraus ergibt sich keine Notwendigkeit, exotische Habitate wie die indonesischen Tropen zu beproben. Stattdessen ist es genau so vielversprechend, wenn Böden in gemäßigten Breiten aber mit unterschiedlichen Umweltbedingungen beprobt werden. Die aufgeführten Studien beziehen sich allerdings nur auf die Diversität der bakteriellen Spezies, nicht auf die Diversität der kodierten Sekundärmetabolite.

Charlop-Powers *et al.* untersuchten 2015 (239) die Diversität von Adenylierungs- und Ketosynthesedomänen basierend auf „*environmental DNA*“ (eDNA) Proben aus weltweit beprobten Böden unterschiedlicher Habitats. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die geografische Distanz mit der genetischen Varianz der Domänen korreliert und demnach Domänensequenzen aus benachbarten Böden eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen. In einer Studie von 2018 verglichen Lemetre *et al.* (240) die Ähnlichkeit der Sequenzen von Adenylierungs- und Ketosynthese-Domänen aus eDNA, die

aus Bodenproben vom australischen Kontinent isoliert wurden (240). Die Gruppe kam zu dem Schluss, dass die Varianz der Domänen mit dem Breitengrad zunimmt. Umwelteinflüsse spielen dabei eine untergeordnete Rolle. Auch Choudoir *et al.* kamen 2018 (241) zu dem Schluss, dass der Breitengrad der wichtigste Faktor bei der Diversifikation von Sekundärmetaboliten ist. In dieser Studie wurden speziell die BGCs von *Streptomyces griseus* aus Bodenproben aus Nordamerika untersucht (241).

Die große Anzahl der in der vorliegenden Arbeit isolierten Aktinomyceten unterstützt die Theorie, dass Indonesien als tropisches Habitat große mikrobielle Diversität aufweist. Acht indonesische Stämme wurden anhand ihres Gesamtgenoms in einen genetischen Stammbaum eingeordnet. Dabei ergab sich eine nahe Verwandtschaft zwischen den Stämmen Tü4106, I3, I4 und I5. Auch die mit AntiSMASH detektierten BGCs dieser Stämme zeigen Überschneidungen. 16 der 17 bzw. 19 BGCs von I3 bzw. I4 sind nahezu identisch. Die Ähnlichkeiten zwischen I3, I4 und I5 sind vermutlich auf die geringe Distanz der Probennahmestellen zurückzuführen, die alle aus Bodenproben von der Insel Lombok isoliert worden waren. Tü4097, Tü4100 und Tü4103 dagegen stammen aus Java und liegen auch taxonomisch weiter auseinander. Das Ergebnis unterstützt die Theorie, dass die Biodiversität mit der geografischen Distanz korreliert.

Um neue Aktinomyceten-Stämme mit unbekannter Naturstoffchemie zu finden, werden bisher wenig untersuchte oder extreme Habitate, wie Wüsten, Höhlen oder verschiedene marine Habitate beprobt (26–28). Insbesondere Mangrovenwälder rücken zunehmend in den Fokus bei der Suche nach neuen bakteriellen Spezies (47, 48, 242) Sie bilden wegen des ab- und zunehmenden Wasserspiegels sowie der daraus resultierenden schwankenden Salzkonzentrationen ein extremes Habitat an der Interphase zwischen Land und Wasser (49). In einer Studie aus dem Jahr 2014 wurden 73 neu entdeckte Substanzen gezählt, die von aus Mangroven isolierten Aktinomyceten produziert werden (243). In der vorliegenden Arbeit stammen 15 der 56 neuen Isolate aus Proben, die von Mangrovensediment genommen wurden. Von den neuen aufgrund der Bioaktivität für weitere Studien ausgewählten Isolaten, stammten I3, I4, I5, I6, und I7 aus Mangrovensediment. Das Ergebnis zeigt, dass Mangroven in der Tat ein artenreiches Habitat darstellen. Allerdings konnten aus diesen Stämmen bislang keine neuen Sekundärmetaboliten isoliert werden, sodass über die Einträglichkeit der Mangroven-Stämme in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden kann.

5.1.2 Gesamtgenomsequenzierung mit der PacBio-Methode

Die Sequenzierung der genomischen DNA der selektierten Stämme wurde mit der PacBio RS(II)-Plattform durchgeführt. Diese neue Technologie (erste Publikation 2009 (244)) hat gegenüber *next generation sequencing*-Verfahren, wie der Illumina (245) Sequenzierung, folgende Vorteile: (i) Es können längere *contigs* am Stück generiert werden. Durch die längeren *contigs* ist die Methode besonders für *de novo* Sequenzierungen geeignet, da hochreplikative Sequenzen am Stück abgelesen werden können

(246). (ii) Durch lange *reads* lassen sich Sequenzierungen in kürzerer Zeit durchführen, da so die Anzahl der Pausen zwischen den *reads* reduziert werden kann (246). (iii) Es wurde gezeigt, dass Regionen mit hohem GC-Gehalt mit der PacBio-Methode durchsequenziert werden können, während andere Sequenzier-Methoden an diesen Stellen oft abbrechen (247). Das ist besonders bei der Sequenzierung von Aktinomycceten-Genomen vorteilhaft, die einen hohen GC-Gehalt von ca. 70% aufweisen (32). Nachteilig an der PacBio-Methode sind der geringere Durchsatz an Basen, die höheren Kosten pro Basenpaar und die höhere Fehlerrate für einzelne Basen. Für eine Identifizierung der BGCs im Genom ist die PacBio-Sequenzierung geeignet, da das Genom komplett, inklusive repetitiver Sequenzen und Regionen mit hohem GC-Gehalt, zuverlässig sequenziert wird. Die höhere Fehlerrate kann durch spätere Illumina-Sequenzierung kleiner Abschnitte der DNA ausgeglichen werden, wenn für Klonierungen oder ähnlichem an konkreten Abschnitten im Genom gearbeitet wird.

Die PacBio-Methode war in diesem Fall die am besten geeignete Technik zur Sequenzierung der Genome der ausgewählten Aktinomycceten. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurde ein hohes *coverage* erreicht, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit das Genom vollständig erfasst worden ist. Zudem resultierten aus der Sequenzierung der Genome nur zwei bis sieben *contigs*, sodass auch hochreplikative Sequenzen wahrscheinlich korrekt sequenziert worden sind. Die Sequenzierung resultierte also in qualitativ hochwertigen Sequenzen.

Nachdem das Gesamtgenom ausgewählter Stämme sequenziert worden war, sollte anhand einer Analyse mit AntiSMASH eine weitere Priorisierung der zu untersuchenden Stämme erfolgen. Dabei war die Existenz von bekannten Antibiotika-Genclustern ein Ausschlusskriterium. Der Fokus wurde auf seltene Klassen von BGCs gelegt.

Durchschnittlich kodieren Aktinomycceten 35 BGCs (248). Die in dieser Arbeit untersuchten Aktinomycceten enthielten zwischen 17 (I3) und 26 (Tü4100) BGCs. Im Vergleich zu mit dem Illumina-Verfahren sequenzierten Genomen, führt die AntiSMASH-Analyse in PacBio-Sequenzen generell zu weniger detektierten BGCs (Mast, pers. Mitt.). Daher ist die für Aktinomycceten unterdurchschnittliche Anzahl an vorhergesagten BGCs auf das Sequenzierverfahren zurückzuführen.

5.2 Phosphonatproduktion durch Tü4103 und I6

Im Zuge der Analyse mit AntiSMASH wurde im Genom von Tü4103 ein Phosphonat-Cluster und im Genom von I6 ein Phosphonat-NRPS-Hybridcluster gefunden. Die Phosphonat-Cluster von Tü4103 und I6 enthalten, einer BlastP-Analyse zufolge, putative Gene (*pepM* und *pnpD*), die für die beiden essenziellen Enzyme zur Phosphonatsynthese, die Phosphoenolpyruvat-Mutase und die Phosphonopyruvat-Decarboxylase kodieren. Anhand der Anwesenheit von *pepM* und *pnpD* lassen sich Phosphonat-Cluster einfach identifizieren (113). In einer Studie von Ju *et al.* (111) konnte *pepM*, durch eine Genomanalyse mittels PCR mit degenerierten Primern, in ca. 5% von 10.000 Aktinomycceten

nachgewiesen werden (111). Daraus folgt, dass es vermutlich weit mehr Phosphonat-Produzenten und Phosphonate als die ~30 bisher bekannten gibt (111). Drei dieser ~30 entdeckten Phosphonate (10%) wurden bisher vermarktet (113). Im Gegensatz dazu kommen insgesamt nur etwa 0,1% aller natürlich produzierten Antibiotika oder deren semisynthetische Derivate auf den Markt (2). Das deutet auf das große pharmazeutische Potential der Phosphonate hin. Aufgrund dessen wurde die Phosphonatproduktion von Tü4103 und I6 genauer untersucht.

5.2.1 Nachweis der Phosphonatproduktion von I6

Durch GNPS-Clustering wurde bereits festgestellt, dass im Agarüberstand aber nicht im Ethylacetat-Extrakt von I6 eine bislang unbekannte Substanz vorhanden ist (Saad, pers. Mitt.). Die Plattform GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*) ermöglicht die Speicherung, Analyse und das Teilen von MS-MS-Daten. Durch GNPS-Clustering können die eigenen MS-MS-Daten mit einer allgemeinen Datenbank abgeglichen werden, in die die User ihre Daten einspeisen. Dadurch wird der Dereplikationsprozess erleichtert und die Wiederentdeckungsrate verringert (21).

I6 produziert also eine vermutlich unbekannte Substanz. Außerdem deutet die Anwesenheit von *pepM* darauf hin, dass I6 ein Phosphonat produzieren kann. Möglicherweise produziert I6 ein unbekanntes Phosphonat. I6 zeigt eine generelle Aktivität gegen Gram-negative Organismen, daher kann die Bioaktivität gegen den Phosphonat-sensitive Stamm *E. coli* WM6242 nicht als Nachweis für eine Phosphonatproduktion verwendet werden. Stattdessen könnte die LC-MS/MS basierte Methode von Evans *et al.* (121) Anwendung finden, durch die Phosacetmycin entdeckt wurde. Diese Methode beruht darauf, dass die Phosphonatgruppe im MS-Spektrum ein spezifisches Fragmentierungsmuster verursacht ($m/z = 79$ und 63), das auf die Eliminierung von PO^{3-} bzw. PO^{2-} zurückzuführen ist. Voraussetzung für diese Methode ist, dass das Phosphonat für die Detektion angereichert wird. Ziel der Anreicherung ist, das Hintergrundrauschen durch phosphorylierte Metabolite, die ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster wie Phosphonate verursachen, zu reduzieren (121). Sobald ein Protokoll zur Phosphonat-Anreicherung für I6 optimiert worden ist, kann die LC-MS/MS basierte Methode alternativ zum Bioassay mit *E. coli* WM6242 als Nachweismethode für Phosphonate eingesetzt werden.

5.2.2 Phosphonatproduktion von Tü4103

Im Gegensatz zu I6 konnte die Phosphonatproduktion von Tü4103 durch den Bioassay mit *E. coli* WM6242 nachgewiesen werden. Der Agarüberstand von Tü4103 zeigt Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 aber nicht gegen *E. coli* K12. Tü4103 wurde taxonomisch als *Kitasatospora* und damit als seltener Aktinomycet eingeordnet. Bis heute wurden nur 23 Spezies der Gattung *Kitasatospora* beschrieben, aber es wurden bereits über 50 verschiedene bioaktive Stoffe aus Vertretern der Gattung

isoliert (39), etwa Setamycin (nematizid, fungizid) aus *K. setae* bzw. *K. griseola* (45) oder Talosin A und B (fungizid) aus *Kitasatospora kifunensis* (249). *K. phosalacinea*, aus dem das herbizid wirkende Peptid-Phosphonat Phosalacin isoliert wurde, ist ein weiterer Phosphonat-Produzent der Gattung der *Kitasatosporae* (46). Das Cluster von Phosalacin ist allerdings noch nicht beschrieben.

Aufgrund der Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 und der taxonomischen Einordnung von Tü4103 als seltener Aktinomycet wurde die Phosphonatproduktion dieses Stammes intensiver untersucht.

5.2.2.1 Variationen der Mutagenese-Methode

Die Transkription von *kph18*, das für eine putative PepM kodiert, durch Tü4103 konnte mittels Transkriptionsanalyse nachgewiesen werden. Allerdings wurde keine Korrelation der Transkription von *kph18* mit der Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 beobachtet. Zum Nachweis, dass das Phosphonat-Cluster tatsächlich für die Bioaktivität gegen *E. coli* WM6242 verantwortlich ist, sowie für Wirkort-spezifische Assays sollte eine Insertions- oder Deletionsmutante von Tü4103 hergestellt werden, bei der *kph18* inaktiviert wurde. Ein Insertions- und eine Deletionskonstrukt konnte erfolgreich generiert werden. Doch obwohl die Protoplastentransformation von Tü4103 grundsätzlich möglich ist, wie anhand der Einführung des Plasmids pGM190 nachgewiesen wurde, konnte Tü4103 bislang mit keinem der rekombinanten Plasmide transformiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Transformationsprotokolle zur Protoplastentransformation, Konjugation und Elektroporation sind ursprünglich für Streptomycceten und nicht für *Kitasatosporae* entwickelt worden. Doch auch in früheren Studien wurden Vertreter der Gattung *Kitasatospora* schon erfolgreich mit für Streptomycceten etablierten Methoden transformiert (250–252). Daher wird in zukünftigen Studien der Fokus auf der Etablierung eines zuverlässigen Protokolls zur genetischen Manipulation von Tü4103 liegen. So kann zur Konjugation die Temperatur des Hitzeschocks für die Sporenkeimung variiert werden. Für Streptomycceten liegt die Keimtemperatur zwischen 45°C und 55°C (253). Zudem kann die Zugabe von MgCl₂ die Konjugationseffizienz erhöhen (254). Zur Protoplastentransformation können außer PEG1000 und PEG2000 noch länger-kettige PEGs verwendet werden. Zur Elektroporation kann die Feldstärke variiert werden: in dieser Arbeit wurde mit einer Feldstärke von 17,5 kV/cm gearbeitet; für Bakterien können Feldstärken von 5 bis 20 kV/cm verwendet werden (255). Für Wachstum und Regenerierung der transformierten Zellen kann das Medium optimiert werden (253).

5.2.2.2 Methoden zur Phosphonat-Aufreinigung

Neben einem Transformationsprotokoll für Tü4103 sollte in dieser Arbeit auch ein Protokoll zur Anreinigung des Phosphonats für spätere Isolierungen entwickelt werden. Bei Phosphonaten handelt es sich um extrem hydrophile Substanzen, die kaum in organische Lösungsmittel zu überführen sind. Das

von Tü4103 produzierte Phosphonat-Antibiotikum lässt sich zumindest zum Teil in Methanol lösen. Auch andere Phosphonate lassen sich in Methanol überführen. Die Extraktion von Cyanohydrin und FR900098 erfolgt mit einer 90%igen Methanol-Lösung (159, 256). K-26 kann in eine 50%ige Methanol-Lösung überführt werden (127). Trialaphos dagegen wird zur Isolierung aus dem Kulturmedium nicht mit organischen Lösungsmitteln extrahiert, sondern Medienbestandteile werden durch Aktivkohle aus dem Medium entfernt und der verbleibende wässrige Überstand über einen stark basischen Anionen-Austauscher entmineralisiert, sodass eine anschließende Aufreinigung durch präparative *reversed phase* HPLC möglich ist (138). Zur Isolierung von Fosfomycin wird zuerst die Bakterienkultur mit Phosphorsäure neutralisiert. Fosfomycin wird über eine Anionen-Austausch-Säule vorgereinigt und anschließend durch Gelfiltration isoliert (257). PTT wird zunächst durch einen stark sauren Kationen-Austauscher angereinigt und dann durch einen stark basischen Anionen-Austauscher adsorbiert sowie mit Salzsäure eluiert. Das Eluat wird durch präparative Gaschromatographie aufgetrennt, sodass PTT isoliert werden kann (258). Um Phosacetamycin aus dem Kulturmedium zu gewinnen, werden zunächst Phosphate aus der Kultur ausgefällt und Phosacetamycin durch *iron-immobilized metal affinity chromatography* angereinigt, bevor die Aufreinigung mit *hydrophilic interaction chromatography* (HILIC) durchgeführt wird (121). HILIC gehört zu den wenigen etablierten Methoden zur chromatografischen Aufreinigung hydrophiler Substanzen (259). Daher werden derzeit verschiedene HILIC-Säulen zur Entwicklung eines Aufreinigungsprotokolls für das von Tü4103 produzierte Phosphonat-Antibiotikum getestet. Mit einer HILIC-Säule ist es bereits gelungen, den Agarüberstand von Tü4103 zu fraktionieren und das Phosphonat in einer Fraktion durch ^{31}P -NMR nachzuweisen (Aziz, pers. Mitt.).

2014 entwickelten Gao *et al.* (260) eine Methode zur gezielten Aufreinigung von Phosphonaten, die "*stable isotope labeling of phosphonates in extract*" (SILPE) genannt wurde. Mit der Phosphonat-O-Methyltransferase Dhpl, aus dem Dehydrophos-Biosyntheseweg von *Streptomyces luridus*, können unspezifisch auch andere Phosphonate methyliert werden. Dazu wird der Phosphonat-haltige Kulturüberstand mit S-Adenosyl-Methionin (SAM) und SAM- CD_3 als Methylquelle versetzt und mit Dhpl behandelt, um eine CH_3 - bzw. CD_3 -Gruppe von SAM auf das Phosphonat zu übertragen. Auf diese Weise entsteht ein ^2D -gelabeltes Phosphonat mit einer Massendifferenz von 3 Da zum mit ^1H methyliertem Phosphonat. In einer LC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes verursachen die beiden Derivate zwei durch 3 Da getrennte Signale, sodass das Phosphonat leicht detektiert werden kann. Das ^2D -gelabelte kann vom ^1H -gelabelten Phosphonat außerdem durch ^{31}P -NMR unterschieden werden (260).

Im unbehandelten Agarüberstand von Tü4103 konnte durch ^{31}P -NMR eine Phosphor-haltige Substanz detektiert werden. Der chemische Shift könnte auf ein Phosphonat zurückzuführen sein (Saad, pers. Mitt.). Um nachzuweisen, dass tatsächlich ein Phosphonat diesen Shift verursacht, sollte der Agarüberstand von Tü4103 mit Dhpl und SAM bzw. SAM- CD_3 behandelt werden. Durch das Labeling des Phosphonats mit $-\text{CH}_3$ bzw. $-\text{CD}_3$ würden im ^{31}P -NMR-Spektrum zwei neue Signale auftauchen und der

ursprüngliche Phosphonat-Peak verschwinden. Der Massenunterschied zwischen mit $-CH_3$ bzw. $-CD_3$ gelabeltem Phosphonat ermöglicht die Detektion des Phosphonats und dessen Aufreinigung mit präparativer HPLC-MS.

5.2.2.3 Anwendung von Phosphonat-Derivaten als Pro-Pharmaka

Die hervorragende Wasserlöslichkeit von Phosphonaten, wie auch des Phosphonats von Tü4103, erschwert zwar die Aufreinigung, ist aber unter anwendungsbezogenen Aspekten von Vorteil, denn Wasserlöslichkeit ist für mikrobielle Wirkstoffe eine wichtige Voraussetzung, um als Medikament eingesetzt werden zu können. Medikamente werden über das Blut im Organismus verteilt und müssen daher wasserlöslich sein, um überhaupt ins Blut aufgenommen zu werden. Allerdings sind alle Phosphonate bei physiologischem pH zweifach deprotoniert. Das verhindert, dass sie die lipophile Zellmembran durchdringen können. Die Aufnahme in die Zelle ist aber Voraussetzung für die orale Gabe von Medikamenten. Derzeit werden sogenannte Pro-Pharmaka entwickelt, bei denen die Phosphonatgruppe von Nukleosid-Phosphonaten solange blockiert bleibt, bis das Medikament über das Darmepithelium in die Blutbahn gelangen kann. Dabei wird die Phosphonatgruppe mit einer Schutzgruppe versehen, die durch körpereigene Enzyme abgespalten werden kann (261).

Zum Beispiel wird Pivaloyloxymethyl als Schutzgruppe für Adefovir verwendet. Die Schutzgruppe wird mit der Phosphonatgruppe von Adefovir verestert und kann durch eine körpereigene Esterase wieder entfernt werden (261). Bis-(Pivaloyloxymethyl)-Adefovir zeigt *in vitro* eine 9- bis 13-fach erhöhte antivirale Aktivität und *in vivo* eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit als Adefovir (262). 2002 wurde Bis-(Pivaloyloxymethyl)-Adefovir unter dem Namen Hepsera® (**Abbildung 53 (a)**) zur Behandlung von HBV Infektionen zugelassen (261).

Mit dem zyklischen 1-Aryl-1,3-propanylester kann Adefovir ebenfalls geschützt werden. Der Vorteil ist, dass diese Gruppe durch das Leber-spezifische Enzym Cytochrom P450 Isozym CYP3A4 abgespalten wird und somit speziell für den Transport von Medikamenten in die Leber geeignet ist (263). Als Pradefovir (**Abbildung 53 (b)**) wurde Adefovir-1-Aryl-1,3-propanylester in klinischen Studien der Phase II gegen HBV Infektionen getestet. Die Studien wurden allerdings aufgrund einer erhöhten Tumorraten in Tierversuchen eingestellt (264).

Eine weitere Schutzgruppe ist der Alkoxyalkyl-Rest, der durch die Phospholipase C abgespalten werden kann. Ein Alkoxyalkyl-Derivat des Nukleosids-Phosphonats Cidofovir zeigt eine 2,5- bis 4-fach erhöhte antivirale Aktivität *in vitro* (265). Im Maus-Modell wirkt das Alkoxyalkyl-Derivat ebenso effektiv gegen Infektionen mit dem humanen Cytomegalovirus wie Cidofovir (266). Unter dem Namen Brincidofovir (**Abbildung 53 (c)**) schaffte es das Nukleosid-Phosphonat im Jahr 2015 bis in Phase III der klinischen Studien im Test gegen HCMV. In dieser Phase war allerdings keine verbesserte Wirkung im Vergleich zu Cidofovir festzustellen (267).

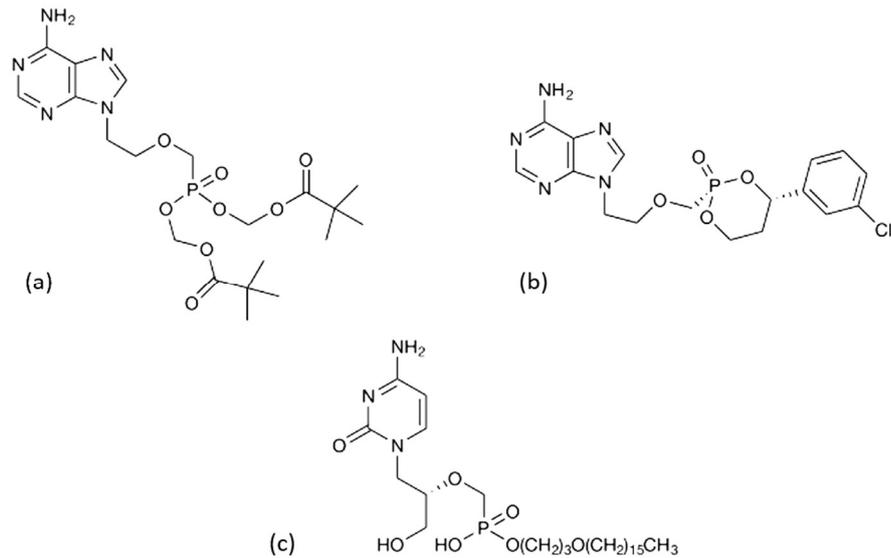


Abbildung 53: Strukturformeln der Pro-Pharmaka (a) Hepsera[®], (b) Pradefovir und (c) Brincidofovir (261).

5.2.2.4 Voraussagen zur Struktur des Phosphonats anhand des Genclusters

Solange das Phosphonat von Tü4103 nicht aufgereinigt ist und die Struktur nicht aufgeklärt wurde, können über die Struktur nur Vermutungen anhand der Genomsequenz angestellt werden. Im Phosphonat-BGC finden sich mehrere *orfs*, deren Genprodukte zur Nukleotid-/Nukleosid-Biosynthese, insbesondere der Purin-Biosynthese, beitragen könnten. Daher kann vermutet werden, dass es sich bei dem Phosphonat um ein Nukleosid- oder Nukleotid-Analogon handelt.

Die Purin-Biosynthese beginnt mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat, das über sieben Intermediate zu Carbamoylphosphat metabolisiert wird. Eines der Intermediate ist Glyconribonukleotid, das durch die Addition von Glycin an Aminoimidazol-Ribonukleotid durch die Phosphoribosamylamin-Glycin-Ligase gebildet wird. Eine putative Phosphoribosamylamin-Glycin-Ligase wird auch im Phosphonat-BGC von Tü4103 kodiert (*kph21*). Des Weiteren verbindet die Aspartat-Carbamoyl-Transferase ein Aspartat-Molekül mit Carbamoylphosphat zu N-Carbamoyl-L-Aspartat. *kph31* kodiert für eine putative Aspartat-Carbamoyl-Transferase. Aus N-Carbamoyl-L-Aspartat wird über zwei weitere Intermediate Inosin-5'-Monophosphat gebildet, das eine Vorstufe der Adenin- und Guanin-Biosynthese ist (193).

Die Genprodukte der im Phosphonat-BGC von Tü4103 vorliegenden Nukleotid-/Nukleosid-Biosynthesegene reichen nicht aus, um ein vollständiges Nukleosid oder Nukleotid herzustellen. Möglicherweise werden Enzyme oder Moleküle zur Bildung des Nukleosid-Phosphonats aus dem Primärmetabolismus rekrutiert. So ist z.B. bekannt, dass die Alaninreste zur Biosynthese von PTT dem Primärmetabolismus entnommen werden, während die nicht-proteingene Aminosäure Phosphinothricin aus dem Sekundärmetabolismus stammt (268).

Nukleosid-/Nukleotid-Analoga imitieren endogene Nukleotide und inhibieren dadurch die Zellteilung oder Replikation durch Beeinträchtigung der DNA/RNA-Synthese oder der Enzyme, die in den Nukleosid-

/Nukleotid-Metabolismus involviert sind (269–271). Das Uracil-Analogon Pseudouridimycin (**Abbildung 54**) z.B., das 2017 von Maffioli *et al.* untersucht wurde, inhibiert die bakterielle RNA-Polymerase durch kompetitive Bindung der NTP-Bindestelle anstelle von UTP (272).

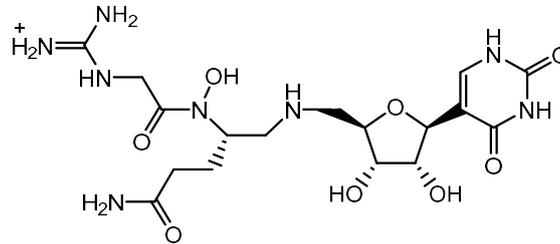


Abbildung 54: Strukturformel von Pseudouridimycin (272).

Nukleosid-/Nukleotid-Phosphonate sind Nukleosid-/Nukleotid-Analoga, die anstelle von Phosphatgruppen Phosphonatgruppen aufweisen (143). Auch diese Gruppe von Molekülen wirkt antibiotisch, indem die DNA- oder RNA-Synthese inhibiert wird. α -Carboxyl-Nukleosid-Phosphonate (α -CNP, **Abbildung 55**) wurden 2015 von Balzarini *et al.* (273) synthetisiert und inhibieren die virale DNA-Polymerase. Der Carboxyl-Sauerstoff imitiert dabei den α -Phosphat-Sauerstoff und die beiden Sauerstoffatome der Phosphonatgruppe imitieren die β - und γ -Phosphat-Sauerstoffatome von dNTPs. Diese Sauerstoffatome bilden mit einem der beiden katalytischen Mg^{2+} -Ionen einen Chelatkomplex. Dadurch wird die Polymerase inhibiert, ohne dass α -CNP in die DNA inkorporiert wird (273).

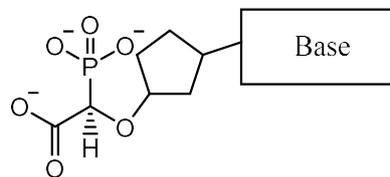


Abbildung 55: Allgemeine Strukturformel von α -Carboxyl-Nukleosid-Phosphonaten (273).

Bisher werden Nukleosid-Phosphonate, wie Adefovir, Tenofovir und Cidofovir, ausschließlich synthetisch hergestellt (145). Das möglicherweise von Tü4103 produzierte Phosphonat-Antibiotikum könnte eventuell das erste natürlich produzierte Nukleosid-Phosphonat sein.

5.2.2.5 Putative DNA-schädigende Wirkung des Phosphonats

Neben potenziellen Nukleosid-/Nukleotid-Biosynthesegenen wurden im Phosphonat-BGC von Tü4103 *orfs* identifiziert, deren putative Genprodukte bei DNA-Reparaturmechanismen eine Rolle spielen könnten: die DNA-Reparaturproteine RadA und DisA, die DNA-Protein-Cystein-Methyltransferase und die A-/G-spezifische Adenin-Glykosylase. Die genannten Genprodukte könnten Teil des Resistenzmechanismus von Tü4103 gegen das selbst produzierte DNA-schädigende Nukleosid-/Nukleotid-Phosphonat-Antibiotikum sein.

Die Ergebnisse Wirkort-spezifischer Bioaktivitätsassays deuten darauf hin, dass Tü4103 tatsächlich ein Phosphonat produziert, das die DNA angreift. Der Agarüberstand von Tü4103 induziert den Promotor *yorB*, der sensitiv gegenüber DNA-Schäden ist. Die Aktivität des Agarüberstands von Tü4103 gegen *E. coli* WM6242 korreliert mit der Aktivierung von *yorB*, was nahelegt, dass das Phosphonat-Antibiotikum DNA-Schäden oder die Inhibition der DNA-Synthese verursacht.

Auch die Ergebnisse eines Assays mit einem RecA-defizienten *S. lividans*-Stamm deuten darauf hin, dass Tü4103 DNA-Schäden verursacht oder möglicherweise als RecA-Inhibitor in der SOS-Antwort auf DNA-Schäden interveniert. Dadurch könnte das Produkt von Tü4103 nicht nur als Antibiotikum, sondern auch als Beigabe zu Antibiotika eingesetzt werden, wie folgende Studie zeigt: 2016 haben Alam *et al.* (274) die Resistenzbildung Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien bei Behandlung mit bakteriostatischen Antibiotika der Klassen der Quinolone, β -Lactame und Aminoglycoside in Kombination mit dem RecA-Inhibitor Fe-Phthalocyanin-Tetrasulfonsäure (Fe-PcTs) getestet. Als Kennzahl für die Resistenz dienten die *colony forming units/mL*. Die Co-Applikation von Fe-PcTs mit anderen Antibiotika konnte die Anzahl der *colony forming units/mL* für Gram-positive und Gram-negative Bakterien reduzieren. Indem die SOS-Antwort und der Transfer mobiler genetischer Elemente inhibiert wurden, konnte die Ausbildung von Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika durch Zugabe von Fe-PcTs reduziert werden. Durch Beigabe von RecA-Inhibitoren, die die Ausbildung von Resistenzen reduzieren, könnte also die Anwendbarkeit von Antibiotika verlängert werden (274). Da es sich bei dem Phosphonat-Antibiotikum von Tü4103 möglicherweise um einen RecA-Inhibitor handelt, könnte das Phosphonat auch als Beigabe zu anderen Antibiotika verwendet werden, um die Ausbildung von Resistenzen zu verhindern. Das Phosphonat sollte auf seine Wirkung in Bezug auf die Ausbildung von Resistenzen in Kombination mit weiteren Antibiotika hin untersucht werden, wie in den von Alam *et al.* entwickelten Versuche (274).

Da die wirkortspezifischen Assays nur mit Agarüberstand von Tü4103 durchgeführt worden sind, lässt sich die DNA-schädigende Wirkung des Überstandes nicht spezifisch auf das Phosphonat zurückführen. Die Tests müssten mit aufgereinigtem Phosphonat-Antibiotikum oder alternativ mit einer Mutante von Tü4103, in der Biosynthesegene des Phosphonat-Clusters unterbrochen oder deletiert sind, wiederholt werden. Die Mutante wäre nicht mehr in der Lage, das Phosphonat zu produzieren. Wenn das Phosphonat DNA-Schäden verursacht, würde die Mutante im Gegensatz zum WT keine DNA-schädigende Wirkung zeigen.

Mit der Reinsubstanz sollten zur Verifizierung des Wirkorts des Phosphonats von Tü4103 weitere Tests, die nicht auf der Aktivität gegenüber Testbakterien beruhen, durchgeführt werden. Ein gebräuchlicher Assay zur Detektion von DNA-Schäden ist der Comet Assay (275). Testzellen werden mit einer potenziell DNA-schädigenden Substanz behandelt und die DNA mit einem Fluoreszenzlabel versehen. Die Zellen werden dann in Agarose fixiert und lysiert. An die Agarose wird ein Spannungsfeld angelegt, sodass DNA-

Fragmente wie bei einer Gelelektrophorese aus den Zellfragmenten hinaus zum negativen Pol migrieren und dabei der Größe nach aufgetrennt werden. Die DNA kann unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Wurde die DNA geschädigt, ist ein „Schweif“ hinter der lysierten Zelle detektierbar, der durch die Bildung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen verursacht wird (275). Nach der Aufreinigung sollte das Phosphonat mit dem Comet Assay auf DNA-schädigende Wirkung hin untersucht werden.

Zur Ermittlung des Wirkorts des Phosphonats von Tü4103 kann auch eine Proteomanalyse durchgeführt werden. Bandow *et al.* verglichen 2003 (276) Expressionsprofile für *B. subtilis*, die durch die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika hervorgerufen werden. Dafür wurden die Proteine von *B. subtilis*-Zellen, die nach der Behandlung mit einem Antibiotikum exprimiert worden sind, in einer 2D-PAGE aufgetrennt. Anhand bestimmter Marker-Proteine lässt sich auf den Wirkort des Antibiotikums schließen. So induzieren DNA-schädigende Substanzen die SOS-Antwort der Zelle. Daher können RecA und PBSX (Prophage *B. subtilis* Protein X), dessen Expression RecA-abhängig induziert wird, als Marker-Proteine für DNA-Schäden verwendet werden (276).

Synthetische Nukleosid-Phosphonate wirken insbesondere antikanzerogen und antiviral (145). Nach der Aufreinigung des Phosphonats wäre es daher interessant, die Cytotoxizität und antiviralen Eigenschaften der Reinsubstanz zu testen. Der Tryphan-Blue-Assay ist einer der gebräuchlichsten Tests zur Bestimmung der Cytotoxizität. Lebende Zellen verhindern das Eindringen des Farbstoffs, wodurch nur tote Zellen gefärbt werden. Allerdings ist der Test nicht sehr sensitiv (277). Eine neuere Methode ist die Raman-Mikrospektroskopie, die auf der Interaktion der Raman-Strahlung mit dem Zielmolekül beruht. Diese Methode ist schnell und insbesondere nicht-invasiv. Raman-Mikrospektroskopie ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, sowie zwischen den Stadien des Zellzyklus (278). Zur Ermittlung der antiviralen Aktivität sollten Assays gegen gängige Viren, wie das humane Cytomegalovirus, Herpes-, HI- oder Hepatitis B-Virus durchgeführt werden.

5.3 PapR2 als Aktivator von stillen Antibiotika-Genclustern

Um das gesamte Potential der isolierten indonesischen Aktinomyceten zur Antibiotikaproduktion ausnutzen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der SARP-Aktivator PapR2 aus *S. pristinaespiralis* als genereller Aktivator für SARP-regulierte Antibiotika-Gencluster in Aktinomyceten verwendet werden kann. Mittels Transkriptionsanalysen und Bandshiftassays konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von PapR2 in *S. lividans* die Produktion von Undecylprodigiosin induziert wird. Auf die gleiche Weise wurde die Produktion von Plicacetin in dem neu isolierten Aktinomycetenstamm SHP22-7 durch PapR2 gesteigert. Die vermehrte Transkription des Plicacetin-BGCs konnte durch Transkriptionsanalysen und die gesteigerte Produktion von Plicacetin durch die

Detektion mittels HPLC-Analyse nachgewiesen werden. Auch in den Stämmen Tü4097, Tü4100, Tü4103 und Tü4106 wurden SARP-Gene und -Bindemotive gefunden. Dass SARPs in jedem untersuchten Stamm vorhanden sind, spricht für die Verbreitung und Bedeutung dieses Regulatortyps in Aktinomyceten.

Die Ergebnisse zeigen, dass SARP-Regulatoren sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Das wird durch eine frühere Studie unterstützt, in der die Überexpression des SARP-Gens *vImI* aus dem Valanimycin-Produzenten *Streptomyces viridifaciens* die Red-Produktion in einer *redD*-Mutante von *S. coelicolor* M145 wiederherstellen konnte (279). SARP-Aktivatoren sind also keineswegs „Syntheseweg-spezifische“, sondern vielmehr „Cluster-situierte Regulatoren“, die unterschiedliche Biosynthesen regulieren können. Das zeigt auch das Beispiel des SARPs CcaR aus *Streptomyces clavuligerus*, der sowohl das Cephamycin-Cluster, in dem *ccaR* situiert ist, als auch das benachbarte Clavulansäure-Gencluster aktivieren kann (280).

Der innovative Ansatz der Aktivierung stiller Gencluster durch *PapR2* kombiniert die bioinformatische Suche nach SARP-Motiven im Gesamtgenom mit der Aktivierung von Antibiotika-Genclustern durch SARPs. Diese Strategie ist geeignet für die Aktivierung SARP-regulierter Streptomyceten-BGCs. Zwar wurde schon zuvor gezeigt, dass die Überexpression Stamm-eigener SARPs die BGC-Expression anregen kann: Durch Überexpression der Stamm-eigenen SARPs aus *Streptomyces* MSC090213JE08 entdeckten Du *et al.* 2014 (281) das Antibiotikum Ishigamide. Sie kombinierten dazu die SARP-Aktivierung mit der OSMAC-Strategie (281). Doch der hier vorgestellte Ansatz belegt, dass es auch mit Spezies-fremden SARPs und ohne aufwändige Optimierung der Kultivierungsbedingungen möglich ist, die Sekundärmetabolit-Biosynthese zu induzieren. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Aktivierung von BGCs hat die PapR2-Aktivierung zwei wesentliche Vorteile: Zum einen ist dieser Ansatz (im Gegensatz zu völlig unspezifischen Ansätzen, wie der Zugabe allgemeiner Elizitoren, Co-Kultivierungen oder der OSMAC-Strategie) zielgerichteter, da er sich ausschließlich auf SARP-regulierte Cluster fokussiert, die durch eine bioinformatische Analyse mit PatScan schnell identifiziert werden können. Zusätzlich wird die Detektion der Substanz, deren Biosynthese aktiviert worden ist, erleichtert, wenn aus der Cluster-Sequenz die Kernstruktur abgeleitet werden kann. Zum anderen benötigt die PapR2-Aktivierung keinen aufwändigen Eingriff in die genomischen DNA (im Gegensatz zu absolut BGC-spezifischen Aktivierungsstrategien, z.B. die heterologe Expression eines BGCs, die Einführung künstlicher Promotoren vor den BGCs oder die Manipulation von Cluster-spezifischen Regulatoren). Die Aktivierung erfordert nur die Klonierung eines SARP-Gens enthaltenden Expressionskonstrukts und dessen Einbringung in einen geeigneten Stamm. Diese Vorteile machen die Überexpression von *papR2* zu einer vielversprechenden Strategie zur Aktivierung von Streptomyceten-BGCs.

6 Literatur

1. World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization.
2. Bérđy J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)* 65:385–395.
3. Takahashi Y, Nakashima T. 2018. Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics* 7:1–17.
4. Waksman SA. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia* 39:565–9.
5. Waksman SA, Harris DA. 1949. Streptomycin, antibiotic isolated from mycelium of *Streptomyces griseus*, active against *Trichomonas vaginalis*, and certain bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 70:308–12.
6. Swedish Academy. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1952.
7. Waksman SA, Lechevalier HA. 1949. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science (80-)* 109:305–307.
8. Reynolds DM, Waksman SA. 1948. Grisein, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 55:739–52.
9. Kupferberg AB, Styles H, Singher HO, Waksman SA. 1950. The production of streptocin by different strains of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 59:523–526.
10. Shockman G, Waksman SA. 1951. Rhodomycin - an antibiotic produced by a red-pigmented mutant of *Streptomyces griseus*. *Antibiot Chemother (Northfield, Ill)* 1:68–75.
11. Raubitschek F, Acker RF, Waksman SA. 1952. Production of an antifungal agent of the fungicidin type by *Streptomyces aureus*. *Antibiot Chemother (Northfield, Ill)* 2:179–83.
12. Lechevalier H, Acker RF, Corke CT, Haenseler CM, Waksman SA. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. *Mycologia*. Taylor & Francis, Ltd.
13. Taber WA, Vining LC, Waksman SA. 1954. Candidin, a new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces viridoflavus*. *Antibiot Chemother (Northfield, Ill)* 4:455–61.
14. Katz E, Pugh LH, Waksman SA. 1956. Antibiotic and cytostatic properties of the actinomycins. *J Bacteriol* 72:660–5.
15. Bérđy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58:1–26.
16. Katz L, Baltz RH. 2016. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43:155–176.
17. Baltz RH. 2018. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *J Ind Microbiol Biotechnol* 46:1–19.
18. Traxler MF, Kolter R. 2015. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Nat Prod Rep* 32:956–970.
19. Walsh C, Tang Y. 2017. *Natural product biosynthesis : chemical logic and enzymatic machinery*.
20. Niu G. 2018. Genomics-driven natural product discovery in actinomycetes. *Trends Biotechnol* 36:238–241.
21. Wang M, Carver JJ, Phelan V V, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen D-TDD, Watrous J, Kapon CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik A V, Meehan MJ, Liu W-T, Crüsemann M, Boudreau PD,

- Esquenazi E, Sandoval-Calderón M, Kersten RD, Pace LA, Quinn RA, Duncan KR, Hsu C-C, Floros DJ, Gavilan RG, Kleigrewe K, Northen T, Dutton RJ, Parrot D, Carlson EE, Aigle B, Michelsen CF, Jelsbak L, Sohlenkamp C, Pevzner P, Edlund A, McLean J, Piel J, Murphy BT, Gerwick L, Liaw C-C, Yang Y-L, Humpf H-U, Maansson M, Keyzers RA, Sims AC, Johnson AR, Sidebottom AM, Sedio BE, Klitgaard A, Larson CB, Boya P CA, Torres-Mendoza D, Gonzalez DJ, Silva DB, Marques LM, Demarque DP, Pociute E, O'Neill EC, Briand E, Helfrich EJM, Granatosky EA, Glukhov E, Ryffel F, Houson H, Mohimani H, Kharbush JJ, Zeng Y, Vorholt JA, Kurita KL, Charusanti P, McPhail KL, Nielsen KF, Vuong L, Elfeki M, Traxler MF, Engene N, Koyama N, Vining OB, Baric R, Silva RR, Mascuch SJ, Tomasi S, Jenkins S, Macherla V, Hoffman T, Agarwal V, Williams PG, Dai J, Neupane R, Gurr J, Rodríguez AMC, Lamsa A, Zhang C, Dorrestein K, Duggan BM, Almaliti J, Allard P-M, Phapale P, Nothias L-F, Alexandrov T, Litaudon M, Wolfender J-L, Kyle JE, Metz TO, Peryea T, Nguyen D-TDD, VanLeer D, Shinn P, Jadhav A, Müller R, Waters KM, Shi W, Liu X, Zhang L, Knight R, Jensen PR, Palsson BØ, Pogliano K, Lington RG, Gutiérrez M, Lopes NP, Gerwick WH, Moore BS, Dorrestein PC, Bandeira N. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34:828–837.
22. Lodhi AF, Zhang Y, Adil M, Deng Y. 2018. Antibiotic discovery: combining isolation chip (iChip) technology and co-culture technique. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:7333–7341.
 23. Piddock LJ V. 2015. Teixobactin, the first of a new class of antibiotics discovered by iChip technology? *J Antimicrob Chemother* 70:2679–2680.
 24. Wunder F, Kalthof B, Muller T, Huser J. 2008. Functional cell-based assays in microliter volumes for ultra-high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen* 11:495–504.
 25. Mahler L, Wink K, Beulig RJ, Scherlach K, Tovar M, Zang E, Martin K, Hertweck C, Belder D, Roth M. 2018. Detection of antibiotics synthesized in microfluidic picolitre-droplets by various actinobacteria. *Sci Rep* 8:13087.
 26. Genilloud O. 2018. Mining actinomycetes for novel antibiotics in the Omics era: Are we ready to exploit this new paradigm? *Antibiotics* 7:1–13.
 27. Hug JJ, Bader CD, Remškar M, Cirnski K, Müller R, Hug JJ, Bader CD, Remškar M, Cirnski K, Müller R. 2018. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. *Antibiotics* 7:1–47.
 28. Genilloud O. 2017. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Nat Prod Rep* 34:1203–1232.
 29. Sharland M, Pulcini C, Harbarth S, Zeng M, Gandra S, Mathur S, Magrini N. 2018. Classifying antibiotics in the WHO Essential Medicines List for optimal use—be AWaRe. *Lancet Infect Dis* 18:18–20.
 30. Worldbank. 2016. Drug-resistant infections: A threat to our economic future.
 31. Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. 2017. *Notes from the Field*: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* — Washoe County, Nevada, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66:33.
 32. Hopwood DA. 2006. Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet* 40:1–23.
 33. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43.
 34. Labeda DP, Goodfellow M, Brown R, Ward AC, Lanoot B, Vannanneyt M, Swings J, Kim S-B, Liu Z, Chun J,

- Tamura T, Oguchi A, Kikuchi T, Kikuchi H, Nishii T, Tsuji K, Yamaguchi Y, Tase A, Takahashi M, Sakane T, Suzuki KI, Hatano K. 2012. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101:73–104.
35. Vrancken K, Anné J. 2009. Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*. *Future Microbiol* 4:181–188.
36. Chater KF. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 47:685–713.
37. Jones SE, Ho L, Rees CA, Hill JE, Nodwell JR, Elliot MA. 2017. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *Elife* 6:1–21.
38. Omura S, Takahashi Y, Iwai Y, Tanaka H. 1982. *Kitasatosporia*, a new genus of the order Actinomycetales. *J Antibiot (Tokyo)* 35:1013–1019.
39. Takahashi Y. 2017. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 70:506–513.
40. Takahashi Y, Iwai Y, Omura S. 1991. Mode of submerged spore formation in *Kitasatosporia setae*. *J Gen Appl Microbiol* 37:261–266.
41. Mishig-Ochiriin T, Won H-S, Lee C-J, Kang S-O, Lee B-J. 2003. Biophysical and structural property of the putative DNA-binding protein, BldB, from *Streptomyces lividans*. *Biopolymers* 69:343–350.
42. Heichlinger A, Ammelburg M, Kleinschnitz E-M, Latus A, Maldener I, Flärdh K, Wohlleben W, Muth G. 2011. The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol* 193:1533–42.
43. Aínsa JA, Bird N, Ryding NJ, Findlay KC, Chater KF. 2010. The complex whjI locus mediates environmentally sensitive repression of development of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:225–236.
44. Girard G, Willemsse J, Zhu H, Claessen D, Bukarasam K, Goodfellow M, van Wezel GP. 2014. Analysis of novel *Kitasatospora* reveals significant evolutionary changes in conserved developmental genes between *Kitasatospora* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106:365–380.
45. Omura S, Ootoguro K, Nishikiori T, Oiwa R, Iwai Y. 1981. Setamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 34:1253–1256.
46. Takahashi Y, Iwai Y, Omura S. 1984. Two new species of the genus *Kitasatosporia*, *Kitasatosporia phosalacinea* sp. nov. and *Kitasatosporia griseola* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* 30:377–387.
47. Hu D, Chen Y, Sun C, Jin T, Fan G, Liao Q, Mok KM, Lee M-YS. 2018. Genome guided investigation of antibiotics producing actinomycetales strain isolated from a Macau mangrove ecosystem. *Sci Rep* 8:14271.
48. Handayani I, Ratnakomala S, Lisdiyanti P, Fahrurrozi, Alanjary M, Wohlleben W, Mast Y. 2018. Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. strain BSE7F, a Bali mangrove sediment actinobacterium with antimicrobial activities. *Genome Announc* 6:1–3.
49. Arifuzzaman M, Khatun M, Rahman H. 2002. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African J Biotechnol* 9:4615–4619.
50. Ministry of Environment and Forestry. 2015. The fifth national report of Indonesia to the convention on biological diversity.
51. de Bruyn M, Stelbrink B, Morley RJ, Hall R, Carvalho GR, Cannon CH, van den Bergh G, Meijaard E, Metcalfe

- I, Boitani L, Maiorano L, Shoup R, von Rintelen T. 2014. Borneo and Indochina are major evolutionary hotspots for southeast Asian biodiversity. *Syst Biol* 63:879–901.
52. Berkelmann D, Schneider D, Engelhaupt M, Heinemann M, Christel S, Wijayanti M, Meryandini A, Daniel R. 2018. How rainforest conversion to agricultural systems in Sumatra (Indonesia) affects active soil bacterial communities. *Front Microbiol* 9:2381.
53. Polónia ARM, Cleary DFR, Duarte LN, de Voogd NJ, Gomes NCM. 2014. Composition of archaea in seawater, sediment, and sponges in the Kepulauan Seribu reef system, Indonesia. *Microb Ecol* 67:553–567.
54. Lohman DJ, de Bruyn M, Page T, von Rintelen K, Hall R, Ng PKL, Shih H-T, Carvalho GR, von Rintelen T. 2011. Biogeography of the Indo-Australian archipelago. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:205–226.
55. Nurkanto A, Tamura T, Shibata C, Ratnakomala S, Hamada M, Lisdiyanti P. 2015. *Cryptosporangium cibodasense* sp. nov., isolated from leaf litter in Indonesia. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4632–4637.
56. Nurkanto A, Lisdiyanti P, Hamada M, Ratnakomala S, Shibata C, Tamura T. 2016. *Actinoplanes bogoriensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from leaf litter. *J Antibiot (Tokyo)* 69:26–30.
57. Otoguro M, Yamamura H, Tamura T, Irzaldi R, Ratnakomala S, Ridwan R, Kartina G, Triana E, Nurkanto A, Lestari Y, Lisdiyanti P, Widyastuti Y, Ando K. 2011. *Actinophytocola timorensis* sp. nov. and *Actinophytocola corallina* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:834–838.
58. Lisdiyanti P, Otoguro M, Ratnakomala S, Lestari Y, Hastuti RD, Triana E, Katsuhiko A, Widyastuti Y. 2010. *Actinokineospora baliensis* sp. nov., *Actinokineospora cibodasensis* sp. nov. and *Actinokineospora cianjurenensis* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2331–2335.
59. Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, Hill RT. 2005. Novel *Actinobacteria* from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:29–36.
60. Handayani I, Ratnakomala S, Lisdiyanti P, Fahrurrozi, Kusharyoto W, Alanjary M, Ort-Winklbauer R, Kulik A, Wohlleben W, Mast Y. 2018. Complete genome sequence of *Streptomyces* sp. strain SHP22-7, a new species isolated from mangrove of Enggano island, Indonesia. *Microbiol Resour Announc* 7:1–3.
61. Krause J, Ratnakomala S, Lisdiyanti P, Ort-Winklbauer R, Wohlleben W, Mast Y. 2019. Complete genome sequence of the putative phosphonate producer *Streptomyces* sp. strain I6, isolated from Indonesian mangrove sediment. *Microbiol Resour Announc* 8:1–3.
62. Takahashi Y, Omura S. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* 49:141–154.
63. Fotso S, Santosa DA, Saraswati R, Yang J, Mahmud T, Zabriskie TM, Proteau PJ. 2010. Modified phenazines from an Indonesian *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 73:472–475.
64. Fotso S, Mahmud T, Zabriskie TM, Santosa DA, Sulastri, Proteau PJ. 2008. Angucyclinones from an Indonesian *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 71:61–65.
65. Sheng Y, Fotso S, Serrill JD, Shahab S, Santosa DA, Ishmael JE, Proteau PJ, Zabriskie TM, Mahmud T. 2015. Succinylated apoptolidins from *Amycolatopsis* sp. ICBB 8242. *Org Lett* 17:2526–2529.
66. Pudjiraharti S, Takesue N, Katayama T, Lisdiyanti P, Hanafi M, Tanaka M, Sone T, Asano K. 2011. Actinomycete *Nonomuraea* sp. isolated from Indonesian soil is a new producer of inulin fructotransferase. *J Biosci Bioeng* 111:671–674.
67. Rahmani N, Kashiwagi N, Lee J, Niimi-Nakamura S, Matsumoto H, Kahar P, Lisdiyanti P, Yopi, Prasetya B,

- Ogino C, Kondo A. 2017. Mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of mannoooligosaccharides from mannan polymers. *AMB Express* 7:1–11.
68. Jordan DC, Reynolds PE. 1967. Vancomycin, p. 102–116. *In* Mechanism of Action. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
69. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang C-H, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream M-A, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417:141–147.
70. Zhu H, Sandiford SK, van Wezel GP. 2014. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:371–86.
71. Nett M, Ikeda H, Moore BS. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 26:1362.
72. Doull JL, Ayer SW, Singh AK, Thibault P. 1993. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot (Tokyo)* 46:869–871.
73. Clark GJ, Bushell ME. 1995. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology* 141:663–669.
74. Doull JL, Singh AK, Hoare M, Ayer SW. 1994. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J Ind Microbiol* 13:120–125.
75. Chen G, Wang G-Y-S, Li X, Watres B, Davies J. 2000. Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Antibiot (Tokyo)* 53:1145–1153.
76. Tanaka Y, Hosaka T, Ochi K. 2010. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot (Tokyo)* 63:477–481.
77. Paquet V, Goma G, Soucaille P. 1992. Induction of pristinamycins production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol Lett* 14:1065–1070.
78. Tan G-Y, Bai L, Zhong J-J. 2013. Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates A-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnol Bioeng* 110:2984–2993.
79. Seyedsayamdost MR. 2014. High-throughput platform for the discovery of elicitors of silent bacterial gene clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7266–71.
80. Lincke T, Behnken S, Ishida K, Roth M, Hertweck C. 2010. Closthioamide: An unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Costridium cellulolyticum*. *Angew Chemie Int Ed* 49:2011–2013.
81. Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Proksch P. 2014. Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar Drugs* 12:1043–65.
82. Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, Murakami K, Tsurumi Y, Kodani S, Yoshida M, Fujie A, Ochi K. 2009. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol* 27:462–464.

83. Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. 2012. *Streptomyces coelicolor* as an expression host for heterologous gene clusters. *Methods Enzymol* 517:279–300.
84. Bunet R, Song L, Mendes MV, Corre C, Hotel L, Rouhier N, Framboisier X, Leblond P, Challis GL, Aigle B. 2011. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins. *J Bacteriol* 193:1142–1153.
85. Zhou Z, Xu Q, Bu Q, Guo Y, Liu S, Liu Y, Du Y, Li Y. 2015. Genome mining-directed activation of a silent angucycline biosynthetic gene cluster in *Streptomyces chattanoogensis*. *Chembiochem* 16:496–502.
86. Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* 8:208–215.
87. Bibb M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142:1335–1344.
88. Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, Chater K. 2005. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 56:465–479.
89. Bate N, Stratigopoulos G, Cundliffe E. 2002. Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Mol Microbiol* 43:449–458.
90. Novakova R, Rehakova A, Kutas P, Feckova L, Kormanec J. 2011. The role of two SARP family transcriptional regulators in regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology* 157:1629–1639.
91. Sheldon PJ, Busarow SB, Hutchinson CR. 2002. Mapping the DNA-binding domain and target sequences of the *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis regulatory protein, DnrI. *Mol Microbiol* 44:449–460.
92. Aigle B, Pang X, Decaris B, Leblond P. 2005. Involvement of AlpV, a new member of the *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein Family, in regulation of the duplicated type II polyketide synthase *alp* gene cluster in *Streptomyces ambofaciens*. *J Bacteriol* 187:2491–2500.
93. Lombó F, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 1999. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol* 181:642–647.
94. Wu X, Jin L, Zhang H, Tong R, Ma M, Chen Y. 2018. Identification of truncated form of NosP as a transcription factor to regulate the biosynthesis of nosiheptide. *FASEB J* 32:453–465.
95. Widdick DA, Dodd HM, Barraille P, White J, Stein TH, Chater KF, Gasson MJ, Bibb MJ. 2003. Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4316–4321.
96. Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. 2002. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* 184:794–805.
97. Mast Y, Guezguez J, Handel F, Schinko E. 2015. A complex signaling cascade governs pristnamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Appl Environ Microbiol* 81:6621–6636.
98. Pulsawat N, Kitani S, Fukushima E, Nihira T. 2009. Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR. *Microbiology* 155:1250–1259.

99. Xie Y, Wang B, Liu J, Zhou J, Ma J, Huang H, Ju J. 2012. Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridigrisein in *Streptomyces griseoviridis*. *ChemBioChem* 13:2745–2757.
100. Suzuki T, Mochizuki S, Yamamoto S, Arakawa K, Kinashi H. 2010. Regulation of lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei* by two SARP genes, *srrY* and *srrZ*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:819–827.
101. Salehi-Najafabadi Z, Barreiro C, Rodríguez-García A, Cruz A, López GE, Martín JF. 2014. The gamma-butyrolactone receptors BulR1 and BulR2 of *Streptomyces tsukubaensis*: tacrolimus (FK506) and butyrolactone synthetases production control. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:4919–4936.
102. Ye S, Braña AF, González-Sabín J, Morís F, Olano C, Salas JA, Méndez C. 2018. New insights into the biosynthesis pathway of polyketide alkaloid argimycins P in *Streptomyces argillaceus*. *Front Microbiol* 9:252.
103. Takano E, Gramajo HC, Strauch E, Andres N, White J, Bibb MJ. 1992. Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 6:2797–2804.
104. Santamarta I, Rodríguez-García A, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2002. CcaR is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriol* 184:3106–3113.
105. Rodríguez M, Núñez LE, Braña AF, Méndez C, Salas JA, Blanco G. 2008. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol Microbiol* 69:633–645.
106. Kurniawan YN, Kitani S, Maeda A, Nihira T. 2014. Differential contributions of two SARP family regulatory genes to indigoidine biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:9713–9721.
107. Garg RP, Ma Y, Hoyt JC, Parry RJ. 2002. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the azoxy antibiotic valanimycin. *Mol Microbiol* 46:505–517.
108. Wietzorrek A, Bibb M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25:1181–1184.
109. Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:112–43.
110. Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007. AfsR recruits RNA polymerase to the afsS promoter: A model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol* 369:322–333.
111. Metcalf WW, Van Der Donk WA. 2009. Biosynthesis of Phosphonic and Phosphinic Acid Natural Products. *Annu Rev Biochem* 78:65–94.
112. Liu S, Lu Z, Jia Y, Dunaway-Mariano D, Herzberg O. 2002. Dissociative phosphoryl transfer in PEP mutase catalysis: structure of the enzyme/sulfo-pyruvate complex and kinetic properties of mutants. *Biochemistry* 41:10270–10276.
113. Ju K-S, Gao J, Doroghazi JR, Wang K-KA, Thibodeaux CJ, Li S, Metzger E, Fudala J, Su J, Zhang JK, Lee J, Cioni JP, Evans BS, Hirota R, Labeda DP, van der Donk WA, Metcalf WW. 2015. Discovery of phosphonic acid natural products by mining the genomes of 10,000 actinomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:12175–

- 12180.
114. Yu X, Doroghazi JR, Janga SC, Zhang JK, Circello B, Griffin BM, Labeda DP, Metcalf WW. 2013. Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20759–20764.
 115. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphomycin). *Ann N Y Acad Sci* 235:364–386.
 116. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, Miller TW, Chalet L, Kahan FM, Foltz EL, Woodruff HB, Mata JM, Hernandez S, Mochales S. 1969. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 166:122–3.
 117. World Health Organization. 2017. Executive summary: The selection and use of essential medicine.
 118. Johnson RD, Kastner RM, Larsen SH, Earl E. Ose. 1984. Antibiotic A53868 and process for production thereof.
 119. Whitteck JT, Ni W, Griffin BM, Eliot AC, Thomas PM, Kelleher NL, Metcalf WW, van der Donk WA. 2007. Reassignment of the structure of the antibiotic A53868 reveals an unusual amino dehydrophosphonic acid. *Angew Chemie Int Ed* 46:9089–9092.
 120. Kuemin M, van der Donk WA. 2010. Structure–activity relationships of the phosphonate antibiotic dehydrophos. *Chem Commun* 46:7694.
 121. Evans BS, Zhao C, Gao J, Evans CM, Ju K-S, Doroghazi JR, van der Donk WA, Kelleher NL, Metcalf WW. 2013. Discovery of the antibiotic phosacetamycin via a new mass spectrometry-based method for phosphonic acid detection. *ACS Chem Biol* 8:908–913.
 122. Cobb RE, Bae B, Li Z, DeSieno MA, Nair SK, Zhao H. 2015. Structure-guided design and biosynthesis of a novel FR-900098 analogue as a potent *Plasmodium falciparum* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (Dxr) inhibitor. *Chem Commun* 51:2526–2528.
 123. Zeidler J, Schwender J, Müller C, Wiesner J, Weidemeyer C, Beck E, Jomaa H, Lichtenthaler HK. 1998. Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Zeitschrift für Naturforsch C* 53:980–986.
 124. Missinou MA, Borrmann S, Schindler A, Issifou S, Adegnik AA, Matsiegui P-B, Binder R, Lell B, Wiesner J, Baranek T, Jomaa H, Kremsner PG. 2002. Fosmidomycin for malaria. *Lancet* 360:1941–1942.
 125. Kuzuyama T, Shimizu T, Takahashi S, Seto H. 1998. Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett* 39:7913–7916.
 126. Okuhara M, Kuroda Y, Goto T, Okamoto M, Terano H, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. 1980. Studies on new phosphonic acid antibiotics. I. FR-900098, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 33:13–17.
 127. Yamamoto M, Toshiro K, Okachi R, Yamada K, Nakayama K, Kase H, Karasawa A, Shuto K. 1986. K-26, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by an actinomycete K-26. *J Antibiot (Tokyo)* 39:44–52.
 128. Erdös EG, Skidgel RA. 1987. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 56:345–348.
 129. Ntai I, Bachmann BO. 2008. Identification of ACE pharmacophore in the phosphono-peptide metabolite K-26. *Bioorg Med Chem Lett* 18:3068–3071.
 130. Ntai I, Manier ML, Hachey DL, Bachmann BO. 2005. Biosynthetic origins of C–P bond containing tripeptide

- K-26. Org Lett 7:2763–2765.
131. Bayer E, Gugel KH, Hägele K, Hagenmaier H, Jessipow S, König WA, Zähner H. 1972. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv Chim Acta* 55:224–239.
 132. Colanduoni JA, Villafranca JJ. 1986. Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by phosphinothricin. *Bioorg Chem* 14:163–169.
 133. J. Lea P, W. Joy K, L. Ramos J, G. Guerrero M. 1984. The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* 23:1–6.
 134. Wild A, Sauer H, Rühle W. 1987. The effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis I. inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. *Zeitschrift für Naturforsch C* 42:263–269.
 135. Sauer H, Wild A, Rühle W. 1987. The effect of phosphinothricin (Glufosinate) on photosynthesis II. The causes of inhibition of photosynthesis. *Zeitschrift für Naturforsch C* 42:270–278.
 136. Omura S, Murata M, Hanaki H, Hinotozawa K, Oiwa R, Tanaka H. 1984. Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin. Fermentation, isolation, biological activity and mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* 37:829–835.
 137. Seto H, Imai S, Tsuruoka T, Ogawa H, Satoh A, Sasaki T, Otake N. 1983. Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) Part 3. Production of phosphinic acid derivatives, MP-103, MP-104 and MP-105, by a blocked mutant of *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. *Biochem Biophys Res Commun* 111:1008–1014.
 138. Kato H, Nagayama K, Abe H, Kobayashi R, Ishihara E. 1991. Isolation, structure and biological activity of trialaphos. *Agric Biol Chem* 55:1133–1134.
 139. Omura S, Hinotozawa K, Imamura N, Murata M. 1984. The structure of phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin. *J Antibiot (Tokyo)* 37:939–940.
 140. Martinez DA, Loening UE, Graham MC. 2018. Impacts of glyphosate-based herbicides on disease resistance and health of crops: a review. *Environ Sci Eur* 30:2.
 141. Monsanto. Crop Management Solutions | Roundup Ready PLUS.
 142. Monsanto. Bayer Closes Monsanto Acquisition | Monsanto.
 143. De Clercq E. 2011. The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. *Biochem Pharmacol* 82:99–109.
 144. Herman BD, Votruba I, Holy A, Sluis-Cremer N, Balzarini J. 2010. The acyclic 2,4-diaminopyrimidine nucleoside phosphonate acts as a purine mimetic in HIV-1 reverse transcriptase DNA polymerization. *J Biol Chem* 285:12101–12108.
 145. Clercq E De, Holý A. 2005. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:928–940.
 146. Balzarini J, Holy A, Jindrich J, Dvorakova H, Hao Z, Snoeck R, Herdewijn P, Johns DG, De Clercq E. 1991. 9-[(2RS)-3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4961–4965.
 147. Clercq E De, Holý A, Rosenberg I, Sakuma T, Balzarini J, Maudgal PC. 1986. A novel selective broad-spectrum

- anti-DNA virus agent. *Nature* 323:464–467.
148. Clercq E De, Sakuma T, Baba M, Pauwels R, Balzarini J, Rosenberg I, Holý A. 1987. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines. *Antiviral Res* 8:261–272.
 149. Lalezari JP, Stagg RJ, Kuppermann BD, Holland GN, Kramer F, Ives D V., Youle M, Robinson MR, Drew WL, Jaffe HS. 1997. Intravenous cidofovir for peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Ann Intern Med* 126:257.
 150. Neyts J, Snoeck R, Balzarini J, De Clercq E. 1991. Particular characteristics of the anti-human cytomegalovirus activity of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC) *in vitro*. *Antiviral Res* 16:41–52.
 151. Neyts J, Sadler R, De Clercq E, Raab-Traub N, Pagano JS. 1998. The antiviral agent cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine] has pronounced activity against nasopharyngeal carcinoma grown in nude mice. *Cancer Res* 58:384–388.
 152. Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E. 1998. Inhibiting effects of cidofovir (HPMPC) on the growth of the human cervical carcinoma (SiHa) xenografts in athymic nude mice. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 10:533–539.
 153. Liekens S, Andrei G, Vandeputte M, De Clercq E, Neyts J. 1998. Potent inhibition of hemangioma formation in rats by the acyclic nucleoside phosphonate analogue cidofovir. *Cancer Res* 58:2562–2567 antiangiogenic.
 154. Browder T, Butterfield CE, Kråling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. 2000. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 60:1878–1886.
 155. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang T-T, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. 2003. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen–negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 348:800–807.
 156. Balzarini J, Verstuyf A, Hatse S, Goebels J, Sobis H, Vandeputte M, De Clercq E. 1995. The human immunodeficiency virus (HIV) inhibitor 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (pmea) is a strong inducer of differentiation of several tumor cell lines. *Int J Cancer* 61:130–137.
 157. Hatse S, Naesens L, Degrève B, Segers C, Vandeputte M, Waer M, De Clercq E, Balzarini J. 1998. Potent antitumor activity of the acyclic nucleoside phosphonate 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in choriocarcinoma-bearing rats. *Int J Cancer* 76:595–600.
 158. Balzarini J, Holy A, Jindrich J, Naesens L, Snoeck R, Schols D, De Clercq E. 1993. Differential antiherpesvirus and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective *in vitro* and *in vivo* antiretrovirus activities of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-. *Antimicrob Agents Chemother* 37:332–338.
 159. Eliot AC, Griffin BM, Thomas PM, Johannes TW, Kelleher NL, Zhao H, Metcalf WW. 2008. Cloning, expression, and biochemical characterization of *Streptomyces rubellomurinus* genes required for biosynthesis of antimalarial compound FR900098. *Chem Biol* 15:765–770.
 160. Hopwood DA, Kieser T, Wright HM, Bibb MJ. 1983. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *Microbiology* 129:2257–2269.
 161. Muth G, Frese D, Kleber A, Wohlleben W. 1997. Mutational analysis of the *Streptomyces lividans recA* gene

- suggests that only mutants with residual activity remain viable. *Mol Gen Genet* MGG 255:420–428.
162. Feitelson JS, Hopwood DA. 1983. Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *MGG Mol Gen Genet* 190:394–398.
163. Sigle S, Ladwig N, Muth G. 2015. Synthesis of the spore envelope in the developmental life cycle of *Streptomyces coelicolor*. *Int J Med Microbiol* 305:183–189.
164. Pridmore RD. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56:309–312.
165. Menges R, Muth G, Wohlleben W, Stegmann E. 2007. The ABC transporter Tba of *Amycolatopsis balhimycina* is required for efficient export of the glycopeptide antibiotic balhimycin. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:125–134.
166. ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.
167. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617.
168. Meier-Kolthoff JP, Göker M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun* 10:1–10.
169. Blin K, Wolf T, Chevrette MG, Lu X, Schwalen CJ, Kautsar SA, Suarez Duran HG, de Los Santos ELC, Kim HU, Nave M, Dickschat JS, Mitchell DA, Shelest E, Breitling R, Takano E, Lee SY, Weber T, Medema MH. 2017. antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* 45:W36–W41.
170. Alanjary M, Kronmiller B, Adamek M, Blin K, Weber T, Huson D, Philmus B, Ziemert N. 2017. The Antibiotic Resistant Target Seeker (ARTS), an exploration engine for antibiotic cluster prioritization and novel drug target discovery. *Nucleic Acids Res* 45:W42–W48.
171. Fu H, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides: dissection of the catalytic specificity of the *act* ketoreductase. *J Am Chem Soc* 116:4166–4170.
172. Meurer G, Gerlitz M, Wendt-Pienkowski E, Vining LC, Rohr J, Hutchinson CR. 1997. Iterative type II polyketide synthases, cyclases and ketoreductases exhibit context-dependent behavior in the biosynthesis of linear and angular decapolyketides. *Chem Biol* 4:433–443.
173. Ando T, Hiramaya K, Takahashi R, Horino I, Etoh Y, Morioka H, Shibai H, Murai A. 1985. Cosmomycin D. A new anthracycline antibiotic. *Agric Biol Chem* 49:259–262.
174. Anazai K. 1960. The new antibiotics, Questionomycin A and B. *J Antibot Ser A* 13:125–132.
175. Horiuchi K, Adachi K, Fujise Y, Naruse H, Sumimoto K, Kanayama N, Terao T. 1991. Isolation and characterization of zinc coproporphyrin I: a major fluorescent component in meconium. *Clin Chem* 37:1173–1177.
176. Brockmann H, Pini H. 1947. Actinorhodin, ein roter Farbstoff aus Actinomyceten. *Naturwissenschaften* 34:190–190.
177. Wassermann HH, Rogers GC, Keith DD. 1966. The Structure and Synthesis of Undecylprodigiosin. A

- Prodigiosin Analogue from *Streptomyces*. *Chem Commun* 22:825–826.
178. Yuntsen H. 1958. On the studies of angustmycins. VI. Chemical structure of angustmycin A. *J Antibiot (Tokyo)* 11:79–80.
179. Guarino AJ. 1967. Angustmycin A, p. 464–467. *In Mechanism of Action*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
180. Bihlmaier C, Welle E, Hofmann C, Welzel K, Vente A, Breitling E, Müller M, Glaser S, Bechthold A. 2006. Biosynthetic gene cluster for the polyenoyltetramic acid alpha-lipomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2113–2121.
181. Kunze B, Schabacher K, Zähler H, Zeeck A. 1972. Metabolic products of microorganisms. 3 lipomycins. I. Isolation, characterization and first studies of the structure and the mechanism of action. *Arch Mikrobiol* 86:147–74.
182. Komaki H, Harayama S. 2006. Sequence diversity of type-II polyketide synthase genes in *Streptomyces*. *Actinomycetologica* 20:42–48.
183. Doroghazi JR, Metcalf WW. 2013. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. *BMC Genomics* 14:611–623.
184. Alam MT, Medema MH, Takano E, Breitling R. 2011. Comparative genome-scale metabolic modeling of actinomycetes: the topology of essential core metabolism. *FEBS Lett* 585:2389–2394.
185. Wright F, Bibb MJ. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113:55–65.
186. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D van. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:495–548.
187. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
188. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:W339-346.
189. Kramer SF, Flynn GL. 1972. Solubility of organic hydrochlorides. *J Pharm Sci* 61:1896–1904.
190. Oddo JE, Tomson MB. 1990. The solubility and stoichiometry of calcium-diethylenetriaminepenta(methylene phosphonate) at 70° in brine solutions at 4.7 and 5.0 pH. *Appl Geochemistry* 5:527–532.
191. Nash KL. 1994. Actinide phosphonate complexes in aqueous solutions. *J Alloys Compd* 213–214:300–304.
192. Ogasawara Y, Dairi T. 2017. Biosynthesis of oligopeptides using ATP-grasp enzymes. *Chem - A Eur J* 23:10714–10724.
193. Brown AM, Hoopes SL, White RH, Sarisky CA. 2011. Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme. *Biol Direct* 6:1–21.
194. Lipscomb WN, Kantrowitz ER. 2012. Structure and mechanisms of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Acc Chem Res* 45:444–53.
195. Leyh TS, Taylor JC, Markham GD. 1988. The sulfate activation locus of *Escherichia coli* K12: cloning, genetic, and enzymatic characterization. *J Biol Chem* 263:2409–2416.
196. Tomasz M, Palom Y. 1997. The mitomycin bioreductive antitumor agents: Cross-linking and alkylation of

- DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther* 76:73–87.
197. Yingqing M, Varoglu M, Sherman DH. 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol* 6:251–263.
 198. Ichinose K, Ozawa M, Itou K, Kunieda K, Ebizuka Y. 2003. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: Towards comparative analysis of the benzoisochromanquinone gene clusters. *Microbiology*. Microbiology Society.
 199. Zhao Q, He Q, Ding W, Tang M, Kang Q, Yu Y, Deng W, Zhang Q, Fang J, Tang G, Liu W. 2008. Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chem Biol* 15:693–705.
 200. Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, Vasiliou V. 2011. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* 5:283–303.
 201. Eichhorn E, Ploeg JR van der, Kertesz MA, Leisinger T. 1997. Characterization of α -ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272:23031–23036.
 202. Haruyama K, Nakai T, Miyahara I, Hirotsu K, Mizuguchi H, Hayashi H, Kagamiyama H. 2001. Structures of *Escherichia coli* histidinol-phosphate aminotransferase and its complexes with histidinol-phosphate and N-(5'-phosphopyridoxyl)-L-glutamate: double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry* 40:4633–4644.
 203. Ferrández A, Miñambres B, García B, Olivera ER, Luengo JM, García JL, Díaz E. 1998. Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem* 273:25974–86.
 204. McLennan AG. 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell Mol Life Sci* 63:123–143.
 205. Eberle RJ, Coronado MA, Caruso IP, Lopes DO, Miyoshi A, Azevedo V, Arni RK. 2015. Chemical and thermal influence of the [4Fe–4S]₂ + cluster of A/G-specific adenine glycosylase from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1850:393–400.
 206. Campos SS, Ibarra-Rodríguez JR, Barajas-Ornelas RC, Ramírez-Guadiana FH, Obregón-Herrera A, Setlow P, Pedraza-Reyes M. 2014. Interaction of apurinic/apyrimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *J Bacteriol* 196:568–78.
 207. Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S. 2006. A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 125:679–690.
 208. Tschowri N. 2016. Cyclic dinucleotide-controlled regulatory pathways in *Streptomyces* species. *J Bacteriol* 198:47–54.
 209. Haldenby S, White MF, Allers T. 2009. RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins. *Biochem Soc Trans* 37:102–7.
 210. Davis MC, Kesthely CA, Franklin EA, MacLellan SR. 2017. The essential activities of the bacterial sigma factor. *Can J Microbiol* 63:89–99.
 211. Sutton MD, Walker GC. 2001. Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair, and

- DNA recombination. *Proc Natl Acad Sci* 98:8342–8349.
212. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 6:1079–1099.
213. Cuthbertson L, Nodwell JR. 2013. The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:440–75.
214. Körner H, Sofia HJ, Zumft WG. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27:559–592.
215. Gao C, Hindra, Mulder D, Yin C, Elliot MA. 2012. Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *MBio* 3:1–12.
216. Santos CL, Tavares F, Thioulouse J, Normand P. 2009. A phylogenomic analysis of bacterial helix–turn–helix transcription factors. *FEMS Microbiol Rev* 33:411–429.
217. Mahnensmith RL, Aronson PS. 1985. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 56:773–788.
218. Schäberle TF, Vollmer W, Frasch H-J, Hüttel S, Kulik A, Röttgen M, von Thaler A-K, Wohlleben W, Stegmann E. 2011. Self-resistance and cell wall composition in the glycopeptide producer *Amycolatopsis balhimycina*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4283–4289.
219. Quistgaard EM, Löw C, Guettou F, Nordlund P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:123–132.
220. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. 1995. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20:257–259.
221. Polgár L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci C* 59:349–362.
222. Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21:321–332.
223. Ferguson RA, Johnston JS, Mitchell RE. 1980. Resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* to its own toxin, phaseolotoxin. *FEMS Microbiology Letters*. Elsevier Science on behalf of the Federation of European Microbiological Societies.
224. Moore RE, Niemczura WP, Kwok OCH, Patil SS. 1984. Inhibitors of ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. revised structure of phaseolotoxin. *Tetrahedron Lett* 25:3931–3934.
225. Mosqueda G, Van den Broeck G, Saucedo O, Bailey AM, Alvarez-Morales A, Herrera-Estrella L. 1990. Isolation and characterization of the gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* encoding the phaseolotoxin-insensitive ornithine carbamoyltransferase. *Mol Gen Genet MGG* 222:461–466.
226. Honzatko RB, Crawford JL, Monaco HL, Ladner JE, Edwards BFP, Evans DR, Warren SG, Wiley DC, Ladner RC, Lipscomb WN. 1982. Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 160:219–263.
227. Delepierre M, Van Heijenoort C, Igolen J, Pothier J, Le Bret M, Roques BP. 1989. Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG) 2: Actinomycin D complex from complete 1H and 31P NMR. *J Biomol Struct Dyn* 7:557–589.
228. Blin K, Wohlleben W, Weber T. 2018. Patscanui: an intuitive web interface for searching patterns in DNA

- and protein data. *Nucleic Acids Res* 46:W205–W208.
229. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
230. Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, Smith ME, Sharp C, Saluveer E, Saitta A, Rosas M, Abarenkov K. 2014. Global diversity and geography of soil fungi 246:1256688-1-1256688–10.
231. Brundrett MC. 2017. Global diversity and importance of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants, p. 533–556. *In* . Springer, Cham.
232. Pärtel M, Zobel M, Öpik M, Tedersoo L. 2017. Global patterns in local and dark diversity, species pool size and community completeness in ectomycorrhizal fungi, p. 395–406. *In* . Springer, Cham.
233. Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, Johnson NC, Kane A, Koorem K, Kochar M, Ndiaye C, Pärtel M, Reier Ü, Saks Ü, Singh R, Vasar M, Zobel M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* (80-) 349:970–973.
234. Kivlin SN, Hawkes C V., Treseder KK. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 43:2294–2303.
235. Green JL, Bohannan BJM, Whitaker RJ. 2008. Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *Science* 320:1039–43.
236. Cameron EK, Martins IS, Lavelle P, Mathieu J, Tedersoo L, Bahram M, Gottschall F, Guerra CA, Hines J, Patoine G, Siebert J, Winter M, Cesarz S, Ferlian O, Kreft H, Lovejoy TE, Montanarella L, Orgiazzi A, Pereira HM, Phillips HRP, Settele J, Wall DH, Eisenhauer N. 2019. Global mismatches in aboveground and belowground biodiversity. *Conserv Biol* 33:1331.
237. Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, Anderson JL, Soudzilovskaia NA, Bodegom PM, Bengtsson-Palme J, Anslan S, Coelho LP, Harend H, Huerta-Cepas J, Medema MH, Maltz MR, Mundra S, Olsson PA, Pent M, Põlme S, Sunagawa S, Ryberg M, Tedersoo L, Bork P. 2018. Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 560:233–237.
238. Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannan BJM. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 271:113–122.
239. Charlop-Powers Z, Owen JG, Reddy BVB, Ternei MA, Guimarães DO, de Frias UA, Pupo MT, Seepe P, Feng Z, Brady SF. 2015. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *Elife* 4:1–10.
240. Lemetre C, Maniko J, Charlop-Powers Z, Sparrow B, Lowe AJ, Brady SF. 2017. Bacterial natural product biosynthetic domain composition in soil correlates with changes in latitude on a continent-wide scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:11615–11620.
241. Choudoir MJ, Pepe-Rannek C, Buckley DH. 2018. Diversification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters coincides with lineage divergence in *Streptomyces*. *Antibiot (Basel, Switzerland)* 7.
242. Azman A-S, Othman I, Velu SS, Chan K-G, Lee L-H. 2015. Mangrove rare *actinobacteria*: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Front Microbiol* 6:856.
243. Xu D-B, Ye W-W, Han Y, Deng Z-X, Hong K, Xu D-B, Ye W-W, Han Y, Deng Z-X, Hong K. 2014. Natural products from mangrove actinomycetes. *Mar Drugs* 12:2590–2613.

244. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, Peluso P, Rank D, Baybayan P, Bettman B, Bibillo A, Bjornson K, Chaudhuri B, Christians F, Cicero R, Clark S, Dalal R, Dewinter A, Dixon J, Foquet M, Gaertner A, Hardenbol P, Heiner C, Hester K, Holden D, Kearns G, Kong X, Kuse R, Lacroix Y, Lin S, Lundquist P, Ma C, Marks P, Maxham M, Murphy D, Park I, Pham T, Phillips M, Roy J, Sebra R, Shen G, Sorenson J, Tomaney A, Travers K, Trulson M, Vieceli J, Wegener J, Wu D, Yang A, Zaccarin D, Zhao P, Zhong F, Korf J, Turner S. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323:133–8.
245. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IMJ, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar S V., Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DMD, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara E, Catenazzi M, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo K V., Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov D V., Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang G-D, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Racz C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, vandeVondele S, Verhovskiy Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53–59.
246. Rhoads A, Au KF. 2015. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13:278–289.
247. Zhang X, Davenport KW, Gu W, Daligault HE, Munk AC, Tashima H, Reitenga K, Green LD, Han CS. 2012. Improving genome assemblies by sequencing PCR products with PacBio. *Biotechniques* 53:61–62.
248. Jakubiec-Krzyszniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish J Microbiol* 67:259–272.
249. Yoon TM, Kim JW, Kim JG, Kim WG, Suh JW. 2006. Talosins A and B: New isoflavonol glycosides with potent antifungal activity from *Kitasatospora kifunensis* MJM341. *J Antibiot (Tokyo)* 59:633–639.
250. Choi SU, Lee CK, Hwang Y II, Kinoshita H, Nihira T. 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B1 producer. *Arch Microbiol* 181:294–298.

251. Nara A, Hashimoto T, Komatsu M, Nishiyama M, Kuzuyama T, Ikeda H. 2017. Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in *Actinomycetales* microorganisms. *J Antibiot (Tokyo)* 70:616–624.
252. Aroonsri A, Kitani S, Hashimoto J, Kosone I, Izumikawa M, Komatsu M, Fujita N, Takahashi Y, Shin-ya K, Ikeda H, Nihira T. 2012. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl Environ Microbiol* 78:8015–24.
253. Jin Z, Jin X, Jin Q. 2010. Conjugal transferring of resistance gene *ptr* for improvement of pristinomycin-producing *Streptomyces pristinaespiralis*. *Appl Biochem Biotechnol* 160:1853–1864.
254. Gowan B, Dabbs ER. 1994. Identification of DNA involved in *Rhodococcus* chromosomal conjugation and self-incompatibility. *FEMS Microbiol Lett* 115:45–50.
255. Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, Miklavčič D. 2015. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 33:480–488.
256. Cioni JP, Doroghazi JR, Ju K-S, Yu X, Evans BS, Lee J, Metcalf WW. 2014. Cyanohydrin Phosphonate Natural Product from *Streptomyces regensis*. *J Nat Prod* 77:243–249.
257. Rogers TO, Birnbaum J. 1974. Biosynthesis of fosfomycin by *Streptomyces fradiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 5:121–32.
258. Imai S, SEeto H, Sasaki T, Tsuruoka T, Ogawa H, Satoh A, Inouye S, Niida T, Otake N. 1985. Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293). 6. Production of N-acetyldemethylphosphinothricin and N-acetylbialaphos by blocked mutants of *Streptomyces hygroscopicus* SF-1293 and their roles in the biosynthesis of bialaphos. *J Antibiot (Tokyo)* 38:687–690.
259. Buszewski B, Noga S. 2012. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 402:231–247.
260. Gao J, Ju K-S, Yu X, Velásquez JE, Mukherjee S, Lee J, Zhao C, Evans BS, Doroghazi JR, Metcalf WW, van der Donk WA. 2014. Use of a phosphonate methyltransferase in the identification of the fosfazinomycin biosynthetic gene cluster. *Angew Chemie* 126:1358–1361.
261. Pertusat F, Serpi M, McGuigan C. 2012. Medicinal chemistry of nucleoside phosphonate prodrugs for antiviral therapy. *Antivir Chem Chemother* 22:181–203.
262. Zídek Z, Kmonickova E, Holy A. 2005. Cytotoxicity of pivoxil esters of antiviral acyclic nucleoside phosphonates: Adefovir dipivoxil versus adefovir. *biomed.papers.upol.cz* 149:315–319.
263. Erion MD, Reddy KR, Boyer SH, Matelich MC, Gomez-Galeno J, Lemus RH, Ugarkar BG, Colby TJ, Schanzer J, Poelje PD van. 2004. Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P450 3A-activated prodrugs (HepDirect prodrugs) useful for targeting phosph(ate)-based drugs to the liver.
264. Tillmann HL. 2007. Pradefovir, a liver-targeted prodrug of adefovir against HBV infection. *Curr Opin Investig Drugs* 8:682–690.
265. Beadle JR, Hartline C, Aldern KA, Rodriguez N, Harden E, Kern ER, Hostetler KY. 2002. Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2381–2386.
266. Kern ER, Collins DJ, Wan WB, Beadle JR, Hostetler KY, Quenelle DC. 2004. Oral treatment of murine

- cytomegalovirus infections with ether lipid esters of cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3516–3522.
267. Chimerix announces top-line results from phase 3 SUPPRESS trial of brincidofovir | Chimerix, Inc.
268. Schwartz D, Berger S, Heinzemann E, Muschko K, Welzel K, Wohlleben W. 2004. Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptide from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Appl Environ Microbiol* 70:7093–7102.
269. Eyer L, Nencka R, de Clercq E, Seley-Radtke K, Růžek D. 2018. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses. *Antivir Chem Chemother* 26:1–28.
270. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. 2013. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12:447–464.
271. Ray AS. 2010. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Res* 85:39–58.
272. Maffioli SI, Zhang Y, Degen D, Carzaniga T, Del Gatto G, Serina S, Monciardini P, Mazzetti C, Gugliera P, Candiani G, Chiriac AI, Facchetti G, Kaltfen P, Sahl H-G, Dehò G, Donadio S, Ebricht RH. 2017. Antibacterial nucleoside-analog inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Cell* 169:1240-1248.e23.
273. Balzarini J, Das K, Bernatchez JA, Martinez SE, Ngure M, Keane S, Ford A, Maguire N, Mullins N, John J, Kim Y, Dehaen W, Vande Voorde J, Liekens S, Naesens L, Götte M, Maguire AR, Arnold E. 2015. Alpha-carboxy nucleoside phosphonates as universal nucleoside triphosphate mimics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:3475–3480.
274. Alam MK, Alhazmi A, Decoteau JF, Luo Y, Geyer CR. 2016. RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol* 23:381–391.
275. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291–298.
276. Bandow JE, Brötz H, Leichert LIO, Labischinski H, Hecker M. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother* 47:948–955.
277. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. 2016. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr Pharm Biotechnol* 17:1213–1221.
278. Notingher I, Hench LL. 2006. Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells *in vitro*. *Expert Rev Med Devices* 3:215–234.
279. Garg RP, Parry RJ. 2010. Regulation of valanimycin biosynthesis in *Streptomyces viridifaciens*: characterization of VImI as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP). *Microbiology* 156:472–483.
280. Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, Martín JF. 1997. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol* 179:2053–9.
281. Du D, Katsuyama Y, Onaka H, Fujie M, Satoh N, Shin-ya K, Ohnishi Y. 2016. Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem* 17:1464–1471.

7 Anhang

7.1 Liste der Isolate von Lombok

Nr.	Methode	Probe	Sammelstelle	Inhibitionszonen auf Agarplatten in mm				
				<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1 (I1)	ohne Vorbehandlung	Seesand	Cemara Strand, West- Lombok	0	14,0	23,0	30,0	31,0
2	ohne Vorbehandlung	Seesand	Cemara Strand, West- Lombok	0	0	9,5	0	11,5
3	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd- Lombok	0	0	14,5	16,0	12,0
4	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd- Lombok	0	0	0	0	0
5 (I2)	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd- Lombok	0	0	20,0	13,0	21,0
6	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Cemara Strand, West- Lombok	0	0	0	0	0
7	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Cemara Strand, West- Lombok	0	0	0	0	0
8 (I3)	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	11,5	26,5	26,5	31,0
9	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
10	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
11	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
14	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
15	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	11,0	11,5	12,5
16 (I4)	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	20,5	18,5	21,5
17	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
18 (I5)	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	9,5	0	20,5	17,0	19,5
19 (I6)	ohne Vorbehandlung	Mangroven- sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	14,0	15,0	17,0
20 (I7)	ohne Vorbehandlung	Mangrovens ediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	19,0	15,0	20,0

				Inhibitionszonen auf Agarplatten in mm				
Nr.	Methode	Probe	Sammelstelle	<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
21	ohne Vorbehandlung	Mangroven-sediment	Tanjung Kelor Strand, Ost-Lombok	0	0	0	0	0
22	ohne Vorbehandlung	Mangroven-sediment	Cemara Strand, West-Lombok	0	0	12,0	14,0	17,0
23	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd-Lombok	0	0	0	0	0
25	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd-Lombok	0	0	0	0	0
26 (18)	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd-Lombok	0	0	17,5	13,0	15,0
27 (19)	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd-Lombok	0	0	19,0	14,5	16,5
28	ohne Vorbehandlung	Seesand	Kuta Strand, Süd-Lombok	0	0	0	0	0
29	Trockenhitze	Erde unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	13,5	15,5
30 (10)	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	23,0	22,0	23,5
31	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
32	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
33	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	18,0	17,0	15,0
34	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	10,0	0	0
35	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	24,0	20,0	25,0
36	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
37	Trockenhitze	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	15,0	17,0	18,0
38	Trockenhitze	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
39	Trockenhitze	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
40	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
41	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0

Nr.	Methode	Probe	Sammelstelle	Inhibitionszonen auf Agarplatten in mm				
				<i>C. albicans</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
42	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
43	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
44	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
45	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
46	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
47	Trockenhitze	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
48	SDS-Hefe	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
49	SDS-Hefe	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
50	SDS-Hefe	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	12,5	0	0
51	SDS-Hefe	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	16,0	0	0
52	SDS-Hefe	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	0	0	0
53	SDS-Hefe	Erde unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	0	14,0	0	0
54	SDS-Hefe	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	12,0	11,0	0	0
55	SDS-Hefe	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	12,0	11,0	12,0	0
56	SDS-Hefe	Laub unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	11,0	11,0	0	0
57	SDS-Hefe	Laub unter Kakaobaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	12,0	0	0	0
58	SDS-Hefe	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	11,0	12,0	0	10,0
59	SDS-Hefe	Erde unter Kaffeebaum	Dorf Genggelang, Nord-Lombok	0	12,0	11,0	0	10,0

7.2 AntiSMASH Output der sequenzierten indonesischen Stämme

Tü4097

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record unknown:				
Cluster 1	T1pks	1	45129	-
Cluster 2	Lantipeptide-Nrps-T1pks	37987	102042	Antimycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 3	T1pks	97799	251419	FR-008_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 4	T3pks	257952	299019	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (12% of genes show similarity)
Cluster 5	Terpene-Bacteriocin	414123	447850	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (54% of genes show similarity)
Cluster 6	Ectoine	1200940	1211338	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 7	Siderophore	2165112	2176932	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 8	Nrps	2413440	2457789	-
Cluster 9	Nrps	2940555	3046160	Mannoheptimycin_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)
Cluster 10	Nrps	3299535	3349573	Scabichelin_biosynthetic_gene_cluster (40% of genes show similarity)
Cluster 11	Otherks-Amglyccyl-Butyrolactone	3655060	3717092	Pactamycin_biosynthetic_gene_cluster (20% of genes show similarity)
Cluster 12	Lantipeptide	4148330	4170915	SAL-2242_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 13	Thiopeptide	4471331	4503796	-
Cluster 14	Terpene	4996612	5017586	-
Cluster 15	Terpene	5328228	5350513	Kanamycin_biosynthetic_gene_cluster (1% of genes show similarity)
Cluster 16	Siderophore	5598530	5613566	-
Cluster 17	Nrps	5683212	5746328	Desotamide_biosynthetic_gene_cluster (18% of genes show similarity)
Cluster 18	Bacteriocin	5986306	5997337	Ansatrienin_(mycotrienin)_biosynthetic_gene_cluster (7% of genes show similarity)
Cluster 19	Otherks	6166614	6207663	Avermectin_biosynthetic_gene_cluster (66% of genes show similarity)
Cluster 20	Bacteriocin	6453591	6463806	-
Cluster 21	Terpene	6529455	6556019	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (69% of genes show similarity)
Cluster 22	Nrps-T1pks	6590931	6640341	SGR_PTMs_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 23	Nrps	6792483	6853009	Lividomycin_biosynthetic_gene_cluster (6% of genes show similarity)
Cluster 24	Terpene	6847477	6869504	-

Tü4100

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record unknown:				
Cluster 1	Otherks-T2pks-T1pks	104973	185107	Cinerubin_B_biosynthetic_gene_cluster (31% of genes show similarity)
Cluster 2	Otherks	217164	263382	-
Cluster 3	Nrps	461995	512694	Coelichelin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 4	Bacteriocin	778348	788563	Informatipeptin_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity)
Cluster 5	Terpene	1021748	1047252	Isorenieratene_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 6	Terpene	1214284	1241019	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (92% of genes show similarity)
Cluster 7	Lantipeptide	1315548	1338187	SapB_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 8	T1pks-Siderophore	1872513	1988999	Lipomycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 9	Terpene	2148230	2170440	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 10	Bacteriocin	2182183	2193499	-
Cluster 11	Nrps	2313666	2403996	Laspartomycin_biosynthetic_gene_cluster (53% of genes show similarity)
Cluster 12	T2pks	2405975	2448466	Fluostatin_biosynthetic_gene_cluster (20% of genes show similarity)
Cluster 13	Siderophore	2522715	2533968	-
Cluster 14	T2pks	3041702	3084243	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (66% of genes show similarity)
Cluster 15	Terpene	3147151	3168164	Albaflavenone_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 16	Siderophore	5616625	5628403	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 17	Melanin	5715383	5725952	Melanin_biosynthetic_gene_cluster (60% of genes show similarity)
Cluster 18	Ectoine	6664701	6675099	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)
Cluster 19	T3pks	7393683	7434807	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)
Cluster 20	Nrps	7439651	7484220	Meridamycin_biosynthetic_gene_cluster (10% of genes show similarity)
Cluster 21	T1pks	7679351	7778496	Vicenistatin_biosynthetic_gene_cluster (60% of genes show similarity)
Cluster 22	Other	7932508	7973395	-
Cluster 23	Nrps	8102815	8149218	Paenibactin_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 24	Terpene	8165265	8189311	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (45% of genes show similarity)
Cluster 25	Indole	8238689	8259816	Ravidomycin_biosynthetic_gene_cluster (5% of genes show similarity)
Cluster 26	Nrps	8505724	8558066	Coelibactin_biosynthetic_gene_cluster (90% of genes show similarity)

Tü4103

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record unknown:				
Cluster 1	Terpene	57909	82551	Isorenieratene_biosynthetic_gene_cluster (85% of genes show similarity)
The following clusters are from record unknown_1:				
Cluster 2	Nrps	653669	733074	Fuscachelin_biosynthetic_gene_cluster (88% of genes show similarity)
Cluster 3	Ectoine-Bacteriocin-Otherks-T1pks	803539	895504	Oligomycin_biosynthetic_gene_cluster (38% of genes show similarity)
Cluster 4	Terpene	1698599	1725042	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (61% of genes show similarity)
Cluster 5	T1pks-Nrps	1724369	1778216	Microsclerodermins_biosynthetic_gene_cluster (14% of genes show similarity)
Cluster 6	T3pks	1776696	1817688	Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 7	Bacteriocin	1874620	1885420	-
Cluster 8	Nrps	2848511	2903728	Laspartomycin_biosynthetic_gene_cluster (16% of genes show similarity)
Cluster 9	Phosphonate	3383515	3424408	Rhizoctin_biosynthetic_gene_cluster (9% of genes show similarity)
Cluster 10	Indole	3759541	3780560	-
Cluster 11	Lantipeptide-Ladderane	4184567	4226092	-
Cluster 12	Butyrolactone-T1pks-Nrps-Lantipeptide-Bacteriocin	4500306	4575054	Delftibactin_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity)
Cluster 13	Terpene	4582102	4604294	Bleomycin_biosynthetic_gene_cluster (6% of genes show similarity)
Cluster 14	Siderophore	5390880	5406348	-
Cluster 15	Bacteriocin	5583939	5594778	-
Cluster 16	Nrps-T1pks	6016448	6100163	Kedarcidin_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)
Cluster 17	Other	6298846	6342661	Daptomycin_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 18	Otherks-Butyrolactone	6371481	6414017	Streptomycin_biosynthetic_gene_cluster (2% of genes show similarity)
Cluster 19	Lantipeptide-Terpene	6410327	6456432	Ravidomycin_biosynthetic_gene_cluster (5% of genes show similarity)
Cluster 20	Lantipeptide	6570836	6593412	-
Cluster 21	Nrps	6772602	6850405	Lobosamide_biosynthetic_gene_cluster (10% of genes show similarity)
Cluster 22	Nrps	6870743	6918627	Chloramphenicol_biosynthetic_gene_cluster (23% of genes show similarity)
Cluster 23	Terpene	7302661	7323596	-
Cluster 24	Terpene	7330326	7351615	2-methylisoborneol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 25	T2pks	7564711	7607193	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)
Cluster 26	Nrps	7771399	7864749	Pristinamycin_biosynthetic_gene_cluster (7% of genes show similarity)

Tü4106

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record unknown:				
Cluster 1	Bacteriocin	369174	379389	Informatipeptin_biosynthetic_gene_cluster (57% of genes show similarity)
Cluster 2	Terpene	720509	747202	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (76% of genes show similarity)
Cluster 3	Nrps	1104196	1185339	Daptomycin_biosynthetic_gene_cluster (6% of genes show similarity)
Cluster 4	Siderophore	1252724	1265881	Grincamycin_biosynthetic_gene_cluster (8% of genes show similarity)
Cluster 5	Terpene-T1pks	1423458	1480275	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 6	Bacteriocin	1486532	1497842	-
Cluster 7	T1pks	1520280	1564020	Enduracidin_biosynthetic_gene_cluster (14% of genes show similarity)
Cluster 8	Nrps	1701162	1785197	Friulimicin_biosynthetic_gene_cluster (69% of genes show similarity)
Cluster 9	Terpene	2409925	2431016	Albaflavenone_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 10	Siderophore	4695586	4707358	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 11	Nrps	5087848	5137240	SCO-2138_biosynthetic_gene_cluster (64% of genes show similarity)
Cluster 12	Ectoine	5764600	5774998	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)
Cluster 13	T2pks	6619977	6662486	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 14	Otherks-T1pks	6683989	6732087	Arsenopolyketides_biosynthetic_gene_cluster (87% of genes show similarity)
Cluster 15	Terpene	6923618	6947705	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (54% of genes show similarity)
Cluster 16	T3pks	7139443	7180581	Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 17	Lantipeptide	7218417	7250578	-
Cluster 18	Otherks-T2pks	7270078	7340939	Granaticin_biosynthetic_gene_cluster (27% of genes show similarity)

I3

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record contig1:				
Cluster 1	Siderophore	88220	101458	Grincamycin_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)
Cluster 2	Terpene	232840	254996	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 3	Bacteriocin	279626	291143	-
Cluster 4	Terpene	1163607	1184698	Albaflavone_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 5	Lasso peptide	2081945	2104436	SSV-2083_biosynthetic_gene_cluster (37% of genes show similarity)
Cluster 6	Siderophore	3421799	3433571	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 7	Ectoine	4421230	4431628	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig2:				
Cluster 8	T2pks	262553	305062	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 9	Terpene	500345	521349	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (45% of genes show similarity)
Cluster 10	T3pks	712540	753676	Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 11	Otherks-T1pks-Nrps	935378	1053904	Naphthyridinomycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig3:				
Cluster 12	Terpene	331313	358008	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (84% of genes show similarity)
Cluster 13	T1pks-Otherks	613438	680946	Nataxazole_biosynthetic_gene_cluster (59% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig4:				
Cluster 14	Bacteriocin	50096	60311	Informatipeptin_biosynthetic_gene_cluster (57% of genes show similarity)
Cluster 15	Butyrolactone-T1pks-Ectoine-Nrps	333920	475808	Polyoxypeptin_biosynthetic_gene_cluster (48% of genes show similarity)
Cluster 16	Amglyccycl	523665	544921	Cetoniacytone_A_biosynthetic_gene_cluster (12% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig6:				
Cluster 17	Other	1	2925	-

I4

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record contig1:				
Cluster 1	Terpene	269111	295807	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (92% of genes show similarity)
Cluster 2	Siderophore	718451	731690	Grincamycin_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)
Cluster 3	Terpene	863120	885276	Herboxidiene_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 4	Bacteriocin	909909	921219	-
Cluster 5	Terpene	1794205	1815296	Albaflavone_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig2:				
Cluster 6	Lasso peptide	418679	441172	SSV-2083_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)
Cluster 7	Lantipeptide	1248555	1271227	Venezuelin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 8	Siderophore	1759030	1770802	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig3:				
Cluster 9	T2pks	1	38373	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 10	Ectoine	896220	906618	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 11	Nrps	1499068	1548546	SCO-2138_biosynthetic_gene_cluster (64% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig4:				
Cluster 12	Lantipeptide	149650	172307	SAL-2242_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 13	Amglyccycl	182862	204118	Cetoniacytone_A_biosynthetic_gene_cluster (12% of genes show similarity)
Cluster 14	Nrps-Ectoine-T1pks-Lantipeptide-Butyrolactone-Otherks	252001	528929	Naphthyridinomycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 15	T3pks	710774	751910	Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 16	Terpene	940076	964196	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (54% of genes show similarity)
The following clusters are from record contig5:				
Cluster 17	T1pks-Otherks	1	52571	Nataxazole_biosynthetic_gene_cluster (48% of genes show similarity)
Cluster 18	Bacteriocin	169676	179891	Informatipeptin_biosynthetic_gene_cluster (57% of genes show similarity)
Cluster 19	Ectoine	468623	479021	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)

I5

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record I5_1_1:				
Cluster 1	T3pks	1037	42110	Alkylresorcinol_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 2	Terpene	250706	274829	Carotenoid_biosynthetic_gene_cluster (54% of genes show similarity)
Cluster 3	T2pks	470558	513067	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (83% of genes show similarity)
Cluster 4	Ectoine	1406481	1416879	Ectoine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 5	Nrps	2010420	2059725	SCO-2138_biosynthetic_gene_cluster (64% of genes show similarity)
Cluster 6	Siderophore	2403321	2415093	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 7	Lantipeptide	2915702	2938374	Venezuelin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 8	Lasso peptide	3815556	3838049	SSV-2083_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity)
Cluster 9	Terpene	4731042	4752133	Albaflavone_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 10	Bacteriocin	5639340	5650650	-
Cluster 11	Terpene	5675287	5697443	Herboxidene_biosynthetic_gene_cluster (2% of genes show similarity)
Cluster 12	Siderophore	5829297	5842536	Grincamycin_biosynthetic_gene_cluster (11% of genes show similarity)
Cluster 13	T2pks	6096810	6139331	Resistomycin_biosynthetic_gene_cluster (88% of genes show similarity)
Cluster 14	Terpene	6295899	6322595	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (92% of genes show similarity)
Cluster 15	Bacteriocin	6669734	6679949	Informatipeptin_biosynthetic_gene_cluster (57% of genes show similarity)
Cluster 16	Butyrolactone-T1pks-Ectoine-Nrps	6979529	7114110	Polyoxypeptin_biosynthetic_gene_cluster (48% of genes show similarity)

I6

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster
The following clusters are from record I6_1_1:				
Cluster 1	Indole	2931	26195	Staurosporine_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 2	Nrps	52744	110732	Scabichelin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 3	Terpene	110904	180252	Stenothricin_biosynthetic_gene_cluster (13% of genes show similarity)
Cluster 4	T2pks-Siderophore	350089	401853	Spore_pigment_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)
Cluster 5	Siderophore	2192088	2203869	Desferrioxamine_B_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 6	Thiopeptide	2369431	2398750	-
Cluster 7	Phosphonate-Nrps	2647952	2707241	Stenothricin_biosynthetic_gene_cluster (9% of genes show similarity)
Cluster 8	Other	3878454	3921357	Phosphonoglycans_biosynthetic_gene_cluster (3% of genes show similarity)
Cluster 9	Other	4671363	4713540	Stenothricin_biosynthetic_gene_cluster (13% of genes show similarity)
Cluster 10	Siderophore	5243149	5257109	-
Cluster 11	Nrps	5321778	5390215	Echinomycin_biosynthetic_gene_cluster (88% of genes show similarity)
Cluster 12	Bacteriocin	5486135	5497325	-
Cluster 13	T3pks	5579797	5620873	Flaviolin_biosynthetic_gene_cluster (75% of genes show similarity)
Cluster 14	Terpene	5678250	5706747	Isorenieratene_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 15	Linaridin	5891142	5911798	Nogalamycin_biosynthetic_gene_cluster (30% of genes show similarity)
Cluster 16	Bacteriocin	6077717	6089720	Paromomycin_biosynthetic_gene_cluster (5% of genes show similarity)
Cluster 17	Terpene	6194753	6221437	Hopene_biosynthetic_gene_cluster (61% of genes show similarity)
Cluster 18	T1pks-Nrps	6297498	6378684	Tirandamycin_biosynthetic_gene_cluster (100% of genes show similarity)
Cluster 19	Melanin	6403982	6414404	Melanin_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity)
Cluster 20	Thiopeptide	6454419	6490122	-
Cluster 21	T3pks-Fused-Lantipeptide-T1pks-Otherks	6663094	6793199	Pheganomycin_biosynthetic_gene_cluster (52% of genes show similarity)
Cluster 22	Other	6807638	6850880	Lipstatin_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity)

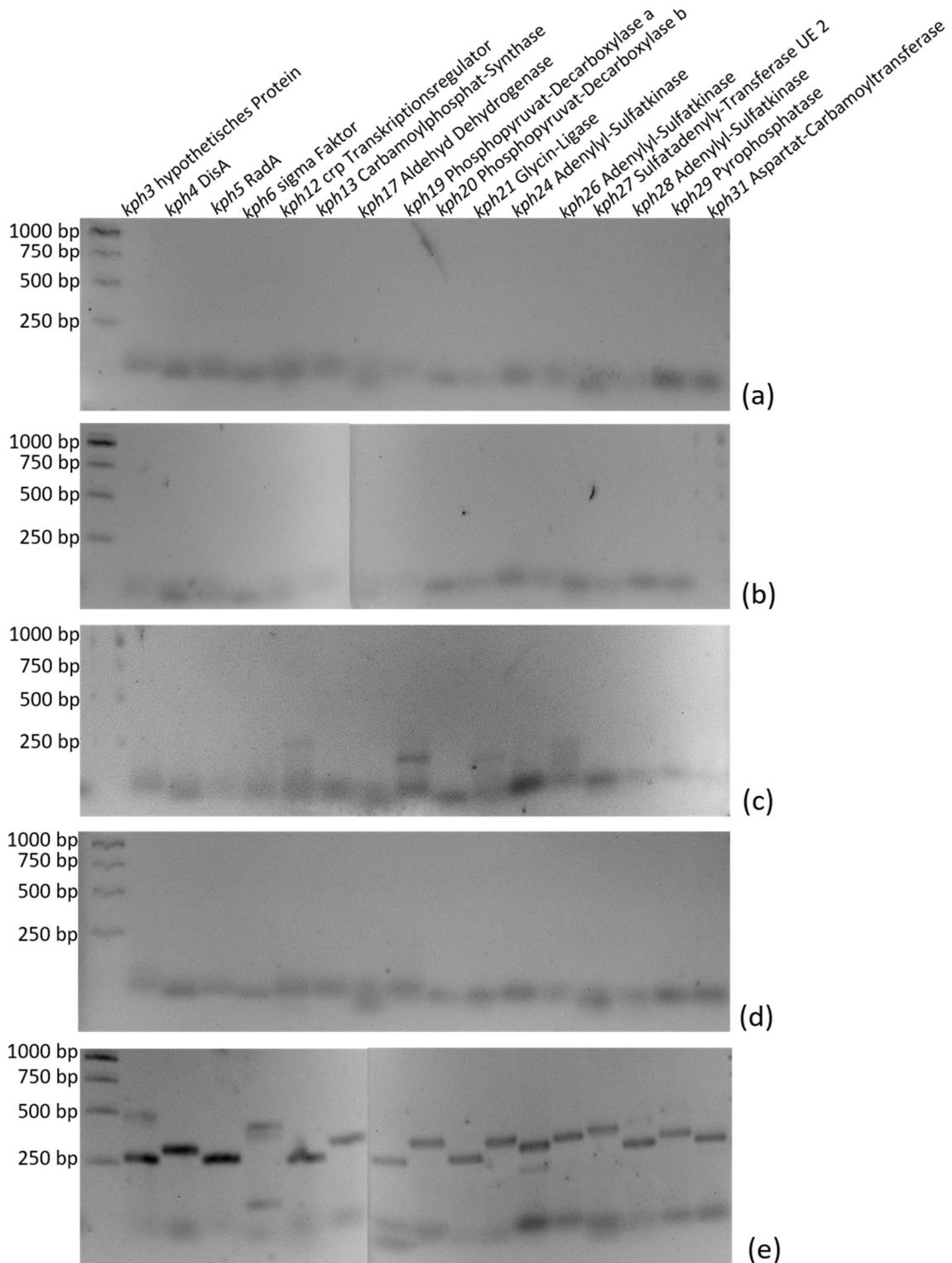
7.3 Abgeleitete Funktionen der *orfs* des Phosphonat-Clusters von Tü4103 gemäß einer Analyse mit BlastP und BlastX

<i>orf</i>	abgeleitetes Genprodukt	postulierte Funktion	Identität in % zu					
			<i>Streptomyces</i> sp. 4121.5	<i>K.</i> <i>phosalacinea</i>	<i>K. setae</i>	<i>K.</i> <i>cheerisanensis</i>	<i>Streptomyces</i> sp. 31A4	<i>Streptomyces</i> sp. MMG1121
<i>kph-25</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	87	83	79	-	-
<i>kph-24</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	92	87	85	-	-
<i>kph-23</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	97	95	94	-	-
<i>kph-22</i>	NADH-Quinon Oxidoreduktase Untereinheit D	Energiemetabolismus	100	98	98	96	-	-
<i>kph-21</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	99	90	-	85	-	-
<i>kph-20</i>	Sensor Histidin Kinase	Regulation	100	92	89	-	-	-
<i>kph-19</i>	Response-Regulator Transkriptionsfaktor	Regulation	100	97	97	-	-	-
<i>kph-18</i>	DUF2520 -Domäne enthaltendes Protein	unbekannte Funktion	99	96	95	94	-	-
<i>kph-17</i>	Pantoat- β -Alanin Ligase	Biosynthese	-	95	94	93	-	-
<i>kph-16</i>	Aspartat-1-Decarboxylase	Biosynthese	-	99	98	97	-	-
<i>kph-15</i>	L-Aspartat Oxidase	Biosynthese	100	94	95	93	-	-
<i>kph-14</i>	L-Aspartat Oxidase	Biosynthese	100	97	96	93	-	-
<i>kph-13</i>	Typ III Pantothenat Kinase	Biosynthese	100	99	-	-	-	-
<i>kph-12</i>	bifunktionale Lysylphosphatidylglycerol Synthetase Lysine-tRNA Ligase LysX	Biosynthese	100	95	94	94	-	-
<i>kph-11</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	-	93	97	-	-
<i>kph-10</i>	Transkriptionsregulator der Blal-Familie/hypothetisches Protein	Regulation	100	98	98	98	-	-
<i>kph-9</i>	Aminosäuren-N-Acetyltransferase	Resistenz	100	97	98	97	-	-
<i>kph-8</i>	Protein der Lsr2-Familie	Regulation	100	88	87	85	-	-
<i>kph-7</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	91	90	84	-	-
<i>kph-6</i>	ATP-abhängige Clp Protease ATP-Bindeuntereinheit	Regulation	100	100	99	99	-	-
<i>kph-5</i>	Immuninhibitor A	unbekannte Funktion	100	93	91	91	-	-
<i>kph-4</i>	Threonine Aldolase	Biosynthese	100	91	88	85	-	-
<i>kph-3</i>	Peptidase M23-ähnliches Protein	unbekannte Funktion	87	98	67	89	-	-
<i>kph-2</i>	(TetR Regulator) <i>acrAB</i> Operon Repressor (hypothetisch)	Regulation	100	94	91	89	-	-

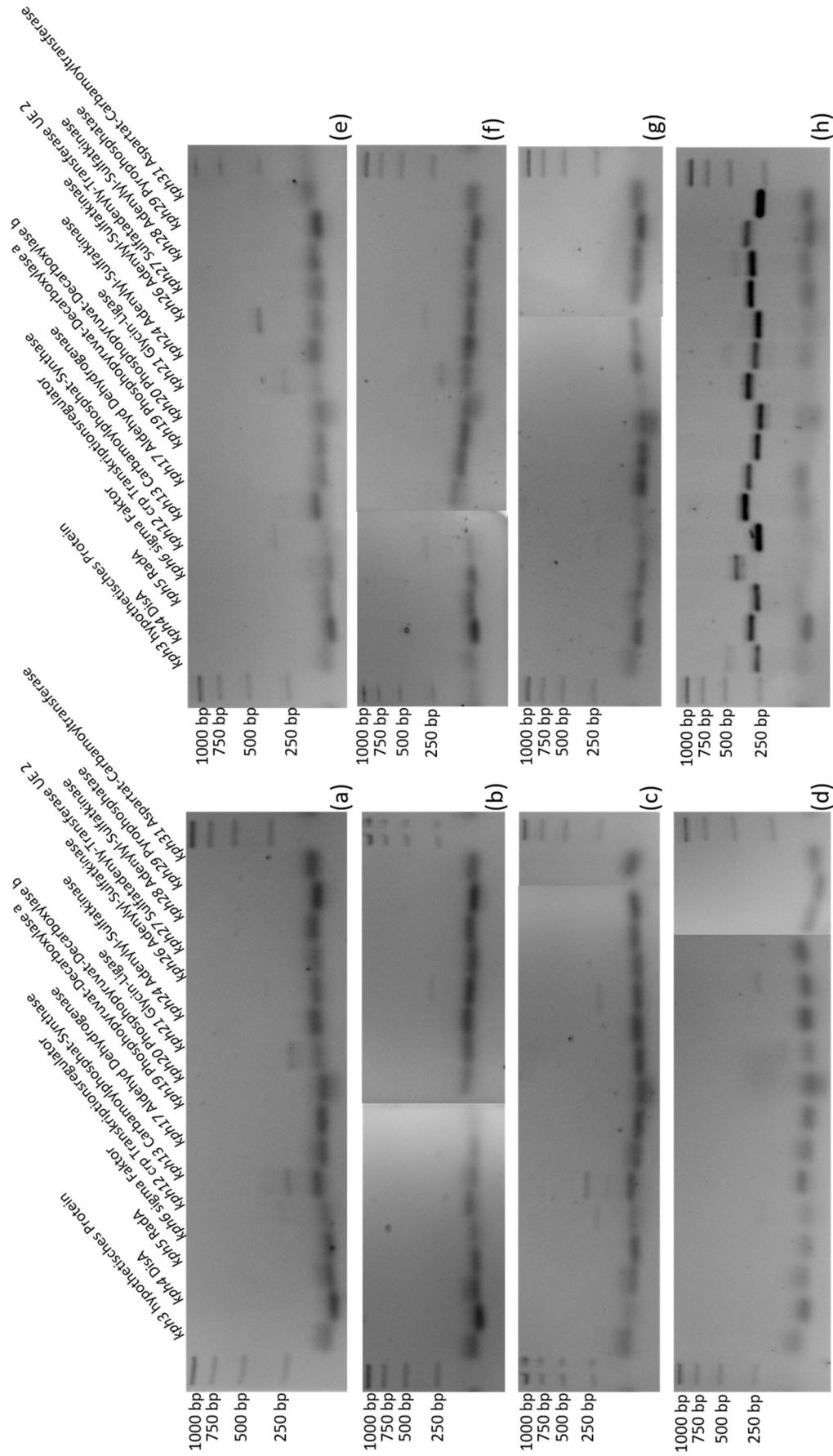
orf	abgeleitetes Genprodukt	postulierte Funktion	Identität in % zu					
			<i>Streptomyces</i> sp. 4121.5	<i>K.</i> <i>phosalacinea</i>	<i>K. setae</i>	<i>K.</i> <i>cheerisanensis</i>	<i>Streptomyces</i> sp. 31A4	<i>Streptomyces</i> sp. MMG1121
<i>kph-1</i>	Multidrug-Efflux Transporter 3	Transport/Resistenz	100	93	92	93	-	-
<i>kph1</i>	A-/G-spezifische Adenin Glykosylase	Resistenz	99	95	95	93	-	-
<i>kph2</i>	Rhombosortase (Rhomboidfamilie, intramembrane Serin Protease)	unbekannte Funktion	99	80	75	74	-	-
<i>kph3</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	99	81	80	70	-	-
<i>kph4</i>	DNA- Integrität scannendes Protein DisA	Resistenz	99	-	99	-	-	-
<i>kph5</i>	DNA Reparaturprotein RadA	Resistenz	100	96	95	93	-	-
<i>kph6</i>	RNA Polymerase Sigma-Faktor-Untereinheit (hypothetisch)	Resistenz	98	86	84	-	-	-
<i>kph7</i>	ATP Synthase Untereinheit (hypothetisch)	Resistenz	99	86	83	78	-	-
<i>kph8</i>	NADH-Flavin Reduktase (hypothetisch)	Biosynthese	99	87	88	82	-	-
<i>kph9</i>	Kurzkettendehydrogenase (3-Oxoacyl-ACP Reduktase)	Biosynthese	100	-	-	-	-	-
<i>kph10</i>	TetR Regulator	Regulation	99	-	-	-	-	-
<i>kph11</i>	Farnesyldiphosphat Synthase (Polyprenyl Synthetase)	Biosynthese	99	92	91	87	-	-
<i>kph12</i>	Transkriptionsregulator, Crp (Crp/Fnr Transkriptionsregulatorfamilie)	Regulation	99	92	91	87	-	-
<i>kph13</i>	Carbamoylphosphat Synthase ähnliches Protein (ATP-Grasp Domänen Protein)	Pyrimidin-Biosynthese	98	92	87	86	-	-
<i>kph14</i>	Methylierte DNA-Protein-Cystein Methyltransferase	Resistenz	98	87	83	80	-	-
<i>kph15</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	100	85	91	66	-	-
<i>kph16</i>	Ionenkanalprotein (Chlorid-Tunnelzentrum, hypothetisch)	Transport	98	88	90	-	-	-
<i>kph17</i>	Aldehyd Dehydrogenase	Biosynthese	99	-	-	-	82	82
<i>kph18</i>	Phosphoenolpyruvat-Mutase	Phosphonat-Biosynthese	100	-	-	-	84	86
<i>kph19</i>	Phosphonopyruvat-Decarboxylase, β -Untereinheit	Phosphonat-Biosynthese	99	-	79	-	85	84
<i>kph20</i>	Phosphonopyruvat-Decarboxylase, α -Untereinheit	Phosphonat-Biosynthese	99	-	76	-	89	89
<i>kph21</i>	Phosphoribosylamin-Glycin Ligase; Glycinamid	Purin-Biosynthese	99	-	-	-	78	79

orf	abgeleitetes Genprodukt	postulierte Funktion	Identität in % zu					
			<i>Streptomyces</i> sp. 4121.5	<i>K.</i> <i>phosalacinea</i>	<i>K. setae</i>	<i>K.</i> <i>cheerisanensis</i>	<i>Streptomyces</i> sp. 31A4	<i>Streptomyces</i> sp. MMG1121
	Ribonukleotid Synthetase (hypothetisch)							
<i>kph22</i>	Taurin Metabolismus Dioxxygenase TauD (hypothetisch)	unbekannte Funktion	99	-	-	-	85	86
<i>kph23</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	99	-	-	-	81	80
<i>kph24</i>	Adenylylsulfat Kinase	Purin-Biosynthese	99	-	-	-	48	52
<i>kph25</i>	Natrium/Wasserstoff Austauscher	Transport	100	-	-	-	72	73
<i>kph26</i>	Sulfat Adenylyltransferase Untereinheit 1	Purin-Biosynthese	99	93	-	-	92	94
<i>kph27</i>	Sulfat Adenylyltransferase Untereinheit 2	Purin-Biosynthese	97	95	-	-	94	94
<i>kph28</i>	Adenylylsulfat Kinase	Resistenz/Purin-Biosynthese	95	82	-	-	82	82
<i>kph29</i>	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat Phosphatase	Purin-Biosynthese	98	-	-	-	73	74
<i>kph30</i>	Permease	Transport	100	-	-	-	76	77
<i>kph31</i>	Aspartat-/Ornithin-Carbamoyltransferase	Resistenz/Pyrimidin / Purin-Biosynthese	100	-	81	-	86	88
<i>kph32</i>	Hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	99	-	-	-	76	70
<i>kph33</i>	Taurin Metabolismus Dioxxygenase TauD (hypothetisch)	Biosynthese	99	-	-	-	81	82
<i>kph34</i>	TPR Domäne enthaltenes Protein	unbekannte Funktion	99	-	-	-	85	85
<i>kph35</i>	Prolyl-Oligopeptidase Proteinfamilie	unbekannte Funktion	99	-	-	-	70	71
<i>kph36</i>	Histidinol-Phosphate Aminotransferase	Biosynthese	99	-	-	-	76	77
<i>kph37</i>	(Phenylacetat) CoA-Ligase	Biosynthese	96	-	-	-	67	68
<i>kph38</i>	MerR Transkriptionsregulator (hypothetisch)	Regulation	100	-	-	-	59	55
<i>kph39</i>	Hypothetisches Protein	Regulation	100	-	-	-	59	55
<i>kph40</i>	Hypothetisches Helix-Turn-Helix Motiv	Regulation	100	-	-	-	89	89
<i>kph41</i>	Hypothetisches Helix-Turn-Helix Motiv	Regulation	100	-	-	-	76	76
<i>kph42</i>	Pyrophosphatase der NUDIX-Familie	Resistenz	97	-	-	-	71	67
<i>kph43</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	-	58	57	-	-	-
<i>kph44</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	-	59	-	-	-	-
<i>kph45</i>	hypothetisches Protein	unbekannte Funktion	-	59	-	-	-	-

7.4 Gelbilder zur Analyse der Transkription des Phosphonat-Clusters



RT-PCR der Kulturen von Tü4103 ohne Aktivität gegen *E. coli* WM6242. (a) bis (d) zeigen jeweils die in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennten RT-PCR-Ansätze der Kulturen 8 bis 11. (e) gDNA-Kontrolle.



RT-PCR der Kulturen von Tü4103 mit Aktivität gegen *E. coli* WM6242. (a) bis (g) zeigen jeweils die in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennten RT-PCR-Ansätze der Kulturen 1 bis 7. (h) gDNA-Kontrolle.

7.5 ARTS-Output der Analyse des Phosphonat-Clusters von Tü4103 (Auszug)

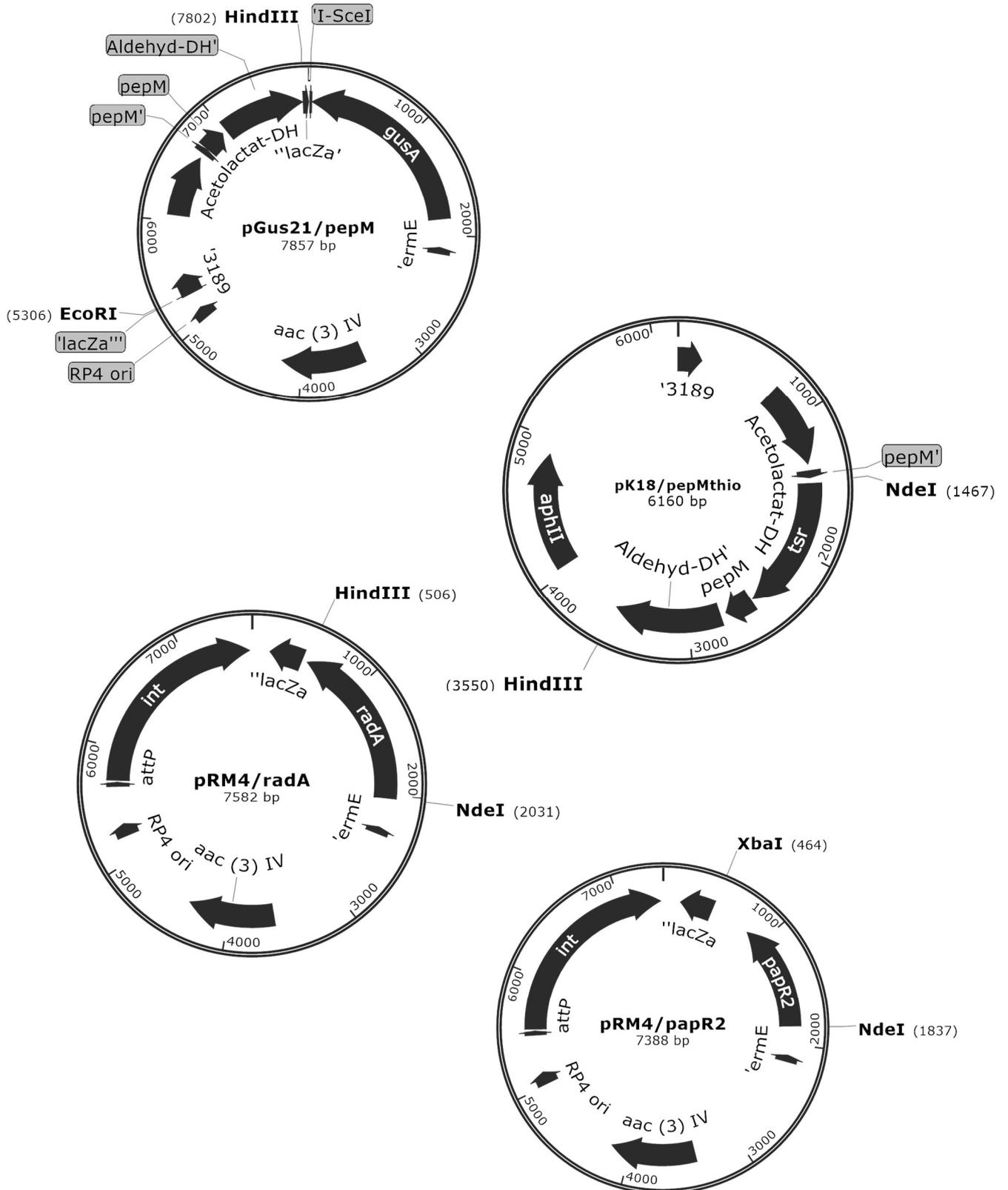
+	Gene	Description	Function	U	D	B	P	R
+	TIGR00416	sms: DNA repair protein RadA	DNA metabolism	0.9053	✗	✓	✗	✗
+	Gene	Description	Function	U	D	B	P	R
+	TIGR00455	apsK: adenylyl-sulfate kinase	Central intermediary metabolism	0.4842	✓	✓	✗	✗
+	Gene	Description	Function	U	D	B	P	R
+	TIGR00670	asp_carb_tr: aspartate carbamoyltransferase	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	0.9842	✗	✓	✗	✓
-	cluster-8	phosphonate	scaffold_1	3383514 - 3424408	3	1		



Biosynthetic
 Transport
 Regulatory
 Other
 DUF
 Core
 ResModel
 CoreRes

Sequence id	Location (start-end)	Type	Gene	Description	Function
3308	3412806 - 3413361	@core	TIGR00455	apsK: adenylyl-sulfate kinase	Central intermediary metabolism
3285	3387542 - 3389063	@core	TIGR00416	sms: DNA repair protein RadA	DNA metabolism
3311	3416681 - 3417728	@core	TIGR00670	asp_carb_tr: aspartate carbamoyltransferase	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides
3311	3416681 - 3417728	CoreRes	PF00185.19	OTCace: Aspartate/ornithine carbamoyltransferase, Asp/Orn binding domain	N/A

7.6 Plasmidkarten



7.7 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ANI	<i>average nucleotide identity</i>
BGC	<i>biosynthetic gene cluster</i> , Biosynthesegencluster
deion	deionisiert
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assays</i>
EtBr	Ethidiumbromid
Fe-PcTs	Fe-Phthalocyanin-Tetrasulfonsäure
GBDP	<i>Genome Blast Distance Phylogeny</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
NRPS	<i>non-ribosomal peptide synthase</i> , nicht-ribosomale Peptid-Synthase
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PepM	Phosphoenolpyruvat-Mutase
PKS	<i>polyketide synthase</i> , Polyketid-Synthase
PnPyD	Phosphonopyruvat-Decarboxylase
PPT	Phosphinothricintri-peptid
RBS	<i>ribosomal binding site</i> , Ribosomen-Bindestelle
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SAM	<i>S-Adenosyl-Methionin</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
T _m	Schmelztemperatur
ü/N	über Nacht
WHO	<i>world health organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure

7.8 Publikation

Janina Krause, Shanti Ratnakomala, Puspita Lisdiyanti, Regina Ort-Winklbauer, Wolfgang Wohlleben, Yvonne Mast. Complete genome sequence of the putative phosphonate producer *Streptomyces* sp. I6 isolated from Indonesian mangrove sediment. *Microbiol. Resourc. Announc.* 8, 4 (2019).

DOI: 10.1128/MRA.01580-18

Eigenanteil

Die Bodenproben wurde von S. Ratnakomala und P. Lisdiyanti genommen. Ich habe den Stamm nach Protokollen von S. Ratnakomala und P. Lisdiyanti isoliert und R. Ort-Winklbauer hat die genomische DNA extrahiert. Die PacBio-Sequenzierung wurde von der Firma Macrogen, Südkorea, durchgeführt. Die bioinformatischen Analysen wurden von mir vorgenommen. Die Publikation wurde von mir und Y. Mast verfasst und von W. Wohlleben korrekturgelesen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Streptomyces sp. I6 wurde aus einer indonesischen Mangrovensedimentprobe, die vom Tanjung Kelor Strand, Sekotong, West Lombok, Indonesien stammt, isoliert. Die Gesamtgenomsequenzierung wurde mit der PacBioRSII-Sequenzierertechnologie (20 kb *library*) durchgeführt. Taxonomische Analysen mit EzTaxon und autoMLST ergaben, dass I6 den Streptomyceten zuzuordnen ist. Eine anschließende bioinformatische Analyse mit dem Webtool AntiSMASH ergab 23 potenzielle BGCs darunter ein potenzielles Phosphonat-NRPS-Hybrid-Cluster. Das essenzielle Gen zur Phosphonat-Biosynthese, *pepM*, ist in diesem Cluster vorhanden. Die Gesamtgenomsequenz wurde bei DDBJ/ENA/GenBank unter der Zugriffsnummer RHDP00000000 hinterlegt.



Complete Genome Sequence of the Putative Phosphonate Producer *Streptomyces* sp. Strain I6, Isolated from Indonesian Mangrove Sediment

Janina Krause,^a Shanti Ratnakomala,^b Puspita Lisdiyanti,^b Regina Ort-Winklbauer,^a Wolfgang Wohlleben,^{a,c} Yvonne Mast^{a,c}

^aDepartment of Microbiology/Biotechnology, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, Faculty of Science, Eberhard Karls University of Tübingen, Tübingen, Germany

^bResearch Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI), Cibinong, Indonesia

^cGerman Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Tübingen, Tübingen, Germany

ABSTRACT *Streptomyces* sp. strain I6 is a novel strain isolated from an Indonesian mangrove sediment sample. Bioinformatic analysis of the genome sequence of *Streptomyces* sp. I6 revealed 23 biosynthetic gene clusters. One of them encodes the synthesis of a putative phosphonate secondary metabolite, a class of underexplored natural compounds with great pharmaceutical potential.

Actinomycetes have turned out to be prolific sources for new antibiotics, as 70% of all known antibiotics were derived from actinomycetes (1). Unique habitats are suggested to be a good source for novel antimicrobial species that offer new natural compound chemistry (2). Indonesia is especially biodiverse (3) and may be host to unknown antibiotic-producing actinomycetes. *Streptomyces* sp. strain I6 is a novel isolate from a mangrove sediment soil sample from Tanjung Kelor Beach, Sekotong, West Lombok, Indonesia. The strain was isolated via selective medium, as described previously (4). In order to uncover its potential to produce novel natural compounds, we report here the whole-genome sequence and bioinformatic analysis of *Streptomyces* sp. I6.

For genome isolation, *Streptomyces* sp. I6 was cultivated for 2 days in 50 ml of R5 medium (5) at 30°C. For cell lysis, lysozyme (10 mg/ml; Serva) and achromopeptidase (5 mg/ml; Sigma) were added, as reported previously (6). Genomic DNA was extracted and purified using the Genomic-tip 100/G kit (catalog number 10243; Qiagen). The genomic DNA isolation procedure was carried out following the standard protocol provided by the manufacturer. For genome sequencing, a single SMRTbell template was prepared according to the Pacific Biosciences (PacBio) sample preparation protocol (7), and sequencing was performed with the PacBio RS II platform. The genome was assembled with the Hierarchical Genome Assembly Process (HGAP) v3.0 (8). HGAP data processing used PreAssembler v1 for filtering, PreAssembler v2, and AssembleUnitig v1 for assembly, BLASR v1 (9) for mapping, and Quiver v1 for consensus polishing, using only unambiguously mapped reads. HGAP3 settings were kept at the defaults, except for the genome size estimate parameter, which was set to 8.0 Mbp. Altogether, 119,346 filtered reads with an N_{50} value of 13,548 bp were assembled into two contigs, yielding a 7,054,598-bp draft sequence with a 6-fold coverage and an average G+C content of 72.47%. Genome annotation was performed with the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline software tool (PGAP v4.6) (10), yielding 6,005 coding sequences (CDSs), 65 tRNAs, and 18 rRNAs. Using 16S marker genes, EzTaxon (11) identified the strain as most similar to *Streptomyces spongiicola* HNM0071, with 99.78% similarity (12). Using the Automatic Multi-Locus Species Tree (autoMLST) Web server (13), we found that

Citation Krause J, Ratnakomala S, Lisdiyanti P, Ort-Winklbauer R, Wohlleben W, Mast Y. 2019. Complete genome sequence of the putative phosphonate producer *Streptomyces* sp. strain I6, isolated from Indonesian mangrove sediment. *Microbiol Resour Announc* 8:e01580-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01580-18>.

Editor Vincent Bruno, University of Maryland School of Medicine

Copyright © 2019 Krause et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Yvonne Mast, yvonne.mast@biotech.uni-tuebingen.de.

Received 19 November 2018

Accepted 19 December 2018

Published 24 January 2019

Streptomyces sp. I6 is closely related to *Streptomyces* sp. strain CNT302, with an average nucleotide identity (ANI) of 94.0%.

In order to identify biosynthetic gene clusters (BGCs), the genome sequence was analyzed with antiSMASH version 4.0 (14), which predicted 23 BGCs. For five of them, antiSMASH predicted 100% similarity to the BGCs for tirandamycin (15), isorenieratene (16), desferrioxamine B (17), scabichelin (18), and staurosporine (19). One BGC showed 88% similarity to the echinomycin (20) BGC. The remaining BGCs were predicted to encode two terpenes, two thiopeptides, two bacteriocins, one polyketide, one linaridin, one melanin, one polyketide-siderophore hybrid, one phosphonate-nonribosomal peptide hybrid, one polyketide-lanthipeptide-polyketide hybrid, one butyrolactone-polyketide-nonribosomal peptide hybrid, and three other secondary metabolites.

A particularly interesting BGC from *Streptomyces* sp. I6 is the hybrid phosphonate-nonribosomal peptide cluster, which may encode a phosphonopeptide. Phosphonates in general are promising secondary metabolites due to their unique chemical properties and broad spectrum of activities (21). The key enzyme in phosphonate biosynthesis is the phosphoenolpyruvate mutase (PepM), which catalyzes the conversion of phosphoenolpyruvate to phosphopyruvate (22, 23). A putative *pepM* gene (*ctg1_4282*) is present within the phosphonate-nonribosomal peptide BGC of *Streptomyces* sp. I6. This indicates that *Streptomyces* sp. I6 has the genetic potential to produce a phosphonopeptidic secondary metabolite.

Data availability. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number RHDP00000000. The version described in this paper is version RHDP01000000. Raw sequencing data are available under BioProject accession number PRJNA498008 and SRA accession number SRX4939820. For all software analyses, default settings were used.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the funding received from the BMBF German-Indonesian Cooperation project NAbuUnAk, the Indonesian Institute of Sciences Priority Program 2015–2017, and the German Center for Infection Research (DZIF). J.K. is grateful for a scholarship from the German Academic Exchange Service (DAAD).

REFERENCES

- Takahashi Y, Omura S. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol* 49: 141–154. <https://doi.org/10.2323/jgam.49.141>.
- Williams ST, Vickers JC. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microb Ecol* 12:43–52. <https://doi.org/10.1007/BF02153221>.
- de Bruyn M, Stelbrink B, Morley RJ, Hall R, Carvalho GR, Cannon CH, van den Bergh G, Meijaard E, Metcalfe I, Boitani L, Maiorano L, Shoup R, von Rintelen T. 2014. Borneo and Indochina are major evolutionary hotspots for Southeast Asian biodiversity. *Syst Biol* 63:879–901. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu047>.
- Hayakawa M, Nonomura H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 65:501–509. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90108-7](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90108-7).
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 1985. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Jiao J-Y, Carro L, Liu L, Gao X-Y, Zhang X-T, Hozzein WN, Lapidus A, Huntmann M, Reddy TBK, Varghese N, Hadjithomas M, Ivanova NN, Goker M, Pillay M, Eisen JA, Woyle T, Klenk H-P, Kyrpidis NC, Li W-J. 2017. Complete genome sequence of *Jiangella gansuensis* strain YIM 002T (DSM 44835T), the type species of the genus *Jiangella* and source of new antibiotic compounds. *Stand Genomic Sci* 12:21. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0226-6>.
- Pacific Biosciences. 2015. Guidelines for preparing 20 kb SMRTbell™ templates. User bulletin PN 100-286-700-04. Pacific Biosciences, Menlo Park, CA. <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Procedure-Checklist-20-kb-Template-Preparation-Using-BluePippin-Size-Selection.pdf>.
- Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
- Chaisson MJ, Tesler G. 2012. Mapping single molecule sequencing reads using basic local alignment with successive refinement (BLASR): application and theory. *BMC Bioinformatics* 13:238. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-238>.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *Nucleic Acids Res* 44: 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>.
- Zhou S, Xiao K, Huang D, Wu W, Xu Y, Xia W, Huang X. 2018. Complete genome sequence of *Streptomyces spongiicola* HNM0071^T, a marine sponge-associated actinomycete producing staurosporine and echinomycin. *Mar Genomics*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2018.08.002>.
- Ziemert Lab. 2018. autoMLST: Automatic Multi-Locus Species Tree. Ziemert Lab, Tübingen, Germany. <http://automlzt.ziemertlab.com/index>.
- Blin K, Wolf T, Chevrette MG, Lu X, Schwalen CJ, Kautsar SA, Suarez Duran HG, de Los Santos ELC, Kim HU, Nave M, Dickschat JS, Mitchell DA, Shelest E, Breitling R, Takano E, Lee SY, Weber T, Medema MH. 2017. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* 45:W36–W41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx319>.
- Mo X, Wang Z, Wang B, Ma J, Huang H, Tian X, Zhang S, Zhang C, Ju J.

2011. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster of the bacterial RNA polymerase inhibitor tirandamycin from marine-derived *Streptomyces* sp. SCSIO1666. *Biochem Biophys Res Commun* 406:341–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.040>.
16. Krügel H, Krubasik P, Weber K, Saluz HP, Sandmann G. 1999. Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1439:57–64. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00075-X).
17. Barona-Gómez F, Wong U, Giannakopoulos AE, Derrick PJ, Challis GL. 2004. Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J Am Chem Soc* 126:16282–16283. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>.
18. Kodani S, Bicz J, Song L, Deeth RJ, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Ochi K, Challis GL. 2013. Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plant pathogen *Streptomyces scabies* 87.22. *Org Biomol Chem* 11:4686. <https://doi.org/10.1039/c3ob40536b>.
19. Onaka H, Tanifuguchi S-I, Igarashi Y, Furumai T. 2002. Cloning of the staurosporine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0274 and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *J Antibiot (Tokyo)* 55:1063–1071. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.1063>.
20. Corbaz R, Ettlinger L, Gämman E, Schierlein WK, Kradolfer F, Neipp L, Prelog V, Reusser P, Zähler H. 1957. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 7. Mitteilung. Echinomycin. *Helv Chim Acta* 40:199–204. <https://doi.org/10.1002/hlca.19570400124>.
21. Metcalf WW, Van Der Donk WA. 2009. Biosynthesis of phosphonic and phosphinic acid natural products. *Annu Rev Biochem* 78:65–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.091707.100215>.
22. Ju K-S, Gao J, Doroghazi JR, Wang K-KA, Thibodeaux CJ, Li S, Metzger E, Fudala J, Su J, Zhang JK, Lee J, Cioni JP, Evans BS, Hirota R, Labeda DP, van der Donk WA, Metcalf WW. 2015. Discovery of phosphonic acid natural products by mining the genomes of 10,000 actinomycetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:12175–12180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500873112>.
23. Yu X, Doroghazi JR, Janga SC, Zhang JK, Circello B, Griffin BM, Labeda DP, Metcalf WW. 2013. Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:20759–20764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315107110>.

7.9 Manuskript

SARP-driven activation of antibiotic gene clusters

Janina Krause¹, Ira Handayani^{1,2}, Andreas Kulik¹, Yvonne Mast^{1,3,4,5*}

¹Department of Microbiology/Biotechnology, Interfaculty Institute of Microbiology and Infection Medicine, Faculty of Science, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tübingen, Germany

²Research Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Sciences (LIPI), Jl. Raya Jakarta-Bogor KM.46, Cibinong 16911, Indonesia

³German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Tübingen, Tübingen, Germany

⁴Department Bioresources for Bioeconomy and Health Research, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany

⁵Technical University Braunschweig, Department of Microbiology, Rebenring 56, 38106 Braunschweig, Germany

*Correspondence :
Prof. Dr. Yvonne Mast
yvonne.mast@dsmz.de

Running title: SARP-driven activation of antibiotic gene clusters

Key words: actinomycetes, *Streptomyces*, antibiotic, regulator, SARP, silent gene cluster

1 Abstract

SARP-type regulators are well-known activators of antibiotic biosynthesis in streptomycetes. The respective genes occur in various types of antibiotic gene clusters encoding e.g. for polyketides, ribosomally and non-ribosomally synthesized peptides or β -lactam antibiotics. We found that overexpression of the SARP-type regulator gene *papR2* from *Streptomyces pristinaespiralis* in *Streptomyces lividans* leads to the activation of the silent undecylprodigiosin (Red) gene cluster. The activation happens upon the inducing function of PapR2, which takes over the regulatory role of RedD, the latter of which is the intrinsic SARP regulator of Red biosynthesis in *S. lividans*. Due to the broad abundance of SARP genes in different antibiotic gene clusters of various actinomycetes and the uniform activating principle of the encoded regulators, we suggest that this type of regulator is especially well suited to be used as a general initiator of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. Here, we report on a SARP-guided strategy to activate antibiotic gene clusters. As a proof of principle, we present the PapR2-driven activation of the amicetin/plicaceticin gene cluster in the novel Indonesian strain isolate *Streptomyces* sp. SHP22-7.

2 Introduction

In 2015, the WHO warned that the dramatic increase of antibiotic resistances coupled with the scarcity of new antibiotics will lead to a global health crisis in the 21st century (World Health Organization 2015). Even nowadays, infections that are caused by drug-resistant pathogens are suggested to account for 700,000 deaths worldwide annually (United Nations Foundation and the Wellcome Charitable Trust 2016). According to the World Bank Group “by 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with the 2008 financial crisis” (Worldbank 2016). Thus, there is a substantial need for new antibiotics in order to combat drug-resistances. Bacteria have long been recognized as a prolific source for antibiotics (Newman and Cragg 2016). Especially actinomycetes are potent producers of bioactive molecules, as they provide up to 70% of all medically important antibiotic agents (Y. Tanaka and Omura 1990). The capability to produce these natural compounds is genetically encoded in the actinomycete’s genome, whereby the respective genes usually are organized as biosynthetic gene clusters (BGCs). In recent years, genomic analyses of actinomycetes have revealed the presence of numerous 'silent' or 'cryptic' BGCs, meaning that these clusters remain silent or are only weakly expressed under standard lab conditions. Indeed it is estimated that actinomycetes encode ~10-times the number of secondary metabolites than anticipated from prior fermentation studies (Baltz 2017). Thus, these microorganisms still hold the genetic potential to produce new bioactive compounds. Consequently, there are several attempts to activate silent gene cluster expression in order to find new antibiotics. However, most of these activation efforts are either a) completely unspecific in terms of the BGC(s) to be activated (e.g. by adding general elicitors to the cell culture, co-cultivation approaches or strain-cultivation following the “one strain-many compounds” (OSMAC) strategy) or b) they are absolutely specific for the BGC of interest (e.g. heterologous expression of the BGC, introduction of an artificial promoter in front of the BGC or manipulation of a cluster-situated regulator) (reviewed in (Zhu, Sandiford, and van Wezel 2014; Ochi and Hosaka 2013)). Both approaches have their drawbacks, as there are either major analytical efforts to identify the product from the silent gene cluster (in terms of a)) or tedious genetic engineering efforts to manipulate the producer strain (in terms of b)). Thus, it would be highly beneficial to have a more general activation strategy that targets a defined set of BGCs, which would tackle both issues.

In this study we demonstrate that SARP (*Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein)-type regulators can be used as general activators of certain antibiotic gene clusters in actinomycetes. SARPs have exclusively been found in actinomycetes, especially in streptomycetes, where they act as pathway-specific activators of secondary metabolite biosynthesis (Bibb 2005). They are known to be associated with various antibiotic gene clusters, encoding type I- (Eriko Takano et al. 2005; Bate, Stratigopoulos, and Cundliffe 2002; Novakova et al. 2011) and type II-PKS derived polyketides (Sheldon, Busarow, and Hutchinson 2002; Novakova et al. 2011; Aigle et al. 2005; Lombó et al. 1999), ribosomally (Wu et al. 2018; Widdick et al. 2003) and non-ribosomally synthesized peptides (NRP) (Ryding, Anderson, and Champness 2002), mixed polyketide/NRP compounds (Mast et al. 2015; Pulsawat et al. 2009; Xie et al. 2012; Suzuki et al. 2010; Salehi-Najafabadi et al. 2014; Ye et al. 2018), β -azachinones (Santamarta et al. 2002; Rodríguez et al. 2008; Kurniawan et al. 2014) and azoxy compounds (Ram P. Garg et al. 2002). The SARP encoding genes usually are located within the BGC they are regulating. The encoded gene products are characterized by a winged helix-turn-helix DNA-binding motif at the N-terminus that binds to a conserved recognition sequences within the major groove of the target DNA (Wietzorrek and Bibb 1997;

Liu et al. 2013). The DNA recognition sequence often constitutes direct heptameric repeat sequences followed by 4 bp spacers, which are localized at the -10 region of the target promoter (A. Tanaka et al. 2007). The C-terminal bacterial activation domain (BTAD) of the SARP protein then activates the transcription of the target genes by recruiting the RNA polymerase (RNAP) to the respective promoter, where a ternary DNA-SARP-RNAP complex is formed allowing transcriptional initiation. (A. Tanaka et al. 2007) A typical SARP-type activator is represented by PapR2, which has been identified as the major activator of pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* (Mast et al. 2015). A *papR2* deletion mutant is unable to produce any pristinamycin, depicting that PapR2 is essential for pristinamycin biosynthesis (Mast et al. 2015). In contrast, overexpression of *papR2* in *S. pristinaespiralis* leads to an increased pristinamycin production, which shows that PapR2 has an activating function (Mast et al. 2015). With the help of electromobility shift assays (EMSAs) and RT-PCR analysis the PapR2 target genes have been identified in the pristinamycin producer and a conserved PapR2 binding site was proposed (Mast et al. 2015).

In this study, we report on the potential of SARP-type regulators as genetic engineering devices for the activation of (silent) BGCs in actinomycetes. As a proof of concept, we demonstrate that PapR2 activates the silent Red gene cluster in *Streptomyces lividans*. Additionally, we provide evidence for a PapR2-guided activation of a BGC in the poorly studied Indonesian strain isolate *Streptomyces* sp. SHP22-7 (SHP22-7), which yielded an increased production of the nucleoside antibiotic plicacetin.

3 Material and Methods

3.1 Bacterial strains, plasmids and cultivation conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in **Table 1** and **Table 2**. For routine cloning strategies, *Escherichia coli* Novablue (Novagen) was used. *S. lividans* T7 (Fischer 1996) and SHP22-7 (Handayani et al. 2018) were applied for antibiotic production analysis, generation of overexpression strains and transcriptional analysis. Cloning procedures and strain cultivation was carried out as described previously (Mast et al. 2015). For cultivation and isolation of RNA, *Streptomyces* strains were grown in 100 ml of R5 medium in 500-ml Erlenmeyer flasks (with steel springs) on an orbital shaker (180 rpm) at 28°C (Kieser et al. 2000). For isolation of genomic DNA and protoplast transformation experiments, strains were grown in 100 ml of S-medium (Kieser et al. 2000). Kanamycin, apramycin, or thiostrepton (50 µg/ml) were used for selection when appropriate.

3.2 Molecular cloning

Basic procedures for DNA manipulation were performed as described previously (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989; Kieser et al. 2000). Primers used for PCR were obtained from MWG Biotech AG (MWG; Ebersberg, Germany) and are listed in **Table 3**.

3.3 Construction of the *papR2* overexpression strain SHP22-7*papR2-OE*

For *papR2* overexpression experiments with SHP22-7, the *papR2* gene was isolated as a *NdeI/HindIII*-fragment from pGM190/*papR2* and was cloned into the *NdeI/HindIII* restriction site of the integrative expression vector pRM4. In the resulting overexpression construct pRM4/*papR2*, the *papR2* gene is under control of the constitutive promoter of the erythromycin resistance gene *ermEp**. pRM4/*papR2* was transferred to SHP22-7 by

protoplast transformation, followed by a selection with apramycin (50 µg/ml), yielding the overexpression strain SHP22-7*papR2-OE*. Strain SHP22-7*pRM4*, harboring the empty pRM4 vector was constructed accordingly and served as a reference.

3.4 PapR2 protein expression in *S. lividans* and SHP22-7

For overexpression experiments *S. lividans* precultures were grown shaking in 100 ml of R5 liquid medium (Mast 2008) for two days at 27 °C. 5 ml of preculture were used as inoculum for 100 ml R5 liquid medium main culture with thiostrepton (12.5 µg/ml) as inductor for gene expression, which was incubated by shaking for 3 days at 27 °C. *papR2* protein purification was carried out as reported before (Mast et al. 2015).

For *papR2* expression and plicacetin/amicetin production in SHP22-7, strains (SHP22-7*papR2-OE*; reference: SHP22-7*pRM4* and SHP22-7 WT) were grown in 50 ml NL410 medium consisting of glucose (10 g l⁻¹), glycerol (10 g l⁻¹), oat meal (5 g l⁻¹), soy flour (10 g l⁻¹), yeast extract (5 g l⁻¹), Bacto casamino acids (5 g l⁻¹), CaCO₃ (1 g l⁻¹) and distilled water (pH was adjusted to 7.0 with NaOH) as a preculture. After 3 days, 10 ml of preculture were transferred to 100 ml sterile main culture medium NL19, consisting of mannitol (20 g l⁻¹), soy flour (20 g l⁻¹) and distilled water (pH adjusted to pH 7.5 with NaOH). Cell were grown for 168 hours at 27 °C.

3.5 Spectrophotometrical analysis for Red detection

Red production was detected spectrophotometrically as reported before (Onaka et al. 2011).

3.6 HPLC and HPLC-DAD-MS analysis for amicetin and plicacetin detection

5 ml culture samples of SHP22-7*papR2-OE* (reference: SHP22-7*pRM4* and SHP22-7 WT) were extracted with 5 ml ethyl acetate for 30 min and concentrated completely in vacuo. The extract was redissolved in 0.75 ml of methanol and samples were used for bioassays and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC-MS) analysis. HPLC analyses were performed on an HP1090M system with ChemStation 3D software rev. A.08.03 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on a Nucleosil C18 column (5 µm, 125 mm × 3 mm) fitted with a precolumn (20 x 3 mm) and with a flow rate of 850 µl min⁻¹. Chromatography was done by linear gradient elution from 95.5% solvent A (water with 0.1% phosphoric acid) to 100% solvent B (ACN) over 15 min., the injection volume was 5 µl. Multiple wavelength monitoring was performed at 210, 230, 260, 280, 310, 435 and 500 nm, UV-Vis spectra were measured from 200 to 600 nm. The evaluation of the chromatograms (210 nm only) was done by means of our HPLC-UV-Vis database.

HPLC-MS analysis of Amicetin and Plicacetin was done with an Agilent 1200 series chromatography system (binary pump, high performance autosampler, DAD-detector) coupled with an LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The sample (5 µl) was injected on a Nucleosil 100 C18 column (3 µm, 100 x 2 mm) fitted with a precolumn (3 µm, 10 x 2 mm) at a flowrate of 400 µl/min and a linear gradient from 100% solvent A (0.1% HCOOH in water) to 100% solvent B (0.06 % HCOOH in ACN) over 15 minutes at 40°C. UV-Vis-detection was done at 220, 260, 280, 360 and 435 nm. Electrospray ionization was performed in positive and negative ultra scan mode (alternating) with a capillary voltage of 3.5 kV and a drying gas temperature of 350°C. Detection of *m/z* values was conducted with Agilent DataAnalysis for 6300 Series IonTrap

LC/MS Version 3.4 (Bruker Daltonik). Upon HPLC-MS analyses amicitin and plicacitin were identified by comparisons of their UV/visible spectra, retention times and molecular masses with authentic standards, as m/z 617.1 [M-H]⁻ and m/z 516.1 [M-H]⁻, respectively.

3.7 PatScan analysis

PatScan analysis (Blin, Wohlleben, and Weber 2018) was performed with the *S. lividans* T7 genome (GenBank Accession Number ACEY00000000) and the PapR2 consensus sequence 5'-GTCAGSS-3' using the software at <https://patscan.secondarymetabolites.org/>

3.8 PapR2 electromobility shift assays (EMSAs)

For shifts with Red-specific promoter regions, 182 bp DNA fragments of the upstream regions of *redP* and *redQ*, respectively, were amplified by PCR from genomic DNA of *S. lividans* T7 with primer pairs PredPfw/rv and PredQfw/rv listed in **Table 3**. For shifts with the *amiA* promoter region, a 230 bp DNA fragment of the upstream region of *amiA* was amplified by PCR from genomic DNA of strain SHP22-7 and primer pair PamiAfw/rv (**Table 3**). For Cy5 labeling, the promoter DNA amplicates were used as templates in a second PCR approach with the Cy5 primer (**Table 3**). PapR2 EMSAs were carried out as reported before (Mast et al. 2015). To verify the specificity of the PapR2-DNA binding, an excess of unlabeled, specific and non-specific DNA, respectively, was added to the EMSA mixture as described previously. DNA bands were visualized by fluorescence imaging using a Typhoon TrioTM Variable Mode Imager (GE Healthcare).

3.9 Transcriptional analysis by RT-PCR

SLpGMI90 and *SLpapR2-OE*, as well as SHP22-7, SHP22-7*pRM4* and SHP22-7*papR2-OE* were each grown under *papR2*-overexpression conditions as described above 30 ml samples were taken after 48 h. Cell disruption was carried out with glass beads (150 to 212 μm; Sigma) using a Precellys Homogenizer (Peqlab) at 6,500 rpm, once for 20 to 30 s. RNA isolation was carried out as described previously and was used as the template for RT-PCR. DNA was removed via digestion with DNase (Thermo Fisher Scientific). RNA concentrations and quality were checked using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). cDNA from 3 μg RNA was generated with random primers, reverse transcriptase, and cofactors (Fermentas). For RT-PCRs, primers were used that amplify cDNA of 200 to 250 bp from internal gene sequences. PCR conditions were 98°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s, and a final cycling step at 72°C for 5 min. As a positive control, cDNA was amplified from the 16S rRNA transcript, which is produced constitutively. To exclude DNA contamination, negative controls were carried out by using total RNA as a template for each RT-PCR.

3.10 Transcriptional analysis by Real-time qPCR

Real time qPCR analysis was applied for quantitative cDNA determination. PCR reactions were run with SYBR[®] Green Supermix (BioRad) on an iQ5 Multicolor Real-Time-PCR Detection System (BioRad). The SYBR[®] Green Dye shows increased fluorescence when bound to double stranded DNA. The fluorescence is measured at 494 nm and 521 nm and gives the proportional amount of generated dsDNA. cDNA was isolated from cultures of *SLpGMI90* and *SLpapR2-OE* as described above. The primers redPintfw, redPintrv, redQintfw and redQintrv, that amplify fragments of about 180 bp from internal gene

sequences, were used (**Table 3**). Triplicate PCR reactions were carried out for each sample analyzed. *hrdB* was used as housekeeping gene in each sample in order to standardize the results by eliminating variation in RNA and cDNA quantity and quality. Each reaction mixture of 10 μ L volume contained 5 μ L SYBR[®] Green Supermix (BioRad), 3.85 μ L nuclease-free water, 0.2 μ L of each primer, and 0.75 μ L template. PCR conditions were 98°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 20 s, and 57°C for 30 s. To determine amplification specificity melting curve analyses were performed after the last cycle showing in all cases one single peak. Results were analysed using the $\Delta\Delta$ CT-method. (Livak and Schmittgen 2001) Changes in gene expression are represented in relation to the data from the control sample *SLpGMI90*.

3.11 Bioassays

Antibiotic activity was analyzed in disc diffusion assays using *Bacillus subtilis* ATCC6051 and *Escherichia coli* K12 as test organisms. 30 μ l methanolic extract from SHP22-7 WT, SHP22-7*pRM4* and SHP22-7*papR2-OE* was pipetted on a filter disc, which was placed on the respective bioassay plates. 5 μ l kanamycin (50 μ g/ml) were applied as a positive control and 30 μ l of methanol as negative control. The plates were incubated overnight at 37°C. The antibiotic activity was quantified by measuring the diameter of the inhibition zone around the filter discs.

4 Results

4.1 PapR2 induces expression of the silent Red gene cluster in *S. lividans*

In frame of analyzing the regulatory role of PapR2 in *S. pristinaespiralis*, the *papR2* gene was heterologously expressed in *S. lividans* T7. *S. lividans* is a widely used heterologous host strain, which under standard lab conditions, does not exhibit antibiotic production. For overexpression experiments the *S. lividans* strain *SLpapR2-OE* was used, which harbors the *papR2* gene on the replicative medium-copy plasmid pGM190 under control of the thiostrepton-inducible promoter P_{tipA} (Mast et al. 2015). *S. lividans* strain *SLpGMI90* was used as a reference, containing the pGM190 empty vector. After two to three days of growth in YEME liquid medium with thiostrepton as inductor for gene expression, the whole culture, as well as the culture supernatant of *SLpapR2-OE* showed an intensive red pigment formation, which was not observed for samples of *SLpGMI90* (**Figure 1A**). This phenomenon was also observed on R5 agar with thiostrepton (12.5 μ g/ml), where *SLpapR2-OE* mycelium was intensively red colored after three to four days of cultivation but *SLpGMI90* mycelium was not (**Figure S1**). *S. lividans* is known to harbor a Red biosynthetic gene cluster, which remains silent under normal growth conditions (Horinouchi, Suzuki, and Beppu 1986). To investigate, whether the red color in the *SLpapR2-OE* cultures occurs from the formation of the Red metabolite, we performed a pH shift with the culture supernatant of *SLpapR2-OE* and analyzed the samples with a Hitachi U-2000 spectrophotometer. Spectrophotometrical analysis led to the detection of the Red-specific spectral absorption maxima at 533 nm and 468 nm under acidic and basic conditions (Onaka, Nakagawa, and Horinouchi 2002), respectively (**Figure 1B**), which proved that the *SLpapR2-OE* samples contained Red. These data suggested that the overexpression of *papR2* in *S. lividans* induced Red biosynthesis.

4.2 PapR2 mimics the function of the *S. lividans* SARP-type regulator RedD

In *S. lividans*, Red biosynthesis is under control of the SARP-type regulator RedD, which directly activates the Red biosynthetic genes (White and Bibb 1997; E. Takano et al. 1992). An amino acid sequence comparison using BLASTP revealed that PapR2 and RedD show high amino acid similarity to each other (44% identity, 55% similarity) (Mast et al. 2015). Thus, we suspected that PapR2 may substitute for the function of RedD and activates Red biosynthesis in *S. lividans*. In order to identify potential SARP-type binding motifs within the *S. lividans* Red BGC, the genome was analysed with the bioinformatic software PatScan, which allows for the identification of specific sequence patterns in a given genome sequence (Blin, Wohlleben, and Weber 2018). PatScan analysis was performed with the previously described PapR2 consensus motif (5'-GTCAGSS-3') (Mast et al. 2015) as sequence pattern on the *S. lividans* genome sequence. Thereby, two highly conserved PapR2-like motifs were identified within the upstream regions of the Red-specific biosynthetic genes *redP* (SCO5888) and *redQ* (SCO5887) with each 100% and 96.5% identity, respectively (**Figure 2A**). *redP* encodes a 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase, whereas *redQ* codes for an acyl carrier protein, both of which have been shown to be involved in Red biosynthesis (Mo et al. 2008). To analyse the functionality of the identified SARP motifs, EMSAs were performed with the PapR2 protein and the upstream regions of *redP* (*PredP*, 156 bp) and *redQ* (*PredQ*, 166 bp), respectively, harbouring the PapR2 consensus sequence. EMSAs showed that PapR2 specifically binds to the *PredP* and *PredQ* fragment, respectively (**Figure 2B**), revealing the functionality of the identified SARP-type motifs.

To confirm the regulatory effect of PapR2 on the transcription of Red, we performed reverse transcription-PCR (RT-PCR) and quantitative RT-PCR (qPCR) experiments using RNA isolated from *SLpapR2-OE*, as well as from *SLpGMI90* as a reference, after 72 h of cultivation (controls s. **Figure 3A and B**, n=6). The isolated RNA was used as template for RT-PCR experiments with the primer pairs redPintfw/iv and redQintfw/iv (**Table 3**), which annealed to internal parts of *redP* and *redQ*, respectively. The transcriptional analysis revealed that there is a significant increase of *redP* and *redQ* cDNA amplicates in *SLpapR2-OE* samples compared to *SLpGMI90* samples (**Figure 3C and D**, respectively). This was confirmed by qPCR analyses, which showed that transcription levels of *redP* and *redQ* were increased in *SLpapR2-OE* samples in relation to *SLpGMI90* by 57- and 492-fold, respectively (**Figure 5**). This demonstrated that PapR2 activates the transcription of the Red biosynthetic genes *redP* and *redQ*. Due to the intensive Red production of strain *SLpapR2-OE* together with the data obtained from PapR2 EMSA studies and transcriptional analysis, we propose that overexpressed PapR2 in *S. lividans* takes over the regulatory function of RedD and activates the transcription of the Red biosynthetic genes, which leads to the formation of the red colored secondary metabolite Red.

4.3 PapR2 expression improves antibiotic activity of SHP22-7

In order to study the general application of SARP-type regulators for activation of antibiotic biosynthesis, we exemplarily tested strain SHP22-7 as a host for *papR2* expression. SHP22-7 is a novel strain isolate from a soil sample of the unique desert island Enggano, Indonesia (Handayani et al. 2018). SHP22-7 shows broad-spectrum antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *E. coli*, *Staphylococcus carnosus*, *Micrococcus luteus*, and *B. subtilis*. The SHP22-7 genome has been sequenced recently and AntiSMASH analysis predicted 25 potential secondary metabolite gene clusters. (Handayani et al. 2018) For *papR2* expression studies, the *papR2* gene was cloned into the integrative

plasmid pRM4 under control of the constitutive *ermE** promoter, resulting in construct pRM4/papR2. The pRM4 vector was used as expression plasmid in these analyses to avoid addition of thiostrepton as inductor (see above), which would influence subsequent antibacterial bioassays. The plasmid was brought into SHP22-7 by protoplast transformation. The resulting expression strain SHP22-7*papR2-OE*, as well as the SHP22-7 strain with the empty pRM4 vector, SHP22-7*pRM4*, and the SHP22-7 wild-type (WT), which both served as references, were used for antibacterial bioassay studies. SHP22-7*papR2-OE*, SHP22-7*pRM4*, and SHP22-7 WT were each cultivated in NL19 medium. Samples were taken at 168 hours and methanolic culture extracts were applied for antibacterial bioassays using *B. subtilis* as test organism. Bioassays were carried out ten times independently. Filter discs with kanamycin and methanol served as positive and negative control, respectively. Thereby, significantly larger inhibition zones against *B. subtilis* were observed on average with extracts of SHP22-7*papR2-OE* (11.7 mm \pm 2.1mm) compared to extracts of SHP22-7*pRM4* (8.3 mm \pm 2.6) or SHP22-7 WT (7.3 mm \pm 2.7) (

Figure 4). Thus, *papR2* expression in SHP22-7 led to significantly improved antibiotic activity.

4.4 PapR2 activates transcription of cluster 9 in SHP22-7

In order to identify the substance that is responsible for the antibiotic activity of SHP22-7 but avoid elaborative chemical analytics in the first place, we screened the SHP22-7 genome sequence for the occurrence of PapR2-like consensus sequences by using the PatScan tool. Here, we only considered motifs that were located within intergenic regions of genes from suggested BGCs. The motif search led to the identification of PapR2-like consensus sequences within five of the 25 predicted BGCs from SHP22-7 (**Table S1**). These included cluster 6 and 10 (NRPS-like gene cluster), cluster 15 (type 2 PKS-butyrolactone-like gene cluster), as well as cluster 3 and 9 (“other” type of gene cluster) (**Table S1**). In order to find out which of the five gene clusters is activated by PapR2, comparative RT-PCR analysis were carried out with SHP22-7*papR2-OE*, SHP22-7*pRM4* and SHP22-7 WT with four replicates each. Cells were grown under antibiotic production conditions and samples were harvested at 168 hours. Two samples were collected for each strain and growth time point, whereby one sample was used for RT-PCR analyses and the second one for HPLC-MS analysis. RT-PCR was carried out with RNA isolated from cell pellets of SHP22-7*papR2-OE*, SHP22-7*pRM4*, and SHP22-7 WT, respectively (controls s. **Figure 6 A and B**). cDNA was amplified with primer pairs cl3fw/rv, cl6fw/rv, cl9fw/rv, cl10fw/rv, and cl15fw/rv each aligning to a specific predicted biosynthetic gene of cluster 3, 6, 9, 10, and 15 (**Table 3**). The transcriptional analysis revealed that there is a stronger signal for the cluster 9 amplicate in the SHP22-7*papR2-OE* samples compared to samples of SHP22-7*pRM4* and SHP22-7 WT (**Figure 6C**). The amplicates specific for cluster 3, 6, 10, and 15 did not show such concrete difference (**Figure 6C**). Thus, these data suggested that PapR2 activates the transcription of cluster 9 in SHP22-7*papR2-OE*.

4.5 PapR2 activates plicacetin production in SHP22-7

In order to deduce for what type of metabolite cluster 9 encodes for, we analyzed the cluster sequence region in detail. The AntiSMASH output predicted a 75% similarity of cluster 9 (**Figure 7A**) to the amicetin gene cluster from *Streptomyces vinaceusdrappus* NRRL 2363 (**Figure 7B**). Manually cluster analysis by sequence alignments yielded a 100% sequence similarity. Amicetin (**Figure 7C**) and its suggested precursor plicacetin (**Figure 7D**) are

disaccharide pyrimidine nucleoside antibiotics with a broad-spectrum antibacterial (especially against *Mycobacterium tuberculosis*) and antiviral activity. They act as a peptidyl transferase inhibitors and thereby inhibit protein synthesis. Amicetin consists of the two deoxysugar moieties, D-amosamine and D-amicetose, as well as cytosine, p-aminobenzoic acid (PABA), and a terminal methylserine moiety (**Figure 7C**), whereby the latter moiety is missing in plicacetin (**Figure 7D**) (Zhang et al. 2012; Korzybski et al. 2013). The gene cluster analysis of SHP22-7 revealed that the PapR2-like motif is located directly in front of the *orf plicA*, which shows 99.23% gene sequence identity to *amiA* of *S. vinaceusdrappus*. In *S. vinaceusdrappus* *amiA* is the first gene of the amicetin biosynthetic gene cluster and is suggested to encode a putative 4-amino-4-deoxychorismate lyase, catalyzing the conversion from 4-amino-4-deoxychorismate to produce p-aminobenzoic acid (Zhang et al. 2012). Remarkably, all genes in the amicetin gene cluster of *S. vinaceusdrappus* and the amicetin-like gene cluster of SHP22-7 are organized in one direction, suggesting a unidirectional transcription. In this context, it would make sense that regulatory activation targets the promoter of the first gene of the unidirectional BGC. However, this would suggest the existence of a cluster-associated SARP-type gene or another transcriptional activator gene within the amicetin gene cluster, which could not be identified so far. In order to investigate which type of metabolite production is influenced by *papR2* expression in SHP22-7 *papR2-OE*, we analysed methanolic extracts of cell culture samples from SHP22-7 *papR2-OE*, as well as of SHP22-7 *pRM4* and SHP22-7 WT by HPLC/MS. For these analyses we used the second culture samples obtained from SHP22-7 *papR2-OE*, SHP22-7 *pRM4* and SHP22-7 WT, respectively (see above). HPLC-MS/MS analysis revealed the production of the antibiotics amicetin (m/z 617.1 [M-H]⁺) and plicacetin (m/z 516.1 [M-H]⁺), as well as a plicacetin isomer (m/z 516.1 [M-H]⁺). The compounds display very similar spectra but a different retention times in all three strains (**Figure 8A**). However, the production of plicacetin and the plicacetin isomer was significantly increased in SHP22-7 *papR2-OE* for plicacetin (605 mAU) and for plicacetin isomer (259 mAU) in comparison to samples from SHP22-7 *pRM4* (120 mAU for plicacetin and 97 mAU for the plicacetin isomer) and SHP22-7 WT (66 mAU for plicacetin and 57 mAU for the plicacetin isomer; **Figure 8B**). Thus, it could be shown that *papR2* expression in SHP22-7 activates plicacetin biosynthesis. With this result it could be confirmed that PapR2 induced cluster 9 transcription, which resulted in increased plicacetin production. Furthermore, it can be concluded that the increased bioactivity of SHP22-7 *papR2-OE* samples against *B. subtilis* arises from the increased production of the nucleoside antibiotic plicacetin.

5 Discussion

Regulation is the screw plug to unlock the biosynthetic potential of natural compound producers. Here, we showed that heterologous expression of the SARP-type regulatory gene *papR2* in the foreign host *S. lividans* leads to the transcriptional activation of the silent Red gene cluster. Since SARP regulators show a similar protein architecture and bind to similar recognition sequences at the DNA, they can substitute for their regulatory functions as exemplified for PapR2 and RedD. This is also underpinned by a previous study, where it has been shown that overexpression of the SARP gene *vml* from the valanimycin producer *Streptomyces viridifaciens* in a *redD* mutant of *Streptomyces coelicolor* M512 restores Red production, demonstrating that *vml* can complement a *redD* mutation (R. P. Garg and Parry 2010). So far, there are only bioinformatic predictions on potential regulatory binding regions

within the Red BGC (Iqbal/Mast, 42;). Here, we provide experimental evidence by EMSA studies for the SARP binding capability to promoter regions (*PredP*, *PredQ*) of the Red BGC.

In literature SARPs often are designated as „pathway-specific“ transcriptional activators, which means that the regulators have a major effect on the level of production of the cognate antibiotic. However, SARPs indeed can have activating effects on the biosynthesis of different substances. One example, occurring in nature is provided by the SARP-type regulator CcaR from *Streptomyces clavuligerus*, which activates the cephamycin gene cluster, where *ccaR* is part of, as well as the adjacent clavulanic acid gene cluster (Perez-Llarena et al., 1997). Also, our results showed that the SARP regulator PapR2 activates the transcription of the corresponding pristinamycin gene cluster (Mast 2015), as well as different antibiotic gene clusters, such as Red and plicacetin, when expressed in foreign strains. Thus, the term „pathway-specific“ are not really accurate for SARPs and should better be replaced by „cluster-situated“ as suggested before (Liu et al., Huang, Cohen et al., 2005).

The fact, that SARP genes are widely distributed amongst actinomycetes, where they occur in many different types of secondary metabolite gene clusters makes them good candidates to be used as engineering tools for the activation of biosynthetic gene clusters in general. Besides that, the study revealed that not all SARPs are suitable candidates for activation. Indeed there are different types of SARP regulators, belonging either to the small SARPs (<400 amino acids) with only HTH and BTAD domains (e.g. ActII-ORF4 or RedD) or the large SARPs, which contain an additional ATPase domain and a conserved C-terminal domain of unknown function (~1000 residues) (Liu et al.,). Since there are more examples available in literature for regulators of the group of small SARPs and their regulation is better investigated, we suggest that especially representatives from the group of small SARP regulators are good candidates to be used for activation approaches.

That SARP expression can lead to the activation of silent gene cluster expression has been shown in a recent study. Here, the aim was to activate some of the more than 20 cryptic gene clusters from *Streptomyces sp.* MSC090213JE08 (Du et al., 2016). In this study the authors combined an OSMAC approach with the expression of several native SARP genes from *S. sp.* MSC090213JE08. Thereby, four of the seven generated recombinant SARP expression strains produced nine metabolites that were hardly detected in the control strains. Expression of one of the SARP genes (SARP-7) in *Streptomyces sp.* MSC090213JE08 led to the production of the novel polyene-like substance ishigamide (Du et al., 2016). However, the drawback of this approach is that several conditions need to be tested and a set of genetic manipulations have to be done in order to get the substance in hand. Indeed, this is also the main problem of several efforts to activate secondary metabolite synthesis in actinomycetes. This strategy has two main advantages: 1. In contrast to completely unspecific cluster activation efforts, such as addition of general elicitors, co-culture approaches or the OSMAC strategy, our approach is more targeted, as it focusses only on a defined set of BGCs, namely those ones that are predicted to be under SARP control. Applying bioinformatics, such as PatScan, allows to directly identify the associated antibiotic gene cluster. In addition, the detection of the activated compound is more straight forward if the outline of the structure can be deduced from the cluster sequence. 2. In contrast to activation strategies that are absolutely specific for the respective BGC, e.g. heterologous expression of the BGC, introduction of artificial promoters in front of the BGC or the manipulation of cluster-situated regulators, no major effort to manipulate the genome is necessary with our procedure since it only involves cloning of the SARP gene containing expression construct into the respective strain of interest. In addition, SARP-activation enables improved expression in the native host independent from

heterologous expression of gene clusters, which as a drawback requires immense fine-tuning of gene-controlling elements to enable stalwart gene expression (Huo et al. 2019). These major benefits make the activation of *Streptomyces* BGCs by SARPs a promising strategy to be applied on putative antibiotic producers.

6 Contribution to the field

Due to a lack of new antibiotics from the pharmaceutical industry and the rise of resistances of pathogenic bacteria the world is running out of antibiotics. This could have serious consequences on our current methods in healthcare. Actinomycetes harbor the potential to produce novel antibiotics. But many of their biosynthetic gene clusters are silent, meaning that they are not expressed under standard conditions. We focused on the *Streptomyces* specific SARP activator PapR2 to activate the expression of silent antibiotic gene clusters. As a proof of concept, we presented that PapR2 activates the silent Red BGC expression in *S. lividans*. Furthermore, we depicted that activation is also possible in a less-studied organism, such as *S. sp.* SHP22-7, which produced the nucleoside antibiotic plicacetin upon PapR2 activation. This strategy could accelerate the discovery of new antibiotics.

7 Data availability

The complete genome sequence of *S. lividans* T7 has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number ACEY00000000. The complete genome sequence of SHP22-7 has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number QXMM00000000. Raw sequencing data are available under SRA accession number PRJNA489221.

8 Conflicts of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

9 Author Contributions

The strains *SLpGMI90* and *SLpapR2-OE* were generated by YM. The bandshift assays were done by VK. YM performed the bioinformatic analyses. The statistical analyses were performed by KB. The vector pRM4/papR2 was created by JK while the vector was inserted in SHP22-7 by IH. The bioactivity was tested by IH. All qualitative and quantitative transcriptional analyses were performed by JK. HPLC analyses were done by AK and IH. The manuscript was written by YM, JK, IH and KB. YM designed, supervised and coordinated the study.

10 Funding

We gratefully acknowledge the funding received from the BMBF German-Indonesian Cooperation project NAbUnAk. The study was supported by a DAAD scholarship given to J.K. and a scholarship from the Indonesian Ministry for Research and Technology for I.H.

11 Acknowledgements

We thank Regina Ort-Winklbauer from University of Tübingen for excellent technical assistance. We acknowledge help from Nico Ortlieb and Dorothee Wistuba University of Tübingen for High-Resolution Mass Spectrometric analysis. We thank Puspita Lisdiyanti and

Shanti Ratna Komala from the Indonesian Institute of Sciences for providing us with the Indonesian strain isolate SHP 22-7.

12 References

- Aigle, B., X. Pang, B. Decaris, and P. Leblond. 2005. "Involvement of AlpV, a New Member of the *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein Family, in Regulation of the Duplicated Type II Polyketide Synthase Alp Gene Cluster in *Streptomyces Ambofaciens*." *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2491–2500. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2491-2500.2005>.
- Baltz, Richard H. 2017. "Gifted Microbes for Genome Mining and Natural Product Discovery." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 44 (4–5): 573–88. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1815-x>.
- Bate, Neil, George Stratigopoulos, and Eric Cundliffe. 2002. "Differential Roles of Two SARP-Encoding Regulatory Genes during Tylosin Biosynthesis." *Molecular Microbiology* 43 (2): 449–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02756.x>.
- Bibb, Mervyn J. 2005. "Regulation of Secondary Metabolism in Streptomycetes." *Current Opinion in Microbiology* 8 (2): 208–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.02.016>.
- Blin, Kai, Wolfgang Wohlleben, and Tilmann Weber. 2018. "Patscanui: An Intuitive Web Interface for Searching Patterns in DNA and Protein Data." *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W205–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gky321>.
- Fischer, J. 1996. "Entwicklung Eines Regulierbaren Expressionssystems Zur Effizienten Synthese Rekombinanter Proteine in *Streptomyces Lividans*." University of Stuttgart, Germany.
- Garg, R. P., and R. J. Parry. 2010. "Regulation of Valanimycin Biosynthesis in *Streptomyces Viridifaciens*: Characterization of VImI as a *Streptomyces* Antibiotic Regulatory Protein (SARP)." *Microbiology* 156 (2): 472–83. <https://doi.org/10.1099/mic.0.033167-0>.
- Garg, Ram P., Yunqing Ma, Jeffrey C. Hoyt, and Ronald J. Parry. 2002. "Molecular Characterization and Analysis of the Biosynthetic Gene Cluster for the Azoxy Antibiotic Valanimycin." *Molecular Microbiology* 46 (2): 505–17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03169.x>.
- Handayani, Ira, Shanti Ratnakomala, Puspita Lisdiyanti, Fahrurrozi, Wien Kusharyoto, Mohammad Alanjary, Regina Ort-Winklbauer, Andreas Kulik, Wolfgang Wohlleben, and Yvonne Mast. 2018. "Complete Genome Sequence of *Streptomyces* Sp. Strain SHP22-7, a New Species Isolated from Mangrove of Enggano Island, Indonesia." Edited by J. Cameron Thrash. *Microbiology Resource Announcements* 7 (20): 1–3. <https://doi.org/10.1128/MRA.01317-18>.
- Horinouchi, S, H Suzuki, and T Beppu. 1986. "Nucleotide Sequence of AfsB, a Pleiotropic Gene Involved in Secondary Metabolism in *Streptomyces Coelicolor* A3(2) and 'Streptomyces Lividans'" *Journal of Bacteriology* 168 (1): 257–69. <https://doi.org/10.1128/JB.168.1.257-269.1986>.

- Huo, Liujie, Joachim J. Hug, Chengzhang Fu, Xiaoying Bian, Youming Zhang, and Rolf Müller. 2019. "Heterologous Expression of Bacterial Natural Product Biosynthetic Pathways." *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/C8NP00091C>.
- Kieser, T, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. "Practical *Streptomyces* Genetics." *The John Innes Foundation, Norwich, England* 3 (4): 260–61. <https://doi.org/10.2436/im.v3i4.9291>.
- Korzybski, Tadeusz, Zuzanna Kowszyk-Gindifer, Włodzimierz Kuryłowicz, and Edwin Paryski. 2013. *Antibiotics. Volume 1 : Origin, Nature and Properties*. https://books.google.de/books/about/Antibiotics.html?id=JxEIBQAAQBAJ&redir_esc=y.
- Kurniawan, Yohanes Novi, Shigeru Kitani, Asa Maeda, and Takuya Nihira. 2014. "Differential Contributions of Two SARP Family Regulatory Genes to Indigoidine Biosynthesis in *Streptomyces Lavendulae* FRI-5." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (23): 9713–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5988-9>.
- Liu, Gang, Keith F Chater, Govind Chandra, Guoqing Niu, and Huarong Tan. 2013. "Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 77 (1): 112–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>.
- Lombó, F, A F Braña, C Méndez, and J A Salas. 1999. "The Mithramycin Gene Cluster of *Streptomyces Argillaceus* Contains a Positive Regulatory Gene and Two Repeated DNA Sequences That Are Located at Both Ends of the Cluster." *Journal of Bacteriology* 181 (2): 642–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882681>.
- Mast, Yvonne. 2008. "Biosynthetische Und Regulatorische Aspekte Der Pristinamycin-Produktion in *Streptomyces Pristinaespiralis*."
- Mast, Yvonne, Jamil Guezguez, Franziska Handel, and Eva Schinko. 2015. "A Complex Signaling Cascade Governs Pristinamycin Biosynthesis in *Streptomyces Pristinaespiralis*." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (19): 6621–36. <https://doi.org/10.1128/AEM.00728-15>.
- Mo, SangJoon, Paulina K Sydor, Christophe Corre, Mamoun M Alhamadsheh, Anna E Stanley, Stuart W Haynes, Lijiang Song, Kevin A Reynolds, and Gregory L Challis. 2008. "Elucidation of the *Streptomyces Coelicolor* Pathway to 2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis." *Chemistry & Biology* 15 (2): 137–48. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.015>.
- Musiol, Ewa M., Thomas Härtner, Andreas Kulik, Jana Moldenhauer, Jörn Piel, Wolfgang Wohlleben, and Tilmann Weber. 2011. "Supramolecular Templating in Kirromycin Biosynthesis: The Acyltransferase KirCII Loads Ethylmalonyl-CoA Extender onto a Specific ACP of the Trans-AT PKS." *Chemistry & Biology* 18 (4): 438–44.

<https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2011.02.007>.

- Newman, David J., and Gordon M. Cragg. 2016. "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014." *Journal of Natural Products* 79 (3): 629–61.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Novakova, R., A. Rehakova, P. Kutas, L. Feckova, and J. Kormanec. 2011. "The Role of Two SARP Family Transcriptional Regulators in Regulation of the Auricin Gene Cluster in *Streptomyces Aureofaciens* CCM 3239." *Microbiology* 157 (6): 1629–39.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.047795-0>.
- Ochi, Kozo, and Takeshi Hosaka. 2013. "New Strategies for Drug Discovery: Activation of Silent or Weakly Expressed Microbial Gene Clusters." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (1): 87–98. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9>.
- Onaka, Hiroyasu, Yukiko Mori, Yasuhiro Igarashi, and Tamotsu Furumai. 2011. "Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in Streptomyces Species." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2): 400–406.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01337-10>.
- Onaka, Hiroyasu, Taishiro Nakagawa, and Sueharu Horinouchi. 2002. "Involvement of Two A-Factor Receptor Homologues in Streptomyces Coelicolor A3(2) in the Regulation of Secondary Metabolism and Morphogenesis." *Molecular Microbiology* 28 (4): 743–53.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00832.x>.
- Pulsawat, N., S. Kitani, E. Fukushima, and T. Nihira. 2009. "Hierarchical Control of Virginiamycin Production in *Streptomyces Virginiae* by Three Pathway-Specific Regulators: VmsS, VmsT and VmsR." *Microbiology* 155 (4): 1250–59.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.022467-0>.
- Rodríguez, Miriam, Luz Elena Núñez, Alfredo F. Braña, Carmen Méndez, José A. Salas, and Gloria Blanco. 2008. "Identification of Transcriptional Activators for Thienamycin and Cephamycin C Biosynthetic Genes within the Thienamycin Gene Cluster from *Streptomyces Cattleya*." *Molecular Microbiology* 69 (3): 633–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06312.x>.
- Ryding, N Jamie, Todd B Anderson, and Wendy C Champness. 2002. "Regulation of the *Streptomyces Coelicolor* Calcium-Dependent Antibiotic by AbsA, Encoding a Cluster-Linked Two-Component System." *Journal of Bacteriology* 184 (3): 794–805.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790750>.
- Salehi-Najafabadi, Zahra, Carlos Barreiro, Antonio Rodríguez-García, Anthony Cruz, Gustavo E. López, and Juan F. Martín. 2014. "The Gamma-Butyrolactone Receptors BulR1 and BulR2 of *Streptomyces Tsukubaensis*: Tacrolimus (FK506) and Butyrolactone Synthetases Production Control." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (11): 4919–36. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5595-9>.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061>.

- Santamarta, Irene, Antonio Rodríguez-García, Rosario Pérez-Redondo, Juan F Martín, and Paloma Liras. 2002. "CcaR Is an Autoregulatory Protein That Binds to the CcaR and CefD-CmcI Promoters of the Cephamycin C-Clavulanic Acid Cluster in *Streptomyces Clavuligerus*." *Journal of Bacteriology* 184 (11): 3106–13. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3106-3113.2002>.
- Sheldon, Paul J., Sara B. Busarow, and C. Richard Hutchinson. 2002. "Mapping the DNA-Binding Domain and Target Sequences of the *Streptomyces Peuceetius* Daunorubicin Biosynthesis Regulatory Protein, DnrI." *Molecular Microbiology* 44 (2): 449–60. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02886.x>.
- Suzuki, Toshihiro, Susumu Mochizuki, Shouji Yamamoto, Kenji Arakawa, and Haruyasu Kinashi. 2010. "Regulation of Lankamycin Biosynthesis in *Streptomyces Rochei* by Two SARP Genes, SrrY and SrrZ." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (4): 819–27. <https://doi.org/10.1271/bbb.90927>.
- Takano, E., H. C. Gramajo, E. Strauch, N. Andres, J. White, and M. J. Bibb. 1992. "Transcriptional Regulation of the RedD Transcriptional Activator Gene Accounts for Growth-Phase-Dependent Production of the Antibiotic Undecylprodigiosin in *Streptomyces Coelicolor* A3(2)." *Molecular Microbiology* 6 (19): 2797–2804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01459.x>.
- Takano, Eriko, Hiroshi Kinoshita, Vassilis Mersinias, Giselda Bucca, Graham Hotchkiss, Takuya Nihira, Colin P. Smith, Mervyn Bibb, Wolfgang Wohlleben, and Keith Chater. 2005. "A Bacterial Hormone (the SCB1) Directly Controls the Expression of a Pathway-Specific Regulatory Gene in the Cryptic Type I Polyketide Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces Coelicolor*." *Molecular Microbiology* 56 (2): 465–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04543.x>.
- Tanaka, Akiko, Yuji Takano, Yasuo Ohnishi, and Sueharu Horinouchi. 2007. "AfsR Recruits RNA Polymerase to the AfsS Promoter: A Model for Transcriptional Activation by SARPs." *Journal of Molecular Biology* 369 (2): 322–33. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2007.02.096>.
- Tanaka, Yoshitake, and Satoshi Omura. 1990. "Metabolism and Products of Actinomycetes. An Introduction." *Actinomycetologica* 4 (1): 13–14. https://doi.org/10.3209/saj.4_13.
- United Nations Foundation and the Wellcome Charitable Trust. 2016. "Review on Antimicrobial Resistance." 2016. <https://amr-review.org/>.
- White, J, and M Bibb. 1997. "BldA Dependence of Undecylprodigiosin Production in *Streptomyces Coelicolor* A3(2) Involves a Pathway-Specific Regulatory Cascade." *Journal of Bacteriology* 179 (3): 627–33. <https://doi.org/10.1128/JB.179.3.627-633.1997>.
- Widdick, D A, H M Dodd, P Barraille, J White, T H Stein, K F Chater, M J Gasson, and M J Bibb. 2003. "Cloning and Engineering of the Cinnamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces Cinnamoneus Cinnamoneus* DSM 40005." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4316–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230516100>.

- Wietzorrek, Andreas, and Mervyn Bibb. 1997. "A Novel Family of Proteins That Regulates Antibiotic Production in Streptomyces Appears to Contain an OmpR-like DNA-Binding Fold." *Molecular Microbiology* 25 (6): 1181–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5421903.x>.
- Wohlleben, Wolfgang, Evi Stegmann, and Roderich D. Süßmuth. 2009. "Chapter 18 Molecular Genetic Approaches to Analyze Glycopeptide Biosynthesis." *Methods in Enzymology* 458 (January): 459–86. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04818-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04818-6).
- World Health Organization. 2015. "Global Action Plan on Antimicrobial Resistance." World Health Organization. 2015. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
- Worldbank. 2016. "Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future." 2016. <http://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>.
- Wu, Xuri, Liang Jin, Hong Zhang, Ruinian Tong, Min Ma, and Yijun Chen. 2018. "Identification of Truncated Form of NosP as a Transcription Factor to Regulate the Biosynthesis of Nosiheptide." *The FASEB Journal* 32 (1): 453–65. <https://doi.org/10.1096/fj.201700556R>.
- Xie, Yunchang, Bo Wang, Jing Liu, Junchao Zhou, Junying Ma, Hongbo Huang, and Jianhua Ju. 2012. "Identification of the Biosynthetic Gene Cluster and Regulatory Cascade for the Synergistic Antibacterial Antibiotics Griseoviridin and Viridogrisein in *Streptomyces Griseoviridis*." *ChemBioChem* 13 (18): 2745–57. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200584>.
- Ye, Suhui, Alfredo F. Braña, Javier González-Sabín, Francisco Morís, Carlos Olano, José A. Salas, and Carmen Méndez. 2018. "New Insights into the Biosynthesis Pathway of Polyketide Alkaloid Argimycins P in *Streptomyces Argillaceus*." *Frontiers in Microbiology* 9 (February): 252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00252>.
- Zhang, Gaiyun Guangtao, Haibo Zhang, Sumei Li, Ji Xiao, Gaiyun Guangtao Zhang, Yiguang Zhu, Siwen Niu, Jianhua Ju, and Changsheng Zhang. 2012. "Characterization of the Amicetin Biosynthesis Gene Cluster from *Streptomyces Vinaceusdrappus* NRRL 2363 Implicates Two Alternative Strategies for Amide Bond Formation." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (7): 2393–2401. <https://doi.org/10.1128/AEM.07185-11>.
- Zhu, Hua, Stephanie K Sandiford, and Gilles P van Wezel. 2014. "Triggers and Cues That Activate Antibiotic Production by Actinomycetes." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41 (2): 371–86. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1309-z>.

13 Tables and Figures

Table 1: Bacterial strains

Bacterial strain	Description	Source or reference
<i>E. coli</i> NovaBlue	<i>endA1, hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac F'[proA⁺B⁺. lacI^qZΔM15::Tn10], (tsr)</i>	Novagen
<i>S. lividans</i>		
T7	<i>tsr</i> , T7 RNA polymerase gene	(Fischer 1996)
<i>SLpGM190</i>	<i>S. lividans</i> /pGM190	(Mast et al. 2015)
<i>SLpapR2-OE</i>	<i>S. lividans</i> /pGM190/papR2	(Mast et al. 2015)
SHP22-7 WT	Wild-type	(Handayani et al.
SHP22-7papR2-OE	SHP22-7/pRM4	This work

Table 2: Plasmids

Plasmids	Description	Source or reference
pGM190	<i>Streptomyces-E. coli</i> shuttle vector, <i>tsr</i> , <i>aphII</i> , pSG5 derivative, <i>tipA</i> promoter shuttle vector	(Wohlleben, Stegmann, and Süßmuth 2009)
pGM190/papR2	pGM190 derivative, PtipA, <i>tsr</i> , <i>aphII</i> , <i>hispapR2</i>	(Mast et al. 2015)
pRM4	pSET152, <i>ermEp*</i> derivate (Φ C31 integration vector with mutated erythromycin promoter, <i>acc(3)IV</i> with artificial RBS	(Musiol et al. 2011)
pRM4/papR2	pRM4 derivative, Φ C31, <i>acc(3)IV</i> , artificial RBS, <i>hispapR2</i>	This work

Table 3: Primers

Primer	Primer sequence (5'→3')	T_m (°C)
For bandshift assays		
PredPfw	AGCCAGTGGCGATAAGGTGTGTGCTCCTCGCGTGAT	67
PredPrv	AGCCAGTGGCGATAAGGGGGCGGGACGCCC GCCGGG	81
PredQfw	AGCCAGTGGCGATAAGCGCGGCCCCGCCCGGCGGGC	84
PredQrv	AGCCAGTGGCGATAAGTTCGCCCAACGCCGCCCGG	77
PamiAfw	AGCCAGTGGCGATAAGACGGGCAACCGTCAGTTGAG	76
PamiArv	AGCCAGTGGCGATAAGAAGTGGCCCAGGTTGGTCAG	76
For transcriptional analysis		
16Sfw	CGGCCTTCGGGTTGTAAACCTC	63
16Srv	GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	62
redPintfw	GGTTGAGGATGCGGGAGAAG	58
redPintrv	AGATCGACGCGGTCATCGTG	60
redQintfw	CGACAAGCTCGTTGATCTTG	54
redQintrv	GAACTCGGACTGGATGAC	52
cl3fw	TCCTGCCGACTTCATGG	58
cl3rv	GTGCCGGTTGATCCTGTTG	57
cl6fw	GAGCGTGAGCATCACGTTGG	59
cl6rv	TCGCCGAGGACAAGGACTTC	59
cl9fw	AACCTCGCGGACCTCACCAC	58
cl9rv	CCGGTCATGCAGAGTCTCAG	60
cl10fw	GGTGATGCCGTACATGTTGACC	59

SARP-driven activation of antibiotic gene clusters

cl10rv	ACTCGTACGCCTTCGACTTCTC	58
cl15fw	TCGGAGGTGCTGTTCTTG	55
cl15rv	CGAACGCATCCACATCTG	54
For qPCR analysis		
HrdBfw	CCCTTGGTGTAGTCGAAC	53
HrdBrv	CTGGAGATCATCGCCGAGG	58
redPqPCRfw	GAGATCGACGCGGTCATC	56
redPqPCRrv	GATGACCAGGACCCGTTC	55
redQqPCRfw	CACGCCGAACTCGGACTG	59
redQqPRCrv	CCAGGAAAGGCGGACCAC	59

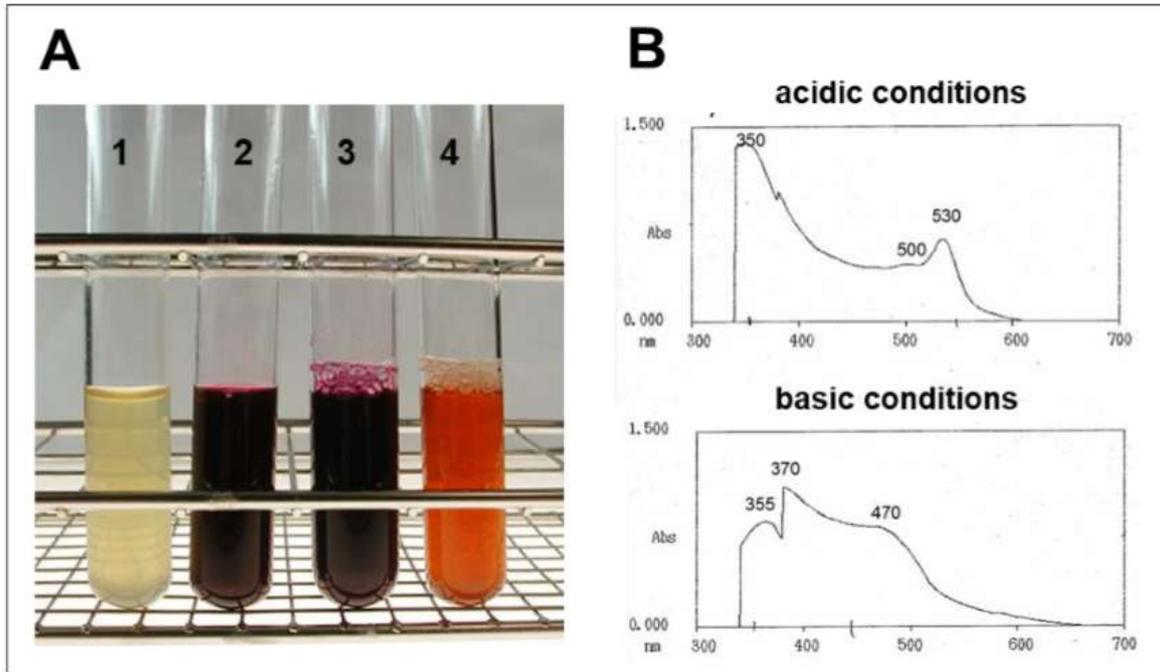


Figure 1: Culture filtrates from *SLpGM190* (1) and *SLpapR2-OE* (2) samples after 3 days of cultivation. Culture filtrate of *SLpapR2-OE* under acidic (3) and basic (4) conditions **(A)**. Absorption profile of the *SLpapR2-OE* culture filtrate under acidic (upper graph) and basic condition (lower graph) **(B)**. Chemical structure of Red **(C)**.

A

P_{redP} GTCAGTGAGCCGTCAGCGCCCGGTCAGGG
P_{redQ} GTCAGCCAACCGTCAGCGGGCCGTCAGCG

B

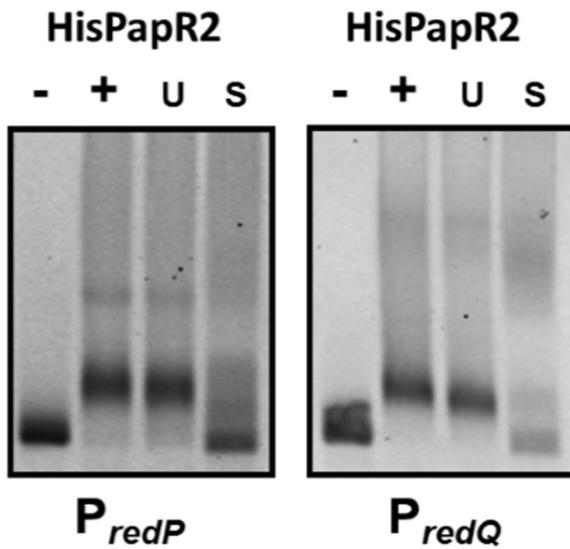


Figure 2: SARP binding sequences within the upstream region of the RED-biosynthetic genes *redP* (SCO5888) and *redQ* (SCO5887) **(A)**. EMSAs with His PapR2 and Cy5-labeled promoter regions of *redP* and *redQ*. – indicates negative control without protein, + indicates addition of HisPapR2 protein. The specificity of the reaction was checked by the addition of 500-fold specific (S) and unspecific (U) unlabeled DNA **(B)**.

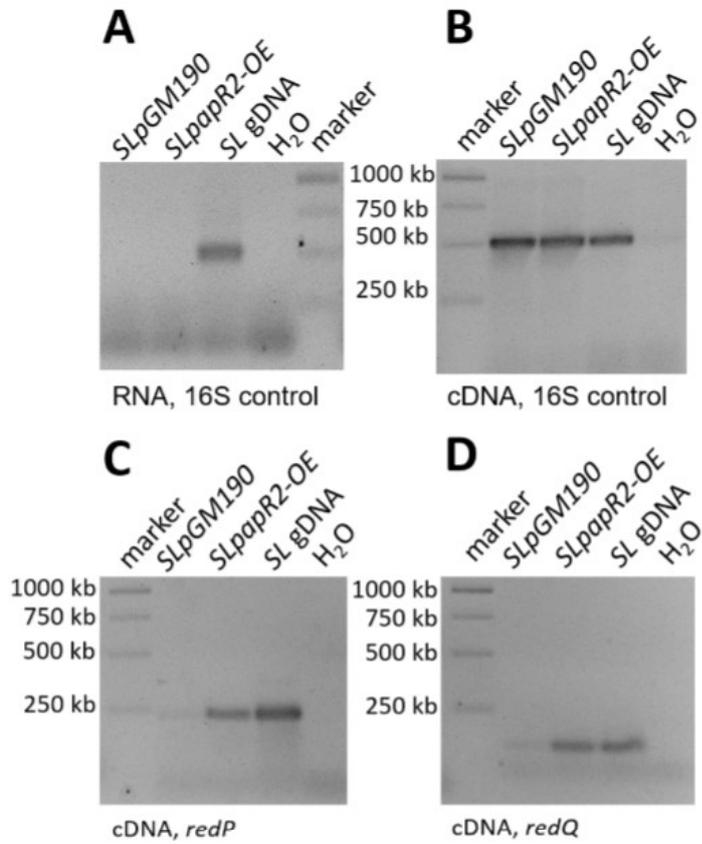


Figure 3: Transcriptional analysis of samples from *SLpGM190* and *SLpapR2-OE* after 168 h. gDNA of *S. lividans* was used as a positive (SL gDNA) and water as a negative control. PCR analysis of DNA remains in the RNA sample **(A)**. Proof for the presence of cDNA **(B)**. RT-PCR analysis of the gene *redP* and in the strains *SLpGM190* and *SLpapR2-OE* **(C)**. RT-PCR analysis of the gene *redQ* and in the strains *SLpGM190* and *SLpapR2-OE* **(D)**.

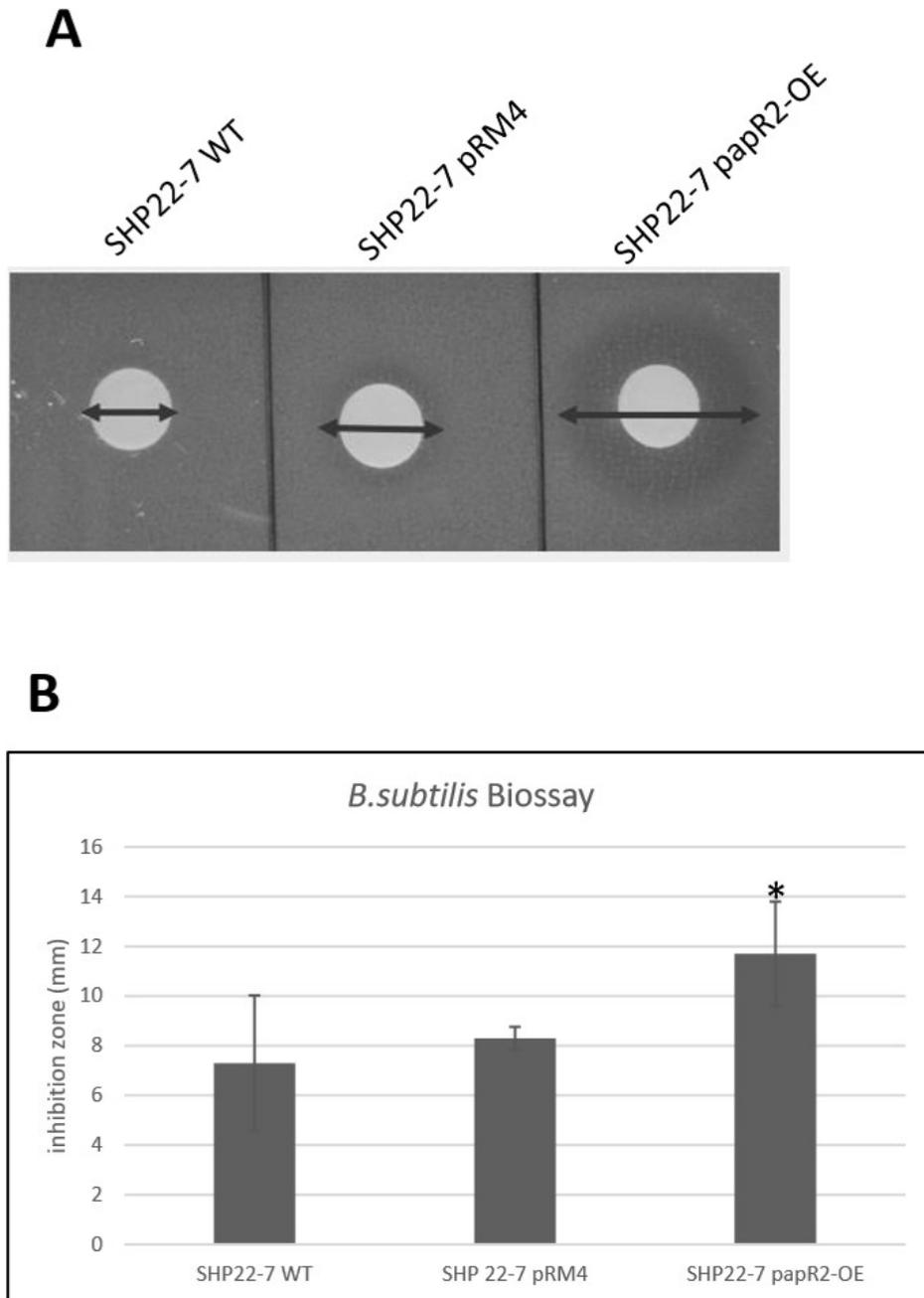


Figure 4: Antibiotic activity of culture extracts from SHP22-7 WT, SHP22-7pRM4 and SHP22-7papR2-OE against *B. subtilis*. Filter disk diffusion assay (A). Graphical representation of the inhibition zone diameters (mm); n=10. * means significance (B).

SARP-driven activation of antibiotic gene clusters

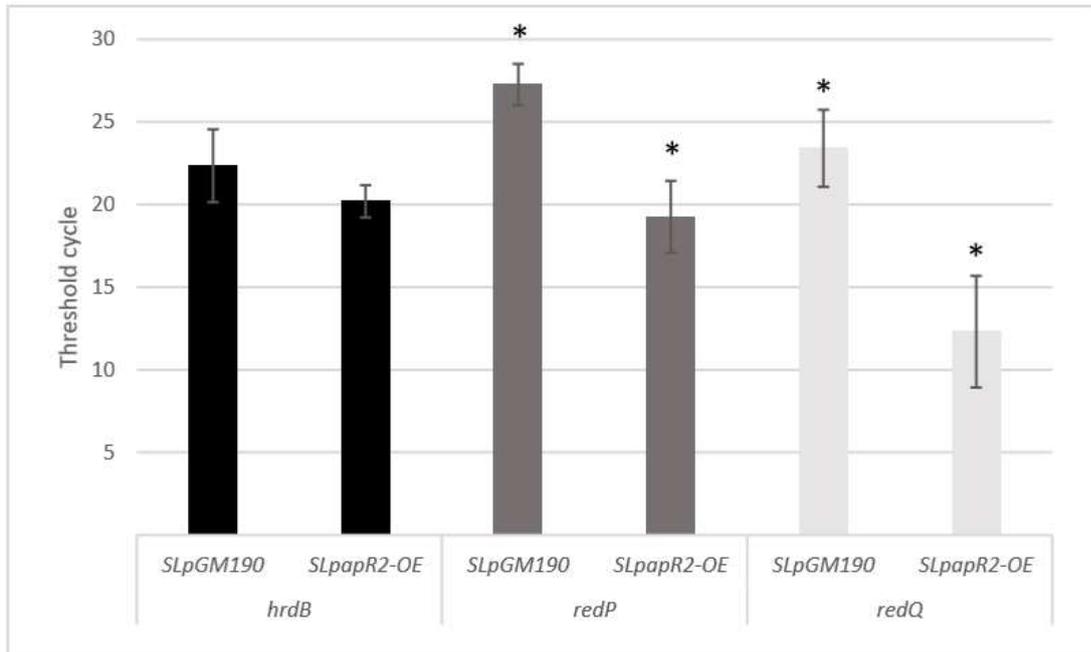


Figure 5: RT-qPCR analysis of *SLpGM190* and *SLpapR2-OE*. Graph shows threshold cycle of the genes *hrdB*, *redP* and *redQ* in RT-qPCR reactions with cDNA derived from 72 h samples of cultures of *SLpGM190* and *SLpapR2-OE* ($n=6$). * means significance.

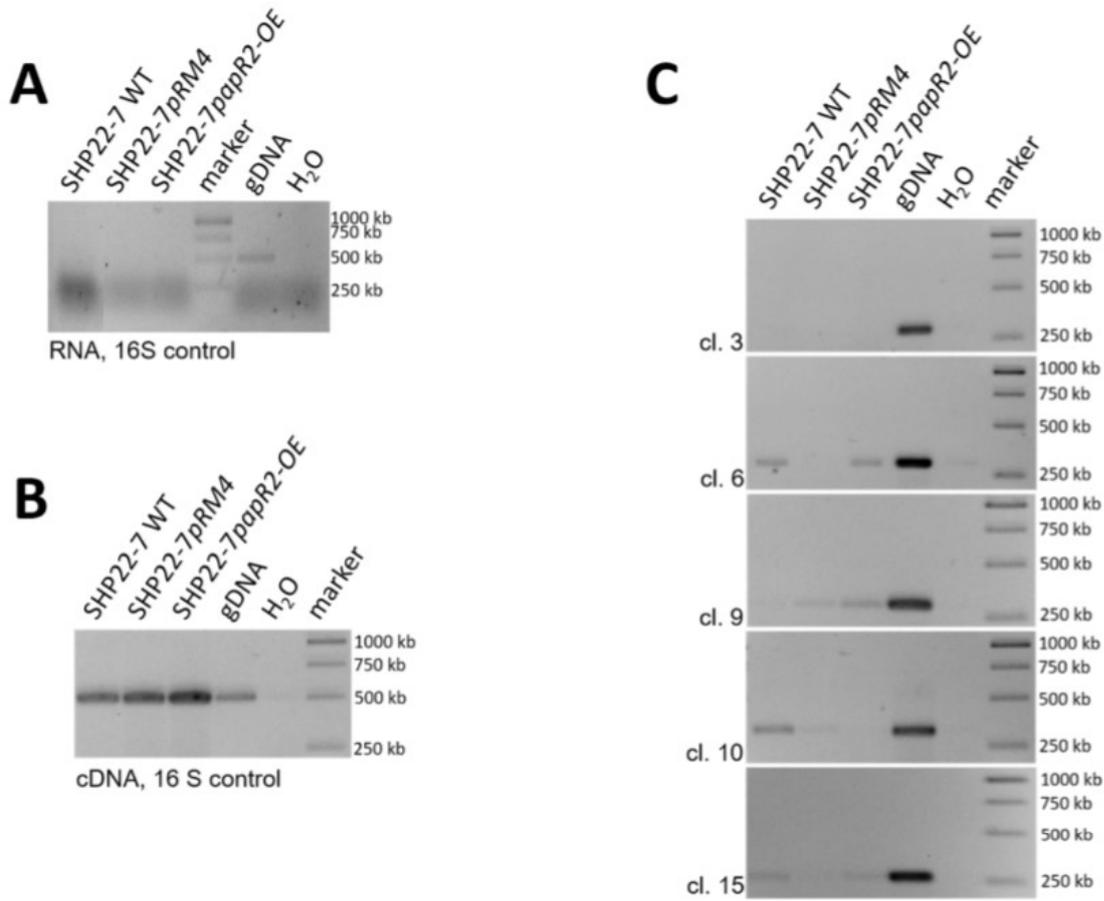


Figure 6: Transcriptional analysis of the SHP22-7 strains SHP22-7 WT, SHP22-7pRM4 and SHP22-7papR2; gDNA of SHP22-7 was used as a positive (gDNA) and water as a negative control. The samples are representative for four independent experiments. PCR analysis of DNA remains in the RNA (**A**). Proof for the presence of cDNA (**B**). Transcriptional analysis of the SARP containing gene clusters (cl.) 3, 6, 9, 10 and 15 in the strains SHP22-7 WT, SHP22-7pRM4 and SHP22-7papR2 (**C**).

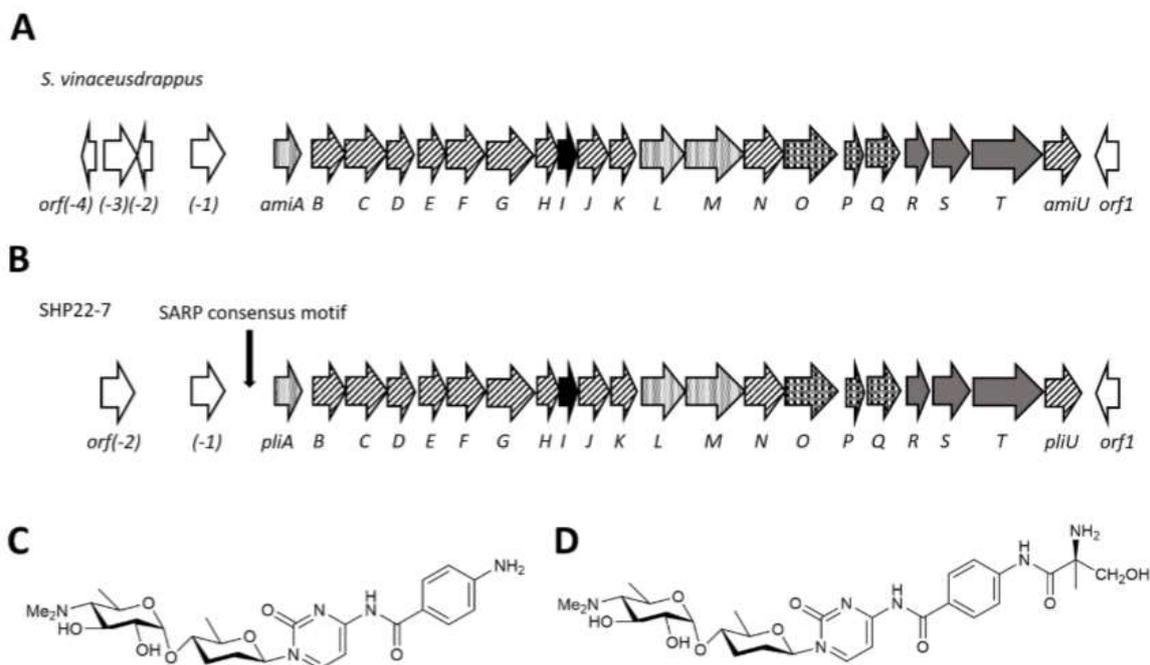


Figure 7: Schematic organization of the amicetin biosynthetic gene cluster of **(A)** *S. vinaceusdrappus* according to (Zhang et al. 2012) and of **(B)** SHP22-7. Chemical structures of **(C)** plicacetin and **(D)** amicetin. α -methylserine residue is highlighted in red.

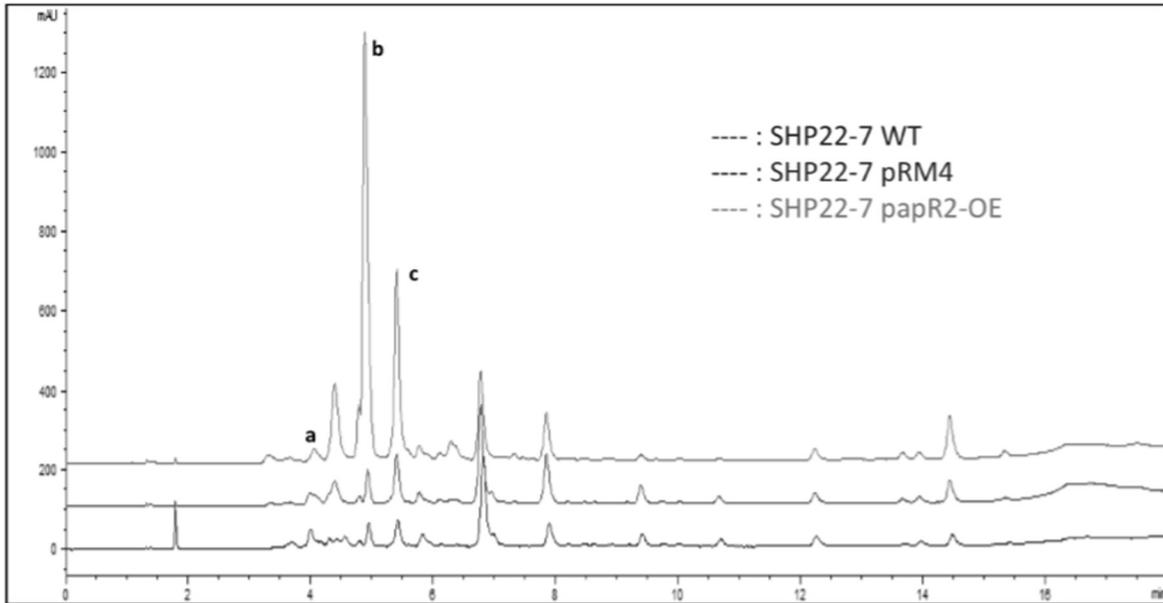
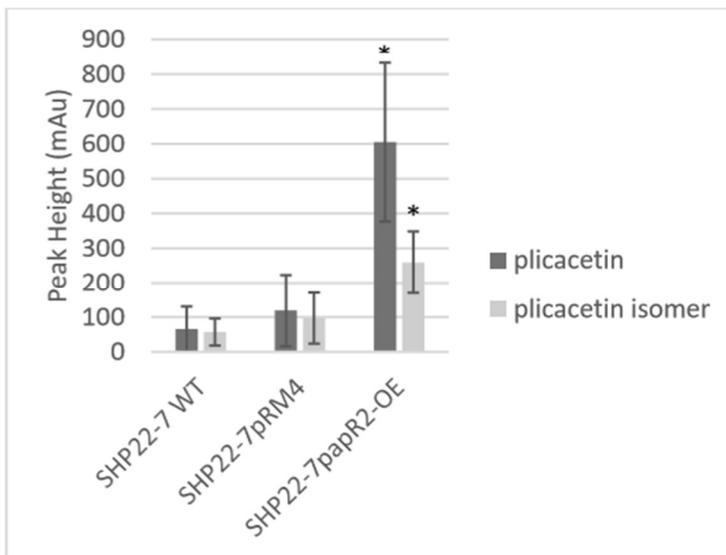
A**B**

Figure 8: Amicetin, plicacetin and plicacetin isomer production in the strains SHP22-7 WT, SHP22-7*pRM4* and SHP22-7*papR2-OE*. (A) HPLC profile of all three strains. Peaks representing amicetin are marked with **a**, plicacetin marked with **b** and plicacetin isomer marked with **c**. (B) Graphical representation of production levels of plicacetin and plicacetin isomer in each strain. n=10; * means significance.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt...

...Prof. Dr. Yvonne Mast für ihre langjährige, hervorragende Betreuung, dass sie mir immer mit guten Ratschlägen geholfen und mich bei diversen Versuchen, Auswertungen, Präsentationen sowie dieser Arbeit unterstützt hat.

...Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben für die Überlassung eines interessanten Projekts.

...Prof. Dr. Harald Groß für die Erstellung des Zweitgutachtens.

...Franziska Handel für die angenehme Laborpartnerschaft („Kannst du was für mich rausholen?“, „Kannst du da mal drüber gucken?“, „Die sind vegan.“)

...Regina Ort-Winklbauer für die Unterstützung bei diversen Protoplastentransformationen und die Vorarbeiten zu meinem Projekt.

...Mareike Vogt für ihre unermüdliche Arbeit am widerspenstigen Tü4103. Ich hoffe, du wirst noch viel Freude damit haben!

...Ira Handayani für die Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt. Terima kasih!

...allen weiteren Mitgliedern der AG Mast für das produktive Arbeitsklima und die leckeren Snacks bei unseren Gruppentreffen.

...Hamada Saad und Saefuddin Aziz für die Arbeit am GNPS-Clustering der indonesischen Isolate und der Aufreinigung des Phosphonats.

... Andreas Kulik, Aysun Engelhard, Thomas Härtner, Janina Lemaire und Pierre Lemaire, die uns allen die Arbeit so viel leichter machen.

...meinen Eltern, die mich bei allem, was ich tue, unterstützen.