

**Vollsynthetische Rekonstruktion eines Genclusters aus *Bacillus cereus* VD169 zur
Produktion des Antibiotikums FR-900493**

Dissertation

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

vorgelegt von
Tobias Otto Hermann Raichle
aus Kirchheim unter Teck

Tübingen
2019

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

25.06.2019

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Bertolt Gust

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Harald Groß

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	IX
1 Einleitung	1
1.1 Naturstoffe als Antibiotika	1
1.2 Die bakterielle Zellwandbiosynthese als Angriffspunkt	2
1.3 Nukleosid-Antibiotika als Hemmstoffe der MraY-Translokase	4
1.3.1 Antibiotika vom Tunicamycin-Typ	4
1.3.2 Antibiotika vom Capuramycin-Typ	5
1.3.3 Uridyl-Peptid-Antibiotika	5
1.3.4 Liponukleosid-Antibiotika	6
1.3.5 Weitere Nukleosid-Antibiotika	7
1.4 Genome Mining	10
1.5 Synthetische Biologie	12
1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
2.1.2 Geräte und Instrumente	19
2.1.3 HPLC-Säulen	20
2.1.4 Enzyme und Kits	20
2.1.5 Puffer und Lösungen	21
2.1.6 Medien	23
2.1.7 Primer	26
2.1.8 gBlocks®	34
2.1.9 Plasmide und Cosmide	44
2.1.10 Bakterienstämme	47
2.2 Mikrobiologische Methoden	48
2.2.1 Kultivierungsbedingungen	48
2.2.2 Produktion von Sekundärmetaboliten	48
2.3 Molekularbiologische Methoden	49
2.3.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	49
2.3.2 Transformation in <i>E. coli</i> durch Elektroporation	49
2.3.3 Transformation in <i>E. coli</i> durch chemische Kompetenz	49
2.3.4 Transformation in <i>Bacillus subtilis</i>	50
2.3.5 Blau-Weiß-Selektion	50
2.3.6 Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i>	51
2.3.7 Aufreinigung von DNA	51
2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA	52
2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese	52
2.3.10 DNA-Sequenzierung	53
2.3.11 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	53
2.3.12 DNA-Ligation	53
2.3.13 Isolierung von RNA aus <i>Bacillus subtilis</i>	53
2.3.14 Reverse-Transkriptase-Reaktion	55
2.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.3.16 Gibson-Assembly	57

2.3.17	Integration von gBlocks® via Red/ET-Rekombination	58
2.4	Analytische Methoden	60
2.4.1	Probenvorbereitung.....	60
2.4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	61
2.4.3	Aufreinigung und Aufkonzentrierung der LB- und P-Peaks.....	62
2.4.4	HPLC-MS und HPLC-MS ²	62
2.4.5	Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS).....	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Identifizierung eines Genclusters in <i>Bacillus cereus</i> VD169	63
3.1.1	Hintergrund: FR-900493 – ein Antibiotikum aus <i>Bacillus cereus</i> No. 2045	63
3.1.2	Entdeckung eines potenziellen Genclusters durch Genome Mining	65
3.2	Vollsynthetische Rekonstruktion des Genclusters	70
3.2.1	Vollsynthetische Herangehensweise: Die Entscheidung	70
3.2.2	Vollsynthetische Herangehensweise: Der Entwurf	72
3.2.3	Vollsynthetische Herangehensweise: Die Durchführung	77
3.3	Integration des Genclusters in <i>Bacillus subtilis</i>	88
3.3.1	Untersuchungen von <i>E. coli</i> Extrakten.....	88
3.3.2	Umklonierung des Genclusters in den Vektor pBS1C.....	88
3.3.3	Transformation in <i>Bacillus subtilis</i> 168	90
3.3.4	Analytische Betrachtung der <i>Bacillus subtilis</i> 168 / pBS1CTR01 Klone	92
3.4	Aktivierung des Genclusters durch Austausch der Promotoren	93
3.4.1	Betrachtung der Transkription mittels RT-PCR.....	93
3.4.2	Aktivierung durch Integration von Promotoraustauschkassetten	95
3.5	Produktion des Antibiotikums FR-900493.....	100
3.5.1	Probenvorbereitung.....	100
3.5.2	Analytische Betrachtung des <i>Bacillus subtilis</i> 168 / pBS1CTR03 Klons.....	101
3.5.3	Aufreinigung der Peaks und Bestätigung der Massen	105
3.5.4	Strukturaufklärung mittels hochauflösender Massenspektrometrie	108
3.6	Nachträgliche Integration von zwei weiteren Genen	115
4	Diskussion	119
4.1	Genome Mining.....	119
4.2	Vollsynthetische Rekonstruktion des Genclusters	120
4.2.1	Betrachtung der Vorarbeiten	120
4.2.2	Betrachtung des Rekonstruktionsprozesses.....	121
4.3	Aktivierung des Genclusters durch Austausch der Promotoren	124
4.4	Transformation in <i>Bacillus subtilis</i>	124
4.5	Produktion des Antibiotikums FR-900493.....	128
4.6	Biosynthetische Betrachtungen	130
4.7	Ausblick.....	134
Anhang	X	
Literaturverzeichnis	XIII	
Abbildungsverzeichnis	XXVI	
Tabellenverzeichnis	XXVII	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
<i>aac(3)/IV</i>	Apramycin Resistenzgen
<i>aadA</i>	Streptomycin / Spectinomycin Resistenzgen
ABC	ATP-bindende Kasette
ACN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADR	5''-Amino-5''-desoxyribose
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AmS	Aminosäuren
Apra	Apramycin
Ara	L-Arabinose
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
Carb	Carbenicillin
Cml	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DABA	Diaminobuttersäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
GlyU	5'-C-Glycyluridin
GPT	GlcNAc-1-Phosphat-Transferase
VI	

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
α -KG	α -Ketoglutarat
kb	Kilo Basenpaare
l	Liter
<i>lacZα</i>	β -Galactosidase Gen (α -Fragment)
<i>lacZω</i>	β -Galactosidase Gen (ω -Fragment)
LB-HK	LB-Medium Hauptkulturen
M	Molar
m	Meter
m	Milli (als Präfix)
MM	Master Mix
mb	Mega Basenpaare
MCS	Multiple Cloning Site (Polylinker)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<i>m</i> -DAP	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
Met	Methionin
MIC	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MTA	5'-Methylthioadenosin
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
n	Nano
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Kernspinresonanz
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

P-HK	P-Medium Hauptkulturen
P _i	Orthophosphat
PLP	Pyridoxalphosphat
PP _i	Pyrophosphat
PPTase	4'-Phosphopantetheinyl Transferase
R	Resistent
RBS	Ribosomale Bindestelle
RE	Restriktionsenzyme
RFP	Rotes Fluoreszenzprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale-RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S.	<i>Streptomyces</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumlaurylsulfat
sp.	Species
Spec	Spectinomycin
Strep	Streptomycin
Thr	Threonin
TRIS	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)propan-1,3-diol
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Die Substanz FR-900493 zählt zu den Nukleosid-Antibiotika mit ADR-GlyU Grundstruktur, zu welchen auch die Caprazamycine und Muraymycine gehören. Der Wirkmechanismus dieser Substanzen besteht in der Hemmung des Enzyms MraY-Translokase, welches eine essentielle Rolle im Rahmen der Peptidoglykan-Biosynthese spielt. Hier katalysiert das besagte Enzym die Übertragung des UDP-MurNAc-Pentapeptids an den membrangebundenen Undecaprenol-Phosphat Carrier. FR-900493 wurde erstmalig im Jahr 1989 aus Kulturen des Stammes *Bacillus cereus* No. 2045 isoliert und zeigt antibakterielle Eigenschaften gegen *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*. Obwohl die biosynthetischen Gencluster aller anderen Nukleosid-Antibiotika mit entsprechender Grundstruktur bereits identifiziert und beschrieben wurden, ist dies für FR-900493 bis heute nicht der Fall. Auch die Genomsequenz des Produzentenstammes ist zumindest in den öffentlich zugänglichen Datenbanken bisher nicht hinterlegt.

Diese Arbeit beschreibt erstmalig ein Gencluster, das zur Produktion von FR-900493 befähigt. Es wurde mittels „Genome Mining“ in der Genomsequenz des Stammes *Bacillus cereus* VD169 entdeckt, welcher jedoch aufgrund eines ebenfalls vorhandenen Virulenzplasmides für nähere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das ~25 kb umfassende Gencluster aus 45 künstlichen Einzelfragmenten vollsynthetisch rekonstruiert. Während dieses Gesamtprozesses kamen verschiedene Methoden der synthetischen Biologie zum Einsatz. Der sukzessive Aufbau erfolgte hierbei unter Anwendung der *in vitro* Methode des Gibson-Assembly. Um Sequenzfehler auszuschließen, wurde die Integrität der Zwischenstufen durch zahlreiche Sequenzierungen kontinuierlich überprüft. Nach erfolgreicher Rekonstruktion wurde das Gencluster anschließend zur Produktion in den Stamm *Bacillus subtilis* 168 integriert. Allerdings zeigte sich zunächst keine Produktion von neuen Sekundärmetaboliten. Die Analyse der Transkription mittels RT-PCR ergab, dass Teile des Genclusters noch transkriptionell inaktiv waren. Daher wurde eine Strategie zur Aktivierung dieses bisher stillen Genclusters entwickelt. Diese sah die Integration zweier weiterer synthetischer Hilfskonstrukte vor, um konstitutiv aktive Promotoren in das synthetische Gencluster einzubringen. Eine weitere Betrachtung der Transkription mittels RT-PCR bestätigte den Erfolg dieser Strategie. Das aktivierte Gencluster wurde anschließend erneut in den Produktionsstamm *Bacillus subtilis* 168 transformiert. Hieraus resultierten schließlich mehrere Klone, die tatsächlich das Antibiotikum FR-900493 sowie weitere biosynthetische Intermediate produzierten.

Der vollsynthetische Aufbau ganzer Gencluster ist äußerst selten – auf dem Gebiet der Nukleosid-Antibiotika ist diese Strategie bisher einmalig. Die innovative Herangehensweise dieser Arbeit auf Basis verschiedener Methoden der synthetischen Biologie kann daher als ein Pionierprojekt auf dem Gebiet der Identifizierung bioaktiver Naturstoffe betrachtet werden.

1 Einleitung

1.1 Naturstoffe als Antibiotika

Die Beschreibung des Penicillins durch Sir Alexander Flemming im Jahre 1929 stellte einen Meilenstein in der medikamentösen Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten dar (Fleming 1929). Nachdem die industrielle Produktion dieses Antibiotikums in den frühen 1940er Jahren etabliert war, stand großen Bevölkerungsgruppen ein effektives Mittel im Kampf gegen bakterielle Erkrankungen zur Verfügung (Gaynes 2017). In den darauffolgenden Jahren wurde innerhalb eines kurzen Zeitraums eine ganze Reihe weiterer Antibiotika entdeckt und entwickelt (Fernandes 2006). Die hierbei definierten Hauptklassen umfassen noch heute wesentliche Vertreter des alltäglichen klinischen Gebrauchs. Viele der ursprünglichen Antibiotika sind Naturstoffe, die aus bestimmten Pilzen oder Bakterien isoliert wurden. In den Nachkriegsjahren wurde verstärkt die Methode der chemischen Derivatisierung von Naturstoff-Antibiotika vorangetrieben (Wright et al. 2014). Mit diesen semisynthetischen Derivaten konnten die Wirkungsspektren erweitert, die Verträglichkeit verbessert und die pharmakokinetischen Eigenschaften optimiert werden. Auf diese Weise entstanden in den Klassen der Tetracycline, der Makrolide und auch der Penicilline zahlreiche Abkömmlinge, die ihren Ursprungssubstanzen teilweise weit überlegen waren (Wright et al. 2014). Neben den reinen Naturstoffen und den semisynthetischen Derivaten wurden auch bedeutende Antibiotikaklassen, wie beispielsweise die Fluorchinolone, auf rein chemisch-synthetischem Wege entdeckt und entwickelt (Andriole 1993). Dennoch stellen Naturstoffe und deren Abwandlungsprodukte nach wie vor den Großteil der antibakteriellen Pharmaka dar (Newman et al. 2016). Die anfänglichen Erfolge in der antibakteriellen Therapie bedingten allerdings den Trugschluss, diese Erkrankungen seien endgültig besiegt worden (Spellberg et al. 2004). Das Aufkommen von resistenten und multiresistenten Keimen stellt mittlerweile jedoch ein immer größer werdendes Problem dar. Gerade die Behandlung nosokomialer Infektionen entwickelt sich mehr und mehr zu einer schwierigen Herausforderung. Der Zunahme an resistenten Erregern stand im Laufe der Jahre unglücklicherweise ein drastischer Rückgang an Neuzulassungen antibiotisch aktiver Pharmaka entgegen (Alanis 2005). Der Entwicklung und Erforschung neuer Antibiotikaklassen sollte daher dringend wieder mehr Aufmerksamkeit entgegengebracht werden. Insbesondere auf dem Gebiet der Naturstoff-Forschung könnte noch viel verborgenes Potential liegen – gerade auch in Hinblick auf die sich stetig verbessernden Möglichkeiten der Molekularbiologie. So könnte heute die Technik des „Genome Minings“ in Verbindung mit der stetig wachsenden Datenmenge an DNA-Sequenzen eine vielversprechende Herangehensweise sein. Sollte sich der Rückgang an Neuzulassungen jedoch unvermindert fortsetzen, könnten die pharmazeutischen Errungenschaften des vergangenen Jahrhunderts auf diesem Gebiet zunehmend in Gefahr geraten.

1.2 Die bakterielle Zellwandbiosynthese als Angriffspunkt

Eine essentielle Eigenschaft sämtlicher Antibiotika besteht in der selektiven Toxizität auf Mikroorganismen. Diese wird durch Bindung der Substanzen an bestimmte bakterielle Zielstrukturen bedingt. Um einen therapeutischen Effekt bei geringstmöglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erreichen, sollte sich das pharmazeutische Target daher möglichst stark von jeglichen humanen Vergleichsstrukturen unterscheiden. Neben speziellen Enzymen wie der bakteriellen Gyrase oder Enzymen der Folsäurebiosynthese, ist insbesondere der gesamte Aufbauprozess der bakteriellen Zellwand ein wichtiger Angriffspunkt verschiedener Antibiotikaklassen (Bugg et al. 2011). Hierzu zählen neben sämtlichen β -Lactamen auch die Glykopeptid-Antibiotika sowie die Substanzen Fosfomycin und Bacitracin. Da der Gesamtprozess der Zellwandbiosynthese im menschlichen Organismus nicht existiert, ist dieser ein idealer Angriffspunkt für Antibiotika. Ein zentraler Baustein der bakteriellen Zellwand ist das sogenannte Peptidoglykan – ein Makromolekül, das netzartig die gesamte Zelle umgibt und essentielle Funktionen in Hinblick auf die Formstabilität, den osmotischen Druck und die Zellteilung ausübt (Mattei et al. 2010). Dieses, auch als Murein bezeichnete Biopolymer, setzt sich aus Ketten von alternierend angeordneten Monosacchariden zusammen, die über kurze Peptidbrücken miteinander quervernetzt sind und so eine dreidimensionale Struktur ausbilden (Holtje 1998). Die Zuckerketten enthalten die beiden Aminozucker *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die in abwechselnder Reihenfolge über β -1,4 glykosidische Bindungen verknüpft sind. Am Milchsäurerest der einzelnen MurNAc-Elemente befinden sich jeweils Pentapeptidreste der Grundstruktur L-Ala- γ -D-Glu-A_x-D-Ala-D-Ala (Winn et al. 2010). Hierbei kann „A_x“ entweder von der Aminosäure L-Lysin oder von der nichtproteinogenen Aminosäure *meso*-Diaminopimelinsäure (*m*-DAP) eingenommen werden (Winn et al. 2010). Die Aminosäure „A_x“ an Position 3 bildet nun eine Quervernetzung zum D-Ala an Position 4 eines benachbarten Pentapeptids unter Abspaltung des äußeren D-Alanins aus. Diese Quervernetzung erfolgt entweder direkt oder über ein kurzes Peptid-Zwischenstück (Barreteau et al. 2008). Das auf diese Weise aufgebaute Peptidoglykan umgibt die gesamte Bakterienzelle.

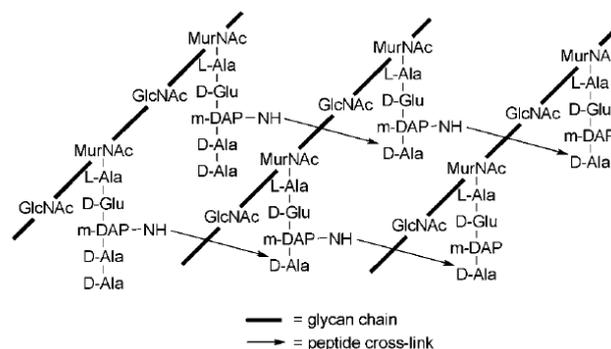


Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung der Peptidoglykan-Struktur.

Wiedergegeben aus (Winn et al. 2010). Abgedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Im Rahmen der Peptidoglykan-Biosynthese erfolgt im Cytoplasma zunächst die enzymatische Umwandlung von UDP-GlcNAc zum UDP-MurNAc, welchem anschließend die entsprechenden Aminosäuren angefügt werden. Das so gebildete Zwischenprodukt UDP-MurNAc-Pentapeptid wird daraufhin vom Enzym MraY-Translokase unter Abspaltung von UMP an den membrangebundenen Undecaprenol-Phosphat Carrier gebunden. Das resultierende Konstrukt wird als Lipid I bezeichnet. Nach Anfügen eines weiteren Elements GlcNAc entsteht das membrangebundene Pentapeptid-Disaccharid Lipid II. Dieses wird nun auf die andere Seite der Cytoplasmamembran transportiert, wo die Polymerisation zum Peptidoglykan durch Transglycosylierung und Transpeptidierung stattfindet (van Heijenoort 2001). Die letztgenannten Prozesse sind wichtige Angriffspunkte für die bedeutenden Antibiotika aus der Klasse der Glykopeptide bzw. der β -Lactame. Eine weitere vielversprechende Zielstruktur für Antibiotika stellt das Enzym MraY-Translokase dar. Zwar spielt es im klinischen Gebrauch bisher noch keine Rolle, doch sind bereits seit Jahren verschiedene Naturstoffe mit Nukleosid-Struktur bekannt, die durch Inhibierung dieses Enzyms antibiotische Wirkung entfalten. Das Enzym MraY-Translokase besteht aus insgesamt 10 Transmembran-Helices, wobei das aktive Zentrum intrazellulär lokalisiert ist. Hier wird die essentielle Übertragung von Lipid I auf den membrangebundenen Undecaprenol-Phosphat Carrier katalysiert (Koppermann et al. 2016). Durch kristallographische Untersuchungen der MraY-Translokase wurden bereits umfassende Erkenntnisse über deren Proteinstruktur gewonnen (Chung et al. 2013). Drei Jahre später konnte das Enzym sogar im Komplex mit dem gebundenen Inhibitor Muraymycin D2 kristallisiert werden, was tiefe Einblicke in dessen Bindungseigenschaften eröffnete (Chung et al. 2016).

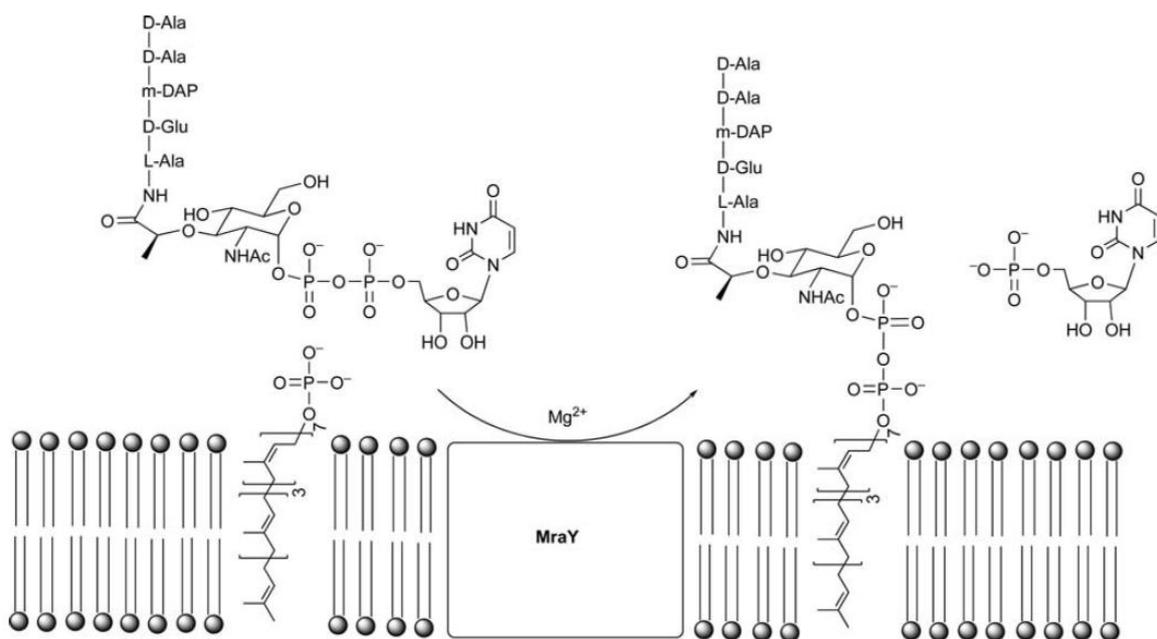


Abbildung 2: Darstellung der katalysierten Reaktion des Enzyms MraY-Translokase. Wiedergegeben aus (Winn et al. 2010). Abgedruckt mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Die Erkenntnisse aus der Kristallographie ergaben, dass *MraY* als Dimer vorliegt, wobei jedes Monomer 10 Transmembran-Helices und 5 intrazelluläre Loops umfasst und sowohl der N- als auch der C-Terminus extrazellulär lokalisiert sind (Chung et al. 2013). Darüber hinaus haben bereits vorherige Studien gezeigt, dass drei intrazellulär lokalisierte Asparaginsäuren essentiell für die katalytische Funktion sind (Lloyd et al. 2004, Al-Dabbagh et al. 2008). Interessanterweise ergab die Co-Kristallisation mit Muraymycin D2, dass die drei Asp-Elemente nicht direkt mit diesem Inhibitor in Kontakt stehen, sondern dass stattdessen das gesamte Enzym umfassenden Konformationsänderungen unterworfen ist (Chung et al. 2016). Für die Bindung des Inhibitors an das Enzym sind offenbar die Strukturelemente des Uracils und der damit verknüpften 5“-Amino-5“-desoxyribose (= ADR) von zentraler Bedeutung (Chung et al. 2016).

1.3 Nukleosid-Antibiotika als Hemmstoffe der *MraY*-Translokase

Im Laufe der vergangenen Jahre und Jahrzehnte wurden bereits einige Naturstoffe identifiziert, die durch Hemmung der *MraY*-Translokase antibiotische Eigenschaften aufweisen. Diese Substanzen variieren in Ihrem Aufbau teilweise recht stark. Sie weisen allerdings als Gemeinsamkeit alle eine Uridinstruktur auf. Daher können sie auch mit dem Überbegriff „Nukleosid-Antibiotika“ bezeichnet werden. Da manche dieser Vertreter strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, können diese in einzelne Gruppen zusammengefasst werden (Winn et al. 2010).

1.3.1 Antibiotika vom Tunicamycin-Typ

Bereits im Jahr 1970 wurde die Substanz Tunicamycin aus Kulturen von *Streptomyces lyso-superificus* isoliert (Takatsuki et al. 1971). Einige Jahre später erfolgte die Strukturaufklärung (Takatsuki et al. 1977). Da Tunicamycin stark den beiden Naturstoffen Streptoviridin und Corynetoxin ähnelt, lassen sich diese drei in einer gemeinsamen Strukturklasse zusammenfassen. Die Uracil-Base ist hier an einen speziellen C₁₁-Aminozucker namens Tunicamin gebunden, welcher wiederum ein Element GlcNAc sowie eine Fettsäure trägt (Winn et al. 2010). Die einzelnen Tunicamycin-Derivate unterscheiden sich strukturell in der Länge dieser Fettsäure.

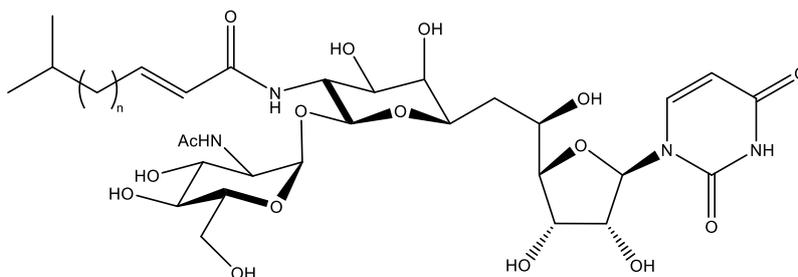


Abbildung 3: Struktur der Tunicamycine.

Aufgrund der charakteristischen Struktur werden diese Substanzen auch als Uridyl-Lipodisaccharid-Antibiotika bezeichnet. Neben der antibakteriellen Aktivität weist Tunicamycin allerdings auch eine ausgeprägte Toxizität gegen das humane Enzym GlcNAc-1-Phosphat-Transferase (GPT) auf, was dem Nutzen als Antibiotikum stark entgegensteht (Yoo et al. 2018).

1.3.2 Antibiotika vom Capuramycin-Typ

Im Jahr 1986 wurde die Substanz Capuramycin beschrieben – die Isolierung erfolgte aus Kulturen von *Streptomyces griseus* 446-S3 (Yamaguchi et al. 1986). Neben der Uridinstruktur und einer seltenen Uronsäure ist hier ein Caprolactam-Ring vorhanden, von welchem der Name Capuramycin abgeleitet wurde. Einige Jahre später wurden weitere strukturähnliche Capuramycin-Derivate aus verschiedenen *Streptomyces* und *Amycolatopsis* Stämmen isoliert sowie die MraY-Translokase als deren Zielstruktur identifiziert (Muramatsu et al. 2003, Muramatsu et al. 2004, Murakami et al. 2007). Im Jahr 2015 wurde zudem das Gencluster des Capuramycin-Derivats A-102395 identifiziert und hierbei dessen Biosynthese beschrieben (Cai et al. 2015).

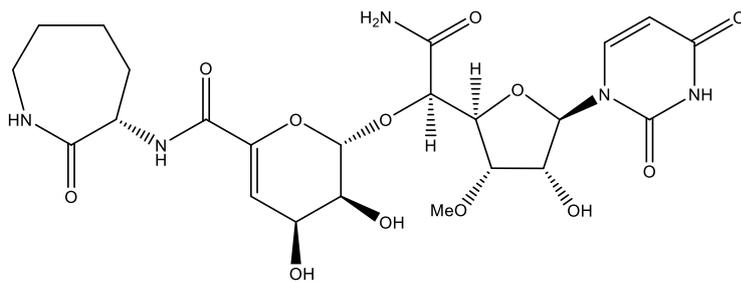


Abbildung 4: Struktur von Capuramycin.

1.3.3 Uridyl-Peptid-Antibiotika

Eine größere Gruppe innerhalb der Nucleosid-Antibiotika sind die sogenannten Uridyl-Peptide. Hierzu gehören die Pacidamycine (Karwowski et al. 1989), die Mureidomycine (Inukai et al. 1989), die Napsamycine (Chatterjee et al. 1994) und die Sansanmycine (Xie et al. 2007). Sämtliche dieser Substanzen wurden aus verschiedenen Streptomyceten isoliert und weisen vom Aufbau her eine 3'-Desoxyuridinstruktur auf, welche über eine 4',5'-Enamid-Bindung mit einer *N*-Methyl-2,3-diaminobuttersäure (= DABA) verknüpft ist. Mit der DABA-Struktur sind weitere Aminosäuren verbunden, die sich in den einzelnen Vertretern unterscheiden. Zusätzlich tragen alle Strukturen dieser Klasse eine Harnstoffbrücke zwischen den Aminosäuren der Position 4 und 5. Darüber hinaus enthalten viele Uridyl-Peptide innerhalb des Peptidrückgrats die seltene Aminosäure *meta*-Tyrosin bzw. davon abgewandelte bityklische Derivate. Da sie eine ausgeprägte Aktivität gegen den nosokomialen Problemkeim *Pseudomonas aeruginosa* aufweisen, sind die Uridyl-Peptide aus pharmakologischer Sicht besonders interessant.

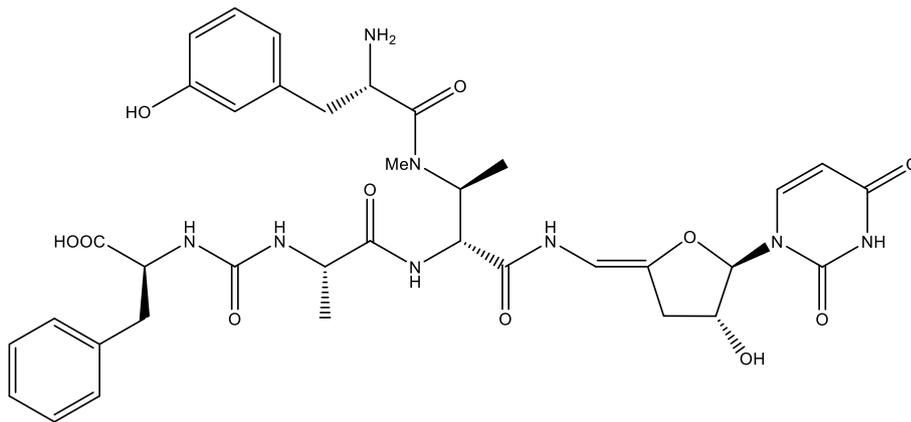
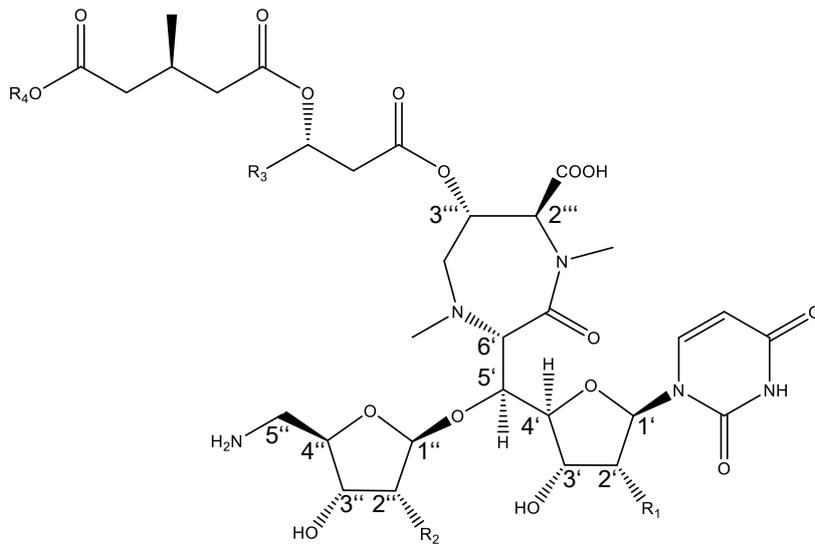


Abbildung 5: Struktur von Pacidamycin 5.

1.3.4 Liponucleosid-Antibiotika

Die Gruppe der sogenannten Liponucleoside umfasst die Strukturklassen der Caprazamycine (Igarashi et al. 2003, Igarashi et al. 2005), der Liposidomycine (Isono et al. 1985), von A-90289 (Funabashi et al. 2010) sowie der Muraminomicine (Chi et al. 2013). All diese Substanzen weisen ein Grundgerüst aus einer 5''-Amino-5''-desoxyribose (ADR) auf, welche mit einem 5'-C-Glycyluridin (GlyU) verbunden ist (= ADR-GlyU). Hierbei unterscheiden sich die einzelnen Substanzklassen in bestimmten Substituierungen. Im Falle der Muraminomicine fehlen diesem Grundgerüst die Hydroxygruppen an Position 2' und 2''. Die Liposidomycine weisen dagegen sulfatierte 2'' Hydroxygruppen auf (Ubukata et al. 1988). Ursprünglich wurden bei den Caprazamycinen ausschließlich Vertreter ohne eine solche Sulfatgruppe beschrieben. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch bei den Caprazamycinen entsprechende Derivate mit Sulfatierung vorkommen (Kaysser et al. 2010). Bei den Substanzen von A-90289 liegen ebenfalls sulfatierte Hydroxygruppen vor – hier allerdings an Position 2' und somit nicht an der Aminoribose, sondern an der Ribose des Uridin-Kerns. All diesen Substanzen ist dagegen der Diazepanon-Ring, ausgehend vom Glycylrest der Kernstruktur, gemein. Dieser Ring weist an beiden Aminogruppen Methylierungen auf, trägt an Position 2''' eine Carboxyl- und an Position 3''' eine Hydroxygruppe, welcher bei allen Vertretern der Liponucleoside eine β -hydroxylierte Fettsäure angehängt ist. Da sich diese Fettsäure in Hinblick auf Länge, Sättigungsgrad und Verzweigung unterscheidet, ist an dieser Stelle stets eine gewisse Strukturvariabilität vorhanden. Im Weiteren trägt die β -Hydroxygruppe der Fettsäure zusätzlich einen 3-Methylglutaryl-Rest. Diesem Rest ist sowohl bei den Caprazamycinen als auch bei A-90289 eine permethylierte Rhamnose angehängt. Die Muraminomicine tragen an dieser Stelle zwar keine Rhamnose, dafür aber eine seltene Heptose, die zusätzlich einen Bernsteinsäurerest trägt. Sämtliche Liposidomycine sind dagegen an der Methylglutaryl-Gruppe unsubstituiert. Die Gruppe der Liponucleosid-Antibiotika weist eine starke antibiotische Aktivität gegen Mykobakterien auf. Durch weltweite Resistenzentwicklungen erweist sich die Behandlung der

Tuberkulose, die vom Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* ausgelöst wird, zunehmend als problematisch. Die Tuberkulose-Behandlung zählt zu den wenigen Therapien, die eine Kombination mehrerer Antibiotika über einen langen Zeitraum erfordert. Aufgrund der klinischen Relevanz besteht hier ein hoher Bedarf an neuen Wirkstoffen, was die Liponukleoside für eine zukünftige klinische Anwendung besonders interessant macht. Mit dem semisynthetischen Caprazamycin-Derivat CPZEN-45 befindet sich bereits ein möglicher Kandidat dieser Klasse in präklinischen Studien (Salomon et al. 2013, Nakamura et al. 2016, Pstragowski et al. 2017).



Caprazamycine:

R1 = OH
R2 = OH oder OSO₃H
R3 = diverse Fettsäuren

A-90289:

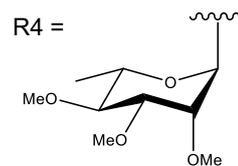
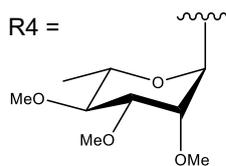
R1 = OSO₃H
R2 = OH
R3 = diverse Fettsäuren

Liposidomycine:

R1 = OH
R2 = OH oder OSO₃H
R3 = diverse Fettsäuren

Muraminomicin F:

R1 = H
R2 = H
R3 = -(CH₂)₁₀-CH₃



R4 = H

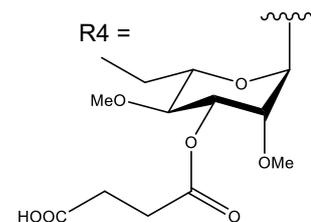


Abbildung 6: Strukturübersicht der Liponukleosid-Antibiotika.

1.3.5 Weitere Nukleosid-Antibiotika

Neben den bereits beschriebenen Substanzen existieren noch weitere Nukleosid-Antibiotika, die sich nicht eindeutig in eine der genannten Klassen einordnen lassen. Diese weisen alle eine ADR-GlyU-Grundstruktur auf und zeigen damit die größten Gemeinsamkeiten mit den bereits beschriebenen Liponukleosid-Antibiotika. Allerdings enthält keine dieser Substanzen einen Diazepanon-Ring und die damit verbundenen Strukturelemente. In den folgenden Abschnitten werden die Strukturen dieser weiteren Substanzen in kurzer Form beschrieben.

1.3.5.1 Sphaerimicin

Die Substanz Sphaerimicin wurde aus Kulturen des Stammes *Sphaerisporangium* sp. SANK 60911 isoliert und weist durch das Vorhandensein einer ADR-GlyU Grundstruktur gewisse Ähnlichkeiten zu den Liponukleosid-Antibiotika auf (Funabashi et al. 2013). Jedoch sind im Gegensatz zu diesen, hier die Aminoribose und der Glycylrest über einen dihydroxylierten Piperidinring miteinander verbunden. An dieses Strukturelement ist zusätzlich ein lineares Polyketid angefügt. Sphaerimicin zeigte in ersten Versuchen bereits vielversprechende antibakterielle Aktivität gegen verschiedene Gram-positive Erreger aus der Gattung *Staphylococcus*.

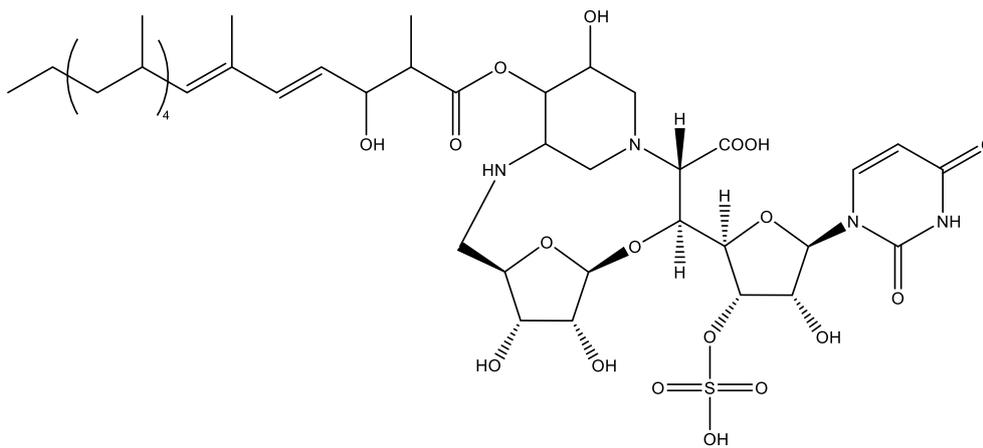


Abbildung 7: Struktur von Sphaerimicin A.

1.3.5.2 Muraymycin

Die Muraymycine weisen eine klassische ADR-GlyU Grundstruktur auf (McDonald et al. 2002, Cheng et al. 2011). Im Gegensatz zu den Liponukleosid-Antibiotika fehlt hier jedoch der Diazepanon-Ring vollständig. Die Glycylstruktur trägt hier stattdessen eine Aminopropyl-Kette, welcher ein kurzes Peptid angefügt ist, das einige seltene Strukturelemente wie beispielsweise ein Epicapreomycinid oder eine Harnstoffbrücke enthält. Manche Muraymycine weisen in ihrer Struktur ein hydroxyliertes Leucin auf, an welchem diverse Fettsäuren verestert sein können.

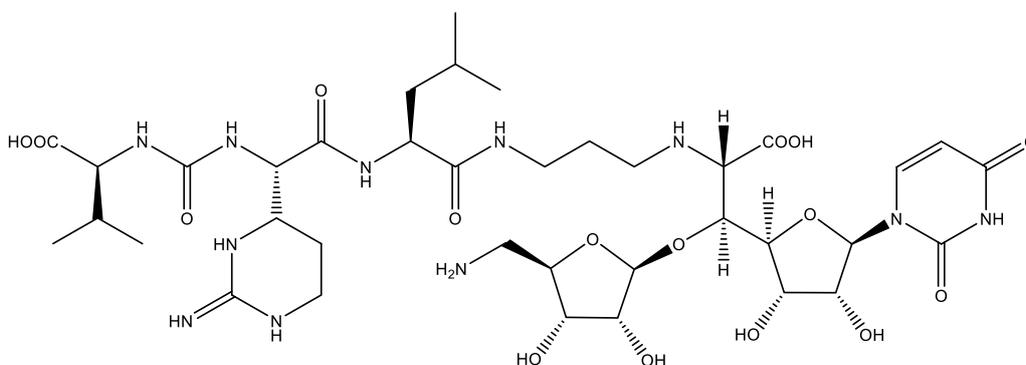


Abbildung 8: Struktur von Muraymycin D2.

1.3.5.3 FR-900493

Die Substanz FR-900493 wurde 1989 in Kulturen des Stammes *Bacillus cereus* No. 2045 entdeckt und stellt unter den Nukleosid-Antibiotika die einzige Struktur dar, die aus der Gattung *Bacillus* isoliert wurde (Ochi et al. 1989). Im Gegensatz zu den anderen Vertretern wurde hier nur diese eine Struktur beschrieben. Strukturell ist FR-900493 kleiner als die meisten anderen Nukleosid-Antibiotika. Die Substanz umfasst zwar das gesamte ADR-GlyU Grundgerüst, jedoch sind darüber hinaus nur zwei Substituenten an der Aminogruppe des Glycylrests in Form einer Methylgruppe sowie einer Aminopropyl-Kette vorhanden. FR-900493 ähnelt bis zu diesem Punkt strukturell stark den Muraymycinen. Diese enthalten jedoch noch zusätzlich einen Peptidanteil. FR-900493 weist antibakterielle Eigenschaften gegen *Staphylococcus aureus* sowie gegen *Bacillus subtilis* auf. Chemisch-synthetische Derivate von FR-900493 zeigen darüber hinaus auch Aktivität gegen das Bakterium *Clostridium difficile* (Mitachi et al. 2018).

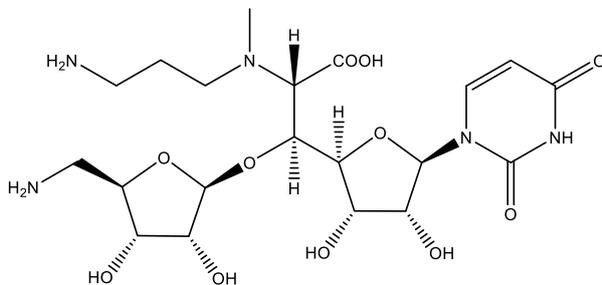


Abbildung 9: Struktur von FR-900493.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die große Gruppe der Nukleosid-Antibiotika einige vielversprechende Substanzen umfasst, die antibiotische Aktivitäten gegen viele jener Keime zeigen, welche sich aufgrund von zunehmender Resistenzbildung weltweit immer mehr zu einem klinischen Problem entwickeln. Hierzu zählen insbesondere die Stämme *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium tuberculosis*. Mit dem semisynthetischen Caprazamycin Derivat CPZEN-45 befindet sich bereits ein Vertreter dieser Strukturklasse in präklinischen Studien, was die Relevanz dieser Antibiotikagruppe unterstreicht.

1.4 Genome Mining

Bei sämtlichen Antibiotika des vorherigen Kapitels erfolgte die Entdeckung über die Identifizierung der Substanzen selbst. Meist wurde hierbei zunächst die antibiotische Aktivität von Kulturen der Produktionsstämme beobachtet und in Folge dessen nach den dafür verantwortlichen Substanzen gesucht. Nach Identifizierung der Bioaktivität erfolgte dann in der Regel die Strukturaufklärung und im Anschluss – oft erst Jahre später – wurde der genetische Hintergrund durch Identifizierung der entsprechenden Gencluster geklärt. Ein Paradebeispiel sind die Liposidomycine. Hier erfolgte die Entdeckung der antibiotischen Aktivität bereits im Jahr 1985 (Isono et al. 1985), die vollständige Strukturaufklärung gelang drei Jahre später (Ubukata et al. 1988). Das zugehörige Gencluster wurde allerdings erst viele Jahre später identifiziert und beschrieben (Kaysser et al. 2010). Dieser letzte Schritt ist bei manchen Vertretern bis heute nicht erfolgt, wie beispielsweise bei der Substanz FR-900493. Diese klassische Herangehensweise wird bereits seit Jahren und Jahrzehnten erfolgreich betrieben und hat zur Identifizierung etlicher Antibiotika und anderer Naturstoffe beigetragen. Allerdings hat diese Strategie auch einige Nachteile, da die Produktion von Naturstoffen nicht immer unter allen Bedingungen möglich ist. Viele potentielle Gencluster sind unter Laborbedingungen nicht aktiv und werden daher als „stille Gencluster“ bezeichnet (Ochi et al. 2013). Insbesondere die Medienzusammensetzung, der pH-Wert sowie die Temperatur und auch das Vorhandensein anderer Bakterienstämme können einen großen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten haben (Abdelmohsen et al. 2015). Daher stößt die klassische Herangehensweise in vielen Fällen mittlerweile an ihre Grenzen. Durch die rasant wachsenden Datenmengen an DNA-Sequenzen in verschiedenen frei zugänglichen Datenbanken entwickelte sich in den letzten Jahren eine neue Technik, die unter dem Namen „Genome Mining“ bekannt wurde (Wohlleben et al. 2016). Hier wird die Suche nach bioaktiven Naturstoffen vom Ende her betrieben. Zunächst werden bioinformatische Tools angewandt, um nach möglichen Genclustern in den genannten Sequenzdatenbanken zu suchen. Diese Tools arbeiten mit programmierten Algorithmen, die auf Basis bereits bekannter Gencluster entwickelt wurden. Beispiele wären die beiden Tools anti-SMASH (Medema et al. 2011, Blin et al. 2013) und PRISM (Skinnider et al. 2015), mit welchen komplette Gencluster identifiziert werden können. Ebenso können aber auch die Sequenzen einzelner Proteine mittels BLAST-Analyse zur Suche von Homologien verwendet und auf diese Weise verwandte Gene identifiziert werden (Altschul et al. 1990). Nachdem ein mögliches Gencluster gefunden wurde, wird die Sequenz in der Regel gründlich untersucht und den einzelnen Genen mögliche Funktionen zugeordnet (beispielsweise mittels BLAST-Analyse). Oft können hierbei bereits erste Prognosen über die möglichen Strukturen der resultierenden Naturstoffe erstellt werden. Anschließend wird der entsprechende Mikroorganismus kultiviert und auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hin untersucht. Leider hat sich herausgestellt, dass in vielen Fällen weit mehr Gencluster in den Genomen vorhanden

sind, als sich tatsächlich in Form von chemischen Metaboliten identifizieren lassen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein – letztendlich scheinen die natürlichen Signale, die Mikroorganismen zur Produktion dieser Substanzen stimulieren, unter Laborbedingungen offenbar nicht immer vorhanden zu sein (Rutledge et al. 2015). Die reine Identifizierung eines potentiellen Genclusters in einem Organismus ist somit oft nicht genug. Es müssen daher ebenfalls Möglichkeiten eröffnet werden, wie stille Gencluster soweit aktiviert werden können, dass auch tatsächlich eine Produktion der gesuchten Naturstoffe erfolgt. Um dies zu erreichen, wurden bereits zahlreiche verschiedene Methoden entwickelt und erfolgreich eingesetzt – zusammengefasst in (Rutledge et al. 2015). Hierbei werden epigenetische und spezifische Methoden unterschieden. Bei den erstgenannten werden allgemeine Mechanismen verändert, um dadurch die Expression von Genen in einem Organismus zu beeinflussen. Dies reicht von der Variation von Medienbestandteilen (Scherlach et al. 2006) über das Einbringen von Mutationen in RNA-Polymerasen (Hosaka et al. 2009) bis hin zur Einflussnahme auf die Chromatinstruktur (Williams et al. 2008). Bei den spezifischen Methoden werden konkrete Veränderungen am Gencluster durchgeführt. Beispielsweise kann die Überexpression bzw. die Deletion von Regulatorgenen vorgenommen werden, um die Expression eines Genclusters zu aktivieren (Laureti et al. 2011). Dies kann auch durch gezieltes Einbringen von Promotoren erreicht werden, deren Aktivität unabhängig von der natürlichen Regulation ist (Franke et al. 2012).

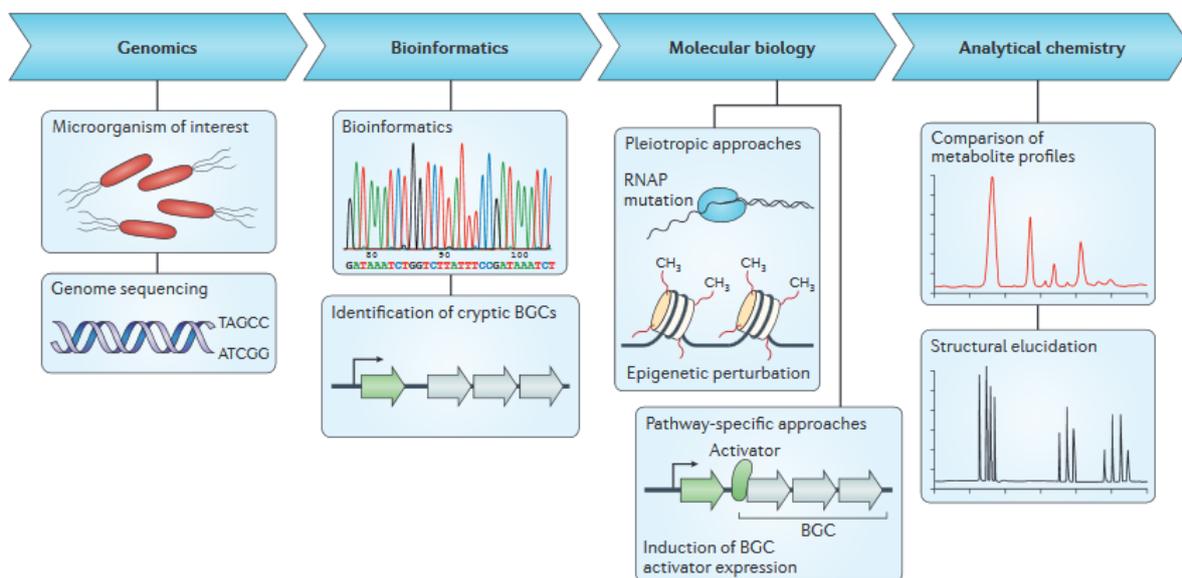


Abbildung 10: Darstellung der einzelnen Schritte im Prozess des Genome Minings.

Wiedergegeben aus (Rutledge et al. 2015). Abgedruckt mit Genehmigung der Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Reviews Microbiology, Copyright 2015.

Die genannten Methoden können aber nicht nur zur Entdeckung neuer Naturstoffe beitragen: So kamen beispielsweise auch unter den Nukleosid-Antibiotika bereits Methoden dieser Art zum Einsatz, um die Produktionsraten bereits bekannter Strukturen signifikant zu steigern. Zu

nennen wäre hier die gezielte Deletion des negativen Regulatorgens *mur34* im Muraymycin-Gencluster, welche sowohl im Wildtyp-Stamm als auch im heterologen Produzenten eine mindestens 10-fache Produktionssteigerung mit sich brachte (Xu et al. 2013).

1.5 Synthetische Biologie

Der Begriff „Synthetische Biologie“ ist bisher schwer definierbar. Seine Abgrenzung zu anderen Schlagwörtern wie „Metabolic Engineering“ oder „Biotechnologie“ ganz allgemein ist schwierig bis unmöglich (Stephanopoulos 2012, Gardner et al. 2013). Klar ist, dass die synthetische Biologie ein interdisziplinäres Feld darstellt, in dem viele Bereiche der Molekularbiologie, der Bioinformatik, der Biochemie und auch der Ingenieurskunst miteinander in Verbindung stehen. Trotz dieser schwammigen Definition hat die Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen zum Thema synthetische Biologie seit den 2000er Jahren bis heute stark zugenommen (Shapira et al. 2017). Ein Hauptelement der synthetischen Biologie stellt die industrielle Produktion künstlicher DNA dar. Insbesondere deshalb wird die Möglichkeit zur kostengünstigen Herstellung großer DNA-Mengen als Geburtsstunde der synthetischen Biologie diskutiert (Stephanopoulos 2012). Teilweise wird die synthetische Biologie auch mit dem Ziel in Verbindung gebracht, künstliches Leben *de novo* zu erzeugen – ein Gebiet, das auch moralische Fragen aufwirft. Die Diskussionen dazu haben bereits begonnen (Douglas et al. 2013, Christiansen 2016). Doch jenseits dieser Diskussionen werden auch große Visionen mit der synthetischen Biologie in Verbindung gebracht. Die Hoffnungen liegen hier in der Entwicklung von Biokraftstoffen, der Produktion von umweltfreundlichen Kunststoffen oder der Fixierung von CO₂ – Schlagwörter, die aktuell auf reges Interesse stoßen und positive Assoziationen hervorrufen. Bei solch großen Visionen sollte dennoch stets ein gewisses Maß an Skepsis beibehalten werden (Stephanopoulos 2012). Doch wie auch immer der Begriff „synthetische Biologie“ letztendlich definiert wird oder ob man dieselbe Thematik stattdessen unter dem Namen „Metabolic Engineering“ oder unter einem ganz anderen Namen bezeichnet – die Fähigkeit zur künstlichen Produktion von DNA hat der Wissenschaft große Möglichkeiten eröffnet. Die moralischen Fragen sollten jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Doch auch wenn man von den großen Zielen und Visionen abrückt und auf bereits etablierte Forschungsmethoden schaut, kann die synthetische Biologie auch auf diesen eher „kleinen“ Feldern sehr konkrete Hilfe leisten. Wie im vorigen Abschnitt ausführlich beschrieben, stehen dem Bereich der Naturstoff-Forschung mittlerweile eine Vielzahl an innovativen Methoden zur Verfügung. Eine große Herausforderung ist und bleibt hier die Aktivierung von stillen biosynthetischen Genclustern. Gerade durch den zunehmenden Bedeutungsgewinn der Methode des Genome Minings steigt die Zahl der potentiellen Gencluster unaufhörlich an. Nicht immer ist es möglich, solche Gencluster mit den etablierten Methoden zu aktivieren – ein Verlust an verborgenem

Potential. Dazu kommt, dass nicht jeder Stamm, der in den DNA-Sequenzen hinterlegt ist, auch tatsächlich zur Verfügung steht. Regulatorische und politische Gründe sowie Sicherheitsrisiken können der „globalen Mobilität“ von Mikroorganismen zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen im Wege stehen. Hierbei kann die synthetische Biologie unterstützende Hilfe leisten. Gewünschte DNA-Abschnitte können dadurch auf synthetischem Wege erlangt und stille Gencluster durch Umorientierung ihrer Architektur aktiviert werden. Daneben können auch Methoden der heterologen Expression zur Aufklärung von Biosynthesewegen durch Elemente der synthetischen Biologie ergänzt und verbessert werden (Luo et al. 2016).

Die synthetische Biologie ist bereits heute ein mächtiges Werkzeug auf dem Gebiet der molekularbiologischen Naturstoff-Forschung. Dennoch sind die Möglichkeiten bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Zwar ist die Synthese von einzelnen Genen oft möglich, jedoch gilt dies nicht für vollständige Biosynthesewege in Form größerer Gencluster. Zumindest heute besteht die größte Einschränkung in der *de novo* Synthese von größeren zusammenhängenden DNA Bereichen. Daher sind Methoden zur schnellen und effektiven Rekonstruktion solcher Strukturen, ausgehend von vielen kleinen DNA Fragmenten, zurzeit noch von zentraler Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Projekt vorgestellt, in welchem genau dies im Mittelpunkt steht: Es wird ein Gesamtprozess, beginnend beim Genome Mining, über die *de novo* Synthese vieler kleiner DNA-Fragmente, dem sukzessiven Aufbau dieser Fragmente zu einem Gencluster, dessen Aktivierung durch Integration synthetischer Hilfskonstrukte, bis schließlich zur heterologen Expression eines Antibiotikums in *Bacillus subtilis* beschrieben. Was in diesem Prozess noch lange Zeit in Anspruch nahm, könnte bei sich stetig verbessernden Rahmenbedingungen in Zukunft wesentlich effizienter erfolgen. Daher kann diese Arbeit auch als ein Pionierprojekt auf dem Gebiet der Identifizierung bioaktiver Naturstoffe betrachtet werden.

1.6 Zielsetzungen dieser Arbeit

Vor Beginn dieser Arbeit fielen im Rahmen von bioinformatischen Untersuchungen einzelne Gene innerhalb des Genoms von *Bacillus cereus* VD169 auf. Diese zeigten Homologie zu frühen Biosynthesegenen des bereits umfassend aufgeklärten Caprazamycin Genclusters.

▪ Zielsetzung 1: Genome Mining

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der ausführlichen Untersuchung der gesamten genetischen Umgebung dieser identifizierten Gene. Hierzu sollte der entsprechende Sequenzbereich mittels BLAST-Analyse und dem Analysetool „Phyre2“ betrachtet und sämtlichen identifizierten Genen mögliche Funktionen zugeordnet werden. Auf Basis dessen sollte die Entscheidung getroffen werden, ob hier tatsächlich ein eventuelles Gencluster für ein Nukleosid-Antibiotikum vorliegt und wo sich die möglichen Grenzen befinden könnten.

▪ Zielsetzung 2: Entwurf einer synthetischen Rekonstruktionsstrategie

Da die bioinformatischen Untersuchungen tatsächlich das Vorhandensein eines hoch interessanten Genclusters bestätigten, sollte zunächst eine Strategie zu dessen heterologer Expression entworfen werden. Da der Stamm *Bacillus cereus* VD169 aufgrund eines enthaltenen Virulenzplasmides nicht zur Verfügung stand, sollte mit Möglichkeiten der synthetischen Biologie eine geeignete Alternative zur klassischen Herangehensweise entworfen werden. Diese umfasste eine vollsynthetische Rekonstruktion des Genclusters durch einzelne, künstlich hergestellte DNA-Fragmente. Die Strategie sah den sukzessiven Aufbau eines knapp 25 kb umfassenden DNA-Bereichs ausgehend von 45 einzelnen gBlocks® vor.

▪ Zielsetzung 3: Sukzessiver Aufbau des Genclusters via Gibson-Assembly

Der zeitaufwändigste Teil dieser Arbeit bestand in der Durchführung der entworfenen Rekonstruktionsstrategie. Hierbei mussten Schritt für Schritt insgesamt 21 verschiedene Gibson-Assembly Reaktionen umgesetzt und überprüft werden. Im Rahmen dieses Gesamtprozesses kamen neben zahlreichen Transformationen, Restriktionsanalysen und PCR-Amplifikationen auch umfassende Sequenzierungen zum Einsatz. Da bei diesen Reaktionsschritten immer wieder einzelne Sequenzfehler aufgefallen sind, mussten in manchen Schritten teilweise hunderte Klone überprüft werden. Manche DNA-Bereiche konnten dennoch mit dem entwickelten Standard-Verfahren nicht korrekt aufgebaut werden. Für diese Fälle mussten alternative Strategien auf Basis diverser Stückelungen – teilweise unter Zuhilfenahme weiterer synthetischer Hilfskonstrukte – entwickelt und umgesetzt werden.

▪ **Zielsetzung 4: Transformation des Genclusters in *Bacillus subtilis***

Nachdem das Gencluster vollständig rekonstruiert war, musste es im Anschluss in den vorgesehenen Produktionsstamm *Bacillus subtilis* 168 transformiert werden. Um eine stabile Transformation zu erreichen, sollte dies in integrativer Weise in den *amyE*-Locus des *Bacillus subtilis* Genoms erfolgen. Für diesen Zweck sollte das rekonstruierte Gencluster zunächst in seiner Gesamtheit in den hierfür geeigneten Vektor pBS1C umklontiert werden.

▪ **Zielsetzung 5: Aktivierung des Genclusters durch synthetische Hilfskonstrukte**

Nachdem die ersten analytischen Betrachtungen des in *Bacillus subtilis* integrierten Genclusters keine Hinweise auf eine Produktion neuer Naturstoffe ergaben, sollte eine Methode zu dessen Aktivierung entworfen werden. Dafür musste zunächst der Grund für die Inaktivität ermittelt werden. Die Überprüfung der Genexpression via RT-PCR zeigte, dass Teile des Genclusters transkriptionell inaktiv waren. Daher sollte eine Methode zur Aktivierung der Transkription erarbeitet werden. Hierfür wurden zwei synthetische Promotoraustauschkassetten in Form von gBlocks® erstellt, die nachträglich in das rekonstruierte Gencluster integriert werden sollten. Nachdem die darauffolgende Betrachtung mittels RT-PCR nun eine vollständige transkriptionelle Aktivität bestätigte, sollte das auf diese Weise aktivierte Gencluster erneut in den Produktionsstamm *Bacillus subtilis* 168 transformiert werden.

▪ **Zielsetzung 6: Analytische Untersuchungen der produzierten Sekundärmetabolite**

Nachdem von vielen Transformanten hier nur ein Klon das korrekt integrierte Gencluster aufwies, sollte dieser Klon ausführlich analytisch untersucht werden. Da erste Betrachtungen tatsächlich Hinweise auf die Produktion neuer Metabolite ergaben, sollte eine analytische Methode erarbeitet werden, mit welcher die neuen Substanzen für nähere Untersuchungen ausreichend aufgetrennt werden konnten. Mit dieser Methode sollten die neuen Substanzpeaks soweit aufgereinigt werden, dass eine massenspektrometrische Untersuchung möglich wurde. Hierbei sollte ein Vergleich mit einem chemisch-synthetischen FR-900493 Standard sowie mit einer Negativkontrolle durchgeführt werden. Nachdem in den neuen Substanzpeaks tatsächlich vielversprechende Massen gefunden wurden, sollten zur Strukturaufklärung weitere Messungen mit der hochauflösenden Massenspektrometrie inklusive einer MS²-Fragmentierung vorgenommen werden. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sollten gründlich ausgewertet und die möglichen Strukturen der untersuchten Massen postuliert werden. Hierbei zeigte sich, dass tatsächlich exakt die Substanz FR-900493 sowie mehrere biosynthetische Intermediate von dem untersuchten Klon mit aktiviertem Gencluster produziert wurden. Der Nachweis gelang durch Vergleich mit dem chemisch-synthetischen FR-900493 Standard. Der produzierte Substanzpeak und der Standard wiesen

bei gleichen Retentionszeiten dieselben Massen mit jeweils identischen Fragmentierungsmustern auf. Somit konnte mit einer innovativen Herangehensweise auf Basis verschiedener Methoden der synthetischen Biologie erstmalig ein Gencluster für FR-900493 identifiziert, vollsynthetisch rekonstruiert, aktiviert und letztlich heterolog exprimiert werden.

▪ **Zielsetzung 7: Nachträgliche Integration von zwei weiteren Genen**

Für den synthetischen Rekonstruktionsprozess wurde ein größerer Bereich aus der Mitte des Genclusters ausgeklammert, da hier mehrere Gene für Transposasen vorhanden waren. Da dieser Bereich jedoch auch zwei weitere Gene enthielt, die möglicherweise in der Biosynthese bzw. dem Resistenzmechanismus eine Rolle spielen könnten, sollten diese beiden Gene nachträglich an das synthetische Gencluster angefügt werden. Hierfür wurde eine synthetische Integrationskassette erstellt, die mittels Red/ET-Rekombination an ein bereits aktives Operon angefügt werden sollte. Anschließend musste das erweiterte Gencluster erneut in den Produktionsstamm *Bacillus subtilis* integriert werden. Bei dieser Transformation zeigten sich auch nach zahlreichen Versuchen keine Klone mit vollständig integrierter DNA. Gerade die beiden zusätzlichen Gene wurden offenbar stets deletiert. Daher sollten diejenigen Klone untersucht werden, welche zumindest den ursprünglichen Teil des Genclusters enthielten. Hierbei konnten 7 weitere Klone identifiziert werden, die FR-900493 produzierten. Die Mengen waren mit denen des bereits beschriebenen Klons vergleichbar.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril	Fisher Scientific
Agar	Carl Roth
Agarose	Genaxxon Bioscience
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumeisen(III)-citrat	Carl Roth
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Santa Cruz Biotechnology
Apramycin	Genaxxon Bioscience
L-Arabinose	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
Butan-1-ol	Honeywell
Carbenicillin	Genaxxon Bioscience
Casaminsäuren	Becton, Dickinson and Company (BD)
Chloramphenicol	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumtetraborat-Dekahydrat (Borax)	Sigma-Aldrich
dNTP Mix	Genaxxon Bioscience
Eisen(III)-chlorid	Carl Roth
Ethanol	Honeywell
Ethylacetat	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Gel Loading Dye, Purple 6x	New England Biolabs
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company (BD)
Iod-Kaliumiodid Lösung nach Lugol	Carl Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Carl Roth

Kalimndihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fisher Scientific
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumglutamat	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Carl Roth
Kupfer(II)-chlorid	Carl Roth
Lösliche Stärke	Becton, Dickinson and Company (BD)
Lysing Matrix B Gefäß	MP Biomedicals
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Merck
Maisstärke (Mondamin Speisestärke)	Unilever
D-Maltose-Monohydrat	Merck
Mangan(II)-chlorid	Sigma-Aldrich
MaXtract High Density Tube (2ml)	Qiagen
β-Mercaptoethanol	VWR
Methanol	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumlaurylsulfat (SDS) 20%	Carl Roth
Nonidet P-40	AppliChem
Nutrient Broth	Becton, Dickinson and Company (BD)
Pepton	Becton, Dickinson and Company (BD)
PeqGREEN Lösung 20.000x	PEQLAB Biotechnologie
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol	Carl Roth
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Soyton	Becton, Dickinson and Company (BD)
Streptomycin	Sigma-Aldrich
TRIS (Base)	Sigma-Aldrich
Trypton	Becton, Dickinson and Company (BD)
L-Tryptophan	Fluka Analytical
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich
Zinkchlorid	Carl Roth

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial.

2.1.2 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Büchi Rotavapor R-210	BÜCHI Labortechnik
Büchi Vacuum Controller V-855	BÜCHI Labortechnik
Büchi Vacuum Pump V-700	BÜCHI Labortechnik
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG
Certomat U + Certomat HK	B. Braun
Concentrator Plus	Eppendorf AG
Destamat Bi 18 E	Heraeus
E-Box VX5	Vilber Lourmat
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare
FastPrep-24 Instrument	MP Biomedicals
Fedegari FVS3	Fedegari Autoclavi
Function Line B12	Heraeus
Function Line B6	Heraeus
HPLC 1100 Series	Agilent Technologies
HPLC 1200 Series	Agilent Technologies
iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330	Agilent Technologies
MaXis 4G	Bruker Daltronics
Mettler PM600	Mettler-Todelo
MicroPulser Electroporator	Bio-Rad Laboratories
MR Hei-Standard	Heidolph Instruments
Multifuge 1 S-R	Heraeus
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
New Brunswick innova44	New Brunswick Scientific
Novaspec II Spectrophotometer	Pharmacia LKB
peqSTAR 96x Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie
PerfectBlue Gelsystem Midi ExW	PEQLAB Biotechnologie
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PEQLAB Biotechnologie
Sartorius A120S	Sartorius AG
Sartorius MC210P	Sartorius AG
Sonorex RK 510 Transistor	BANDELIN electronic
Sprout Mini Centrifuge	Heathrow Scientific
Systemc DE-23	Systemc
Systemc VX-150	Systemc

Thriller Thermo-Inkubationsmischer	PEQLAB Biotechnologie
UltiMate 3000 HPLC Series	Thermo Fisher Scientific
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Tabelle 2: Geräte und Instrumente.

2.1.3 HPLC-Säulen

Bezeichnung	Hersteller
Reprosil Pur Basic-C18 (250 mm x 2 mm, 5 µm)	Dr. Maisch
Nucleodur PolarTec (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Macherey-Nagel
Nucleodur PolarTec (250 mm x 10 mm, 5 µm)	Macherey-Nagel
Luna® Omega Polar C18 (250 mm x 4,6 mm, 3 µm)	Phenomenex

Tabelle 3: HPLC-Säulen.

2.1.4 Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Diverse Restriktionsendonukleasen + CutSmart® Buffer + S-Adenosylmethionin (für Bael)	New England Biolabs
Gibson Assembly® Master Mix	New England Biolabs
iScript Reverse Transcriptase	Bio-Rad Laboratories
Lysozym	SERVA Electrophoresis
peqGOLD Cycle-Pure Kit	PEQLAB Biotechnologie
peqGOLD Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Eigenherstellung im Arbeitskreis
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase + Q5 Reaction Buffer (5x)	New England Biolabs
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen
RNase A	Macherey-Nagel
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eigenherstellung im Arbeitskreis
T4 DNA Ligase + T4 DNA Ligase Buffer (10x)	New England Biolabs

Tabelle 4: Enzyme und Kits.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurde als Lösungsmittel stets frisches doppelt-distilliertes Wasser verwendet, welches mit dem Gerät Destamat Bi 18 E (Heraeus) hergestellt wurde.

2.1.5.1 Puffer und Lösungen zur Plasmid- bzw. Cosmid-Isolierung aus *E. coli*

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration	Anmerkungen
Sol I	Glucose EDTA TRIS RNase A	50 mM 10 mM 25 mM 100 µg/ml	pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt RNase wurde frisch zugegeben
Sol II	NaOH SDS	0,2 M 1% (w/v)	wurde stets frisch zubereitet
Sol III	KAc	3 M	pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,2 eingestellt
NaAc-Lösung	NaAc	3 M	pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,2 eingestellt
TRIS-Puffer	TRIS	10 mM	pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt

Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Plasmid- bzw. Cosmid-Isolierung aus *E. coli*.

2.1.5.2 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration	Anmerkungen
TAE-Puffer (50x)	TRIS EDTA Eisessig	2 M 50 mM 57,1 ml/l	pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt
Ladepuffer (6x)	Bromphenolblau Xylencyanol FF Glycerol 98% TAE-Puffer (50x) H ₂ O	30 mg 30 mg 60 ml 0,5 ml ad 100 ml	

Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

2.1.5.3 Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration	Anmerkungen
IPTG-Lösung	IPTG	33 mM	sterilfiltriert
X-Gal-Lösung	X-Gal	2% (w/v) in DMSO	

Tabelle 7: Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion.

2.1.5.4 Puffer für die PCR-Reaktion

Folgender Puffer wurde für sämtliche PCR-Ansätze mit der im Arbeitskreis eigens hergestellten *Taq*-Polymerase bzw. dem ebenfalls eigens hergestellten Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase (10:1) verwendet. Für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) wurde stattdessen stets der im Lieferumfang enthaltene Q5 Reaction Buffer (5x) verwendet.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration	Anmerkungen
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	TRIS KCl Nonidet P-40 MgCl ₂	100 mM 500 mM 0,8% (w/v) 15 mM	pH-Wert wurde auf 9,0 eingestellt

Tabelle 8: Puffer für die PCR-Reaktion.

2.1.5.5 Puffer und Lösungen zur RNA-Isolierung aus *Bacillus subtilis*

Für die RNA-Isolierung aus *Bacillus subtilis* wurden die separat erhältlichen Kits RNAprotect Bacteria Reagent, RNeasy Mini Kit und RNase-Free DNase Set verwendet (alle: Qiagen).

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration	Anmerkungen
TE-Puffer	TRIS EDTA	10 mM 1 mM	pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt
Gemisch aus Lysozym + TE-Puffer	Lysozym in TE-Puffer	5% (w/v)	wurde stets frisch zubereitet
Gemisch aus β-Mercaptoethanol + RLT-Puffer	β-Mercaptoethanol in RLT-Puffer	1% (v/v)	RLT-Puffer ist Bestandteil des RNeasy Mini Kits
Gemisch aus DNase I + RDD-Puffer	DNase I RDD-Puffer	20 µl (c = 2,73 Kunitz units/µl) 140 µl	Beide: Bestandteil des RNase-Free DNase Set

Tabelle 9: Puffer und Lösungen zur RNA-Isolierung aus *Bacillus subtilis*.

2.1.5.6 Antibiotika-Lösungen

Antibiotikum	Lösungsmittel	c (Stammlösung) [mg/ml]	c (im Medium) [µg/ml]
Apramycin	H ₂ O	50	50
Carbenicillin	H ₂ O	50	50
Chloramphenicol	Ethanol 70% (v/v)	25	25 <i>E. coli</i> 5 <i>B. subtilis</i>
Kanamycin	H ₂ O	50	50
Streptomycin	H ₂ O	50	50

Tabelle 10: Antibiotika-Lösungen.

Sämtliche Antibiotika-Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Alle in Wasser gelösten Stammlösungen wurden direkt nach der Zubereitung sterilfiltriert. Sofern nicht anders angegeben, wurden pro 1 ml Medium je 1 µl Stammlösung zugegeben. Bei Festmedien erfolgte die Antibiotikazugabe zur handwarmen Lösung kurz vor dem Gießen der Platten. Für die Selektion mit Chloramphenicol wurden für *E. coli* und *Bacillus subtilis* jeweils unterschiedliche Endkonzentrationen verwendet. Bei *E. coli* betrug diese 25 µg/ml und bei *Bacillus subtilis* 5 µg/ml.

2.1.6 Medien

Für die Herstellung sämtlicher Medien wurde stets frisches doppelt-destilliertes Wasser verwendet. Die pH-Wert Einstellung erfolgte durch Zugabe von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH (sofern nicht anders angegeben). Festmedien wurde vor dem Sterilisationsprozess Agar in einer Konzentration von 2% (w/v) zugegeben. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 20 min. In der Regel wurden die Medien auf 50-100 ml aliquotiert und in Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur gelagert. Hitzeempfindliche Medienbestandteile wurden in Lösung sterilfiltriert und vor Verwendung direkt zugegeben. Für das Gießen von Festmedien wurden diese zunächst in der Mikrowelle verflüssigt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurden ggfs. Antibiotika-Lösungen zugesetzt und anschließend die Medien in Petrischalen gegossen.

LB-Medium (Luria-Bertani) (Sambrook et al. 2001)

Hefeextrakt	5,0	g
NaCl	10,0	g
Trypton	10,0	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

SOB-Medium (Super Optimal Broth) (Sambrook et al. 2001)

Hefeextrakt	5,0	g
KCl	0,186	g
NaCl	0,5	g
Trypton	20,0	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

SOC-Medium (Sambrook et al. 2001)

Hefeextrakt	5,0	g
KCl	0,186	g
NaCl	0,5	g
Trypton	20,0	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurden 20,0 ml einer sterilfiltrierten 2 M Glucose-Lösung zugegeben.

P-Medium (Fronko et al. 2000)

Lösliche Stärke	10,0	g
D-Maltose	20,0	g
Soyton	10,0	g
Spurenelemente-Lösung	5,0	ml
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt.

Spurenelemente-Lösung:

ZnCl ₂	40	mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200	mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10	mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10	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
H ₂ O	ad 1000	ml

MNGE-Medium (Harwood et al. 1990)

MN-Medium (10x)	920	µl
H ₂ O	8,28	ml
Glucose 20% (w/v)	1,0	ml
K-Glutamat 40% (w/v)	50	µl
Ammonium Eisen(III)-citrat (2,2 mg/ml)	50	µl
L-Tryptophan (5 mg/ml)	100	µl
MgSO ₄ (1 M)	30	µl

MN-Medium (10x):

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	136	g
KH ₂ PO ₄	60	g
Natriumcitrat	10	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Die Bestandteile wurden einzeln hergestellt und separat sterilfiltriert (H₂O wurde autoklaviert). Vor Gebrauch wurden die Bestandteile zum MNGE Medium zusammengefügt.

Expression-Mix

Casaminosäuren 10% (w/v)	250	µl
Hefeextrakt 5% (w/v)	500	µl
H ₂ O	250	µl
L-Tryptophan (5 mg/ml)	50	µl

Die Bestandteile wurden einzeln hergestellt und separat sterilfiltriert (H₂O wurde autoklaviert). Vor Gebrauch wurden die Bestandteile zum Expression-Mix zusammengefügt.

FR-Produktionsmedium (Ochi et al. 1989)

Corn steep liquor	20,0	g
NaCl	5,0	g
Polypepton	20,0	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Maisstärke-Medium (zum $\Delta amyE$ -Nachweis)

Nutrient Broth	7,5	g
Maisstärke	5,0	g
Agar	1,5	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Der Stärkenachweis mit Lugol'scher Lösung zeigte die deutlichsten Ergebnisse, wenn das Medium mit reiner Maisstärke (z.B. Mondamin) hergestellt wurde.

2.1.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics in Form von „Custom DNA Oligos in Tubes“ bezogen. Nach Lieferung wurden diese in TRIS-Puffer (10 mM, pH8) gelöst und hierbei auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte stets bei -20°C.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Primer zur Amplifikation der 45 gBlocks®:		
1	BC1_f	AAAAATATTTTACATGGATCTAGG
2	BC1_r	ATGGAAGATTAGCCTTTAAG
3	BC2_f	GATCTGAATCCTTAAAGGCTAATC
4	BC2_r	CTGAATGGTGATTCTAAAGGTAAC
5	BC3_f	TGCTTTGTTACCTTTAGAATC
6	BC3_r	TAAACGTCTAATGGTAGAATC
7	BC4_f	AAGTTTCCTGATTCTACCATTAG
8	BC4_r	TCAATGAAGGCTAATCCAAATC
9	BC5_f	AACGAAGGGATTTGGATTAG
10	BC5_r	CTCCAACCAGCACAAATAG
11	BC6_f	GAATGTTAGGATCTATTGTGC
12	BC6_r	ACCTATATTTGAAATCGTAGATTC
13	BC7_f	GGTAACGAATCTACGATTTTC
14	BC7_r	TAGGTACGGCAATACCAG
15	BC8_f	GAATTTCAACACCTGGTATTGC
16	BC8_r	TGGCTGGAGCTATGATAGTAC
17	BC9_f	TATCGATTGGTACTATCATAGCTC
18	BC9_r	ATTGGGTCGATCAAGGTG
19	BC10_f	CACCTATAACATCACCTTGATC
20	BC10_r	CAATAAGGGATGTAACAGCG
21	BC11_f	ATTCTGCAGTCGCTGTTAC
22	BC11_r	GTAGACAAGATCTCAAATTCTGAATC
23	BC12_f	TCCAGATTCAGAATTTGAGATCTTG
24	BC12_r	ATGATTGGGCCACCTTCTG
25	BC13_f	ACGATTCACGGCAGAAGG
26	BC13_r	GTGTTGATTTAAAGGTGGAGATCTAC
27	BC14.1_f	CTTCGTAGATCTCCACC
28	BC14.1_r	TTTAAGAATATATTGACATTTATTGAC
29	BC14.2_f	CCAAGAGCAGTCAATAAATGTCA
30	BC14.2_r	GTGCCCCGCGAAAGTTC

31	BC14.3_f	ATGAGGATCATTGGAAC TTTTCG
32	BC14.3_r	CCCGAAGCTTTCTGCTAAC
33	BC15_f	GCTACTCAACAGTTAGCAG
34	BC15_r	TACTCCTAAGCGTAGAATTGAC
35	BC16.1_f	GCACCAGAGTCAATTCTAC
36	BC16.1_r	CTGGATTTAATTTCTTCTGGAGAAC
37	BC16.2_f	TAATGGTTCTCCAGAAGAAATTAAATC
38	BC16.2_r	CGGATGATTGTATCCACAAC
39	BC16.3_f	TTAAATGCAAGTTGTGGATACAATC
40	BC16.3_r	CTGTTTCAGTTGCTTCAGAAC
41	BC17_f	GTA CTAGCGTTCTGAAGC
42	BC17_r	TTACTTGGATTGTAGCCAAAGC
43	BC18_f	CAGCTGCAGCTTTGGCTAC
44	BC18_r	CAGTCTATTGATAAATAGACTGTGGC
45	BC19.1_f	CAGTCTATTTATCAATAGACTGTG
46	BC19.1_r	AGAAAAAGCGTATGAAACAATTATC
47	BC19.2_f	TCGAGTGGTTGAAGATAATTG
48	BC19.2_r	TCAATTAGAGTTTCGATAGA ACTC
49	BC20_f	AAGTAAAGAGTTCTATCGAACTC
50	BC20_r	ATTGCAGCGATTACCAGATC
51	BC21_f	GGCAAATTTGGATCTGGTAATC
52	BC21_r	GGCAATCTCCTGCAAT TTC
53	BC22_f	AAGAACCAGTTGAAATTGCAG
54	BC22_r	CAAAATGTAGGACTAGGTGTTG
55	BC23_f	TTTCATTGCAACACCTAGTC
56	BC23_r	ATAGGTATAGCAACGGGAC
57	BC24_f	AATCCAAGTTCGTCCCGTTG
58	BC24_r	TAGTACCGGAAGCGATTTCG
59	BC25_f	CTTTAAGTTTACGAATCGCTTC
60	BC25_r	TCAACATATTCCATCGGAAAC
61	BC26_f	ACCCATGCTGTTTCCGATG
62	BC26_r	GTTATAATTCCATGTGGAGGTATAGG
63	BC27_f	TTCCCTATACCTCCACATG
64	BC27_r	TCGCTATTCAATTATCAACTTGC
65	BC28_f	AAATAATGCAAGTTGATAATTGAATAG
66	BC28_r	GATATCACCATCTAAGCTGC
67	BC29_f	TGTTTCAGTTCGCAGCTTAG

68	BC29_r	ATTTAATAGACTCTTTGACTACTTCTG
69	BC30_f	CATCAGAAGTAGTCAAAGAGTC
70	BC30_r	GTTACTTGACGAGGTAACC
71	BC31_f	TCTAATCCTGAGGTTACCTC
72	BC31_r	ACATTGGAAGTATCATGTCTTTAG
73	BC32_f	GCAATTCCTAAAGACATGATACTTC
74	BC32_r	AGCACATGCTGTCTTAACAG
75	BC33_f	GGTACTCCAAGTGAAGAC
76	BC33_r	AATTACAGAAGGGCAGAATAC
77	BC34_f	GTAATTACTGTATTCTGCCCTTC
78	BC34_r	AGTCGCTACAAAGTACAGG
79	BC35_f	CTGTTTCGATACCTGTACTTTG
80	BC35_r	CCGTGGATAGTCAAATAACTATG
81	BC36_f	GAAGATGCATAGTTATTTGACTATC
82	BC36_r	CCTCGAAGATACATTAGGATG
83	BC37_f	CTAATATCCCATCCTAATGTATCTTC
84	BC37_r	AAAGCTTGGTTTGGAGGAAG
85	BC38_f	ATTGGCTAGACTTCCTCC
86	BC38_r	AATTAGAACTGAAACCGCAG
87	BC39_f	AAACATACCCTGCGGTTTC
88	BC39_r	GTAGGGAACCTAAATTTGGGAATC
89	BC40_f	CTAATCGATTCCCAAATTTAGGTTC
90	BC40_r	GTAAACTCAATGCTCCTAAGAAAG
Alternative Primer zur Amplifikation der gBlocks® BC18, BC19.1, BC26 und BC34:		
91	BC18_2f	CAGCTGCAGCTTTGGC
92	BC18_2r	CAGTCTATTGATAAATAG
93	BC19.1_2f	CAGTCTATTTATCAATAG
94	BC19.1_2r	AGAAAAAGCGTATGAAAC
95	BC26_2f	ACCCATGCTGTTTCC
96	BC26_2r	GTTATAATTCCATGTG
97	BC34_2f	GTAATTACTGTATTCTGCC
98	BC34_2r	AGTCGCTACAAAGTACAG
Primer zur Vektor-Amplifikation (Schritt 1):		
99	pBlue_sk+_1f	CTCAGTCCTAGATCCATGTAAAATATTTTTCACTGCATCG AATTCCTGCAGCCCGG
100	pBlue_sk+_1r	AAGTTTCCTGATTCTACCATTAGACGTTTACTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG

101	pBlue_sk+_2f	TAAACGTCTAATGGTAGAATCAGGAACTTCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
102	pBlue_sk+_2r	GGTAACGAATCTACGATTTCAAATATAGGTCCTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
103	pBlue_sk+_3f	ACCTATATTTGAAATCGTAGATTCGTTACCCACTGCATCG AATTCCTGCAGCCCGG
104	pBlue_sk+_3r	CACCTATAACATCACCTTGATCGACCCAATCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
105	pBlue_sk+_4f	ATTGGGTCGATCAAGGTGATGTTATAGGTGCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
106	pBlue_sk+_4r	ACGATTCACGGCAGAAGGTGGCCCAATCATCACTGCTC GATACCGTCGACCTCGAG
107	pBlue_sk+_5f	ATGATTGGGCCACCTTCTGCCGTGAATCGTCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
108	pBlue_sk+_5r	GCACCAGAGTCAATTCTACGCTTAGGAGTACACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
109	pBlue_sk+_6/16f	TACTCCTAAGCGTAGAATTGACTCTGGTGCCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
110	pBlue_sk+_6/19r	AAGTAAAGAGTTCTATCGAACTCTAATTGACACTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
111	pBlue_sk+_7f	TCAATTAGAGTTCGATAGAACTCTTTACTTCACTGCATCG AATTCCTGCAGCCCGG
112	pBlue_sk+_7r	TTTCATTGCAACACCTAGTCCTACATTTTGCACTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
113	pBlue_sk+_8f	CAAAATGTAGGACTAGGTGTTGCAATGAAACACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
114	pBlue_sk+_8r	ACCCATGCTGTTTCCGATGGAATATGTTGACACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
115	pBlue_sk+_9f	TCAACATATTCCATCGGAAACAGCATGGGTCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
116	pBlue_sk+_9r	TGTTTCAGTTCGCAGCTTAGATGGTGATATCCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
117	pBlue_sk+_10f	GATATCACCATCTAAGCTGCGAACTGAACACACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
118	pBlue_sk+_10r	CAATTCCTAAAGACATGATACTTCCAATGTCCTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
119	pBlue_sk+_11f	CATTGGAAGTATCATGTCTTTAGGAATTGCCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
120	pBlue_sk+_11r	CTGTTTCGATACCTGTACTTTGTAGCGACTCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
121	pBlue_sk+_12f	AGTCGCTACAAAGTACAGGTATCGAAACAGCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
122	pBlue_sk+_12r	ATTGGCTAGACTTCTCCAAACCAAGCTTTCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG

123	pBlue_sk+_13f	AAAGCTTGGTTTGGAGGAAGTCTAGCCAATCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
124	pBlue_sk+_13r	TTTTATCTTTCTTAGGAGCATTGAGTTTACCACTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
125	pBlue_sk+_14f	GTGTTGATTTAAAGGTGGAGATCTACGAAGCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
126	pBlue_sk+_14r	GCTACTCAACAGTTAGCAGAAAGCTTCGGGCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
127	pBlue_sk+_16r	GTACTAGCGGTTCTGAAGCAACTGAAACAGCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
128	pBlue_sk+_19f	AATAGCCACAGTCTATTGATAAATAGACTGCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
Primer zur Sub-Block Sequenzierung:		
129	pBlue_Seq_f	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG
130	pBlue_Seq_r	GACCATGATTACGCCAAGCTC
131	Block1_1f	GTAGGAGAGTATTTCTTAGCG
132	Block1_2f	ACCACATGGCATTTAAGGGAG
133	Block1_1r	GAAGTCCCACAATTGCTAGG
134	Block1_2r	TGCTGGTCCAATATGTGTTTC
135	Block2_1f	CCTAGGGATAATAAGATGCCG
136	Block2_1r	CTTCTTCCGTTTTACTTGGTG
137	Block3_1f	GGGTATATTCGGGAGAAAGTG
138	Block3_2f	CGGATGAACAAATAAGAAATACGC
139	Block3_3f	AAATAGGAGTGAAAACGTGAAG
140	Block3_1r	CATTAATCCAGGGCTTTTAGC
141	Block4_1f	GCCAGTTGGAGGTAGAATAGC
142	Block4_1r	AGCAAAGCATATGTGACCCC
143	Block5_1f	CCTTCATCCAATGGATTTGGC
144	Block5_1r	AGTATGGGAAGTTCAGTCCAG
145	Block6_1f	CTATTTTCATCCAATTGCTTGC
146	Block6_1r	ACCCATGGACTTCAACTTACC
147	Block7_1f	AAGTAGTGATTGGCAATCTCC
148	Block7_1r	ATCAAATCCAAAAGTCTCCC
149	Block8_1f	GAGCTACTATTATTGCATCCC
150	Block8_1r	TATTCGATATCGTCTGCTTCC
151	Block9_1f	GTTAATAAGGCTAGCAAGCAG
152	Block9_1r	TTTCTACTGCTCCTTCTCTTG
153	Block10_1f	CATAGTTGGGAGAAGTGGATG
154	Block10_1r	GTTGGAACAGGTACTCCATTC

155	Block11_1f	GGAGAAGTAGTAGCAAGTTTG
156	Block11_2f	ATACAGAGTTAGAGAAGGAGC
157	Block11_1r	TGAGAACTCCTGATGTTGTTG
158	Block12_1f	CGGTTGGTATAGGTAGACAAG
159	Block12_1r	TGCGGATACTCAGGCTAACAC
160	Block13_1f	TAGGTGCTTCTAATAATGGTG
161	Block13_2f	AGCTGAATATTGTCCAAAGG
162	Block13_1r	TTAAATCCACACGACTCTGTC
Primer zur Vektor-Amplifikation (Schritt 2):		
163	pBlue_sk+_Af	CACCTATAACATCACCTTGATCGACCCAATCACTGCATC GAATTCCTGCAGCCCGG
164	pBlue_sk+_Ar	CTCAGTCCTAGATCCATGTAAAATATTTTTCCTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
165	pBlue_sk+_Bf	AAGTAAAGAGTTCTATCGAACTCTAATTGACACTGCATCG AATTCCTGCAGCCCGG
166	pBlue_sk+_Br	ATTGGGTCGATCAAGGTGATGTTATAGGTGCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
167	pBlue_sk+_Cf	CAATTCCTAAAGACATGATACTTCCAATGTCCTGCTCG AATTCCTGCAGCCCGG
168	pBlue_sk+_Cr	TCAATTAGAGTTCGATAGAACTCTTACTTCACTGCTCGA TACCGTCGACCTCGAG
169	pBlue_sk+_Df	TTTTATCTTTCTTAGGAGCATTGAGTTTACCACTGCATCG AATTCCTGCAGCCCGG
170	pBlue_sk+_Dr	CATTGGAAGTATCATGTCTTTAGGAATTGCCACTGCTCG ATACCGTCGACCTCGAG
Primer zur Sub-Sub-Block Sequenzierung:		
171	BlockA_1f	GCTTTCATTCTCAATATCCCC
172	BlockA_2f	TCACATACCACCCACCTTCTC
173	BlockA_3f	GTATTCTTGCAAAACCATGTG
174	BlockA_4f	CGGCATCTTATTATCCCTAGG
175	BlockA_1r	ATACCAGGTGTTGAAATTCGC
176	BlockA_2r	GTATCCAAAAGTGATGCTCAG
177	BlockA_3r	TAGGTGGAGATTTGGTTATG
178	BlockB_1f	TCATATTATCGTCCCCCTATC
179	BlockB_2f	TGGTGCGGTAGAATCATTTCC
180	BlockB_3f	AAATTCTCACCTTTAAC
181	BlockB_4f	AACATCTAGCTCTCTACAG
182	BlockB_1r	AACGGCACTCTTGGCATCGAG
183	BlockB_2r	TAAGCGTAGAATTGACTCTGG

184	BlockB_3r	TTATTGACTGCTCTTGGTAAC
185	BlockB_4r	GAATCGTTTAGCTCAGATATATC
186	BlockB_5r	CTCGAAAATAGCCACAGTC
187	BlockC_1f	CGTGCTAGAGATACATTCTGC
188	BlockC_2f	GTCCTTAGCTCTTTCAAGTATAG
189	BlockC_3f	AGTCCCAAATACCACCATTCC
190	BlockC_4f	CCCATAATCTCACACCGATCC
191	BlockC_1r	GTGAAGTGTGAAAATGCGTTC
192	BlockC_2r	CGTACTCTGTTATTGCAGAAG
193	BlockC_3r	TGATTTAGGTGTATGGGAGGC
194	BlockD_1f	ACGTCTTGTGCAGAAATTGC
195	BlockD_2f	TATATTGCAGAACCTATGGC
196	BlockD_3f	CAAACCTTGCTACTACTTCTCC
197	BlockD_4f	CTTTCGGCATATGCGAGGTAG
198	BlockD_1r	GCAAGATCGTATCTTTGTAGTAG
199	BlockD_2r	AATTACTACCTCGCATATGCCG
200	BlockD_3r	ATTTGCAAGGGATGATGAACG
201	BlockD_4r	TTAGAGACAGAGTCGTGTGG
Primer zur finalen Sequenzierung im SuperCos Vektor:		
202	SC1TR01_Seq_f	GCCACCTGACGTCTAAGAAAC
203	SC1TR01_Seq_r	CCGTGGAATGAACAATGGAAG
204	X_1f	CACTTTCTCCCGAATATACCC
205	X_1f_2	GGATTTACCTATAACATCACC
206	X_1r	GGGGTCACATATGCTTTTGCT
207	X_2f	GCAAGCAAGTGGATGAAATAG
208	X_2r	GGGAGCAGTTTTGGATTTGAT
209	X_3f	CATCCACTTCTCCCAACTATG
210	X_3r	CAACAACATCAGGAGTTCTCA
Primer zur Sequenzierung nach Umklonierung in den Vektor pBS1C:		
211	pBS1C_Seq_f	ATTATGCCGCGATTTCCAATG
212	pBS1C_Seq_r	ACATGAGAATTGACACCTTGC
213	pBS1C-BC-Cluster	TATGGATTTGAGCGAGTTGAG
214	pBS1C-BC-Clust-r	GGTTCCTACTAACGAAATCTG
Primer für die RT-PCR:		
215	BC_RT_1f	AATGCTCAACTCGCTCAAATC
216	BC_RT_1r	ATATCGCGGATGCTATCAATC
217	BC_RT_2f	ATTGGCTATTCTACCTCCAAC

218	BC_RT_2r	GGACAATTGAGTCTGCTAAAC
219	BC_RT_3f	TTGTGAACATCCAAGTGGAAG
220	BC_RT_3r	TACTTGGATTGTAGCCAAAGC
221	BC_RT_4f	CTGGTATTGCACTTAAGACAC
222	BC_RT_4r	TGCAGAATGTATCTCTAGCAC
223	BC_RT_5f	ATGCATAGAAGGATTATCCCC
224	BC_RT_5r	TTTTGGTGGATCATCTCTTCC
225	CAT_RT_1f	AGAACTGGTTACAATAGCGAC
226	CAT_RT_1r	TTAGGCCTATCTGACAATTCC
227	GAP_RT_1f	ATCCTGAAGTTGAGGTAGTAG
228	GAP_RT_1r	TGTTGGGATGATGTTTTTCAGC
Primer für die Integration der Promotoraustauschkassetten:		
229	BS_1promcas01_long_f	TAATTTTATATAGTTTTTGCAGTATTTACTCTACTCATGT TTGTCCTCCTTATTAGTTAA
230	BS_1promcas01_long_r	CTTGCCCTTTTTTGCCGGACTGCAGCGGCCGCTACTAGT GTTTAAACTTATTTGCCGAC
231	BS_2promcas01_long_f	ACCTTTGTGTTTTTTAATTGTTCTTCGTAGATCTCCACGT CGATCAAACCCCTTCCA
232	BS_2promcas01_long_r	ATTATAAATTAATAAGTCCAATGCCTGAGATAACTTCATT CTAAAATCCTCCTTAAGAGCGC
233	BS_1prom_f	ATTGTCCCCATTTGGCTCATC
234	BS_1prom_r	ATAAGGGTAACTATTGCCGATG
235	BS_2prom_f	CTAGTATGGGAAGTTCAGTCC
236	BS_2prom_r	GCGAAAGTTCCAATGATCCTC
Primer für die Integration des gBlocks® „BS_2genecas_01“:		
237	BS_2genecas_01_f	GGATCCTAGAAGCTTATC
238	BS_2genecas_01_r	ATGTTAAGAGGGGTATTTTC
239	2genecas_Seq_f	ATTATGCCGCGATTTCCAATG
240	2genecas_Seq_r	TATGGATTTGAGCGAGTTGAG
241	2genecas_Seq_2f	GCCTTTTGATATTCTTCAGAC
242	2genecas_Seq_2r	CTCCTGAATATAAGTGTTTAG
243	2genecas_Seq_1f	GAAGATACCTGCAAGAATGTC
244	2genecas_Seq_1,5f	CATTGCACTCCACCGCTGATG
245	2genecas_Seq_3r	GTCTGAAGAATATCAAAGGC

Tabelle 11: Bezeichnungen und Sequenzen (5'-3') der eingesetzten Primer.

2.1.8 gBlocks®

Sämtliche gBlocks® wurden von Integrated DNA Technologies (= IDT, Coralville, USA) bestellt. Die Rekonstitution erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Hierzu wurden die gelieferten Reaktionsgefäße zunächst kurz abzentrifugiert (10 s, 5000 rpm, 4°C) und anschließend ein entsprechendes Volumen TRIS-Puffer (10 mM, pH8) zugegeben, um eine DNA-Konzentration von 20 ng/µl zu erhalten. Nach gründlichem Mischen wurden die Gefäße auf dem Thermo-Blocker Thermo-Inkubationsmischer (PEQLAB Biotechnologie) für 20 min bei 50°C inkubiert, um ein vollständiges Lösen der DNA zu gewährleisten. Die Lagerung der gBlocks® erfolgte bei -20°C. Folgende Tabelle zeigt die DNA Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten gBlocks®:

Nr.	Bezeichnung	Größe [bp]	Sequenz (5'-3')
gBlocks® zur Rekonstruktion des Genclusters aus <i>Bacillus cereus</i> VD169:			
1	BC1	594	AAAAATATTTTACATGGATCTAGGACTGAGGTTTACACAAATACTAAATATTATATCGTAAGTCCAATTGGTGCCACTAGCAAATTCACCTGTAAAAATATACGCTATTACAAAATTAGAAAATAAAAAGAAATCCCATTGGAGTTCCTTTTTGATGGAATACCATTGGGATTCTTTTCTGCTTTTCATTTTCGTAACATATGGAAGATGAAATTAAATCATCGTGGACAAAATAAGAACAATTAAGCGATTAATGGGAATGAATAAATAAATCTTATTCAACCAAAGGATGCTTTACTTGAGAAAATCACTAGAAGAGTCAAATGCTAACTATGAACTGCCACAATTGCTAGGTTTTGTTTAAACAATTGGGGGCAGTTCATTTATAGCGTATAGGTAAGCAGCTTTTTGTTAATCATGAGGTAATATTTTTAGCTAAAAAACCGATAATAGAAAATATATTACAGCTTATGACCCGTTTTTATACGTATCTGGGCTGAACCCCTATTATGTTTTCAATTAGAATGATGCCAGTTTTGAAAATACCCCTCTTAACATTTTTCGTTTTTGTGATCTGAATCCTTAAAGGCTAATCTTCCAT
2	BC2	643	GATCTGAATCCTTAAAGGCTAATCTTCCATGAGAAATCTTATCATTTGCCATTATAATCCCTTGATTATTAGTAATAAAAACCTTTGTAATGTTTTATTTCTGGCTGTGCTTTATCTTTCAAAAATGAAAAGCTTGTCCAAATGCTCAACTCGCTCAAATCCATATTCCCAATAAGCAGTATGATCTAGAGTGAACCGTGAACAAATTTCCCATTTTTCAATAGCAAATGCTGGTCCAATATGTGTTTCTTCAAATATAATATCAGCCTTGCCTTTAAACTTTCTTCATGGAACAAGGAAAGAGCCACTTTCTGGATTTACTGTTACAAGTTCAGCAAAGCATCCATGGTATGAAAGATATTGATTTTTCTCCCTCAGCTGCCATAGACTCACAAAACAGTAATGTAGTTTTCAATTTCTCAAATTTTTACTGTTCCATCAGAATGTAATCCTTGATTATTATCTCCCTAAATGCCATGTGGTTATTTTCATTTCCAGCTGTAATTACATTTAATTTATTAGATTGATACATTTGAGAATCTTTTTATAGTATTGGTACAAAAGGATTTCAAAGATTGATAGCATCCGCGATATTATAAATGCTTTGTTACCTTTAGAAATCACCATTACG
3	BC3	719	TGCTTTGTTACCTTTAGAATCACCATTAGTTCATATATAACAAATCCATATTGGTAGTATCTTTCAACTAACTCTTTTACTTTCATAATCTCTAATCTCATCAATATCTCAATAATTACTGGTTTTAAAGGGTCTCATGATTGAAACCATTGGTATTTGTTTTTCTAATGCTATACGTATTTTCATCAAGTGAAGGTTGTTTTATTTATTAATTTGTGCTTTTCAATCTCAATATCCCATTCATTATAATTTTATAAATAAGTTCGTATTTAAATACATTTAGCTTTGTTTGGTGAACGCGCTAAGAAAATACTCTCCATACATTATAATAAAAATTTAGCTGGTTCATCATGTGATAAAAATTGTAACCTAGAAGATGTTAACGCGTATGCACCATTATTAGGAAAAATGATATAATCACCCTTTTCTACACTTGGCAATGTTGCTTTTACTTAACTAAGTATGTCGTTAGGTGACATAAATTTCCCAACAATAAGAGCTTTATTTTCTAATATTTTCTCTCGTAAAGGGAGAATTATAATGTCTTCTGTTCTCCAGAAAACATTTTGAAGAAAACGAGACTCTCCCGAATATGATGTGCCACCATACAAAAATATAGGTCATATCTTCTCTTTTGTATATAAAAACGCGTACATACCACCCACCTTCTCTCGCTAAAAAGTTTCTGATTCTACCATTAGACGTTTA
4	BC4	674	AAGTTTCTGATTCTACCATTAGACGTTTATTACGGAAAAAATCTTGATAGTTTTGCAAAGTAGTATTTAATATGTTACTAAATGATTCTAAATCAAATACTTTTTCTCCAGTAGGATCATAACCAAATCCTCCACCTAATCCTAAAAACTGGATTGGATACCCTTGAATTTCTAATTTTCTGCAATTTCTATAAGTTCTGTCCAGCTTTCTAAATATACTTCGGAATTAATAATTTCTCTGAACCTTGAAGATGAAGGCCATATAAATTTTATAAATGGGTTAAGTGGTTTTCTCCCTCAACCTTTCTAATAAATCTTCAGCTGTAATCCCAAATTTGAGGGAAGAACCCTGATTTTTCAATCCCCTATTTTATTTGATTTTGGGCTAAATATTGATGAATACGAACAGTAATAGAAATATTACAATTATATTCTGCTAGTTTTTCAATTAATCTAGTCTTGGCAATATCTATATTTATGGCTAAAATTTGTTTTTCAATAGCTAATCTTAATTTCTTCCGTTTTACTTGGTGCAGTAAAGAAGATTTTTTCTGGATCATATCTCAGCTAAGGCAACCAATTCCTTTTTGATGCTACTTCAATTTCTAAACCTAATTTTTGAAATGTTTTTAAACGAAGGGATTTGGATTAGCCTTCATTGA
5	BC5	672	AACGAAGGGATTTGGATTAGCCTTCATTGAATAAAAAGACTTCCACATTTGGACTTACTGCATTTTGAATTAATGAGCTCGCTTTTCTAGTGTGATTCTCTCATATGTATAATGGTGATCCATACATTTGAGTAAGTTTATTCAAATTTTCAAGCCGAAACATAATTACACACACCTCCACGGTTATATTTTTAAAAATAATTTCACTATCTAAATAATCAGATATCGAAATGAATTTTTCTAAAATTTCAAAGATACACCTGTTTGTGTTTGAATATCGCTTAGTATTTTTTCAAGCCTTGAATCTATCTCCAAATCCTTTTATATTTGCAATATTTTCTAATTTGATTTGATCTTTTTCCAGGTATTCTTAGATTTTCATAGCCTTCTATTACCTCGTAGTTAAGAAAATGCTCTTTCTAACTACAATCGCATCATTATAATTGCATATCCCATACACATATTAGATCAACAGTACAAAAATTTGTTTTGCTTTCCCTTTGATTTTCAAAAATAAATTTTCCACCACCCAGTAAACCAATAAATAAATCAATAAGTAAACCTAATTGAAAACCTTTATATTCTCCTTTTTTATCACCAGCACCTAAGGGGGCTAACATTCTATTTTCATATAGAATGTTAGGATCTATTGTGCTGGTTGGAG
6	BC6	765	GAATGTTAGGATCTATTGTGCTGGTTGGAGAAATATTATGTTTTCTTCAAAAACGAAGCAGCAGCCAAATGTGCAGGAACCTTTATTTCTTTTTCAATTTCTAAAAATAAATTTCCCAATGAGGTAATACTAAGTCCCAATCTAACACTAACGGCATCTTATTATCCCTAGGAAAGGCAATTTGATACTGCATTTGTTCCCTAAAAAATTTCTTTCCACCTGGTGCTACCACAGCAGGACTACCAATTTGAAAGTGAATTTCTATTAATTTCTTAGTCGCCATCATACTATAGTAAGTACTAGCTATCCAAAAATGTGTAATCTGTAAACAAAAGTTACACCCATACCAAAATTTTAGCATTTCCTAATACTATAAATTCATTGCATTATAAATTTGTTGAAAAACCTAAAGATTTCTTAGCATCAATATATTTAATGATCGGGTTAGAAAACGTAATAGAGGGTTTATTCTTAAAGTTGAACAATGTTATCTAAAATAAGTGGTAAATAAAAAGGCAGTATTCTTGCAAAAACCATGTGAATATATACCACGTATCTCTGCAGTTACAATAACATCAGCTGCAATCTGAGCATCACTTTTGGATACATTAAGTACTGATCTTAAACGCTTTTCAA

			CAAATTCCTTAAGGATGTCTATTTAATAACTTTATTATTTAATAACTGTTTCATTATTTATAACCCCGTTATTTAAACGTTAATTTTATTGTTGTAAGTTTtaggt AACGAATCTACGATTTCAAATATAGGT
7	BC7	469	GGTAACGAATCTACGATTTCAAATATAGGTATTTATATTTAGCTAATCTCTTTTGCGCATAATCGATTAATCTTCTACAGTTATATTTTATTGTTAATACTAT TTTAGCGCATGGAATTTACCATAAATATGATGACTAACACCATGTACATAGATAGCTTCTATCCCATCATAAGTAAGCATATGCGATTCAATTTCTTCAGGATA AATGTTAACACCTGCTCGAATAATGATGTTTTTAAGGCGACCAATTATAAAATAACTCACCTTCTGTATTTAAATATCCTAAATCACTGTATGTAACCAATTATTC TTTAACACTTCATCCGTCTGTGTTTGTCTTATAATATCCTTTCATTAATCCAGGGCTTTTAGCTATAATTTGACCAACTTTTCCAGTATTAACCTCTTTCCCAA ATTCATCAATAATGCGAATTTCAACACCTGGTATTGCCGTACCTA
8	BC8	765	GAATTTCAACACCTGGTATTGCCGTACCTACGCTATTTAATGTTGTTTTAATTGATGTTGGCTTTACAGCGGTTAAACGCGGTCCAGCCTCTGTCAACCCATAA GTTTTACAGAGATTGGCATTGGGAAATATTTTTTATATCTTGAACTTTTTCATATGGAAAAGGTGCTCCTCCGTAAGTTATTTGTCTTACAGTAGAACGCTTA TATTTAATAAATGTACAAAATCTTTTATTGTAATAACATAGATGGAACAGCCGTAACACTGTTACATCATACTTATCAATCATTCTAAATAATCTATGTGGGG TAAAAATACCGTCCATAAATAAATAAGTACTTCTAATAAAGAAATGACTGATAATTTGAGCTGTATTGCAATAGCCAAAGTGCATTGGTAATAACTAACGCAC GATCTTCTGGCTTTATATCTAAATGCAATACATGTGCACTTGCATTACTGAGTATTCCTTTATGAGTTAACATGACTCTTTTGGGATTACCAACAGACCCTGATG TATGTAATAAAATAGCTGTTTCATCCTCATTGTTGAATACATTATATTGAGGATATTCAACTTTATATTGTTCAAAATTACTCTCCTGCAAAAACAACAATGATT ACTCGTAACATGAGCACTATAATCTAATTGAGAATTATCGCTAATTATTATATCTACATCACAATATATTAACGTTTCTTTAATTTCTTTATCAGTTAAATCTTAT CGATTGGTACTATCATAGCTCCAGCCA
9	BC9	722	TATCGATTGGTACTATCATAGCTCCAGCCATTAAGTTGCAAAAATAAGCGATGATATAATGAACTGACCTATCAGATAGAATTGCAATAGATTTTACTTCTGAAT TAATAGATTTTAAATTTCTGGACACACCCCAAGAGATTTCAAATATCTTTGTAAGTATATGATTTATTTTTATCAATAACTGCAACTTTGTTAGGTTCTTCCTTA GCCTGATAATAAATAATATCACTTAAACTTTGAGGGGAAAAACACCTTCTCTGATTAATCCATAAATTATACACTCACTTTCTCCCGAATATACCCAATTAATA TAGTCTAAATCTGCTAAACTCTCAAAAGTAAGCATTTTCATCGTCAAATTCACATCAAATTCACCTTCGATGCTCAAAATTACCTCGATAAAGTCTAAAGAATCA ATAAATCCGCGATAAATTCCTCATCCTCATTAAATGTAATTAGTTAAATCTCTAAAAGCGTATTTCTTATTGTTTCATCCGTATTTAAAGTTTCAATATTCTTAC GTTTTCACTCCTATTTATTTTTTACGTATAAATCTTCTTTTGAATAACAACAATAAATCTTTATGACTCATTCTTTGTCTGCCACAATTAATGCATCTTG AATCAGTTTAGTTATATTTCTATTTTATGATTATCAGAGAACTCCAATGGATTTACCTATAACATCACCTTGATCGACCCCAAT
10	BC10	690	CACCTATAACATCACCTTGATCGACCCCAATCTCCACCTTTTTTTTCTTATGATCCTCCGACCAAAATCTATAATATCATTCTTTTTTTGTGCGCCTGCCCAA GTAGCATAGATGCATAACCTATATTTTCTGCATTTATCTCATTAAATAAACCCAGAAATATTAGACTTAATTTCTTTTTTCCATTTAGCATGTGGTAGTAACTCCAT GTTACTAATAAAAAGCAGTATCTCCACCTTGATATACATTAATTCACATAAATTTCTTAAAGTGCCTCTCCGTTGAAAGTAACTCTTTCAAATATTTCTAGCTTCC TCAACTGTTTTTGTCTTTTACCTAGCAAAAGCATATGTGACCCCAATACTAAACATAATTTCTTAAATCTTTAGGTCTTTTCTTGTAAATGTAGTCACCGCC TCTTTAATTTCTAATGAATTTCTACTGCATATCCAATGGTTTCATCAGCTTTACTAATAATAGCAACAGTTTCTTTCCCTAGATCAACCCCAATTTTAAACATCA TTTGGGCAAGTTCTACTGCATCATCAAATGTTTTATAAATGCACCTTTACCAAATTTACATCTAGAATAATTTATCTGCTCCGCCAGCTATCTTCTTACTCA TAATTGAATGGCAATTAATGTTTTGATTCTGCAGTCTGTTACATCCCTTATTG
11	BC11	620	ATTCTGCAGTCGCTGTTACATCCCTTATTGCATACAATTTTTTATCAGCAATTTGCTATTTTTTCTGATTGTCCAATTAATCCTAACTTGAATTTTTTTATTGTTCT AAGAATTCATCTTGAGTCTTTTCAATGCTAAAACCTGGAATAGATTCTAGTTTATCAATAGTACCTCCTAAATTTCCGAGGCTTCTGCCTGACATCTTTGCCACC GATAATCCAGCAGATGCTACCCATGGTAAGAGAATAAAGTAGTTTTGTGCGCTACTCCACCTGTACTGTGTTGTCTACTTTGATACCATCAATTGAATCTAA ATTTAGTTTTTCTCCAGAAGCGGCCATCTGCATAGTTAAATCAGCAAGTTCCTAGATGTCATCCCTTGAATAATACCGACATTGCCATGCAGATATTTGAT AGTCTGGAATACACCTGCAACAATTCATCTACAAAATTTGAATCTCCTTAGAAGTTAAATCAAACCAATTACGTTTTTTATTTATATCTAAGGCCCTCAT ATTATCGTCCCCCTATCAAATTTAATGGATTGTTATTTTTAAGTGGTATAAATGAGTCTGTTTTTCCAGATTCGAATTTGAGATCTTGTCTAC
12	BC12	699	TCCAGATTCAGAATTTGAGATCTTGTCTACATATACAAAATTCATAAAAATACATCTTCTATAAACTTATTAATTTCTCAATTAATAAAAGTTAATCATTTCAGAAA AATTCTCACCTTTAACTATATAAATTAATAAATGTTTTAAATTTTTTGTACAACCTGAAATCTTGAATGGTATTTGCATTGCTTCTAATTGTACGTGAAAATGCA GTATCAAAAATAACACTTGTAAAATTTTATCTTCAGTAATAACCAAATTTGGCTATTCTACCTCCAATGGCTCTAATATAAGACCTGTTTACCACAACCTACATT CCTTTGAGTCGAATATAAACGAACGATATCCCAATTTTGTATCTTATAAATGGCATAATATTGTTAGTTAATGACGTGACTACCAATTTCTCCCTTTCATGAG GAGCAACTGGTCTCCATTCTTTAGAACCTCAAAGAAGAGATGTTCTTCCCAAGCATGCATCTTTGATTTGGACACTCGTAAGATAAAAACATCTAGCTCTCTA CAGCCATAATGATTAACAACAGGACAATCAAAAATTTCTGAATAAATCCCTTTGGTGGGTGAATCATTCCCCATACATTTCTATAAACTTTAATGATTTA AAAGTTTCTTTATCATCTTGATATATCTGAGCTAAACCTGTTGAGGCGAGAAAGTGGCCCAATCAT
13	BC13	539	ACGATTCACGGCAGAAGGTGGCCCAATCATCCACTGTGGCTCAAAAATCTAATTTCTTCTTTGTAATTAGCTAATACTTCTCTTGAAGGTCTAAATATTCTT CACATCCTAAACGTAACCTTTTTGTTTAGCAGACTCAATTGTCTGTACAAAACAATAAATTTAAATTTATTACATCCTTGTCCCAATTTCTTACTTTCCA CAATTTTTTAGTCAGTAAAAGATCCTCTTTTTTATCTCTAAAAATTTTAAACGGTACACCAGTACTGCCACTGTATGTAATACCCTTATATTAGGATCTTGCCTA

			AGATTTGGTTTTGCAATGTAATCACTAAAGTTATTCTGTATATGGCTTTTTCTAGTATGGGAAGTTCAGTCCAGTTTTATAATTTTCCAAGTAATATTTCAACTG GTCTTGTCAATTCCTTTATAGGATGGAACGTGTTAAAAAGCCATTGAAAGTAAATTATACAGATTACCTTTGTGTTTTTAATTGTTCTTCGTAGATCTCCACCTT TAAATCAACAC
14	BC14 (nicht geliefert)	670	CTTCGTAGATCTCCACCTTTAAATCAACACCATTCTAAATTATTATCATTAAAGATTGAGAAATTTTCGATTCTTCATTAACAAATGTTACCAAGAGCAGTCAATAA ATGTCAATATATTCTTAAAAAAAATATATTTATCAAATTATAATTTTTTAAATAATTATCTTTTTAGAATTGTCTAAAAATAAATTTGACAAATTAATAATCAAGG GTTAACATTCCTTTAGTGAATATAATTACAATTAATCAAAGATAGGTGGAAAATATGAAGTTATCTCAGGCATTGGACTTATTAATTTATAATGAAGAAGTTT CACACCAAATCAATATGGTTCCTAGTGAATAATATGCTTCTGTTCTTCAAGAATCCCTTTATTATTAGATGTTACAATCGATATTTTTCAATGTTGAACA AGATGAGGATCATTGGAACCTTCGCGGGGCACAAAATGTGGCTGATCTTGAATCTAAGCTTGCAATTTCTTTACTAAAAGAATTGACAACGGCAAAGCACGTT AACTTACGCCCTATTTAGGTTAAATTTGATGGCATTAGTATTAATGCATTAGGAAAGAATACAGGTAATAACATTATGATTGTTTCACCTGAACAAGGTGGT CATTATGCTACTCAACAGTTAGCAGAAAGCTTCGGG
15	BC15	708	GCTACTCAACAGTTAGCAGAAAAGCTTCGGGTTAAATGTTACCCTATAACGGGAGTGGATGCTCATACCATAGATTTTGACGATTTAGCTTACAAGTTAAGTAT GGAGAAAATTGATTAATATATATAGATCAATCCAATTGCTTATTCCCTATTGATGTAAGAACCTTGTTCAACTGTACGTAAAGTTTCGCCAGAAACCATTGT TCATATTGATGTTAGCCATTGGATGGGTTTAAATTTAGGAAAAAGTATGCCAAATCCATTGGATGAAGGAGCAGATTCGTTTGAGGTTCTACACACAAAACCTT TTCTGGGCCTCAAAAAGCGATTTTTGTACAAATAGATCTGATTTAGCTAACTTGTTCGGAAGCGCAATATTACATGTTAAGTAGCCATCATTTGGAGGA GTTTTAAGTTAGCTTTAGCCTTGTAGAGTTAAAGAGTGAATGGAACACATTATGCGCAACAGGTGATTGCAAATTTCTAAAAAATTTGCAGCTAACCTAAA TCAATATGGATTTGATGTAAGAGGTGCTTCAAAAGGTTTTACCTGTGGTCACCAGATATGGATGAGTACCAATAACACAGGGTTCGATTCATTTGAAGCTAGT AAAAGTTATAAATGTAGGAATTCGAGTAAATGTTTTGATAACCTGCCTGGTGACCAGAGTCAATTTCTACGCTTAGGAGTA
16	BC16 (nicht geliefert)	800	GCACCAGAGTCAATTTACGCTTAGGAGTAAATGAAATTAAGTCTGTTTTGGAGCATCTATTTCTGATATGGATGAATTGTCTCAAATTTATGATGATGCTATCAG TAATAATGGTTCTCCAGAAGAAATTAATCCAGAGTAAATAAATTAAGAAACCAATATAAGAATGCCTATTCATATGATATTAATTCTAGCGAACTAAAAGATAG AATTAATAAAATTAATCTATTTTCCCTGTAAGAAATAGAGAGAAAATAACTATTTAATTAAGAATCACATAATTTTATACAAAAATTTATTTTCGTATTT AAAATGAGAGAATATCTTATATCAAAACGCTTTTGTATTATTTAAATATAAAAAACCTTCCCGCAATTTAAGAACAGTTTTATCATCTTTTATTACAGTATAAA TAAAAATTGCAAAGGGGATTTAAATGAATTTTGAACCTTGATAAAGAATATGTATGGCACCCATGGACTTCACTTACCAAATTTGAGTCTAATAACTATT ATGCAGAAAAGGCGATGGATGTTATATTACAGATTAATGTTAAACTTATCTCGATGCCAAGAGTCCGTTTTAAATGCAAGTTGTGGATACAATCATCCGAA AATTATTTCTGCTATACAAATCACAATTAACAGAACTTATGAATTTGATCATGCTGAATTTCAACCATACCTCCCATCTTTTAGCTGAAAAGCTTTCTAGCATT TTACCAAAGCAACTAGAACGTACTTTTTTTGACTAGCGGTTCTGAAGCAACTGAAACAG
17	BC17	675	GTACTAGCGGTTCTGAAGCAACTGAAACAGCAATAAAAAATGGCGGTATGTACTTTTCAAGATTGATGGGAGAAAACAAAAAATAAGATCATTCTTTAGATAAA GGGTATCACGGTATTACATTAGGGGCTCTTGGGGCTTCAATATTCTTTAGCAAGAAATGAAGTGTATTAATGAATGAAGGTTATGAGAGCATCCCAACAC CAATTTGTAAAAGTGTGTGCTTTTCTCCTCACGATATTTGTGAACATCCAAGTGAAGAGAACTAGAAAATAAAATTTAGAGTTAGGTCCTGAAAATGTA GCCGCTTTTATTATGGAACCTGTTTTAGGACTTGGTGGTATTGTTATCCATCAATAGACTATATGCAAGAAATCAAAAAATTTGTCTGAAATATGAGGTAATA CTAATATTAGACGAAAACAATGACCTGCATGGGACGTACAGGTAATAATGTTTGCCTTTGAACATTTAATATAGTACCAGACATTTTATCTGCGAAAAGGTAT TAGCGGTGGTTATTTCCGATATCTACTATAACAACCTTCGCAAGAAATTTACTATAAATTTGTGAAGATCCCTTTCTAAATGGTTTCCGCCATGGGCATACAA ATTCAGGACATGCTACCGCTGCAGCTGCAGCTTTGGCTACAATCCAAGTAA
18	BC18	610	CAGCTGCAGCTTTGGCTACAATCCAAGTAATTGAGGAAGAGAAGTACTAGTTACTAATTTCTAAGAATATGGGAAATACTTATCAGAAAAATATTTGCTTAACA GAAAAATATGATTTTATACGTAATGTACGTGGTCTAGGCTTATTATTAGCTCTCGACATTGATAATACATTAATGACAGTGATTTAATTTCAAAATATTGCTTTG AAAAAGGTTAATTTTCGCCAAATGGGATCACTTTAGTTTTATTACCTCCTCAATTTAATAGCAAGCAAGTGGATGAAATAGTTTCCATTTTAGAGACAG TATTTTCATGAGCTCTCTACAACCTCAAATACTAACTTATTAGAAGCTTTAACGAACCTACCAGAAATTCGCTTCTCAAGCTCGTAAAAGAAGATAGCTCAGG AAAGCGAAAGGTTACTTTAGCTCCCACTTCAAGCTTTGCTAATAATGAACTACGTTACCCTATTTGCTAGCAAAATGCATACTATATTTATAAAATTTAAACAGTC AGATTATTGATGAGTTCTAGGAGTTAGGTTGTTGTTTTTTGATCTACTTAAATAGCCACAGTCTATTTATCAATAGACTG
19	BC19 (nicht geliefert)	212	CAGTCTATTTATCAATAGACTGTGGCTATTTTCGAGTAATTTACAGCCTTAAATCCATTAGTTGAAATGGTCAATATCAAACTGAATATCGAGTGGTTGAAGATAA TTGTTTCATACGCTTTTTCTAAATTTAGTTATTTGAACTACCCCACTTTCACTTTCGTTTGAAGTGAAGGATTCTAAGTAAAGAGTTCTATCGAACTCAAT GA
20	BC20	799	AAGTAAAGAGTTCTATCGAACTCTAATTGACTAAAGGCGAGGGGCTTTCTCGTTTCGGGAAGGGCTGTAAAAATACAAGTAACTTGCACATAGACTCTTCACAC TCCCTATTTTTGTTGATTTTCAACATTTGACAAACATGGAACGATAGAGCGTTGAGAATTTATGATTTCAATGTGTTTCTACAACCAAATTCATCTCTCAA

			CTAAATTTAATGTTTTATATCTATACAAGGAGTTCCTTCCAAAAACGATAAACTAATAAATATAGTTCCTATCAATAGCTAAATTACAAAATCTTTAAAGCTA CAAGAAATAGCTGATGTGTATATTACACATAATTAATTTTATTATTAACAAAGTAATTATATAAATATAATGCGTTCGTAAACGCTCTCATAAATGTTTTCTCTTCCA ACAGAAATCTTAAAGCGCAATTAATTTACTTGAAACACTTTCTTCAACAACACAAAAGCTTTGTAGTATCAAATCCAAAAGTCTCCCTGAAATATATTAATAT TAGGTTGAATATTCCTCACGATATTTTACACTCATTGCAATAGTCAGATAAAGATTCAGAAATATAGAGTCTTACATAAATTAAGTTTCCATCCATGGATAT CATTAATTTGATATTTTTGTCCATTGAGACTGAAGTATTAACCTCTTTAATTAATTTCTTCCATATACTTAAAAAAGAACACAATAATCTAGTATTACGC GCCATTCTATCTAATCTTTCTTCTACAAAAGGCAAATTTGGATCTGGTAATCGCTGCAAT
21	BC21	751	GGCAAATTTGGATCTGGTAATCGCTGCAATAAAACAGGATCTGGTATTGCACTTAAGACACTACTCAAATGATTAATTATATCTACAAAATCTTTCAATTCTAAAG ATATTTCCGTAAATGTAACAAATCCTAAATTTGGTTAAATCTAATCCTAGTTGAAAGTATTTTATTCCACTTTCCACAATTATAAGAACGACATGAGATGGTAACA TTTTTTCGTATTTTCTAGAATCGAATTAGTAATACTAGTAATAGTTCTATCAATAATAATAAATAAAGGCTTTTTCTGCCTATGATGTTTTAGTTTTCAAAAAAT AAATCTAGATTTATCCCGTCCCTAATTGGCCAAGTTGTTCCCGGGTCAATTAATAACAACCTATATCTTCATTATTCTCAATCTTCTGATATATATTCGTGCTA GAGATACATTCTGCATTACTGTATATATTTTTTATTAAGTAATACCCTCAAAAATAATCCTTCTTGAAGTAAATAGGAAAGATATCTTTTGTAAATTTGTTTTATA AGCAATTAAGCCATTTCTAAAGCTTTCAATTCCTGAGTTTGTAGAACACCTAATGTTTTCTTCTGTAATGCTAAAGGAATACGATAATACTCTGAAAAAAGCG ATCTTGA AAAATTCGTTACAAATTCATGTCCATTCATTGCGATATATACATCTTCATTTATTTGTCCAATTCCTTTTTCTTAAACCAAGAACCAGTTGAAATTGCA GGAGATTGCC
22	BC22	538	AAGAACCAGTTGAAATGCAGGAGATTGCCAATCACTACTTGTCAAAAATCCACTTAAATTTTTAAAACTGCACGAATATTATATTTAGTTTAAATAAATTTAA AAAAGTGCATTCTGAGGTGTATTTTTATAAATCTCTAATTTGTTGACTAAGTAATTTACAATGTTGTCTAATAATATTGACCATTTCAATTTCTAACTACTTTTTG AAAAATCCGTTCTACTTCCCTTTACTTTTAAATAACATTGCTCCATTAACCACATAAGTTCTTTTAAAGTCTTAGCTCTTCAAGTATAGATAGTTCAATAAAGG TTTTATGTCTGCAGTTTCAATAAGATATCCCAATCTATACTTTCAATTTGCTCTTTTTGTATATCTAATATCTCCATCATATTTAACCACCATTATTTAATAAGT TACTAATTTTTCGCAACACCATCATATCTACAGTGTCTGCAACTAAATTCGCCGATTTTTTATTTTCAAGATTTGCATTTTTCTTGAACACCTAGTCTCTAC ATTTTG
23	BC23	585	TTTCATTGCAACACCTAGTCCCTACATTTTGTAGCATATTTAAATCATTCTTCCATCTCCAAAAGCAATAATTTGGGCCATTGAGACCTTATAATATTTTGTCAAC ATTTGAATAGCTGTTAATTTATTTGTTTCTTTAATATATATTTAACCATTATCTCCAGCAAGGAAAATTTTCAATTTTTCCAAAGCAATTTCTAATTTTTCGA TTCCATTTCAAATGAAAACTATTACTTTATTTTTGATTTAATGTATAAACGGAATGGATTGCTTTTTGGCTGACTTCCAACTTTATTTTTTTCTATTAACCT TAAAAGCCATACTAAATAAATGCACTAATCTGATCAAAAGCGTAAATCGAAGACATCTCTTCTTGA AAAATATAAAAAATCATCTGAAATGCACTAATAATTT GCTGAACTTTACTATTGATATCGTCTGCTTCCAAATACCTCATTTTTTTTATAATCATATTAACCTTCCATCATAACAAATACCGGCCAACTAGGTTGTAT AATATCAACTAATTTGTTGGCATTCAATCCAAGTTGCTCCCGTTGCTATACCTAT
24	BC24	785	AATCCAAGTTCGTCGCCGTTGCTATACCTATTTGATTCCCACACTCTTTCCACTTTTCCAGACAACCTTAAAGTCTTTTCTGAAACATAGTTCTCATCATATTTTCCAC AATAGTCCCATCTAAATCTAAAATAGCAACCTGATAGGTCTGATTATTCATTTAACATCACCTCATTTGCTAAATATTGAGCTGGGCTTTACTAGAAGATCCGA ATTAGCAGATAATAAATCAGATATTTTATCTCTTGAATTAACCTTCCAGAACTCAGTTTCTTATGATTATTAGAAAATTAACCTAAGCTATGATGTTTCTGTT TCTACTTTAAATTTGCTCACGTACTTTTTGGAGATTTAAAACTAATTTGTTGATAAAAAATCTTCATCATATTTAATGCGTTCCATCGCCCTAGCTAACTCAATTTTCT TTCGAACTGTTATGCCAATATTTAATTTGTTCAACTAAATCTCCAGTTGCTCCATATTTGTCAGTAATTACAGGTAATTTAATAAGAATGCATCAGTAATCTCAA ACGATGGCAAGTATAATTTCTCAATTTGAATCTTTTGCATAAACTATTATTGCCCTGGATGCATTTAGTAATTTATCACGTTGCAAGTGAGGAATATACTCTTGAAC AAATTTAATTTGATCTTCTACTTGTAACTCCTTCGTTTTGTTATGTAATTCATTGCTTCTTTAAATAATTTGTTTATTGTTGATGGAAAATACATAAACTTCATATTTA CATCAATATTTGATCTTTAAGTTTACGAATCGCTTCCGGTACTA
25	BC25	643	CTTTAAGTTTACGAATCGCTTCCGGTACTATACAAGGTTTCAAAAAGTCCCAAATACCACCATTCCATATAAAATCTATTGTTTTATCTATTCCAATGGTATTATT CTTTATTTTCACTAAAGCTATTTAAACCAATTTGGAATATGTGATAGAAATTTAGATAAAATTTCTTACTGTTATTATATTCATCATAGTCAATTTCCCTAGTAAA ACTAGGGATGCAATAATAGTAGCTCGTTGACTGAAGAAGTGTAAATAAATGATCAGTTACTAATATTTGCAATTTGTACCTAGAAAATATATCGTTGTAACA TAAATTAGGATCCATTGCCATTCTAATTTATAATATTCAAGGTGTTCAATAGGAACCTGGTTTTCTGAAATAATTAATTTGTTTTTTCGTGTGCATAAAATTA AAACGTGTATCTGGTAAATCAGTAGTAATTTGCATCACAGTATCAATTAATTTCTTCCAATTAGATTCTTGATAAATTTCAAACCTAATATTTGGATGCTCAA AATCAGATTTCTTTAATACCAAAAAAGTAATAAATAATTTTTAGAAAAGTACTTTGGGCTAACTCCCAATCTCACACCGATCCCACCCATGCTGTTTCCGATGG AATATGTTGA

26	BC26 2x bestellt	798	ACCCATGCTGTTCCGATGGAATATGTTGATGCATCAATTAATATATTCATCTTATATTCTCCTCTGCAAGATAATTATTCACAGTTTAAAGTCTGATAATATTGA TGACTGCCTCCCATACACCTAAATCATAGGATCTTTTACTTCAATGGCAGGAATTCCTGGTGTTAATTTTACTCATGTTTATTGCCTCTTTATTATTTATTG CGCTATCCATCATTCTAAAAATCCTACTATATCTTTTATTAACCAAGGACGAGCCAAATCAAGTGAAGAATTTAAATTTGATGGTTTATCAATATA TTTCCTTACAAAATCCTCATTACTTAAATTTCTACTGCTCCTTCTGCAAGTATTTTTGATTTTTTTTCGATTTTAAATCCAAAAATAGCGTCTTGTC TTTTGAGTAACTGTATAGATTGACTAATAATATCTTGATCAGGTGACTTTGTTTCAATAATTGTGTCAGGTAATAATAATATATTATGCTGTAAAAACAAATCCTG AGCAGATTTTACTGCTCCAATCATTCTGTTAAACCAGACTCCTGATATAAAAGACTATTTAAATTTATCTTTTACTCTCTAAATACTCTACTACTTGCAA TTTTCTTTATTAAGAATAACAATTACTCTAATCTGAAAAGGACATTTAAGATCAAGTCAAACGAATAGTCTATTAGGGCCTTATTATAATTCACATTAATAATG GTTTAGGATAGGGAAGATTTAACCTTTCCCTATACCTCCACATGGAATTATAAC
27	BC27	400	TTTCCCTATACCTCCACATGGAATTATAACTGCTATTTCTTTTTCATTTTAAATAACTCCCAACTTAAACAATTCAAAATCATCATAATTTCTATTTTTAAAG TTATGAGATGTAATCCGGACAAAATTTCTTACTTTATAATTATCACATTAGAATGCCGATTTATTAACCTCAATTAAGCTTGTATTATTATTTATCAATCGTATTTAA AAGTACCCCATGTAAACAAAACAACTAACATGAAGAAGCTTTCTTTTCATATGGAAATGAGTATCCCTTAAGTCCAATAATTGTTTAAACAATTTCTAACTGCTTGCTA GCCTTATTAACCTTGATATTTTAACTCTCATTATCACCTTGATTTTCCACCAATAATGCAAGTTGATAATTGAATAGCGA
28	BC28	408	AAATAATGCAAGTTGATAATTGAATAGCGATCTATTGCATAATTTATTGCCATTCTCTGATCTTCTTTTTAAAATTTTATTATTTTTGATAATCATCTAAGTA TTTTTTTACTAAATGAGCAAAATCCCCATTCTCATCATATACTCTGTACATAAAATCCCAAATAAAACATCCCAAATCTTCTGCAATAACAGAGTAACGAATATC TCCAAAATCAATAAAAGCTACTAATTTACCTTGATTAATAAAAGATATTATCACGTTTTATCACTATGAATCATTTGCTTATTTGATTTTTATAATATCTTTCAA GCTCAAAACGTACATCTAAATATATTTCTTTTCATAGTTTCATATAACCTAGTTGGGAATTGTTGAGTTGCGAGCTTAGATGGTGATATC
29	BC29	520	TGTTGAGTTGCGAGCTTAGATGGTGATATCATCCTGTGACTCATTGCTGAATACTTTCATCATTTCGATATAATCTGTCTGAAATTGAATACTTATATTATGA AATATTACCTGCTTACTCGCAATTTCTTGAAATTATCTTTGTATACTCAGGATGAACCCCTTAAATAATTCAATTAAGGTTATAAAACGTACATGTGATTTAG ATTCGGTTTTACATAAGTTTTCCATCTGCAACCGATTTATAAAACGTTGGAACAGGACTCCATTCTTTGTAATACTTAATAAAGTCTAGTTCTCGCTTAAT TAATTTTTCACTATAACTAGACATATTATGGTTTTTTTCATAGATGAAATACGAAGTATATAGAACGCATTTTACACTTCACTTTAATTAATAATTTTCATATC CTTCAGGTATAATTTTAAACTTATAACTCTAGATTCGGGAAAAAATACCTGATATATTCTTCAACATCAGAAGTAGTCAAAGAGTCTATTAAT
30	BC30	285	CATCAGAAGTAGTCAAAGAGTCTATTAATTTCAATTTTGAAAAAACATACTATCACCTAATTTTTAAATTAACGATTCTATACTACTTAATACTAATTGAT TTGCTACATTAACTCGGATACCTTTATTTTGAATCAAAATTAACATACTGAATGTTTACTTCTCCGATTAATGCGTAACCGAAATAATAGTAACTTCTTC CAATCCTTTTAACTGTTTGGACATTAATAGCATTTTCAATCTAATCTGAGGTTACCTCGTCAAGTAAC
31	BC31	769	TCTAATCCTGAGGTTACCTCGTCAAGTAACAATACTTTTGGTTTACGAATTAAGCCCTGGCAATTGCTAGACGCTGTAATTGACCTCCCGATAAAGTAACGTT ATCATTGGATCCAATCACTGTATCATATCCATGAGGTAGTTTTCTACAAACTCATTAAATACGCAAAAGACGTAACAGTTCTTAACTCATTCTTCTATTTCA TCAATTCAAAATATTAATTTCTCCCATATAGAACCCTTACAAATTCAGAATTCGAGGAACAAATGAATAATACTACGCAATTTTTCTAGCCTAAAATGCTGA ATAGGACTATTTATTTAGAAATACACCTTTATTAGTATCTATTAATTTAAATAAGATCTTTAGCAAACACTTTTTCCACATCCACTTCTCCCAACTATGCTTGT ATATTTATTCATCTTAATATCAAGTGTGAGGTTTTGAAATATCTTTGTTTCATCATATGAGAAGTAGATTTCTCAAGCTTATACTTTGATATTTTAGATCTT TATCTCCACTAACCTCATAATTAGATTATCATGCGACTTTTTCTAATTTTTTGGTATCGGCATCTTTTGAATGTTTCCATTAATCGATAGTAAATAACTTG ACTTCTTAGAAATATTTGCTCTATATACATCTTTGCCGCAATCATAACCCCAATTGTTAAGGTTCTTCAATTACCTGTAACCACCATACAAATAAATTAAGC AATTCCTAAAGACATGATACTTCCAATGT
32	BC32	687	GCAATTCCTAAAGACATGATACTTCCAATGTACAATTTTCTATCAATTTTCTTAACTGCCATAAATGCTCTAAAGTTTTCTTCAATTAACTTTTCTAATCG CTTCTGTAATAAATCCACGTTACCAAAATGATTTGAATAACTTTACTGCATTTAATCCTTCAATTAAGAATACCTGTAGCTGCAGCTCGACTCTCTAGTTCTACAAA AGAGGCTTTTTGGAGCTTATTTTTAAAGAGAATATACGGGATATATAAAACAGTAATAATATCATTGTCAATTAATCCCAATCCAAATGCTCAAAATAGAATAATAC ACTTAACAAAATTAATAACTCATACAATTTAGTAATTTGAATTTGAAGTAATGTAATCCAAATGTTCAATTTCTCGGGTTCAATTAATTTGTTGAAAGAT TCCCCACTTAAAGCTTTTGAATGACTTTCTACTTTACGATTTAAACATTAGAAAATAATTTAACTCTCATATTAGTTAATACTTTATGACCTAGTTTATTAGCAAA GTAATCTTCAAACGTCATGAGAACTCCTGATGTTGTTGGTATAAATACCATACTTAAATTAACCCACACAATAATCCATTTTCATAAATTTTTAAAGCGTTATC AATTAATAATCATTGTAAGCATTGGTACTCCAATGTTAAGACAGCATGTGCT
33	BC33	732	GGTACTCCAACCTGTTAAGACAGCATGTGCTATAACTTAGAATAATCATTGTTACTAAGAATTTTTCCGGTCTTAGAATAACCCACATATACCTTAAATAATCA GTCAGCTCTTTAAATTTATAGTAAATCCACCTTAATTAAGCAATTTGATAAGTAGTCAGTTTTTTGTTTCAATATGAATCTTTTGAAGAATATTTTCCACA ACTTGGACGATGAGCAATTTGAATTAAGTAAATCGTTTTGTTGATATACTATGGAATAGCTCCTTCAACTCTGTATTTAAGCTGAGGTTGCTTCGTC CAATAATAAAAATTTCTATTGTAATCAATGCCCTAGCTATAACTAGTCGTTGTCGTTGACCACCTGATAACTTGTTCATTTTACCAATTTGGTATTAAT CCTTCTGGTAACTGATCTATAAATTCATCACAACTTAGATAAAGTGCTCTCTTTATTTCTTATCTGTAGCCATTTGGTTAAAGCTTTTAGATTATTTTTAA

			TAGAATCATTTAAAAATAATACGCTTGTGCAGAAATTGCAAAAAAGTTACGTAATTGATTGAAATCTACATTTTCATACGATACATCATTTATTCTAATTTCCCA AATCTGCGGATTATATAACCCAAGTAATAAAATTAATATAGTAGACTTTCCTGCACCACCTTTCACCAGTAATTACTGTATTCTGCCCTTCTGTAATT
34	BC34 2x bestellt	727	GTAATTACTGTATTCTGCCCTTCTGTAATTTTAAACGATGCATCTTTAAAAATTTTAAAGACCATAAATCTCATATGTAACACCTATGAACCTAATTCATTAATTTTC AACCTTAGGTATTGATACCAATGGATGCTCCTTTGCTTTAGGCGCAATTTACTAAAAGTAATTTACTCTTTTATTCTTGGAAATTAATCTTTTAAAAAAGATAA TAACCTGTAATATTAATTTGGTTTTGTAATGGTTGGAACTAACAAACAAACTTGCCTACTACTTCTCTATACTTAACTGGCCTATAATATATAAATAGCCCCAT AGCCAAATATAAATGCTGGTACTAATGAATCAAAAAAACACGGTACTAAGTATGCTCTGAAATTTAGTTCTCTTTTAAAGAGAAAATAACATATTTAATCTTG CGATTTTTTAAACCCGTTAGAAATTAATATGTTTTTATTAATAATCTTTGTAATAAATAGGTTTATCTATAAAATTTTGGATATTTTCAGTCATATCTTGTTTCATATT TATGTGCTTCCCAACTAATTTACCTTGACGTTTATTAATATAATATAAAGGTAATAAACTTATTAAACTCACTATAATTTGTTCCAATTAATAAATAGTGGGTTTAT GAACTTAAATATATTGCAGAACCTATGGCTATAAATATAGATATAATTATCTCAGGAACTGTTTCGATACCTGTACTTTGTAGCGACT
35	BC35	776	CTGTTTCGATACCTGTACTTTGTAGCGACTTAATATCATTTACAAATAAATTCATACTTCTGATTGATTGCTTACGGAATAGTTCATAAGGCCAAATGAATTAATTT ATAAAAAACTATTCTTAATCTTACTACTAAGTTGAATGAAATTTTACTATAGAAGTACATAAAATAGTACCTTACAGATTTCTCCCGCTACCATTGCCAGTAAA ATTGCTATGAATGCTTTGAATACTAAATCTGCATTTGTACCAACTAAAATGAATCCATATACCATTGCACTAATGCAGGGGGAACAATTCGAATGATGCT CATAGTGGCTAACTGACCAACAATAAGATACCCTTTATTTCCCGTACATATCGTTTAAAAACATTTGATTGTTCCCTCTATTCTTTAAAAATTTGATATTT ATACCATTGCTCCTAATTTTAAATATGCGGATACTCAGGCTAACACATTAGAAGTTAAAATATCTGTATGGTGACTATCACACTGTTTTGACTAATAAACAGA ACAATTCCTTTTTCATCTAAAAAAGTATTATTTTATTAAGAATATTCTCTTCTGAATAAATTTTTTACGGCAGTAATCCCTTTTCAATCGCTAATTGGCTAACT TTTTCAAGATAAGGAAATGGTCCGTTACGTAATATCAATAAACTCCTCAATGTGTACTTCTCATGCCAATTAGCTAGTTGTTTTTCTCCGTTTTATTTTCT TCTATGAAGATGCATAGTTATTTGACTATCCACGAT
36	BC36	605	GAAGATGCATAGTTATTTGACTATCCACGGATATCCCTTTGATAAAAAACGGAGCTTTCTCAAACTAGACACTTCTTGATGAAATACATCTAACAATTTATTAT ATATAGAATTAGGGGTGCGCTTACTTACAATACGAATAAATTTCCACATGGCTTAAATAGATCTACTATTTGATCACATACCGTTTGTGGGTATAAAGTAAATA ACATAACCTCATGCTCAAATATTACATCAAACGTTTTTTGAGGAAAAATTTCTTTTAAATGTCATTATATCCCAACAACCTAACGATGCACGGTTATATTCCATATC TTGAATTTTTTTCAGTAAATTTCTTCAACATAAATTTCTGATTGTTCTATTCTATATAAATTTGAGCGTAAGGCATAATTTAAGCCTATTCTCCGGTCCCAGCC CCTAATTCAGAATATCTTTTTCTTCATATATGTATCTGCAAGTTGATGCAGACCTACAATCATATCATCTGTCTACTACGTCATGATGCATCATATTGATTAGCT AAATTTAGTGTATACATTAAGAAGCTCATCTGATTGAGGGTCAAGACTAATATCCCATCTAATGATCTTCGAGG
37	BC37	767	CTAATATCCCATCCTAATGTATCTTTCGAGGATTTCTCTATTTTCAATCAACAAGCTTTATCGAAAGTTGAAAATACTCTCTCATAACGATATAGATTTATAGTAA ATAGTTTTAAAACTGATTAACCACATTTTTCACTTCTTCTGGAAGTATATCCTCTTCAATTTAGACTACCTATACTTTTGTAAATTTCTCCAATAATTTCTTTACTT TAGGATGTACATAAGGTTTTAACCTTCTGTATCAAATTCATAACCACATTTTTCAATTAATAATATGTATCAAAGGTATTATTCTTAAACACTTCTAACGATTG CTTTAAAAACATACCATCTTGTCTACCTATACCAACCGCAATTTGAATAAATATCAATTTAGCCCTGTGAGATACTATCTTTAATGGATTTTTTATTACTTCACTT CGCTTATCCATCCTGATACTACTTTAAAAGCTTGATTATCAGTTTTAGAATGTAAGTTATGTTATTTGATTAAGCTCAATTTTCTCAGGACCTTTTACCC GTTTCATCATCCCTTGAAATATAATTACATCGATTAACACTTTAGAATCATATAAAAACAATAATTTCTTTTATTACTTCTACATCATTGATTTTCAATATTTTA ATTTTCAATTCGTTTCTCATAGCAATAGAAACATCTTCAAACTTTTCTCATTACTTTTAAATATAAGTTTTATTGGACCAATCATCGCTTGATTATTGGCTA GACTTCTCCAACCAAGCTTT
38	BC38	797	ATTGGCTAGACTTCTCCAAACCAAGCTTTTTCAATTAATAATTTCCCTTCTGAAAAATCAGCCAATTCATACAATATGGTCAGAAATTTTTTTTTTATAAAGTTC CCCTCTACTTTAATAATTTTCAAAGATTAATCCTAAATTTGATAACAGCGATTCCAGGTAATAAGTTTCGCTATCTTTATATTGTATTTTCAATAGTCGAGCA ATTAAGGTGTATAATCCCCTTAAATATACATTTTGTAAATACATATTAACACATTAGCTATTAATCTCTTGTGATCTTATAACATTAATTTCTTTCTCATTAAAT TTTGAATCTTTCCGCATATGCGAGGTAGTAATTTGCAATTTTGTATAGCTAATTTTAAATATCATGTTAGCTACTACATTTCAATCATGACCTAATTTCTACATA AGATTGATGAAGTTTCGTTTATATAAATCCACACGACTGTCTCTAAAAATGACTCTAAAAAAGCAGCATAAATATATCGAGAATTAGATATTTCCCTTAAATC AGTGTATAAATTTCTCTAAATAAATACTTTCTACTACTTCTATATCCATATGTTCAAATGTCTTCTGTATATCATTAAGACTGATAAACCCTGATTTAACGGCTGT TGAAAAGGCAATGCTGATTTATAAAAATCTAAATATTTTCTTCACTCATGGCTATGATTTCTGCATTATGACTTCTTTAATGCCTGTAACTTATATCAGAAT ATGCACTTGTATCTAATAAACACAAAACATACCCTGCGGTTTCAGTTTCTAATT
39	BC39	720	AAACATACCCTGCGGTTTCAGTTTCTAATTTTCTTCTTCAACATCGCCATATAAAGACTATCCGCTAGAAGTTCTCCTTCAAAATGGAACAACGGATCAAAA ATTTTATAATTTTCCATCAGATTTACATTTTTTATCTCTATATAATGAAATTCGTGTAATCATTATAATTTAAGCAATATGGTAAATAATAAGCATCTACTACTAC AAAGATACGATCTTGTCTTTATTAATTTTCTAGTAATATCTGAAACTCTTCTTTTTCATCAAAAATATATTCTCTCAAAATATATATTATTTAAAAAATGCAAGTTTCA ATTTCAACGACCTATAACGTGGGTAAAATCGTAATTTATTTTCTTCTAAATAAGACATAAGCCCCATTTGTTTCCATATCTGTCTATAATCTATTGACTTTGAATG GACTATATTGGTAATAACTAACTAATACAATTATGATGACTTAAGATAAGGCTTTTCTTTTATTATCCACTTGAATCACTCATTTCTTTATTTAATTTAAT

			ATTCTAAAGTTATTGAAAAATATGCATAGAAGGATTATCCCAAATTTAATACAATTAATTTCTAACGGCTGATCAAAGTAATTGAATCACACCATATTTTGA GAATAAATTGCTTTAACTCTCCAATCTTATTATTAATATAAGGAAATTTAACTGCTAATCGATTCCCAAATTTAGGTTCCCTAC
40	BC40	599	CTAATCGATTCCCAAATTTAGGTTCCCTACTAACGAAATCTGTAAGATGAECTATAAGAAGCAATAAATGATCATCTTTACTAATTTGTACTTTTCATAAAA ATCACCATTATTAGAAGCACCTAAAATAGAAATTTTTATACATATTTTACCAAAAAAATAGTTGTCTTCCAATTCATATTGCCCCATTTGGCTCATCG ACAAAAAGCTCATATGGAACACCTTCCATTTCAAATAAACCCCTTTGGACAATATTAGCTGGAAGAGATGCCACCAAACTTAAGGCCCTTCTGCTTCAA GACCTGTTTTAGTAAATCCTTGATTATTAATTTGTTGGCGAAAATCTAATTTTATATAGTTTTTGCAGTATTTACTCTACTCATATTACCCCTCTACTTCTAAAT TTTTTAAAGGTAGGAACTATATAAAAGTTCTACCTTAAATGTAGTAAAATTACATTATAAAATTATTTCTAAATCTTATTAACAGTTACTTTGATATATAA TACTTTAGTTTGCATGCTTATTCATCTCCTTAACCTGTTTTTTTATCTTTCTTAGGAGCATTGAGTTTAC
Alternative gBlocks® zu den gestrichenen Blöcken BC14, BC16 und BC19:			
41	BC14.1	125	CTTCGTAGATCTCCACCTTTAAATCAACACCATTCTAAATTATTATCATTAAGATTGAGAAATTTTCGATCTTTCATTAACAAATGTTACCAAGAGCAGTCAATAA ATGTCAATATATTCTTAAA
42	BC14.2	369	CCAAGAGCAGTCAATAAATGTCAATATATTCTTAAAAAATAATATTTTATCAAATTATAATTTTTTAATAATATTATCTTTTTAGAAATTGTCTAAAATAAATTTGA CAAATTATAAATCAAGGGTTAACATTCCTTTAGTGAATATATTTACAATTAATCAAAGATAGGTGGAAAATATATGAAGTTATCTCAGGCATTGGACTTATTAAT TTATAATGAAGAAGTTTCACACCAAATCAATATGGTTCCTAGTGAAAATTATGCTTCTGTTCTTTCAAGAATCCCTTTATTATTAGATGTTTACAATCGATAT TTTTTCAATGTTGAACAAGATGAGGATCATTGGAACCTTCGCGGGGAC
43	BC14.3	242	ATGAGGATCATTGGAACCTTCGCGGGGACAAAATGTGGCTGATCTTGAATCTAAGCTTGCAATTTCTTTACTAAAAGAATTGACAACGGCAAAGCAGCTTAA CTTACGCCCTATTTAGGTTTAAATTTGATGGCATTAGTATTAATGCATTAGGAAAGAATACAGGTAATAACATTATGATTGTTTCACCTGAACAAGGTGGTC ATTATGCTACTCAACAGTTAGCAGAAAGCTTCGGG
44	BC16.1	137	GCACCAGAGTCAATTCACGCTTAGGAGTAAATGAAATTAATCTCGTTTTGGAGCATCTATTTCTGATATGGATGAATTGTCTCAAATTTATGATGATGCTATCAG TAATAATGGTTCTCCAGAAGAAATTAATCCAG
45	BC16.2	524	TAATGGTTCTCCAGAAGAAATTAATCCAGAGTTAATAAATTAAGAACCATAAAGAATGCCTATTCATATGATATTAATTTCTAGCGAACTAAAAGATAGAAT TAATAAATTAATCTCTATTTCTGTAAGAAATAGAGAAAAATAACTATTTAATATTAAGAATCACATAATTTATACAAAAATTTATTTTCGATTTTAAA ATGAGAGAATATCTTATATCAAAACGCTTTTGTATTATTTAAATATAAAAAAACCTTCCCGCAATTTAAAGAACAGTTTTATCATCTTTTATTACAGTATAAATAA AAATTGCAAAGGGGATTTAAATGAATTTTGAACCTTGATAAAGAATATGATGGCACCCATGGACTTCAACTTACCAAATTTAGTCTAATAATACTATTATG CAGAAAGGCGATGGATGTTATATTACAGATTAATGGTAAAATTTATCTCGATGCCAAGAGTGCCGTTTTAAATGCAAGTTGTGGATACAATCATCCG
46	BC16.3	199	TTAAATGCAAGTTGTGGATACAATCATCCGAAAATTTATTTCTGCTATACAATCACAATTAACAGAATTTATGAATTTTATGATCATGCTGAATTTTCAACCATACCT CCCATCTTTTATGCTGAAAAGCTTTCTAGCATTTTACCAAAGCAACTAGAAGTACTTTTTTTTGTACTAGCGGTTCTGAAGCAACTGAAACAG
47	BC19.1	125	CAGTCTATTTATCAATAGACTGTGGCTATTTTCGAGTAATTTACAGCCTTAAATCCATTAGTTGAAATGGTCATATCAAATGAATATCGAGTGGTTGAAGATAA TTGTTTCATACGCTTTTTCT
48	BC19.2	125	TCGAGTGGTTGAAGATAATTGTTTCATACGCTTTTTCTAAATTAGTTTTATTTGAACTACCCCCACTTTCACTTCGTTTAGAAGTGAGGGATTCTTAAGTAAAGAG TTCTATCGAACTCAATTGA
„Helfer“-gBlock® für die Stückelung von Sub-Block 6:			
49	BC16-17	1144	GCAAAGGGGATTTAAATGAATTTTGAACCTTGATAAAGAATATGATGGCACCCATGGACTTCAACTTACCAAATTTAGTCTAATAATACTATTATGCAGAA AGGCGATGGATGTTATATTACAGATTAATGGTAAAATTTATCTCGATGCCAAGAGTGCCGTTTTAAATGCAAGTTGTGGATACAATCATCCGAAAATTTATTT CTGCTATAACAATCACAATTAACAGAATTTATGAATTTTATGATGCTGAATTTTCAACCATACCTCCCATCTTTTATGCTGAAAAGCTTTCTAGCATTTTACCAA AGCAACTAGAACGTACTTTTTTTTGTACTAGCGGTTCTGAAGCAACTGAAACAGCAATAAAAAATGGCGCGTATGACTTTTCAAGATTGATGGGAGAAAACAAAA AAATAAGATCATTCTTTAGATAAAGGGTATCACGGTATTACATTAGGGGCTCTTTGGGCTTCTAATATTCTTTAGCAAGAAATGAAGTGTATTAAATGAATG AAGGTTATGAGAGCATCCCAACACCAATTTGTGAAAAGTGTCTGTGCTTTTCTTCTCAGATATTTGTGAACATCCAAGTGAAGAGAAGTAAACTAAAATTT TTAGAGTTAGGTCCTGAAAATGTAGCCGCTTTTATTATGAACTGTTTTAGGACTTTGGTGGTATTGTTATTTCCATCAATAGACTATATGCAAGAAAATACAAAA AATTTGTCTGAAATATGAGGTAACAACTAATATTAGACGAAACAATGACCTGATGGAGCTACAGGTAATAATGTTTGGCGTTTGAACATTTTAAATATAGTACCAG ACATTCTTATCTGCGAAAAGGTATTAGCGGTGGTTATTTCCCGATATCTACTATAACAACCTCGCAAGAAATTTACTATAAATTTTGTGAAGATCCCTTTCTAA ATGGTTTCCGCCATGGGCATACAAATTCAGGACATGCTACCGCTGCAGCTGCAGCTTTGGCTACAATCCAAGTAAATGAGGAAGAGAAGTAACTAGTTACTAATTC TAAGAATATGGGGAAATACTTATCAGAAAAAATTTGCTCTAACAGAAAAATATGATTTTATACGTAATGTACGTGGTCTAGGCTTATTATTAGCTCTCGAC

„Linker“-gBlock® für das finale Gibson-Assembly:			
50	Bael-Linker- (Super Cos)	160	GAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAATTCCTAATGCAGTGAAAAATATTTTACATGGATCTAGGACTGAGTATGCATGCCACGATAGTATCAGCGGAGTTTTATCTTTCTTAGGAGCATTGAGTTTACCCTGCATTAAGAATTCCTATGTTTGACCGCTTATC
„Linker“-gBlock® für die Umklonierung in den Vektor pBS1C:			
51	Bael-Linker- (pBS1C)	148	AAGCTTATCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAAAAATATTTTACATGGATCTAGGACTGAGTATGCATGCCACGATAGTATCAGCGGAGTTTTATCTTTCTTAGGAGCATTGAGTTTACACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTCCGGCAAAA
gBlocks® der beiden Promotoraustauschkassetten:			
52	BS_1 promcas _01	1083	GTTTGTCTCCTTATTAGTTAATCGCTAGCTTTTCTCCACATTTATTGTACAACACGAGCCATTTTTGTCAAATAAAATTTAACGGTATCAACGTTAATAAGACGTTGTCAATAAAATTTTTGACAAAATTTGTTAAACAAAATGCCGGCCTTTGAATGGGTTTCATGTGCAGCTCCATCAGCAAAGGGGATGATAAGTTTATCA CCACCGACTATTTGCAACAGTGCCGTTGATCGTGCTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGAGTGAATGTCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTA TCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCGAA GCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCC TGGAGAGCGGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTACCATTGTTGTGCAGCAGCAGATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGGAACTGCAATTTGGAG AATGGCAGCGCAATGACATTTCTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCAGCATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCCT TGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGAC TGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCGCCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGCAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGG CAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAG TTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAGGTAGTCGGCAAATAAGTTAAAC
53	BS_2 promcas _01	1111	GTCGATCAAACCCCTTCCACCGCTAGCTTTTCTCAAACCTTATTGTAATCTTACGAAATACTTGTCAAGCTTGCCATCTTAACGGCGCGCCAAAATGCCGG CCTTTGAATGGGTTTCATGTGCAGCTCCATAAGCAAAAAGGGGATGATAAGTTTATCACCACCGACTATTTGCAACAGTGCCGTTGATCGTGCTATGATCGACTG ATGTCATCAGCGGTGGAGTGAATGTCGTGCAATACGAATGGCGAAAAGCCGAGCTCATCGGTGAGCTTCTCAACCTTGGGGTTACCCCCGGCGGTGTGCT GCTGGTCCACAGCTCCTCCGTAGCGTCCGGCCCTCGAAGATGGGCCACTTGGACTGATCGAGGCCCTGCGTGCTGCGCTGGGTCCGGGAGGGACGCT CGTCATGCCCTCGTGGTCAAGTCTGGACGACGAGCCGTTGATCCTGCCACGTCGCCGTTACACCGGACCTTGGAGTTGCTCTGACACATTTGCGGCC TGCCAAATGTAAGCGCAGCGCCATCCATTTGCCTTTGCGGCAGCGGGGCCACAGGCAGAGCAGATCATCTCTGATCCATTGCCCTGCCACCTCACTCG CCTGCAAGCCCGTCCCGTGTCCATGAACCTGCATGGCCAGTACTTCTCCTCGGCGTGGACACGATGCCAACACGACGCTGCATCTTCCGAGTTGA TGGCAAAGGTTCCCTATGGGGTCCCGAGACACTGCACCATTTCTCAGGATGGCAAGTTGGTACGCGTCGATTATCTCGAGAATGACCACTGCTGTGAGCGC TTTGCTTGGCGGACAGGTGGCTCAAGGAGAAGAGCCTTCAGAAGGAAGGTCCAGTCCGTCATGCCTTTGCTCGGTTGATCCGCTCCCGGACATTGTGG CGACAGCCCTGGGTCAACTGGGCCGAGATCCGTTGATCTTCTGCATCCGCCAGAGCGGGATGCGAAGAATGCGATGCCGCTCGCCAGTCGATTGGCTG AGCTCATGAGGCGCGCCACTGCGTCAATACACGTTGACACTCTTTGAAAGTGTGTTAAATATCAGGGAGAAAAGCTAGCGCTCTTAAGGAGGATTTTAGA
gBlock® für die Integration der Gene <i>IKA_05328</i> und <i>IKA_05331</i> :			
54	BS_2 genecas _01	2966	GGATCCTAGAAGCTTATCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGACCTGCAGTTATTTGCCGACTACCTTGGTATCTCGCCTTTACAGTATGGACAAATCTTCCA ACTGATCTGCGCGCAGGCCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATACTGGCCGGCAGGCGCTCCATT GCCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGGATTTTGGCGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCAGCCCA GTCCGGCGCGGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCAATAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCCAGGAACCGGATCAAAGAGTTCCCTCCGCCGCTGGACCTACCA AGGCAACGCTATGTTCTTGTCTTTGTGTCAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATT

		<p>CTCCAAATTGCAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAG GGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTGCTTGGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCAACCCTAACCGAAATCAATATCACTGTGTGGCT TCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTGTGATAGTTGAGTCGAT ACTTCGGCGATCACCCTCCCTCATGACATTGCCTCCACCGCTGATGACATCAGTCGATCAGCAGATCAACGGCACTGTTGCAAATAGTCGGTGGTG ATAAACTTATCATCCCCTTTTGCTGATGGAGCTGCACATGAACCCATTCAAAGGCCGGCATTTCCTGCAGGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCTTT CTGCGTTTATACTAGAGAGAGAATATAAAAAGCCAGATTATTAATCCGGCTTTTTTATTATTTACCTGGGATTTCCGAAGATTGACTATTCTCAGATAAAGT CTAGATCGTTTGCATAATTCGTGCGAGTTCTTTTTCTAAAGCAGCGGGCTCGTTTGCATAATTGTAATCCCTAAAACTTCTCTATAGCCTCTGGATGGGAAC TGATTAGCTTGTGACAGCATCCTGTTGTTCCAGATATGCGTTCATTCTTCGAAATTTGGCATCCCATGTGAAACCGAACCATAACTCATCTTCTATTGCCTTTT GATATTCTTCAGACATTTGATTTGATTGATCGGATTGTCCCTTATATTTTGATAGAATATTGGATAATATACGTGCTCCACATATAGCATCATGGATACCCCTGCG CCATGCCAGGATCTTTAAAACAACTGCATCTCCAACCAACGCCCATCCTTTCCATTCTTTTATACCAGTAATTATCATATCCGAGAATGCCTTTGACCGGT TCTACTAGTTCTGCATTTTTCAAGCGCGCCCAATTGTTGTATTTGGAAAGTTATCTGTAAAGAAATTGCGTAGACAGCTTTCCGGATTTAATTTCAACCGTTC TATCAATTCCTTATTTTCTAATGGGAAAATGCCGACAATTACATATAAATCATCATTGTCGGAAGAGAATGGCTGTGTTATCTTTTATCTTGTATACTTCAAAT TTAGGGACATTATCGTGGCGAAATCCAGAGAAATACCCGAAATAGATGCCGACTGTTGCCGGAATACTTATTTGAGTTCACCTTTTACCAGCTTGCGAATAA TAGAGGATCGGCCGTCTGCCCGACTACCAGGCGAGCTAAAAATCTTGTTCGTTGTCGCGCTCTAAACCTTTACCGCTATCACTGTTTCGTCATCAC GGATGACATCCGTCACACGAAATCCTTCAAACAGTTACATTCATTTGGGATTTGGCTTGTTCAGTAGAATATGATCGAGATAAGTCTTCTAATAACAATAA CAACTTCTCCTCCGTAACCTTAGGGATGAGACCTTCTATCAGGATCCTCAAATGAAATTTAATATCCCGTACCGGCGGTGCTTTTGTTCCTAATAACTT GTCCAGGACACCGTTTTCTGAAGAAGAGCGACAGTATTATTGAAAAAGGTATGGGTTGATAATGTGTCCTTGAAAAATTCGCTCGGTCCACTAACAACAC ATGGAAACCTGCCTTAGCAAGATAAATTGCCAGGGTAGAGCCGGCACATCTAGCACCGGTAATGATGACATCATACGTCTTATTCATCGTATCACTCCATTTT CAAGTATAATTATTCATGTATGTAATTCATAACTTCTCGAATGTAACCTTTCAAAGGCTGTTTAGTATCTACAACCTAAACCTTATATTCAGGAGGTTTTTACTA TTCTTGATAGTATATTTAAAAGATTCTTCAGACTGTATCTCTTAATTTGGCTTAGCATTCTATCACGGTTTTTAAATCTGAAATTTATTTCACTATCATCTAG GTAACATTCATATATTTATATTTAACATTATTTTTTTGATAAATCTGTTCTTTTCAACCATTTCTTCATACAAGCAAGGACTATCAAATATTACAGCCTGTC CCTCTGATAAGTGAATTCATTAAGACCAATCAATATTGATGAAATCTTACCAGCAAGCTTTACATCAATTGAAGCTTCTCAATGGAAAGTAATAAAGCG GTTTTTACAATATCGTGGTCAATAATAACTGCTCCTGTTCTCTTAGCGATTTTTTCGAGCAAGTGTGACTTACCAGAGCCAGGGAAACCTGACATTTGAACAAA AAACATATAAAACACCCTCTCATGATTCTCTTAGAATGATGGCCTAGTTTGAATACCCCTCTTAACAT</p>
--	--	---

Tabelle 12: Bezeichnungen und Sequenzen (5'-3') der eingesetzten gBlocks®.

2.1.9 Plasmide und Cosmide

Name	Bezeichnung	Quelle
pBluescript sk (-)	Standard Klonierungsvektor <i>lacZα</i> , Amp ^R	Stratagene
pBluescript sk (-) -(BC14)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC14.1, BC14.2 und BC14.3. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(BC16)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC16.1, BC16.2 und BC16.3. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(BC19)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC19.1 und BC19.2. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 1)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC1, BC2 und BC3. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 2)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC4, BC5 und BC6. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 3)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC7, BC8 und BC9. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 4)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC10, BC11 und BC12. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 5)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC13 und BC15 sowie mit dem Bts ⁹¹ -ausgeschnittenen Block BC14 aus dem entsprechenden Vektor. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 6)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC17 und BC18	Diese Arbeit

	sowie mit den Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Blöcken BC16 und BC19 aus den entsprechenden Vektoren. Amp ^R	
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 7)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC20, BC21 und BC22. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 8)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC23, BC24 und BC25. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 9)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC26, BC27 und BC28. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 10)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC29, BC30 und BC31. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 11)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC32, BC33 und BC34. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 12)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC35, BC36 und BC37. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Block 13)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den gBlocks [®] BC38, BC39 und BC40. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Sub-Block A)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Sub-Blöcken 1, 2 und 3 aus den entsprechenden Vektoren. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Sub-Block B)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Sub-Blöcken 4, 5 und 6 aus den entsprechenden Vektoren. Amp ^R	Diese Arbeit

pBluescript sk (-) -(Sub-Sub-Block C)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Sub-Blöcken 7, 8, 9 und 10 aus den entsprechenden Vektoren. Amp ^R	Diese Arbeit
pBluescript sk (-) -(Sub-Sub-Block D)	pBluescript sk (-) Derivat Verdaut mit EcoRV. Q5-Amplifikation mit überhängenden Primern. Rezirkuliert via Gibson Assembly mit den Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Sub-Blöcken 11, 12 und 13 aus den entsprechenden Vektoren. Amp ^R	Diese Arbeit
mrsMR02	Integratives SuperCos1 Derivat Enthält die multiple recombineering site (mrs), <i>oriT</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31, Tet ^R , Kan ^R	(Basitta et al. 2017)
SC1TR01	mrsMR02 Derivat Die multiple recombineering site (mrs) wurde beidseitig mit PacI ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert. Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
SC1TR02	SC1TR01 Derivat Verdaut mit PacI. Rezirkuliert via Gibson-Assembly mit dem gBlock [®] „Bael-Linker-(Super-Cos)“. Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
SC1TR03	SC1TR02 Derivat Verdaut mit Bael. Rezirkuliert via Gibson-Assembly mit den 4 Bts ^{qI} -ausgeschnittenen Sub-Sub-Blöcken A, B, C und D aus den entsprechenden Vektoren. Tet ^R , Kan ^R	Diese Arbeit
pBS1C	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> Shuttle-Vektor Enthält ein RFP in der MCS. Fähig zur Integration im <i>amyE</i> -Locus. Amp ^R , Cml ^R	(Radeck et al. 2013)
pBS1C -[Bael-Linker]	pBS1C Derivat Verdaut mit EcoRI und SpeI. Rezirkuliert via Ligation mit dem ebenfalls EcoRI und SpeI verdauten gBlock [®] „Bael-Linker-(pBS1C)“. Amp ^R , Cml ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR01	pBS1C-[Bael-Linker] Derivat Verdaut mit Bael. Rezirkuliert via Gibson-Assembly mit dem <i>Bacillus cereus</i> Gencluster, welches mit Bts ^{qI} aus SC1TR03 ausgeschnitten wurde. Amp ^R , Cml ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR02-Apra	pBS1CTR01 Derivat Der gBlock [®] „BS_2promcas_01“ mit dem Resistenzgen <i>aac3(IV)</i> wurde via Red/ET-Rekombination integriert. Amp ^R , Cml ^R , Apra ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR02	pBS1CTR02-Apra Derivat Das Resistenzgen <i>aac3(IV)</i> wurde durch AscI Verdau ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert. Amp ^R , Cml ^R	Diese Arbeit

pBS1CTR03 -SpecStrep	pBS1CTR02 Derivat Der gBlock® „BS_1promcas_01“ mit dem Resistenzgen <i>aadA</i> wurde via Red/ET-Rekombination integriert. Amp ^R , Cml ^R , Strep ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR03	pBS1CTR03-SpecStrep Derivat Das Resistenzgen <i>aadA</i> wurde durch Pmel Verdau ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert. Amp ^R , Cml ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR04 -SpecStrep	pBS1CTR03 Derivat Der gBlock® „BS_2genecas_01“ mit dem Resistenzgen <i>aadA</i> wurde via Red/ET-Rekombination integriert. Amp ^R , Cml ^R , Strep ^R	Diese Arbeit
pBS1CTR04	pBS1CTR04-SpecStrep Derivat Das Resistenzgen <i>aadA</i> wurde durch SbfI Verdau ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert. Amp ^R , Cml ^R	Diese Arbeit
PIJ790	λ-Red (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>araC</i> , <i>rep101^{ts}</i> , Cml ^R	(Gust et al. 2003)

Tabelle 13: Plasmide und Cosmide.

2.1.10 Bakterienstämme

Name	Bezeichnung	Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^I ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR1</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam⁻ dcm⁻ hsdM^r Tet^R Cml^R</i>	(MacNeil et al. 1992)
<i>E. coli</i> BW25113 / pIJ790	<i>E. coli</i> K-12 Derivat: <i>ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i> λ-Red (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>araC</i> , <i>rep101^{ts}</i> , Cml ^R	(Datsenko et al. 2000) (Gust et al. 2003)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	(Burkholder et al. 1947) (Zeigler et al. 2008)
<i>Bacillus subtilis</i> OKB120	<i>pheA1 sfp srfA::Tn917</i>	(Nakano et al. 1988)

Tabelle 14: Bakterienstämme.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierungsbedingungen

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Sofern nicht anders beschrieben, wurden sämtliche *E. coli* Kulturen bei 37°C für 15-20 h über Nacht inkubiert. Die Inkubation von Flüssigkulturen erfolgte unter Schütteln bei 200 rpm im 300 ml Erlenmeyerkolben ($V_{\text{Medium}} = 50-100$ ml) bzw. im Reagenzglas ($V_{\text{Medium}} = 5$ ml). Festmedien wurden im Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung von Festmedien-Kulturen wurden die entsprechenden Platten ggfs. für einige Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden je 700 µl einer frischen Flüssigkultur mit 300 µl Glycerol 80% (v/v) gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Kultivierung von *B. subtilis*

Die Inkubation und Aufbewahrung von *Bacillus subtilis* Kulturen erfolgte bei 30 oder 37°C über einen Zeitraum von 15-120 h. Flüssigkulturen wurden entweder im 300 ml Erlenmeyerkolben oder im 300 ml Schikanekolben mit innenliegender Metallspirale unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert ($V_{\text{Medium}} = 50-100$ ml). Für die DNA-Transformation wurden 100 ml Erlenmeyerkolben mit innenliegender Metallspirale verwendet ($V_{\text{Medium}} = 10-20$ ml). Kleinere Volumina wurden im Reagenzglas inkubiert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden Platten mit Festmedien bei Raumtemperatur gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden je 700 µl einer frischen Flüssigkultur mit 300 µl Glycerol 80% (v/v) gemischt und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Produktion von Sekundärmetaboliten

Bei Kultivierungen zum Zwecke der Produktion von Sekundärmetaboliten wurde zunächst eine Vorkultur im 300 ml Erlenmeyerkolben ($V_{\text{Medium}} = 100$ ml) unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika angelegt und für 15-24 h bei 30 oder 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte im 300 ml Schikanekolben mit innenliegender Metallspirale ($V_{\text{Medium}} = 70-100$ ml) ohne Zusatz von Antibiotika. Die Hauptkultur wurde mit 1 ml Vorkultur angeimpft und anschließend für 24-120 h bei 30 oder 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Ggfs. wurden unter sterilen Bedingungen zwischenzeitliche Proben entnommen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Elektroporation von DNA in *E. coli* werden elektrokompetente Zellen benötigt. Diese können nach Herstellung für längere Zeit bei -80°C aufbewahrt werden. Für die Herstellung wurden 100 ml LB-Medium mit 2-5 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4°C , 4000 rpm) geerntet. Das Zellpellet wurde in 10-25 ml Glycerol 10% (v/v) resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 4°C , 4000 rpm). Der Waschvorgang wurde 1-2 Mal wiederholt. Schließlich wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert und zu je 50 μl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2 Transformation in *E. coli* durch Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde mit 1-5 μl (~ 100 ng) Plasmid- bzw. Cosmid-DNA vermischt. Das Gemisch wurde in eine eiskalte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt und auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gerät MicroPulser Electroporator (Bio-Rad Laboratories) unter Verwendung von Programm EC2 (2,5 kV). Direkt nach dem Impuls wurden je 0,5-1 ml eiskaltes SOC Medium zugegeben und der Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Selektion wurden je 50-200 μl Transformationsansatz auf eine LB-Platte mit dem benötigten Antibiotikum ausgestrichen. Die getrockneten Platten wurden für 15-20 h bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Transformation in *E. coli* durch chemische Kompetenz

Als chemisch kompetente Zellen wurden ausschließlich gekaufte NEB[®] 5-alpha Competent *E. coli* (New England Biolabs) verwendet. Diese wurden bereits zu 50 μl aliquotiert geliefert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurde ein Aliquot für 10 min auf Eis aufgetaut und mit 1-5 μl (~ 100 ng) Plasmid- bzw. Cosmid-DNA vermischt. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 30 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 μl eiskaltem SOC Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Selektion wurden je 50-200 μl Transformationsansatz auf eine LB-Platte mit dem benötigten Antibiotikum ausgestrichen. Die getrockneten Platten wurden für 15-20 h bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Transformation in *Bacillus subtilis*

Für die Transformation in *Bacillus subtilis* wurde ausschließlich der integrative Vektor pBS1C verwendet, bzw. davon abgeleitete Derivate mit den entsprechenden DNA-Inserts. Die Integration dieses Vektors erfolgte in den *amyE*-Locus des *Bacillus subtilis* Genoms. Die transformierten Stämme waren *Bacillus subtilis* 168 sowie *Bacillus subtilis* OKB120. Für die Transformation wurden 20 ml MNGE Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit innenliegender Metallspirale mit 1-2 ml frischer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 400 µl dieser Kultur in ein Reagenzglas überführt und 1-2 µg der zu transformierenden linearisierten Plasmid DNA zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde (37°C, 200 rpm) wurden 100 µl Expression-Mix mit subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen zur Expression des Resistenzgens zugegeben (C_{Cml} = 0,625 µg/ml). Nach einer Inkubationszeit von einer weiteren Stunde (37°C, 200 rpm) wurde der Transformationsansatz auf LB Cml Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

2.3.5 Blau-Weiß-Selektion

Wird für die Transformation in bestimmte *E. coli* Stämme (z.B. *E. coli* XL1-Blue) ein Vektor verwendet, dessen MCS innerhalb eines *lacZα* Gens lokalisiert ist, kann die Blau-Weiß-Selektion eine sehr hilfreiche Methode sein, um rekombinante Plasmide von nicht rekombinanten „leeren“ Plasmiden zu unterscheiden. Wichtig ist, dass der verwendete *E. coli* Stamm das Gen *lacZω* trägt. Erst die gemeinsame Expression des α-Fragments (vom nicht rekombinanten Plasmid) sowie des ω-Fragments (vom Bakteriengenom) der β-Galactosidase führt zu einem funktionellen Enzym (sog. α-Komplementation). Werden dem Medium nun die beiden Stoffe IPTG (als Induktor) sowie X-Gal (als Enzymsubstrat) zugegeben, entsteht bei Vorhandensein der aktiven β-Galactosidase ein blauer Farbstoff. Ist jedoch das *lacZα* Gen auf dem Plasmid durch Einbringen von DNA in die MCS unterbrochen (z.B. durch Ligation oder Gibson-Assembly), wird das α-Fragment der β-Galactosidase nicht korrekt exprimiert und das Enzym ist nicht funktional. In diesem Fall bildet sich bei IPTG und X-Gal Zugabe kein blauer Farbstoff. Blaue Kolonien tragen demnach „leere“ Plasmide, wohingegen weiße Kolonien rekombinante Plasmide tragen. Bei der Transformation von pBluescript sk (-) Derivaten in *E. coli* XL1-Blue wurde zur Unterscheidung von rekombinanten und nicht rekombinanten Plasmiden stets die Blau-Weiß-Selektion verwendet. Hierfür wurde auf jede Agar-Platte vor der Transformation je 150 µl IPTG-Lösung (33 mM in H₂O, sterilfiltriert) sowie 150 µl X-Gal-Lösung (2% (w/v) in DMSO) aufgetragen und vorsichtig auf der Oberfläche verteilt. Nach einer Trocknungszeit von ca. 30 min konnte der Ansatz in der üblichen Weise ausplattiert werden. Bei undeutlicher Blaufärbung konnte diese durch Lagerung für mehrere Stunden bei 4°C verbessert werden.

2.3.6 Isolierung von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli*

Für die DNA-Isolierung aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet. Hierzu wurden 3-5 ml einer frischen Übernachtskultur in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 2-4 Schritten abzentrifugiert (2 min, 4°C, 13600 rpm) und der klare Überstand jeweils verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Sol I resuspendiert und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl frisch zubereiteter Sol II zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 µl eiskalte Sol III zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 min, 4°C, 13600 rpm), der klare Überstand mit der Pipette entnommen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufreinigung wurde nun ein fertiges Gemisch aus Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol im selben Volumen zum vorher überführten Überstand zugegeben und durch Vortexen für 30 s kräftig gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde erneut zentrifugiert (15 min, 4°C, 13600 rpm). Die obere wässrige Phase wurde, ohne die Interphase zu berühren, vorsichtig mit der Pipette entnommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufkonzentrierung der DNA wurde die Methode der Alkohol-Präzipitation verwendet. Hierzu wurde dem Ansatz ein gleiches Volumen an eiskaltem Isopropanol (100%) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30 min, 4°C, 13600 rpm). Der Überstand wurde abgegossen und das DNA Pellet mit 500 µl Ethanol 70% (v/v) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 4°C, 13600 rpm) wurde der Überstand möglichst vollständig mit der Pipette entnommen, das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 30 min getrocknet und schließlich in 30-50 µl TRIS-Puffer (10 mM, pH8) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Zur Isolierung größerer DNA Mengen wurde ein Volumen von 100 ml Bakterienkultur verwendet (verteilt auf 2 x 50 ml Zentrifugenröhrchen). Die Volumina der verwendeten Lösungen wurden dabei entsprechend erhöht. Um den Einsatz von toxischem Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol möglichst gering zu halten, wurde hier nach der alkalischen Lyse zunächst eine Alkoholpräzipitation durchgeführt. Die gefällte DNA wurde im 50 ml Zentrifugenröhrchen in ca. 400 µl TRIS-Puffer gelöst und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol und eine zweite Alkoholpräzipitation analog zur oben beschriebenen Isolierung im kleinen Maßstab. Das resultierende Zellpellet wurde am Ende jedoch in einem Volumen von insgesamt 200-400 µl TRIS-Puffer gelöst.

2.3.7 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA (Plasmid-DNA, Cosmid-DNA, Restriktions-Ansätze, PCR-Ansätze) wurde vorzugsweise das Aufreinigungs-Kit peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotechnologie) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte hier stets gemäß den Herstellerangaben. Bei DNA-

Fragmenten > 30 kb wurden mit diesem Aufreinigungs-Kit meist nur sehr geringe Ausbeuten erzielt. Daher wurden in diesen Fällen vorzugsweise zusätzliche Aufreinigungen mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol und einer anschließenden Alkoholpräzipitation durchgeführt.

2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA erfolgte mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) unter Messung der UV-Absorption bei 260 nm. Alternativ wurde die zu quantifizierende DNA via Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden mit dem Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verglichen.

2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Proben aufzutrennen und visuell zu analysieren, wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden Gele mit 0,8-2,0% (m/m) Agarose in TAE-Puffer 1x hergestellt. Auf die Verwendung des kanzerogenen Ethidiumbromids wurde in dieser Arbeit vollständig verzichtet. Stattdessen wurde die DNA mittels PeqGREEN (PEQLAB Biotechnologie) angefärbt. Dieses Färbereagenz wird in wässriger Lösung in einer Konzentration von 20.000x geliefert und kann vor dem Gießen direkt in das handwarme Gel zugegeben werden. Abweichend von den Herstellerangaben wurde mit einer Endkonzentration im Gel von 0,4x gearbeitet (und nicht mit einer Konzentration von 1x). Als Gelkammern wurde das PerfectBlue Gelsystem Mini L oder das PerfectBlue Gelsystem Midi ExW (beide: PEQLAB Biotechnologie) verwendet, die mit TAE-Puffer 1x bis zur Markierung befüllt wurden. Um die DNA-Banden in Hinblick auf Größe und Konzentration zu vergleichen, wurde stets der Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) mit aufgetragen. Die DNA-Proben wurden mit dem Ladepuffer Gel Loading Dye, Purple 6x (New England Biolabs) gemischt (Endkonzentration: 1x). Alternativ wurde ein eigens hergestellter Ladepuffer verwendet (siehe 2.1.5.2). Die Auftrennung erfolgte je nach Bandengröße mit einer Spannung von 80-120 V für 40-120 min. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht mithilfe des Geldokumentationssystems E-Box VX5 (Vilber Lourmat) unter Verwendung der Software VisionCapt. Für präparative Zwecke (mit dem Ziel, bestimmte DNA-Banden nach Auftrennung aus dem Gel auszuschneiden) wurde auf die direkte Zugabe von PeqGREEN zum Gel verzichtet. Stattdessen wurde ein größeres Volumen der betreffenden Probe in der Mitte des Gels aufgetragen (= Hauptstück) und zudem am Rand des Gels ein geringes Volumen derselben Probe direkt neben dem Marker aufgetragen (= Randstück). Nach der Elektrophorese wurde das Randstück mit einem Skalpell abgeschnitten und für 30 min in einem frisch hergestellten PeqGREEN Färbegrad angefärbt (PeqGREEN-Konzentration im Färbegrad: 3x). Anschließend wurde derselbe Streifen für weitere 30 min in einem Wasserbad entfärbt. Das so behandelte Randstück wurde nun unter dem UV-Licht

ausgewertet und die gewünschten Banden mit einem Zahnstocher markiert. Auf Höhe dieser Markierung wurde nun ein horizontaler Streifen aus dem nicht angefärbten Hauptstück des Gels ausgeschnitten. Die DNA aus diesem dünnen Gelstreifen wurde mithilfe des peqGold Gel Extraction Kit (PEQLAB Biotechnologie) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Auf diese Weise wurde die DNA zu keinem Zeitpunkt einem Interkalator und keinerlei UV-Licht ausgesetzt und somit vor möglichen Strangbrüchen und anderen DNA-Schäden bewahrt.

2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von Eurofins Genomics unter Verwendung der Cycle Sequencing Technologie auf ABI 3730XL-Sequenzern durchgeführt. Hierbei kam eine Abwandlung der klassischen Sanger Sequenzierung auf Basis von Didesoxyribonukleotid-Triphosphaten zum Einsatz. Die DNA-Proben wurden bereits im Voraus mit den gewünschten Primern für die Sequenzierung gemischt. Die Probenvolumina sowie die DNA- und Primerkonzentrationen wurden entsprechend den Empfehlungen von Eurofins Genomics gewählt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden anschließend in Form von Chromatogrammen übermittelt.

2.3.11 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden diese Reaktionen stets entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation und gegebenenfalls die Hitzeinaktivierung erfolgten hierbei am Thermo Thermo-Inkubationsmischer (PEQLAB Biotechnologie).

2.3.12 DNA-Ligation

Für alle Ligationen wurde die T4 DNA Ligase (New England Biolabs) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Verhältnis von linearisiertem Vektor zu Insert lag zwischen 1:3 und 1:5. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Inaktivierung erfolgte für 10 min bei 65°C. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20°C. Für nachfolgende Transformationen wurden je 1-3 µl des unverdünnten Ansatzes verwendet.

2.3.13 Isolierung von RNA aus *Bacillus subtilis*

Die RNA-Isolierung ist relativ aufwändig und erfordert ausreichend Zeit sowie eine gründliche Vorbereitung. Die Standardmaterialien (Pipettenspitzen, Wasser, Reaktionsgefäße, Spatel, etc.) wurden im Voraus doppelt autoklaviert (2x 20 min, 121°C, 2 bar). Für die Durchführung wurden die Kits RNAProtect Bacteria Reagent, RNase-Free DNase Set sowie RNeasy Mini Kit benötigt (alle: Qiagen). Die Puffer wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet

(siehe auch 2.1.5.5). Zur RNA-Isolierung aus *B. subtilis* wurden zunächst 6 ml frische Übernachtskultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß durch dreimaliges Abzentrifugieren (5 min, RT, 5000 rpm) geerntet und der Überstand jeweils abgegossen. Das resultierende Pellet wurde in 1,5 ml RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) durch kurzes Vortexen resuspendiert und im Anschluss für 5 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min, RT, 5000 rpm) wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das verbleibende Pellet in 200 µl eines frisch hergestellten Gemischs aus Lysozym + TE-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde für 10 min bei RT inkubiert und alle 2 min durch kurzes Vortexen gemischt. Anschließend wurde der Ansatz in ein 2 ml Lysing Matrix B Gefäß (MP Biomedicals) überführt und 700 µl eines gekühlten Gemischs aus β-Mercaptoethanol und RLT-Puffer zugegeben. Der Ansatz wurde nun im FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals) für 2x 40 s auf Programm 1 lysiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach kurzem Zentrifugieren (10 s, 4°C, 13600 rpm) wurde der klare Überstand in ein 2 ml MaXtract High Density Tube (Qiagen) überführt und ein dem Überstand entsprechendes Volumen an Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol zugegeben. Das Gemisch wurde für 30 s kräftig geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4°C, 13600 rpm). Die obere wässrige Phase wurde mit der Pipette vorsichtig abgenommen und in ein weiteres 2 ml MaXtract High Density Tube überführt, erneut mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol geschüttelt und abzentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wiederum in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Gemisch aus β-Mercaptoethanol und RLT-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 900 µl aufgefüllt. Nun wurden 500 µl Ethanol 100% zugegeben und nach kurzem Vermischen in 2 Schritten auf eine RNeasy Minisäule (Qiagen) aufgetragen und zentrifugiert (15 s, RT, 10000 rpm). Nun wurden 350 µl RW1-Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert (15 s, RT, 10000 rpm). Anschließend wurden 160 µl eines Gemischs aus DNase I und RDD-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 350 µl RW1-Puffer zugegeben, für weitere 5 min bei RT inkubiert und schließlich zentrifugiert (15 s, RT, 10000 rpm). Das Eluat wurde verworfen. Nun wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert (15 s, RT, 10000 rpm). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, nun aber für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30-50 µl RNase freiem Wasser eluiert (1 min, RT, 10000 rpm). Das Eluat wurde erneut auf die Säule pipettiert und abermals zentrifugiert (1 min, RT, 10000 rpm). Die RNA wurde nun zu 10 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde via NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) unter Messung der UV-Absorption bei 260 nm ermittelt. Der 260/280 nm Quotient sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.3.14 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Um RNA in DNA umzuschreiben, wurden zunächst ~1000 ng RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 15 µl verdünnt und für 5 min bei 65°C inkubiert, um etwaige Sekundärstrukturen zu zerstören. Anschließend wurde die RNA zur Kühlung sofort auf Eis gestellt. Nun wurden 1 µl iScript Reverse Transcriptase sowie 4 µl iScript Reaction Mix (beide: Bio-Rad) zugegeben und anschließend vorsichtig mit der Pipette gemischt. Der Ansatz wurde nun auf dem iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) folgendem Temperaturschema ausgesetzt:

- 25°C 5 min
- 46°C 20 min
- 95°C 1 min
- 4°C ∞

Die umgeschriebene cDNA wurde bei -80°C gelagert. Für die RT-PCR wurde als Template die cDNA verwendet. Um sicher zu stellen, dass etwaige PCR Banden in der RT-PCR nicht von verschleppter genomischer DNA kommen, wurde im Vergleich auch eine PCR mit der reinen RNA durchgeführt. Hier sollten keine bzw. allenfalls sehr schwache Amplifikate entstehen.

2.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurde entweder der iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) oder der peqSTAR 96x Universal Gradient (PEQLAB Biotechnologie) verwendet. PCR-Reaktionen zu analytischen Zwecken wurden mit einer im Arbeitskreis eigens hergestellten *Taq*-Polymerase durchgeführt. Sofern die resultierenden Amplifikate in weiteren Reaktionschritten weiterverwendet werden sollten (z.B. für ein anschließendes Gibson-Assembly bzw. eine anschließende Ligation), wurde in den meisten Fällen die Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) eingesetzt. Teilweise wurde hierfür auch ein im Arbeitskreis eigens hergestelltes Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase (Verhältnis 10:1) verwendet. Der Reaktionspuffer für Amplifikationen mit der *Taq*-Polymerase sowie für das Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase ist unter (2.1.5.4) beschrieben. Für sämtliche Amplifikationen mit der Q5-Polymerase wurde der im Lieferumfang enthaltene Reaktionspuffer verwendet. Da in den PCR-Reaktionen keine GC-reichen DNA-Sequenzen amplifiziert werden sollten, wurde auf den Zusatz des optionalen High GC Enhancers stets verzichtet. Um den Erfolg einer PCR-Reaktion zu überprüfen, wurden in der Regel 10 µl eines Reaktionsansatzes (unter Zusatz von 2 µl Ladebuffer 6x) mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Sofern die PCR-Amplifikate weiterverwendet oder sequenziert werden sollten, wurden diese zunächst via peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotechnologie) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Sofern nicht anders angegeben, waren die PCR-Ansätze folgendermaßen zusammengesetzt:

PCR: Zusammensetzung und Temperaturschema (<i>Taq</i> - bzw. <i>Taq/Pfu</i> -Polymerase)		
Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
DMSO	2,5	5% (v/v)
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	5	1x
Primer f (100 μ M)	0,5	1 μ M
Primer r (100 μ M)	0,5	1 μ M
dNTPs (je 2,5 mM)	4	je 200 μ M
Template DNA	0,5-2	50-100 ng
Polymerase	2	
H ₂ O	ad 50	
Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min:s]	Zyklen
94	05:00	1
94	00:45	25-30
50-60	00:45	
72	1 min/kb	
72	05:00	1
4	∞	1

Tabelle 15: PCR-Bedingungen (*Taq*- bzw. *Taq/Pfu*-Polymerase).

PCR: Zusammensetzung und Temperaturschema (Q5-Polymerase)		
Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Q5-Puffer (5x)	10	1x
Primer f (10 μ M)	2,5	0,5 μ M
Primer r (10 μ M)	2,5	0,5 μ M
dNTPs (je 2,5 mM)	4	je 200 μ M
Template DNA	0,5-2	50-100 ng
Polymerase (2000 U/ml)	0,5	0,02 U/ μ l
H ₂ O	ad 50	
Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer [min:s]	Zyklen
98	00:30	1
98	00:10	25-30
50-72	00:20	
72	20-30 s/kb	
72	02:00	1
4	∞	1

Tabelle 16: PCR-Bedingungen (Q5-Polymerase).

Colony-PCR (*E. coli*)

Um schnelle analytische PCR-Reaktionen mit einzelnen *E. coli* Kolonien durchzuführen, wurde die Methode der Colony-PCR verwendet, welche auf die Zugabe von isolierter DNA als Template komplett verzichtet. Stattdessen wurden hier dem Ansatz 0,5-2 µl Flüssigkultur zugegeben bzw. einzelne Bakterienkolonien von Festmedien mit dem Zahnstocher gepickt, in ca. 50 µl Wasser resuspendiert und davon 0,5-2 µl als Template eingesetzt. Die sonstige Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Temperaturschema blieben dabei unverändert.

Colony-PCR (*B. subtilis*)

Im Falle von *Bacillus subtilis* wurden für die Colony-PCR ausschließlich Klone von Festmedien verwendet. Diese wurden zunächst mit dem Zahnstocher gepickt und in 30-50 µl TRIS-Puffer (10 mM, pH 8) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min auf Eis gestellt und direkt danach für 1 min in der Mikrowelle erhitzt. Dies wurde je 3 Mal wiederholt. Von der so behandelten Suspension wurden schließlich 2 µl als Template verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes blieb auch hier gleich. Im Temperaturschema wurde allerdings die initiale Denaturierung von 5 auf 10 min erweitert. Direkt nach Beendigung der Temperaturzyklen wurde jedem Ansatz sofort der EDTA-haltige Gel Loading Dye, Purple 6x (New England Biolabs) zugegeben, um einer möglichen DNA-Degradation rasch entgegenzuwirken.

2.3.16 Gibson-Assembly

Ein beträchtlicher Teil dieser Arbeit basiert auf dem Zusammenbau von synthetischen DNA-Fragmenten durch die *in vitro* Methode des Gibson-Assembly. Hierfür wurden die Fragmente bereits bei der Synthese so angelegt, dass sie zu ihren jeweiligen Nachbarfragmenten eine Überlappung von ca. 30 bp aufweisen. Nun wurden stets 2-4 Fragmente sowie der entsprechend vorbereitete Vektor in einer Assembly-Reaktion unter Verwendung des Gibson-Assembly® Master Mix (New England Biolabs) zusammengefügt. Da die DNA-Konzentrationen der gelieferten gBlocks® teilweise sehr gering waren, wurden sämtliche Blöcke zunächst via Q5-Polymerase amplifiziert. Hierzu wurden pro gBlock® gleich mehrere Amplifikationen parallel durchgeführt und anschließend unter Verwendung von einer Säule des peqGOLD Cycle-Pure Kits (PEQLAB Biotechnologie) aufkonzentriert. Auf diese Weise konnten ausreichend hohe DNA-Konzentrationen erreicht werden. Im Laufe dieser Arbeit wurde die Erfahrung gemacht, dass der Erfolg des Gibson-Assembly mit zunehmender DNA-Konzentration sämtlicher eingesetzten DNA-Fragmente enorm zunimmt. Daher wurde – auch abweichend von den Herstellerangaben – stets versucht, eine möglichst hohe DNA Konzentration aller verwendeten DNA-Blöcke sowie des Vektors zu erreichen. Pro Ansatz wurde daher mit Vektorkonzentrationen von ~50-100 ng sowie mit gBlock®-Konzentrationen von jeweils ~100-300 ng gearbeitet:

Komponente	DNA-Menge [ng]	Volumina [μ l]
Linearisierter Vektor	50-100 ng	jeweils 1-5 μ l (je nach Konzentration)
gBlock [®] 1	je 100-300 ng	
gBlock [®] 2		
(gBlock [®] 3)		
(gBlock [®] 4)		
Gibson-Assembly [®] Master Mix 2x		Entsprechend der Summe aller anderen Volumina

Tabelle 17: Zusammensetzung der Gibson-Ansätze.

Direkt nach Zusammenfügen aller Komponenten wurde der Gibson-Ansatz für 60 min bei 50°C auf der Thermocycler inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert. Alternativ wurde eine Inkubation von 90 min bei 45°C verwendet. Für die anschließende Transformation wurde eine 1:3 Verdünnung des Ansatzes mit H₂O angefertigt und davon 1-3 μ l transformiert (siehe 2.3.2 bzw. 2.3.3). Sofern der Vektor pBluescript sk (-) zum Einsatz kam, wurde dabei stets eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt, um rekombinante Plasmide effizienter unterscheiden zu können.

2.3.17 Integration von gBlocks[®] via Red/ET-Rekombination

Für die aufeinanderfolgende Integration der beiden Promotoraustauschkassetten sowie für das Einbringen der beiden Gene *IKA_05328* und *IKA_05331* in das entsprechende pBS1C Derivat wurde eine etwas abgewandelte Technik der Red/ET-Rekombination verwendet. Hierbei wurden insgesamt 3 synthetische Integrationskassetten auf Basis der Resistenzgene *aac3(IV)* bzw. *aadA* entworfen. Nach erfolgreicher Integration wurden die Resistenzgene jeweils durch den Verdau mit Restriktionsenzymen und der anschließenden Religation des Vektors wieder entfernt. Die hierfür benötigten Schnittstellen wurden bereits beim Entwurf der synthetischen Kassetten an den entsprechenden Stellen platziert. Da für die homologe Rekombination auf Red/ET-Basis, seitlich der Integrationskassetten, dem Zielvektor homologe Sequenzen von mindestens 39 bp benötigt werden, wurden diese Sequenzen entweder bereits in die synthetische Kassette eingebaut oder sie wurden nachträglich mittels PCR-Elongation durch überhängende Primer angefügt. Der Zielvektor wurde für diese Technik zunächst in den Bakterienstamm *E. coli* BW25113 / pIJ790 transformiert. Das in diesem Stamm vorhandene Plasmid pIJ790 enthält die Arabinose induzierbaren λ -Red Gene *gam*, *bet* und *exo*. Für die Selektion wurde sowohl Carb für das entsprechende pBS1C Derivat als Zielvektor sowie Cml für den Erhalt des Plasmids pIJ790 eingesetzt. Die im pBS1C-Vektor ebenfalls vorhandene Cml Resistenz ist nur für die Selektion in *Bacillus subtilis* geeignet. Aus diesem Grund waren hier keine Interferenzen zu erwarten. Sämtliche Inkubationen von *E. coli* BW25113, die den Erhalt

des Plasmids pIJ790 zum Ziel hatten, wurden bei 30°C durchgeführt. Für die weiteren Schritte wurde eine Übernachtskultur eines Klons von *E. coli* BW25113 / pIJ790 / pBS1C Derivat angelegt (Carb, Cml, 30°C, 200 rpm). Am nächsten Tag wurden 50 ml SOB-Medium mit 5% dieser Übernachtskultur inokuliert. Zur Induktion der λ -Red Gene wurde L-Arabinose in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die Inkubation erfolgte bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 (Ara 10 mM, Carb, Cml, 30°C, 200 rpm). Die Zellen wurden im Anschluss durch Zentrifugation geerntet (5 min, 4°C, 4000 rpm), 2 Mal mit je 10 ml eiskaltem Glycerol 10% (v/v) gewaschen und schließlich im letzten Tropfen des Rücklaufs resuspendiert. Nun wurden ~100-300 ng der entsprechenden linearen Austausch-kassette mit den flankierenden homologen Regionen zugegeben und das Gemisch via MicroPulser Electroporator (Bio-Rad) elektroporiert (siehe 2.3.2). Ab diesem Schritt erfolgte die Inkubation jeweils wieder bei 37°C. Nach dem Ausplattieren wurde sowohl mit Carb (Resistenzgen des Vektors pBS1C) als auch mit dem Antibiotikum des entsprechenden Resistenzgens der Austausch-kassette (hier: entweder Apra oder Strep) selektiert. Die dabei erhaltenen Klone wurden via PCR bzw. Restriktionsverdau analysiert und positive Klone in *E. coli* XL1-Blue retransformiert. Die integrierten Resistenzgene wurden anschließend durch Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und der Vektor danach religiert. Zur finalen Bestätigung wurde jeweils der gesamte veränderte Bereich sequenziert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Probenvorbereitung

Vorbereitung der Kulturüberstände

Um eine Produktion von Sekundärmetaboliten nachzuweisen, wurden die zu untersuchenden Kulturen entsprechend den unter 2.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Je Hauptkultur wurde anschließend ein Volumen von 2 ml abzentrifugiert (5 min, 4°C, 13600 rpm) und der klare Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um alle Zellen möglichst vollständig aus dem Ansatz zu entfernen. Die resultierenden Kulturüberstände wurden anschließend bei -20 °C gelagert. Für die HPLC-Analytik wurden diese in unveränderter Form mit Injektionsvolumina von 5-50 µl direkt eingesetzt.

Vorbereitung der Extrakte

Bevor das oben beschriebene Verfahren Anwendung fand, wurden zunächst diverse Extraktionsversuche zur Substanzisolierung unternommen. Hierzu wurden je untersuchter Hauptkultur insgesamt 6 Proben verschiedener pH-Werte mit 1-Butanol bzw. mit Ethylacetat extrahiert.

Proben je Bakterienkultur		
Probe	Eingestellter pH-Wert	Extraktionsmittel
1	4	1-Butanol
2	7	1-Butanol
3	10	1-Butanol
4	4	Ethylacetat
5	7	Ethylacetat
6	10	Ethylacetat

Tabelle 18: Übersicht der verschiedenen Extraktionsbedingungen.

Für jede Probe wurde 1 ml Kultur mit HCl (1 M) bzw. mit NaOH (1 M) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und je 2 Mal mit 700 µl des jeweiligen organischen Lösungsmittels extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mittels der Vakuumentrifuge Concentrator Plus (Eppendorf AG) bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in je 50 µl Methanol 50% (v/v) gelöst. Hiervon wurden 5-20 µl für die HPLC-Analytik verwendet. Im Gegensatz zu den Kulturüberständen zeigten diese Extrakte keine neuen Peaks im HPLC-Chromatogramm beim Vergleich mit den Negativkontrollen. Die produzierten Sekundärmetabolite konnten mit dieser Methode somit nicht extrahiert werden. Daher wurden bei sämtlicher weiterführender Analytik ausschließlich die abzentrifugierten Kulturüberstände (s.o.) betrachtet.

2.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Analytik erfolgte an den Geräten HPLC 1100 Series und HPLC 1200 Series (beide: Agilent Technologies). Die beiden eingesetzten Fließmittel für sämtliche HPLC-Läufe waren:

- FM A = H₂O + 0,1% (v/v) HCOOH
- FM B = ACN + 0,06% (v/v) HCOOH

Da sämtliche Substanzen mit ADR-GlyU Grundgerüst UV-Absorptionsmaxima bei 262 nm aufweisen, wurde primär diese Wellenlänge mit dem UV-Detektor aufgezeichnet. Da für die Detektion hierbei ein Diodenarray-Detektor vorlag, konnten zur weiteren Analyse zusätzlich die gesamten UV-Spektren der einzelnen Peaks betrachtet und miteinander verglichen werden.

Methode 1

Für erste Versuche wurde die Säule Reprosil Pur Basic-C18 (250 mm x 2 mm, 5 µm, Dr. Maisch) eingesetzt. Bei einer Flussrate von 0,2 ml/min wurde ein linearer Gradient des FM B von 5-100% in 30 min gefahren. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 262 nm. Mit dieser Methode konnte hier jedoch keine zufriedenstellende Peakauftrennung erzielt werden.

Methode 2

In einem zweiten Schritt wurde die Säule Nucleodur PolarTec (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) verwendet. Bei einer Flussrate von 1,0 ml/min wurde ein linearer Gradient des FM B von 5-100% in 30 min gefahren. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei 262 nm. Dieselbe Säule lag auch mit größerem Durchmesser in semipräparativer Ausführung vor: Nucleodur PolarTec (250 mm x 10 mm, 5 µm, Macherey-Nagel). Im Gegensatz zur analytischen Ausführung wurde hier bei sonst gleichen Bedingungen mit einer höheren Flussrate von 3 ml/min gearbeitet. Mit Methode 2 war jedoch nur eine teilweise Peakauftrennung möglich.

Methode 3

Eine gute Peakauftrennung wurde mit der Säule Luna® Omega Polar C18 (250 mm x 4,6 mm, 3 µm, Phenomenex) erreicht. Bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min wurde mit einem Isokraten aus 100% FM A eluiert. Nach Auftrennung der gewünschten Peaks wurde zur Reinigung der Säule jeweils für 5 min mit 100% FM B gespült und anschließend wieder für 15 min mit 100% FM A äquilibriert. Die Detektion erfolgte auch hier mittels UV-Detektor bei 262 nm.

2.4.3 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der LB- und P-Peaks

Um die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Peaks näher zu untersuchen, mussten diese für weitere Messungen aufkonzentriert und gereinigt werden (siehe 3.5.3). Hierzu wurden die Überstände aus LB- und P-Hauptkultur in mehreren HPLC-Läufen aufgetrennt und die entsprechenden Peaks mittels automatischem Fraktionssammler aufgefangen. Für die LB-Peaks erfolgte zunächst eine grobe Auftrennung unter Verwendung von Methode 2 (siehe 2.4.2). Hierzu wurden insgesamt 2200 µl Kultur in 44 Schritten von je 50 µl auf die Säule aufgetragen und in 2 Fraktionen aufgesammelt (Fraktion 1: 2,37-2,68 min, Fraktion 2: 4,07-4,89 min). Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und in 200 µl H₂O gelöst. Anschließend erfolgte die vollständige Auftrennung unter Verwendung von Methode 3 (siehe 2.4.2), in welcher die einzelnen Peaks aufgefangen wurden. Aus der ersten Vorfraktion wurde Peak LB1 aufgesammelt, aus der zweiten Vorfraktion die Peaks LB2 bis LB5. Anschließend wurden diese erneut am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt und bei -20°C gelagert. Für die P-Peaks wurde keine Vorfraktionierung nach Methode 2 vorgenommen, sondern stattdessen zwei aufeinanderfolgende Auftrennungen nach Methode 3 durchgeführt. Hierbei wurden jeweils die Peaks P1 bis P6 aufgesammelt. Bei der ersten Auftrennung waren es insgesamt 4800 µl Kultur in 96 Läufen von je 50 µl. Bei der zweiten waren es 25 Läufe von je 10 µl. Danach wurden die Peaks am Rotationsverdampfer eingeeengt und bei -20°C gelagert.

2.4.4 HPLC-MS und HPLC-MS²

Zur Strukturaufklärung wurden zusätzlich HPLC-MS sowie HPLC-MS² Messungen durchgeführt. Hierfür kam ein LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330 (Agilent Technologies) zum Einsatz. Zur Auftrennung wurde Methode 3 verwendet (siehe 2.4.2). Die MS-Analyse erfolgte unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation (ESI) bei einer Spannung von 3,5 kV und einer N₂-Temperatur von 350°C. Die MS²-Messungen wurden im positiven Modus durchgeführt.

2.4.5 Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Die mittels automatischem Fraktionssammler aufgesammelten Peaks wurden zur genauen Strukturaufklärung zusätzlich via HR-MS vermessen. Hierbei kam ein UltiMate 3000 HPLC System (Thermo Fisher Scientific) in Verbindung mit einem MaXis 4G (Bruker Daltronics) zum Einsatz. Zur Auftrennung wurde Methode 3 verwendet (siehe 2.4.2). Die MS-Analyse erfolgte unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation (ESI) bei einer Spannung von 4,5 kV und einem End Plate Offset von -500 V. Das Trockengas hatte eine Temperatur von 200°C und zeigte einen Strom von 12,0 l/min. Sämtliche Messungen erfolgten im positiven Modus.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung eines Genclusters in *Bacillus cereus* VD169

3.1.1 Hintergrund: FR-900493 – ein Antibiotikum aus *Bacillus cereus* No. 2045

Bereits im Jahre 1989 wurde in Japan durch die Firma Fujisawa Pharmaceutical Co. eine antibiotisch aktive Substanz aus Bakterienkulturen des Stammes *Bacillus cereus* No. 2045 isoliert und auf den Namen FR-900493 patentiert (Ochi et al. 1989). Neben einer umfassenden chemischen Charakterisierung wurden in diesem Patent auch Daten zur antibakteriellen Aktivität gezeigt. FR-900493 wies hemmende Eigenschaften gegen die beiden Gram-positiven Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* 209P JC-1 (MIC = 3.13 µg/ml) sowie *Bacillus subtilis* ATCC-6633 (MIC = 3.13 µg/ml) auf. Der Produktionsstamm *Bacillus cereus* No. 2045 stammte aus Bodenproben der japanischen Pazifikinsel Amami-Oshima und wurde vor Eintragung des Patents gesammelt und registriert (Ochi et al. 1989). Dieser Stamm wurde jedoch bis heute nicht sequenziert bzw. ist die Veröffentlichung der Genomsequenz bisher nicht erfolgt, sodass nach unserem Wissen der genetische Hintergrund dieser Substanz noch immer ungeklärt ist.

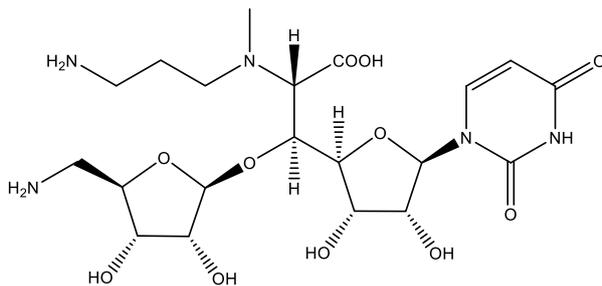


Abbildung 11: Struktur von FR-900493.

Einige Jahre nach der Erstbeschreibung wurde ein Verfahren zur chemischen Synthese von FR-900493 in 17 Reaktionsschritten entwickelt sowie die absolute Konfiguration stereochemisch aufgeklärt (Hirano et al. 2007). Zudem wurden auf chemischem Wege modifizierte FR-900493 Derivate entwickelt, die stärkere inhibitorische Aktivität gegen die Enzyme *MraY* und *WecA* aufweisen und darüber hinaus noch hemmende Eigenschaften gegen das Gram-positive Bakterium *Clostridium difficile* zeigen (Mitachi et al. 2018). Neben FR-900493 wurden in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten noch einige weitere antibakterielle Naturstoffe identifiziert und charakterisiert, die strukturelle Ähnlichkeiten in der Kernstruktur aufweisen (siehe 1.3). Hierbei sind insbesondere die Nukleosid-Antibiotika der Caprazamycine, der Vertreter von A-90289, der Liposidomycine, der Muraminomicine, der Muraymycine sowie der Sphaerimycine zu erwähnen. Strukturell zwar ähnlich, aber doch etwas weiter entfernt, sind die Nukleosid-Antibiotika der Tunicamycine, der Capuramycine sowie die Uridyl-Peptid-Antibiotika.

Substanz	Herkunft	Quelle
FR-900493	<i>Bacillus cereus</i> No. 2045	(Ochi et al. 1989)
Caprazamycin	<i>Streptomyces</i> sp. MK730-62F2	(Igarashi et al. 2003)
A-90289	<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60405	(Funabashi et al. 2010)
Liposidomycin	<i>Streptomyces griseosporus</i>	(Isono et al. 1985)
Muraminomicin	<i>Streptosporangium amethystogenes</i> SANK 60709	(Chi et al. 2013)
Muraymycin	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30471	(McDonald et al. 2002)
Sphaerimicin	<i>Sphaerisporangium</i> sp. SANK 60911	(Funabashi et al. 2013)

Tabelle 19: Übersicht der verschiedenen Antibiotika mit ADR-GlyU Grundstruktur.

Es ist auffällig, dass all diese weiteren Strukturvertreter aus Aktinomyceten isoliert wurden. Interessanterweise wurden aus Stämmen der Gattung *Bacillus* bisher keine weiteren Stoffe dieser Art entdeckt. Vergleicht man die verschiedenen Substanzen strukturell, kann als gemeinsame Grundstruktur ein Element aus einem 5'-C-Glycyluridin (GlyU) verbunden mit einer 5''-Amino-5''-desoxyribose (ADR) abgeleitet werden (= ADR-GlyU). Diese Grundstruktur wird auch als Disaccharid-Kern bezeichnet (Cui et al. 2018a). Da es sich bei der Substanz FR-900493 um den kleinsten Vertreter dieser Strukturklasse handelt, liegen die Unterschiede zur Kernstruktur lediglich in der 6'-N-Methyl- sowie der 6'-N-Aminopropyl-Substitution.

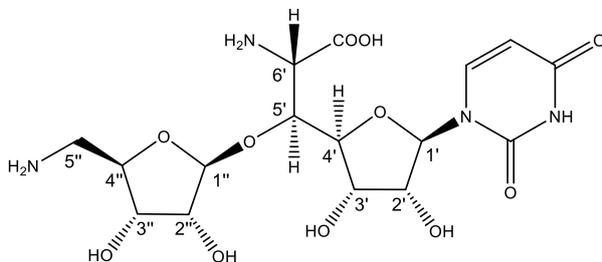


Abbildung 12: ADR-GlyU Grundstruktur.

Die Biosynthese der Kernstruktur und der nachgelagerten Reaktionsschritte wurde auf Basis von Gen-Knockout-Experimenten, *in silico* Analysen sowie biochemischer Nachweise bereits ausgiebig untersucht – zusammengefasst in (Gust et al. 2013). Hierzu trugen in den vergangenen Jahren insbesondere die umfassenden Untersuchungen der Van Lanen Gruppe am Beispiel des A-90289 Genclusters bei, in welchen gerade die frühen Biosyntheseschritte betrachtet wurden (Chi et al. 2011, Yang et al. 2011, Barnard-Britson et al. 2012). Die auffallenden Ähnlichkeiten in den Genclustern der Caprazamycine, der Liposidomycine und von A-90289 legen nahe, dass für diese Substanzen auch die einzelnen Biosyntheseschritte in Hinblick auf ihre gemeinsamen Strukturelemente analog ablaufen (Gust et al. 2013). Im Jahr 2018

wurden auch am Beispiel des Muraymycins die frühen Biosyntheseschritte bis zur ADR-GlyU Kernstruktur auf Basis biochemischer Untersuchungen umfassend aufgeklärt und die hierfür benötigten sechs Enzyme funktionell charakterisiert (Cui et al. 2018a). Das Ergebnis dieser Untersuchungen deckt sich mit den früheren postulierten und charakterisierten Abläufen am Beispiel von A-90289. Wie bereits erwähnt, teilt sich auch das aus *Bacillus cereus* No. 2045 stammende Antibiotikum FR-900493 die gemeinsame ADR-GlyU Grundstruktur. Allerdings konnten hierfür wegen der fehlenden Genomsequenz bisher keine Aussagen zum genetischen Hintergrund getroffen werden. Umfassende Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese wurden hier ebenfalls nicht durchgeführt bzw. nicht veröffentlicht.

3.1.2 Entdeckung eines potenziellen Genclusters durch Genome Mining

Vor Beginn dieser Arbeit fiel während bioinformatischer Arbeiten zum Caprazamycin Gencluster mittels BLAST-Analyse = „Basic Local Alignment Search Tool“ (Altschul et al. 1990) zum wiederholten Male ein Stamm namens *Bacillus cereus* VD169 auf. Der Algorithmus erkannte Homologien zwischen mehreren Genen der frühen Caprazamycin-Biosynthese und Genen des besagten *Bacillus cereus* Stammes. Erstmalig fiel dieser Umstand bei Homologie-Suchen zu *cpz15* auf, welches für eine α -Ketoglutarat abhängige Dioxygenase codiert - ein Enzym, das den ersten Schritt in der Biosynthese der ADR-GlyU Grundstruktur durch die Umwandlung von Uridinmonophosphat (UMP) zum Uridin-5'-aldehyd katalysiert (Yang et al. 2011). Aufgrund dieses Umstandes wurde die Sequenz des Stammes *Bacillus cereus* VD169 mit Beginn dieser Arbeit näher untersucht. Das bereits identifizierte homologe Gen zu *cpz15* befindet sich in der Genomsequenz des erwähnten *Bacillus cereus* Stammes. Diese ist in der öffentlich zugänglichen Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Zugangsnummer „JH791834 AHFJ01000000“ hinterlegt. Von den dort hinterlegten Sequenzabschnitten befindet sich das erwähnte Gen auf Supercontig 1.2 und trägt die Bezeichnung *IKA_05317*.

Der Stamm *Bacillus cereus* VD169 wurde im Rahmen eines Sequenzierungsprojekts des Broad Instituts veröffentlicht, bei welchem 94 verschiedene *Bacillus cereus* Isolate mittels der Illumina-Methode sequenziert wurden (Van der Auwera et al. 2013). Stamm VD169 wurde aus Erdproben-Sammlungen isoliert, die in Dubai (Vereinigte Arabische Emirate) durchgeführt wurden. Er trägt zudem das Virulenzplasmid pXO1, das auch im Stamm *Bacillus anthracis* vorkommt (Van der Auwera et al. 2013). Zur genaueren Analyse wurde die Genomsequenz von Supercontig 1.2 im Genebank-Format heruntergeladen und mit dem Programm „Artemis“ weiter bearbeitet (Carver et al. 2012). Der benachbarte DNA-Bereich zu Gen *IKA_05317* wurde sowohl mit der Methode des Nucleotide BLAST als auch mittels Protein BLAST umfassend untersucht. Die möglichen Funktionen der hierbei gefundenen homologen Gene wurden mit den bereits bekannten Genen aus dem Caprazamycin bzw. dem Muraymycin Gencluster

verglichen. Darüber hinaus wurden die identifizierten Gene auch unter Verwendung des kostenlosen Analyse-Tools „Phyre2“ auf ihre möglichen Funktionen hin untersucht (Kelley et al. 2015). Hierbei konnten oft noch genauere Ergebnisse als mit der reinen BLAST-Analyse erhalten werden. Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse wurden verwendet, um folgende Übersicht des Sequenzbereichs mit möglichen Funktionsbeschreibungen zu erstellen:

Name	AmS	Mögliche Funktion	Homologes Gen
<i>IKA_05297</i>	403	S-layer-Protein	
<i>IKA_05298</i>	133	Transkriptionsregulator / Penicillinase Repressor	
<i>IKA_05299</i>	636	Beta-Lactamase Regulationsprotein	
<i>IKA_05300</i>	358	Tyrosin Rekombinase XerS	
<i>IKA_05301</i>	195	GTP Cyclohydrolase I FolE (Queuosin Biosynthese)	
<i>IKA_05302</i>	238	7-Carboxy-7-deazaguanin Synthase QueE (Queuosin Biosynthese)	
<i>IKA_05303</i>	163	6-Carboxytetrahydropterin Synthase QueD (Queuosin Biosynthese)	
<i>IKA_05304</i>	221	7-Cyano-7-deazaguanin Synthase QueC (Queuosin Biosynthese)	
<i>IKA_05305</i>	262	ABC-Transporter	
<i>IKA_05306</i>	263	ABC-Transporter	
<i>IKA_05307</i>	332	ABC-Transporter	
<i>IKA_05308</i>	218	GlcNAc-PI de-N-Acetylase	
<i>IKA_05309</i>	266	SAM-Methyltransferase	
<i>IKA_05310</i>	244	Glycosyltransferase	
<i>IKA_05311</i>	252	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05312</i>	555	Carbamoyltransferase	
<i>IKA_05313</i>	344	SAM Methyltransferase / Spermidin Synthase	
<i>IKA_05314</i>	32	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05315</i>	269	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05316</i>	106	Hypothetisches Protein (Lysin-2,3-Aminomutase)	
<i>IKA_05317</i>	296	Taurin Dioxygenase	<i>cpz15</i>
<i>IKA_05318</i>	431	Diaminopimelat Decarboxylase (PLP-abhängig)	<i>mur23</i>
<i>IKA_05319</i>	360	Malat / L-Laktat Dehydrogenase	
<i>IKA_05320</i>	506	Acyl-CoA-Synthetase	
<i>IKA_05321</i>	82	Acyl-Carrier-Protein	
<i>IKA_05322</i>	444	Pyrimidin-Nukleosid Phosphorylase	<i>cpz19</i>
<i>IKA_05323</i>	418	Phenylacetat-CoA Ligase	
<i>IKA_05324</i>	438	Serin-Glycin Hydroxymethyltransferase	<i>cpz14</i>
<i>IKA_05325</i>	440	Aminotransferase	<i>cpz18</i>
<i>„Assembly-Gap“ (695 bp)</i>			
<i>IKA_05326</i>	49	Transposase	
<i>IKA_05327</i>	116	Hypothetisches Protein (Lysin-2,3-Aminomutase)	

<i>IKA_05328</i>	169	Nukleosid- bzw. Nukleotid-Kinase	<i>cpz12, cpz27</i>
<i>IKA_05329</i>	62	Transposase	
<i>IKA_05330</i>	385	Transposase	
<i>IKA_05331</i>	409	Oxidoreduktase / Hydroxylase	
<i>IKA_05332</i>	151	Transposase	
<i>IKA_05333</i>	101	Transposase	
<i>IKA_05334</i>	150	Hypothetisches Protein (SMI1 / KNR4 Protein)	
<i>IKA_05335</i>	517	PLP-abhängige Transferase (Cystathionin Synthase ähnlich)	<i>cpz13</i>
<i>IKA_05336</i>	268	HAD-Phosphatase	
<i>IKA_05337</i>	414	Glucosyltransferase	<i>cpz17</i>
<i>IKA_05338</i>	247	Nukleotidyltransferase	<i>cpz16</i>
<i>IKA_05339</i>	351	Aminoglykosid-Phosphotransferase	<i>cpz12, cpz27</i>
<i>IKA_05340</i>	566	ABC-Transporter	
<i>IKA_05341</i>	546	ABC-Transporter	
<i>IKA_05342</i>	566	SAM (Glycin)- <i>N</i> -Methyltransferase	<i>cpz26</i>
<i>IKA_05343</i>	331	Cystein Proteinase / Hydrolase	
<i>IKA_05344</i>	187	Hypothetisches Protein	
„ <i>Assembly-Gap</i> “ (316 bp)			
<i>IKA_05345</i>	100	Hypothetisches Protein (DUF 4306)	
<i>IKA_05346</i>	176	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05347</i>	64	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05348</i>	63	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05349</i>	158	Hypothetisches Protein / Zellwand Protein	

Tabelle 20: Funktionsübersicht des möglichen Genclusters aus *Bacillus cereus* VD169.

Nach gründlicher Analyse der Ergebnisse konnten folgende Aussagen getroffen werden:

- Neben *IKA_05317* wurden in direkter Umgebung noch weitere homologe Gene zu den Biosynthese-Genen aus dem Caprazamycin bzw. dem Muraymycin Gencluster gefunden: *mur23, cpz19, cpz14, cpz18, cpz12, cpz27, cpz13, cpz17, cpz16, cpz26*. Zur besseren Übersicht werden hier die Gene aus dem Muraymycin Gencluster nur dann erwähnt, sofern kein entsprechendes Gen im Caprazamycin Gencluster existiert.
- Auffällig ist hierbei, dass es sich bei diesen Genen fast ausschließlich um die frühen Biosynthese-Gene handelt. Sämtliche homologen Gene, die für die Bildung der zentralen ADR-GlyU Grundstruktur benötigt werden, sind in diesem Cluster enthalten.
- Zwischen den homologen Genen liegt ein Bereich mit einer Größe von ungefähr 10 kb, der mehrere Transposasen enthält. Zudem finden sich in diesem Bereich bei genauer Betrachtung mittels Nucleotide BLAST-Analyse zahlreiche kleine Genfragmente.

- Stromaufwärts von *IKA_05317* finden sich keine Gene mehr, die funktionell klar mit der Biosynthese der Caprazamycine bzw. der Muraymycine in Verbindung gebracht werden können. Vielmehr scheint in diesem Bereich ein größeres Operon zu liegen, das mehrere Biosynthese-Gene des speziellen t-RNA Nukleosids Queuosin enthält.
- Stromabwärts finden sich jenseits von *IKA_05344* ebenfalls keine entsprechenden Gene mehr. Die hier liegenden Gene konnten mit den eingesetzten Analysetools keiner Funktion zugeordnet werden. Zwar konnte auch für *IKA_05344* keine Funktion zugeordnet werden – dieses befindet sich jedoch in einer Anordnungslinie von 10 gleich orientierten Genen und scheint daher zu einem gemeinsamen Operon zu gehören.
- Die beiden Gene *IKA_05317* und *IKA_05344* definieren möglicherweise die Grenzen. Das Cluster hätte damit 28 Gene bei einer Größe von 34 kb (siehe Abbildung 13).
- Hiervon können 11 Gene mit der Biosynthese eines Nukleosid-Antibiotikums in Verbindung gebracht werden, 2 Gene sind ABC-Transporter, 5 Gene sind Transposasen aus dem mittleren Sequenzbereich und von 10 Genen werden Funktionen prognostiziert, die nicht klar zugeordnet werden können bzw. kann keine Funktion zugeordnet werden.
- Außerdem werden in der DNA-Sequenz zwei Bereiche als „Assembly-Gap“ dargestellt. Die prognostizierten Größen dieser Bereiche werden mit 695 bzw. 316 bp angegeben.
- Der GC-Gehalt von Supercontig 1.2 beträgt 30,35% – der des möglichen Genclusters liegt bei 30,82%. Zwischen Cluster und restlicher genomischer DNA sind hier also keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Betrachtet man hingegen die Gencluster des Caprazamycins und des Muraymycins, liegen die Werte hier bei 70,2% bzw. 67,9%. Solch hohe GC-Werte sind typisch für Gencluster aus Streptomycceten.

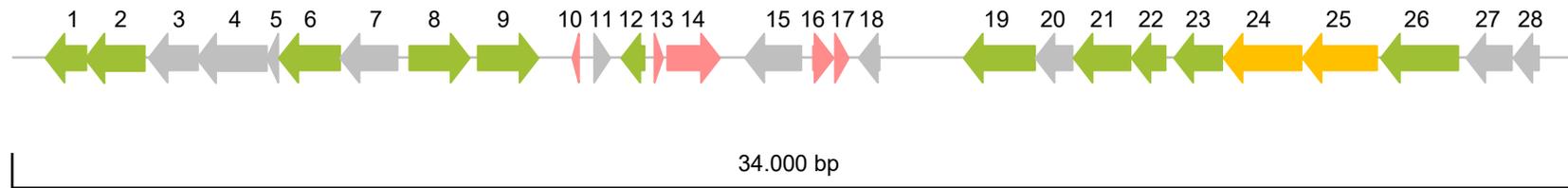


Abbildung 13: Übersicht des Genclusters aus *Bacillus cereus* VD169.

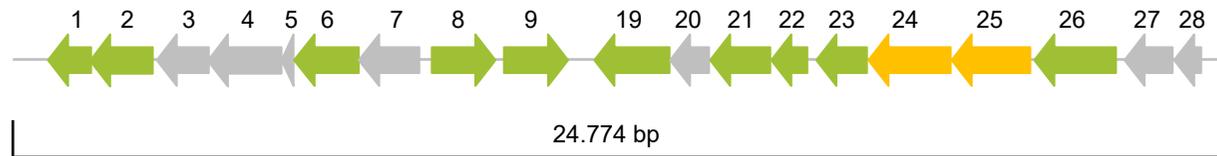


Abbildung 14: Übersicht des Genclusters nach vorgenommener Verkürzung.

Grün: Homologe zu ADR-GlyU Biosynthesegenen

Gelb: Mögliche ABC-Transporter

Rot: Transposasen

Grau: Funktion unbekannt

In diesem Abschnitt wurde ausführlich auf die Analyse des Genclusters aus *Bacillus cereus* VD169 eingegangen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier ein hoch interessantes Gencluster entdeckt wurde, welches beträchtliche Gemeinsamkeiten zu frühen Biosynthesegenen der bekannten Antibiotika mit ADR-GlyU Grundstruktur aufweist. Daneben bestehen allerdings mit den zehn nicht genau definierbaren Genen auch durchaus Unterschiede.

Die These war folglich, dass hier ein Gencluster entdeckt wurde, das möglicherweise für ein Nukleosid-Antibiotikum kodiert.

Die Plausibilität dieser Annahme wurde durch die Tatsache unterstützt, dass mit FR-900493 bereits ein Antibiotikum dieser Strukturklasse aus einem *Bacillus cereus* Stamm isoliert wurde.

3.2 Vollsynthetische Rekonstruktion des Genclusters

3.2.1 Vollsynthetische Herangehensweise: Die Entscheidung

Normalerweise hätte nun der Wildtypstamm *Bacillus cereus* VD169 kultiviert und auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hin untersucht werden müssen. Um das Gencluster final zu identifizieren, ginge der übliche Weg über das Anlegen einer Genbank, das Screenen mittels PCR und der anschließenden heterologen Produktion in einem geeigneten Wirtstamm. Ein Weg, der beispielsweise bei der Identifizierung des Caprazamycin Genclusters gegangen wurde (Kaysser et al. 2009). Im Falle von *Bacillus cereus* VD169 war beides auf diese Weise nicht möglich. Grund hierfür war die Tatsache, dass der Stamm nicht beschafft werden konnte. Allerdings war und ist die DNA-Sequenz des Stammes vorhanden (Van der Auwera et al. 2013). Da bereits zu Beginn dieser Arbeit die Möglichkeit zur DNA-Synthese zu erschwinglichen Preisen bestand, wurde daher die Entscheidung getroffen, das gesamte Gencluster künstlich nachzubilden. Die synthetische Nachbildung und Manipulation von Genclustern wurde in den vergangenen Jahren bereits mehrfach erfolgreich angewandt, beispielsweise zur Produktion von 6-Desoxyerythronolid B (Kodumal et al. 2004, Menzella et al. 2006) oder zur heterologen Produktion von Epothilonen (Mutka et al. 2006, Osswald et al. 2014). Leider wurden insbesondere bei Herangehensweisen, welche die Architektur von Genclustern in größerem Ausmaß veränderten (wie beispielsweise bei verschiedenen Plug-and-Play Systemen), oft weit geringere Produktionsraten als im ursprünglichen Produzentenstamm erreicht (Shao et al. 2013, Basitta et al. 2017). Aufgrund dieser Erfahrungen wurde daher beschlossen, dass das Gencluster aus *Bacillus cereus* VD169 möglichst wenig verändert werden sollte. Die größte Veränderung betraf den mittleren Teil des Genclusters. Wie bereits beschrieben, enthält der Bereich zwischen den möglichen Biosynthesegenen *IKA_05325* (Aminotransferase) sowie *IKA_05335* (PLP-abhängige Transferase) insgesamt fünf Transposasen. Daneben sind hier mit den Genen *IKA_05328* (eine prognostizierte Nukleosid-Kinase) und *IKA_05331* (eine

prognostizierte Oxidoreduktase / Hydroxylase) zwei Gene lokalisiert, die möglicherweise eine Rolle im Resistenzmechanismus oder der Biosynthese spielen könnten. Insbesondere die Nukleosid-Kinase schien interessant zu sein, da phosphorylierte Derivate bereits vom Caprazamycin und Muraymycin bekannt waren (Shiraishi et al. 2016, Cui et al. 2018b). Die Homologien zu den entsprechenden Genen der beiden Cluster waren hier aber schwach ausgeprägt. Darüber hinaus sind im Bereich der Transposasen noch zwei weitere Gene vorhanden, über die mittels BLAST-Analyse bzw. Phyre2 kaum Informationen gefunden wurden. Daher wurde beschlossen, diesen gesamten Bereich aus allen 9 Genen – zumindest vorerst – komplett von der Synthese auszuschließen. Außer dem Effekt, dass ungewollte Rekombinationen durch Ausschluss der fünf Transposasen vermieden wurden, konnte dadurch auch das Gencluster wesentlich verkürzt und somit der Syntheseaufwand erheblich reduziert werden.

Name	AmS	Mögliche Funktion	Abschnitt
<i>IKA_05317</i>	296	Taurin Dioxygenase (<i>cpz15</i>)	Teil 1: 11.714 bp (9 Gene)
...			
<i>IKA_05325</i>	440	Aminotransferase (<i>cpz18</i>)	Dieser Bereich aus 9 Genen wurde von der Synthese ausge- schlossen
<i>IKA_05326</i>	49	Transposase	
<i>IKA_05327</i>	116	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05328</i>	169	Nukleosid- bzw. Nukleotid-Kinase	
<i>IKA_05329</i>	62	Transposase	
<i>IKA_05330</i>	385	Transposase	
<i>IKA_05331</i>	409	Oxidoreduktase / Hydroxylase	
<i>IKA_05332</i>	151	Transposase	
<i>IKA_05333</i>	101	Transposase	
<i>IKA_05334</i>	150	Hypothetisches Protein	
<i>IKA_05335</i>	517	PLP-abhängige Transferase (<i>cpz13</i>)	Teil 2: 13.060 bp (10 Gene)
...			
<i>IKA_05344</i>	187	Hypothetisches Protein	

Tabelle 21: Übersicht der ausgewählten Bereiche für die synthetische Rekonstruktion.

Die finale Entscheidung stand nun fest: Der gesamte Bereich zwischen *IKA_05317* und *IKA_05325* (9 Gene) sowie zwischen *IKA_05335* und *IKA_05344* (10 Gene) sollte mit möglichst wenig Veränderungen synthetisch nachgebildet werden. Die Grenzen der beiden Teilstücke wurden so gewählt, dass angrenzende intergenische Bereiche mit in das zu synthetisierende Stück aufgenommen wurden. Die beiden Teilstücke mit den Größen 11.714 bp bzw. 13.060 bp sollten im letzten Aufbauschnitt direkt verbunden werden, sodass ein durchgehendes Gencluster von 24.774 bp entsteht (siehe Abbildung 14). Außer der Verkürzung musste zusätzlich an Position 6.172 die Base Thymin durch Cytosin ersetzt werden. Dadurch wurde innerhalb des Gens *IKA_05322* ein neutraler Codon-Tausch von GCA zu GCG (beide Alanin) erzeugt. Der Austausch war nötig, um eine Bts⁹¹ Schnittstelle zu eliminieren, welche andernfalls mit dem intakten Ausschneiden der entsprechenden Zwischenstufe interferieren würde.

3.2.2 Vollsynthetische Herangehensweise: Der Entwurf

3.2.2.1 Methodenübersicht zum synthetischen Aufbau größerer DNA-Abschnitte

Für die Synthese des 24.774 bp großen Genclusters wurde nun ein theoretischer Entwurf erarbeitet, mit welchem das Cluster sukzessiv aufgebaut werden sollte. Für den Syntheseauftrag wurde die Firma Integrated DNA Technologies (= IDT) aus Coralville, USA ausgewählt. Die Möglichkeiten der DNA- bzw. Gensynthese waren zu Beginn dieser Arbeit noch eingeschränkter, als sie es zum heutigen Zeitpunkt sind. Die maximale Größe betrug hierfür 2.000 bp pro DNA-Fragment. Allerdings waren und sind diese Größen meist nur unter Idealbedingungen erreichbar. Sehr hohe bzw. sehr niedrige GC-Gehalte, Sekundärstrukturen sowie Wiederholungen stellten zu diesem Zeitpunkt die DNA-Synthese vor große Herausforderungen und tun dies meist auch heute noch. Da die gewünschte DNA-Sequenz jedoch nicht verändert werden sollte, mussten bei den Größen der zu synthetisierenden DNA-Fragmente teils erhebliche Einschnitte hingenommen werden. Die erste große Herausforderung bestand somit im Aufbau eines ~25 kb großen DNA Stücks aus vielen kleinen DNA-Fragmenten. Um größere DNA-Bereiche aus kleineren Vorstufen aufzubauen, wurden in den letzten Jahren bereits viele verschiedene Methoden entwickelt – zusammengefasst in (Chao et al. 2015). Hierbei können die einzelnen Methoden in mehrere Gruppen untergliedert werden: Die erste Gruppe beruht auf dem Verfahren der Restriktion und Ligation, wie beispielsweise die BioBrick Methode (Shetty et al. 2008), BglBrick (Anderson et al. 2010), ePathBrick (Xu et al. 2012), Golden Gate (Engler et al. 2008) und die MASTER Ligation (Chen et al. 2013). Die zweite Gruppe beruht auf Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Fragmenten. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man Methoden, die *in vivo* durchgeführt werden, wie die RecET basierte homologe Rekombination in *E. coli* (Zhang et al. 2000), die DNA Assembler Methode in *Saccharomyces cerevisiae* (Shao et al. 2009) sowie die Domino Methode in *Bacillus subtilis* (Itaya et al. 2008). Daneben basieren aber auch zahlreiche *in vitro* Methoden auf Sequenzhomologien. Bei diesen spielt vor allem die Technik der Polymerase-Kettenreaktion eine wesentliche Rolle. Zu nennen wären hier die Overlap extension PCR (OE-PCR) (Horton et al. 1989), das Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) (Quan et al. 2009), die SLIC Methode (Li et al. 2007), SLiCE (Zhang et al. 2012), USER (Nour-Eldin et al. 2010) sowie NE-LIC (Wang et al. 2013).

3.2.2.2 Gibson-Assembly als Methode der Wahl

Zur den *in vitro* Methoden auf Basis von Sequenzhomologien gehört auch das sogenannte Gibson-Assembly – die Methode, welche für wesentliche Teile dieser Arbeit ausgewählt wurde. Beim Gibson-Assembly werden lineare DNA Fragmente mit homologen Enden zueinander in einer isothermen Ein-Schritt-Reaktion *in vitro* zusammengefügt (Gibson et al. 2009). Während dieser Reaktion sind insgesamt drei Enzyme beteiligt, welche gemeinsam den Gesamtprozess ausmachen: Die T5-Exonuklease, die Phusion-Polymerase und die *Taq*-Ligase.

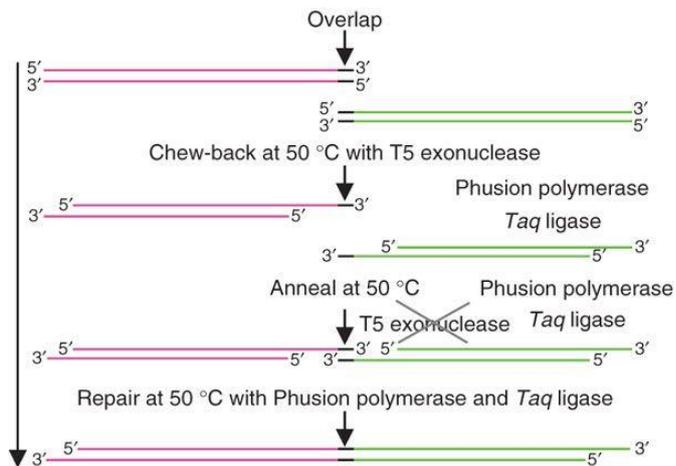


Abbildung 15: Darstellung der einzelnen Schritte des Gibson-Assembly.

Wiedergegeben aus (Gibson et al. 2009). Abgedruckt mit Genehmigung der Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Methods, Copyright 2009.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, werden die linearen DNA-Fragmente im Reaktionsansatz von den 5'-Enden her zunächst verdaut und weisen damit 3'-Überhänge auf. Da die benachbarten Fragmente an ihren Enden homolog zueinander sind, können diese nun Basenpaarungen ausbilden. Die T5-Exonuklease ist in dem 50°C Reaktionsansatz nur für kurze Zeit stabil. Somit kommt die Exonuklease-Aktivität während der einstündigen Inkubationszeit schnell zum Erliegen. Die hitzestabile Polymerase kann jedoch bei dieser Temperatur arbeiten und füllt die Lücken an den gepaarten DNA-Fragmenten am 3'-Ende auf. Die ebenfalls hitzestabile *Taq*-Ligase schließt letztendlich die Stränge der benachbarten Fragmente durch Bildung einer Phosphodiester-Bindung (Gibson et al. 2009). Ein großer Vorteil dieser Methode besteht in der Tatsache, dass in den zusammengefügteten DNA-Fragmenten keine „Narben“ von Erkennungssequenzen verwendeter Restriktionsenzyme zurückbleiben. Die DNA-Sequenz der eingesetzten Fragmente bleibt also in ihrer Gesamtheit unverändert. Darüber hinaus lässt sich diese Methode relativ einfach umsetzen und erfordert zudem wenig Zeit- und Materialeinsatz.

3.2.2.3 Fragmentierung in überlappende gBlocks®

Für die DNA-Synthese des ~25 kb großen Genclusters wurde nun in Kooperation mit IDT ein geeignetes Fragmentierungsmuster in Form einzelner gBlocks® erstellt, die zueinander Überlappungen von ~30 bp aufwiesen. Diese Überlappungsgröße ist für das Gibson-Assembly noch ausreichend, erzeugt aber für die kostspielige Synthese ein noch überschaubares Maß an Redundanzen. Für den Entwurf eines Fragmentierungsmusters wurde die gesamte DNA-Sequenz an IDT übermittelt und um den Vorschlag einer geeigneten Fragmentierung gebeten. Wie bereits beschrieben, war die gewünschte DNA-Sequenz wegen des sehr geringen GC-Gehalts, vielerlei Wiederholungen sowie Hairpin-Strukturen sehr schwer zu handhaben. Aufgrund dessen umfasste der Erstvorschlag von IDT bereits 40 einzelne gBlocks®:

Bezeichnung	Größe [bp]	Bereich
BC1	594	1 – 594
BC2	643	565 – 1.207
BC3	719	1.178 – 1.896
BC4	674	1.867 – 2.540
BC5	672	2.511 – 3.182
BC6	765	3.153 – 3.917
BC7	469	3.888 – 4.356
BC8	765	4.327 – 5.091
BC9	722	5.062 – 5.783
BC10	690	5.754 – 6.443
BC11	620	6.414 – 7.033
BC12	699	7.004 – 7.702
BC13	539	7.673 – 8.211
BC14	670	8.182 – 8.851
BC15	708	8.822 – 9.529
BC16	800	9.500 – 10.299
BC17	675	10.270 – 10.944
BC18	610	10.915 – 11.524
BC19	212	11.503 – 11.714
BC20	799	11.685 – 12.483
BC21	751	12.454 – 13.204
BC22	538	13.175 – 13.712
BC23	585	13.683 – 14.267
BC24	785	14.238 – 15.022
BC25	643	14.993 – 15.635
BC26	798	15.606 – 16.403
BC27	400	16.374 – 16.773
BC28	408	16.744 – 17.151
BC29	520	17.122 – 17.641
BC30	285	17.612 – 17.896
BC31	769	17.867 – 18.635
BC32	687	18.605 – 19.291
BC33	732	19.262 – 19.993
BC34	727	19.964 – 20.690
BC35	776	20.661 – 21.436
BC36	605	21.407 – 22.011
BC37	767	21.982 – 22.748
BC38	797	22.719 – 23.515
BC39	720	23.486 – 24.205
BC40	599	24.176 – 24.774

Tabelle 22: Übersicht des Fragmentierungsmusters der Erstbestellung.

Das vorgeschlagene Fragmentierungsmuster wurde nach Überprüfung in exakt dieser Form bei IDT bestellt. Leider konnten mit BC14, BC16 und BC19 gleich drei der bestellten DNA-

Blöcke nicht wie erwartet synthetisiert werden. Da wir dem Wunsch nach Sequenzveränderungen nicht nachkommen konnten, musste das Cluster noch weiter aufgesplittet werden:

Gestrichener Block	Bezeichnung	Größe [bp]	Bereich
BC14	BC14.1	125	8.182 – 8.306
	BC14.2	369	8.271 – 8.639
	BC14.3	242	8.610 – 8.851
BC16	BC16.1	137	9.500 – 9636
	BC16.2	524	9.607 – 10.130
	BC16.3	199	10.101 – 10.299
BC19	BC19.1	125	11.503 – 11.627
	BC19.2	125	11.590 – 11.714

Tabelle 23: Übersicht der erweiterten Fragmentierung aller drei gestrichenen gBlocks®.

Nach dieser weiteren Aufspaltung konnten alle Blöcke synthetisiert und geliefert werden. Insgesamt waren es nun 45 DNA-Fragmente mit Größen von je 125 bis 800 bp. Die Sequenzen sämtlicher Blöcke sind unter (2.1.8) aufgeführt. Nach erfolgter Lieferung wurden die Blöcke entsprechend der unter (2.1.8) beschriebenen Methode rekonstituiert und bei -20°C gelagert.

Auf nachfolgender Seite (Abbildung 16) ist ein Alignment aller 45 gBlocks® dargestellt, das auf eindrückliche Weise das Ausmaß der Fragmentierung und des damit verbundenen Arbeitsaufwands für die Rekonstruktion zeigt. Wie in der Abbildung schematisch skizziert, wurden sämtliche Blöcke so entworfen, dass sie zu ihren Nachbarfragmenten Überlappungen von ca. 30 bp aufwiesen und somit für die Methode des Gibson-Assembly bereit waren. Der sukzessive Aufbau sollte im Rahmen des Rekonstruktionsprozesses über die Zwischenstufen von 13 Sub-Blöcken sowie 4 weiteren Sub-Sub-Blöcken schließlich zum finalen Gencluster führen.

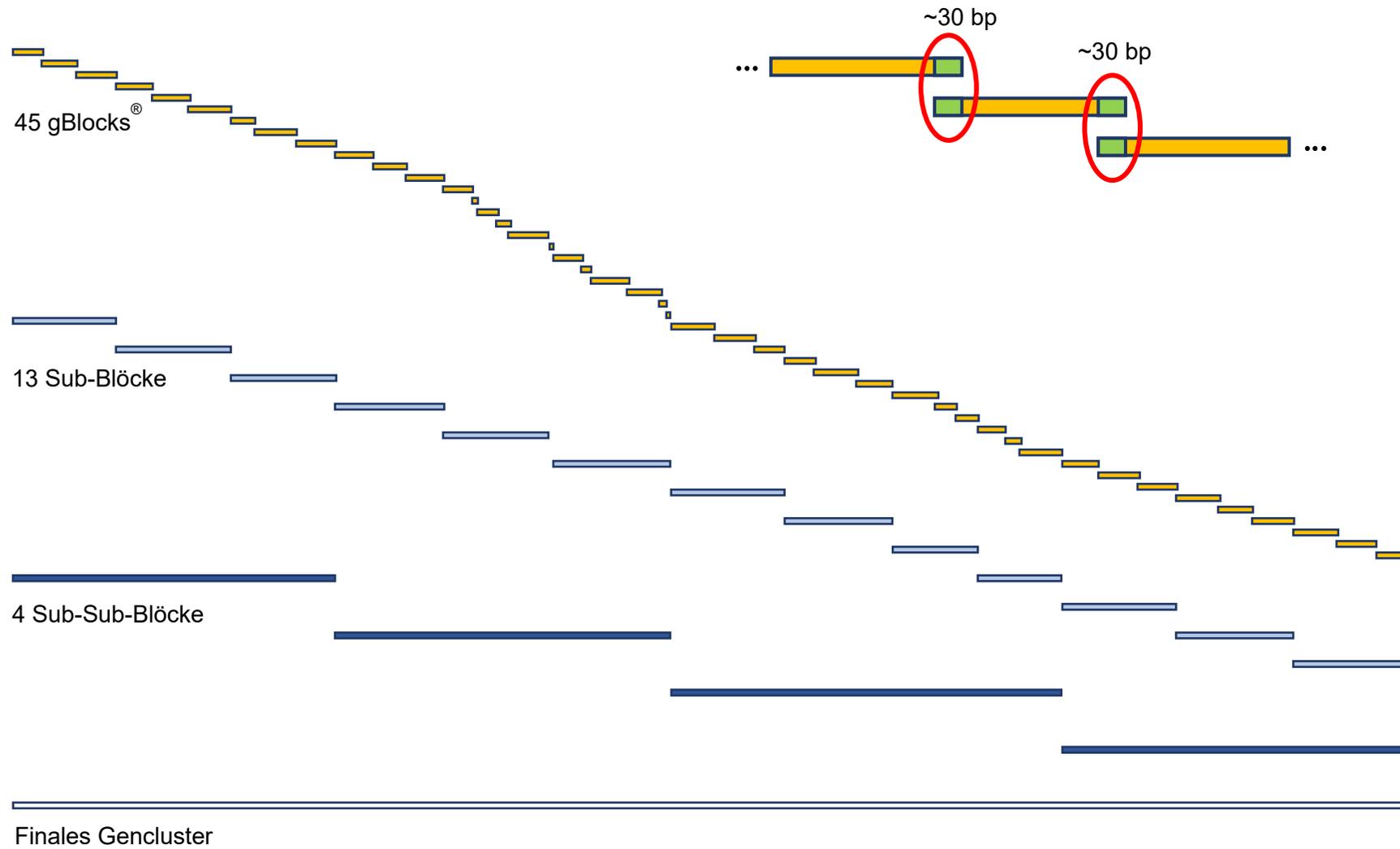


Abbildung 16: Alignment aller 45 gBlocks[®] sowie der weiteren Zwischenstufen.

3.2.3 Vollsynthetische Herangehensweise: Die Durchführung

3.2.3.1 Amplifikation der gBlocks®

Um die Qualität der gBlocks® zu überprüfen, wurden diese zunächst via Agarose-Gelelektrophorese visuell überprüft. Je Block wurden 30 ng der (theoretisch) erhaltenen Gesamtmenge von 200 ng aufs Gel aufgetragen. Leider zeigte sich hier, dass die angegebene DNA-Konzentration bei vielen der Blöcke nicht erreicht wurde. Teilweise waren hier gar keine Banden zu erkennen. Um genügend DNA in verlässlicher Konzentration zu erhalten, wurden daher alle gBlocks® via Q5-Polymerase amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer sind unter (2.1.7) „Primer zur Amplifikation der 45 gBlocks®“ aufgeführt. Bei den gBlocks® BC18, BC19.1, BC26 sowie BC34 war die Amplifikation nicht erfolgreich. Daher wurden für diese Fragmente leicht abgewandelte Primer bestellt (siehe 2.1.7): „Alternative Primer zur Amplifikation der gBlocks BC18, BC19.1, BC26 und BC34“. Hiermit war zumindest bei BC18 und BC19.1 eine Amplifikation möglich. Die Blöcke BC26 und BC34 konnten aber auch damit nicht amplifiziert werden. Auf dem Gel der aufgetragenen gBlocks® waren hier außerdem keinerlei Banden zu erkennen. Daher wurden diese beiden Blöcke mit gleicher Sequenz erneut bei IDT bestellt. Nach Überprüfung via Agarose-Gelelektrophorese waren bei den Zweitlieferungen nun deutliche Banden erkennbar, sodass sogar auf eine Amplifikation komplett verzichtet werden konnte. Warum die DNA bei der ersten Lieferung hier offenbar nicht vorhanden war konnte nicht geklärt werden.

3.2.3.2 Vektorvorbereitung

Die 45 gBlocks® mussten nun mittels der Methode des Gibson-Assembly nach und nach zusammengefügt werden. Hierzu sollten zunächst je 2 bis 4 benachbarte Blöcke mit einem linearisierten pBluescript sk (-) Plasmid verbunden werden und somit einen größeren Sub-Block bilden. Das hierbei entstandene Produkt sollte dann direkt für die Transformation eingesetzt werden. Die leeren Plasmide wurden im Voraus zunächst durch das Restriktionsenzym EcoRV linearisiert. Die entsprechende Schnittstelle ist in der MCS des eingesetzten Vektors vorhanden. Anschließend wurde für jeden einzelnen Assembly-Schritt eine separate PCR-Amplifikation des linearisierten Vektors mit überhängenden Primern durchgeführt. Mit diesen Primerüberhängen wurden beidseitig der Vektorgrenzen die Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym Bts^{AI} eingefügt. Dieses Enzym ist für das spätere Ausschneiden der Sub-Blöcke essentiell. Direkt an diese Erkennungssequenz angeschlossen, enthielten die Primerüberhänge die homologen Endsequenzen (je 30 bp) der jeweils äußeren gBlocks®. Da diese für jeden Ansatz unterschiedlich waren, musste für jeden Assembly-Schritt eine separate Vektoramplifikation mit den jeweils passenden Primerpaaren durchgeführt werden. Die Sequenzen dieser Primer sind unter (2.1.7) „Primer zur Vektor-Amplifikation (Schritt 1)“ aufgeführt. Nach erfolgter Vektor Elongation via Q5-Polymerase wurde der PCR-Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dieses besondere Enzym schneidet in der Mitte der spezifischen

Erkennungssequenz GATC unter Ausbildung glatter Enden. Allerdings kann die Sequenz ausschließlich dann erkannt und geschnitten werden, wenn das Stickstoffatom an Position 6 der Adeninbase eine Methylgruppe trägt (Palmer et al. 1994). Dies ist bei DNA der Fall, die in einem *E. coli* Stamm repliziert wurde, der eine funktionelle Dam-Methylase exprimieren kann. Hierzu gehört auch der Stamm *E. coli* XL1-Blue, aus welchem das als Template verwendete Plasmid isoliert wurde. Der durchgeführte DpnI Verdau führte in diesem Fall also dazu, dass sämtliche Template-Rückstände aus der PCR-Reaktion verdaut und somit zerstört wurden. Da amplifizierte DNA aus PCR-Reaktionen jedoch keine Methylierungen trägt, kann diese auch nicht durch DpnI verdaut werden. Der Sinn dieses Prozesses bestand dabei in der größtmöglichen Reduzierung jeglicher zirkulärer Leervektor-DNA, die bei der späteren Transformation zu falsch positiven Transformaten führen könnte. Nach erfolgtem DpnI-Verdau wurden die PCR-Ansätze zunächst mittels peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB Biotechnologie) aufgereinigt und anschließend mittels NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert.

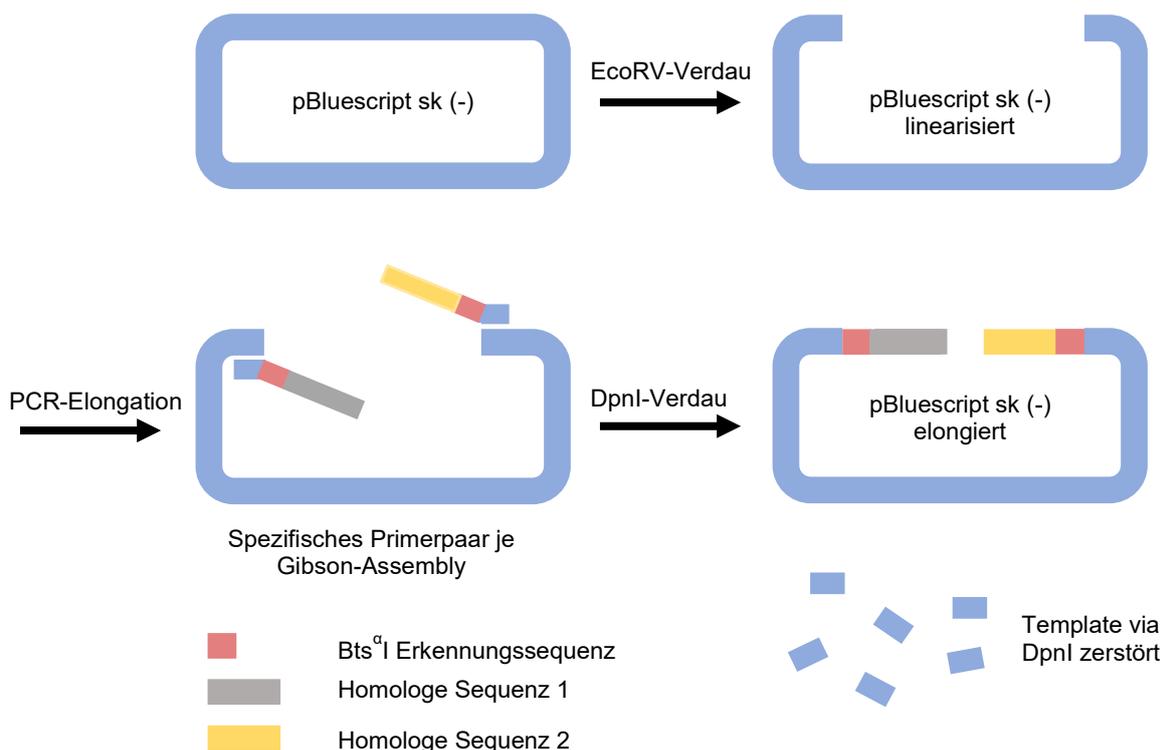


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vektorvorbereitung.

3.2.3.3 Konstruktion der Sub-Blöcke (Standard-Verfahren)

Nachdem für jedes Gibson-Assembly nun die entsprechenden Vektoren vorbereitet waren, konnten die einzelnen Reaktionen mit den passenden gBlocks[®] durchgeführt werden. Hierfür wurden die gBlock[®]-Amplifikate bzw. die neu bestellten gBlocks[®] im Falle von BC26 und BC34 verwendet. Die genaue Methodenbeschreibung des Gibson-Assembly ist unter (2.3.16)

aufgeführt. Das Prozedere war für alle Reaktionsansätze vom Prinzip her identisch. Zunächst wurde der verlängerte Vektor mit den 2 bis 4 entsprechenden gBlocks® gemischt und mit demselben Volumen Gibson Assembly® Master Mix 2x (New England Biolabs) ergänzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 50°C (Alternativ: 90 min bei 45°C) wurde der Ansatz 1:3 mit H₂O verdünnt und davon 1-3 µl in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Zur Selektion wurde auf LB-Platten mit dem Antibiotikum Carb ausgestrichen. Zur Unterscheidung zwischen den gewünschten Vektorkonstrukten mit integriertem Sub-Block und möglichen Leerplasmiden wurde zusätzlich bei allen Transformationen mit dem pBluescript sk (-) Vektor eine unterstützende Blau-Weiß-Selektion durchgeführt (siehe 2.3.5). Die gewünschten Klone sollten durch die Sub-Block Integration kein intaktes *lacZα* Gen mehr tragen, somit keine funktionelle β-Galactosidase besitzen und daher auch keine Blaufärbung mehr ausbilden können.

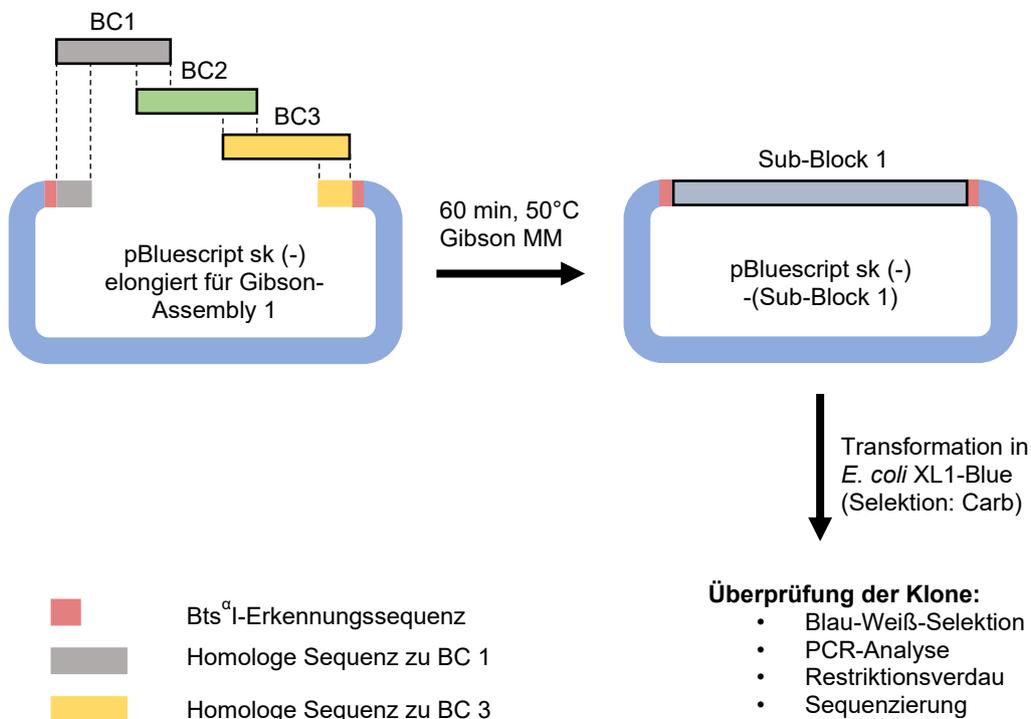


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Standard-Verfahrens.

Zur Selektion wurden anschließend mehrere weiße Klone gepickt und in je 5 ml LB Carb Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden daraus die Plasmide isoliert und anschließend mittels Restriktionsverdau und PCR überprüft. Da die Sub-Blöcke jeweils andere Restriktions-Schnittstellen aufwiesen, wurden für die verschiedenen Konstrukte teils unterschiedliche Restriktionsenzyme verwendet. Das Auswahlkriterium bestand stets darin, dass mit dem Verdau klar unterscheidbare Banden im Vergleich zum Leervektor entstehen sollten. Zusätzlich wurde von den isolierten Plasmiden eine PCR-Amplifikation durchgeführt – in der Regel mit den Primern (pBlue_Seq_f / pBlue_Seq_r). Dieses Primerpaar bindet am Vektor-Rückgrat links bzw.

rechts neben dem jeweils integrierten Sub-Block und eignete sich somit universell für alle Assembly-Schritte mit demselben Vektor. Konstrukte, die sowohl die gewünschten Banden beim Restriktionsverdau als auch bei der PCR-Reaktion zeigten, wurden zur finalen Bestätigung sequenziert. Alle für die Sequenzierungen (und teilweise auch für zusätzliche PCR-Reaktionen) verwendeten Primer sind unter (2.1.7) „Primer zur Sub-Block Sequenzierung“ aufgeführt.

Da die drei gBlocks® BC14, BC16 und BC19 von IDT nicht synthetisiert werden konnten und nachträglich von der Bestellung gestrichen wurden, mussten diese in noch kleinere Vorstufen fragmentiert werden (siehe 3.2.2.3). Zum Aufbau dieser gestrichenen gBlocks® aus den Vorstufen wurde das in diesem Abschnitt beschriebene Verfahren analog angewandt. Die dabei resultierenden Konstrukte waren aber im Grunde keine „Sub-Blöcke“ im eigentlichen Sinne, sondern lediglich die gestrichenen gBlocks® der Erstbestellung. Für den Aufbau der eigentlichen „Sub-Blöcke“ wurden die selbst aufgebauten gBlocks® aus den entsprechenden Vektoren ausgeschnitten (gemäß 3.2.3.5) und danach in analoger Weise weiterverwendet. Auf diese Feinheit in der Bezeichnung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht weiter eingegangen.

3.2.3.4 Konstruktion der Sub-Blöcke (Stückelung)

Mit dem oben beschriebenen Standard-Verfahren konnten für 3 der insgesamt 13 Sub-Blöcke leider keine korrekten Klone identifiziert werden. Konkret handelte es sich hierbei um die Sub-Blöcke 2, 6 und 12. Zwar konnten meist einige der Klone mittels PCR-Analyse und Restriktionsverdau als „korrekt“ ermittelt werden, bei der Sequenzierung fielen dann jedoch einzelne Punktmutationen in der Basenabfolge auf. Zur Lösung dieses Problems wurden hier sogenannte „Stückelungen“ durchgeführt. Dabei wurden 2 Klone gewählt, deren Blöcke in unterschiedlichen Bereichen Fehler aufwiesen. Durch Auswahl von zwei geeigneten Restriktionsenzymen, die nur eine Schnittstelle im Vektor aufwiesen (bzw. mittels eines Restriktionsenzym das zwei Schnittstellen aufwies), wurden diese Plasmide verdaut und die Banden mittels präparativer Gelelektrophorese (gemäß 2.3.9) aufgetrennt. Die fehlerfreien Teilstücke wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA via peqGold Gel Extraction Kit (PEQLAB Biotechnologie) extrahiert und gereinigt. Die jeweils fehlerfreien Teilstücke wurden anschließend durch Ligation wieder verknüpft und das resultierende Ligationsprodukt in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die hierbei erhaltenen Klone wurden anschließend mit den Standard-Methoden überprüft. Mit dem Verfahren der Stückelung konnte letztendlich in allen 3 Fällen ein Klon mit korrekter Sequenz identifiziert werden. Bei Sub-Block 6 kam hierbei allerdings ein etwas abgeändertes Verfahren zum Einsatz. Bei diesem Sub-Block bestand die Besonderheit, dass hier 4 gBlocks® in einer Assembly-Reaktion zusammengebracht werden sollten (und nicht 3 wie in den anderen Fällen). Erschwerend kam noch hinzu, dass im Bereich zwischen BC18 und BC19 eine Hairpin-Sekundärstruktur vorhanden war (von der Genanordnung her

wahrscheinlich eine Terminatorsequenz). Möglicherweise aufgrund dieser beiden Faktoren konnte für Sub-Block 6 auch nach zahlreichen Versuchen kein korrekter Klon identifiziert werden. Die Fehler bestanden hier zudem nicht „nur“ in einzelnen Punktmutationen, sondern waren vielmehr bereits von der Makrostruktur mittels PCR und Restriktionsverdau zu erkennen. Von den sehr wenigen Klonen, die nach der Transformation überhaupt erhalten wurden, zeigte kein Klon das gewünschte Bandenmuster. Lediglich ein Klon nach Transformation in die chemisch kompetenten NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (New England Biolabs) zeigte ein Bandenmuster, das dem gewünschten zumindest ähnlich war. Dieser Klon wurde als „N6.1“ bezeichnet. Die Sequenzierung lieferte die Erkenntnis, dass hier zwar keine Punktmutationen vorlagen, jedoch ein größeres Stück von 553 bp in der Mitte des Sub-Blocks fehlte. Dieses Stück war im Übergangsbereich der gBlocks® BC16 und BC17 lokalisiert. Diverse Versuche, dieses fehlende Stück aus dem Gibson-Ansatz zu amplifizieren, brachten keinen Erfolg. Daher wurde beschlossen, einen weiteren „Helfer“-gBlock® mit der Bezeichnung „BC16-17“ zu bestellen, der diesen fehlenden Übergangsbereich abdeckt. Anschließend sollte eine Stückelung nach dem bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt werden, da links und rechts der Lücke in besagtem Klon je eine NcoI Schnittstelle lokalisiert war. Abweichend vom bereits beschriebenen Verfahren wurden hier nicht zwei Plasmide miteinander kombiniert, sondern ein Plasmid sowie der Helfer-gBlock® „BC16-17“. Die für dessen Amplifikation verwendeten Primer sowie die Sequenz dieses gBlocks® sind unter (2.1.7) bzw. (2.1.8) aufgeführt.

Sub-Block	Verwendete Klone	Anzahl Fehler	Verwendete RE	Verwendete Fragmente	Korrekt Klon
2	X2.3	4 Fehler	EcoRV & BamHI	899	X2.3/9 2
	X2.9	1 Fehler		4.118	
6	N6.1	Lücke von 553 bp	NcoI (2 Schnittstellen)	4.288	X6.3I
	Helfer gBlock® „BC16-17“	-		893	
12	X12.4	3 Fehler	EcoRV & BamHI	806	X12.4/7 7
	X12.7	1 Fehler		4.248	

Tabelle 24: Übersicht der durchgeführten Stückelungen.

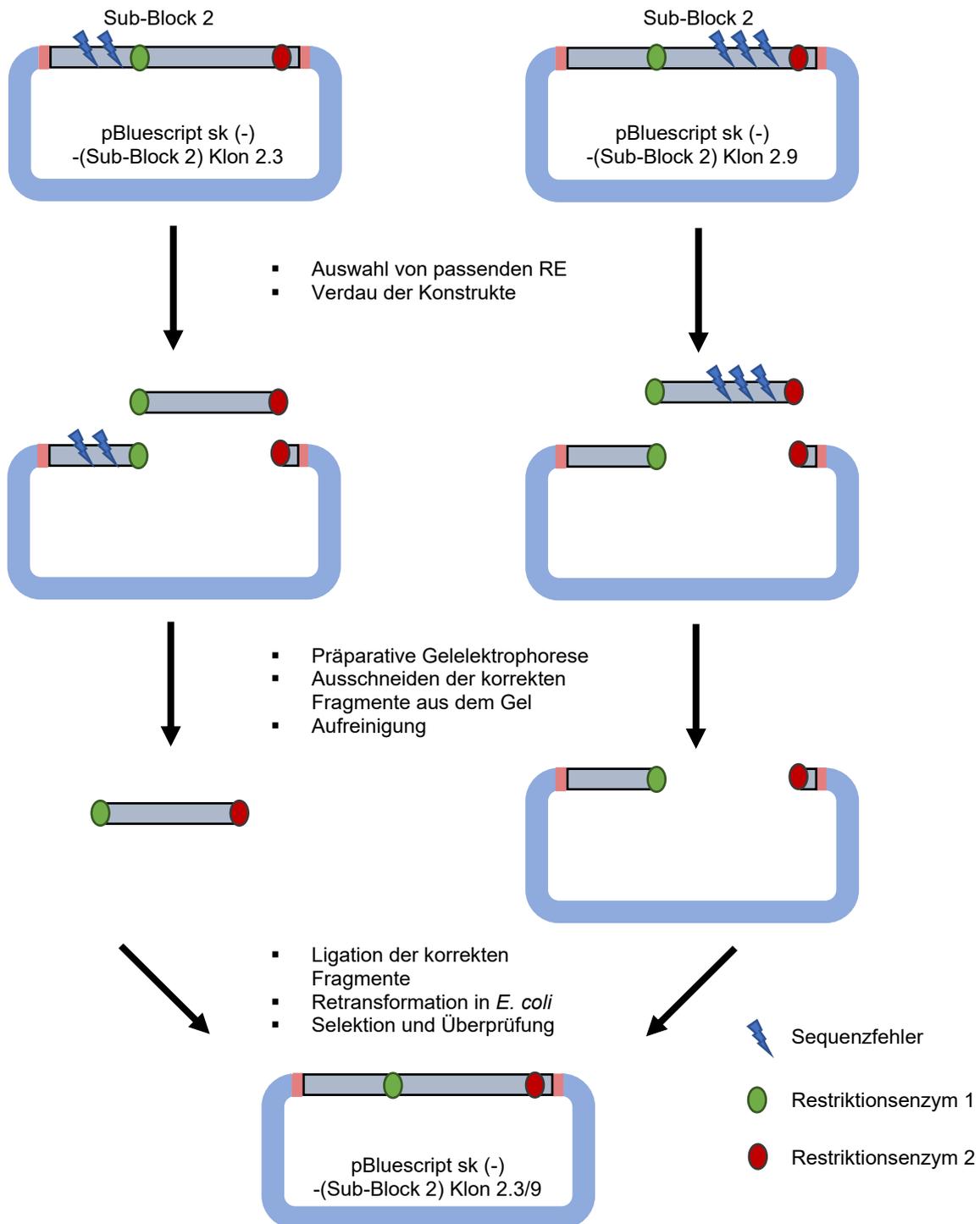


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Verfahrens der Stückelung.

3.2.3.5 Ausschneiden der Sub-Blöcke und Konstruktion der Sub-Sub-Blöcke

Nachdem alle 13 Sub-Blöcke über das Standard-Verfahren oder über das Verfahren der Stückelung durch korrekte Sequenzierungen final bestätigt waren, lag der nächste Schritt im Ausschneiden dieser Blöcke aus dem pBluescript sk (-) Vektor (gleiches galt im Vorfeld für die drei gestrichenen gBlocks® BC14, BC16 und BC19). Das Ausschneiden war für die folgenden Schritte insofern essentiell, da die Methode des Gibson-Assembly funktionsbedingt lineare

DNA-Fragmente erfordert (Gibson et al. 2009). Hierfür war es allerdings nicht ausreichend, die zirkulären Konstrukte an einer beliebigen Stelle zu linearisieren. Dieser Vorgang musste vielmehr so ablaufen, dass die Grenzen der ausgeschnittenen Fragmente wieder homologe Überlappungen aufweisen. Da die 3'-Enden im Reaktionsansatz von der T5-Exonuklease nicht verdaut werden, sondern von der Phusion-Polymerase für das Anfügen weiterer Nukleotide benötigt werden, mussten die Überlappungen bis zur letzten Base am 3'-Ende passend sein. Um ein Ausschneiden in dieser Form zu ermöglichen, wurde bereits bei der Vektorvorbereitung durch die PCR eine spezielle Restriktionsschnittstelle direkt neben die homologen Bereiche eingebaut (siehe 3.2.3.2). Das hierfür verwendete Enzym Bts^qI besitzt die Besonderheit, dass es nicht innerhalb, sondern direkt neben der Erkennungssequenz unter Ausbildung eines 3'-Überhangs schneidet. Auf diese Weise konnten alle aufgebauten Blöcke exakt an ihren 3'-Grenzen ausgeschnitten werden. Da das Enzym allerdings keine glatten Enden ausbildet, fehlten am 5' Ende je zwei Basen. Dies war aber insofern irrelevant, da in allen nachfolgenden Assembly-Schritten ohnehin die 5' Enden verkürzt wurden. Nach Bts^qI-Verdau wurden die einzelnen Sub-Blöcke mittels Elektrophorese aufgetrennt und präparativ aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden anschließend mittels des peqGold Gel Extraction Kit extrahiert, die resultierende DNA aufgereinigt und schließlich quantifiziert. Die auf diese Weise ausgeschnittenen Sub-Blöcke waren direkt für die nachfolgenden Assembly-Schritte bereit. Hierbei sollten wieder 3-4 Sub-Blöcke zu noch größeren Sub-Sub-Blöcken aufgebaut werden. Da das hierbei verwendete Verfahren völlig identisch zu dem bereits ausführlich beschriebenen Verfahren war, wird an dieser Stelle auf eine nähere Erläuterung verzichtet. Sämtliche DNA-Primer für die Vektor-Elongationen und Sequenzierungen sind unter (2.1.7) aufgeführt.

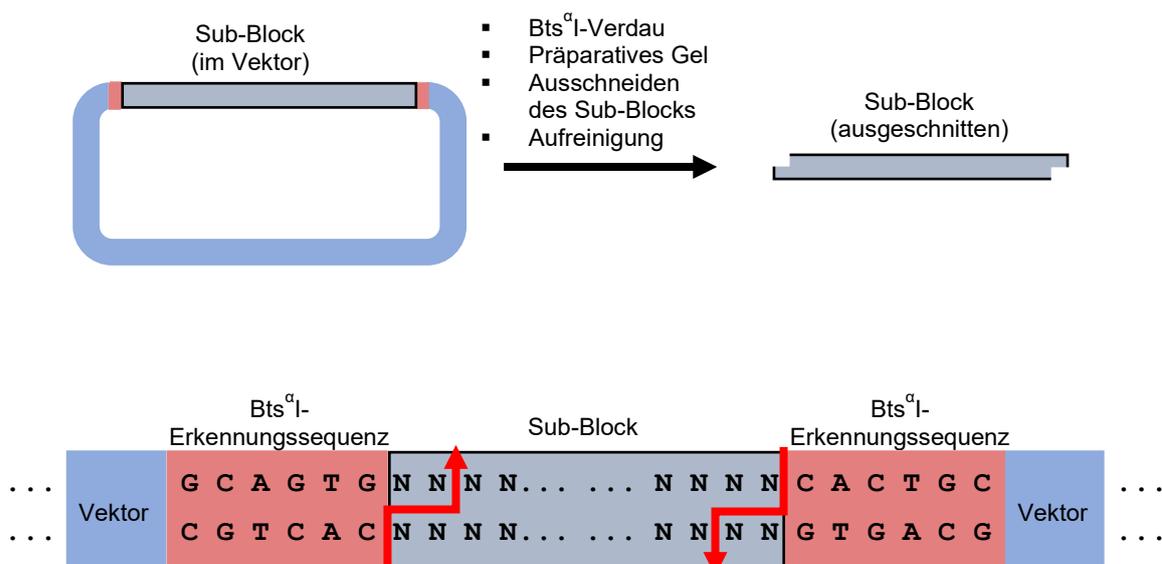


Abbildung 20: Darstellung des Ausschneidevorgangs mittels Bts^qI.

Vorstufe	gBlock®	Sub-Block	Sub-Sub-Block
	BC1	1 (1.896 bp)	A (5.783 bp)
	BC2		
	BC3		
	BC4	2 (2.051 bp)	
	BC5		
	BC6		
	BC7	3 (1.896 bp)	
	BC8		
	BC9		
	BC10	4 (1.949 bp)	
	BC11		
	BC12		
	BC13	5 (1.857 bp)	
BC14.1			
BC14.2			
BC14.3			
	BC15		
BC16.1	BC16		
BC16.2			
BC16.3			
	BC17	6 (2.215 bp)	
	BC18		
BC19.1	BC19		
BC19.2			
	BC20	7 (2.028 bp)	C (6.951 bp)
	BC21		
	BC22		
	BC23	8 (1.953 bp)	
	BC24		
	BC25		
	BC26	9 (1.546 bp)	
	BC27		
	BC28		
	BC29	10 (1.514 bp)	
	BC30		
	BC31		
	BC32	11 (1.896 bp)	D (6.170 bp)
	BC33		
	BC34		
	BC35	12 (2.088 bp)	
	BC36		
	BC37		
	BC38	13 (2.056 bp)	
	BC39		
BC40			

Tabelle 25: Ausgangsprodukte und Zwischenstufen des Rekonstruktionsprozesses.

Die Übersicht der vorigen Seite zeigt ein Gesamtbild der einzelnen Assembly-Reaktionen: Unter Anwendung der in den vorigen Kapiteln beschriebenen Methoden wurden insgesamt 3 gBlocks[®], 13 Sub-Blöcke sowie 4 Sub-Sub-Blöcke hergestellt. Zur Bestätigung sämtlicher Sequenzen wurden alle genannten Konstrukte am Ende des Kontrollprozesses sequenziert.

3.2.3.6 Letzter Assembly-Schritt zum finalen Gencluster

Für den letzten Reaktionsschritt sollten nun die 4 Sub-Sub-Blöcke, die jeweils Größen von ~6 kb aufwiesen, in einem Assembly-Schritt zum finalen Konstrukt zusammengebaut werden. Der bisher verwendete pBluescript sk (-) Vektor war für diese Größen jedoch nicht mehr geeignet (das entstehende Gencluster sollte eine Größe von knapp 25 kb umfassen). Daher wurde stattdessen das SuperCos 1 Derivat „mrsMR02“ verwendet, mit welchem schon zuvor ganze Gencluster kloniert wurden (Basitta et al. 2017). Für die Vorbereitung wurde dieser Vektor mittels PacI verdaut, um die darin enthaltene „multiple recombineering site“ beidseitig auszuschneiden und anschließend wieder religiert. Das resultierende Konstrukt wurde als SC1TR01 bezeichnet. Für das finale Assembly wurde nun eine abweichende Strategie zur Vektorvorbereitung verwendet, da der SuperCos Vektor mit einer Eigengröße von über 12 kb nicht mehr amplifizierbar war. Um die homologen Endsequenzen anzufügen, wurde hier ein weiterer Helfer-gBlock[®] entworfen, der als „Bael-Linker-(SuperCos)“ bezeichnet wurde (siehe 2.1.8).

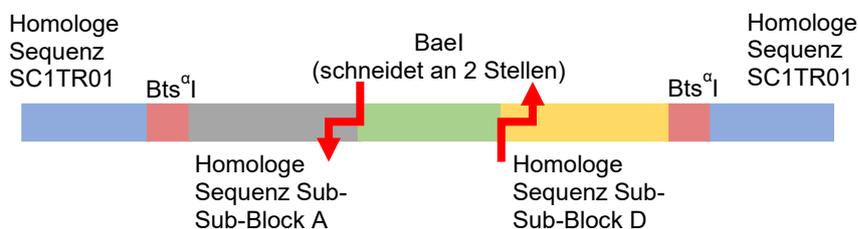


Abbildung 21: Funktionelle Übersicht des gBlocks[®] "Bael-Linker-(SuperCos)".

Dieser Helfer-gBlock[®] besaß an beiden Rändern homologe Bereiche zum PacI linearisierten SC1TR01 Vektor und ließ sich somit einfach via Gibson-Assembly in diesen Vektor einbauen. Das so entstandene Konstrukt wurde als SC1TR02 bezeichnet. Zur Vorbereitung des letzten Assembly-Schritts wurde dieser mit dem Restriktionsenzym Bael geschnitten. Die Schnittstelle hierfür war in der Mitte des Helfer gBlocks[®] platziert worden. Das spezielle Enzym Bael schneidet beidseitig einer vergleichsweise großen Erkennungssequenz unter Ausbildung von 3'-Überhängen. Es schneidet seine Erkennungssequenz quasi „selbst heraus“ und erzeugt im Vektor an exakt definierten Stellen 3'-Überhänge. Nun wurden die homologen Endsequenzen zu den Sub-Sub-Blöcken A bzw. D genau an diesen Grenzen in den Helfer-gBlock[®] eingebaut. Zusätzlich waren, wie bei der Strategie zuvor, direkt daran Bts^αI-Schnittstellen angebracht, um

das Cluster später aus dem Vektor ausschneiden zu können. Auf diesem Wege wurde das finale Gibson-Assembly mit den Sub-Sub-Blöcken A-D und dem Bael linearisierten SC1TR02 Vektor erfolgreich durchgeführt und gleichzeitig ein universelles System zur schnellen Umklonierung ganzer Gencluster entworfen, das über diese Arbeit hinaus verwendet werden kann.

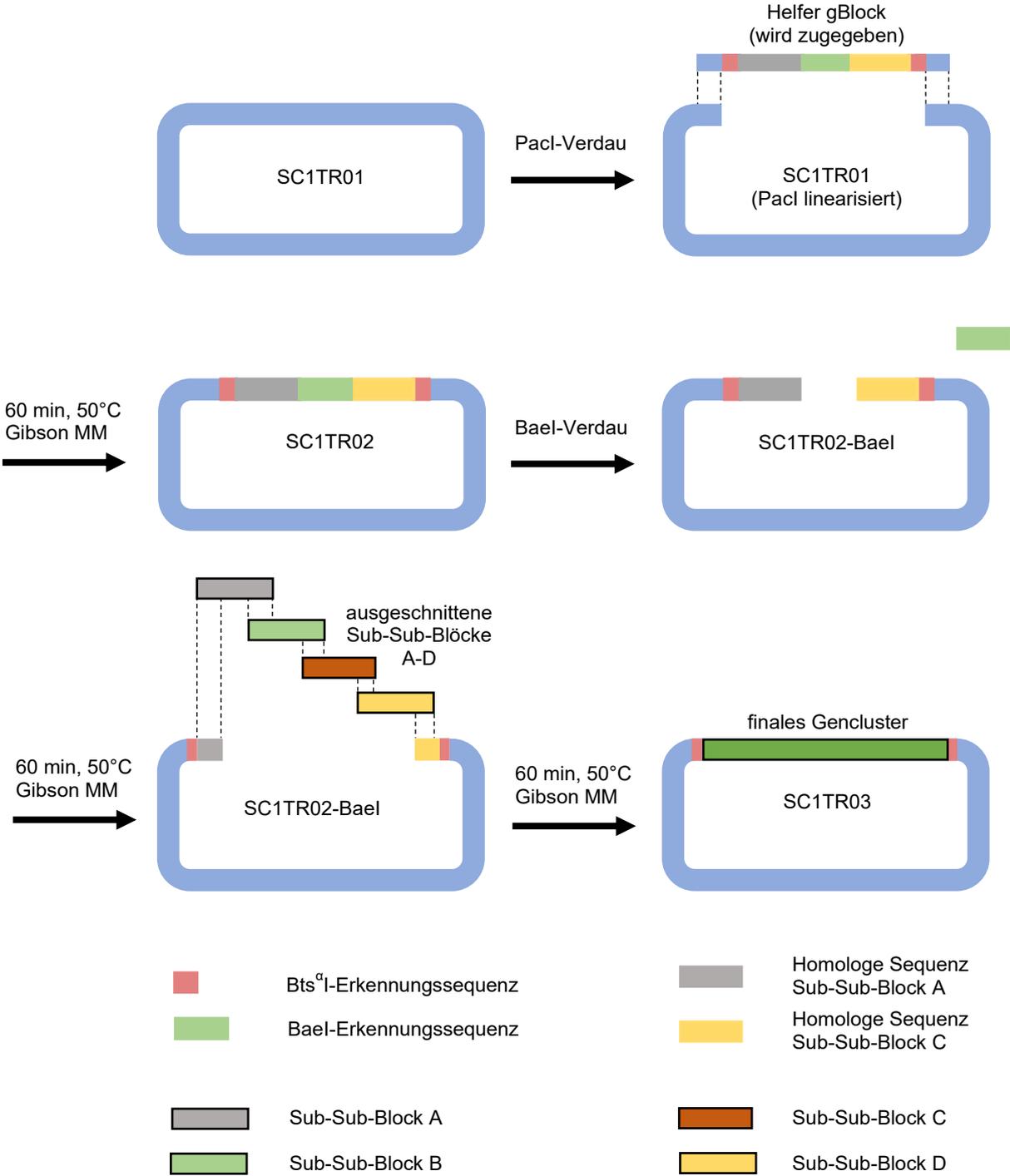


Abbildung 22: Übersicht des finalen Gibson-Assembly.

Das resultierende Konstrukt mit dem finalen Gencluster wurde als SC1TR03 bezeichnet. Leider konnte nach dessen Transformation in *E. coli* keine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden, da das verwendete SuperCos1-Derivat nicht für die α -Komplementation ausgelegt war. Für die Identifizierung eines positiven Klons wurden daher PCR-Reaktionen mit je einem Primerpaar vom linken Ende sowie einem Primerpaar vom rechten Ende des Genclusters verwendet (Block 1_1f / Block 1_1r bzw. Block 13_1f / Block 13_1r). Von 576 Klonen zeigte jedoch nur ein Klon positive Signale mit beiden Primerpaaren. Dieser Klon wurde als „X1aI“ bezeichnet. Zur weiteren Bestätigung wurde daraus das SC1TR03 Konstrukt isoliert und mittels des Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut. Alle 8 Banden entsprachen hier exakt den theoretischen Erwartungen. Zur weiteren Bestätigung wurden die 5 Übergangsbereiche zwischen den Sub-Sub-Blöcken bzw. zwischen dem Vektor und den seitlichen Sub-Sub-Blöcken mittels PCR amplifiziert und die entsprechenden Amplifikate sequenziert. Das aus Klon X1aI isolierte SC1TR03 Konstrukt zeigte hier keinerlei Sequenzfehler. Um sämtliche Zweifel auszuschließen, wurde das Cosmid in einem finalen Schritt komplett mittels Illumina-Technik durch die Firma Macrogen (Südkorea) sequenziert. Nach Auswertung zeigte sich innerhalb des 24.774 bp großen Genclusters eine Punktmutation an Position 16.770. Hier wurde die Base Guanin durch Thymin ersetzt. Glücklicherweise resultierte hierdurch ein neutraler Austausch des Codons CGC zu CGA (beide Arginin) innerhalb des Gens *IKA_05339* (Aminoglykosid-Phosphotransferase). Da dies die Aminosäuresequenz des Proteins nicht verändert, sollten keine schwerwiegenden Defekte zu erwarten sein. Außer dieser Mutation wurden im Rahmen der Sequenzierung keine weiteren Fehler im synthetischen Gencluster gefunden. Das komplette Gencluster konnte somit – mit Ausnahme von nur einer Base – fehlerfrei rekonstruiert werden.

3.3 Integration des Genclusters in *Bacillus subtilis*

3.3.1 Untersuchungen von *E. coli* Extrakten

Nach Komplettierung des Genclusters wurde zunächst untersucht, ob damit bereits in *E. coli* eine Produktion von Sekundärmetaboliten zu beobachten war. Dazu wurde der Klon mit dem final sequenzierten Gencluster verwendet (*E. coli* XL1-Blue / SC1TR03). Als Negativkontrolle diente ein entsprechender Klon mit Leervektor (*E. coli* XL1-Blue / SC1TR02). Zur Untersuchung wurden aus Übernachtskulturen verschiedene Extrakte mit 1-Butanol und Ethylacetat sowie Proben aus mehrfach abzentrifugierten Kulturüberständen hergestellt (siehe 2.4.1). Die HPLC-Analytik erfolgte gemäß (2.4.2) unter Verwendung von Methode 1. Leider zeigten sich hierbei keine neuen Peaks im Vergleich zur Negativkontrolle. Später wurden die Proben mit der besser geeigneten Methode 3 analysiert – auch hier waren keine neuen Peaks feststellbar.

Fazit: Aus diesen ersten analytischen Untersuchungen konnte gefolgert werden, dass mit dem synthetisch rekonstruierten Gencluster keine Produktion neuer Substanzen in E. coli erfolgt.

3.3.2 Umklonierung des Genclusters in den Vektor pBS1C

Nach den ersten analytischen Betrachtungen in *E. coli* sollte nun als Produktionsstamm das Bakterium *Bacillus subtilis* verwendet werden. Dieser quasi ubiquitär vorkommende Modellorganismus (Earl et al. 2008) gehört weltweit zu den meist erforschtesten Gram positiven Bakterien und wird bereits seit vielen Jahren zur industriellen Produktion von Enzymen eingesetzt (van Dijk et al. 2013). Die Genomsequenz von *Bacillus subtilis* wurde früh veröffentlicht und bereits umfassend analysiert (Kunst et al. 1997, Barbe et al. 2009). In den letzten Jahren wurden außerdem bereits mehrere vollständige Gencluster aus Arten der Gattung *Bacillus* heterolog in *Bacillus subtilis* exprimiert, wie beispielsweise das Bacillomycin Gencluster aus *Brevibacillus brevis* X23 mit einer Größe von 37,2 kb (Liu et al. 2016). Ein weiteres Beispiel wäre die erfolgreiche heterologe Produktion des Amicoumacin Genclusters, das eine Größe von 47,4 kb aufweist (Li et al. 2015). Da auch das in dieser Arbeit rekonstruierte Gencluster aus einem Stamm der Gattung *Bacillus* stammt, schien die Auswahl von *Bacillus subtilis* als Wirtstamm die ideale Wahl zu sein. Die Akzeptanz der Codons sowie der Promotoren sollte hier eher gegeben sein als in dem Gram negativen Bakterium *E. coli*. Besser geeignet als *Bacillus subtilis* wäre allenfalls ein *Bacillus cereus* Stamm selbst. Da hierfür allerdings wesentlich weniger Möglichkeiten zur genetischen Manipulation vorhanden sind, wurde als Produktionsstamm letztendlich *Bacillus subtilis* ausgewählt. In den bereits genannten Beispielen zur heterologen Expression in diesem Stamm wurden die Gencluster stets in den *amyE*-Locus auf der genomischen DNA integriert (Shimotsu et al. 1986). Um eine vergleichbare Integration des synthetischen Genclusters durchzuführen, musste dieses zunächst in einen dafür geeigneten

Vektor eingebracht werden. Eine Möglichkeit war der Vektor pBS1C, ein *E. coli* – *Bacillus subtilis* Shuttle-Vektor, der die nötigen Sequenzbereiche für die *amyE*-Integration besitzt (Radeck et al. 2013). Zur Selektion sind hier zwei verschiedene Resistenzgene vorhanden: Eine Ampicillin Resistenz für *E. coli* sowie eine Chloramphenicol Resistenz für *Bacillus subtilis*. Der Vektor pBS1C wurde uns dankenswerterweise von Prof. Dr. Thorsten Mascher (Technische Universität Dresden) zur Verfügung gestellt. Um das Gencluster mit seiner Größe von fast 25 kb umzuklonieren, wurde vom Prinzip her dieselbe Methode verwendet, die bereits bei der Vorbereitung des SC1TR02 Vektors erfolgreich zum Einsatz kam (siehe 3.2.3.6). Hierfür wurde wieder ein entsprechender Helfer-gBlock[®] mit Bael-Schnittstelle und den angrenzenden homologen Randsequenzen des Genclusters entworfen und als „Bael-Linker-(pBS1C)“ bezeichnet (siehe 2.1.8). Da der Vektor pBS1C dem BioBrick Standard entspricht, konnte der gBlock[®] so entworfen werden, dass er durch einfache Ligation in den Vektor integriert werden konnte. Hierfür wurden an den Rändern des gBlocks[®] die entsprechenden Schnittstellen für EcoRI und SpeI platziert. Nachdem Vektor und gBlock[®] mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten waren, wurden sie miteinander ligiert und zur Selektion in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Da der Leervektor ursprünglich an dieser Stelle ein rotes Fluoreszenzprotein enthielt, konnte auf Verlust der roten Farbe hin selektiert werden. Die erfolgreiche Integration des Helfer-gBlocks[®] wurde mittels PCR-Reaktion sowie Sequenzierung mit den Primern (pBS1C_Seq_f / pBS1C_Seq_r) überprüft. Anschließend wurde dieses Zwischenkonstrukt mit dem Restriktionsenzym Bael verdaut und dadurch die homologen Endsequenzen zum Gencluster für das nachfolgende Gibson-Assembly freigelegt. Das Cluster selbst wurde für das Assembly aus dem Vektor SC1TR03 mittels Bts^{qI} ausgeschnitten. Somit konnte das lineare Gencluster sowie der Bael geschnittene pBS1C-Vektor mit den entsprechenden homologen Randbereichen via Gibson-Assembly zusammengefügt werden. Nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue und Selektion auf LB Carb zeigten sich am nächsten Tag viele Transformanten. Für die Überprüfung wurden PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar (pBS1C_Seq_f / pBS1C_BC_Cluster) durchgeführt, welches den Übergang von linkem Genclusterende und Vektor amplifiziert. Von 288 Klonen zeigte nur ein einziger Klon die gewünschte Bande. Mit diesem Klon wurde nun zusätzlich eine PCR mittels Primerpaar (pBS1C-BC-Clust-r / pBS1C_Seq_r) durchgeführt, um den entsprechenden Übergangsbereich am rechten Clusterende zu amplifizieren. Auch hier zeigte der Klon die gewünschte Bande. Beide Amplifikate wurden zur Bestätigung sequenziert und wiesen hierbei keine Fehler auf. Auch ein Verdau mit EcoRI zeigte alle gewünschten Banden. Das somit erzeugte Konstrukt aus Vektor und Gencluster wurde als pBS1CTR01 bezeichnet.

3.3.3 Transformation in *Bacillus subtilis* 168

Als Zielstamm für die Integration des Genclusters wurde der weit verbreitete Laborstamm *Bacillus subtilis* 168 ausgewählt, welcher durch natürliche Kompetenz mit einfachen Methoden transformierbar ist (Harwood et al. 1990). Die Größe des rekonstruierten Genclusters sollte hierfür kein Hindernis sein – so wurde bereits gezeigt, dass sich ein ganzes Genom von 3,5 mb in diesen Stamm integrieren lässt (Itaya et al. 2005). Der Stamm wurde uns ebenfalls dankenswerterweise von Prof. Dr. Thorsten Mascher zur Verfügung gestellt. Für die Transformation durch natürliche Kompetenz in *Bacillus subtilis* wird die DNA im Voraus üblicherweise linearisiert. Hierfür ist im Vektor pBS1C eine *Scal* Schnittstelle vorgesehen (Radeck et al. 2013). Diese konnte hier jedoch nicht verwendet werden, da sich innerhalb des Genclusters an drei verschiedenen Stellen ebenfalls *Scal* Schnittstellen befinden. Alternativ wurde hier das Enzym *KpnI* ausgewählt. Dieses schneidet an nur einer Stelle innerhalb des pBS1C Vektor-Rückgrats, sodass die für die Integration erforderliche Sequenzreihenfolge erhalten bleibt:

amyE' – Gencluster – *cat* – *amyE*

Die Transformation wurde gemäß der unter (2.3.4) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei wird ein Teil des pBS1C-Vektors inkl. des Genclusters in das Genom des Zielstammes integriert. Für diesen Zweck enthält der Vektor den Anfangsbereich des nicht essentiellen Amylase Gens *amyE* aus *Bacillus subtilis*. In der nachfolgenden MCS ist hier das synthetische Gencluster lokalisiert. Darauf folgt das Resistenzgen für Chloramphenicol zur Selektion in *Bacillus subtilis*. Schließlich folgt der Endbereich des *amyE* Gens. Während des Transformationsprozesses wird die lineare DNA in die *Bacillus subtilis* Zellen aufgenommen und dort direkt in das *amyE* Gen auf der genomischen DNA integriert. Bei diesem Vorgang wird das *amyE* Gen komplett zerstört und ist somit in erfolgreichen Transformaten nicht mehr funktionsfähig.

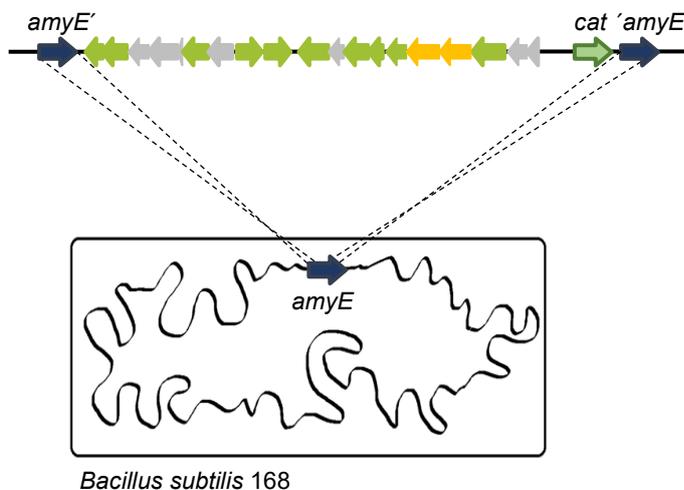


Abbildung 23: Schematische Darstellung der *amyE*-Integration in *Bacillus subtilis*.

Nach Ausplattierung auf LB Cml Platten sind am nächsten Tag 10 Einzelklone angewachsen. Diese wurden in je 5 ml LB Cml Medium über Nacht angezogen und daraus Glycerol-Kulturen zur langfristigen Aufbewahrung bei -80°C angefertigt. Zusätzlich wurden die 10 Klone sowie zwei Kontrollstämme mit aktiver Amylase auf Maisstärke-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden diese Platten mit je 2 ml Iod-Kaliumiodid Lösung nach Lugol (Carl Roth) übergossen. Hierbei sollten Klone mit intaktem *amyE* Gen nach wie vor Stärke abbauen können, was sich in einem hellen Bereich um die Kolonie nach Behandlung mit Lugol'scher Lösung zeigt. Erfolgreiche Transformaten besitzen durch die Integration des Genclusters in das *amyE* Gen keine aktive Amylase mehr und sind somit nicht mehr zur Verstoffwechslung von Stärke befähigt. Diese Klone zeigen daher auch keine hellen Umrandungen auf den Maisstärke-Platten.

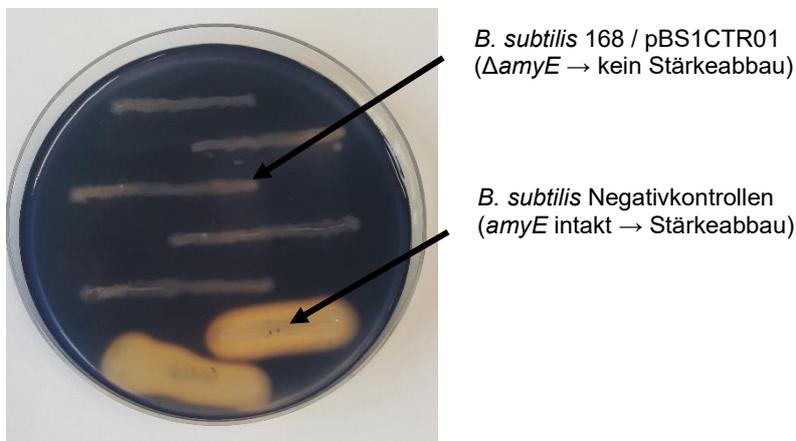


Abbildung 24: Maisstärke-Nachweis mit Lugol'scher Lösung.

In Abbildung 24 sind von oben nach unten 5 der o.g. Transformaten auf einer Maisstärke-Platte nach Behandlung mit Lugol'scher Lösung dargestellt. Die unteren beiden Klone sind Negativkontrollen von *Bacillus subtilis* mit aktivem *amyE* Gen. Man kann deutlich erkennen, dass diese Klone von einer hellen Umrandung umgeben sind, was bei den oberen 5 Klonen nicht der Fall ist. Somit kann mit diesem Test ein simpler Nachweis auf erfolgreiche *amyE*-Integration durchgeführt werden. Von den 10 untersuchten Transformaten zeigten 9 Klone keinen Stärkeabbau mehr – das Gencluster sollte hier also erfolgreich integriert worden sein. Zur Bestätigung wurden von diesen 9 Klonen zusätzlich Colony-PCR-Reaktionen (gemäß 2.3.15) durchgeführt. Hierbei wurden je Klon 3 Primerpaare getestet. Diese sollten am linken Clusterende, in der Mitte des Clusters sowie am rechten Clusterende binden. Von den 9 untersuchten Klonen wiesen 8 Klone positive Signale mit allen 3 Primerpaaren auf. Bei diesen wurde somit das komplette Gencluster in korrekter Weise in den *amyE*-Locus integriert.

3.3.4 Analytische Betrachtung der *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR01 Klone

Um die erfolgreichen Transformanten mit einer geeigneten Negativkontrolle vergleichen zu können, wurde zunächst eine Transformation des pBS1C-Leervektors in *Bacillus subtilis* 168 durchgeführt. Hierzu wurde aus dem Leervektor das rote Fluoreszenzprotein durch Verdau mittels XbaI und SpeI ausgeschnitten und der Vektor anschließend religiert. Nach Verifikation durch PCR und Restriktionsverdau wurde dieser als „pBS1C-[]“ bezeichnete Vektor mittels KpnI linearisiert und analog zur bereits beschriebenen Methode transformiert. Es resultierten hierbei zahlreiche Transformanten. Zehn davon wurden mittels Maisstärke-Test und Colony-PCR untersucht: Alle zeigten keinen Stärkeabbau mehr und lieferten korrekte Banden in der PCR-Reaktion. Die zehn Klone waren somit allesamt korrekte Transformanten des pBS1C-[] Leervektors. Zur analytischen Untersuchung wurden je drei Klone von *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR01 sowie von *Bacillus subtilis* 168 / pBS1C-[] untersucht. Die Kultivierung erfolgte gemäß (2.2.2). Für die Vorkulturen wurde LB Cml Medium verwendet, die Hauptkulturen bestanden aus P-Medium (ohne Antibiotikum) und wurden für 48h inkubiert. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß (2.4.1) „Vorbereitung der Kulturüberstände“. Es wurden hier also keine Extraktionen durchgeführt, sondern die reinen (mehrfach abzentrifugierten) Kulturüberstände der Hauptkulturen untersucht. Die HPLC-Analytik erfolgte gemäß (2.4.2) unter Verwendung von Methode 1. Zu späteren Zeitpunkten wurden diese Proben auch mittels Methode 3 analysiert. Leider konnten in allen Fällen keine neuen Peaks gefunden werden. Das ernüchternde Fazit lautete zu diesem Zeitpunkt somit folgendermaßen:

Das mit großem Aufwand vollsynthetisch rekonstruierte Gencluster führte auch nach Integration in den Stamm Bacillus subtilis zu keiner messbaren Produktion von Sekundärmetaboliten.

3.4 Aktivierung des Genclusters durch Austausch der Promotoren

3.4.1 Betrachtung der Transkription mittels RT-PCR

Um sicherzustellen, dass die Gene des Clusters auch tatsächlich transkribiert wurden, sollte zunächst eine RT-PCR durchgeführt werden. Dabei werden die zu untersuchenden Klone in Flüssigmedium kultiviert und nach einer bestimmten Wachstumszeit geerntet. Aus den Zellen wird nun die vollständige RNA isoliert. Diese RNA sollte neben der rRNA und der tRNA auch die mRNA der transkribierten Gene enthalten. Da RNA für eine PCR-Reaktion nicht zugänglich ist, wird die gesamte RNA mittels reverser Transkriptase in komplementär DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA kann nun mit gewünschten Primerpaaren als Template für PCR-Reaktionen verwendet werden. Sollten hierbei die gewünschten Banden amplifiziert werden, spricht dies für das Vorhandensein der entsprechenden mRNA und somit für eine aktive Transkription. Sofern hier jedoch keine Banden erhalten werden, kann dies durch Abwesenheit der entsprechenden mRNA aufgrund mangelnder Transkription erklärt werden. Für die RNA-Isolierung wurde einer der 8 positiv analysierten *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR01 Klone verwendet. Dieser Klon wurde in 100 ml LB Cml Medium für 17 h bei 200 rpm und 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung aus insgesamt 6 ml Kultur entsprechend des unter (2.3.13) dargestellten Protokolls. Die erhaltene RNA wurde mittels NanoDrop 1000 quantifiziert und insgesamt 1.170 ng RNA in cDNA umgeschrieben (gemäß 2.3.14). Anschließend wurde sowohl mit der cDNA als auch mit der RNA (als Negativkontrolle) eine PCR-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden 5 Primerpaare aus dem Gencluster abgeleitet. Als Positivkontrolle wurde ein zusätzliches Primerpaar aus dem *cat* Gen des Vektor-Rückgrats verwendet, welches für die Chloramphenicol Resistenz in *Bacillus subtilis* verantwortlich ist. Zudem wurde ein weiteres Primerpaar aus dem *gapA* Gen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) abgeleitet, welches als Beispiel eines konstitutiv exprimierten Gens des Primärmetabolismus von *Bacillus subtilis* 168 eine weitere sinnvolle Ergänzung als Positivkontrolle darstellte.



Abbildung 25: Darstellung des Genclusters mit den Primerpaaren für die RT-PCR.

Abbildung 25 zeigt schematisch den Ausschnitt des integrierten Genclusters im Genom von *Bacillus subtilis* 168. Die Positionen der Primerpaare für die RT-PCR sind mit den Ziffern 1-5 gekennzeichnet und für die beiden Positivkontrollen mit den Abkürzungen *cat* bzw. *gapA*. Die erwarteten Größen der 7 Amplifikate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Primerpaar	Amplifikat
1	462 bp
2	557 bp
3	427 bp
4	398 bp
5	430 bp
<i>cat</i>	434 bp
<i>gapA</i>	554 bp

Tabelle 26: Amplifikatgrößen der 7 eingesetzten Primerpaare bei der RT-PCR.

Für die RT-PCR wurde nun cDNA als Template für PCR-Reaktionen mit allen 7 Primerpaaren verwendet. Als Negativkontrolle wurden dieselben PCR-Reaktionen zusätzlich mit der reinen RNA durchgeführt. Hierbei zeigten sich erwartungsgemäß keine bis allenfalls sehr schwache Amplifikate. Etwaige Banden in den Reaktionsansätzen mit cDNA konnten also nicht von der RNA *per se* bzw. von verschleppter genomischer DNA aus dem Isolierungsvorgang stammen.

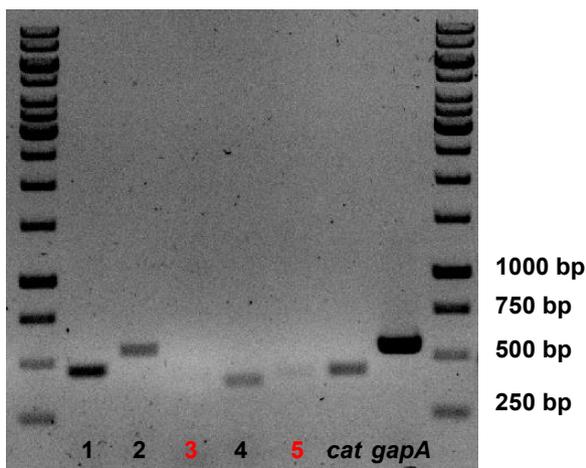


Abbildung 26: Ergebnis der RT-PCR mit allen 7 Primerpaaren.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis der RT-PCR dargestellt. Als Template wurde jeweils 1 μ l cDNA verwendet (dies entsprach einer umgeschriebenen RNA Menge von 58,5 ng). Von den 50 μ l PCR-Ansätzen wurden je 10 μ l auf das Gel aufgetragen. Auf dem Bild ist gut zu erkennen, dass bei den Positivkontrollen deutliche Banden entstanden sind. Wie zu erwarten, waren die beiden Gene *cat* und *gapA* somit transkriptionell aktiv. Bei den Primerpaaren des Genclusters fällt das Ergebnis heterogen aus. An den Positionen 1, 2 und 4 sind deutliche Banden entstanden. Von diesen 3 Positionen müssten demnach Transkripte gebildet worden sein. Im Gegensatz dazu sind an den Positionen 3 und 5 keine oder allenfalls sehr schwache Banden entstanden. Dies lässt den Schluss zu, dass hier offenbar keine Transkripte gebildet wurden.

Zusammenfassend ließ sich nach Auswertung der RT-PCR Ergebnisse Folgendes feststellen:

Das Gencluster schien offenbar nur in bestimmten Teilen transkriptionell aktiv zu sein. Eine Produktion von Sekundärmetaboliten war mit diesem teils stillen Gencluster nicht zu erwarten.

3.4.2 Aktivierung durch Integration von Promotoraustauschkassetten

3.4.2.1 Mögliche Positionen von Promotoren

Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht des integrierten Genclusters inklusive Durchnummerierung aller darin enthaltener Gene. Zusätzlich sind mögliche Positionen von Promotoren und eines Terminators durch entsprechende Pfeile bzw. durch ein Haarnadelsymbol dargestellt:

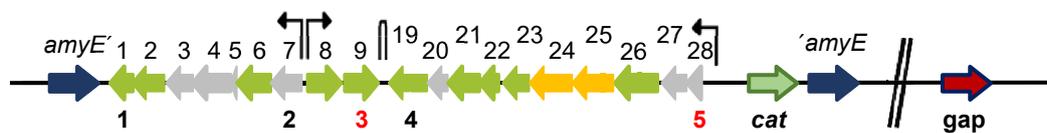


Abbildung 27: Darstellung möglicher Positionen von Promotoren und eines Terminators.

Allein durch die Betrachtung der genetischen Organisation des Genclusters lassen sich mögliche Positionen für Promotoren und Terminatoren lokalisieren. Führt man diese Betrachtung mit dem synthetisch rekonstruierten Gencluster aus (siehe Abbildung 27), kann bereits aufgrund der gegenläufigen Orientierung der Gene 7 und 8 auf einen dazwischen liegenden bidirektionalen Promotor geschlossen werden. Ebenso lässt die aufeinander zulaufenden Orientierung der Gene 9 und 19 einen zwischen diesen beiden Genen liegenden Terminator vermuten (dies wird zudem dadurch unterstützt, dass dieser Bereich schon während der Rekonstruktion aufgrund einer Haarnadelstruktur sehr schwer zu handhaben war). Darüber hinaus muss auf der rechten Seite des Clusters vor den gleichgerichteten Genen 28-19 ein unidirektionaler Promotor liegen. Bei der RT-PCR wurde gezeigt, dass die Positionen 3 und 5 (in Abbildung 27 rot dargestellt) nicht amplifizierbar waren. Diese beiden Positionen schienen folglich transkriptionell inaktiv zu sein. Da die Positionen 1 und 2 starke Banden lieferten, kann daraus gefolgert werden, dass der linke Teil des bidirektionalen Promotors (zwischen Gen 7 und 8) aktiv ist und genügend Transkript gebildet wurde. Im Gegensatz dazu scheint der rechte Teil dieses bidirektionalen Promotors nicht aktiv zu sein, da Position 3 keine Bande lieferte. Gleiches gilt für den unidirektionalen Promotor vor Gen 28. Dieser scheint ebenfalls inaktiv zu sein, da Position 5 nicht amplifizierbar war. Interessanterweise konnte dagegen Position 4 amplifiziert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein weiterer aktiver Promotor in einem der intergenischen Bereiche zwischen den Genen 28 und 19 lokalisiert sein muss. Aufgrund der reinen

Genorientierung kann dieser allerdings nicht genauer lokalisiert werden. Aus diesen Erkenntnissen wurde nun der Schluss gezogen, dass durch Austausch lediglich zweier Promotorbereiche das gesamte Gencluster transkriptionell aktiviert werden könnte. Um den Einfluss von Regulatoren möglichst vollständig auszuschalten, schien es darüber hinaus sinnvoll, auch den aktiven linken Teil des bidirektionalen Promotors komplett zu ersetzen. Somit sollte das Gencluster durch Integration eines bidirektionalen Promotors zwischen den Genen 7 und 8 sowie eines unidirektionalen Promotors vor Gen 28 aktiviert werden. Hierfür sollten für alle drei Positionen möglichst starke, konstitutiv aktive Promotoren für *Bacillus subtilis* verwendet werden.

3.4.2.2 Entwurf zweier Promotoraustauschkassetten

Im Jahr 2016 wurde eine „Toolbox“ mit verschiedenen Promotoren, ribosomalen Bindestellen (RBS) und weiteren Elementen publiziert, mit welcher die Regulation von Genen in *Bacillus subtilis* beeinflusst werden kann (Guiziou et al. 2016). Aus den darin beschriebenen Komponenten wurden zwei Promotoraustauschkassetten in Form von gBlocks® erstellt, welche via Red/ET-Rekombination in das inaktive Konstrukt pBS1CTR01 integriert werden sollten. In der genannten Toolbox wurden unterschiedlich starke Promotoren auf Basis der drei Grund-Promotoren P_{veg} , P_{serA} und P_{ymdA} veröffentlicht (Guiziou et al. 2016). Zusätzlich werden verschiedene ribosomale Bindestellen miteinander verglichen und ihr Einfluss auf die Genexpression unter gleichen Bedingungen untersucht. Für den Entwurf der Austauschkassetten wurden von jedem der drei Grund-Promotoren die jeweils stärkste Version verwendet (P_{veg} , PS1 und PY2). Ebenso wurden mit R0, R1 und R2-1 die drei stärksten RBS für die Kassetten ausgewählt. Zwischen Promotor und RBS wurde stets dieselbe Standardsequenz als Transkriptionsstart eingefügt. Für die Selektion der Austauschkassetten wurden diese um die Resistenzgene *aac3(IV)* ($Apra^R$) bzw. *aadA* ($Strep^R$) ergänzt. Die Resistenzgene wurden dabei mit Restriktionsenzymen flankiert, um ein anschließendes Ausschneiden zu ermöglichen. In Abbildung 28 sind die beiden Promotoraustauschkassetten schematisch dargestellt. Die Integration beider Kassetten sollte in *E. coli* mittels Red/ET-Rekombination in den Vektor pBS1CTR01 erfolgen.

3.4.2.3 Integration der Promotoraustauschkassetten via Red/ET-Rekombination

Die kompletten Sequenzen der beiden Kassetten sind unter (2.1.8) mit den Bezeichnungen „BS_1promcas_01“ bzw. „BS_2promcas_01“ aufgeführt. Beide Kassetten wurden wiederum in Form von synthetischen gBlocks® bei IDT bestellt und nach Rekonstitution zunächst mit folgenden überhängenden Primerpaaren unter Verwendung der Q5-Polymerase amplifiziert:

- (BS_1promcas01_long_f / BS_1promcas01_long_r) bzw.
- (BS_2promcas01_long_f / BS_2promcas01_long_r)

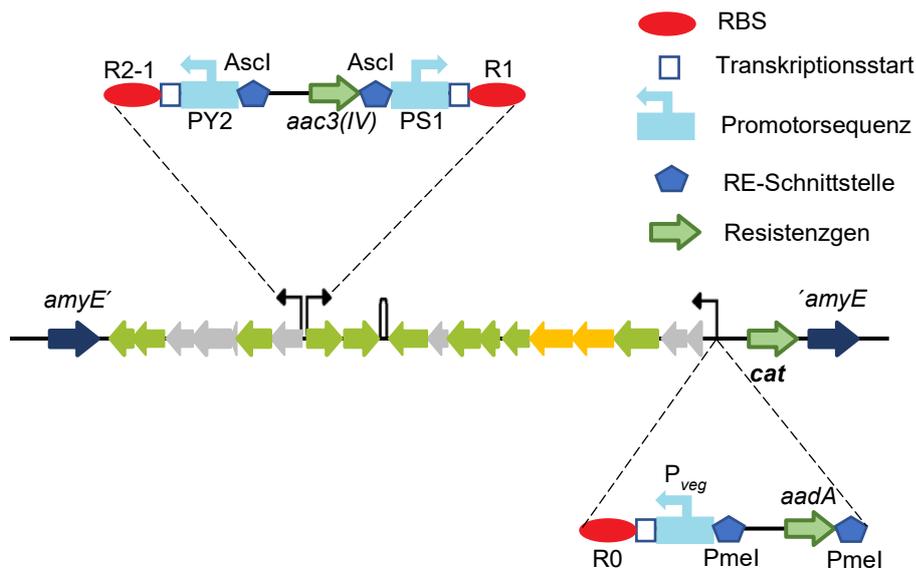


Abbildung 28: Schematische Darstellung der beiden Promotoraustauschkassetten.

Mit den Überhängen dieser Primer wurden beidseitig der Kassetten je 39 bp der DNA-Bereiche angehängt, zwischen welche die Kassetten integriert werden sollten. Also für die bidirektionale Kassetten die ersten 39 Basen von Gen 7 bzw. von Gen 8 und für die unidirektionale Kassetten die ersten 39 Basen von Gen 28 sowie die ersten 39 Basen des pBS1C Vektors, die auf das Gencluster folgen. Die intergenischen Bereiche sollten an den betreffenden Stellen durch Integration der Kassetten vollständig entfernt werden. Für den Integrationsprozess wurde der Vektor pBS1CTR01 zur Red/ET-Rekombination in *E. coli* BW25113 / pIJ790 transformiert und gemäß dem unter (2.3.17) dargestellten Protokoll zunächst die bidirektionale Promotoraustauschkassetten durch Selektion mit Apramycin eingebracht. Das resultierende Konstrukt wurde als pBS1CTR02-Apra bezeichnet. Zur Überprüfung wurden die Klone mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars (BS_2prom_f / BS_2prom_r) analysiert. Hierbei zeigten ~20% der untersuchten Klone das gewünschte Amplifikat. Anschließend wurden die Plasmide mehrerer korrekt analysierter Klone in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die entsprechenden Transformanten wurden anschließend wiederum mittels PCR und Restriktionsverdau untersucht. Drei der korrekten Konstrukte wurden, um das Apramycin Resistenzgen auszuschneiden, mittels *Ascl* verdaut und im Anschluss wieder religiert. Das Ligationsprodukt wurde als pBS1CTR02 bezeichnet und erneut in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Von den Transformanten wurden mehrere Klone mittels PCR und Restriktionsverdau analysiert. Schließlich wurde von einem der Klone, welcher alle erwarteten Bandengrößen zeigte, zusätzlich eine Sequenzierung des veränderten Bereichs mit den Primern (BS_2prom_f und BS_2prom_r) durchgeführt. Nach Bestätigung der Sequenz wurde dieser Klon (*E. coli* XL1-Blue / pBS1CTR02) weiterverwendet und für die Integration der unidirektionalen Promotoraustauschkassetten erneut in *E. coli*

BW25113 / pIJ790 transformiert. Nun wurde unter Verwendung des Selektionsantibiotikums Streptomycin und des Restriktionsenzym PmeI dasselbe Verfahren erneut angewandt. Das Zwischenkonstrukt mit noch enthaltenem Resistenzgen wurde mit pBS1CTR03-SpecStrep bezeichnet. Nach Ausschneiden des Resistenzgens und anschließender Religation wurde das finale Konstrukt pBS1CTR03 erhalten. Am Ende wurde ein Klon (*E. coli* XL1-Blue / pBS1CTR03) identifiziert, der alle erwarteten Banden lieferte. Dieser wurde im veränderten Bereich mit den Primern (BS_1prom_f und BS_1prom_r) zur finalen Bestätigung sequenziert.

3.4.2.4 Erneute Transformation in *Bacillus subtilis* 168

Im nächsten Schritt sollte nun der Vektor pBS1CTR03 in *Bacillus subtilis* 168 transformiert werden. Nachdem dieser Vektor die beiden Promotoraustauschkassetten enthält, müsste als Folge auch die Genexpression in allen Bereichen des Clusters aktiv sein. Nach Linearisierung mittels KpnI erfolgte die Transformation (gemäß 2.3.4). Zur Selektion wurde auf LB Cml Platten ausplattiert. Am nächsten Tag zeigten sich einige Transformanten. Davon wurden 50 Klone auf Maisstärke-Platten umgestrichen und auf ihre Fähigkeit zum Stärkeabbau untersucht. Von den 50 Klonen zeigte jedoch nur ein Klon (als „Klon 6“ bezeichnet) den Verlust des Stärkeabbaus. Alle anderen Klone waren beim Stärketest von einer hellen Zone umgeben und somit weiterhin zum Abbau von Stärke befähigt. Hier lag also keine korrekte Integration in das *amyE* Gen vor. Zur weiteren Untersuchung wurde Klon 6 (ohne Stärkeabbau) und 9 weitere Klone (mit Stärkeabbau) mittels Colony-PCR (gemäß 2.3.15) unter Verwendung von Primerpaaren aus den Bereichen des linken Clusterendes, der bidirektionale Promotoraustauschkassette, der Clustermitte und des rechten Clusterendes untersucht. Der Klon 6 (ohne Stärkeabbau) zeigte in allen 4 Bereichen die erwarteten Amplifikate. Interessanterweise ergaben auch 5 der 9 Klone mit aktivem Stärkeabbau positive Signale mit allen 4 Primerpaaren. Möglicherweise wurde hier das Cluster an einer falschen Stelle in das *Bacillus subtilis* Genom integriert (keiner dieser 5 Klone mit aktivem Stärkeabbau zeigte jedoch im späteren Verlauf eine Produktion von Sekundärmetaboliten). Anschließend wurde von dem einen positiven Klon (*Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR03 Klon 6) eine erneute RT-PCR durchgeführt, um die Transkription nach Integration der Promotoraustauschkassetten zu untersuchen. Die RNA-Isolierung wurde gemäß (2.3.13) durchgeführt. Anschließend erfolgte das Umschreiben in cDNA mittels reverser Transkriptase (gemäß 2.3.14). Für die PCR-Reaktion wurden wieder dieselben 5 Primerpaare sowie die beiden Positivkontrollen verwendet, wie unter (3.4.1) beschrieben. Auch hier wurden die PCR-Reaktionen sowohl mit der cDNA als auch mit der RNA (als Negativkontrolle) durchgeführt. Mit der reinen RNA wurden auch in diesem Fall keine bis schwache Banden erhalten.

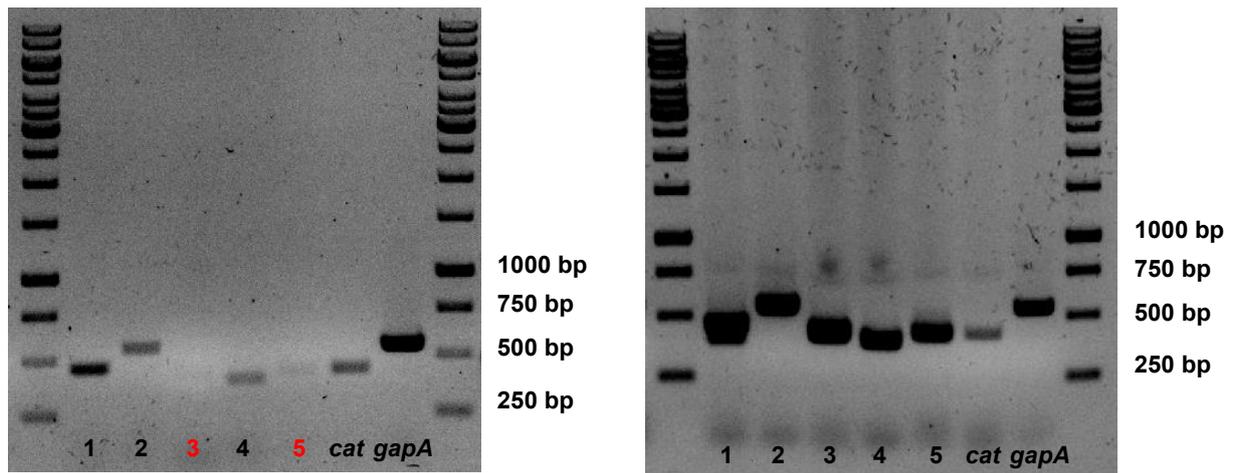


Abbildung 29: Ergebnis der RT-PCR (links: pBS1CTR01, rechts: pBS1CTR03).

In Abbildung 29 ist auf der linken Seite das bereits unter (3.4.1) gezeigte Gelbild des Klons *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR01 dargestellt. Dieser Klon enthält das ursprüngliche Gencluster vor Integration der beiden Promotoraustauschkassetten. Die Positionen 3 und 5 konnten nicht amplifiziert werden und zeigten daher offenbar keine Transkription. Auf der rechten Seite sind nun dieselben Reaktionen mit *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR03 Klon 6 dargestellt. Es fällt sofort ins Auge, dass nun von sämtlichen 5 Genclusterpositionen deutliche Amplifikate gebildet wurden – auch von den bisher nicht amplifizierbaren Positionen 3 und 5. Ebenso zeigten die beiden Positivkontrollen die erwarteten Banden. Die Aktivierung des Genclusters durch Integration der synthetischen Promotoraustauschkassetten war somit in Hinblick auf die Transkription erfolgreich. An dieser Stelle ließ sich zusammenfassend feststellen:

Das Gencluster schien nach Integration der beiden Promotoraustauschkassetten transkriptionell vollständig aktiv zu sein. Eine Produktion von Sekundärmetaboliten wäre daher denkbar.

3.5 Produktion des Antibiotikums FR-900493

3.5.1 Probenvorbereitung

Da bei der Transformation des aktivierten Genclusters lediglich einer der Klone („Klon 6“) eine korrekte Integration aufzeigte (siehe 3.4.2.4), wurde für den Hauptteil der analytischen Untersuchungen dieser eine Klon betrachtet. Als Negativkontrolle wurde stets ein Klon mit integriertem Leervektor sowie ein Klon mit integriertem Gencluster in inaktiver Form (vor Einbringen der Promotoraustauschkassetten) verwendet. Da diese beiden Negativkontrollen durchgehend identische Chromatogramme ergaben, wird im Weiteren nur eine Negativkontrolle in Form des Klons mit integriertem Leervektor aufgeführt. Neben „Klon 6“ und der Negativkontrolle wird stets noch ein qualitativer FR-900493 Standard gegenübergestellt, sodass in den analytischen Betrachtungen insgesamt folgende 3 Proben miteinander verglichen werden:

- *Bacillus subtilis* 168 / pBS1C-[] (Negativkontrolle)
- *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR03 (Klon 6: enthält aktiviertes Gencluster)
- FR-900493 (qualitativer Standard)

Besagter „Klon 6“ trägt den pBS1CTR03 Vektor im *amyE*-Locus integriert. Auf diesem Vektor befindet sich das mit beiden Promotoraustauschkassetten aktivierte Gencluster. Der Klon zeigte den Verlust des Stärkeabbaus ($\Delta amyE$) und lieferte positive Signale in der Colony-PCR mit Primerpaaren aus 4 verschiedenen Bereichen des Genclusters. Zusätzlich wurde von diesem Klon die transkriptionelle Aktivität des integrierten Genclusters mittels RT-PCR nachgewiesen (siehe 3.4.2.4). Als Vergleichssubstanz diente FR-900493, welches auf chemisch-synthetischem Wege hergestellt wurde. Dieser qualitative Standard wurde uns dankenswerterweise von Prof. Dr. Satoshi Ichikawa (Universität Hokkaido, Japan) für die Vergleiche zur Verfügung gestellt. Die übermittelte Menge des Standards war uns allerdings unbekannt und per Wägung nicht feststellbar, sodass er nicht für Quantifizierungen verwendet werden konnte. Um die Produktion von Sekundärmetaboliten nachzuweisen, wurden die beiden untersuchten Klone gemäß (2.2.2) kultiviert. Die Vorkulturen enthielten hier stets LB Cml Medium. Für die Hauptkulturen wurde entweder LB-Medium (LB-HK), FR-Produktionsmedium (FR-HK) oder P-Medium (P-HK) ohne Antibiotikazugabe verwendet. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß (2.4.1) „Vorbereitung der Kulturüberstände“. Da die produzierten Sekundärmetabolite mit den hier ebenfalls beschriebenen Extraktionsversuchen mit 1-Butanol bzw. Ethylacetat nicht isoliert werden konnten, bezieht sich sämtliche hier dargestellte Analytik ausschließlich auf die mehrfach abzentrifugierten Überstände der Hauptkulturen nach 45 h Inkubation. In den Hauptkulturen mit FR-Produktionsmedium konnte mit keiner der eingesetzten Methoden eine zufriedenstellende Peakauftrennung erzielt werden. Dieses Medium enthält offenbar *per se* eine Vielzahl an UV-aktiven Komponenten und eignet sich daher nicht für Untersuchungen der reinen Kulturüberstände. Bei Verwendung dieses speziellen Produktionsmediums müssten die

zu untersuchenden Kulturen zunächst einem geeigneten Extraktionsverfahren unterzogen werden. Ein solches Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht entwickelt.

Bei der Transformation des aktivierten Genclusters in *Bacillus subtilis* wurden neben dem bereits erwähnten „Klon 6“ noch weitere Transformanten erhalten, die zwar keinen Verlust des Stärkeabbaus zeigten, jedoch positive Signale bei der Colony-PCR lieferten. Mehrere dieser Klone wurden analytisch untersucht – keiner davon zeigte eine Produktion von Sekundärmetaboliten. Die Chromatogramme dieser Klone unterschieden sich nicht von denen der Negativkontrollen (Daten nicht gezeigt). Daher wird auf diese Klone hier nicht näher eingegangen. Die Integration des Genclusters an einer falschen Stelle innerhalb des Genoms schien zumindest in diesem Fall mit dem vollständigen Verlust der Produktionsfähigkeit einher zu gehen.

3.5.2 Analytische Betrachtung des *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR03 Klons

In ersten Versuchen wurden die LB-Hauptkulturen mittels der Methode 1 (siehe 2.4.2) untersucht. Hierbei konnte keine zufriedenstellende Peakauftrennung erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Aussage, ob „Klon 6“ im Vergleich zur Negativkontrolle neue Peaks aufwies, war damit nicht möglich. In weiteren Versuchen wurden die LB-Hauptkulturen (LB-HK) sowie die P-Hauptkulturen (P-HK) mittels Methode 2 (siehe 2.4.2) analysiert. Da die hierbei verwendete Säule besser für polare Substanzen geeignet war, konnte damit eine teilweise Peakauftrennung erreicht werden. Mit dieser Methode waren bereits Unterschiede zwischen den Proben von „Klon 6“ und der Negativkontrolle sichtbar (Daten nicht gezeigt). Da die Peaks jedoch unsauber getrennt waren, wurde für weitere Untersuchungen eine andere Methode gewählt. Letztendlich wurden die besten Trennleistungen mit Methode 3 erreicht (siehe 2.4.2). Hierbei wurde die Säule Luna[®] Omega Polar C18 (250 mm x 4,6 mm, 3 µm, Phenomenex) eingesetzt – eine RP-18 Säule, die sich aufgrund integrierter polarer Gruppen gut zur Auftrennung polarer Verbindungen eignet. Durch Verwendung einer Korngröße von 3 µm konnte hier auch dadurch die Trennleistung verbessert werden. Methode 3 wurde sowohl mit den Standard-HPLC-Geräten (2.4.2) als auch mit dem HPLC-MS- (2.4.4) sowie dem HPLC-HR-MS-Gerät (2.4.5) eingesetzt. Bei den beiden letztgenannten konnten sowohl UV-Chromatogramme als auch die entsprechenden Massenspektren aufgezeichnet und somit untersucht werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse stammen daher allesamt aus Messungen dieser beiden Analysengeräte.

3.5.2.1 Ergebnisse des Vergleichs der LB-Hauptkulturen

Die folgenden Abbildungen zeigen die UV-Chromatogramme (bei 262 nm) aller 3 miteinander verglichenen Proben gemäß einem einheitlichen Farbschema. Die Messungen wurden mit einem HPLC-MS Gerät (gemäß 2.4.4) durchgeführt. Es konnten somit zusätzlich die jeweiligen Massenspektren zu beliebigen Zeitpunkten ausgewertet und miteinander verglichen werden.

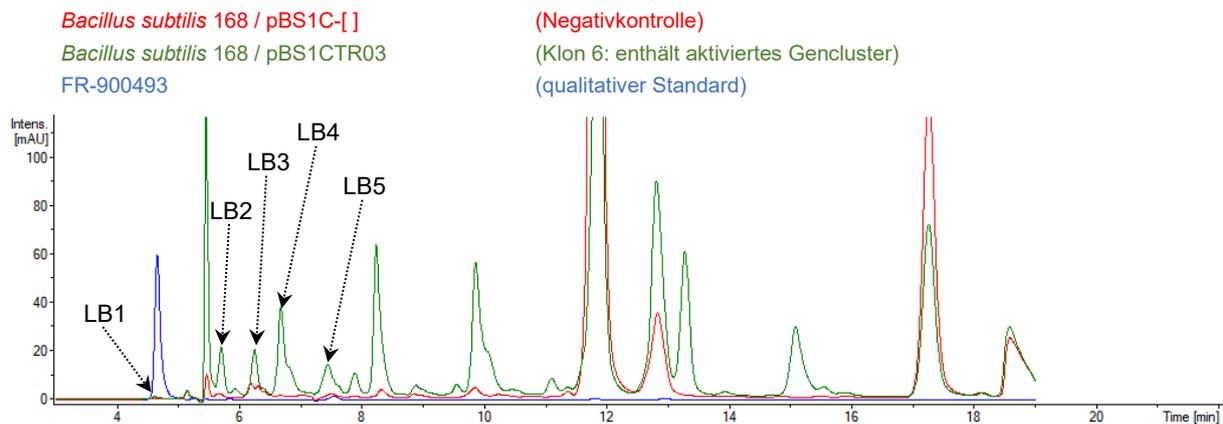


Abbildung 30: UV-Chromatogramme der beiden LB-HK und des FR-900493 Standards.

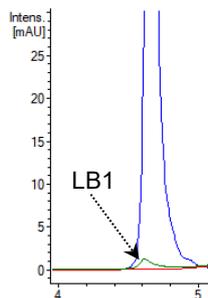


Abbildung 31: Vergrößerte Darstellung von Peak LB1.

Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, weist das UV-Chromatogramm von Klon 6 einige Peaks auf, die in der Negativkontrolle nicht vorhanden sind. Um eine genauere Aussage über diese Peaks treffen zu können, wurden die im selben Lauf aufgezeichneten Massenspektren zu den Zeitpunkten der jeweiligen UV-Peaks betrachtet und mit den Massenspektren der Negativkontrolle zu denselben Zeitpunkten verglichen (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise wurde versucht, den Peaks entsprechende Massen zuzuordnen. Dies war in einigen Fällen möglich. Bei manchen der Peaks konnten allerdings keine „neuen“ Massen gefunden werden. Das kann dadurch erklärt werden, dass bestimmte physiologische Metabolite in Klon 6 zwar stärker produziert wurden als in der Negativkontrolle – hier in geringeren Mengen aber auch vorhanden waren. Da solche Peaks für den Zweck dieser Arbeit nicht interessant sind, wird auf diese hier nicht näher eingegangen. Ein Beispiel hierfür wäre der dominante Peak bei $t = 5,6$ min. Dieser

enthält eine Vielzahl an verschiedenen Massen, die regelmäßige Massen-Abstände zueinander aufweisen und kommt mit geringerer Intensität auch in der Negativkontrolle vor. Da beim Vergleich der beiden Spektren keine neuen Massen für Klon 6 gefunden wurden, wird auf diesen Peak im Weiteren nicht näher eingegangen. Die ebenfalls sehr dominanten Peaks bei $t = 8,3$ min, $t = 9,9$ min, $t = 13,3$ min und $t = 15,1$ min weisen die Massen der Nukleosid-Monophosphate CMP, UMP, AMP und GMP auf. Da diese dem Primärmetabolismus entstammen, sind sie für den Zweck der Arbeit uninteressant und werden somit nicht weiter erläutert.

In nachfolgender Tabelle sind sämtliche Peaks näher beschrieben, denen tatsächlich „neue“ Massen zugeordnet werden konnten. Sie wurden durchgehend von LB1 bis LB5 bezeichnet.

Peak	Retentionszeit [min]	Detektierte Masse [M+H] ⁺	Besonderheit
FR-Std.	4,7	m/z = 520.1	
LB1	4,7	m/z = 520.1	Entspricht in Masse und Retentionszeit exakt dem FR-900493 Standard
LB2	5,7	m/z = 529.0	
LB3	6,2	m/z = 317.8	
LB4	6,7	m/z = 543.0	
LB5	7,4	m/z = 331.9	

Tabelle 27: Peaks mit neuen Massen aus den LB-Hauptkulturen von Klon 6.

Mit Peak LB1 ist hier ein sehr kleiner Peak vorhanden, der dieselbe Retentionszeit sowie exakt dieselbe Masse wie der synthetische FR-900493 Standard aufweist (Abbildung 31 zeigt diesen Peak in einer vergrößerten Darstellung). Zusätzlich sind vier weitere Peaks identifizierbar, denen die in der Tabelle aufgeführten Massen zugeteilt werden konnten (Peak LB1 - Peak LB5).

Fazit: „Klon 6“ zeigte beim Vergleich der LB-Hauptkulturen einen Peak, der in Hinblick auf Retentionszeit und Masse exakt dem FR-900493 Standard entsprach. Darüber hinaus wurden vier weitere Peaks identifiziert, deren Massen in der Negativkontrolle nicht vorhanden waren.

3.5.2.2 Ergebnisse des Vergleichs der P-Hauptkulturen

Analog zu den LB-Hauptkulturen wurden auch entsprechende HPLC-MS Messungen mit den Hauptkulturen des P-Mediums durchgeführt. Darstellung und Auswertung erfolgten hierbei in identischer Weise.

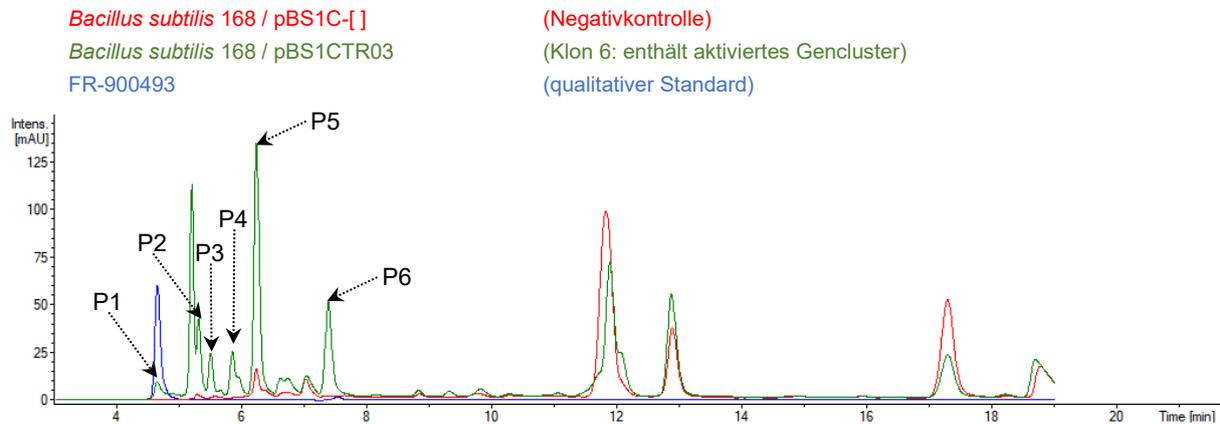


Abbildung 32: UV-Chromatogramme der beiden P-HK und des FR-900493 Standards.

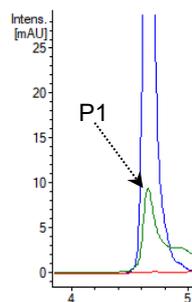


Abbildung 33: Vergrößerte Darstellung von Peak P1.

Auch in den Chromatogrammen der P-Hauptkulturen zeigte Klon 6 gleich mehrere Peaks, die in der Negativkontrolle nicht vorhanden waren und denen sich einzelne Massen zuteilen ließen. Mit Peak P1 ist hier ebenfalls ein Peak vorhanden, der dieselbe Retentionszeit und dieselbe Masse wie der FR-900493 Standard (und somit auch wie Peak LB1) aufweist (Abbildung 33 zeigt eine vergrößerte Darstellung dieses Peaks). Es ist deutlich zu erkennen, dass hier die Intensität höher ist als beim entsprechenden Peak aus dem LB-Medium. Darüber hinaus konnten 5 weitere Peaks identifiziert und mit „neuen“ Massen in Verbindung gebracht werden. Von diesen wiesen die Peaks P2, P3 und P4 Massen auf, die in den LB-Hauptkulturen nicht gefunden wurden. Für die beiden Peaks P5 und P6 wurden dagegen auch entsprechende Peaks im LB-Medium bei gleicher Retentionszeit und Masse identifiziert (LB3 und LB5). Mit den beiden Peaks LB2 und LB4 existieren aber auch zwei Peaks, die zwar im LB-Medium, nicht jedoch im P-Medium identifiziert werden konnten. Es scheinen hier also durchaus Unterschiede

zwischen den verschiedenen Kultivierungsmedien zu bestehen. Was die weiteren Peaks betrifft, konnte auch hier ein Peak bei $t = 5,2$ min gefunden werden, der eine große Anzahl an verschiedenen Massen mit regelmäßigen Massen-Abständen enthält. Ein solcher Peak wurde bereits im LB-Medium beschrieben (siehe 3.5.2.1). Da dieselben Massen ebenfalls in der Negativkontrolle (bei geringeren Intensitäten) zu finden waren, scheidet dieser Peak aus den weiteren Betrachtungen aus. Interessanterweise wurden im P-Medium keine Peaks gefunden, die den bereits erwähnten Nukleosid-Monophosphat Peaks aus dem LB-Medium entsprechen.

In folgender Tabelle werden die Peaks aus dem P-Medium näher beschrieben, denen „neue“ Massen zugeordnet werden konnten. Sie wurden durchgehend von P1 bis P6 bezeichnet.

Peak	Retentionszeit [min]	Detektierte Masse [M+H] ⁺	Besonderheit
FR-Std.	4,7	m/z = 520.1	
P1	4,7	m/z = 520.1	Entspricht in Masse und Retentionszeit exakt dem FR-900493 Standard (sowie Peak LB1)
P2	5,3	m/z = 449.0	
P3	5,5	m/z = 389.0	
P4	5,9	m/z = 463.1	
P5	6,2	m/z = 317.8	Entspricht Peak LB-3
P6	7,4	m/z = 331.9	Entspricht Peak LB-5

Tabelle 28: Peaks mit neuen Massen aus den P-Hauptkulturen von Klon 6.

Fazit: „Klon 6“ zeigte auch beim Vergleich der P-Hauptkulturen einen Peak, der exakt die Retentionszeit des FR-900493 Standards sowie dessen Masse aufwies. Zusätzlich waren weitere Peaks vorhanden, die sich teilweise mit den Peaks aus den LB-Hauptkulturen deckten, teilweise aber auch davon abwichen. Da in beiden Medien nun Peaks gefunden wurden, die dem Standard des Antibiotikums FR-900493 entsprachen, konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass das integrierte Gencluster tatsächlich zu dessen Biosynthese befähigt. Die weiteren Peaks könnten möglicherweise biosynthetische Zwischenstufen von FR-900493 enthalten.

3.5.3 Aufreinigung der Peaks und Bestätigung der Massen

Um die Massen der o.g. Peaks zu bestätigen, sollten diese für weitere Messungen zunächst aufkonzentriert und gereinigt werden. Hierzu wurden die Proben aus LB- und P-Hauptkultur in mehreren HPLC-Läufen aufgetrennt und die entsprechenden Peaks mittels automatischem Fraktionssammler aufgesammelt. Die genaue Vorgehensweise ist unter (2.4.3) aufgeführt. Für die LB-Peaks erfolgte zunächst eine grobe Auftrennung mittels der semipräparativen

Nucleodur PolarTec Säule unter Verwendung von Methode 2. In einem zweiten Schritt wurden die Vorfraktionen mittels Methode 3 vollständig aufgetrennt. Für die P-Peaks wurde auf eine Vorfraktionierung verzichtet und stattdessen zwei aufeinanderfolgende Auftrennungen nach Methode 3 durchgeführt. Die auf diese Weise aufgereinigten Peaks aus LB- und P-Medium wurden anschließend in je 250 μl H_2O gelöst und davon je 10 μl mittels Methode 3 via HPLC-MS erneut vermessen (siehe 2.4.4). Die aufgereinigten Peaks sollten hierbei nun saubere Ergebnisse liefern und bestätigen, ob die zuvor festgestellten Massen tatsächlich enthalten sind.

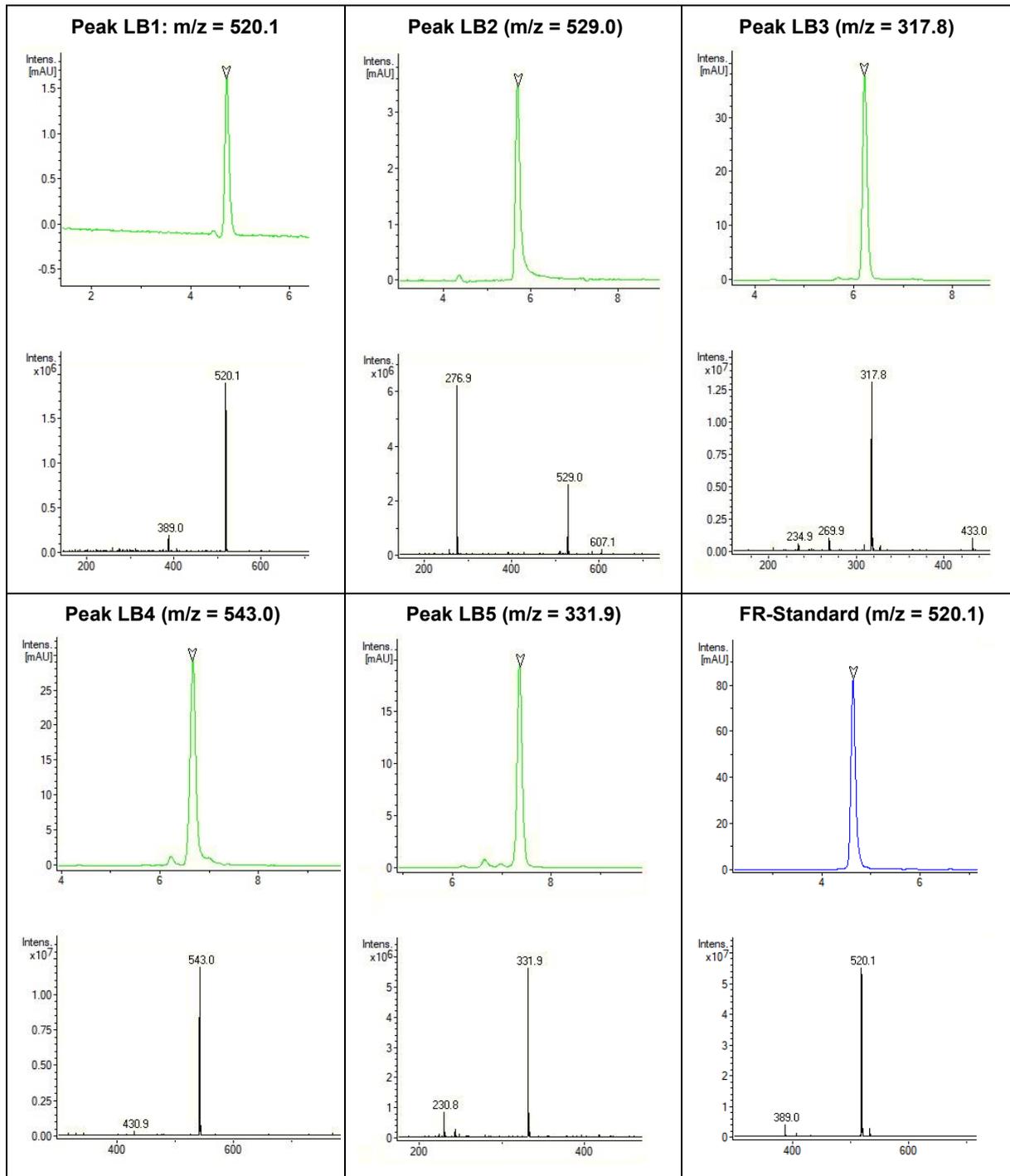


Abbildung 34: UV-Chromatogramme + Massenspektren $[\text{M}+\text{H}]^+$ der LB-Peaks.

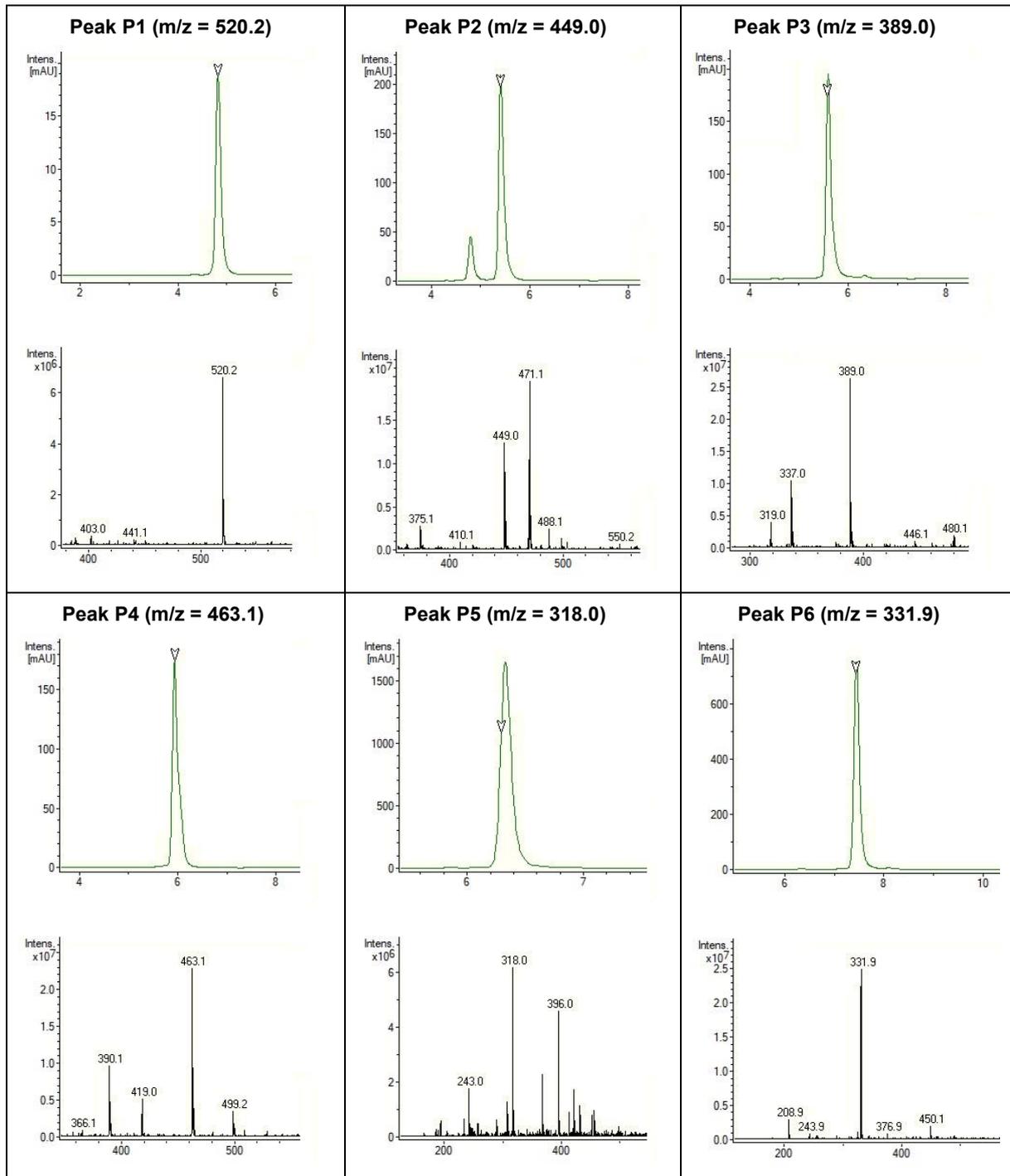


Abbildung 35: UV-Chromatogramme + Massenspektren $[M+H]^+$ der P-Peaks.

Die Abbildungen 34 und 35 zeigen die UV-Chromatogramme sowie die zugehörigen Massenspektren $[M+H]^+$ der aufgereinigten Peaks sowie des FR-900493-Standards. Es ist deutlich erkennbar, dass diese nun in den meisten Fällen soweit aufgereinigt werden konnten, dass jetzt saubere, diskrete Peaks in den UV-Chromatogrammen erkennbar waren. Die entsprechenden Massenspektren dieser Peaks bestätigten zudem die bereits beschriebenen Massen aus den Chromatogrammen der Kulturüberstände. Darüber hinaus konnte hierbei festgestellt werden, dass die LB-Peaks insgesamt deutlich „sauberer“ erschienen als die P-Peaks.

3.5.4 Strukturaufklärung mittels hochauflösender Massenspektrometrie

Um zu bestätigen, dass es sich bei den Peaks LB1 bzw. P1 tatsächlich um die Substanz FR-900493 handelt, sollten Messungen mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (inkl. MS²-Fragmentierung) vorgenommen werden. Als Vergleichssubstanz wurde der FR-Standard verwendet. Daneben sollten auch die anderen Peaks untersucht werden, um dadurch eine Aussage über deren mögliche Struktur treffen zu können. Da bei den Peaks, die sowohl im LB- als auch im P-Medium gefunden wurden (LB1+P1, LB3+P5, LB5+P6), deutliche Unterschiede in der Reinheit bestanden, wurden für diese Messungen die jeweils reinsten Peaks verwendet. Dies waren in allen drei Fällen die Peaks aus dem LB-Medium. Für die Messungen wurden erneut die mittels HPLC-Fraktionssammler aufgesammelten Proben verwendet (siehe 3.5.3). Die Methode und die eingesetzten Geräte sind unter (2.4.5) genauer beschrieben. Auf folgenden Seiten sind die Ergebnisse dieser Messungen in separaten Abbildungen dargestellt. Im oberen Bereich ist stets das Massenspektrum zur Zeit der UV-Peaks abgebildet. Der untere Bereich zeigt die MS²-Fragmentierungen der gesuchten Massen im positiven Modus [M+H]⁺.

Probe	m/z (gemessen)	m/z (berechnet)	Summenformel	Error [ppm]
FR-Standard	520.2251	520.2249	C ₂₀ H ₃₄ N ₅ O ₁₁	0,4
Peak LB1	520.2256	520.2249	C ₂₀ H ₃₄ N ₅ O ₁₁	1,3

Tabelle 29: Gegenüberstellung der Massen [M+H]⁺ von FR-Standard und Peak LB1.

Der Vergleich aus berechneter Masse von FR-900493 [M+H]⁺ mit den gemessenen Werten von Peak LB1 und dem FR-Standard lieferte identische Werte. Die Abweichungen sind mit 0,4 bzw. 1,3 ppm zu vernachlässigen. Auch beim Vergleich der Fragmentierungsmuster zeigten sich zwischen Peak LB1 und dem FR-Standard exakt dieselben Fragmente. Wie bereits aus Fragmentierungen des Caprazamycins bekannt war (Kaysser et al. 2009), weist das ADR-GlyU Gerüst zwei charakteristische Abspaltungen auf: Zum einen den Verlust der Aminoribose (Massenverlust: 131 Da) und zum anderen den Verlust der Uracil-Struktur (Massenverlust: 112 Da). Die beiden Hauptfragmente in den MS²-Spektren von Peak LB1 und dem Standard zeigen genau diese beiden Abspaltungen. Zunächst erfolgt die Abspaltung der Aminoribose zu Fragment 1 (m/z = 389.17) und anschließend die Abspaltung der Uracil-Struktur zu Fragment 2 (m/z = 277.14). Die kleineren Peaks bei m/z = 372.14 bzw. bei m/z = 260.11 lassen sich durch Abspaltungen der endständigen Aminogruppe des Aminopropyl-Rests von Fragment 1 bzw. Fragment 2 erklären. Der Peak bei m/z = 332.11 lässt sich durch Abspaltung des gesamten Aminopropyl-Rests ausgehend von Fragment 1 erklären. Alle genannten Massen sind sowohl bei Peak LB1, als auch im FR-Standard in vergleichbaren Relationen vorhanden und entsprechen sich bis in die 3. Nachkommastelle. Eine solch starke Übereinstimmung lässt sich nur dadurch erklären, dass es sich hierbei tatsächlich um identische Substanzen handelt.

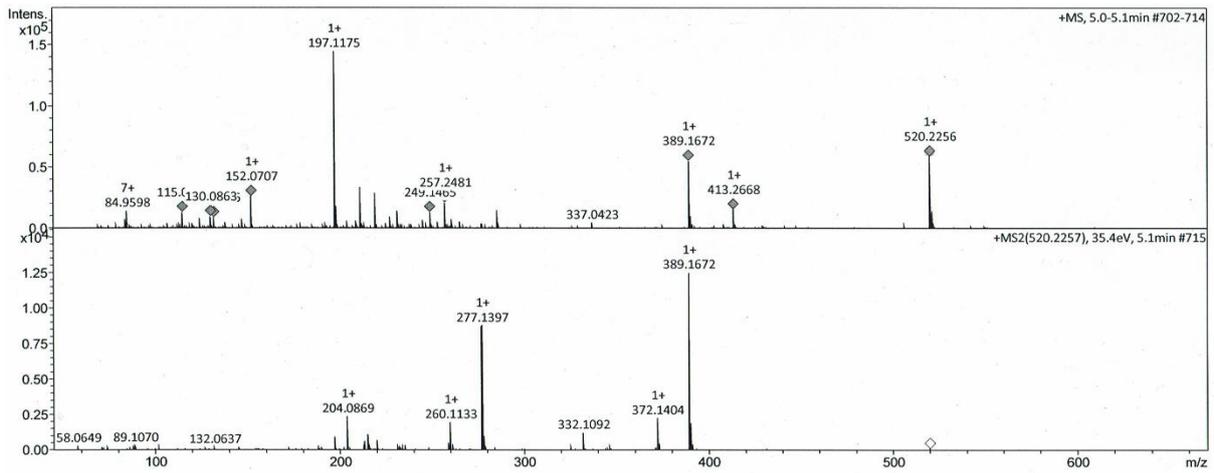


Abbildung 36: Peak LB-1 (Fragmentierte Masse: $m/z = 520.2257 [M+H]^+$).

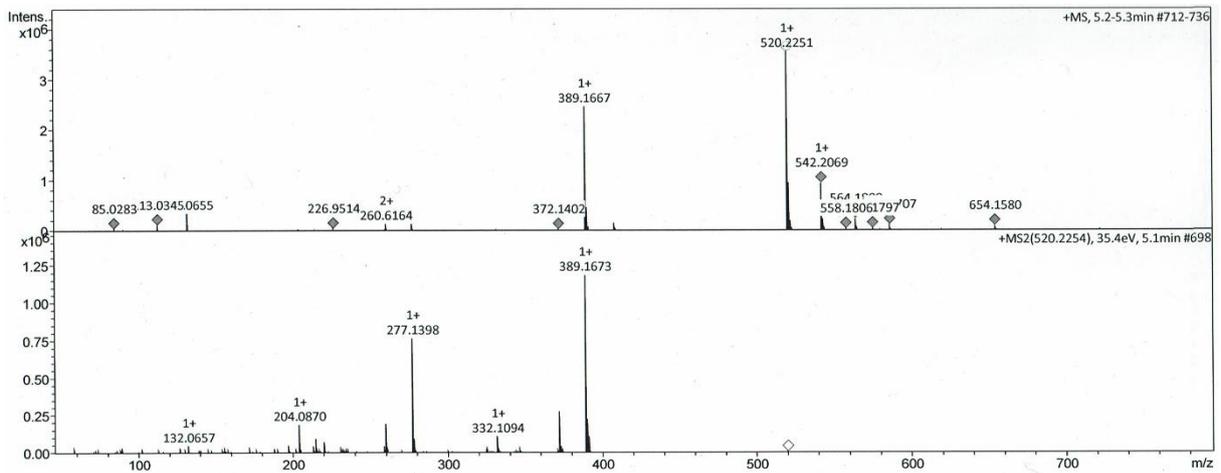


Abbildung 37: FR-900493 Standard (Fragmentierte Masse: $m/z = 520.2254 [M+H]^+$).

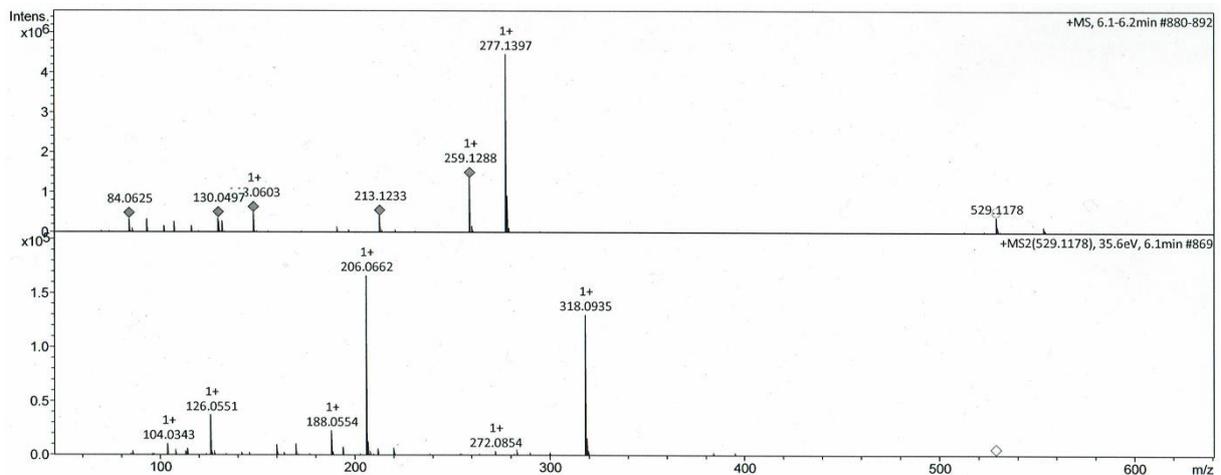


Abbildung 38: Peak LB-2 (Fragmentierte Masse: $m/z = 529.1178 [M+H]^+$).

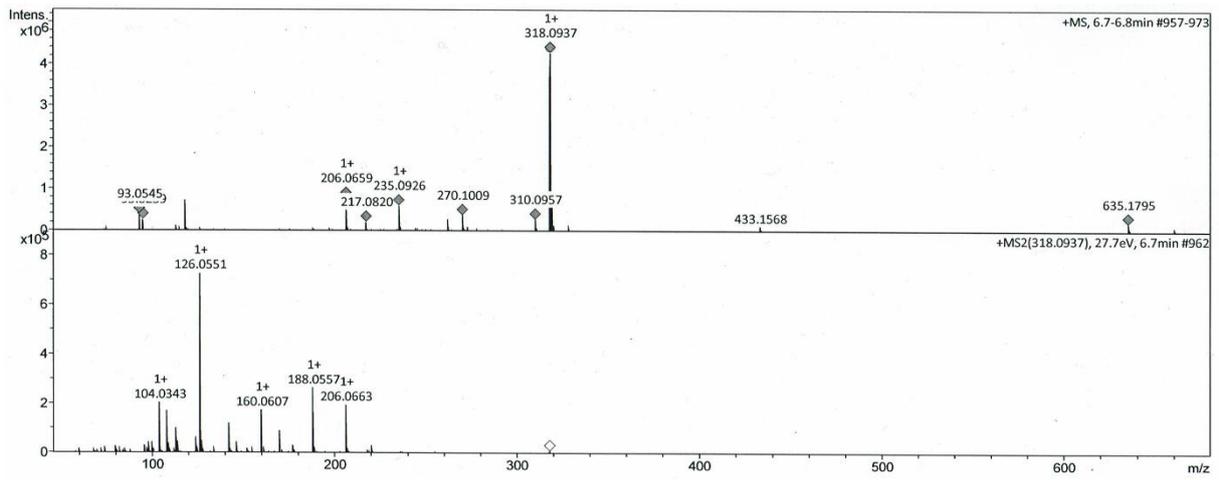


Abbildung 39: Peak LB-3 (Fragmentierte Masse: m/z = 318.0937 $[M+H]^+$).

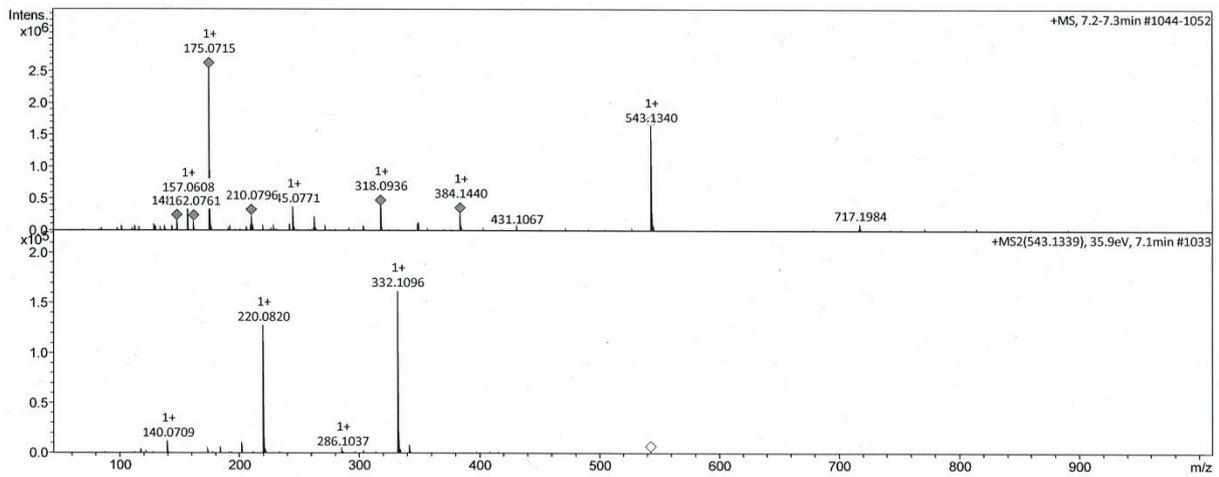


Abbildung 40: Peak LB-4 (Fragmentierte Masse: m/z = 543.1339 $[M+H]^+$).

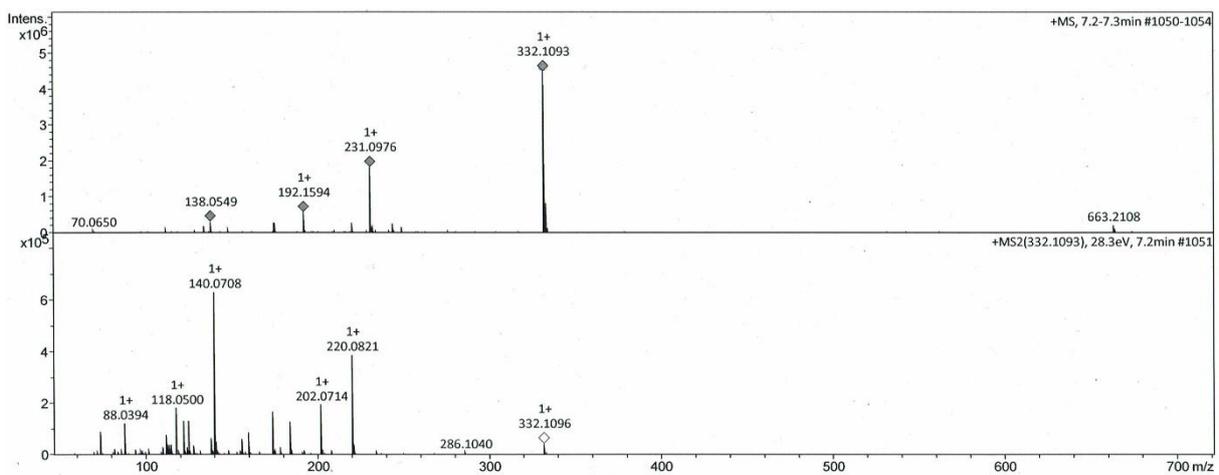


Abbildung 41: Peak LB-5 (Fragmentierte Masse: m/z = 332.1093 $[M+H]^+$).

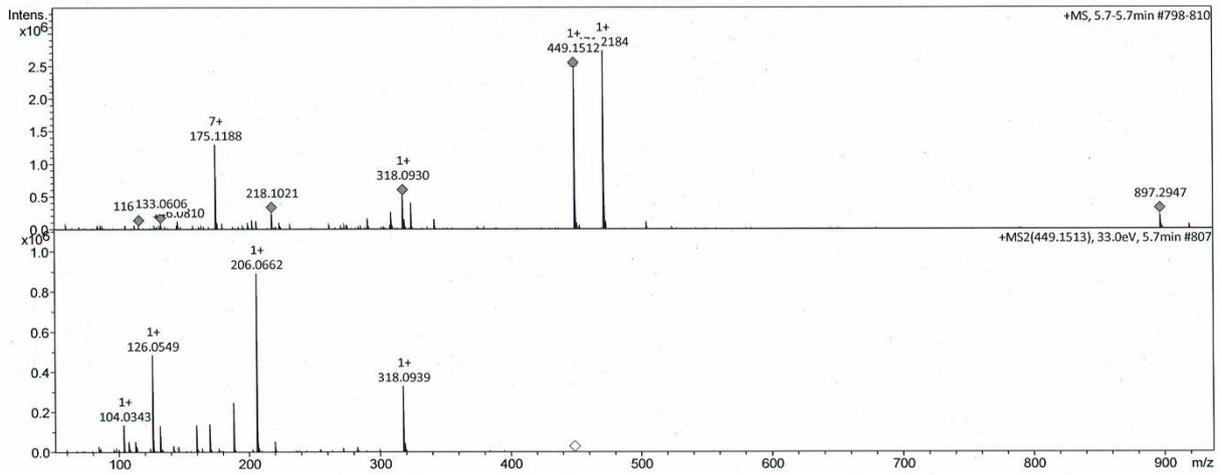


Abbildung 42: Peak P2 (Fragmentierte Masse: $m/z = 449.1513 [M+H]^+$).

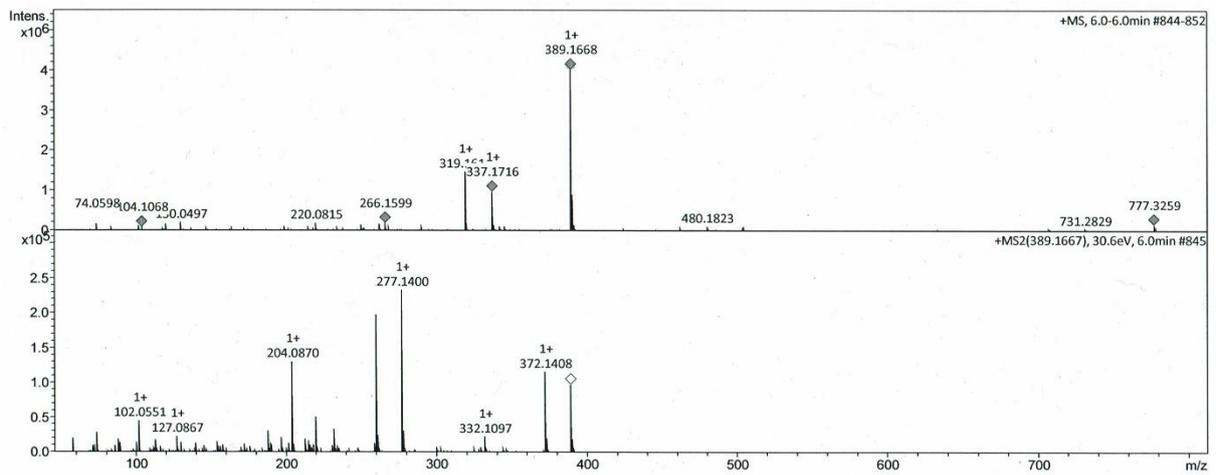


Abbildung 43: Peak P3 (Fragmentierte Masse: $m/z = 389.1667 [M+H]^+$).

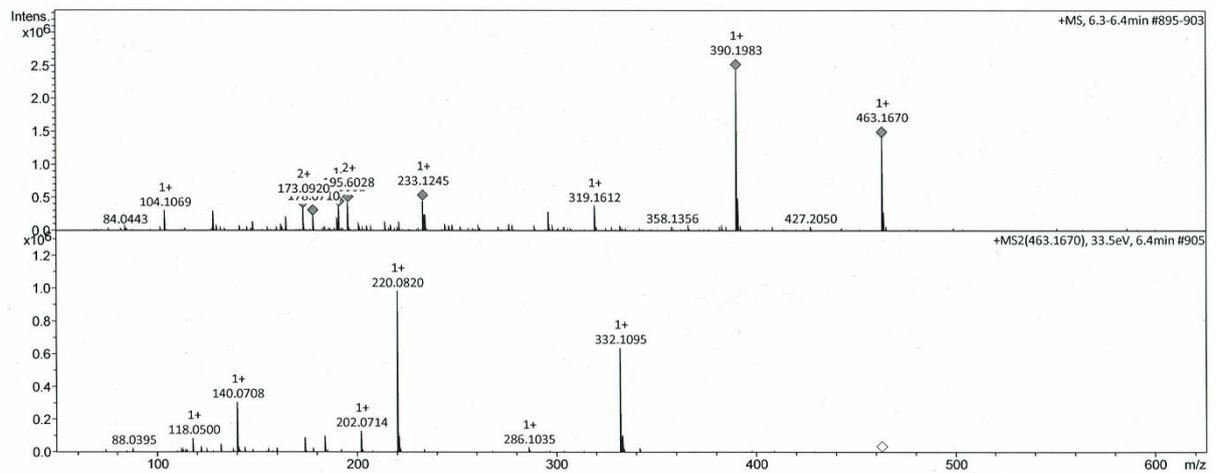


Abbildung 44: Peak P4 (Fragmentierte Masse: $m/z = 463.1670 [M+H]^+$).

Mit Kenntnis des genauen Fragmentierungsmusters von FR-900493 konnten nun gezielte Aussagen über die weiteren Peaks getroffen werden. Die Anordnung ist im Folgenden nicht chronologisch gewählt, sondern folgt sinngemäß einer aufbauenden Argumentationslinie:

- **Peak P3** entspricht mit einer Masse von $m/z = 389,17$ exakt Fragment 1 von FR-900493. Dieses Hauptfragment geht aus der Abspaltung der Aminoribose hervor. Im Fragmentierungsmuster von Peak P3 sind dieselben Fragmente zu finden, wie bereits bei FR-900493 ($m/z = 372,14$, $m/z = 332,11$, $m/z = 277,14$ und $m/z = 260,11$). Peak P3 enthält also offenbar *per se* das um die Aminoribose-Struktur verkürzte FR-900493.
- **Peak LB5 (= P6)** entspricht einer Masse von $m/z = 332,11$ und somit Fragment 1 nach zusätzlichem Verlust der Aminopropyl-Seitenkette. Dieses Fragment wurde ebenfalls bereits im MS²-Spektrum von FR-900493 beschrieben. Durch zusätzlichen Verlust des Uracils lässt sich die Masse $m/z = 220,08$ erklären. Davon ausgehend entsteht durch Wasserabspaltung die Masse $m/z = 202,07$. Durch zusätzliche Decarboxylierung und einer weiteren Abspaltung von Wasser folgt die Masse $m/z = 140,07$.
- **Peak P2** entspricht mit $m/z = 449,15$ der Substanz FR-900493 mit unsubstituiertem 6'-N. Durch die charakteristische Abspaltung der Aminoribose entsteht hier $m/z = 318,09$. Nach weiterer Abspaltung des Uracils folgt $m/z = 206,06$. Durch eine Decarboxylierung und dem Verlust von 2 Molekülen Wasser kann die Masse $m/z = 126,05$ erklärt werden.
- **Peak LB3 (= P5)** entspricht mit einer Masse von $m/z = 318,09$ dem Hauptfragment von Peak P2, also dem am 6'-N unsubstituierten FR-900493 ohne Aminoribose. Analog zu P2 folgt im Weiteren die Masse $m/z = 206,06$ auf die Abspaltung des Uracils. Unter Verlust eines Molekül H₂O ergibt sich Fragment $m/z = 188,06$. Nach weiterer Wasserabspaltung und Decarboxylierung entsteht letztendlich die Masse $m/z = 126,05$.
- **Peak P4** zeigt eine Masse von $m/z = 463,17$ und entspricht damit exakt der Masse von FR-900493 ohne Aminopropyl-Rest am 6'-N. Die Methylgruppe ist hier allerdings vorhanden. Nach Abspaltung der Aminoribose folgt die Masse $m/z = 332,11$ und somit die Substanz aus Peak LB5. Analog folgt nach Verlust des Uracils die Masse $m/z = 220,08$. Nach einer Wasserabspaltung folgt Fragment $m/z = 202,07$. Nach zusätzlicher Wasserabspaltung und einer Decarboxylierung ergibt sich die Masse $m/z = 140,07$.
- **Peak LB2** weist mit $m/z = 529,12$ eine höhere Masse als FR-900493 auf. Das Hauptfragment entspricht hier mit einer Masse von $318,09$ exakt der Masse von Peak LB3 – dem am 6'-N unsubstituierten FR-900493 ohne Aminoribose. Da auch die weiteren Fragmente $m/z = 206,06$, $m/z = 188,05$ und $m/z = 126,05$ hier identisch sind, muss das Hauptfragment von Peak LB2 tatsächlich Peak LB3 entsprechen. Da die Hauptfragmente in allen Substanzen mit Aminoribose stets aus Verlust derselben

hervorgehen, ist auch hier ein entsprechendes Verhalten zu erwarten. Durch Vorhandensein der Aminoribose würde sich in diesem Fall aber die Masse $m/z = 449.15$ ergeben. Allerdings weist Peak LB2 mit $m/z = 529.12$ eine um 80 Da höhere Masse auf. Dies würde sich durch eine phosphorylierte Aminoribose erklären lassen. Phosphorylierte Derivate sind bereits vom Caprazamycin und Muraymycin bekannt – die Phosphatgruppe wurde in beiden Fällen am 3'-OH der Aminoribose lokalisiert (Shiraishi et al. 2016, Cui et al. 2018b). Eine in analoger Weise phosphorylierte FR-900493 Struktur, welche am 6'-N unsubstituiert ist, würde exakt der gesuchten Masse entsprechen und zudem das vorliegende Fragmentierungsmuster vollständig erklären.

- **Peak LB4** folgt denselben Überlegungen. Hier liegt die Masse jedoch bei $m/z = 543.13$. Das Hauptfragment entspricht mit $m/z = 332.11$ der Masse von Peak LB5. Ebenso entsprechen die weiteren Fragmente von $m/z = 220.08$ und $m/z = 140.07$ denen von Peak LB5. Die abgeleitete Substanz war in diesem Fall FR-900493, ohne Aminopropyl-Seitenkette und ohne Aminoribose. Wird davon ausgehend wieder eine am 3'-OH phosphorylierte Aminoribose unterstellt, würde sich exakt die hier gesuchte Masse von $m/z = 543.13$ ergeben. Der Unterschied zum ebenfalls phosphorylierten Peak LB2 bestünde somit lediglich in der zusätzlichen Methylierung der 6'-Aminogruppe.

Die theoretischen Massen dieser hergeleiteten Strukturen wurden nun genau berechnet und mit den gemessenen Werten aus der hochauflösenden Massenspektrometrie verglichen:

Probe	m/z (gemessen)	m/z (berechnet)	Summenformel	Error [ppm]
FR-Standard	520.2251	520.2249	$C_{20}H_{34}N_5O_{11}$	0,4
Peak LB1/P1	520.2256	520.2249	$C_{20}H_{34}N_5O_{11}$	1,3
Peak LB2	529.1178	529.1178	$C_{16}H_{26}N_4O_{14}P$	0,0
Peak LB3/P5	318.0937	318.0932	$C_{11}H_{16}N_3O_8$	1,5
Peak LB4	543.1340	543.1334	$C_{17}H_{28}N_4O_{14}P$	1,1
Peak LB5/P6	332.1093	332.1088	$C_{12}H_{18}N_3O_8$	1,4
Peak P2	449.1512	449.1514	$C_{16}H_{25}N_4O_{11}$	0,5
Peak P3	389.1668	389.1667	$C_{15}H_{25}N_4O_8$	0,2
Peak P4	463.1670	463.1671	$C_{17}H_{27}N_4O_{11}$	0,2

Tabelle 30: Gegenüberstellung der Massen $[M+H]^+$ aller identifizierten Peaks.

Die relativen Massenabweichungen liegen in allen Fällen bei $\leq 1,5$ ppm und sind somit zu vernachlässigen. Da zusätzlich sämtliche Fragmentierungsmuster durch den Vergleich mit einem qualitativen Standard plausibel erklärbar sind, können daher folgende Strukturformeln für die einzelnen Peaks postuliert werden (zusätzliche Abbildungen sind im Anhang aufgeführt):

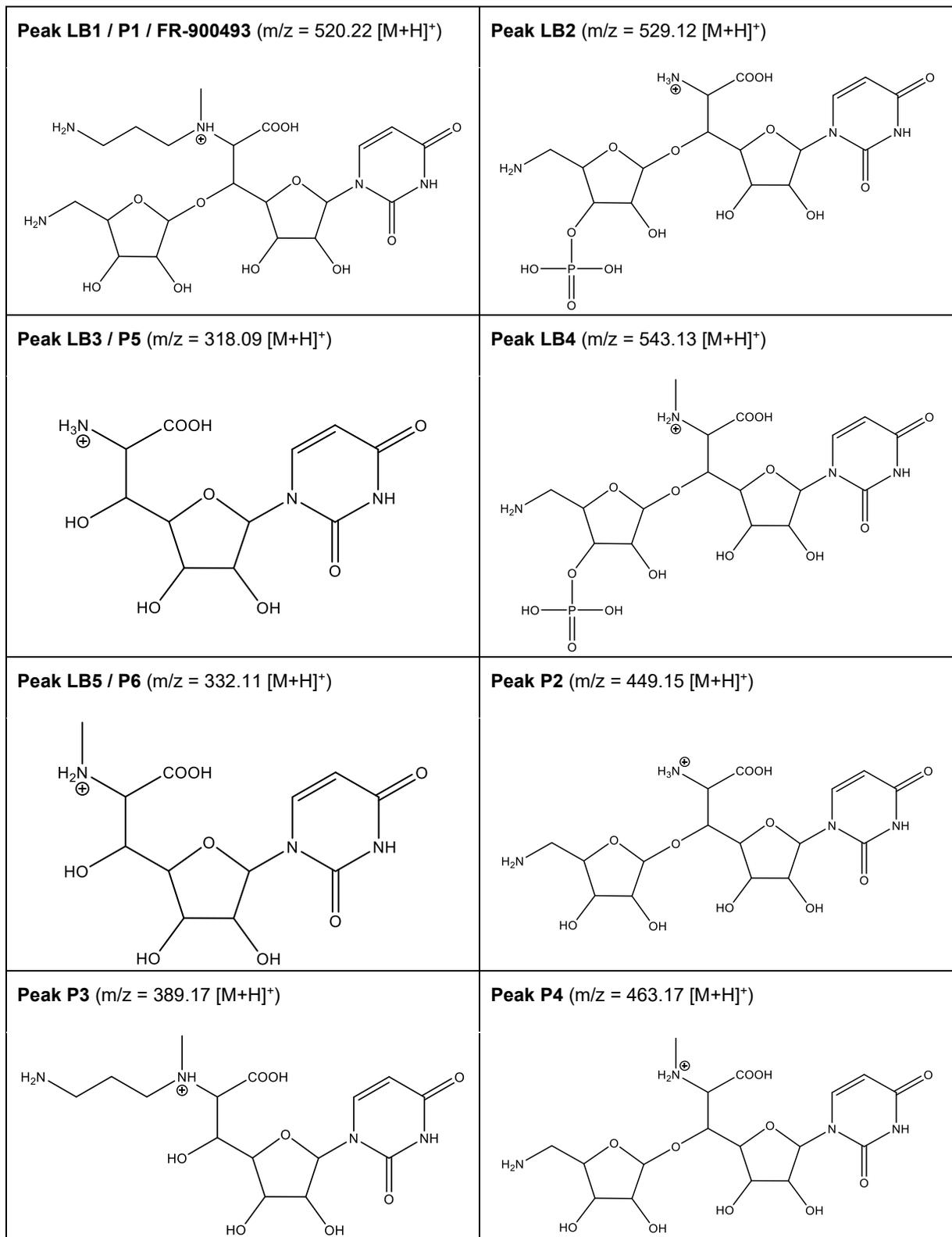


Abbildung 45: Strukturformeln aller untersuchten Peaks aus LB- bzw. P-Medium $[M+H]^+$.

Fazit: Mit dem synthetisch rekonstruierten Gencluster konnte nach dessen Aktivierung und Integration in Bacillus subtilis erfolgreich das Antibiotikum FR-900493 produziert werden. Darüber hinaus wurden sieben weitere eng verwandte Substanzen identifiziert, die von ihrer Struktur her höchstwahrscheinlich biosynthetische Intermediate von FR-900493 darstellen.

3.6 Nachträgliche Integration von zwei weiteren Genen

Nachdem die Produktion von FR-900493 und der möglichen Vorstufen bestätigt war, erfolgten weitere Veränderungen am synthetischen Gencluster. Wie in Kapitel (3.2.1) beschrieben, wurde beim Entwurf des Rekonstruktionsprozesses ein größerer Bereich aus der Mitte des Genclusters ausgeklammert. Der Grund bestand darin, dass dieser Bereich mehrere Gene für Transposasen enthielt, die unter Umständen den Rekonstruktionsprozess durch ungewollte Rekombinationen hätten stören können. In diesem ausgeklammerten Mittelstück waren aber auch 2 Gene vorhanden, die möglicherweise biosynthetische Funktionen aufweisen bzw. mit dem Resistenzmechanismus in Verbindung stehen könnten. Das erste Gen wäre *IKA_05328* – eine hypothetische Nukleosid- bzw. Nukleotid-Kinase. Dieses Gen zeigt funktionelle Ähnlichkeiten zu *cpz12* und *cpz27* aus dem Caprazamycin Gencluster. Beide werden als Aminoglykosid-Phosphotransferasen bezeichnet und weisen ihrerseits Ähnlichkeiten zu Tunicamycin-Resistenzproteinen von *Deinococcus radiodurans* auf (Kapp et al. 2008, Gust et al. 2013). Es wird vermutet, dass diese Gene im Resistenzmechanismus eine Rolle spielen. Daneben wird aber auch diskutiert, ob *cpz27* möglicherweise an der Bildung des Diazepanon-Rings beteiligt ist (Gust et al. 2013). Interessanterweise befindet sich im *Bacillus cereus* Gencluster mit dem Gen *IKA_05339* noch eine weitere mögliche Aminoglykosid-Phosphotransferase. Diese liegt im rechten Operon und war somit im synthetischen Gencluster bereits vorhanden. Es ist jedoch denkbar, dass analog zum Caprazamycin Gencluster auch hier zwei Phosphotransferasen involviert sind. Eine davon wäre im rekonstruierten Gencluster bereits vorhanden, die zweite würde noch fehlen. Aus diesem Grund schien es interessant, dieses zweite Gen noch nachträglich in das Cluster einzubringen. Möglicherweise war im bisherigen Gencluster nur eine unvollständige Resistenzvermittlung gegeben, was die geringe Produktion von FR-900493 und die Akkumulation der Vorstufen erklären könnte. Neben dieser zweiten Phosphotransferase befindet sich im ausgeklammerten Mittelstück noch das Gen *IKA_05331* – eine mögliche Hydroxylase bzw. Oxidoreduktase. Es sind hier zwar keine Ähnlichkeiten zu Biosynthesegenen des Caprazamycins vorhanden – auch nicht zur β -Hydroxylase *cpz10*, jedoch ist es durchaus denkbar, dass dieses Enzym dennoch eine Rolle in der Biosynthese spielen könnte. Die beiden verbleibenden Gene des Mittelstücks, die keine Transposasen sind, wären *IKA_05327* und *IKA_05334*. Zu beiden Genen wurden bei den bioinformatischen Untersuchungen keine Informationen gefunden. Es wurde daher beschlossen, nur die beiden oben beschriebenen Gene nachträglich in das Cluster zu integrieren. Dies sollte analog zum Promotoraustausch mittels eines weiteren synthetischen gBlocks® erfolgen. Zur Selektion sollte dieser neben den beiden Genen noch zusätzlich das *aadA* Resistenzgen für die Selektion mit Streptomycin enthalten. Zur späteren Entfernung wurde dieses Gen von zwei SbfI-Schnittstellen flankiert. Die Integration des Gesamtkonstrukts sollte via Red/ET-Rekombination in das bestehende Operon hinter dem Gen *IKA_05317* (Dioxygenase) erfolgen – also am

äußeren linken Rand des synthetischen Genclusters. Eine Integration an die Enden der anderen beiden Operone wurde wegen des dort lokalisierten Terminators nicht in Erwägung gezogen. Die homologen Endsequenzen für die Red/ET-Rekombination wurden hier bereits in den synthetischen gBlock[®] integriert. Die rechte Seite umfasste das Endstück des Gens *IKA_05317*, die linke Seite umfasste die ersten 39 bp des angrenzenden pBS1C-Vektors. Als Zielvektor sollte das aktivierte Gencluster in Form des pBS1CTR03-Konstrukts verwendet werden. Vor den beiden zu integrierenden Genen wurden je 40 bp (bei *IKA_05328*) bzw. 25 bp (bei *IKA_05331*) des jeweils vorangehenden intergenischen Bereichs aufgenommen, um die ribosomale Bindestelle sicher mit abzudecken. Im Falle von *IKA_05328* (Nukleosid- bzw. Nukleotid-Kinase) wurde hierbei 7 Basenpaare vor dem ursprünglichen Start-Codon ein zusätzliches Thymin eingefügt. Damit wurde das Gen um weitere fünf Codons verlängert, was bei allen mittels BLAST-Analyse gefundenen homologen Genen der Fall war. Nach dem Gen *IKA_05331* wurde der Spacer „Sp5“ sowie der bidirektionale Terminator aus der *Bacillus subtilis* Toolbox aufgenommen, um eine größtmögliche genetische Abschirmung sicherzustellen (Guiziou et al. 2016). Der auf diese Weise zusammengestellte gBlock[®] umfasste insgesamt 2927 bp und konnte in diesem Fall ohne weitere Aufspaltung von IDT geliefert werden. Die DNA-Sequenz dieses Konstrukts, das als „BS_2genecas_01“ bezeichnet wurde, sowie alle im Integrationsprozess verwendeten Primer sind unter (2.1.8) bzw. (2.1.7) aufgeführt.

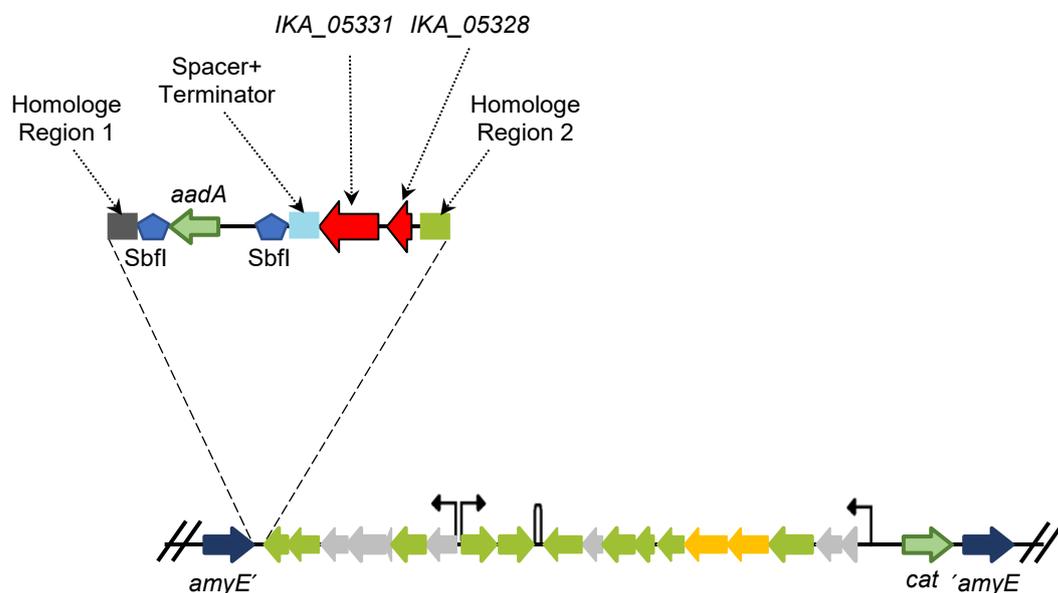


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Integrationskassette "BS_2genecas_01".

Für die Integration wurde der o.g. gBlock[®] zunächst mittels Primerpaar (BS_2genecas_01_f / BS_2genecas_01_r) unter Verwendung der Q5-Polymerase amplifiziert. Die Integration via Red/ET-Rekombination erfolgte gemäß (2.3.17). Das Zwischenprodukt mit dem noch

enthaltenen Resistenzgen wurde als pBS1CTR04-SpecStrep bezeichnet. Nach Selektion mit den beiden Antibiotika Carb und Strep wurden mehrere Klone mittels Restriktionsverdau und PCR-Analyse unter Verwendung des Primerpaars (2genecas_Seq_f / 2genecas_Seq_r) untersucht. Ein Klon mit allen erwarteten Banden wurde schließlich im gesamten veränderten Bereich sequenziert und zeigte hierbei keine Fehler. Um das Resistenzgen zu entfernen, wurde das korrekt sequenzierte Konstrukt via SbfI verdaut, religiert und anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die hierbei erhaltenen Klone wurden erneut via PCR und Restriktionsverdau überprüft und am Ende erneut im veränderten Bereich sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde mit pBS1CTR04 bezeichnet. Es umfasste das synthetisch rekonstruierte Gencluster nach dessen Aktivierung und zusätzlich die beiden an das linke Operon angeschlossenen Gene *IKA_05328* und *IKA_05331*. Dieses Konstrukt wurde nun via KpnI linearisiert und anschließend gemäß (2.3.4) erneut in *Bacillus subtilis* 168 transformiert. Zur Selektion wurde auf LB Cml Platten ausplattiert. Um die korrekte Integration in den *amyE*-Locus zu bestätigen, wurden die Klone im Anschluss wieder auf Maisstärke-Platten ausgestrichen und mittels Lugol'scher Lösung auf ihre Fähigkeit zum Stärkeabbau hin untersucht. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Transformation wurden insgesamt 21 *Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR04 Klone erhalten, die nicht mehr zum Stärkeabbau fähig waren. Mit diesen Klonen wurden zur weiteren Überprüfung mehrere Colony-PCR-Reaktionen (gemäß 2.3.15) durchgeführt. Hierzu wurden Primerpaare verwendet, die am rechten Clusterende, in der Mitte des Clusters, der bidirektionalen Promotoraustauschkassette sowie im Bereich der beiden neu integrierten Gene binden. Leider zeigte sich hierbei, dass keiner dieser Klone positive Signale mit allen verwendeten Primerpaaren lieferte. Insbesondere im Bereich der neu integrierten Gene zeigte kein einziger Klon ein positives Signal. Da 9 Klone zumindest positive Signale aus dem Bereich der Promotoraustauschkassette und der Clustermitte lieferten, wurden mit diesen 9 Klonen weitere Colony-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierfür wurde ein alternatives Primerpaar aus dem Bereich der neu integrierten Gene verwendet und zusätzlich ein weiteres Primerpaar aus dem ursprünglichen linken Clusterende im Bereich der Dioxygenase (*IKA_05317*). Da 5 dieser 9 Klone zuvor auch vom rechten Clusterende keine Signale ergaben, wurde auch für diesen Bereich ein alternatives Primerpaar entworfen. Bei diesen ergänzenden PCR-Reaktionen zeigte jedoch ebenfalls keiner der Klone ein Signal aus den neu integrierten Genen. Interessanterweise war hingegen das ehemalige linke Clusterende bei allen Klonen amplifizierbar. Das rechte Clusterende lieferte bei 8 von 9 Klonen ein positives Signal. In diesen 8 Klonen schien somit zumindest das ursprüngliche Gencluster intakt zu sein. Allerdings fehlten stets die beiden neu integrierten Gene. Aus diesen doch sehr uneinheitlichen Ergebnissen musste somit gefolgert werden, dass nach der Transformation in *Bacillus subtilis* offenbar nicht von der vollständigen Intaktheit der transformierten DNA ausgegangen werden kann – selbst bei positivem *amyE*-Knockout. Unter den 21 anfänglich untersuchten Klonen zeigten einige sogar

positive Signale von beiden Clusterenden, nicht jedoch von den mittleren Bereichen. Zumindest in diesem Fall scheinen beim Integrationsprozess offensichtlich einzelne DNA-Abschnitte verloren zu gehen – und dies auf nicht einheitliche Art und Weise. Da bei Größen von mittlerweile mehr als 25 kb sinnvollerweise nicht jede Base mittels PCR überprüft werden kann, schmälert diese Beobachtung die Verlässlichkeit der Transformation in eklatanter Weise.

Die Ergebnisse der Colony-PCR zeigten, dass 9 der untersuchten Klone zumindest das ursprüngliche Gencluster enthielten. Daher sollten diese Klone nun analytisch näher betrachtet werden. Als Vergleich wurde der bereits ausführlich untersuchte Klon 6 (*Bacillus subtilis* 168 / pBS1CTR03) sowie eine Negativkontrolle mit integriertem Leervektor (*Bacillus subtilis* 168 / pBS1C-[]) verwendet. Alle genannten Klone wurden gemäß (2.2.2) unter Verwendung von 70 ml P-Medium Cml als Vorkultur (23 h, 30°C, 200 rpm) und 70 ml P-Medium als Hauptkultur (45 h, 30°C, 200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände aufbereitet und via HPLC-MS unter Verwendung von Methode 3 analysiert (siehe 2.4.1 bzw. 2.4.4). Hierbei zeigte sich, dass 7 dieser 9 Klone tatsächlich eine Produktion aufwiesen. Die anderen beiden Klone zeigten keine Unterschiede zur Negativkontrolle und wurden daher aussortiert. Die Gegenüberstellung der 7 neu produzierenden Klone mit dem bereits bekannten Klon 6 ergab jedoch, dass hierbei genau dieselben Substanzen in vergleichbaren Mengen produziert wurden. Es konnten keine neuen Massen und auch keine signifikanten Produktionssteigerungen der bereits bekannten Peaks festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die analytischen Daten bestätigten somit die Ergebnisse der Colony-PCR: Bei der Transformation des pBS1CTR04-Konstrukts gingen offenbar genau die beiden neu integrierten Gene verloren. Die Produktion neuer Substanzen bzw. eine Produktionssteigerung von FR-900493, die als Folge der Integration dieser beiden Gene erhofft wurde, konnte daher auch nicht erwartet werden. Das transformierte pBS1CTR04-Konstrukt enthielt ursprünglich jedoch definitiv die beiden neuen Gene. Dies wurde im Anschluss der Red/ET-Rekombination umfassend überprüft und sogar durch Sequenzierung bestätigt. Die Deletion dieses Bereichs musste also im Rahmen des Transformationsprozesses in *Bacillus subtilis* aufgetreten sein. Die Gründe hierfür konnten nicht abschließend identifiziert werden. Eine umfassende Diskussion dieses Sachverhalts wird unter (4.4) geführt. Als positives Ergebnis dieses Experiments kann immerhin der Umstand betrachtet werden, dass nun weitere Klone mit Produktionsfähigkeit für FR-900493 erzeugt werden konnten. Die von Klon 6 ausführlich vorgestellten Ergebnisse waren somit reproduzierbar.

4 Diskussion

Die Substanz FR-900493 stellt das einfachste Nukleosid-Antibiotikum mit ADR-GlyU Grundstruktur dar. Es wurde im Jahr 1989 erstmalig aus Kulturen des Stammes *Bacillus cereus* No. 2045 isoliert und weist antibakterielle Eigenschaften gegen *Staphylococcus aureus* 209P JC-1 und *Bacillus subtilis* ATCC-6633 auf. Obwohl die biosynthetischen Gencluster aller anderen Nukleosid-Antibiotika mit entsprechender Grundstruktur bereits identifiziert und beschrieben wurden, ist dies für FR-900493 bis heute nicht erfolgt. Auch die Genomsequenz des Produzentenstammes ist in den öffentlich zugänglichen Datenbanken bisher nicht hinterlegt. So stellt der genetische Hintergrund dieser Substanz bis auf den heutigen Tag noch immer eine Lücke auf dem ansonsten weit erforschten Feld der Nukleosid-Antibiotika dar. Aufgrund der analogen Biosynthesewege sämtlicher verwandten Substanzen wurde auch für FR-900493 ein ähnlicher Weg erwartet. Diese Arbeit beschreibt erstmalig ein Gencluster, das zur Produktion von FR-900493 befähigt. Es wurde mittels „Genome Mining“ in der Genomsequenz des Stammes *Bacillus cereus* VD169 entdeckt, welcher jedoch aufgrund eines ebenfalls vorhandenen Virulenzplasmides für nähere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand. Daher wurde dieses Gencluster, unter Verwendung verschiedener Methoden der synthetischen Biologie, in seiner Gesamtheit künstlich rekonstruiert. Vergleichbare Herangehensweisen zur synthetischen Nachbildung ganzer Gencluster sind selten (Yan et al. 2018) – auf dem Gebiet der Nukleosid-Antibiotika ist diese Strategie bisher einmalig. Die Erfahrungen, die während dieser Arbeit gewonnen wurden, werden im Folgenden ausführlich diskutiert. Hierbei werden die größten Einschränkungen der durchlaufenen Schritte benannt und mögliche Lösungsvorschläge für künftige Arbeiten dieser Art gegeben. Zusätzlich soll das Gencluster erneut ausführlich betrachtet werden, um einen Vorschlag zur möglichen Biosynthese von FR-900493 aufzustellen. Hierbei werden die bereits bekannten Reaktionsschritte aus den Biosynthesen der Caprazamycine und der Muraymycine als Vergleich gegenübergestellt. Letztendlich soll an dieser Stelle auch reflektiert werden, welche Aufgaben die bisher noch unbekanntes Gene aufweisen könnten. Zu guter Letzt stellt sich hierbei die Frage, ob mit der Substanz FR-900493 tatsächlich das Endprodukt dieses Genclusters vorliegt, oder ob mit zusätzlichen Experimenten möglicherweise noch weitere Substanzen mit bisher unbekanntes Strukturen erwartet werden können.

4.1 Genome Mining

Die Identifizierung neuer Gencluster mittels bioinformatischer Werkzeuge stellt heute eine unverzichtbare Methode auf dem Gebiet der Naturstoff-Forschung dar. Das Gencluster aus *Bacillus cereus* VD169 wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit unter Verwendung der BLAST-Analyse (Altschul et al. 1990) entdeckt. Hierbei wurden Homologien zwischen dem ersten Gen

der Caprazamycin Biosynthese (*cpz15*) und dem Gen *IKA_05317* aus *Bacillus cereus* VD169 festgestellt. Der initiale Schritt dieser Arbeit bestand folglich in der ausführlichen bioinformatischen Analyse dieses möglichen Genclusters. Neben der BLAST-Analyse wurde hierbei das kostenlose Web-Tool Phyre2 verwendet (Kelley et al. 2015), das neben der reinen Sequenzanalyse auch Vorhersagen über mögliche Proteinstrukturen berücksichtigt. Auf diese Weise konnte die gesamte Umgebung des identifizierten Gens analysiert und den einzelnen Genen entsprechende Funktionen zugeordnet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden anhand der Funktionszuordnungen bereits erste Prognosen einer möglichen Struktur des potentiellen Naturstoffs getroffen. Diese waren allerdings noch rein spekulativ. Da jedoch sämtliche homologen Gene zu den benötigten Enzymen der ADR-GlyU-Biosynthese identifizierbar waren, wurde bereits zu diesem Zeitpunkt eine entsprechende Struktur vermutet. Im Rückblick hat sich dies als korrekt erwiesen. Eine genaue Betrachtung der einzelnen Gene wird unter (4.6) im Rahmen der ausführlichen Diskussion eines möglichen Biosyntheseweges vorgenommen.

4.2 Vollsynthetische Rekonstruktion des Genclusters

4.2.1 Betrachtung der Vorarbeiten

Bei den ersten Überlegungen bezüglich einer möglichen synthetischen Rekonstruktion wurde noch von einem wesentlich geringeren Arbeitsaufwand ausgegangen. Die theoretisch erzielbaren Größen für synthetische gBlocks® der Firma IDT lagen zum damaligen Zeitpunkt bei 2000 bp. Folglich wurde von einer Anzahl aus maximal 15 Einzelfragmenten ausgegangen. Leider sollte sich dies im Nachhinein als Trugschluss erweisen. Sofern keine Sequenzveränderungen vorgenommen werden sollen, stellt die *de novo* Synthese von DNA zurzeit noch immer ein schwieriges Unterfangen dar. Gerade der sehr geringe GC-Gehalt von nur 30,82% sowie das Vorhandensein zahlreicher Wiederholungen und Sekundärstrukturen erwiesen sich hierbei als größtes Problem. Die Folge war eine sehr viel größere Aufsplittung als ursprünglich konzipiert und umfasste schließlich 45 Einzelfragmente. Der wiederholten Bitte von IDT, einzelne Sequenzabschnitte abzuändern (z.B. durch Verwendung alternativer Codons), wurde hier bewusst nicht nachgekommen. So resultierten eben solche Veränderungen bereits mehrfach in deutlichen Rückgängen der Produktionsraten (Osswald et al. 2014, Basitta et al. 2017). Es werden verschiedene Ursachen hierfür diskutiert - vor allem der Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit am Ribosom scheint eine große Rolle zu spielen (Zhang et al. 2009). Aber auch interne Shine-Dalgarno-Sequenzen innerhalb der mRNA sowie bestimmte Sekundärstrukturen derselben scheinen beträchtliche Auswirkungen auf die Translation zu haben (Katz et al. 2003, Li et al. 2012). Die Folgen von größeren Veränderungen könnten daher signifikante Auswirkungen auf die Proteinfaltung und somit auf deren Funktionsfähigkeit haben. Da der Einfluss verschieden genutzter Codons bei Weitem noch nicht ausreichend

erforscht ist, sind bereits andere Arbeitskreise von Sequenzvariationen biosynthetischer Gencluster abgekommen (Yan et al. 2018). Die Reflexion all dieser Punkte ließ uns ebenfalls auf solche Anpassungen im synthetischen Gencluster verzichten, da die Gefahr negativer Auswirkungen hier als zu groß erachtet wurde. Es wurde eher eine größere Aufspaltung in Kauf genommen, als unvorhersehbare Effekte durch Änderung der Codonusage zu erzeugen.

Die Grenzen des Genclusters wurden für die synthetische Rekonstruktion anhand der getroffenen Funktionsprognosen gezogen. Außerhalb des gewählten Bereichs konnten keine homologen Gene zu den bekannten Genclustern des Caprazamycins und des Muraymycins gefunden werden. Ebenfalls wurde die Anordnung der Gene in die Entscheidung mit einbezogen. Der gewählte Bereich umfasste insgesamt 3 Operone mit bis zu 10 Genen in einer Anordnungslinie. Der mittlere Bereich mit den Transposasen wurde bewusst aus der Synthese ausgeschlossen. Die Transposasen können hier zwar keine biosynthetische Funktion ausüben, ihre vielfache Präsenz aber zu Instabilitäten und Rearrangements der DNA in dieser Region führen. Ihr Vorhandensein hätte außerdem den Rekonstruktionsprozess beträchtlich stören können. Da zwei von den vier weiteren Genen aus diesem Bereich keine mögliche Funktion zugeordnet werden konnte (*IKA_05327* + *IKA_05334*), wurden diese zum nachträglichen Einbringen nicht weiter in Betracht gezogen. Möglicherweise wurden diese durch eine offenbar stattgefundene Transposition zerstört. Allerdings sind mit den beiden Genen *IKA_05328* + *IKA_05331* noch zwei weitere Gene enthalten, die möglicherweise eine wichtige Rolle spielen könnten. Da diese jedoch ebenfalls von Transposasen umgeben waren, schien eine 1:1 Nachbildung hier nicht zielführend zu sein. Eine funktionelle Einheit aus Promotor, Gen und Terminator konnte hier nicht erwartet werden. Daher sollten diese Gene zunächst zurückgestellt und erst in einem späteren Schritt an ein bereits funktionierendes Operon angeschlossen werden.

4.2.2 Betrachtung des Rekonstruktionsprozesses

Der theoretische Entwurf des Rekonstruktionsprozesses war vom Prinzip her sehr einfach. Es sollten je 2 bis 4 synthetische DNA-Fragmente mit einem linearisierten Vektor im Rahmen einer gemeinsamen Gibson-Assembly Reaktion zusammengefügt werden und so ein transformierbares Konstrukt ausbilden. Um die DNA zu vermehren und somit eine sinnvolle Überprüfung zu ermöglichen, sollten die zirkulären Konstrukte anschließend in *E. coli* XL1-Blue transformiert werden. Hierbei sollte nach einer Vorselektion mittels α -Komplementation, PCR-Analyse und Restriktionsverdau immer auch eine vollständige Sequenzierung erfolgen. Die akribische Überprüfung der Sequenzkorrektheit war bei dieser Strategie essentiell, da sämtliche Zwischenprodukte in aufbauender Weise für die weiteren Schritte verwendet wurden. Bereits einzelne Basenfehler könnten hier fatale Folgen haben – insbesondere durch Insertionen und Deletionen, die einen Frameshift bedingen würden. Während dieser Arbeit wurden daher

hunderte Sequenzierungen durchgeführt, um die Integrität der DNA fortlaufend abzusichern. Bereiche, die hierbei zweifelhafte Sequenzen ergaben, wurden so lange weiter sequenziert, bis eine hundertprozentige Aussage über deren Sequenzkorrektheit getroffen werden konnte.

Ein großes Problem stellte die sehr geringe DNA-Konzentrationen sämtlicher gBlocks® der Erstbestellung dar. Die angegebenen Konzentrationen wurden in den meisten Fällen bei weitem nicht erreicht. Daher mussten alle Fragmente zunächst mittels PCR-Reaktion amplifiziert werden. Da Amplifikationen jedoch stets eine Quelle für Mutationen darstellen, wurde die besonders zuverlässige Q5® High-Fidelity DNA Polymerase unter Verwendung von nur 25 PCR-Zyklen eingesetzt. Trotzdem stellten einzelne Basenfehler das Hauptproblem des gesamten Rekonstruktionsprozesses dar, da diese nur durch kostspielige Sequenzierungen feststellbar sind. Als Fehlerquellen kommen hierfür drei Möglichkeiten in Frage: Erstens könnten die Fehler bereits in den synthetischen gBlocks® vorhanden gewesen sein. Zweitens könnten diese bei der Q5-Amplifikation derselben entstanden sein. Die dritte und letzte Möglichkeit bestünde im Prozess des Gibson-Assembly selbst. Auch während dieses Vorgangs kommt bekanntermaßen eine Polymerase zum Einsatz. Die hierbei enthaltene Phusion Polymerase ist jedoch auch als besonders zuverlässig bekannt. Rückblickend lässt sich feststellen, dass die meisten Sequenzfehler während der ersten Schritte auftraten, also an dem Punkt, wo die amplifizierten gBlocks® zum Einsatz kamen. Nachdem diese in Hinblick auf ihre Sequenz verifiziert waren, traten in den nachfolgenden Schritten wesentlich weniger Sequenzfehler auf. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Fehler tatsächlich bereits in den gBlocks® selbst vorhanden waren oder aber durch die vorherige Amplifikation entstanden sind. Letzteres wird allerdings für unwahrscheinlich erachtet, da sonst auch bei anderen Amplifikationen mit der Q5-Polymerase vermehrt Fehler aufgefallen wären. Dies war aber nicht der Fall. Bei weiterführenden Assembly-Reaktionen bereits verifizierter Blöcke fanden sich deutlich weniger Sequenzfehler. Diese wenigen Fehler befanden sich hierbei erstaunlicherweise fast immer im Bereich der Überlappungen bzw. unweit davon entfernt. Da gerade dies die Bereiche sind, die beim Gibson-Assembly verändert werden, könnte hierfür tatsächlich der Prozess verantwortlich sein. Zur Überprüfung genügt in diesem Falle eine Sequenzierung eben dieser kurzen Übergangsbereiche, da in den anderen Abschnitten keine Fehler mehr erwartet werden. Für die Sub-Sub-Blöcke wurden jeweils noch die gesamten Bereiche umfassend sequenziert. Im letzten Schritt und auch für den Umklonierungsvorgang wurden – auch in Hinblick auf die mittlerweile beträchtlichen Größen der Gesamtkonstrukte – dann nur noch die Übergangsbereiche sequenziert. Da die am Ende durchgeführte Gesamtsequenzierung nur eine stille Punktmutation zeigte, hat sich die Sequenzierungsstrategie rückblickend als richtig erwiesen.

Was die Selektion nach Transformation der Gibson-Assembly Ansätze betrifft, hat sich die Blau-Weiß Selektion als wertvolle Ergänzung bewährt. Obwohl bei der Vektorvorbereitung

stets eine multiple Linearisierung mittels EcoRV erfolgte und nach der PCR-Elongation gründlich mittels DpnI verdaut wurde, zeigten sich teils große Mengen falsch positiver Klone, die ausschließlich den Leervektor enthielten. Glücklicherweise konnten diese anhand ihrer blauen Farbe erkannt werden. Beim finalen Assembly-Schritt mit dem SuperCos Vektor sowie bei der Umklonierung in das pBS1C-Plasmid musste auf diese Hilfe jedoch verzichtet werden. Folglich verzögerte sich hier der Selektionsprozess enorm. In beiden Fällen mussten hunderte Klone mittels PCR-Reaktion vorselektioniert werden. Die Effizienz des Gibson-Assembly scheint somit ohne die Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion deutlich schlechter auszufallen. Dies gilt ganz besonders bei großen Konstrukten. Doch auch bei durchgeführter α -Komplementation war die Selektion in vielen Fällen sehr zeitaufwändig. Selbst unter den Klonen mit weißer Farbe fanden sich meist viele falsche Konstrukte. Diese waren in der Regel bereits mittels PCR und Restriktionsverdau erkennbar. Da beim Gibson-Assembly von der Theorie her eigentlich keine willkürlichen Kombinationen zu erwarten sind, blieb dieses Verhalten rätselhaft. Eine mögliche Erklärung wäre der in manchen Abschnitten extrem hohe AT-Gehalt der DNA. Möglicherweise ähnelten sich dadurch die Randbereiche zweier nicht exakt homologer gBlock[®]-Enden so sehr, dass diese trotzdem auf enzymatische Weise miteinander verbunden werden konnten.

Schlussendlich lässt sich zusammenfassen, dass der Rekonstruktionsprozess durch zahlreiche Selektionsschwierigkeiten geprägt war und dadurch enorm erschwert und verlangsamt wurde. Die Gründe lagen höchstwahrscheinlich im extrem geringen GC-Gehalt des Genclusters sowie in zahlreichen Synthesefehlern innerhalb der einzelnen gBlocks[®]. Um Projekte dieser Art in Zukunft effizienter und zeitsparender durchführen zu können, sollte sich die Qualität der synthetischen DNA wesentlich verbessern. Zusätzlich wäre es empfehlenswert, bei Gibson-Assemblies mit Fragmenten extremer GC-Gehalte größere Überlappungen der einzelnen Fragmente zu verwenden. Die in dieser Arbeit eingesetzten 30 bp scheinen rückblickend etwas zu knapp gewählt worden zu sein. Die weiteren Schritte des Rekonstruktionsprozesses, namentlich das Ausschneiden mittels Bts^qI, die Vorbereitung des SuperCos Vektors sowie das Umklonieren des Genclusters, stellten sich dagegen als geeignete und effiziente Methoden heraus. Die beiden letztgenannten Prozesse beruhten auf einem eigens entwickelten Prinzip unter Verwendung eines Helfer-gBlocks[®] und des Enzyms BaeI. Da sich diese Methode eignet, um selbst große Gencluster schnell von einem Vektor in einen anderen zu übertragen, wurde sie bereits in anderen Projekten innerhalb unseres Arbeitskreises erfolgreich eingesetzt. Umklonierungen ganzer Gencluster sind oft nicht trivial und häufig mit viel Zeitaufwand verbunden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Strategie hat sich für diesen Zweck bewährt. Essentiell ist hierfür allerdings die Möglichkeit zum gezielten Ausschneiden des gewünschten DNA Bereichs an definierten Stellen. Es stellte sich daher als sehr vorteilhaft heraus, dass ein solches Ausschneiden bei allen Schritten dieser Arbeit bereits im Voraus mit eingeplant wurde.

4.3 Aktivierung des Genclusters durch Austausch der Promotoren

Nach Transformation des rekonstruierten Genclusters in *Bacillus subtilis* 168 zeigte sich zunächst keine Produktion von Sekundärmetaboliten. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits bei Versuchen zur heterologen Expression von Edein in *Bacillus subtilis* beschrieben (Liu et al. 2016). Auch hier erfolgte bei nachweislicher Integration des Gencluster keine Produktion des erwarteten Naturstoffs. Ein möglicher Grund wurde in der mangelnden Transkription vermutet. Um dies im Falle des synthetischen Genclusters auszuschließen, sollte die Transkription mittels RT-PCR untersucht werden. Diese Methode hat sich tatsächlich als zielführend herausgestellt. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass das Gencluster im heterologen Produzenten tatsächlich nicht in allen Bereichen transkribiert wurde. Die Gründe könnten in der mangelnden Akzeptanz der nativen Promotoren gelegen haben. Die Umsetzung der RT-PCR war zwar zeitaufwändig, da das ursprünglich für Streptomyceten ausgelegte Protokoll empirisch auf *Bacillus subtilis* angepasst werden musste. Nach dessen Etablierung zeigten sich die Ergebnisse jedoch als sehr wertvoll für den weiteren Erfolg dieser Arbeit. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde schließlich die Entscheidung getroffen, insgesamt drei Promotoren mittels synthetischer Integrationskassetten in das Gencluster einzubringen. Hierbei sollten die nativen Promotoren vollständig ersetzt werden. Da die Funktionalität einer Einheit aus Promotor, ribosomaler Bindestelle und Transkriptionsstart durch Variation bereits weniger Basenpaare enorm gestört werden kann (Popp et al. 2017), sollten für den Austausch möglichst vollständige Funktionseinheiten verwendet werden. Hierfür hat sich die *Bacillus subtilis* Toolbox als hervorragend geeignet herausgestellt (Guiziou et al. 2016). Aus den hier vorgestellten Elementen wurden die beiden Promotoraustauschkassetten aufgebaut, die anschließend in Form synthetischer gBlocks® bestellt wurden. Die Integration mittels der Methode der Red/ET-Rekombination lief weitgehend problemlos ab. Der benötigte Zeitaufwand bewegte sich im erwarteten Rahmen.

4.4 Transformation in *Bacillus subtilis*

Bei der Transformation in *Bacillus subtilis* 168 wurden je nach transformiertem Konstrukt enorme Unterschiede in der erzielten Effizienz festgestellt. Der reine pBS1C-Leervektor konnte ohne jegliche Probleme transformiert werden. Es zeigten sich hier zahlreiche Transformanten, von welchen alle näher untersuchten Klone keinen Stärkeabbau mehr aufwiesen. Die DNA integrierte somit wunschgemäß in den *amyE*-Locus und zerstörte dessen Funktionalität. Dies konnte ebenfalls mittels Colony-PCR bestätigt werden. Bei der Integration des synthetischen Genclusters in seiner nicht aktiven Form (pBS1CTR01) wurde ebenfalls eine gute Transformationseffizienz erreicht. Zwar zeigten sich hier deutlich weniger Transformanten als bei der Transformation des Leervektors, doch wiesen diese in 9 von 10 Fällen keinen Stärkeabbau mehr auf und lieferten in 8 von 10 Fällen alle erwarteten Banden bei der Colony-PCR.

Bei der Transformation des aktivierten Genclusters (pBS1CTR03) zeigte sich jedoch ein völlig anderes Bild. Obwohl die Größe des Konstrukts fast identisch war, konnte hier eine massive Verschlechterung der Transformationseffizienz beobachtet werden. Es wuchsen zwar viele Transformanten an, allerdings zeigte von zahlreichen untersuchten Klonen nur ein einziger Klon den Verlust des Stärkeabbaus und somit die korrekte Integration. Das Gencluster wurde also fast immer an einer falschen Stelle in das Genom integriert. Interessanterweise konnten bei einigen dieser falschen Klone sämtliche gewünschte Banden mittels Colony-PCR amplifiziert werden. Das Gencluster schien also tatsächlich vorhanden zu sein, befand sich jedoch offenbar nicht am gewünschten Ort. Da keiner dieser Klone im späteren Verlauf eine Produktion aufwies, schien diese falsche Integration stets zu einer vollständigen Inaktivierung des Genclusters zu führen. Um diesen Umstand zu erklären, werden zwei Möglichkeiten vermutet, die sich aus den Unterschieden des inaktiven und des aktiven Genclusters ergeben. Beide Erklärungen sind zwar plausibel, jedoch bisher rein spekulativer Art. Die erste Möglichkeit bezieht sich auf die beiden Promotoraustauschkassetten. Die hierbei integrierten Promotoren könnten theoretisch zu falschen Rekombinationen innerhalb des Genoms geführt haben. Dies wäre insofern denkbar, da die Promotorsequenzen der Toolbox auf Basis bekannter *Bacillus subtilis* Promotoren erstellt wurden. Die DNA-Sequenzen dieser Promotoren sind also im Genom des Zielstammes bereits vorhanden gewesen. Doch die Größen dieser Bereiche sind mit ~50-100 bp wesentlich kleiner als die homologen Regionen für die Integration in den *amyE*-Locus (~500 und ~1000 bp). Daher sollte die korrekte Integration hier eigentlich bevorzugt werden. Außerdem wurden die Promotoren auch für eben diese Verwendung entwickelt. Ungewollte Rekombinationen wurden bei den Test-Transformationen der Toolbox nicht beschrieben, obwohl hierbei auch der *amyE*-Locus verwendet wurde (Guiziou et al. 2016). Die zweite Erklärung bezieht sich auf die Bioaktivität von FR-900493 und schließt Betrachtungen der Selbstresistenz mit ein. Diese Betrachtungen sollen im Folgenden etwas ausführlicher diskutiert werden. Zunächst muss hierfür bedacht werden, dass in diesem Projekt letztendlich ein Antibiotikum hergestellt wurde, auf das der Produzentenstamm selbst sensibel ist (Ochi et al. 1989). Zwar wird die Fähigkeit zur Selbstresistenz in der Regel mit dem Gencluster vermittelt – jedoch ist der Resistenzmechanismus für die Nukleosid-Antibiotika noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Co-Kristallisation von Muraymycin D2 mit der *MraY*-Translokase von *Aquiflex aeolicus* zeigte die essentielle Bedeutung der Aminoribose-Struktur (ADR) für die Bindung des Inhibitors (Chung et al. 2016). Da die verschiedenen Muraymycin Derivate D1, D2 und D3, die sich an Position 2' unterscheiden, keine wesentlichen Unterschiede in Ihrer Aktivität aufweisen, scheint diese Position nicht essentiell für die Bindung zu sein. Dagegen spielt offenbar die 3'-OH Gruppe eine wesentliche Rolle im Bindungsmechanismus. Im Rahmen ausführlicher Untersuchungen am Muraymycin konnte gezeigt werden, dass Veränderungen an dieser Stelle mit massiven Einbußen an inhibitorischer Aktivität einhergehen (Cui et al. 2018b). Im

entsprechenden Gencluster sind gleich zwei Gene vorhanden, die an dieser Stelle Funktionalisierungen vornehmen. Die Phosphotransferase Mur28 überträgt eine Phosphatgruppe, die Nukleotidyltransferase Mur29 führt eine Adenylierung durch (Cui et al. 2018b). Offenbar laufen beide Reaktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Biosynthese ab. Die Phosphorylierung tritt bevorzugt an der ADR-GlyU Zwischenstufe auf, wohingegen die Adenylierung eher die Gesamtstruktur betrifft. Diese funktionellen Gruppen werden offenbar spätestens beim Export der Muraymycine wieder entfernt. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, dass mit diesem Mechanismus die Selbstresistenz vermittelt wird. Bei Betrachtung des Caprazamycin Genclusters findet sich keine zu Mur29 vergleichbare Nukleotidyltransferase. Hier sind stattdessen zwei Phosphotransferasen vorhanden (*cpz12* und *cpz27*), welche ihrerseits Ähnlichkeiten zu Tunicamycin-Resistenzproteinen von *Deinococcus radiodurans* aufweisen (Kapp et al. 2008, Gust et al. 2013). Der konkrete Ablauf sowie das Zusammenspiel dieser beiden Gene sind jedoch noch unbekannt. Dass zumindest eines dieser Gene ebenfalls eine Phosphorylierung an der 3' Position bedingt, ist allerdings wahrscheinlich. Zumindest wurden bereits entsprechende Caprazamycin-Derivate mit einer 3'-Phosphargruppe beschrieben (Shiraishi et al. 2016). Interessanterweise konnten diese erst nach Deletion von *cpz23* identifiziert werden – ein Enzym, was die Verknüpfung des Diazepanon-Rings mit der Fettsäure katalysiert (Shiraishi et al. 2016). So kann auch in diesem Fall vermutet werden, dass die Phosphorylierung lediglich für die Resistenzvermittlung gegen biosynthetische Zwischenstufen verantwortlich ist. Phosphorylierte Caprazamycine in ihrer vollständigen Form wurden bisher nicht beschrieben. Auch bei den Capuramycinen wurde bereits ein analoger Resistenzmechanismus mittels Phosphorylierung an Position 3' der Hexuronsäure beschreiben (Yang et al. 2010). Funktionalisierungen an dieser Position scheinen also unter den verschiedenen Nukleosid-Antibiotika verbreitet zu sein. Es ist folglich durchaus plausibel, dass genau dadurch die Selbstresistenz vermittelt wird. Auch im Gencluster von *Bacillus cereus* VD169 befinden sich zwei Phosphotransferasen mit Ähnlichkeit zu *cpz12* und *cpz27*. Mit *IKA_05339* war eines dieser Gene bereits von Anfang an im synthetischen Gencluster vorhanden. Das zweite Gen (*IKA_05328*) lag jedoch im ausgeklammerten Mittelstück und war daher zum Zeitpunkt der Transformation des pBS1CTR03-Konstrukts noch nicht im Gencluster präsent. Es bestand somit die Möglichkeit, dass der Selbstresistenz-Mechanismus zu diesem Zeitpunkt noch nicht komplett war. Bei korrekter Integration in den *amyE*-Locus könnten somit potentiell letale Substanzen produziert worden sein, ohne dass der Stamm mit allen erforderlichen Resistenzgenen ausgestattet war. Die vielen falschen Rekombinationen bei der Transformation würden sich dann durch einen Selektionsdruck erklären, der nur Transformanten mit inaktivem Gencluster zulässt. Allerdings wurde mit Klon 6 auch ein Klon identifiziert, bei welchem das Gencluster korrekt integriert wurde. Und tatsächlich wies dieser Klon eine Produktion von FR-900493 auf. Da das jedoch nur bei einem von vielen Klonen der Fall war, könnte in diesem möglicherweise eine Spontanresistenz

aufgetreten sein oder der Klon zeigt eine verminderte Antibiotikaproduktion durch Mutation innerhalb eines biosynthetischen Gens. Letzteres würde die sehr geringe Produktion von FR-900493 und die deutliche Akkumulation der Vorstufen erklären. Gewissheit über diese Hypothesen würde jedoch erst eine Sequenzierung des Genclusters im Genom dieses Stammes ergeben. Eine solche wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde beschlossen, dass die zweite Phosphotransferase *IKA_05328* und gleichzeitig auch die mögliche Hydroxylase / Oxidoreduktase *IKA_05331* aus dem ausgeklammerten Mittelstück nachträglich in das Gencluster integriert werden sollten (siehe 3.6). Hierbei hätten diese Gene entweder in den bereits produzierenden Stamm eingebracht werden können (durch Integration in einen anderen Genlocus). Oder die Integration könnte bereits in *E. coli* erfolgen – also vor der Transformation in *Bacillus subtilis*. Aufgrund der Möglichkeit, dass Klon 6 durch die oben erklärten Umstände bereits Mutationen enthalten könnte, wurde hierbei die zweite Möglichkeit gewählt. Die beiden Gene sollten also an ein bereits aktives Operon angeschlossen werden und erst das resultierende Gesamtkonstrukt (pBS1CTR04) durch eine erneute Transformation in *Bacillus subtilis* eingebracht werden. Leider konnte diese Strategie nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Theoretisch wurde erwartet, dass die Transformationseffizienz nun wieder wesentlich höher sein müsste. Der hypothetische Selektionsdruck aufgrund unvollständiger Selbstresistenz hätte nun nicht mehr vorhanden sein sollen. Zwar konnten bei den Transformationen nun tatsächlich 21 Klone mit Verlust des Stärkeabbaus identifiziert werden – bei der Transformation ohne die beiden zusätzlichen Gene war es immerhin nur 1 Klon – doch zeigte hierbei die Colony-PCR, dass bei keinem dieser Klone das Gesamtkonstrukt vollständig integriert werden konnte. Gerade die beiden zusätzlichen Gene waren offenbar nicht vorhanden. In einigen Klonen fehlten aber auch andere Bereiche aus dem Gencluster. Offenbar schienen einzelne Abschnitte des Genclusters während der Transformation deletiert zu werden. Ein ungewöhnliches Verhalten, das bei den vorherigen Transformationen nicht beobachtet wurde. Typischerweise genügt zur Überprüfung eine Amplifikation des linken und des rechten Clusterendes. Bei vergleichbaren Transformationen wurde eben dies durchgeführt (Liu et al. 2016). Dass einzelne Teile offenbar willkürlich verloren gehen, ist untypisch. Eine verlässliche Selektion wird dadurch enorm erschwert. Letztendlich konnten bei diesen Transformationen tatsächlich 7 weitere Klone erhalten werden, die eine FR-Produktion aufwiesen. Die produzierten Mengen waren jedoch stets mit denen des bereits bekannten Klon 6 vergleichbar. Neue Substanzpeaks konnten ebenfalls nicht identifiziert werden. All diese Klone zeigten durch den Verlust des Stärkeabbaus eine korrekte Integration in den *amyE*-Locus auf. Sie zeigten auch, dass viele Bereiche des Genclusters amplifiziert werden konnten. Dies traf jedoch in keinem der Klone auf die beiden neu integrierten Gene zu. Ob letztendlich die Selbstresistenz doch ausreichend gegeben war und die Ursache der Transformationsprobleme eher auf ungewollten Rekombinationen durch die Promotorsequenzen beruhte, konnte

nicht final geklärt werden. Immerhin wurden mit den Peaks LB2 und LB4 zwei Substanzen identifiziert, die höchstwahrscheinlich eine phosphorylierte Aminoribose aufweisen. Die genaue Position konnte mit den eingesetzten Methoden allerdings nicht lokalisiert werden. Interessanterweise besitzt *Bacillus subtilis* bereits selbst ein Resistenzgen, welches für die Tunicamycin-Resistenz vermutet wird (Noda et al. 1992, Noda et al. 1995). Dieses Gen scheint ebenfalls eine Phosphotransferase zu sein. Es wäre also denkbar, dass das fehlende Gen des Mittelstücks durch dieses eigene Gen kompensiert wurde. Die enormen Schwierigkeiten bei der Transformation sowie die offenbar willkürlichen Deletionen blieben jedoch bis heute ein Rätsel. Die hier dargestellten Gründe sind theoretische Erklärungsversuche. Ihre Diskussion ist sinnvoll – für konkrete Aussagen sollten jedoch Gesamtsequenzierungen verschiedener Transformaten durchgeführt werden. Erst auf Grundlage solcher Daten könnten weitere Diskussionen der dargestellten Beobachtungen in verlässlicher Weise geführt werden.

4.5 Produktion des Antibiotikums FR-900493

Zur Identifizierung der produzierten Substanzen sollten die in Klon 6 gefundenen Peaks analytisch näher untersucht werden. In dieser Arbeit wurden die analytischen Betrachtungen stets mit den reinen, mehrfach abzentrifugierten Kulturüberständen durchgeführt. Die ebenfalls vorgenommenen Extraktionsversuche, welche auf Vorschriften zur Isolierung der Caprazamycine beruhten, waren für FR-900493 und dessen Vorstufen ungeeignet. Dies lässt sich durch die größere Lipophilie der Caprazamycine aufgrund der vorhandenen Fettsäure erklären. Da jedoch die Analyse der Kulturüberstände unter Verwendung von Methode 3 eine ausreichende Peakauftrennung ergab, wurde das Hauptaugenmerk in der verbliebenen Zeit nicht auf die analytische Optimierung bzw. die Entwicklung eines geeigneten Extraktionsverfahrens gelegt. Mit den aufgesammelten Peaks aus vielen HPLC-Läufen konnten diese schließlich soweit konzentriert und aufgereinigt werden, dass saubere HR-MS Messungen möglich waren. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle erneut an Prof. Dr. Satoshi Ichikawa: Durch die Zurverfügungstellung eines FR-900493 Standards war eine Vergleichssubstanz vorhanden, was die analytischen Arbeiten enorm erleichtert hat. Hiermit war insbesondere ein Vergleich der HR-MS bzw. HR-MS² Messwerte möglich, was letztendlich den Beweis des Vorhandenseins von FR-900493 in den Kulturen des untersuchten Klons erbrachte. Die Messwerte waren hier zwischen dem Standard und dem entsprechenden Peak quasi identisch. Aufgrund der sehr charakteristischen Fragmentierung konnten zudem Strukturvorhersagen über die isolierten Vorstufen durchgeführt werden. Die Herleitungen dazu werden ausführlich unter (3.5.4) diskutiert. Zur endgültigen Bestätigung wären noch zusätzliche NMR-Messungen sinnvoll. Hierzu müssten die Substanzen jedoch zunächst in größeren Mengen und mit höherer Reinheit isoliert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Zusätzlich wäre eine

Quantifizierung der produzierten Substanzen wünschenswert. Da die isolierten Mengen jedoch sehr gering waren, konnten diese per Wägung nicht festgestellt werden. Eine Quantifizierung durch Vergleich der Peakflächen mit dem Standard war hier leider auch nicht möglich, da uns dessen Konzentration nicht bekannt war. Die erfolgreiche Produktion des Antibiotikums FR-900493 und der identifizierten Vorstufen konnten jedoch qualitativ nachgewiesen werden.

4.6 Biosynthetische Betrachtungen

Zum Abschluss dieser Arbeit soll eine Diskussion bezüglich der Biosynthese von FR-900493 in Hinblick auf das synthetische Gencluster vorgenommen werden. Hierzu ist im Folgenden eine Übersicht aller vorhandenen Gene dargestellt, die mit den zugehörigen homologen aus dem Caprazamycin bzw. dem Muraymycin Gencluster verglichen werden. Die mittels BLAST Analyse prognostizierte Identität bzw. Ähnlichkeit ist in Klammern den entsprechenden Genen angefügt. Sofern eine Homologie nur mittels Phyre2 gefunden wurde, fehlt diese Angabe. Die betreffenden Gene sind in blauer Farbe dargestellt. Die Gene mit weißem Hintergrund stammen aus dem ausgeklammerten Stück und waren im synthetischen Gencluster nicht enthalten.

Gen-Bezeichnung (AmS)	Caprazamycin (Ident. / Sim.)	Muraymycin (Ident. / Sim.)	Prognostizierte Funktion
<i>IKA_05317</i> (296)	<i>cpz15</i> (30/46)	<i>mur16</i> (31/49)	Dioxygenase
<i>IKA_05318</i> (431)		<i>mur23</i>	Decarboxylase
<i>IKA_05319</i> (360)			Malat / L-Lactat-Dehydrogenase
<i>IKA_05320</i> (506)		<i>mur21</i> (22/38)	Acyl-CoA-Synthetase
<i>IKA_05321</i> (82)			Acyl-Carrier-Protein
<i>IKA_05322</i> (444)	<i>cpz19</i> (34/53)	<i>mur26</i> (41/60)	Pyrimidin-Nukleosid Phosphorylase
<i>IKA_05323</i> (418)			Phenylacetat-CoA-Ligase
<i>IKA_05324</i> (438)	<i>cpz14</i> (39/59)	<i>mur17</i> (42/58)	Serin-Glycin-Hydroxymethyltransferase
<i>IKA_05325</i> (440)	<i>cpz18</i> (27/46)	<i>mur20</i> (35/54)	Aminotransferase
<i>IKA_05326</i> (49)			Transposase
<i>IKA_05327</i> (116)			Hypothetisches Protein
<i>IKA_05328</i> (169)	<i>cpz12 / cpz27</i>	<i>mur28</i>	Nukleosid- / Nukleotid-Kinase
<i>IKA_05329</i> (62)			Transposase
<i>IKA_05330</i> (385)			Transposase
<i>IKA_05331</i> (409)			Hydroxylase / Oxidoreduktase
<i>IKA_05332</i> (151)			Transposase
<i>IKA_05333</i> (101)			Transposase
<i>IKA_05334</i> (150)			Hypothetisches Protein
<i>IKA_05335</i> (517)	<i>cpz13</i>	<i>mur24</i>	PLP abhängige Transferase
<i>IKA_05336</i> (268)			HAD-Phosphatase
<i>IKA_05337</i> (414)	<i>cpz17</i> (27/45)	<i>mur19</i> (33/52)	Glycosyltransferase
<i>IKA_05338</i> (247)	<i>cpz16</i>	<i>mur18</i> (26/47)	Nukleotidyltransferase
<i>IKA_05339</i> (351)	<i>cpz12 / cpz27</i>	<i>mur28</i>	Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>IKA_05340</i> (566)	<i>cpz22</i> (20/43)		ABC-Transporter
<i>IKA_05341</i> (546)	<i>cpz22</i> (25/44)		ABC-Transporter
<i>IKA_05342</i> (566)	<i>cpz26</i> (27/44)		SAM-N-Methyltransferase
<i>IKA_05343</i> (331)			Cystein Proteinase / Hydrolase
<i>IKA_05344</i> (187)			Hypothetisches Protein

Tabelle 31: Vergleich des Genclusters mit den homologen Genen.

Die Biosynthese des ADR-GlyU Elements scheint in sämtlichen strukturverwandten Substanzen, namentlich den Caprazamycinen, den Liposidomycinen, den Strukturen von A90289, den Muraminomicinen, den Sphaerimicinen und den Muraymycinen analog abzulaufen (Kaysser et al. 2009, Funabashi et al. 2010, Kaysser et al. 2010, Cheng et al. 2011, Chi et al. 2013, Funabashi et al. 2013). Bereits vor einigen Jahren wurden hierzu verschiedene Untersuchungen am Beispiel von A-90289 durchgeführt und die entsprechenden Biosyntheseschritte aufgezeigt (Chi et al. 2011, Yang et al. 2011, Barnard-Britson et al. 2012). Analoge Ergebnisse wurden jüngst auch am Beispiel des Muraymycins erhalten (Cui et al. 2018a). Hier wurden insgesamt 6 Gene für die Biosynthese der Grundstruktur beschrieben. Da auch in den Genclustern der anderen Substanzen entsprechende Genhomologe vorhanden sind, scheint dieser Mechanismus in allen Antibiotika derselben Grundstruktur in gleicher Weise abzulaufen. Für FR-900493 war bisher kein Gencluster bekannt. Deshalb konnte hier eine entsprechende Aussage nur vermutet werden. Diese Arbeit zeigt jedoch, dass auch im Gencluster von *Bacillus cereus* VD169 sämtliche homologen Gene für die Bildung dieser Grundstruktur vorhanden sind. Somit kann auch hier von einem analogen Biosyntheseweg auf Basis der bereits bekannten Mechanismen ausgegangen werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wird im Folgenden ein hypothetischer Biosyntheseweg für FR-900493 mit den Genen des rekonstruierten Genclusters postuliert, welcher auf den o.g. Quellen beruht. Die homologen Gene sind zusätzlich stets in Klammern aufgeführt. Eine grafische Übersicht ist in (Abbildung 47) dargestellt.

Als initialer Schritt erfolgt zunächst die Umwandlung von Uridinmonophosphat (UMP) zum Uridin-5'-aldehyd. Katalysiert wird diese Reaktion von der Dioxygenase *IKA_05317* (*cpz15*, *mur16*), welche die oxidative Dephosphorylierung unter Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Succinat ausführt. Ausgehend vom Uridin-5'-aldehyd erfolgt nun sowohl der Aufbau der GlyU-Struktur, als auch die der Aminoribose (ADR). Im ersten Fall findet die Übertragung der Glycylstruktur durch die Serin-Glycin-Hydroxymethyltransferase *IKA_05324* (*cpz15*, *mur17*) statt. Als Substrat dient vermutlich L-Thr. Im zweiten Fall erfolgt zunächst eine Transaminierung unter Verwendung von L-Met zum 5'-Amino-5'-desoxyuridin. Diese Reaktion wird von der PLP-abhängigen Aminotransferase *IKA_05325* (*cpz18*, *mur20*) katalysiert. Anschließend wird der Uracil-Rest durch die Pyrimidin-Nukleosid-Phosphorylase *IKA_05322* (*cpz19*, *mur26*) abgespalten. Es resultiert die Zwischenstufe 5-Amino-5-desoxyribose-1-phosphat, welche anschließend mittels UTP zur UDP-5-amino-5-desoxyribose umgewandelt wird. Für die Umwandlung dient die Nukleotidyltransferase *IKA_05338* (*cpz16*, *mur18*). Die dadurch entstandene Zwischenstufe wird schließlich mit dem bereits beschriebenen GlyU zur vollständigen ADR-GlyU Grundstruktur verknüpft. Katalysiert wird diese Reaktion von der Glycosyltransferase *IKA_05337* (*cpz17*, *mur19*). Die weiteren Reaktionsschritte zum FR-900493 sind weniger gut untersucht und biochemisch bisher nicht charakterisiert. Ausgehend vom ADR-GlyU stehen noch die Methylierung und die Verbindung mit dem Aminopropylrest aus. Beide

Substituierungen betreffen die 6'-Aminogruppe. Die Methylierung wird höchstwahrscheinlich von der SAM-N-Methyltransferase *IKA_05342* (*cpz26*) durchgeführt. Da sämtliche Vertreter der Muraymycine an dieser Stelle nicht methyliert sind, existiert im Muraymycin Gencluster hierfür kein entsprechendes Gen (Cheng et al. 2011). Im Caprazamycin Gencluster existieren dagegen mit *cpz11* und *cpz26* gleich zwei solcher N-Methyltransferasen (Kaysser et al. 2009, Gust et al. 2013). Das Gen *IKA_05342* weist jedoch stärkere Homologie zu *cpz26* auf. Die Aminopropylgruppe am 6'-N stammt höchstwahrscheinlich aus einer Übertragung eines 3-Amino-3-carboxypropyl Rests ausgehend von SAM (Gust et al. 2013), welcher anschließend decarboxyliert wird. Für die Übertragung wird die PLP abhängige Transferase *IKA_05335* (*cpz13*, *mur24*) vermutet. Die Abspaltung der Carboxylgruppe wird vermutlich von der Decarboxylase *IKA_05318* (*mur23*) katalysiert (Cheng et al. 2011). Da bei den Caprazamycinen eine Decarboxylierung nicht erfolgt, ist hier kein entsprechendes Gen vorhanden. Somit kann die reine Biosynthese durch insgesamt 9 Gene bis zum FR-900493 beschrieben werden. Der Resistenzmechanismus ist im Kapitel (4.4) bereits ausführlich diskutiert worden. Die Phosphotransferase *IKA_05339* (*cpz12*, *cpz27*, *mur28*) kommt für die Phosphorylierung am 3''-OH der ADR-Struktur in Frage. Theoretisch ist dies bei den heterologen Produzenten auch durch das native Tunicamycin-Resistenzgen von *Bacillus subtilis* denkbar. Das Gen *IKA_05328* (*cpz12*, *cpz27*, *mur28*) ist auch eine Phosphotransferase und könnte daher ebenfalls mit dem Resistenzmechanismus in Verbindung stehen. Mit dem Gen *IKA_05336* steht eine HAD-Phosphatase zur Verfügung. Ihre genaue Funktion ist bisher unklar. Möglicherweise spielt sie bei der Abspaltung der 3''-Phosphatgruppe eine Rolle. Die beiden Gene *IKA_05340* und *IKA_05341* stellen ABC-Transporter dar, die Homologie zu *cpz22* aufweisen. Solche Transporter sind häufig in biosynthetischen Gencluster für Antibiotika anzutreffen. Dort bedingen sie typischerweise den Export der Substanzen und sind somit möglicherweise auch bei der Vermittlung der Selbstresistenz beteiligt. Das Gen *IKA_05320* wird als Acyl-CoA-Synthetase prognostiziert. Die gefundenen homologen Gene sind größtenteils für eine Aktivierung langkettiger Fettsäuren durch Kopplung derselben an Coenzym A verantwortlich. Es zeigt jedoch auch Homologie zu *mur21*, welches eine NRPS A- und T-Domäne umfasst. Die Ähnlichkeit besteht hier jedoch nur zur A-Domäne. Interessanterweise befindet sich direkt neben diesem Gen ein Acyl-Carrier-Protein (*IKA_05321*). Dieses könnte daher die entsprechende T-Domäne darstellen. Auch das Gen *IKA_05323*, eine vermutliche Phenylacetat-CoA Ligase, zeigt eine weitere Aktivierungsreaktion durch Kopplung an Coenzym A an. Es sind folglich zwei Gene vorhanden, die möglicherweise Fettsäuren, Aminosäuren oder andere Carbonsäuregruppen aktivieren können. In einem der Gene liegt in direkter Nachbarschaft ein ACP. Mit den durchgeführten bioinformatischen Vergleichen mittels BLAST-Analyse und Phyre2 konnten die konkreten Funktionen dieser Gene jedoch nicht abschließend geklärt werden. Dass sie eine Funktion in der Biosynthese der FR-900493 Struktur besitzen, ist jedoch unwahrscheinlich, da deren

Ablauf bereits umfassend aufgeklärt ist. Somit kann hier im Prinzip nur folgender Schluss gezogen werden: Das Gencluster enthält noch weitere Biosynthese-Gene, deren Funktion in FR-900493 noch nicht abgebildet ist. Es wäre also denkbar, dass FR-900493 selbst nur ein Zwischenprodukt darstellt. Das Endprodukt dieses Genclusters wäre somit noch unbekannt. Möglicherweise könnten Derivate mit angefügten Fettsäuren oder Aminosäuren gebildet werden. Im Gencluster finden sich allerdings keine Gene, die eindeutig auf eine Übertragung aktivierter Carbonsäuren hindeuten. Die Fettsäureübertragung erfolgt bei den Caprazamycinen durch die Lipase *cpz23*, die Übertragung des Methylglutarylrests über die Carboxyesterase *cpz21* (Gust et al. 2013). Vergleichbare Gene finden sich im Gencluster aus *Bacillus cereus* VD169 jedoch nicht. Für die Übertragung des Peptidstücks vom ACP auf die Aminopropylkette der ADR-GlyU Struktur wird in der Muraymycin-Biosynthese das Gen *mur30* vermutet (Cheng et al. 2011). Dieses wird funktionell als β -Lactamase bzw. Hydrolase prognostiziert. Mit dem Gen *IKA_05343* befindet sich im synthetischen Gencluster eine Cystein Proteinase bzw. Hydrolase. Möglicherweise könnte diese für eine entsprechende Übertragung verantwortlich sein. Bisher völlig unbekannt in Hinblick auf ihre biosynthetischen Funktionen sind die Gene *IKA_05319* (eine Malat / L-Lactat-Dehydrogenase), *IKA_05331* (eine Hydroxylase / Oxidoreduktase) sowie *IKA_05344* (ein hypothetisches Protein). Da keine homologen Gene in den bekannten Genclustern gefunden wurden, kann an dieser Stelle keine vernünftige Prognose gegeben werden.

Es lässt sich somit zusammenfassen: Alle Gene bis zur FR-900493 Grundstruktur konnten identifiziert werden. Ein analoger Ablauf zum bereits bekannten Mechanismus ist somit sehr wahrscheinlich. Für den möglichen Resistenzmechanismus existieren zwei ABC-Transporter, eine Phosphotransferase und eine Phosphatase. Eine zweite Phosphotransferase aus dem ausgeklammerten Mittelstück ist im synthetischen Gencluster noch nicht vorhanden. Versuche, diese nachträglich zu integrieren, verliefen bisher ohne Erfolg. Zusätzlich existieren zwei Gene für Aktivierungsreaktionen von Carboxylgruppen (möglicherweise für Fettsäuren oder Aminosäuren). Eines dieser Gene enthält ein ACP in direkter Nachbarschaft. Zusätzlich existiert eine Proteinase bzw. Hydrolase, die möglicherweise für eine Übertragungsreaktion in Frage kommt. Die genauen Funktionen dieser drei Gene sind bisher jedoch unklar – mögliche Strukturelemente finden sich in FR-900493 allerdings nicht. Darüber hinaus existieren drei weitere Gene mit unbekannter Funktion in Hinblick auf die Biosynthese. Eines dieser Gene ist im synthetischen Gencluster nicht enthalten. Auch hier verliefen die Versuche zur nachträglichen Integration bisher nicht erfolgreich. Somit könnte FR-900493 tatsächlich nur ein Zwischenprodukt dieses Genclusters darstellen. Es ist möglich, dass weitere Strukturen mit angefügten Fettsäuren oder Aminosäuren produziert werden könnten. Warum diese Strukturen bisher nicht identifiziert werden konnten, ist bisher unklar. Ein möglicher Faktor könnte jedoch eine wesentliche Rolle spielen: Der heterologe Produzent *Bacillus subtilis* 168 besitzt ein defektes *sfp* Gen (Zeigler et al. 2008), welches als 4'-Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase)

für die Aktivierung von Acyl-Carrier-Proteinen durch Übertragung einer essentiellen prosthetischen Gruppe verantwortlich ist. Im Falle von *Bacillus subtilis* 168 ist dieses Gen durch eine T-Insertion mutiert und folglich dysfunktional (Liu et al. 2016). Dieser Umstand würde bedeuten, dass das ACP *IKA_05321* im synthetischen Gencluster nicht aktiviert werden kann. Folglich würde auch die Übertragung der betroffenen Struktur unterbleiben. Es ist zwar bisher unklar, welches Strukturelement hier übertragen werden soll, bzw. ob es nur eines oder mehrere Elemente sind. Doch durch das Vorhandensein eines ACPs kann gefolgert werden, dass dieses in der Übertragung eines noch unbekanntes Strukturelements eine Rolle spielen könnte.

Aufgrund dieses Umstandes wurden bereits ergänzende Transformationen der synthetischen Konstrukte pBS1CTR03 und pBS1CTR04 durchgeführt. Hierbei wurde als Zielstamm *Bacillus subtilis* OKB120 verwendet (Nakano et al. 1988). Dieser besitzt im Vergleich zu Stamm 168 ein funktionelles *sfp* Gen. Das Acyl-Carrier-Protein sollte hier demnach in seiner aktiven Form vorliegen und somit sämtliche Funktionen erfüllen können. Leider konnte auch nach zahlreichen Transformationsversuchen keine korrekte Integration der Konstrukte erzielt werden. Von drei Klonen mit Verlust des Stärkeabbaus zeigte keiner die gewünschten Banden mittels Colony-PCR. Die Integration des pBS1C-Leervektors gelang jedoch auch hier völlig problemlos.

4.7 Ausblick

Um die Ergebnisse dieser Arbeit noch weiter zu ergänzen, könnten am synthetischen Gencluster noch zusätzliche Versuche zur Integration der beiden ausgeklammerten Gene vorgenommen werden. Da die Transformation der Gesamtkonstrukte offenbar problembehaftet ist, könnte hierzu alternativ ein Klon verwendet werden, der bereits eine Produktion von FR-900493 aufweist und somit das ursprüngliche Gencluster in seiner aktivierten Form bereits enthält (*Bacillus subtilis* / pBS1CTR03). In einen solchen Klon müssten folglich nur noch die fehlenden Gene transformiert werden – die zu integrierenden Konstrukte wären also wesentlich kleiner. Die Integration könnte über Vektoren erfolgen, die in andere Positionen integrieren (wie beispielsweise dem *lacA* Gen). Entsprechende Vektoren sind verfügbar und können analog zum pBS1C-Vektor eingesetzt werden (Popp et al. 2017). Auf dieselbe Weise könnte der betreffende Stamm auch um ein aktives *sfp* Gen komplementiert werden. Dadurch würden sich möglicherweise neue Strukturen mit ADR-GlyU Kern ergeben. Um etwaige Mutationen in dem hierfür verwendeten Stamm auszuschließen, wäre jedoch eine vorherige Sequenzierung sinnvoll. Zusätzlich könnte eine umfassende Analyse verschiedener Produktionsmedien durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bisher zwei verschiedene Medien analytisch näher betrachtet. Da diese teilweise unterschiedliche Vorstufen enthielten und sich auch die produzierten Mengen an FR-900493 signifikant unterschieden haben, könnte ein umfassender Medienscreen in weiterführenden Experimenten durchaus vielversprechend sein.

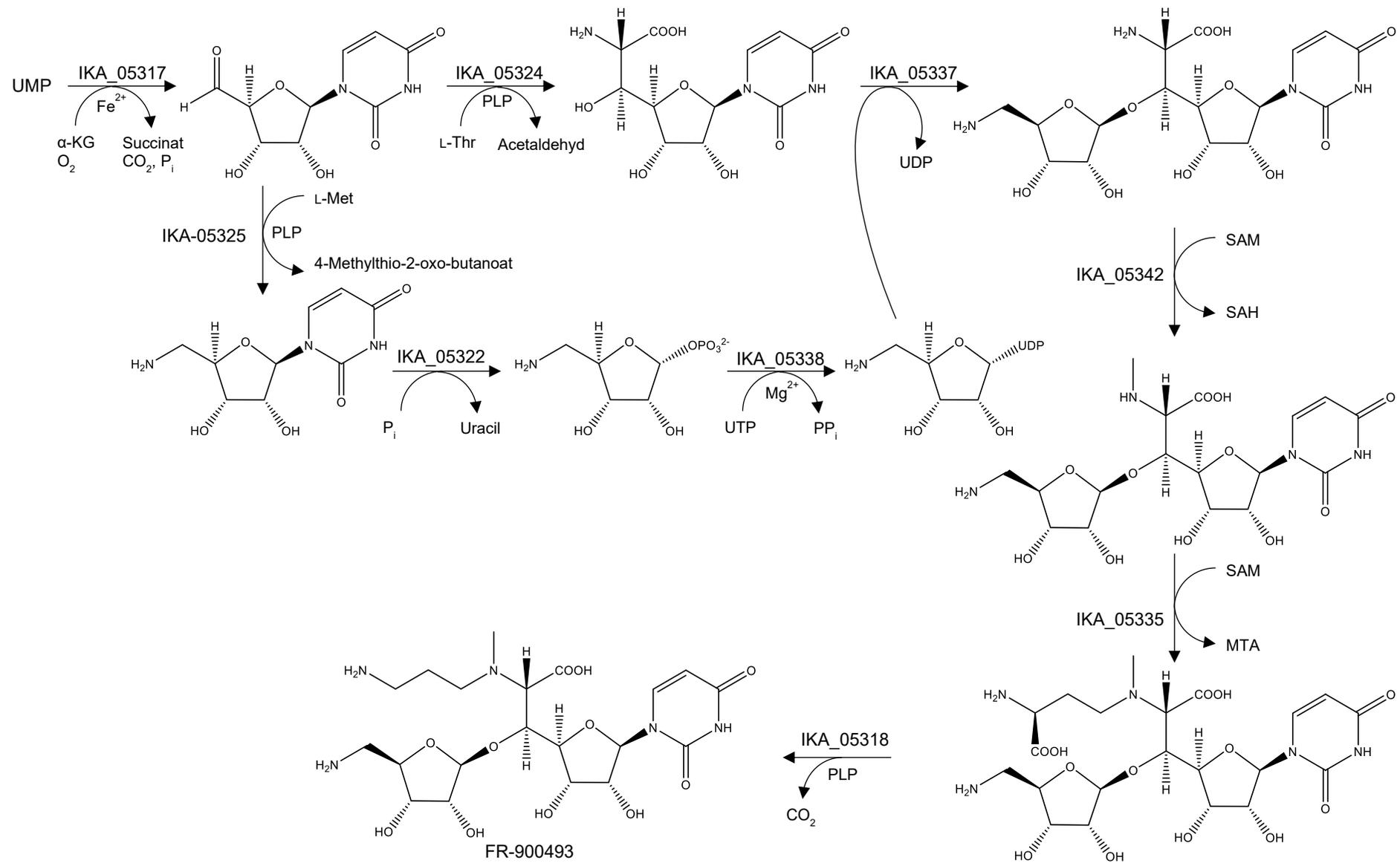
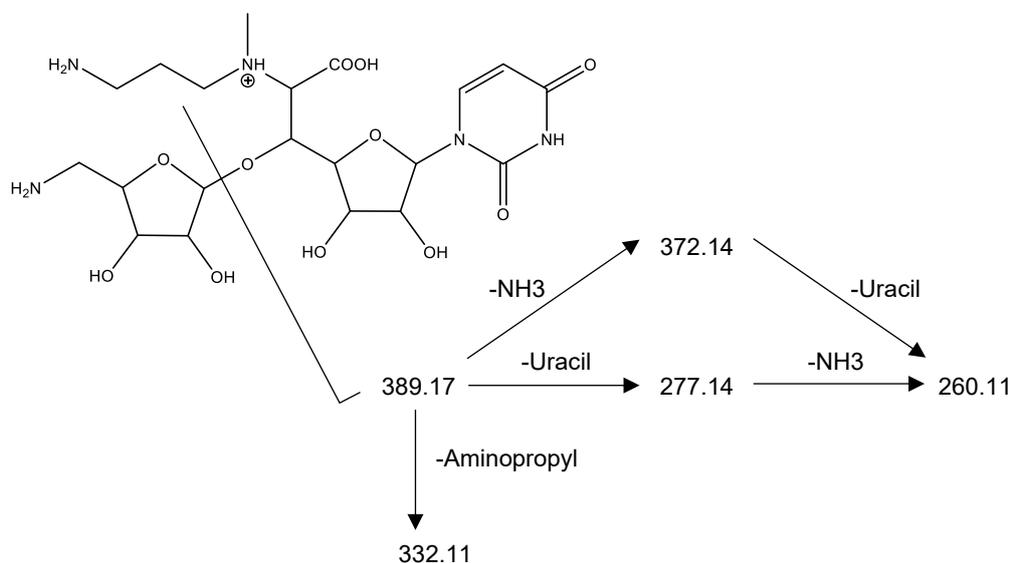


Abbildung 47: Hypothetischer Biosyntheseweg für FR-900493.

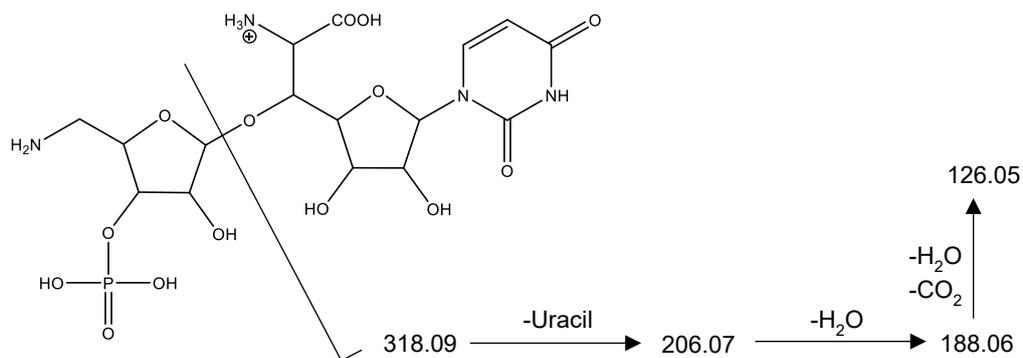
Anhang

Anhang 1: Fragmentierung $m/z = 520.22 [M+H]^+$ (Peak LB1 / Peak P1 / FR-900493). X
 Anhang 2: Fragmentierung $m/z = 529.12 [M+H]^+$ (Peak LB2). X
 Anhang 3: Fragmentierung $m/z = 318.09 [M+H]^+$ (Peak LB3 / Peak P5). XI
 Anhang 4: Fragmentierung $m/z = 543.13 [M+H]^+$ (Peak LB4). XI
 Anhang 5: Fragmentierung $m/z = 332.11 [M+H]^+$ (Peak LB5 / Peak P6). XI
 Anhang 6: Fragmentierung $m/z = 449.15 [M+H]^+$ (Peak P2). XII
 Anhang 7: Fragmentierung $m/z = 389.17 [M+H]^+$ (Peak P3). XII
 Anhang 8: Fragmentierung $m/z = 463.17 [M+H]^+$ (Peak P4). XII

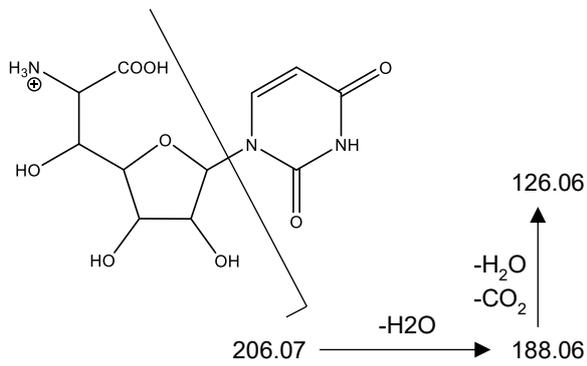
Anhang 1: Fragmentierung $m/z = 520.22 [M+H]^+$ (Peak LB1 / Peak P1 / FR-900493).



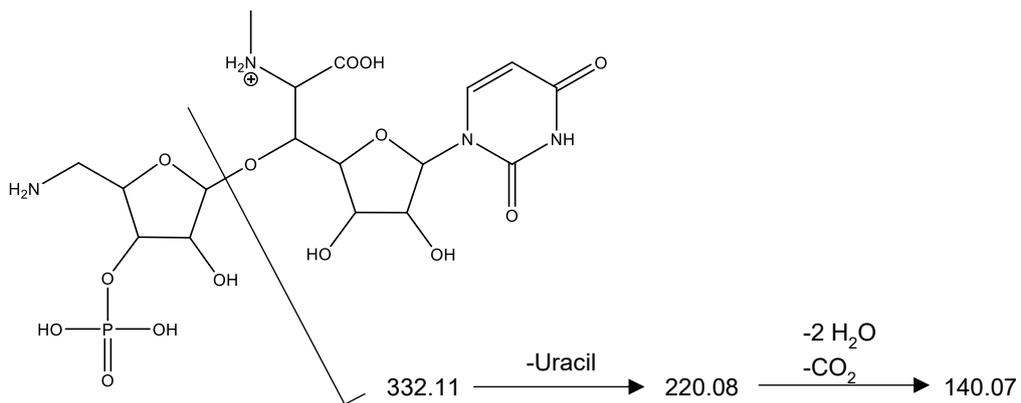
Anhang 2: Fragmentierung $m/z = 529.12 [M+H]^+$ (Peak LB2).



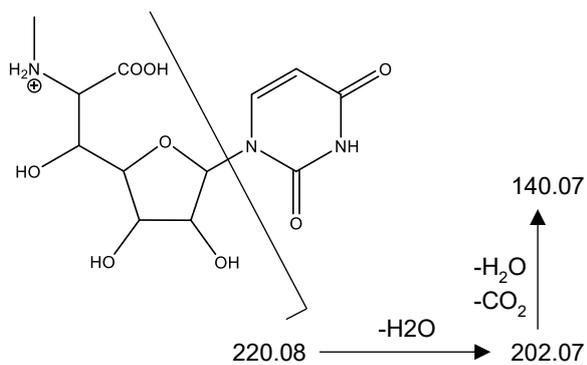
Anhang 3: Fragmentierung $m/z = 318.09 [M+H]^+$ (Peak LB3 / Peak P5).



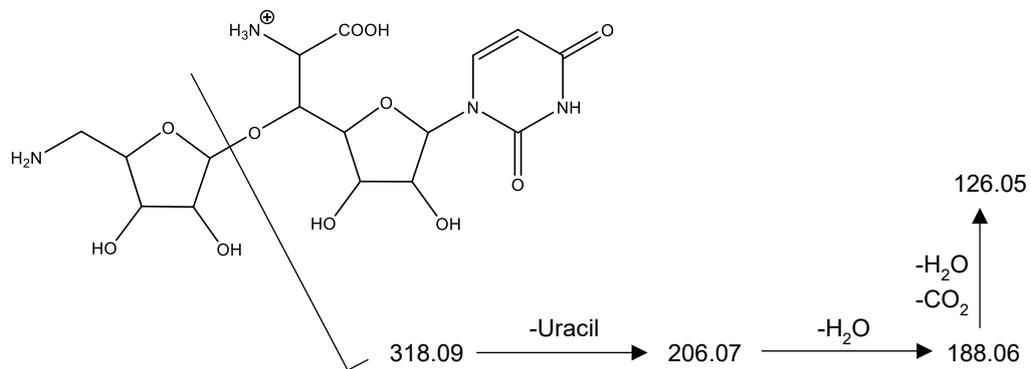
Anhang 4: Fragmentierung $m/z = 543.13 [M+H]^+$ (Peak LB4).



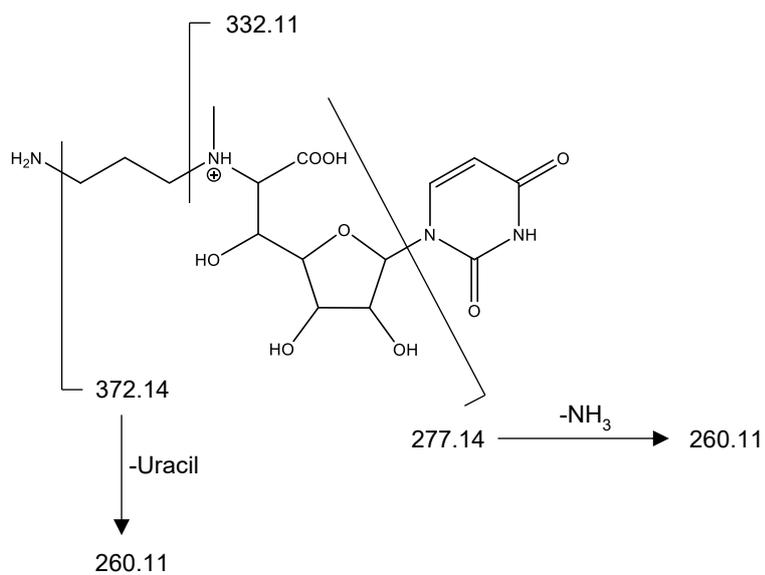
Anhang 5: Fragmentierung $m/z = 332.11 [M+H]^+$ (Peak LB5 / Peak P6).



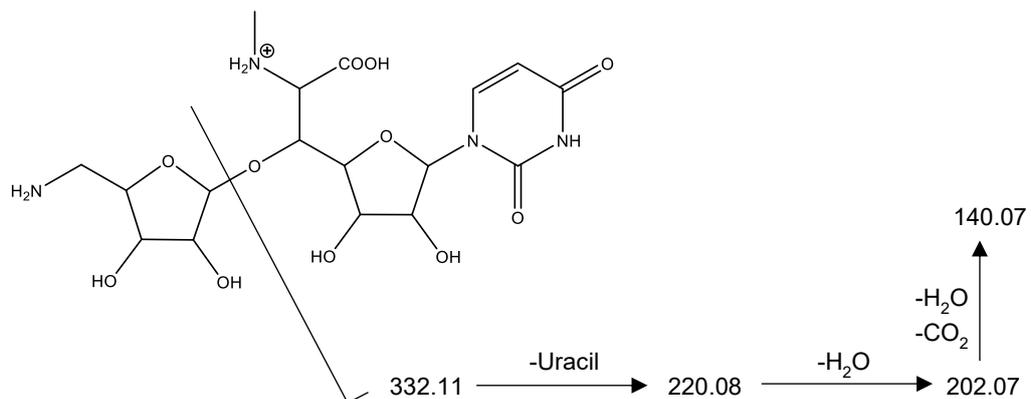
Anhang 6: Fragmentierung $m/z = 449.15 [M+H]^+$ (Peak P2).



Anhang 7: Fragmentierung $m/z = 389.17 [M+H]^+$ (Peak P3).



Anhang 8: Fragmentierung $m/z = 463.17 [M+H]^+$ (Peak P4).



Literaturverzeichnis

1.) **Abdelmohsen U. R., Grkovic T., Balasubramanian S., Kamel M. S., Quinn R. J. and Hentschel U.** (2015). "Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes." *Biotechnol Adv* **33**(6 Pt 1): 798-811.

2.) **Al-Dabbagh B., Henry X., El Ghachi M., Auger G., Blanot D., Parquet C., Mengin-Lecreulx D. and Bouhss A.** (2008). "Active site mapping of MraY, a member of the polyprenylphosphate N-acetylhexosamine 1-phosphate transferase superfamily, catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis." *Biochemistry* **47**(34): 8919-8928.

3.) **Alanis A. J.** (2005). "Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?" *Arch Med Res* **36**(6): 697-705.

4.) **Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J.** (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.

5.) **Anderson J. C., Dueber J. E., Leguia M., Wu G. C., Goler J. A., Arkin A. P. and Keasling J. D.** (2010). "BglBricks: A flexible standard for biological part assembly." *J Biol Eng* **4**(1): 1.

6.) **Andriole V. T.** (1993). "The future of the quinolones." *Drugs* **45 Suppl 3**: 1-7.

7.) **Barbe V., Cruveiller S., Kunst F., Lenoble P., Meurice G., Sekowska A., Vallenet D., Wang T., Moszer I., Medigue C. and Danchin A.** (2009). "From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later." *Microbiology* **155**(Pt 6): 1758-1775.

8.) **Barnard-Britson S., Chi X., Nonaka K., Spork A. P., Tibrewal N., Goswami A., Pahari P., Ducho C., Rohr J. and Van Lanen S. G.** (2012). "Amalgamation of nucleosides and amino acids in antibiotic biosynthesis: discovery of an L-threonine:uridine-5'-aldehyde transaldolase." *J Am Chem Soc* **134**(45): 18514-18517.

9.) **Barreteau H., Kovac A., Boniface A., Sova M., Gobec S. and Blanot D.** (2008). "Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis." *FEMS Microbiol Rev* **32**(2): 168-207.

10.) **Basitta P., Westrich L., Rösch M., Kulik A., Gust B. and Apel A. K.** (2017). "AGOS: A Plug-and-Play Method for the Assembly of Artificial Gene Operons into Functional Biosynthetic Gene Clusters." *ACS Synthetic Biology* **6**(5): 817-825.

11.) **Blin K., Medema M. H., Kazempour D., Fischbach M. A., Breitling R., Takano E. and Weber T.** (2013). "antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers." Nucleic Acids Res **41**(Web Server issue): W204-212.

12.) **Bugg T. D., Braddick D., Dowson C. G. and Roper D. I.** (2011). "Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target." Trends Biotechnol **29**(4): 167-173.

13.) **Burkholder P. R. and Giles N. H., Jr.** (1947). "Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*." Am J Bot **34**(6): 345-348.

14.) **Cai W., Goswami A., Yang Z., Liu X., Green K. D., Barnard-Britson S., Baba S., Funabashi M., Nonaka K., Sunkara M., Morris A. J., Spork A. P., Ducho C., Garneau-Tsodikova S., Thorson J. S. and Van Lanen S. G.** (2015). "The Biosynthesis of Capuramycin-type Antibiotics: IDENTIFICATION OF THE A-102395 BIOSYNTHETIC GENE CLUSTER, MECHANISM OF SELF-RESISTANCE, AND FORMATION OF URIDINE-5'-CARBOXAMIDE." J Biol Chem **290**(22): 13710-13724.

15.) **Carver T., Harris S. R., Berriman M., Parkhill J. and McQuillan J. A.** (2012). "Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data." Bioinformatics (Oxford, England) **28**(4): 464-469.

16.) **Chao R., Yuan Y. and Zhao H.** (2015). "Recent advances in DNA assembly technologies." FEMS yeast research **15**(1): 1-9.

17.) **Chatterjee S., Nadkarni S. R., Vijayakumar E. K., Patel M. V., Ganguli B. N., Fehlhaber H. W. and Vertesy L.** (1994). "Napsamycins, new *Pseudomonas* active antibiotics of the mureidomycin family from *Streptomyces* sp. HIL Y-82,11372." J Antibiot (Tokyo) **47**(5): 595-598.

18.) **Chen W. H., Qin Z. J., Wang J. and Zhao G. P.** (2013). "The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly." Nucleic Acids Res **41**(8): e93.

19.) **Cheng L., Chen W., Zhai L., Xu D., Huang T., Lin S., Zhou X. and Deng Z.** (2011). "Identification of the gene cluster involved in muraymycin biosynthesis from *Streptomyces* sp. NRRL 30471." Mol Biosyst **7**(3): 920-927.

20.) **Chi X., Baba S., Tibrewal N., Funabashi M., Nonaka K. and Van Lanen S. G.** (2013). "The muraminomicin biosynthetic gene cluster and enzymatic formation of the 2-deoxyaminoribosyl appendage." Medchemcomm **4**(1): 239-243.

21.) Chi X., Pahari P., Nonaka K. and Van Lanen S. G. (2011). "Biosynthetic origin and mechanism of formation of the aminoribosyl moiety of peptidyl nucleoside antibiotics." J Am Chem Soc **133**(36): 14452-14459.

22.) Christiansen A. (2016). "Synthetic Biology and the Moral Significance of Artificial Life: A Reply to Douglas, Powell and Savulescu." Bioethics **30**(5): 372-379.

23.) Chung B. C., Mashalidis E. H., Tanino T., Kim M., Matsuda A., Hong J., Ichikawa S. and Lee S. Y. (2016). "Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis." Nature **533**(7604): 557-560.

24.) Chung B. C., Zhao J., Gillespie R. A., Kwon D. Y., Guan Z., Hong J., Zhou P. and Lee S. Y. (2013). "Crystal structure of MraY, an essential membrane enzyme for bacterial cell wall synthesis." Science **341**(6149): 1012-1016.

25.) Cui Z., Liu X., Overbay J., Cai W., Wang X., Lemke A., Wiegmann D., Niro G., Thorson J. S., Ducho C. and Van Lanen S. G. (2018a). "Enzymatic Synthesis of the Ribosylated Glycyl-Uridine Disaccharide Core of Peptidyl Nucleoside Antibiotics." J Org Chem **83**(13): 7239-7249.

26.) Cui Z., Wang X. C., Liu X., Lemke A., Koppermann S., Ducho C., Rohr J., Thorson J. S. and Van Lanen S. G. (2018b). "Self-Resistance during Muraymycin Biosynthesis: a Complementary Nucleotidyltransferase and Phosphotransferase with Identical Modification Sites and Distinct Temporal Order." Antimicrob Agents Chemother **62**(7).

27.) Datsenko K. A. and Wanner B. L. (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.

28.) Douglas T., Powell R. and Savulescu J. (2013). "Is the creation of artificial life morally significant?" Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences **44**(4 Pt B): 688-696.

29.) Earl A. M., Losick R. and Kolter R. (2008). "Ecology and genomics of Bacillus subtilis." Trends Microbiol **16**(6): 269-275.

30.) Engler C., Kandzia R. and Marillonnet S. (2008). "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability." PLoS One **3**(11): e3647.

- 31.) Fernandes P.** (2006). "Antibacterial discovery and development--the failure of success?" Nat Biotechnol **24**(12): 1497-1503.
- 32.) Fleming A.** (1929). "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae." British journal of experimental pathology **10**(3): 226-236.
- 33.) Franke J., Ishida K. and Hertweck C.** (2012). "Genomics-driven discovery of burkholderic acid, a noncanonical, cryptic polyketide from human pathogenic Burkholderia species." Angew Chem Int Ed Engl **51**(46): 11611-11615.
- 34.) Fronko R. M., Lee J. C., Galazzo J. G., Chamberland S., Malouin F. and Lee M. D.** (2000). "New pacidamycins produced by Streptomyces coeruleorubidus, NRRL 18370." J Antibiot (Tokyo) **53**(12): 1405-1410.
- 35.) Funabashi M., Baba S., Nonaka K., Hosobuchi M., Fujita Y., Shibata T. and Van Lanen S. G.** (2010). "The biosynthesis of liposidomycin-like A-90289 antibiotics featuring a new type of sulfotransferase." Chembiochem **11**(2): 184-190.
- 36.) Funabashi M., Baba S., Takatsu T., Kizuka M., Ohata Y., Tanaka M., Nonaka K., Spork A. P., Ducho C., Chen W. C. and Van Lanen S. G.** (2013). "Structure-based gene targeting discovery of sphaerimicin, a bacterial translocase I inhibitor." Angew Chem Int Ed Engl **52**(44): 11607-11611.
- 37.) Gardner T. S. and Hawkins K.** (2013). "Synthetic biology: evolution or revolution? A co-founder's perspective." Curr Opin Chem Biol **17**(6): 871-877.
- 38.) Gaynes R.** (2017). "The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use." Emerging Infectious Diseases **23**(5): 849-853.
- 39.) Gibson D. G., Young L., Chuang R. Y., Venter J. C., Hutchison C. A., 3rd and Smith H. O.** (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." Nat Methods **6**(5): 343-345.
- 40.) Guiziou S., Sauveplane V., Chang H.-J., Clerté C., Declerck N., Jules M. and Bonnet J.** (2016). "A part toolbox to tune genetic expression in Bacillus subtilis." Nucleic acids research **44**(15): 7495-7508.

41.) Gust B., Challis G. L., Fowler K., Kieser T. and Chater K. F. (2003). "PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1541-1546.

42.) Gust B., Eitel K. and Tang X. (2013). "The biosynthesis of caprazamycins and related liponucleoside antibiotics: new insights." Biol Chem **394**(2): 251-259.

43.) Harwood C. R. and Cutting S. M. (1990). Molecular biological methods for Bacillus, Wiley.

44.) Hirano S., Ichikawa S. and Matsuda A. (2007). "Total synthesis of (+)-FR-900493 and establishment of its absolute stereochemistry." Tetrahedron **63**(13): 2798-2804.

45.) Holtje J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 181-203.

46.) Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K. and Pease L. R. (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**(1): 61-68.

47.) Hosaka T., Ohnishi-Kameyama M., Muramatsu H., Murakami K., Tsurumi Y., Kodani S., Yoshida M., Fujie A. and Ochi K. (2009). "Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12." Nat Biotechnol **27**(5): 462-464.

48.) Igarashi M., Nakagawa N., Doi N., Hattori S., Naganawa H. and Hamada M. (2003). "Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from *Streptomyces* sp." J Antibiot (Tokyo) **56**(6): 580-583.

49.) Igarashi M., Takahashi Y., Shitara T., Nakamura H., Naganawa H., Miyake T. and Akamatsu Y. (2005). "Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. II. Structure elucidation of caprazamycins." J Antibiot (Tokyo) **58**(5): 327-337.

50.) Inukai M., Isono F., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y. and Haneishi T. (1989). "Mureidomycins A-D, novel peptidyl nucleoside antibiotics with spheroplast forming activity. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties." J Antibiot (Tokyo) **42**(5): 662-666.

51.) Isono K., Uramoto M., Kusakabe H., Kimura K., Isaki K., Nelson C. C. and McCloskey J. A. (1985). "Liposidomycins: novel nucleoside antibiotics which inhibit bacterial peptidoglycan synthesis." J Antibiot (Tokyo) **38**(11): 1617-1621.

52.) Itaya M., Fujita K., Kuroki A. and Tsuge K. (2008). "Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector." Nat Methods **5**(1): 41-43.

53.) Itaya M., Tsuge K., Koizumi M. and Fujita K. (2005). "Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15971-15976.

54.) Kapp U., Macedo S., Hall D. R., Leiros I., McSweeney S. M. and Mitchell E. (2008). "Structure of *Deinococcus radiodurans* tunicamycin-resistance protein (TmrD), a phosphotransferase." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **64**(Pt 6): 479-486.

55.) Karwowski J. P., Jackson M., Theriault R. J., Chen R. H., Barlow G. J. and Maus M. L. (1989). "Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. I. Taxonomy of the producing organism and fermentation." J Antibiot (Tokyo) **42**(4): 506-511.

56.) Katz L. and Burge C. B. (2003). "Widespread selection for local RNA secondary structure in coding regions of bacterial genes." Genome Res **13**(9): 2042-2051.

57.) Kaysser L., Lutsch L., Siebenberg S., Wemakor E., Kammerer B. and Gust B. (2009). "Identification and manipulation of the caprazamycin gene cluster lead to new simplified liponucleoside antibiotics and give insights into the biosynthetic pathway." J Biol Chem **284**(22): 14987-14996.

58.) Kaysser L., Siebenberg S., Kammerer B. and Gust B. (2010). "Analysis of the liposidomycin gene cluster leads to the identification of new caprazamycin derivatives." ChemBiochem **11**(2): 191-196.

59.) Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N. and Sternberg M. J. E. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nature Protocols **10**: 845.

60.) Kodumal S. J., Patel K. G., Reid R., Menzella H. G., Welch M. and Santi D. V. (2004). "Total synthesis of long DNA sequences: synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15573-15578.

61.) Koppermann S. and Ducho C. (2016). "Natural Products at Work: Structural Insights into Inhibition of the Bacterial Membrane Protein MraY." Angew Chem Int Ed Engl **55**(39): 11722-11724.

62.) Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S. C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C. V., Caldwell B., Capuano V., Carter N. M., Choi S. K., Cordani J. J., Connerton I. F., Cummings N. J., Daniel R. A., Denziot F., Devine K. M., Dusterhoft A., Ehrlich S. D., Emmerson P. T., Entian K. D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S. Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E. J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B. J., Haga K., Haiech J., Harwood C. R., Henaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M. F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S. M., Levine A., Liu H., Masuda S., Mauel C., Medigue C., Medina N., Mellado R. P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S. H., Parro V., Pohl T. M., Portelle D., Porwollik S., Prescott A. M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S. J., Serror P., Shin B. S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Togoni A., Tosato V., Uchiyama S., Vandebol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H. F., Zumstein E., Yoshikawa H. and Danchin A. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." Nature **390**(6657): 249-256.

63.) Laureti L., Song L., Huang S., Corre C., Leblond P., Challis G. L. and Aigle B. (2011). "Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(15): 6258-6263.

64.) Li G. W., Oh E. and Weissman J. S. (2012). "The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria." Nature **484**(7395): 538-541.

65.) Li M. Z. and Elledge S. J. (2007). "Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC." Nat Methods **4**(3): 251-256.

66.) Li Y., Li Z., Yamanaka K., Xu Y., Zhang W., Vlamakis H., Kolter R., Moore B. S. and Qian P.-Y. (2015). "Directed natural product biosynthesis gene cluster capture and expression in the model bacterium *Bacillus subtilis*." Scientific Reports **5**: 9383.

67.) Liu Q., Shen Q., Bian X., Chen H., Fu J., Wang H., Lei P., Guo Z., Chen W., Li D. and Zhang Y. (2016). "Simple and rapid direct cloning and heterologous expression of natural product biosynthetic gene cluster in *Bacillus subtilis* via Red/ET recombineering." Scientific Reports **6**: 34623.

68.) Lloyd A. J., Brandish P. E., Gilbey A. M. and Bugg T. D. H. (2004). "Phospho-N-Acetyl-Muramyl-Pentapeptide Translocase from *Escherichia coli*: Catalytic Role of Conserved Aspartic Acid Residues." Journal of Bacteriology **186**(6): 1747.

69.) Luo Y., Enghiad B. and Zhao H. (2016). "New tools for reconstruction and heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters." Nat Prod Rep **33**(2): 174-182.

70.) MacNeil D. J., Gewain K. M., Ruby C. L., Dezeny G., Gibbons P. H. and MacNeil T. (1992). "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector." Gene **111**(1): 61-68.

71.) Mattei P. J., Neves D. and Dessen A. (2010). "Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis." Curr Opin Struct Biol **20**(6): 749-755.

72.) McDonald L. A., Barbieri L. R., Carter G. T., Lenoy E., Lotvin J., Petersen P. J., Siegel M. M., Singh G. and Williamson R. T. (2002). "Structures of the muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors." J Am Chem Soc **124**(35): 10260-10261.

73.) Medema M. H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M. A., Weber T., Takano E. and 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**(Web Server issue): W339-346.

74.) Menzella H. G., Reisinger S. J., Welch M., Kealey J. T., Kennedy J., Reid R., Tran C. Q. and Santi D. V. (2006). "Redesign, synthesis and functional expression of the 6-deoxyerythronolide B polyketide synthase gene cluster." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **33**(1): 22-28.

75.) Mitachi K., Yun H. G., Kurosu S. M., Eslamimehr S., Lemieux M. R., Klaić L., Clemons W. M., Jr. and Kurosu M. (2018). "Novel FR-900493 Analogues That Inhibit the Outgrowth of *Clostridium difficile* Spores." ACS Omega **3**(2): 1726-1739.

76.) Murakami R., Fujita Y., Kizuka M., Kagawa T., Muramatsu Y., Miyakoshi S., Takatsu T. and Inukai M. (2007). "A-102395, a new inhibitor of bacterial translocase I, produced by *Amycolatopsis* sp. SANK 60206." J Antibiot (Tokyo) **60**(11): 690-695.

77.) Muramatsu Y., Ishii M. M. and Inukai M. (2003). "Studies on novel bacterial translocase I inhibitors, A-500359s. II. Biological activities of A-500359 A, C, D and G." J Antibiot (Tokyo) **56**(3): 253-258.

78.) Muramatsu Y., Ohnuki T., Ishii M. M., Kizuka M., Enokita R., Miyakoshi S., Takatsu T. and Inukai M. (2004). "A-503083 A, B, E and F, novel inhibitors of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 62799." J Antibiot (Tokyo) **57**(10): 639-646.

79.) Mutka S. C., Carney J. R., Liu Y. and Kennedy J. (2006). "Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*." Biochemistry **45**(4): 1321-1330.

80.) Nakamura H., Yoshida T., Tsukano C. and Takemoto Y. (2016). "Synthesis of CPZEN-45: Construction of the 1,4-Diazepin-2-one Core by the Cu-Catalyzed Intramolecular Amidation of a Vinyl Iodide." Org Lett **18**(9): 2300-2303.

81.) Nakano M. M., Marahiel M. A. and Zuber P. (1988). "Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*." Journal of bacteriology **170**(12): 5662-5668.

82.) Newman D. J. and Cragg G. M. (2016). "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014." Journal of Natural Products **79**(3): 629-661.

83.) Noda Y., Takatsuki A., Yoda K. and Yamasaki M. (1995). "TmrB protein, which confers resistance to tunicamycin on *Bacillus subtilis*, binds tunicamycin." Biosci Biotechnol Biochem **59**(2): 321-322.

84.) Noda Y., Yoda K., Takatsuki A. and Yamasaki M. (1992). "TmrB protein, responsible for tunicamycin resistance of *Bacillus subtilis*, is a novel ATP-binding membrane protein." J Bacteriol **174**(13): 4302-4307.

85.) Nour-Eldin H. H., Geu-Flores F. and Halkier B. A. (2010). "USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories." Methods Mol Biol **643**: 185-200.

86.) Ochi K., Ezaki M., Iwami M., Komori T. and Kohsaka M. (1989). "FR-900493 substance, a process for its production and a pharmaceutical composition containing the same." Europ Patent EP 033177A2.

87.) Ochi K. and Hosaka T. (2013). "New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters." Appl Microbiol Biotechnol **97**(1): 87-98.

88.) Osswald C., Zipf G., Schmidt G., Maier J., Bernauer H. S., Muller R. and Wenzel S. C. (2014). "Modular construction of a functional artificial epothilone polyketide pathway." ACS Synth Biol **3**(10): 759-772.

- 89.) Palmer B. R. and Marinus M. G.** (1994). "The dam and dcm strains of Escherichia coli-- a review." Gene **143**(1): 1-12.
- 90.) Popp P. F., Dotzler M., Radeck J., Bartels J. and Mascher T.** (2017). "The Bacillus BioBrick Box 2.0: expanding the genetic toolbox for the standardized work with Bacillus subtilis." Scientific Reports **7**(1): 15058.
- 91.) Pstragowski M., Zbrzezna M. and Bujalska-Zadrozny M.** (2017). "ADVANCES IN PHARMACOTHERAPY OF TUBERCULOSIS." Acta Pol Pharm **74**(1): 3-11.
- 92.) Quan J. and Tian J.** (2009). "Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways." PLoS One **4**(7): e6441.
- 93.) Radeck J., Kraft K., Bartels J., Cikovic T., Durr F., Emenegger J., Kelterborn S., Sauer C., Fritz G., Gebhard S. and Mascher T.** (2013). "The Bacillus BioBrick Box: generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with Bacillus subtilis." J Biol Eng **7**(1): 29.
- 94.) Rutledge P. J. and Challis G. L.** (2015). "Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters." Nat Rev Microbiol **13**(8): 509-523.
- 95.) Salomon J. J., Galeron P., Schulte N., Morow P. R., Severynse-Stevens D., Huwer H., Daum N., Lehr C. M., Hickey A. J. and Ehrhardt C.** (2013). "Biopharmaceutical in vitro characterization of CPZEN-45, a drug candidate for inhalation therapy of tuberculosis." Ther Deliv **4**(8): 915-923.
- 96.) Sambrook J., Russell D. W. and Russell D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set), Cold spring harbor laboratory press New York.
- 97.) Scherlach K. and Hertweck C.** (2006). "Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from Aspergillus nidulans, motivated by genome mining." Org Biomol Chem **4**(18): 3517-3520.
- 98.) Shao Z., Rao G., Li C., Abil Z., Luo Y. and Zhao H.** (2013). "Refactoring the silent spectinabilin gene cluster using a plug-and-play scaffold." ACS Synth Biol **2**(11): 662-669.
- 99.) Shao Z., Zhao H. and Zhao H.** (2009). "DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways." Nucleic Acids Res **37**(2): e16.

100.) Shapira P., Kwon S. and Youtie J. (2017). "Tracking the emergence of synthetic biology." Scientometrics **112**(3): 1439-1469.

101.) Shetty R. P., Endy D. and Knight T. F., Jr. (2008). "Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts." J Biol Eng **2**: 5.

102.) Shimotsu H. and Henner D. J. (1986). "Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the trp operon of Bacillus subtilis." Gene **43**(1-2): 85-94.

103.) Shiraishi T., Hiro N., Igarashi M., Nishiyama M. and Kuzuyama T. (2016). "Biosynthesis of the antituberculous agent caprazamycin: Identification of caprazol-3"-phosphate, an unprecedented caprazamycin-related metabolite." J Gen Appl Microbiol **62**(3): 164-166.

104.) Skinnider M. A., Dejong C. A., Rees P. N., Johnston C. W., Li H., Webster A. L., Wyatt M. A. and Magarvey N. A. (2015). "Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM)." Nucleic Acids Res **43**(20): 9645-9662.

105.) Spellberg B., Powers J. H., Brass E. P., Miller L. G. and Edwards J. E., Jr. (2004). "Trends in antimicrobial drug development: implications for the future." Clin Infect Dis **38**(9): 1279-1286.

106.) Stephanopoulos G. (2012). "Synthetic biology and metabolic engineering." ACS Synth Biol **1**(11): 514-525.

107.) Takatsuki A., Arima K. and Tamura G. (1971). "Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin." J Antibiot (Tokyo) **24**(4): 215-223.

108.) Takatsuki A., Kawamura K., Okina M., Kodama Y., Ito T. and Tamura G. (1977). "The Structure of Tunicamycin." Agricultural and Biological Chemistry **41**(11): 2307-2309.

109.) Ubukata M., Isono K., Kimura K., Nelson C. C. and McCloskey J. A. (1988). "The structure of liposidomycin B, an inhibitor of bacterial peptidoglycan synthesis." Journal of the American Chemical Society **110**(13): 4416-4417.

110.) Van der Auwera G. A., Feldgarden M., Kolter R. and Mahillon J. (2013). "Whole-Genome Sequences of 94 Environmental Isolates of Bacillus cereus Sensu Lato." Genome announcements **1**(5): e00380-00313.

111.) van Dijk J. M. and Hecker M. (2013). "Bacillus subtilis: from soil bacterium to super-secreting cell factory." Microb Cell Fact **12**: 3.

112.) van Heijenoort J. (2001). "Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit." Nat Prod Rep **18**(5): 503-519.

113.) Wang R. Y., Shi Z. Y., Guo Y. Y., Chen J. C. and Chen G. Q. (2013). "DNA fragments assembly based on nicking enzyme system." PLoS One **8**(3): e57943.

114.) Williams R. B., Henrikson J. C., Hoover A. R., Lee A. E. and Cichewicz R. H. (2008). "Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome." Org Biomol Chem **6**(11): 1895-1897.

115.) Winn M., Goss R. J., Kimura K. and Bugg T. D. (2010). "Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis." Nat Prod Rep **27**(2): 279-304.

116.) Wohlleben W., Mast Y., Stegmann E. and Ziemert N. (2016). "Antibiotic drug discovery." Microb Biotechnol **9**(5): 541-548.

117.) Wright P. M., Seiple I. B. and Myers A. G. (2014). "The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery." Angew Chem Int Ed Engl **53**(34): 8840-8869.

118.) Xie Y., Chen R., Si S., Sun C. and Xu H. (2007). "A new nucleosidyl-peptide antibiotic, sansanmycin." J Antibiot (Tokyo) **60**(2): 158-161.

119.) Xu D., Liu G., Cheng L., Lu X., Chen W. and Deng Z. (2013). "Identification of Mur34 as the novel negative regulator responsible for the biosynthesis of muraymycin in Streptomyces sp. NRRL30471." PLoS One **8**(10): e76068.

120.) Xu P., Vansiri A., Bhan N. and Koffas M. A. (2012). "ePathBrick: a synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in E. coli." ACS Synth Biol **1**(7): 256-266.

121.) Yamaguchi H., Sato S., Yoshida S., Takada K., Itoh M., Seto H. and Otake N. (1986). "Capuramycin, a new nucleoside antibiotic. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization." J Antibiot (Tokyo) **39**(8): 1047-1053.

- 122.) Yan F., Burgard C., Popoff A., Ziburanyi N., Zipf G., Maier J., Bernauer H. S., Wenzel S. C. and Müller R.** (2018). "Synthetic biology approaches and combinatorial biosynthesis towards heterologous lipopeptide production." Chemical science **9**(38): 7510-7519.
- 123.) Yang Z., Chi X., Funabashi M., Baba S., Nonaka K., Pahari P., Unrine J., Jacobsen J. M., Elliott G. I., Rohr J. and Van Lanen S. G.** (2011). "Characterization of LipL as a non-heme, Fe(II)-dependent alpha-ketoglutarate:UMP dioxygenase that generates uridine-5'-aldehyde during A-90289 biosynthesis." J Biol Chem **286**(10): 7885-7892.
- 124.) Yang Z., Funabashi M., Nonaka K., Hosobuchi M., Shibata T., Pahari P. and Van Lanen S. G.** (2010). "Functional and kinetic analysis of the phosphotransferase CapP conferring selective self-resistance to capuramycin antibiotics." J Biol Chem **285**(17): 12899-12905.
- 125.) Yoo J., Mashalidis E. H., Kuk A. C. Y., Yamamoto K., Kaeser B., Ichikawa S. and Lee S. Y.** (2018). "GlcNAc-1-P-transferase-tunicamycin complex structure reveals basis for inhibition of N-glycosylation." Nat Struct Mol Biol **25**(3): 217-224.
- 126.) Zeigler D. R., Pragai Z., Rodriguez S., Chevreux B., Muffler A., Albert T., Bai R., Wyss M. and Perkins J. B.** (2008). "The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains." J Bacteriol **190**(21): 6983-6995.
- 127.) Zhang G., Hubalewska M. and Ignatova Z.** (2009). "Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding." Nat Struct Mol Biol **16**(3): 274-280.
- 128.) Zhang Y., Muyrers J. P. P., Testa G. and Stewart A. F.** (2000). "DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*." Nature Biotechnology **18**: 1314.
- 129.) Zhang Y., Werling U. and Edelman W.** (2012). "SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method." Nucleic Acids Res **40**(8): e55.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung der Peptidoglykan-Struktur.....	2
Abbildung 2: Darstellung der katalysierten Reaktion des Enzyms MraY-Translokase.....	3
Abbildung 3: Struktur der Tunicamycine.....	4
Abbildung 4: Struktur von Capuramycin.....	5
Abbildung 5: Struktur von Pacidamycin 5.....	6
Abbildung 6: Strukturübersicht der Liponukleosid-Antibiotika.....	7
Abbildung 7: Struktur von Sphaerimicin A.....	8
Abbildung 8: Struktur von Muraymycin D2.....	8
Abbildung 9: Struktur von FR-900493.....	9
Abbildung 10: Darstellung der einzelnen Schritte im Prozess des Genome Minings.....	11
Abbildung 11: Struktur von FR-900493.....	63
Abbildung 12: ADR-GlyU Grundstruktur.....	64
Abbildung 13: Übersicht des Genclusters aus <i>Bacillus cereus</i> VD169.....	69
Abbildung 14: Übersicht des Genclusters nach vorgenommener Verkürzung.....	69
Abbildung 15: Darstellung der einzelnen Schritte des Gibson-Assembly.....	73
Abbildung 16: Alignment aller 45 gBlocks [®] sowie der weiteren Zwischenstufen.....	76
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Vektorvorbereitung.....	78
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Standard-Verfahrens.....	79
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Verfahrens der Stückelung.....	82
Abbildung 20: Darstellung des Ausschneidevorgangs mittels Bts ^{ql}	83
Abbildung 21: Funktionelle Übersicht des gBlocks [®] "Bael-Linker-(SuperCos)".	85
Abbildung 22: Übersicht des finalen Gibson-Assembly.....	86
Abbildung 23: Schematische Darstellung der <i>amyE</i> -Integration in <i>Bacillus subtilis</i>	90
Abbildung 24: Maisstärke-Nachweis mit Lugol'scher Lösung.....	91
Abbildung 25: Darstellung des Genclusters mit den Primerpaaren für die RT-PCR.....	93
Abbildung 26: Ergebnis der RT-PCR mit allen 7 Primerpaaren.....	94
Abbildung 27: Darstellung möglicher Positionen von Promotoren und eines Terminators.....	95
Abbildung 28: Schematische Darstellung der beiden Promotoraustauschkassetten.....	97
Abbildung 29: Ergebnis der RT-PCR (links: pBS1CTR01, rechts: pBS1CTR03).....	99
Abbildung 30: UV-Chromatogramme der beiden LB-HK und des FR-900493 Standards....	102
Abbildung 31: Vergrößerte Darstellung von Peak LB1.....	102
Abbildung 32: UV-Chromatogramme der beiden P-HK und des FR-900493 Standards.....	104
Abbildung 33: Vergrößerte Darstellung von Peak P1.....	104
Abbildung 34: UV-Chromatogramme + Massenspektren [M+H] ⁺ der LB-Peaks.....	106
Abbildung 35: UV-Chromatogramme + Massenspektren [M+H] ⁺ der P-Peaks.....	107

Abbildung 36: Peak LB-1 (Fragmentierte Masse: $m/z = 520.2257 [M+H]^+$).....	109
Abbildung 37: FR-900493 Standard (Fragmentierte Masse: $m/z = 520.2254 [M+H]^+$).....	109
Abbildung 38: Peak LB-2 (Fragmentierte Masse: $m/z = 529.1178 [M+H]^+$).....	109
Abbildung 39: Peak LB-3 (Fragmentierte Masse: $m/z = 318.0937 [M+H]^+$).....	110
Abbildung 40: Peak LB-4 (Fragmentierte Masse: $m/z = 543.1339 [M+H]^+$).....	110
Abbildung 41: Peak LB-5 (Fragmentierte Masse: $m/z = 332.1093 [M+H]^+$).....	110
Abbildung 42: Peak P2 (Fragmentierte Masse: $m/z = 449.1513 [M+H]^+$).....	111
Abbildung 43: Peak P3 (Fragmentierte Masse: $m/z = 389.1667 [M+H]^+$).....	111
Abbildung 44: Peak P4 (Fragmentierte Masse: $m/z = 463.1670 [M+H]^+$).....	111
Abbildung 45: Strukturformeln aller untersuchten Peaks aus LB- bzw. P-Medium $[M+H]^+$..	114
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Integrationskassette "BS_2genecas_01".	116
Abbildung 47: Hypothetischer Biosyntheseweg für FR-900493.	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	18
Tabelle 2: Geräte und Instrumente.	20
Tabelle 3: HPLC-Säulen.....	20
Tabelle 4: Enzyme und Kits.....	20
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur Plasmid- bzw. Cosmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	21
Tabelle 6: Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	21
Tabelle 7: Lösungen für die Blau-Weiß-Selektion.	21
Tabelle 8: Puffer für die PCR-Reaktion.....	22
Tabelle 9: Puffer und Lösungen zur RNA-Isolierung aus <i>Bacillus subtilis</i>	22
Tabelle 10: Antibiotika-Lösungen.	22
Tabelle 11: Bezeichnungen und Sequenzen (5'-3') der eingesetzten Primer.	33
Tabelle 12: Bezeichnungen und Sequenzen (5'-3') der eingesetzten gBlocks [®]	43
Tabelle 13: Plasmide und Cosmide.	47
Tabelle 14: Bakterienstämme.	47
Tabelle 15: PCR-Bedingungen (<i>Taq</i> - bzw. <i>Taq/Pfu</i> -Polymerase).	56
Tabelle 16: PCR-Bedingungen (Q5-Polymerase).	56
Tabelle 17: Zusammensetzung der Gibson-Ansätze.	58
Tabelle 18: Übersicht der verschiedenen Extraktionsbedingungen.....	60
Tabelle 19: Übersicht der verschiedenen Antibiotika mit ADR-GlyU Grundstruktur.....	64
Tabelle 20: Funktionsübersicht des möglichen Genclusters aus <i>Bacillus cereus</i> VD169.	67
Tabelle 21: Übersicht der ausgewählten Bereiche für die synthetische Rekonstruktion.	71
Tabelle 22: Übersicht des Fragmentierungsmusters der Erstbestellung.	74

Tabelle 23: Übersicht der erweiterten Fragmentierung aller drei gestrichenen gBlocks®.	75
Tabelle 24: Übersicht der durchgeführten Stückelungen.	81
Tabelle 25: Ausgangsprodukte und Zwischenstufen des Rekonstruktionsprozesses.....	84
Tabelle 26: Amplifikatgrößen der 7 eingesetzten Primerpaare bei der RT-PCR.....	94
Tabelle 27: Peaks mit neuen Massen aus den LB-Hauptkulturen von Klon 6.	103
Tabelle 28: Peaks mit neuen Massen aus den P-Hauptkulturen von Klon 6.	105
Tabelle 29: Gegenüberstellung der Massen $[M+H]^+$ von FR-Standard und Peak LB1.	108
Tabelle 30: Gegenüberstellung der Massen $[M+H]^+$ aller identifizierten Peaks.	113
Tabelle 31: Vergleich des Genclusters mit den homologen Genen.....	130