

Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese der
Aminocoumarinantibiotika Simocyclinon D8,
Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Ute Galm

Tag der mündlichen Prüfung:

18.11.2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. L. Heide

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-P. Fiedler

Für Steffen
und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE.....	6	
ABKÜRZUNGEN.....	7	
ZUSAMMENFASSUNG	10	
I	EINLEITUNG.....	12
1	STREPTOMYCETEN UND IHRE SEKUNDÄRSTOFFE	12
2	AMINOCOUMARIN-ANTIBIOTIKA	13
2.1	<i>Untersuchungen zur Biosynthese.....</i>	<i>15</i>
2.2	<i>Wirkungsmechanismus der Aminocoumarin-Antibiotika</i>	<i>16</i>
2.3	<i>Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung.....</i>	<i>17</i>
2.4	<i>Resistenz gegen Aminocoumarine</i>	<i>18</i>
3	MUTASYNTHESE – EINE AUSSICHTSREICHE METHODE ZUR HERSTELLUNG NEUER, BIOAKTIVER SUBSTANZEN	19
4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
II	MATERIAL UND METHODEN.....	22
1	CHEMIKALIEN UND BIOCHEMIKALIEN	22
2	SÄULENMATERIALIEN	24
3	ENZYME UND KITS	25
4	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN.....	25
4.1	<i>Medien für die Bakterienkultivierung.....</i>	<i>25</i>
4.1.1	<i>Kultivierung von <i>E. coli</i>.....</i>	<i>26</i>
4.1.2	<i>Kultivierung von Streptomycesen</i>	<i>26</i>
4.1.3	<i>Produktionsmedien für <i>S. antibioticus</i> Tü 6040.....</i>	<i>26</i>
4.1.4	<i>Produktionsmedien für <i>S. roseochromogenes</i></i>	<i>27</i>
4.1.5	<i>Protoplastentransformation von Streptomycesen</i>	<i>28</i>
4.2	<i>Antibiotikallösungen</i>	<i>29</i>
4.3	<i>Puffer und Lösungen</i>	<i>30</i>
4.3.1	<i>Puffer zur DNA-Isolierung</i>	<i>30</i>
4.3.2	<i>Puffer zur DNA-Gelelektrophorese.....</i>	<i>30</i>
4.3.3	<i>Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung.....</i>	<i>31</i>
4.3.4	<i>Lösungen zur Transformation und Selektion von <i>E. coli</i></i>	<i>31</i>
4.3.5	<i>Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomycesen</i>	<i>32</i>
4.3.6	<i>Puffer zur Enzymreinigung.....</i>	<i>32</i>
4.3.7	<i>Lösungen zur Proteinbestimmung.....</i>	<i>33</i>
4.3.8	<i>Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen.....</i>	<i>33</i>
5	PLASMIDE, PRIMER UND BAKTERIENSTÄMME	34
5.1	<i>Vektoren</i>	<i>34</i>
5.2	<i>PCR-Primer</i>	<i>36</i>
5.3	<i>Bakterienstämme.....</i>	<i>37</i>
6	KULTURBEDINGUNGEN	39
6.1	<i>Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i></i>	<i>39</i>

6.2	<i>Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten</i>	40
6.2.1	Anzucht in Fest- und Flüssigmedien.....	40
6.2.2	Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen	40
7	METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	41
7.1	<i>Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	41
7.1.1	Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA	41
7.1.2	Alkoholfällung	41
7.1.3	DNA-Quantifizierung.....	41
7.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese von DNA</i>	42
7.2.1	Trennbedingungen	42
7.2.2	Färben von Agarose-Gelen	42
7.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	42
7.3	<i>Enzymatische DNA-Manipulationen</i>	43
7.3.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	43
7.3.2	Dephosphorylierung von DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase.....	43
7.3.3	DNA-Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase	43
7.4	<i>DNA-Isolierung</i>	44
7.4.1	Plasmidminipräparationen aus <i>E. coli</i>	44
7.4.2	Plasmidmaxipräparationen aus <i>E. coli</i>	44
7.4.3	Isolierung von genomischer DNA aus Streptomyceten	44
7.5	<i>PCR-Methoden</i>	45
7.5.1	<i>simJ1</i> -Inaktivierungskonstrukt	45
7.5.2	<i>simJ2</i> -Inaktivierungskonstrukt	46
7.5.3	<i>ubiA</i>	47
7.5.4	<i>cloL</i>	48
7.5.5	FRT und <i>apra</i> für die Klonierung von pUG019	49
7.6	<i>CaCl₂-vermittelte Transformation von E. coli</i>	51
7.6.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	51
7.6.2	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i> und Blau-Weiß-Selektion.....	51
7.7	<i>Protoplastierung von Streptomyces antibioticus Tü 6040</i>	52
7.8	<i>PEG-vermittelte Transformation von Streptomyceten</i>	52
7.9	<i>Southern Hybridisierung</i>	53
7.9.1	Enzymabhängige „Random Prime“-DIG-Markierung von DNA-Fragmenten	53
7.9.2	Southern Blot.....	54
7.9.3	Hybridisierung, Waschbedingungen und Detektion	54
7.10	<i>Herstellung und Screening einer Cosmidbank von S. antibioticus Tü 6040</i>	55
7.11	<i>DNA-Sequenzierung und computerunterstützte Sequenzanalyse</i>	56
8	METHODEN DER BIOCHEMIE UND BIOLOGIE	56
8.1	<i>Überexpression und Reinigung rekombinant exprimierter Enzyme aus E. coli</i>	56
8.1.1	Herstellung zellfreier Enzymrohextrakte zur Reinigung der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL.....	56
8.1.2	Reinigung der rekombinant exprimierten Enzyme mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie	57
8.1.3	Herstellung zellfreier Enzymrohextrakte zur Aktivitätsbestimmung der Prenyltransferase UbiA.....	57

8.1.4	Entsalzung der gereinigten Proteine	58
8.2	<i>Proteingehaltsbestimmung</i>	58
8.3	<i>Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	58
8.4	<i>Bestimmung von Enzymaktivitäten</i>	59
8.4.1	Bestimmung der Amidsynthetase-Aktivität	59
8.4.2	Bestimmung der Prenyltransferase-Aktivität	59
8.5	<i>Fütterungsexperimente</i>	59
8.5.1	Fütterung der simJ1-Defektmutante mit Ring B aus Novobiocin	59
8.5.2	Fütterung der cloQ-Defektmutante mit verschiedenen synthetischen Ring A-Analoga	60
8.6	<i>Bestimmung antimikrobieller und gyrasehemmender Aktivitäten der Aminocoumarin-Antibiotika</i>	60
8.6.1	Bioassay mit <i>Bacillus subtilis</i>	60
8.6.2	MIC-Bestimmung	61
8.6.3	Supercoiling-Assay	61
9	ANALYTIK UND ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER SUBSTANZEN	62
9.1	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i>	62
9.1.1	Geräte, Säulen und Fließmittel	62
9.1.2	Analytik der Simocyclinone	62
9.1.3	Analytik von Novobiocinsäure und Novobiocinsäurederivaten	63
9.1.4	Analytik von Clorobiocin und Clorobiocin-Analoga	63
9.1.5	Analytik von 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure	64
9.2	<i>Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika</i>	64
9.2.1	Extraktion aus Zellkulturen	64
9.2.2	Säulenchromatographie and Sephadex LH-20	65
9.2.3	Präparative HPLC-Reinigung	65
9.3	<i>Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung</i>	66
9.3.1	LC-MS-Analyse von Simocyclinon D _{met}	66
9.3.2	LC-MS- und CID-Analyse der enzymatischen Produkte sowie der neuen Aminocoumarin-Antibiotika	66
9.3.3	MS-Analyse neuer Aminocoumarin-Antibiotika	66
9.3.4	¹ H-NMR-Analyse neuer Aminocoumarin-Antibiotika	67
III	ERGEBNISSE	68
1	IDENTIFIZIERUNG DES SIMOCYCLINON D8-BIOSYNTHESEGENCLUSTERS AUS <i>S. ANTIBIOTICUS</i> TÜ 6040	68
1.1	<i>Einleitung</i>	68
1.2	<i>Klonierung und Sequenzierung des Simocyclinon D8- Biosynthesegenclusters</i>	69
1.2.1	Restriktionskartierung der hybridisierenden Cosmide	69
1.2.2	Sequenzierung und Analyse des Cosmides VII-8g	70
1.2.2.1	Gene der Aminocoumarin-Biosynthese	72
1.2.2.2	Polyketid-Biosynthesegene	73
1.2.2.3	Das 4-Phosphopantetheinyltransferasegen sim19	74
1.2.2.4	Gene der Desoxyzucker-Biosynthese	74
1.2.2.5	Regulatoren und Transporter	75
1.3	<i>Inaktivierung von simJ1</i>	75
1.3.1	Klonierung und Transformation der <i>simJ1</i> -Inaktivierungskonstrukte pUG012 und pUG013	76
1.3.2	Untersuchung der Single-Crossover Mutanten UG J1-15 und UG J1-21	76

1.3.3	Fütterung von Ring B aus Novobiocin an die Mutante UG J1-21	78
1.3.4	Untersuchung von Double Crossover Mutanten	80
1.4	<i>Inaktivierung von simJ2</i>	81
1.4.1	Klonierung und Transformation der <i>simJ2</i> -Inaktivierungskonstrukte pUG014 und pUG015.....	81
2	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT DER AMIDSYNTHETASEN NOV_L, CLO_L UND COU_L	82
2.1	<i>Einleitung</i>	82
2.2	<i>Versuche zur heterologen Überexpression der Prenyltransferase UbiA</i>	84
2.2.1	Klonierung des Expressionskonstruktes pUG016.....	84
2.2.2	Überexpression von UbiA.....	84
2.2.3	Prenyltransferase-Assay	85
2.3	<i>Heterologe Überexpression von Nov_L, Clo_L und Cou_L als C-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine</i>	86
2.3.1	Klonierung des Clo _L -Expressionskonstruktes pUG018.....	86
2.3.2	Überexpression und Reinigung der Amidsynthetasen.....	86
2.4	<i>Untersuchung der Substratspezifität mit verschiedenen Ring A-Analoga</i>	87
2.4.1	Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte.....	90
3	HERSTELLUNG NEUER AMINOCOUMARIN-ANTIBIOTIKA DURCH MUTASYNTHESE	91
3.1	<i>Einleitung</i>	91
3.2	<i>Fütterung verschiedener Ring A-Analoga an die cloQ⁻ - Mutante</i>	91
3.3	<i>Strukturaufklärung der neuen Novclobiocine</i>	91
4	UNTERSUCHUNG DER ANTIMIKROBIELLEN UND GYRASEINHIBITORISCHEN AKTIVITÄT NEUER CLOROBIOCINDERIVATE	97
4.1	<i>Einleitung</i>	97
4.2	<i>Antibakterielle Aktivität der Novclobiocine gegenüber Bacillus subtilis</i> ...	98
4.3	<i>Minimale inhibitorische Konzentration (MIC) der Novclobiocine gegenüber klinisch relevanten Mikroorganismen</i>	100
4.4	<i>Gyrasehemmende Aktivität der Novclobiocine</i>	104
5	KONSTRUKTION EINES NEUEN VEKTORS FÜR ANWENDUNGEN MITTELS PCR TARGETING PROTOCOL	105
5.1	<i>Einleitung</i>	105
5.2	<i>Klonierung von pUG019</i>	106
IV	DISKUSSION	107
1	SEQUENZIERUNG DES SIMOCYCLINON D8-BIOSYNTHESEGEN-CLUSTERS	107
1.1	<i>Biosynthesegene der Aminocoumarin-Einheit</i>	109
1.1.1	Aktivierung von Tyrosin durch <i>simH</i>	109
1.1.2	Das Cytochrom P ₄₅₀ -Enzym <i>simI</i>	110
1.1.3	<i>simJ1</i> ist für die Aminocoumarin-Biosynthese essentiell	110
1.1.4	<i>simK</i> , eine Oxidoreduktase?.....	111
1.1.5	Die Amidsynthetase <i>simL</i>	112
1.1.6	<i>simY</i>	112
2	PRODUKTION NEUER AMINOCOUMARIN-ANTIBIOTIKA MITTELS MUTASYNTHESE	112

2.1	<i>Substratspezifität der drei Amidsynthetasen</i>	112
2.2	<i>Fütterungsexperimente und ihr Erfolg</i>	113
2.3	<i>Bioaktivität der neuen Novclobiocine</i>	114
V	LITERATUR	117
VI	ANHANG	127
1	NOMENKLATUR DER RING A-ANALOGA, NOVCLOBIOCINSÄUREN SOWIE NOVCLOBIOCINE	127
2	MS- UND ¹H-NMR-SPEKTREN DER NOVCLOBIOCINE	129
3	¹H-NMR-DATEN DER NOVCLOBIOCINE	164
4	SEQUENZ UND KARTE VON PUG019	169
	DANKSAGUNG	173
	AKADEMISCHE LEHRER	174
	LEBENS LAUF	175

Publikationen und Tagungsbeiträge

Weitgehende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikationen:

GALM, U., SCHIMANA, J., FIEDLER, H.P., SCHMIDT, J., LI, S.-M., AND HEIDE, L. (2002). Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. Arch. Microbiol. **178**, 102-114.

Folgende Manuskripte sind zur Publikation eingereicht:

GALM, U., DESSOY, M. A., SCHMIDT, J., WESSJOHANN, L., AND HEIDE, L. *In vitro* and *in vivo* production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic and synthetic approach. Chem. Biol. (akzeptiertes Manuskript)

GALM, U., HELLER, S., SHAPIRO, S., PAGE, M., LI, S.-M., AND HEIDE, L. Antimicrobial and DNA Gyrase-Inhibitory Activities of Novel Clorobiocin Derivatives Prepared by Mutasynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. (Manuskript in Revision)

Tagungsbeiträge:

Poster:

POJER, F., GALM, U., STEFFENSKY, M., FIEDLER, H.-P., LI, S.-M., HEIDE, L. Molecular Cloning of Biosynthetic Gene Clusters for Aminocoumarin Antibiotics: Novobiocin, Clorobiocin and Simocyclinone D8. International Congress and 48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research (GA), ETH Zürich, Zürich, Switzerland (September 3 - 7, 2000).

GALM, U., SCHIMANA, J., FIEDLER, H.-P., LI, S.-M., HEIDE, L. Biosynthesis of the aminocoumarin moiety of simocyclinone D8 in *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. 12th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA), The University of British Columbia, Vancouver, Canada (August 5 - 9, 2001).

GALM, U., SCHMUTZ, E., SCHMIDT, J., DESSOY, M.-A., WESSJOHANN, L., LI, S.-M., HEIDE, L. Investigations on the substrate specificity of the amide synthetases NovL, CloL and CouL involved in aminocoumarin biosynthesis. VAAM-Workshop „Bakterielle Naturstoffproduzenten“, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Germany (September 29 – October 1, 2002).

GALM, U., SCHMUTZ, E., POJER, F., SCHMIDT, J., DESSOY, M.-A., WESSJOHANN, L., LI, S.-M., HEIDE, L. New aminocoumarin antibiotics by precursor-directed bio-synthesis. European VAAM-Workshop „Biology of Streptomyces and Related Actinomycetes“. Münster, Germany (February 27 – March 3, 2003).

GALM, U., HELLER, S., SHAPIRO, S., PAGE, M., LI, S.-M., HEIDE, L. Antimicrobial and DNA Gyrase-Inhibitory Activities of Novel Clorobiocin Derivatives Prepared by Mutasynthesis. VAAM-Workshop “International Meeting on the Biology of Bacteria producing Natural Compounds”. Groningen, Netherlands (September 27 - 29, 2003).

Abkürzungen

His ₆	Hexahistidin
°C	Grad Celsius
μ	mikro
4HB	4-Hydroxybenzoesäure
4HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
6xHis	Hexahistidin
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADHC	3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Hydrolase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CoA	Coenzym A
comp	compound (= Substanz)
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMAHB	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
dNDP	Desoxynukleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
ESI	electrospray ionization
eV	Elektronenvolt
FAB	fast atom bombardment
FRT	FLP recognition targets
g	Gramm
GBA	3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure
GC-Gehalt	Gehalt an Guanotin und Cytosin
GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Hz	Hertz
IPP	Isopentenyldiphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
KAc	Kaliumacetat
kat	katal, katalytische Aktivität (Umsetzung von 1 mol Substrat pro Sekunde)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria und Broth
Lsg.	Lösung
M	molar
m	milli
mcs	multiple cloning site
min	Minuten
M_r	Molekulargewicht
MS	Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
n	nano
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NCIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
NDP	Nukleosiddiphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	nuclear magnetic resonance
nov	Novobiocin
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	pico
p.a.	pro analysis
pB SK(-)	pBluescript SK(-)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG 1000	Polyethylenglykol
PHB	p-Hydroxybenzoesäure
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
RBS	ribosomale Bindungsstelle
Ring A	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
Ring B	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcumarin
Ring C	substituierte Noviose
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

s.	siehe
S.	<i>Streptomyces</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris-Maleat	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat
U	unit
UDP	Uridindiphosphat
ÜN	Über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumen
VT	Volumenteil
w	Gewicht
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Zusammenfassung

Aminocoumarin-Antibiotika werden von unterschiedlichen *Streptomyces*-Stämmen produziert und üben ihre therapeutische Aktivität durch Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase aus. In den USA wurde Novobiocin (Albamycin[®], Pharmacia & Upjohn) für die Behandlung von Infektionen mit Gram-positiven Bakterien am Menschen zugelassen. Durch die relativ hohe Toxizität in Eukaryonten, die schlechte Wasserlöslichkeit und die nur geringe Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien blieb die klinische Anwendung dieses Antibiotikums auf spezielle Fälle beschränkt. Daher ist es von Interesse, neue strukturell modifizierte Aminocoumarin-Antibiotika zu produzieren und zu testen, ob diese die Einschränkungen der bekannten Substanzen überwinden können.

Die erste Aufgabe meiner Doktorarbeit war es, das Biosynthesegencluster des ungewöhnlichen Aminocoumarin-Antibiotikums Simocyclinon D8 zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine Cosmidbank von *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 mit einer heterologen Sonde von dem Gen *novI*, das ein Cytochrom P450-Enzym aus dem Novobiocin-Cluster codiert, gescreent und eines der hybridisierenden Cosmide wurde anschließend sequenziert. Die Analyse eines 39,4 kb großen Sequenzbereiches erlaubte die Identifizierung von insgesamt 38 Open Reading Frames (ORFs), wovon sechs starke Sequenzhomologie zu Genen des Novobiocin- und Coumermycin A₁-Biosynthesegenclusters aufwiesen. Die Struktur von Simocyclinon enthält auch ein Angucyclinon-Ringsystem, und 12 der identifizierten ORFs zeigten hohe Ähnlichkeit mit Biosynthesegenen anderer Angucyclinon-Antibiotika. Mögliche Funktionen innerhalb der Simocyclinon D8-Biosynthese konnten für 23 ORFs durch Vergleiche mit Sequenzen in der Datenbank GenBank postuliert werden. Der experimentelle Beweis für die Beteiligung eines dieser Gene an der Biosynthese der Aminocoumarin-Einheit wurde durch Inaktivierung dieses Genes erbracht. Untersuchungen der Sekundärstoffproduktion der resultierenden Mutante zeigten, dass diese die Fähigkeit zur Bildung des Aminocoumarin-Ringes vollständig verloren hatte. Eine anschließende Fütterung der Defektmutante mit einem strukturell verwandten Aminocoumarin-Ring führte zur Bildung eines neuen, mutasynthetisch erhaltenen Simocyclinon-Derivates.

Im zweiten Teil meiner Dissertation ging es darum, durch Mutasynthese neue Aminocoumarin-Antibiotika herzustellen. Die chemischen Strukturen der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ enthalten Amidbindungen, die eine aromatische Acylkomponente mit dem für diese Substanzgruppe charakteristischen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin (ADHC)-Ring verbinden. Diese Amidbindungen werden unter Katalyse der Genprodukte von *novL*, *cloL* und *couL* geknüpft, wobei 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (DMAHB) das natürliche Acylsubstrat in der Novobiocin- und Clorobiocin-Biosynthese ist. Zunächst

wurde die Substratspezifität der gereinigten Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL bezüglich verschiedener synthetischer Analoga der DMAHB-Einheit untersucht. CloL akzeptierte ein breites Spektrum synthetischer Ring A-Analoga, und daher wurde eine geeignete Mutante des Clorobiocin-Produzenten *Streptomyces roseochromogenes* für die anschließenden Mutasynthese-Experimente ausgewählt. Die Fütterung 13 verschiedener Substratanaloga an diese Mutante, die in der DMAHB-Biosynthese defekt ist, resultierte in der Bildung von 32 neuen Aminocoumarinen, die anschließend im präparativen Maßstab isoliert wurden. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen erfolgte mit FAB-MS- und ¹H-NMR-spektroskopischen Methoden. Die große Anzahl an neuen Strukturen, die durch diese Experimente gewonnen wurden, zeigt deutlich das hohe Potential der Mutasynthese für die Entwicklung neuer Aminocoumarin-Antibiotika.

Diese neuen Clorobiocin-Derivate wurden bezüglich ihrer antimikrobiellen Aktivität gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen sowie bezüglich ihrer gyrasehemmenden Aktivität untersucht. Die Testsubstanzen unterschieden sich in der mit dem ADHC-Ring verknüpften Benzoessäure-Komponente, der An- oder Abwesenheit des 5-Methyl-1H-pyrrol-2-carboxyl-Substituenten sowie der Verknüfungsposition mit dem Deoxyzucker L-Noviose und der An- oder Abwesenheit eines Chlor-Atoms an C-8 der ADHC-Einheit. Clorobiocin war in diesen Versuchen am stärksten aktiv und übertraf auch Novobiocin. Einige Substanzen waren in ihrer Aktivität mit Novobiocin vergleichbar und könnten erfolversprechende Kandidaten für die Arzneistoffentwicklung darstellen. Eine Positionsverschiebung der 5-Methyl-1H-pyrrol-2-carboxyl-Gruppe vom 3''-O auf das 2''-O der L-Noviose oder eine Entfernung des Chlor-Atoms von C-8 des Aminocoumarin-Ringes reduzierten die Bioaktivität der Substanzen um den Faktor zwei bis vier. Demgegenüber führte die Entfernung der Methylgruppe von 4''-O der L-Noviose zum nahezu vollständigen Verlust der antibiotischen Aktivität. Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich die wichtige Rolle der Substituenten von Clorobiocin und seinen Derivaten für die antimikrobielle Aktivität sowie für die Hemmwirkung gegenüber der *E. coli* DNA-Gyrase

I Einleitung

1 Streptomyceten und ihre Sekundärstoffe

Streptomyceten sind Gram-positive coryneforme Bakterien und gehören zur Gruppe der Actinomyceten. Diese obligat aeroben Bodenbakterien haben sich gut an die wechselnden Bedingungen ihres natürlichen Lebensraumes angepasst indem sie eine für Gram-positive Bakterien einzigartige Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung entwickelt haben. Im nährstoffreichen Boden bilden Streptomyceten filamentöse Substratmycelien, aus denen sich bei Verschlechterung der Wachstumsbedingungen an der Oberfläche ein Luftmycel entwickelt. Von diesem werden anschließend Sporen abgegliedert, die als Dauerformen dienen und aus denen bei einer Verbesserung des Milieus erneut Substratmycel auskeimen kann.

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Fähigkeit zur Produktion von Sekundärstoffen, die vor allem während der Differenzierungsphase gebildet werden, ist die Gattung *Streptomyces* für die Arzneistoffforschung von großem Interesse. Über 3000 antibiotisch wirksame Substanzen konnten bis 1997 aus Streptomyceten isoliert und identifiziert werden (Watve et al., 2001) und viele weitere von dieser Gattung gebildeten Sekundärmetabolite lassen sich den Gruppen der Zytostatika, Antimykotika, Virustatika sowie Herbizide zuordnen (Gräfe, 1992).

Das Genom der Streptomyceten ist mit einer Größe von ca. 8-10 Mbp im Vergleich zu gut untersuchten Mikroorganismen wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* außergewöhnlich groß. Auch der GC-Gehalt der Streptomyceten-DNA liegt mit mehr als 70% über dem nahezu aller anderen Organismen (Bibb et al., 1984). Wie die vollständige Sequenzierung des Genomes von *S. coelicolor* (Bentley et al., 2002) sowie *S. avermitilis* (Omura et al., 2001; Ikeda et al., 2003) zeigte, ist das Chromosom dieser Mikroorganismen linear, was auch für andere Vertreter dieser Gattung zutreffen könnte. In den meisten Streptomyceten liegen die Gene, die für die Biosynthese eines bestimmten Antibiotikums benötigt werden, geclustert vor, d.h. Biosynthesegene sowie regulatorische Gene und Gene, die Resistenz gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum verleihen, liegen auf einem zusammenhängenden Abschnitt des Streptomyceten-Genomes. Eine Vielzahl von verschiedenen Genen, die in die Biosynthese unterschiedlicher Sekundärstoffe involviert sind, konnten bereits kloniert werden und ihre Anordnung auf dem Chromosom belegte das geclusterte Vorkommen der Biosynthesegene. Fundierte Kenntnisse liegen insbesondere für Vertreter der Makrolid-Antibiotika, Tetracycline, Anthracycline, Aminoglykoside und Peptid-Antibiotika vor (von Döhren and Gräfe, 1997). Die Genomsequenzierung von *S. coelicolor* (Genomgröße: 8,7 Mbp; GC-Gehalt: 72,1%) sowie *S. avermitilis* (Genomgröße: 9,0 Mbp; GC-Gehalt: 70,7%) zeigte diese Eigenschaft noch deutlicher: im Genom von *S. coelicolor* wurden 22 putative

Biosynthesegencluster für Sekundärstoffe gefunden, im Genom von *S. avermitilis* waren es 25 Cluster. Dies liefert auch Hinweise auf die große Stoffwechselvariabilität der Streptomyceten: die meisten Vertreter dieser Gattung sind zur Produktion mehrerer unterschiedlicher Sekundärmetabolite befähigt.

Für die Gruppe der Aminocoumarin-Antibiotika, die im folgenden näher beschrieben werden soll, waren die Kenntnisse zu Beginn der hier vorgestellten Untersuchungen noch beschränkt. Die Biosynthesegencluster von Novobiocin (Steffensky et al., 2000b) und Coumermycin A₁ (Wang et al., 2000) waren kloniert und sequenziert und aus dem Vergleich der beiden Sequenzen miteinander konnten erste Vermutungen über den Ablauf der Biosynthese dieser Antibiotika angestellt werden. Experimentelle Beweise für die Funktion einzelner Genprodukte in der Biosynthese dieser Antibiotika standen jedoch noch aus.

2 Aminocoumarin-Antibiotika

Neben den drei „klassischen“, strukturell eng verwandten Vertretern der Aminocoumarin-Antibiotika, Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁, wurde kürzlich ein neues, „atypisches“ Aminocoumarin, Simocyclinon D8, identifiziert (s. Abb. 1). Allen Substanzen ist der namensgebende Aminocoumarin-Ring gemeinsam, der jedoch mit unterschiedlichen Strukturelementen substituiert ist.

Bei Novobiocin und Clorobiocin wird die Aminocoumarin-Einheit (Ring B) auf der einen Seite O-glykosidisch durch den substituierten Deoxyzucker Noviose (Ring C) und auf der anderen Seite durch eine amidartig durch eine prenylierte aromatische Carbonsäure, die 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A), flankiert. Während Ring B von Novobiocin eine Methylgruppe trägt, weist Clorobiocin an dieser Stelle ein Chlor-Atom auf; bei Novobiocin ist Ring C durch eine Carbamoylgruppe substituiert, bei Clorobiocin durch eine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure. Coumermycin A₁ besteht demgegenüber aus zwei Deoxyzucker-Aminocoumarin-Einheiten, die jeweils amidartig mit einer Carboxylgruppe der zentral gelegenen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure als Acylkomponente verknüpft sind. Der Aminocoumarin-Ring trägt bei Coumermycin A₁ wie auch bei Novobiocin eine Methylgruppe in Position 8, der Deoxyzucker ist wie bei Clorobiocin durch eine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure substituiert. Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ werden jeweils von *S. spheroides* NCIMB 11891, *S. rishiriensis* DSM 40489 und *S. roseochromogenes* var. *oscitans* DS 12.976 gebildet.

Simocyclinon D8 hat mit Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ ausschließlich die Aminocoumarin-Einheit gemeinsam. Diese ist allerdings, anders als bei den drei „klassischen“ Aminocoumarin-Antibiotika, an der 7-OH-Gruppe unsubstituiert und trägt im Falle von Simocyclinon D8 ein Chlor-Atom an Position 8, im Falle von

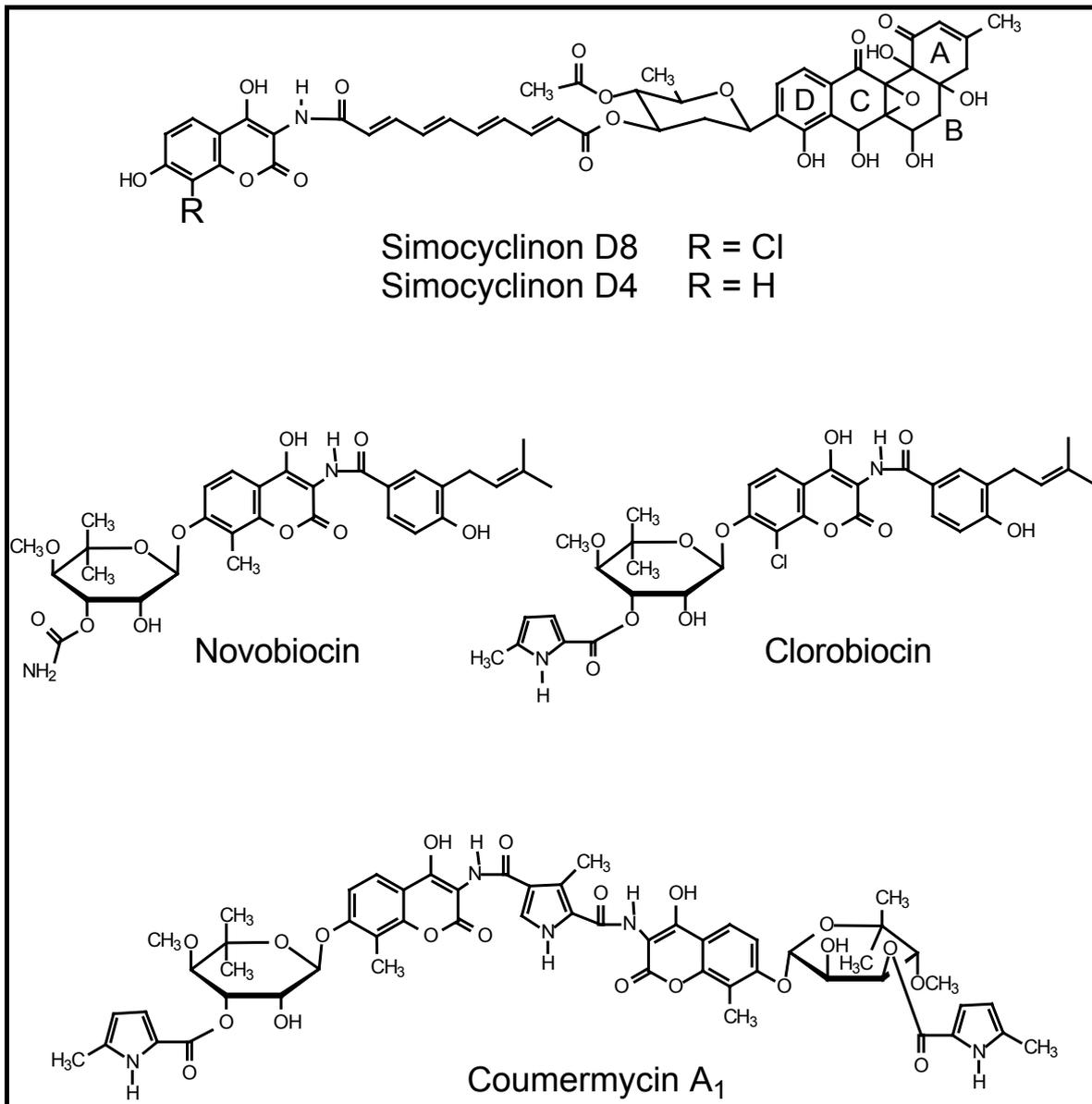


Abb. 1: Strukturen der Aminocoumarin-Antibiotika Simocyclinon, Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁

Simocyclinon D4 ein Wasserstoff-Atom. Die Acylkomponente, die über eine Amidbindung mit der Aminocoumarin-Einheit verknüpft ist, weist eine völlig andere Struktur auf als bei Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁: sie besteht aus einem Angucyclinon-Ringsystem, das an C-9 C-glykosidisch mit dem an der 4-OH-Gruppe acetylierten Deozucker β -D-Olivoose verknüpft ist; der Deozucker ist an der 3-OH-Gruppe zudem mit einer Octatetraendicarbonsäure substituiert, die wiederum mit dem Aminocoumarin-Ring verknüpft ist. Simocyclinon D4 und D8 sowie ihre Vorstufen werden von *S. antibioticus* Tü 6040 produziert (Schimana et al., 2000; Holzenkämpfer et al., 2002).

2.1 Untersuchungen zur Biosynthese

Frühe ^{14}C -Fütterungsversuche zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika zeigten, dass die Deoxyzucker-Einheit aus intakter Glucose entsteht (Birch et al., 1962), und dass sowohl der Aminocoumarin-Ring als auch die prenylierte 4-Hydroxybenzoessäure-Einheit aus Tyrosin abgeleitet werden können (Bunton et al., 1963; Calvert et al., 1972; Kominek and Sebek, 1974). Die Methylgruppen an Position 4 und 5 der Noviose sowie die an Position 8 der Aminocoumarin-Einheit stammen aus S-Adenosyl-Methionin (Birch et al., 1962). Aktuellere Fütterungsexperimente mit ^{13}C -Glucose konnten diese Ergebnisse bestätigen und belegten außerdem, dass die Dimethylallyl-Seitenkette von Ring A aus dem Methylerythritol-Phosphat-Weg stammt (Li et al., 1998). Ein früher Fütterungsversuch mit ^{18}O -Tyrosin legte nahe, dass der heterocyclische Sauerstoff von Ring B aus der Carboxyl-Gruppe von Tyrosin stammen könnte (Bunton et al., 1963). Doch neuere Experimente in $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre lieferten kürzlich für Simocyclinone der D-Reihe den Beweis, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarin-Ringes aus molekularem Sauerstoff stammt (Holzenkämpfer and Zeeck, 2002).

Die Klonierung des Novobiocin-Biosynthesegenclusters durch Screening der Cosmidbank von *S. spheroides* mit einer Sonde von einem dNDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gen (Steffensky et al., 2000b) lieferte die Basis für weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene. Im gleichen Jahr konnte auch das Coumermycin A₁-Biosynthesegencluster kloniert werden (Wang et al., 2000). Beim Vergleich der beiden Cluster fiel auf, dass bestimmte Gene in beiden Clustern an den einander entsprechenden Positionen vorhanden waren, für andere hingegen fehlte ein homologes Gen im jeweils anderen Cluster. Stattdessen lagen an diesen Stellen ein oder mehrere andere Gene ohne Homologie zum ersten Cluster. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Produkte der Gene, die in beiden Clustern identifiziert werden konnten, auch für die Biosynthese homologer Molekülstrukturen verantwortlich sein könnten, während die übrigen Genprodukte vermutlich die Biosynthese derjenigen Strukturelemente katalysieren, die nur in einem der beiden Antibiotika enthalten sind. Diese Analysen erlaubten jedoch nicht die eindeutige Zuordnung bestimmter Gene zur Biosynthese bestimmter Strukturen, wie z.B. der Aminocoumarin-Einheit. Darüber konnten allein Vergleiche mit den noch nicht klonierten Clustern von Clorobiocin und Simocyclinon D8 sowie enzymatische Untersuchungen Aufschluß geben.

Kominek und Meyer konnten durch erste enzymatische Experimente zeigen, dass die prenylierte 4-Hydroxybenzoessäure-Einheit *in vitro* durch eine Novobiocinsäure-Synthetase mit dem Aminocoumarin-Ring zum Aglykon von Novobiocin, der Novobiocinsäure, verknüpft wird (Kominek and Meyer, 1975). Diese Ergebnisse widerlegten die frühere Annahme, dass zuerst Ring B und C zu Novenamin verknüpft werden (Kominek and Sebek, 1974). Die postulierte Novobiocinsäure-Synthetase,

NovL, konnte schließlich 2000 von Steffensky gereinigt und durch *in vitro*-Untersuchungen charakterisiert werden (Steffensky et al., 2000a). Ein weiteres Enzym, das an der Novobiocin-Biosynthese beteiligt ist, die Dimethylallyl-diphosphat:4-Hydroxyphenylpyruvat Dimethylallyltransferase konnte ebenfalls von Steffensky partiell gereinigt und charakterisiert werden (Steffensky et al., 1998), jedoch blieb unklar, welches Biosynthesegen dieses Enzym codiert.

2.2 Wirkungsmechanismus der Aminocoumarin-Antibiotika

Der Wirkmechanismus der Aminocoumarin-Antibiotika beruht darauf, dass sie die B-Untereinheit der bakteriellen DNA-Gyrase komplexieren und dadurch die Funktion dieses essentiellen Enzymes hemmen (Lewis et al., 1996b; Maxwell, 1993; Maxwell, 1997; Maxwell and Lawson, 2003). Die bakterielle DNA-Gyrase, eine DNA-Topoisomerase vom Typ II, besteht aus den zwei verschiedenen Untereinheiten GyrA und GyrB, die zur Bildung des aktiven Enzymkomplexes ein A₂B₂-Heterotetramer bilden. Aufgabe der DNA-Gyrase ist die Einführung von negativen Supercoils in doppelsträngige DNA, was eine Voraussetzung für Replikations-, Rekombinations- und Transkriptionsvorgänge darstellt. Aminocoumarin-Antibiotika inhibieren die Fähigkeit dieses Enzymes zur negativen DNA-Überspiralisierung, genauer gesagt die ATPase-Aktivität der B-Untereinheit des Heterotetramers, wobei die ATP-unabhängige Relaxation der DNA unbeeinflusst bleibt. Die drei „klassischen“ Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ fungieren somit als kompetitive Inhibitoren an der aminoterminalen 24 kDa großen Subdomäne der Gyrase B-Untereinheit und verhindern die Bindung von ATP an seine Bindungsstelle. Einen Sonderfall stellt Simocyclinon D8, bedingt durch seine abweichende Struktur, dar, das die Supercoiling-Aktivität der DNA-Gyrase sogar stärker als Novobiocin inhibiert, die ATPase-Aktivität der DNA-Gyrase jedoch nahezu unbeeinträchtigt lässt (R. Flatman, persönliche Mitteilung).

Röntgenstrukturuntersuchungen konnten für die klassischen Aminocoumarine zeigen, dass sowohl die Aminocoumarin-Einheit als auch der substituierte Deoxyzucker essentiell für die Bindung dieser Substanzen an die B-Untereinheit der Gyrase sind (Lewis et al., 1996a; Maxwell, 1993; Tsai et al., 1997; Lafitte et al., 2002). Die Interaktion von Novobiocin mit der Gyrase kommt dabei unter anderem durch Wasserstoffbrücken zwischen zwei koordinierten Wassermolekülen und der Carbamoyl-Gruppe am Deoxyzucker zustande. Bei Clorobiocin verdrängt die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Einheit die beiden koordinierten Wassermoleküle aus dieser hydrophoben Tasche, was vermutlich entropisch gesehen günstiger ist und dadurch zur höheren Affinität von Clorobiocin zur Gyrase B-Untereinheit beiträgt. Der Aminocoumarin-Ring interagiert mit Arginin 136 (Arg 136) der 24 kDa-Subdomäne der Gyrase B-Untereinheit. Die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit von Novobiocin und Clorobiocin ist in erster Linie wichtig für die Aufnahme dieser

Antibiotika durch Bakterien (Lafitte et al., 2002; Lewis et al., 1996a) und trägt über mehrere hydrophobe Wechselwirkungen nur schwach zur Bindung dieser Substanzen an die bakterielle Gyrase bei (Lewis et al., 1996a; Tsai et al., 1997; Lafitte et al., 2002). Sowohl Novobiocin als auch Clorobiocin binden die Gyrase B-Untereinheit als Monomer (Tsai et al., 1997), während Coumermycin A₁ GyrB als Dimer stabilisiert (Maxwell, 1997).

2.3 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung

Aminocoumarin-Antibiotika sind hochwirksam gegenüber vielen Gram-positiven pathogenen Mikroorganismen, unter anderem auch gegenüber methicillin- und vancomycin-resistenten Staphylokokken. Novobiocin wirkt *in vitro* z.B. gegen *Staphylococcus aureus* und *pyogenes*, Pneumokokken, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens* und *Corynebacterium diphtheriae* bakterizid. Auch einige Gram-negative Bakterien wie *Haemophilus influenzae*, *Neisseria sp.* und *Branhamella catarrhalis* sind sensitiv gegenüber Novobiocin (Jones, 1989).

Bei Anwendung von Novobiocin als humantherapeutisches Antiinfectivum in den USA (Handelsname Albamycin[®], Pharmacia&Upjohn) wurden jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen festgestellt. Seine Toxizität gegenüber Eukaryonten, seine geringe Aktivität gegenüber den meisten Gram-negativen bakteriellen Pathogenen und die Tendenz von Staphylokokken zur Entwicklung endogener Resistenzen gegenüber Aminocoumarinen während der therapeutischen Anwendung (Kirby et al., 1956; Perronne et al., 1987) führte dazu, dass die pharmazeutische Industrie ihre Aktivitäten hinsichtlich der Entwicklung neuer antibakterieller Arzneistoffe eher auf andere Antibiotikaklassen wie β -Lactame, Fluorchinolone oder Makrolide als auf die Gruppe der Aminocoumarine (Maxwell, 1993) richtete, obwohl die Effektivität von Novobiocin in einigen neueren klinischen Studien bestätigt wurde (Raad et al., 1995; Raad et al., 1998; Walsh et al., 1993). Mit der ständigen Zunahme nosokomialer Pathogene (Eady and Cove, 2003; Marcinak and Frank, 2003) sowie dem Auftreten neuer Resistenztypen bei Bakterien (Cui et al., 2003; Hiramatsu, 2001; Marchese et al., 2000), wurde das Interesse an einer erneuten Beurteilung „alter“ bzw. nicht mehr verwendeter Antibiotikaklassen für neue Indikationen wieder stärker (Pitlik, 2003). Wegen des Wirkungsmechanismus der Aminocoumarine und der Effektivität von Novobiocin gegenüber vielen klinisch relevanten Bakterien (Jones, 1989) ist die Entwicklung neuer Aminocoumarine mit geringerer Toxizität und breiterem Wirkungsspektrum heute wieder von großem chemotherapeutischem Nutzen (Maxwell, 1997; Maxwell and Lawson, 2003).

Neben ihrer antiinfektiven Aktivität weisen Aminocoumarine auch synergistische Effekte mit bestimmten Zytostatika wie z.B. Etoposid und Teniposid auf und können daher eingesetzt werden, um Resistenzen bestimmter Tumorzelllinien gegenüber

diesen Zytostatika zu umgehen (Rappa et al., 1992; Rappa et al., 2000). Novobiocin war in diesen Untersuchungen dazu in der Lage, die cytotoxische Wirkung der Zytostatika zu potenzieren. Darüber hinaus zeigt Novobiocin auch anti-Hsp90-Aktivität (Marcu et al., 2000).

Für Simocyclinon D8 und D4 ist eine schwache antibakterielle Aktivität gegenüber Gram-positiven Mikroorganismen belegt, während Gram-negative Bakterien auch dieser Substanz gegenüber resistent waren (Schimana et al., 2000). Die relativ geringe Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien steht im Widerspruch zu der starken gyrase-inhibitorischen Aktivität der Simocyclinone der D-Reihe und weist darauf hin, dass dieses große Molekül die Zellmembran vermutlich viel schlechter penetriert als Novobiocin. Beide Simocyclinone zeigten darüber hinaus gegenüber einigen Tumorzelllinien zytostatische Aktivität (Schimana et al., 2000).

2.4 Resistenz gegen Aminocoumarine

Streptomyceten als Produzenten der Aminocoumarin-Antibiotika müssen sich selbst vor dem inhibitorischen Effekt dieser Sekundärstoffe auf ihre DNA-Gyrase während der Aminocoumarin-Bildung schützen. Der Mechanismus, der hauptsächlich für die Resistenz des Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* gegenüber seinem eigenen Produkt verantwortlich ist, ist die *de novo*-Synthese einer aminocoumarin-resistenten Gyrase B-Untereinheit, die die sensitive Gyrase B-Untereinheit in dem aktiven Heterotetramer $(GyrA)_2(GyrB)_2$ ersetzt (Thiara and Cundliffe, 1988; Thiara and Cundliffe, 1989; Thiara and Cundliffe, 1993). Der Novobiocin-Produzent besitzt also zwei *gyrB*-Gene, das konstitutiv exprimierte *gyrB^S*, das eine sensitive Gyrase B-Untereinheit codiert, sowie das *gyrB^R*-Gen, das eine resistente Gyrase B-Untereinheit codiert, die in Gegenwart von Novobiocin exprimiert wird. Auch im Coumermycin A₁-Biosynthesegencluster sowie später im Clorobiocin-Cluster konnten die Gene für eine sensitive und eine resistente Gyrase B-Untereinheiten identifiziert werden. Der Promotor des Resistenzgenes *gyrB^R* spricht auf Veränderungen in der superhelicalen Dichte der DNA an (Thiara and Cundliffe, 1989).

Im Coumermycin A₁-Biosynthesegencluster sowie später im Clorobiocin-Cluster wurde zusätzlich jeweils ein ähnliches Gen, *parY^R*, gefunden, dessen Produkt Sequenzähnlichkeit mit der B-Untereinheit von Typ II-Topoisomerasen hat. Die Expression von *parY^R* in *S. lividans* TK24 resultierte in einer vergleichbar stark ausgeprägten Resistenz gegenüber Novobiocin und Coumermycin A1 wie die von *gyrB^R* in *S. lividans* TK24 (Schmutz et al., 2003a). Im Novobiocin-Cluster konnte kein mit *parY* vergleichbares Gen gefunden werden.

Im Novobiocin- und Coumermycin A₁-Biosynthesegencluster finden sich außerdem zwei mutmaßliche Transportergene, *novA* und *couR5*. Das Gen *novA* codiert einen

ABC-Transporter und Méndez und Salas schlugen daher vor, dass *novA* in den Transport von Novobiocin involviert ist und möglicherweise auch Resistenz gegenüber Novobiocin verleiht (Méndez and Salas, 2001). Das Genprodukt von *couR5* aus dem Coumermycin A₁-Cluster wies Sequenzähnlichkeit mit transmembranären Effluxproteinen auf und könnte daher ebenfalls am Antibiotika-Transport durch die Zellmembran beteiligt sein. Die Expression von *novA* und *couR5* in *S. lividans* TK24 resultierte in einem moderaten Ausmaß an Resistenz gegenüber Novobiocin und Coumermycin A₁, was darauf schließen lässt, dass die Produkte dieser Gene tatsächlich in den Antibiotika-Transport durch die Membran beteiligt sind (Schmutz et al., 2003a).

Auch bei unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen wurden Resistenzen gegenüber den Aminocoumarin-Antibiotika beobachtet. Diese Resistenz kommt in erster Linie durch eine Mutation der Aminosäure Arg 136 in der 24 kDa großen aminoterminalen Subdomäne der Gyrase B-Untereinheit von *E. coli* zu Histidin, Serin, Leucin oder Cystein zustande (del Castillo et al., 1991; Contreras and Maxwell, 1992; Tsai et al., 1997). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Arg 136 von entscheidender Bedeutung für die Bindung der Aminocoumarine an die Gyrase B-Untereinheit ist (Kampranis et al., 1999; Lewis et al., 1996a).

3 Mutasynthese – eine aussichtsreiche Methode zur Herstellung neuer, bioaktiver Substanzen

Zur Herstellung neuer bioaktiver Substanzen kann man sich grundsätzlich verschiedener Methoden bedienen. Eine davon ist die kombinatorische Biosynthese, eine moderne molekularbiologische Methode, die für die Gruppe der Aminocoumarin-Antibiotika bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe angewandt werden konnte (Eustáquio et al., 2003; Li et al., 2002; Westrich et al., 2003). Vorteilhaft dabei ist, dass die unter Anwendung dieser Methode erhaltenen Mutanten in unbegrenztem Ausmaß zur Fermentierung zur Verfügung stehen, nachteilig ist, dass hiermit in der Regel nur eine begrenzte Zahl neuer Verbindungen erzeugt werden kann.

Eine weitere Methode zur Gewinnung bioaktiver Substanzen ist die Mutasynthese. Hierzu ist es erforderlich, eine Mutante eines Sekundärstoff-Produzenten zu generieren, die in der Biosynthese an einer bestimmten Stelle blockiert ist. Kulturen dieser Mutante werden anschließend mit verschiedenen geeigneten synthetischen Analoga von Vorstufen des Sekundärstoffes versetzt. Sofern die zugeführten synthetischen Substanzen in die Zellen der Mutante aufgenommen, von den Biosynthese-Enzymen akzeptiert und in die neuen Substanzen eingebaut werden, können neue mutasynthetisch hergestellte Sekundärstoffe isoliert und gereinigt werden. Ankenbauer et al. führten derartige Versuche mit 13 verschiedenen Salicylsäure-Analoga durch, konnten allerdings nur drei neue Pyochelin-Analoga

isolieren (Ankenbauer et al., 1991). Als limitierende Faktoren für die Mutasynthese können daher die Verfügbarkeit von geeigneten Substanzen in ausreichender Menge, die Aufnahme der Substanzen in die Zellen sowie die Akzeptanz der Substanzen durch die an der Biosynthese beteiligten Enzymen gelten. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass unter Verwendung einer einzigen Mutante viele Substanzen gefüttert und zu neuen bioaktiven mutasynthetischen Sekundärstoffen verstoffwechselt werden können.

4 Zielsetzung der Arbeit

Der erste Teil meiner Arbeit hatte die Klonierung des Biosynthesegenclusters von Simocyclinon D8, einem ungewöhnlichen Aminocoumarin-Antibiotikum, zum Ziel. Die Struktur dieses natürlich vorkommenden Hybridantibiotikums hat ausschließlich den namengebenden Aminocoumarin-Ring mit den drei klassischen Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ gemein. Daher bestand die Hoffnung, durch Vergleich dieses Clusters mit den drei anderen Clustern die für die Biosynthese der Aminocoumarin-Einheit verantwortlichen Gene identifizieren zu können.

Um das Biosynthesegencluster von Simocyclinon D8 zu klonieren und zu sequenzieren, sollten die folgende Experimente durchgeführt werden:

- Herstellung einer Cosmidbank von *S. antibioticus* Tü 6040 und Screening derselben mit einer Sonde aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster (*novI*).
- Sequenzierung und Analyse eines Cosmides, welches das Simocyclinon D8-Biosynthesegencluster enthält, und Vergleich dieses Clusters mit den Sequenzen der bereits bekannten Novobiocin- und Coumermycin A₁-Biosynthesegencluster.
- Aufstellung einer aus der Sequenzanalyse abgeleiteten Hypothese zur Biosynthese von Simocyclinon D8.
- Inaktivierung eines hypothetischen Aminocoumarin-Biosynthesegenes und Nachweis seiner Beteiligung an der Simocyclinon D8-Biosynthese durch Beobachtung der Veränderungen in der Sekundärstoffproduktion der Mutante.

Ein weiteres Ziel meiner Untersuchungen war die Herstellung neuer Aminocoumarin-Derivate durch Mutasynthese, d.h. durch die Fütterung synthetischer Analoga von Biosynthese-Intermediaten an geeignete Defektmutanten der Aminocoumarin-Produzenten. Die erhaltenen Substanzen sollten anschließend auf ihre Bioaktivität hin getestet werden. Folgende Punkte sollten im Hinblick auf diese Zielsetzung bearbeitet werden:

- *in vitro*-Untersuchung der Substratspezifität der drei Amidsynthetasen NovL (aus dem Novobiocin-Cluster), CloL (aus dem Clorobiocin-Cluster) und CouL (aus dem Coumermycin A₁-Cluster) bezüglich synthetischer 3,4-

disubstituierter Benzoessäure-Derivate in Vorbereitung auf die Fütterungs-experimente.

- Fütterung der *in vitro* akzeptierten synthetischen Acylkomponenten an eine geeignete Mutante, die in der Biosynthese der natürlichen Acylkomponente defekt ist, anschließend Isolierung und Identifizierung der daraus resultierenden Substanzen.
- Durchführung von Agar-Diffusionstests mit dem Indikatorstamm *Bacillus subtilis* für das erste Aktivitäts-Screening der neuen Aminocoumarine
- Untersuchung der DNA-Gyrase-Hemmung der neuen Substanzen mit Hilfe des Supercoiling-Assays.
- MIC-Bestimmung der Substanzen gegenüber klinisch relevanten humanpathogenen Mikroorganismen.

Zusätzlich zu diesen beiden Hauptprojekten befasste ich mich mit der Herstellung eines neuen Vektors für die erst kürzlich entwickelte Methode des PCR-Targeting-Systems. Mit Hilfe dieses Vektors sollten innerhalb eines Cosmides mehrere Geninaktivierungen in Folge ermöglicht werden.

II Material und Methoden

1 Chemikalien und Biochemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Nahezu alle Medienbestandteile stammen von der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg). Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind nachfolgend aufgelistet:

Tab. 1: Spezielle Chemikalien und Biochemikalien

Hersteller	Bezeichnung
Aventis, Bad Soden a. Ts.	Clorobiocin
Becton-Dickinson, Heidelberg	Agar Casaminoacids Corn starch Hefeextrakt (Yeast Extract) Nutrient Agar Tryptic Soy Broth (Soytone) Trypton
Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden	Thiostrepton
Fluka, Neu-Ulm	3-Amino-4-methylbenzoesäure Apramycin 3,4-Diaminobenzoessäure 4-Dimethylaminobenzoessäure 4-Hydroxybenzoesäure (4HB) Novobiocin
FMC BioProducts, Rockland, USA	NuSieve [®] GTG [®] Agarose
Lancaster, Mühlheim a.M.	3,5-Dimethyl 4-hydroxybenzoesäure L-Prolin
Life Technologies, Karlsruhe	Agarose
Merck, Darmstadt	Adenosintriphosphat (ATP) 4-Aminobenzoessäure Bovine Serume Albumine Chloramphenicol EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) L-Glutamin Meat Extract (Fleischextrakt) β-Mercaptoethanol
Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin (Ring B) Novobiocinsäure
Roche Biochemicals, Mannheim	Serva Blau G

Tab. 1: Spezielle Chemikalien und Biochemikalien (Fortsetzung)

Hersteller	Bezeichnung
Roth, Karlsruhe	Ammoniumpersulfat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galctosid (X-Gal) Carbenicillin 1,4-Dithiothreitol (DTT) Glycin Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) Maleinsäure Pepton aus Casein Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Polyethylenglycol (PEG) 1000 (50%) Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Sodiumdodecylsulfat (SDS) N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamin (TEMED) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat (Tris-Maleat) N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R 250 N-Lauroylsarcosine (Na-Salz, 35 %-ig)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Bromphenolblau 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure 2,6-Dihydroxy-4-pyridincarbonsäure (Citrazinsäure) Dimethylformamid (DMF) 2,6-Dimethyl-3,5-pyridindicarbonsäure Dimethylsulfoxid (DMSO) Distillers grains and solubles Imidazol 3-Methyl-4-aminobenzoessäure 6-Methyl-2,3-pyridindicarbonsäure t-Octylphenoxyethoxyethanol (Triton X-100) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Polyvinylpyrrolidon (PVPP) Pyridin-2,6-dicarbonsäure
Südzucker, Mannheim	Saccharose (Südzucker)

Die in Tab. 2 aufgeführten Chemikalien wurden in den Arbeitskreisen von Prof. Heide (Schmutz, E., Hennig, S.) und Prof. Wessjohann (Dessoy, M.-A.) chemisch synthetisiert und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Tab. 2: Chemisch synthetisierte Chemikalien

Synthetisiert durch:	Bezeichnung
Dessoy, M.-A. (Dessoy, 2003)	(<i>N</i> -Acetyl)-3-amino-4-hydroxybenzoesäure (<i>N</i> -Capryl)-3-amino-4-hydroxybenzoesäure (<i>N</i> -Formyl)-3-amino-4-hydroxybenzoesäure (<i>N</i> -Isobutyryl)-3-amino-4-hydroxybenzoesäure (<i>N</i> -Trimethylacetyl)-3-amino-4-hydroxybenzoesäure 3-(1-Hydroxyeth-1-yl)-4-hydroxybenzoesäure 3-(Propan-1-yl)-4-hydroxybenzoesäure 3-Acetyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Allyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Brom-4-hydroxybenzoesäure 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure 3-Cyclohexyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Ethyloxyethyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (GBA)
Hennig, S.; Synthese nach (Kominek and Meyer, 1975)	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A)
Schmutz, E. (Schmutz et al., 2003b)	3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure

2 Säulenmaterialien

Die verwendeten Säulenmaterialien wurden als Fertigsäulen oder Suspensionen bezogen und grundsätzlich bei 4°C in 20% (v/v) Ethanol gelagert. Sephadex LH-20 wurde trocken oder bei RT in Methanol gelagert.

Tab. 3: Säulenmaterialien

Hersteller	Säulenmaterial
Amersham Biosciences, Freiburg	Sephadex [®] LH-20
Pharmacia, Freiburg	Sephadex [®] G-25 (Fertigsäulen PD-10, NAP-10, NAP-5)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

3 Enzyme und Kits

Tab. 4: Kits und Enzyme

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	alkalische Phosphatase Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Restriktionsendonukleasen T4 DNA-Ligase
Fluka, Neu-Ulm	Lysozym (76000 U / mg)
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	1 kb DNA - Leiter High Molecular Weight Marker (bis 48,5 kb)
John Innes Enterprises Ltd., Norwich, UK	DNA Gyrase Assay Kit
Machery-Nagel, Düren	Nucleobond [®] Kit AX100 NucleoSpin [®] Extract 2 in 1
New England Biolabs, Schwalbach	Restriktionsendonucleasen
Promega, Madison, WI, USA	Taq-Polymerase Pfu-Polymerase
Qiagen, Hilden	RNase A
Roche Biochemicals, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert Expand High Fidelity PCR System
Serva, Heidelberg	Lysozym (180000 U / mg)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Lysozyme (47000 U / mg)
Stratagene, Taufkirchen	Gigapack [®] III XL Packaging Extract Pfu-Polymerase Restriktionsendonukleasen
USB, Cleveland, Ohio, USA	T4 DNA - Ligase

4 Medien, Puffer und Lösungen

4.1 Medien für die Bakterienkultivierung

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Medien aufgeführt. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengen jeweils auf 1 l Medium. Im Falle von Festmedien wurden vor Autoklavieren (20 min, 121°C) 1,5-2% (w/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Substanzen wurden erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C.

4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (Sambrook and Russell, 2001)

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g

Die Bestandteile werden in Leitungswasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % Maltose

(für die Herstellung einer Cosmidbank)

NaCl	10,0 g
Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,47 g
Maltose	2,0 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

4.1.2 Kultivierung von Streptomyceten

Yeast-Malt-Glucose-Medium (YMG)

Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
Glucose	4 g

Die Bestandteile werden in Leitungswasser gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

HA-Medium

YMG-Medium	1 l
------------	-----

Nach dem Autoklavieren steril zugeben:

CaCl ₂ * 2 H ₂ O (1 M)	1 ml
--	------

4.1.3 Produktionsmedien für *S. antibioticus* Tü 6040

Komplexes Produktionsmedium 1

Glycerin	20,0 g
Sojamehl vollfett	20,0 g

Die Bestandteile werden in Leitungswasser gelöst, auf pH 7,5 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Spurenelemente-Lösung 1

FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ * H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf 1 l aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Definiertes Produktionsmedium 2 (für Simocyclinone der D-Reihe)

NaCl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
Spurenelemente-Lösung	2 ml
Glycerin	25 g
L-Glutamin	5,84 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Definiertes Produktionsmedium 3 (für Simocyclinone der C-Reihe)

NaCl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
Spurenelemente-Lösung	2 ml
Stärke	25 g
L-Glutamin	1,46 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

4.1.4 Produktionsmedien für *S. roseochromogenes*Corn starch-Medium (Vorkulturmedium)

Corn starch	10,0 g
Pepton	10,0 g
Meat extract	5,00 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Distillers solubles-Medium (Produktionsmedium) (Mancy et al., 1974)

Lösung A:

Distillers grains and solubles	48,0 g
Glucose	12,0 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst und auf pH 7,8 eingestellt.

Anschließend Zugabe von:

CaCO ₃	6,0 g
-------------------	-------

Lösung A wird mit H₂O_{bidest} auf 887 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Lösung B:

(NH ₄) ₂ SO ₄	32,0 g
---	--------

Das Salz wird in H₂O_{bidest} gelöst, auf 200 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Lösung C:

Glucose	75,0 g
---------	--------

Die Glucose wird in H₂O_{bidest} gelöst, auf 300 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren wird Lösung A mit 13 ml Lösung B und 100 ml Lösung C gemischt.

4.1.5 Protoplastentransformation von StreptomycetenTSB-Medium (Kieser et al., 2000) mit 0,4% Glycin und 10% Saccharose

Tryptic Soy Broth	30,0 g
Saccharose	100,0 g
Glycin	7,0 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.Spurenelemente-Lösung 2

ZnCl ₂	0,04 g
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	0,20 g
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,01 g
Na ₂ B ₄ O ₆ * 10 H ₂ O	0,01 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	0,01 g

Die Bestandteile werden in H₂O_{bidest} gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

R₂YE-Medium (Kieser et al., 2000)

Saccharose	103,0 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,12 g
Glucose	10,0 g
Casaminoacids	0,1 g
Spurenelemente-Lösung 2	2 ml
Hefeextrakt	5,0 g
TES	5,73 g
Agar (Platten)	23 g

Die Bestandteile werden in H₂O bidest gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. (Anmerkung: Für die Herstellung von Weichagar werden statt 23.0 g nur 6,0 g Agar zugesetzt.)

Nach dem Autoklavieren steril zugeben:

KH ₂ PO ₄ (0,5 %)	10 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (5 M)	4 ml
L-Prolin (20 %)	15 ml
NaOH (1 N)	7 ml

4.2 Antibiotikallösungen

Die Antibiotika wurden in Stammlösungen mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei -20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden durch einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in DMSO und Ethanol sind autosteril. Die Antibiotika wurden den Medien nach Abkühlen unter eine Temperatur von 50°C steril in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration in		Lösungsmittel	Hersteller
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [µg/ml]		
Apramycin	100	25-100	H ₂ O	Fluka
Carbenicillin	50	50	H ₂ O	Roth
Chloramphenicol	25	25	Ethanol	Merck
Thiostrepton	50	25-50	DMSO	Fluka

4.3 Puffer und Lösungen

4.3.1 Puffer zur DNA-Isolierung

Tab. 6: Puffer zur Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten sowie Plasmid-DNA aus *E. coli*. Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt.

Puffer	Zusammensetzung	Herstellung
TSE-Puffer für Streptomycceten	Tris-HCl 25 mM EDTA 25 mM Saccharose 10,3%	auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren
Aufschlusspuffer für Streptomycceten	TSE-Puffer mit Lysozym 3 mg/ml RNase A 100 µg/ml	vor Gebrauch frisch ansetzen
L1-Puffer	Tris-HCl 50 mM EDTA 10 mM RNase A 100 µg/ml	auf pH 8,0 einstellen und autoklavieren; RNase A vor Gebrauch zugeben
L2-Lösung	NaOH 0,2 N SDS 1 % (w/v)	
L3-Lösung	NaAc * 3 H ₂ O 3 M	Natriumacetat in H ₂ O _{bidest} lösen, auf pH 4,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
TE-Puffer	Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM	auf pH 7,5 einstellen

4.3.2 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Tab. 7: Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt, autoklaviert und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
50xTAE	Tris base 2 M EDTA (0,5 M, pH 8,0) 0,05 M Eisessig 57,1 ml/l	mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen und mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen
Ladepuffer	Glycerin 30% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v)	Nicht autoklavieren Lagerung bei 4°C
Ethidiumbromidlösung für Agarose-Gele	Wasser + Ethidiumbromid 1 µg/ml	

4.3.3 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Tab. 8: Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung. Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
Depurinierungslösung	HCl	250 mM	
Denaturierungslösung	NaOH NaCl	0,5 N 1,5 M	
Neutralisierungslösung	Tris-HCl NaCl	0,5 M 3 M	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
20x SSC	tri-Natrium-Citrat * 2 H ₂ O NaCl	0,3 M 3 M	mit HCl auf pH 7,0 einstellen
Prähybridisierungs-Lösung	Magermilchpulver SDS (als 10%-ige (w/v) Lsg.) N-Lauroylsarkosin (als 35%-ige (w/v) Lsg.)	3% 0,02% 0,1%	frisch ansetzen in 5x SSC-Puffer
Hybridisierungs-Lösung	Magermilchpulver SDS (als 10%-ige (w/v) Lsg.) N-Lauroylsarkosin (als 35%-ige (w/v) Lsg.)	1,5% 0,02% 0,1%	frisch ansetzen in 5x SSC-Puffer
2x Waschpuffer	SDS (als 10%-ige (w/v) Lsg.)	0,1%	frisch ansetzen in 2x SSC-Puffer
0,5x Waschpuffer	SDS (als 10%-ige (w/v) Lsg.)	0,1%	frisch ansetzen in 0,5x SSC-Puffer
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure NaCl	0,1 M 0,15 M	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Tween-Waschpuffer	Tween 20	0,3%	frisch ansetzen in Maleinsäure-Puffer
Blocking-Solution	Magermilchpulver	3%	frisch ansetzen in Maleinsäure-Puffer
Detektions-Puffer	Tris-HCl NaCl	0,1 M 0,1 M	mit HCl auf pH 9,5 einstellen
Antikörper-Lösung	Blocking-Lösung Maleinsäure-Puffer Anti-DIG-AP-Konjugat	20 ml 20 ml 4 µl	frisch ansetzen
Stripping-Lösung	NaOH SDS (als 2%-ige (w/v) Lsg.)	0,2 M 0,1%	

4.3.4 Lösungen zur Transformation und Selektion von *E. coli*

Tab. 9: Stammlösungen zur Blau-Weiß-Selektion. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Lösung	Zusammensetzung	pro Platte
IPTG	80 mg/ml in H ₂ O _{bidest} , sterilfiltriert (0,2 µm Membranfilter)	10 µl
X-Gal	20mg/ml in DMF, autosteril	40 µl

4.3.5 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Die Lösungen für den Protoplastierungs- und den Transformationspuffer wurden in H₂O _{bidest} angesetzt, getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen gemischt. Die Lagerung erfolgte nach Aliquotierung bei -20°C.

Tab. 10: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten.

Puffer	Zusammensetzung	
Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (Kieser et al., 2000)	Saccharoselösung [12 % (w/v)]	85,5 ml
	Spurenelementlösung 2 (siehe 4.1.5)	0,2 ml
	TES (0,25 M, pH 7,2)	10 ml
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O (1 M)	1,0 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,0 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	1,0 ml
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (250 mM)	1,0 ml
Transformationspuffer (T-Puffer) (Kieser et al., 2000)	Saccharoselösung [25 % (w/v)]	1,0 ml
	Spurenelementlösung 2 (siehe 4.1.5)	0,03 ml
	PEG 1000 [50 % (w/v)]	5,0 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	0,1 ml
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O (5 M)	1,0 ml
	Tris-Maleat (0,5 M, pH 8,0)	1,0 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,1 ml
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O (1 M)	0,1 ml
H ₂ O _{bidest}	2,0 ml	

4.3.6 Puffer zur Enzymreinigung

Tab. 11: Puffer zur Enzymreinigung. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in H₂O _{bidest} angesetzt und bei 4°C gelagert.

Medium	Zusammensetzung	
PMSF-Stammlösung	PMSF	50 mM in Isopropanol
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Lysozym	1 mg/ml
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Aufbewahrungspuffer	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	150 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	DTT	5 mM
	PMSF	50 µM

4.3.7 Lösungen zur Proteinbestimmung

Bradford-Färbelösung (Bradford, 1976) (5x):

70 mg Brilliant Serva Blau G in 50 ml Ethanol lösen, Zugabe von 100 ml H₃PO₄ [85%, (v/v)], mit H₂O_{bidest} auf 200 ml auffüllen.

Die Stammlösung wurde bei 4°C aufbewahrt, vor Gebrauch 1:5 mit H₂O_{bidest} verdünnt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Die gebrauchsfertige Bradford-Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

4.3.8 Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Angaben gelten für die Benutzung der Mini-PROTEAN® II Elektrophorese-Kammer (BIO-RAD, Cell) und entsprechen den Angaben des Hersteller-Handbuches.

Tab. 12: Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung / Bemerkung
Sammelgel (4%)	H ₂ O _{bidest}	6,1 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml
	10 % (w/v) SDS	0,1 ml
	Rotiphorese®Gel 30	1,33 ml
	10 % (w/v) APS	0,05 ml
	TEMED	0,01 ml
Trenngel (12 %)	H ₂ O _{bidest}	3,35 ml
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
	10 % (w/v) SDS	0,1 ml
	Rotiphorese®Gel 30	4,0 ml
	10 % (w/v) APS	0,05 ml
	TEMED	0,005 ml
Probenpuffer (1x)	H ₂ O _{bidest}	3,55 ml
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
	Glycerin	2,5 ml
	10% (w/v) SDS	2,0 ml
	0,5% (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml
10x Laufpuffer	Tris base	30,0 g
	Glycin	144,0 g
	SDS	10,0 g
Fixierlösung	H ₂ O _{bidest}	70% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
	Methanol	20% (v/v)

Tab. 12: Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (Fortsetzung)

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Herstellung / Bemerkung
Coomassie Brilliant Blau G-250-Lösung	Coomassie Brilliant Blau 0,25% (w/v) G-250 45% (v/v) H ₂ O <small>bidest</small> 10% (v/v) Essigsäure 45% (v/v) Methanol	Lagerung bei Raumtemperatur
Entfärberlösung	H ₂ O <small>bidest</small> 45% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Methanol 45% (v/v)	Lagerung bei Raumtemperatur

5 Plasmide, Primer und Bakterienstämme

5.1 Vektoren

Tab. 13: Vektoren, Plasmide und Cosmide

Vektor	Größe [kb]	Eigenschaften	Hersteller/Referenz
pBlueskript SK(-) (pBSK(-))	2,958	Amp ^r , lacZ' (α -Komplementation), f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene
pBSKT	4,425	Streptomyceten - <i>E. coli</i> - Shuttle Vektor, Amp ^r , Tsr ^r , lacZ' (α -Komplementation), ColE1-origin	(Lombo et al., 1997)
pKC1132	ca. 3,5	Streptomyceten - <i>E. coli</i> - Shuttle Vektor, Apra ^r , lacZ' (α -Komplementation)	(Bierman et al., 1992)
pQE60	3,431	Amp ^r , <i>E. coli</i> - Überexpressionsvektor, Expression eines C-terminalen Histidin - Fusionsproteins, T5-Promotor, ColE1-origin, synthetische RBS II, NcoI-Schnittstelle in mcs	Qiagen
pQE70	3,426	Amp ^r , <i>E. coli</i> - Überexpressionsvektor, Expression eines C-terminalen Histidin - Fusionsproteins, T5-Promotor, ColE1-origin, synthetische RBS II, SphI-Schnittstelle in mcs	Qiagen
SuperCos 1	7,939	Cosmidvektor, Amp ^r , Neo ^r , S40-origin, Vektor der <i>S. antibioticus</i> Tü 6040 Genbank	Stratagene
pMS88	4,123	1,3 kb XhoI / NcoI-Fragment aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster von <i>Streptomyces spheroides</i> NCIMB11891 in Litmus 28; enthält <i>novI</i>	M. Steffensky, persönliche Mitteilung

Tab. 13: Vektoren, Plasmide und Cosmide (Fortsetzung)

Vektor	Größe [kb]	Eigenschaften	Hersteller/Referenz
pMS80	5,0	1,6 kb <i>SphI</i> / <i>Bam</i> HI-Fragment aus dem Novobiocin-Biosynthese-gencluster in pQE70; Überexpressionskonstrukt für NovL	(Steffensky et al., 2000a)
pMS90	5,0	1,6 kb <i>SphI</i> / <i>Bgl</i> II-Fragment aus dem Coumermycin A ₁ -Biosynthese-gencluster in pQE70; Überexpressionskonstrukt für CouL	(Schmutz et al., 2003b)
pALMU1	6,627	3,7 kb <i>Sau</i> 3A - Fragment aus <i>E. coli</i> MC4100 in pBluescript II KS ⁺ ; enthält <i>orf442</i> , <i>ubiC</i> und <i>ubiA</i>	(Siebert et al., 1992)
pALMU3	4,951	1,86 kb <i>Sac</i> I-Fragment aus pALMU1 in pTZ19R; enthält <i>ubiC</i> und <i>ubiA</i>	(Siebert et al., 1994)
pCloLM	ca. 5,7	cloL und cloM in pBluescript SK(-)	Pojer, persönliche Mitteilung
pIJ773	4,334	1,382 kb <i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III-Fragment mit Apramycin Resistenzgen, <i>oriT</i> , FRT-Sites, Primer-Sites in pBluescript KS (+)	(Gust et al., 2003)

Tab. 14: Eigene Plasmid-Konstrukte. Im folgenden werden alle relevanten zur Cosmidkartierung und zu Expressionsversuchen verwendeten Konstrukte aufgeführt.

Konstrukt	Größe [kb]	Beschreibung
III-3h IV-7a VII-8g VII-9b VIII-2g	je ca. 51	Cosmide aus der <i>S. antibioticus</i> Tü 6040 – Cosmidbank im Cosmidvektor SuperCos 1, enthalten jeweils ca. 43 kb große <i>Sau</i> 3a-Fragmente, die mit <i>novI</i> als Sonde hybridisieren
pUG001	ca. 3,9	ca. 1 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cosmid III-3h in pBluescript SK (-); enthält ein Thioesterase-Fragment
pUG003	ca. 4,2	ca. 1,3 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cosmid III-3h in pBluescript SK (-); enthält ein Typ I PKS-Fragment
pUG004	ca. 4,25	ca. 1,35 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cosmid III-3h in pBluescript SK (-); enthält ein Peptidsynthetase- sowie ein Amidsynthetase-Fragment
pUG005	ca. 7,6	ca. 4,7 kb <i>Bam</i> HI-Fragment aus Cosmid III-3h in pBluescript SK (-); enthält ein Cytochrom P450- sowie ein 3-oxoacyl-[ACP]-Reduktase-Fragment
pUG008	5,8	1,4 kb <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-Fragment (vor <i>simJ1</i>) aus Cosmid VII-8g in pBSKT (für die Inaktivierung von <i>simJ1</i> , mittels PCR amplifiziert)

Tab. 14: Eigene Plasmid-Konstrukte. (Fortsetzung)

Konstrukt	Größe [kb]	Beschreibung
pUG012	7,2	1,4 kb <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-Fragment (vor <i>simJ1</i>) und 1,4 kb <i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI-Fragment (nach <i>simJ1</i>) aus Cosmid VII-8g in pBSKT (für die Inaktivierung von <i>simJ1</i> , mittels PCR amplifiziert)
pUG013	6,3	2,8 kb <i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RI-Fragment (1,4 kb vor und 1,4 kb nach <i>simJ1</i>) aus pUG012 in pKC1132; fertiges Inaktivierungskonstrukt für die In-Frame-Deletion von <i>simJ1</i>
pUG010	5,8	1,4 kb <i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RI-Fragment (vor <i>simJ2</i>) aus Cosmid VII-8g in pBSKT (für die Inaktivierung von <i>simJ2</i> , mittels PCR amplifiziert)
pUG014	7,2	1,4 kb <i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RI-Fragment (vor <i>simJ2</i>) und 1,4 kb <i>Eco</i> RI / <i>Hind</i> III-Fragment (nach <i>simJ2</i>) aus Cosmid VII-8g in pBSKT (für die Inaktivierung von <i>simJ2</i> , mittels PCR amplifiziert)
pUG015	6,3	2,8 kb <i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III-Fragment (1,4 kb vor und 1,4 kb nach <i>simJ2</i>) aus pUG014 in pKC1132; fertiges Inaktivierungskonstrukt für die In-Frame-Deletion von <i>simJ2</i>
pUG016	4,39	960 bp <i>Nco</i> I / <i>Bgl</i> II-Fragment aus pALMU1 in pQE60; Überexpressionskonstrukt für UbiA, mittels PCR amplifiziert
pUG018	5,0	1,6 kb <i>Sph</i> I / <i>Bgl</i> II-Fragment aus pCloL-cloM in pQE70; Überexpressionskonstrukt für CloL, mittels PCR amplifiziert
pUG017	3,06	97 bp <i>Eco</i> RI / <i>Eco</i> RV-Fragment aus pIJ773 in pBluescript SK (-); enthält Primer-Site und FRT-Site, mittels PCR amplifiziert
pUG019	3,96	Ca. 1 kb <i>Eco</i> RV / <i>Hind</i> III-Fragment aus pIJ773 in pUG017 hinter die FRT-Site ligiert; enthält Primer-Site, FRT-Site und <i>apra</i> -Kassette (ohne oriT), mittels PCR amplifiziert

5.2 PCR-Primer

Tab. 15: Für die Klonierungen erfolgreich eingesetzte Primer

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle(n)	Position in Sequenz	amplifiziertes Gen	Accession-No.
Primer für die Inaktivierung von <i>simJ1</i>:					
sim-J1_P01f	5'-gtacggcggtctaga aggac-3'	<i>Xba</i> I	22412 bis 22431	1,4 kb- Bereich vor <i>simJ1</i>	AF322256
sim-J1_P01r	5'-cattcgggatccttc ctgc-3'	<i>Bam</i> HI	23803 bis 23784		
sim-J1_P02f	5'-cgacggcggatcca gtgaa-3'	<i>Bam</i> HI	24541 bis 24560	1,4 kb- Bereich nach <i>simJ1</i>	AF322256
sim-J1_P02r	5'-ggccaccgaattcgg ccaca-3'	<i>Eco</i> RI	25974 bis 25955		

Tab. 15: Für die Klonierungen erfolgreich eingesetzte Primer (Fortsetzung)

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle(n)	Position in Sequenz	amplifiziertes Gen	Accession-No.
Primer für die Inaktivierung von simJ2:					
sim-J2_P01f	5'-cagacgatctagatc gacgg-3'	<i>Xba</i> I	24527 bis 24546	1,4 kb- Bereich vor simJ2	AF322256
sim-J2_P01r	5'-ccacatcgaattcctc gcga-3'	<i>Eco</i> RI	25905 bis 25886		
sim-J2_P02f	5'-tcgacggcggaattc cgatctgac-3'	<i>Eco</i> RI	26524 bis 26547	1,4 kb- Bereich nach simJ2	AF322256
sim-J2_P02r	5'-ctcctcgccaagcttg atgatctg-3'	<i>Hind</i> III	27932 bis 27909		
Primer für die Klonierung und Expression von ubiA:					
ubiA_P01f	5'-ggaaaaaacatqg agtgga-3'	<i>Nco</i> I	5101 bis 5120	ubiA (969 bp)	AE000477
ubiA_P01r	5'-attgagatctgtgtgt agg-3'	<i>Bgl</i> II	6070 bis 6051		
Primer für die Klonierung und Expression von cloL:					
cloL_P03f	5'-tcacgcatgccgaac aaggaccac-3'	<i>Sph</i> I	18084 bis 18107	cloL (1,6 kb)	AF329398
cloL_P02r	5'-ctcagatctcctgtcc accagcac-3'	<i>Bgl</i> II	19680 bis 19657		
Primer für die Herstellung des Vektors pUG019:					
FRT_P01f	5'-ctgcaggaattcgat attccggggatctctaga tct-3	<i>Eco</i> RI <i>Xba</i> I <i>Bgl</i> II	2084 bis 2049	Primer- und FRT-Site	AX657066
FRT_P01r	5'-tggcggggatatcgaa gttc-3'	<i>Eco</i> RV	1995 bis 2015		
apra_P03f	5'-ggggatgatatctttat caccaccgactattg-3'	<i>Eco</i> RV	1642 bis 1610	Primer-Site, FRT-Site und Apra- mycin-Re- sistenzgen (<i>aac</i> (3)IV)	AX657066
apra_P02r	5'-tcgataagcttgatga ctagtctggagctgctcg a-3'	<i>Hind</i> III <i>Spe</i> I	684 bis 719		

5.3 Bakterienstämme

Tab. 16: Bakterienstämme für Klonierungs- und Fütterungsexperimente

<i>E. coli</i>	relevante Marker	Hersteller / Referenz
XL1 Blue MRF ^c	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ^c <i>proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene
ET12567	DNA-Methylase negativer Stamm	(MacNeil et al., 1992)
K-12	Wildtyp; F ⁺ lambda ⁺	ATCC 10798

Tab. 16: Bakterienstämme für Klonierungs- und Fütterungsexperimente (Fortsetzung)

Streptomyces	relevante Marker	Hersteller / Referenz
<i>S. antibioticus</i> Tü 6040	Wildtypstamm, Simocyclinonproduzent	(Schimana et al., 2000)
<i>S. antibioticus</i> UG J1-15	Simocyclinon D-produzierende Single-Crossover-Mutante der <i>simJ1</i> -Inaktivierung; enthält pUG013	diese Arbeit; (Galm et al., 2002)
<i>S. antibioticus</i> UG J1-21	Single-Crossover-Mutante der <i>simJ1</i> -Inaktivierung ohne Simocyclinon D-Produktion; enthält pUG013	diese Arbeit; (Galm et al., 2002)
<i>S. antibioticus</i> UG J1-293 UG J1-692	Double Crossover Mutanten der <i>simJ1</i> -Inaktivierung	diese Arbeit
<i>S. antibioticus</i> UG J2-7 UG J2-8 UG J2-10	Single-Crossover-Mutanten der <i>simJ2</i> -Inaktivierung; enthält pUG015;	diese Arbeit
<i>S. roseochromogenes</i> <i>varietas oscitans</i> DS 12.976	Wildtypstamm, Clorobiocinproduzent	Aventis
<i>S. roseochromogenes</i> QDCO661	<i>cloQ</i> -Defektmutante von <i>S. roseochromogenes</i> ; defekt bezüglich der Ring A-Biosynthese	(Pojer et al., 2003b; Pojer et al., 2003a)

Tab. 17: Bakterienstämme für die Testung der biologischen Aktivität verschiedener Antibiotika

Stamm	Phenotyp bzw. Beschreibung^a	Quelle / Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003)
42080	Cro ^R Ery ^R Meth ^R Pen ^R Cip ^R Tmp ^S Van ^S Imi ^R Amx/Clav ^R Rif ^R Gen ^R Tet ^R	Stammsammlung der Firma Basilea
80CR5	Pen ^R Nov ^R Rif ^R	(Engel et al., 1980)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CNS 184	Cro ^R Ery ^R Meth ^R Pen ^R Cip ^R Tmp ^R Rif ^R	Stammsammlung der Firma Basilea
CNS 10	Ery ^R Meth ^R Pen ^R Cip ^R Tmp ^S Gen ^R Nov ^R	Stammsammlung der Firma Basilea
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 1/1 serotype 6	Cro ^R Ery ^S Meth ^R Pen ^R Tmp ^R	Stammsammlung der Firma Basilea

Tab. 17: Bakterienstämme für die Testung der biologischen Aktivität verschiedener Antibiotika (Fortsetzung)

Stamm	Phenotyp bzw. Beschreibung ^a	Quelle / Referenz
<i>Enterococcus faecalis</i>		
ATCC 29212	Pen ^S Tmp ^S Van ^S	(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003)
Van B E80-8	Amp ^S Cip ^R Tmp ^S Gen ^R Van ^R	Stammsammlung der Firma Basilea
<i>Enterococcus faecium</i>		
ATCC 19434		Stammsammlung der Firma Basilea
Van A E25-1	Amp ^R Cro ^R Ery ^R Meth ^R Pen ^R Cip ^R Tmp ^R Van ^R Gen ^R Tei ^R Imi ^R Rif ^R Tet ^R	Stammsammlung der Firma Basilea
<i>Escherichia coli</i>		
UB1005	Amp ^S Azi ^S Caz ^S Cip ^S Lev ^S	(El Falaha et al., 1983)
DC2	Amp ^S Azi ^S Caz ^S Cip ^S Lev ^S (hyperpermeables Derivat von <i>E. coli</i> UB1005)	(El Falaha et al., 1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
K799/wt	Amp ^R Azi ^R Caz ^S Cip ^S Cro ^S Ctx ^S Imi ^S Lev ^S Tet ^R	(El Falaha et al., 1983)
K799/61	Amp ^S Azi ^S Caz ^S Cip ^S Cro ^S Ctx ^S Imi ^S Lev ^S Tet ^S (hyperpermeables Derivat von <i>P.aeruginosa</i> K799/wt)	(El Falaha et al., 1983)

^a Abkürzungen: Amp, Ampicillin; Amx/Clav, Amoxicillin/Clavulansäure; Azi, Azithromycin; Caz, Ceftazidim; Cip, Ciprofloxacin, Cro, Ceftriaxon; Ery, Erythromycin; Gen, Gentamicin; Imi, Imipenem; Lev, Levofloxacin; Meth, Methicillin; Nov, Novobiocin; Pen, Penicillin; Rif, Rifampicin; Tei, Teicoplanin; Tet, Tetracycline; Tmp, Trimethoprim; Van, Vancomycin.

6 Kulturbedingungen

6.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium (siehe 4.1.1) in Erlenmeyerkolben mit Schikane über Nacht (16-18 h) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C und unter Schütteln bei 170 rpm. Zum Anlegen von Einzelkolonien wurde die Bakteriensuspension auf LB-Festmedium im Verdünnungsausstrich mit einer Platinöse ausgestrichen. Die Selektion erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium (s. 4.2).

Für *E. coli*-Dauerkulturen wurden 800 µl Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen mit 400 µl 86%-iger (v/v) Glycerin-Lösung versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Bei Überexpressionsexperimenten wurde die Inkubationstemperatur auf 30°C reduziert und die Kultur nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,7 mit IPTG induziert.

6.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomycceten

6.2.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien

Zur Kultivierung von Streptomycceten wurde generell YMG- bzw. HA-Medium (s. 4.1.2) verwendet. Für die Simocyclinon- sowie die Clorobiocinproduktion und für Fütterungsexperimente wurden die jeweiligen Produktionsmedien von *S. antibioticus* Tü 6040 (s. 4.1.3) und *S. roseochromogenes* (s. 4.1.4) eingesetzt. Zur Protoplastierung von *S. antibioticus* Tü 6040 wurde TSB-Medium verwendet (s. 4.1.5). Die Stämme wurden auf Festmedien oder in 50 ml Medium in 300 ml bzw. 500 ml-Erlenmeyer-Schikanekolben bei 28-33°C unter Schütteln mit 180-210 rpm angezogen. Um ein homogeneres Wachstum in Flüssigkulturen zu erzielen wurden pro Kolben etwa 10-15 Glasperlen (Durchmesser: 2,85-3,3 mm) steril zugesetzt oder der Kolben wurde vor Autoklavieren mit einer Edelstahlspirale versehen. Die Selektion erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium erzielt (s. 4.2).

6.2.2 Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerindauerkulturen

Zur Stammhaltung wurden die Streptomyccetenstämme bei -70°C in Form von Sporensuspensionen oder Glycerindauerkulturen aufbewahrt.

Für die Herstellung von Sporensuspensionen wurde 1 ml Streptomyccetenflüssigkultur oder 10-20 µl Sporensuspension auf einer HA-Agarplatte steril ausplattiert und anschließend 15-20 min unter der Sterilbank getrocknet. Die Kultivierung erfolgte über 3-6 Tage bei 28°C bis zur Sporulation. Nach Zugabe von 9 ml einer 0,1% igen Tween 20-Lösung wurden die Sporen mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und abgeschwemmt. Die Suspension wurde anschließend 1 min bei maximaler Leistung gevortext. Die Trennung von Mycelresten und Sporen wurde durch Filtration über sterile Watte erzielt. Nach Zentrifugation (2.100 x g, 6 min, 4°C) wurden die Sporen zunächst mit 20% iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, pelletiert und die Sporen in 1-3 ml der Glycerinlösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 80 ml einer 1-2 Tage kultivierten Flüssigkultur abzentrifugiert (4.300 x g, 10 min, 4°C), das Zellpellet in 15 ml 15% iger Glycerinlösung (v/v) gewaschen, pelletiert und anschließend in 10 ml 15% iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde steril zu je 1 ml aliquotiert und bei -70°C gelagert. Für die Inokulation von 50 ml Flüssigmedium wurde nach Auftauen jeweils 0,5 ml der Glycerindauerkultur verwendet, wobei eine Homogenisierung des Mycels durch Verwendung von Insulinspritzen erzielt wurde.

7 Methoden der Molekularbiologie

7.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

7.1.1 Phenol-/Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Abtrennung von Proteinen wurden Nukleinsäurelösungen (mindestens 100 µl) mit 0,8-1,0 VT Rotiphenol (Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol 25:24:1, Roth, Karlsruhe) versetzt, durch Vortexen intensiv gemischt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert ($20000 \times g$, 4 C, 5-10 min). Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und Phenolreste durch Ethanolfällung (s. 7.1.2) entfernt.

7.1.2 Alkoholfällung

Sowohl eine Aufkonzentrierung als auch Reinigung der DNA von niedermolekularen Substanzen wurde durch Ethanolfällung erzielt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,1 VT 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 VT eiskaltem 98%-igem Ethanol oder 0,8-1,0 VT Isopropanol versetzt und durch Invertieren gemischt. Bei Verwendung von Ethanol wurde das Gemisch 30 min bei -70 C bzw. über Nacht bei -20 C gelagert. Bei Verwendung von Isopropanol wurde die DNA 30 min bei -20 C gefällt. Nach Zentrifugation ($20.000 \times g$, 30 min, 4°C) wurde das DNA-Präzipitat mit 0,5 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen.

7.1.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch nach geeigneter Verdünnung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit einem GeneQuant Photometer (Pharmacia, Freiburg) bei 260 nm. Dabei entsprach eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Mit RNA oder Proteinen verunreinigte DNA-Präparationen wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung durch Abschätzung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der eines geeigneten DNA-Größenstandards mit bekannter Konzentration quantifiziert.

7.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

7.2.1 Trennbedingungen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Die Herstellung des Gels sowie die Elektrophorese wurde dabei nach Sambrook und Russell (Sambrook and Russell, 2001) durchgeführt. Durch Verwendung von 0,4-1,5% ige (w/v) Agarosekonzentrationen (Agarose ultrapure, USB, Cleveland, USA) konnten DNA-Fragmente im Bereich von 0,5 bis 50 kb aufgetrennt werden. Zur Trennung von Fragmenten < 500 bp wurden 2,0% (w/v) NuSieve®GTG® Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) eingesetzt. In der Regel wurde ein 0,8%iges Agarosegel und 1×TAE (s. 4.3.2) als Elektrophorese-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen im Verhältnis 1:1 mit DNA-Ladepuffer (s. 4.3.2) versetzt. Analytische Gele wurden bei einer konstanten Spannung von 50-70 V bei RT, präparative Gele bei 30-50 V und RT über 4-16 h durchgeführt.

Als Standardmarker zur Größenbestimmung dienten:

- 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL, Karlsruhe): 0,5 - 12 kb
- High Molecular Weight Marker (Gibco BRL, Karlsruhe): 8,3 – 48,5 kb
- DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert (Boehringer Mannheim, Mannheim): 0,359 – 8,576 kb für Southern-Blot-Hybridisierungen

7.2.2 Färben von Agarose-Gelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel in einem wässrigen Ethidiumbromidbad (1 µg/ml Ethidiumbromid, s. 4.3.2) 15-30 min gefärbt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Durchlicht bei 312 nm sichtbar gemacht (Transilluminator IL-200 M, Bachofer, Reutlingen) und mit dem Eagle-Eye II-System (Stratagene, Heidelberg) fotografiert.

7.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Aus einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel eines präparativen DNA-Restriktionsansatzes wurde unter UV-Licht das gewünschte Agarosestück mit dem entsprechenden DNA-Fragment unter Verwendung eines Skalpellens ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des NucleoSpin® Extract 2 in 1 (Machery-Nagel, Düren) Kits. Die erhaltene DNA wurde mit Ethanol gefällt und anschließend in TE-Puffer (s. 4.3.1) aufgenommen.

7.3 Enzymatische DNA-Manipulationen

7.3.1 Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsverdau wurden im analytischen oder präparativen Maßstab gemäß der vom Hersteller angegebenen, enzymespezifischen Inkubationstemperatur unter Verwendung der mitgelieferten Puffer über einen Zeitraum von 1-4 h in einem Gesamtvolumen von 10-200 µl durchgeführt. Zur Zerstörung von eventuell im Ansatz vorhandener RNA wurde RNase A in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugesetzt. Falls sich dem Verdau nicht direkt eine Gelelektrophorese anschloss, wurden die Restriktionsenzyme durch Ethanol-Fällung (s. 7.1.2), Erhitzen auf 70°C für 15 min oder Phenol-Chloroform-Behandlung (s. 7.1.1) inaktiviert.

Partielle Restriktionsspaltung:

Für die Herstellung einer Cosmidbank (s. 7.10) war eine partielle Spaltung genomischer DNA erforderlich. Unter Variation der Enzymkonzentration (0,025 bis 0,2 Units für jeweils 40 µg genomische DNA) wurde dieser Partialverdau in einem Gesamtvolumen von 100 - 250 µl 30 min lang inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms durch Behandlung bei 70°C für 15 min.

7.3.2 Dephosphorylierung von DNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase

Zur Vermeidung von intramolekularer Ligation der DNA wurde an deren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierfür wurde die DNA-Probe mit 1x One-phor-all-buffer und 0,2 U alkalischer Phosphatase (Amersham Biosciences, Freiburg) 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Erhitzen auf 85°C über 20 min und anschließende Ethanolfällung (s. 7.1.2).

7.3.3 DNA-Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten über Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA wurde die T4-DNA-Ligase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Ein typischer Ligationsansatz enthielt linearisierten Vektor und zu klonierendes Insert im Verhältnis 1:10 bis 1:100, 1 U T4-DNA-Ligase und 1x Ligationspuffer (mit 0,1 mM rATP) in einem Endvolumen von 10 µl. Die Ansätze wurden 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

7.4 DNA-Isolierung

7.4.1 Plasmidminipräparationen aus *E. coli*

3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit *E. coli*-Einzelkolonien inokuliert, über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation (2000 x g, 4°C, 5 min) wurden die Zellen von 1,5 ml Bakteriensuspension geerntet. Das Zellpellet wurde in 250 µl L1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert und mit 250 µl L2-Lösung (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) versetzt. Nach Mischen durch Invertieren wurde der Ansatz ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 250 µl L3-Lösung (3 M Natriumacetat, pH 4,8) versetzt, erneut durch Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Überstand (ca. 650 µl) wurde nach Zentrifugation (20000 x g, 4°C, 20 min) in ein frisches Gefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 460 µl Isopropanol zugesetzt, erneut durch Invertieren gut gemischt und 30 min bei 20000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%-igem (v/v) Ethanol (eiskalt) gewaschen (20000 x g, 4°C, 5 min), getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Präparationen wurden bei -20°C gelagert. Für Restriktionsanalysen wurden 0,5-1,0 µl der Plasmid-DNA eingesetzt. Alle eingesetzten Lösungen sind unter 4.3.1 beschrieben.

7.4.2 Plasmidmaxipräparationen aus *E. coli*

Für die Isolation größerer Plasmidmengen mit einem höheren Reinheitsgrad wurden Nucleobond AX-100-Säulen (Machery-Nagel, Düren) (s. 3) eingesetzt. Die Aufarbeitung des Zellmaterials aus 50 ml Bakteriensuspension wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und resultierte in einer Ausbeute von 80-160 µg Plasmid-DNA, die in 160 µl TE-Puffer (s. 4.3.1) oder sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen wurden. Die so erhaltene DNA wurde bei -20°C aufbewahrt und sowohl zur Transformation von Streptomyceten (s. 7.8) als auch zur DNA-Sequenzierung durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) verwendet.

7.4.3 Isolierung von genomischer DNA aus Streptomyceten

(verändert nach Kieser et al., 2000)

Das Zellmaterial von 50 ml einer 1-2 Tage alten Streptomyceten-Kultur wurde geerntet (2100 x g, 4°C, 10 min) und anschließend einmal mit 15 ml TSE-Puffer (10,3% Saccharose, 25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA; pH 8,0) gewaschen. 40-100 mg der Zellen wurden in 0,5 ml Aufschlußpuffer (TSE-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase) resuspendiert, 30 min bei 37°C inkubiert und zwischendurch 3 mal invertiert. Dieser Ansatz wurde mit 0,25 ml 2%-iger SDS-Lösung versetzt, bei 60°C für 10 min inkubiert und anschließend 10 min auf RT abgekühlt. Das erhaltene Zell-Lysat wurde zur Abtrennung von Proteinen drei mal mit je 0,25 ml Rotiphenol®

extrahiert (s. 7.1.1). Vor der dritten Extraktion wurden dem Ansatz 70 µl einer 3 M NaAc-Lösung (pH 4,8) zugesetzt. Anschließend wurde die isolierte genomische DNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt (s. 7.1.2), bei RT für 10-30 min getrocknet und über Nacht bei 4°C in 50 µl TE-Puffer gelöst. Alle eingesetzten Lösungen sind unter 4.3.1 beschrieben.

7.5 PCR-Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Ein Ansatz (100 µl) für die PCR von Streptomyces-DNA enthielt 10 µl 10xPCR-Puffer (mit MgSO₄), 0,2 mM dNTP, 5% (v/v) DMSO, 20 pmol von jedem Primer, 100-500 ng Template-DNA und 2,5-3,0 Units Pfu-Polymerase. Diverse Kontrollen wurden ohne Template-DNA bzw. mit nur einem der beiden Primer durchgeführt. Der Ansatz wurde im PCR-Gerät zunächst für 5 min bei 96°C, anschließend für 25-30 Zyklen abwechselnd 1,5 min bei 95°C denaturiert, 1,5 min bei der für das jeweilige Primerpaar spezifischen Annealing-Temperatur inkubiert und 2 min bei 72°C elongiert. Anschließend wurde weitere 10 min bei 72°C für die terminale Elongation inkubiert und danach auf 4°C abgekühlt.

Von 5 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurde unter Zusatz von 5 µl Ladepuffer und unter Einsatz eines entsprechenden DNA-Größenstandards ein Agarose-Gel angefertigt.

7.5.1 *simJ1*-Inaktivierungskonstrukt

Zur Inaktivierung von *simJ1* mittels In-Frame-Deletion wurde je ein ca. 1,4 kb großes DNA-Fragment vor (*sim-J1_P01*) sowie hinter *simJ1* (*sim-J1_P02*) unter Verwendung der Primer *sim-J1_P01f*, *sim-J1_P01r*, *sim-J1_P02f* und *sim-J1_P02r* mit PCR amplifiziert. Dabei wurde für die anschließende Klonierung durch den Primer *sim-J1_P01f* eine *XbaI*-Schnittstelle, durch *sim-J1_P01r* und *sim-J1_P02f* eine *BamHI*-Schnittstelle und durch *sim-J1_P02r* eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz für <i>sim-J1_P01</i> (1392 bp)	
Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA Cosmid VII-8g	400 ng
Primer <i>sim-J1_P01f</i> (10 pmol/µl)	10 pmol
Primer <i>sim-J1_P01r</i> (10 pmol/µl)	10 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/µl)	3 Units/Ansatz

Ansatz für sim-J1_P02 (1434 bp)

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA Cosmid VII-8g	400 ng
Primer sim-J1_P02f (10 pmol/μl)	10 pmol
Primer sim-J1_P02r (10 pmol/μl)	10 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Temperaturprofil

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	90 s	
Annealing	58°C	90 s	30
Elongation	72°C	2 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Die PCR-Produkte wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft. Nach *Xba*I-*Bam*HI-Verdau wurde sim-J1_P01 in die gleichen Schnittstellen des integrativen *E. coli*-*Streptomyces* Shuttle-Vektors pBSKT ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als pUG008 bezeichnet. Das PCR-Fragment sim-J1_P02 wurde dann nach *Bam*HI-*Eco*RI-Verdau in die gleichen Schnittstellen von pUG008 hinter sim-J1_P01 ligiert. Das resultierende Plasmid pUG012 wies eine In-Frame-Deletion von 756 bp innerhalb von *simJ1* auf. Durch Umklonierung des 2,8 kb großen *Xba*I-*Eco*RI-Fusionsproduktes von sim-J1_P01 und sim-J1_P02 aus pBSKT in pKC1132, einen integrativen Suizidvektor mit Apramycin Resistenzgen, wurde das fertige Inaktivierungskonstrukt pUG013 erhalten.

7.5.2 *simJ2*-Inaktivierungskonstrukt

Zur Inaktivierung von *simJ2* mittels In-Frame-Deletion wurde je ein ca. 1,4 kb großes DNA-Fragment vor (sim-J2_P01) sowie hinter *simJ2* (sim-J2_P02) unter Verwendung der Primer sim-J2_P01f, sim-J2_P01r, sim-J2_P02f und sim-J2_P02r mit PCR amplifiziert. Dabei wurde für die anschließende Klonierung durch den Primer sim-J2_P01f eine *Xba*I-Schnittstelle, durch sim-J2_P01r und sim-J2_P02f eine *Eco*RI-Schnittstelle und durch sim-J2_P02r eine *Hind*III-Schnittstelle eingeführt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz für sim-J2_P01 (1379 bp)

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA Cosmid VII-8g	400 ng
Primer sim-J2_P01f (10 pmol/μl)	10 pmol
Primer sim-J2_P01r (10 pmol/μl)	10 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Ansatz für sim-J2_P02 (1409 bp)

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA Cosmid VII-8g	400 ng
Primer sim-J2_P02f (10 pmol/μl)	10 pmol
Primer sim-J2_P02r (10 pmol/μl)	10 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Temperaturprofil

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	90 s	
Annealing	58°C	90 s	30
Elongation	72°C	2 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Die PCR-Produkte wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft. Nach *Xba*I-*Eco*RI-Verdau wurde sim-J2_P01 in die gleichen Schnittstellen des integrativen *E. coli-Streptomyces* Shuttle-Vektors pBSKT ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als pUG010 bezeichnet. Das PCR-Fragment sim-J2_P02 wurde dann nach *Eco*RI-*Hind*III-Verdau in die gleichen Schnittstellen von pUG010 hinter sim-J2_P01 ligiert. Das resultierende Plasmid pUG014 wies eine In-Frame-Deletion von 639 bp innerhalb von *simJ2* auf. Durch Umklonierung des 2,8 kb großen *Xba*I-*Hind*III-Fusionsproduktes von sim-J2_P01 und sim-J2_P02 aus pBSKT in pKC1132, einen integrativen Suizidvektor mit Apramycin Resistenzgen, wurde das fertige Inaktivierungskonstrukt pUG015 erhalten.

7.5.3 *ubiA*

Zur Klonierung und Überexpression von *ubiA* wurde unter Verwendung der Primer *ubiA_P01f* und *ubiA_P01r* ein ca. 1,0 kb großes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer *ubiA_P01f* eine *Nco*I-Schnittstelle und

durch den Primer ubiA_P01r eine *Bgl*II-Schnittstelle eingeführt. Diese *Bgl*II-Schnittstelle lag hinter dem natürlichen Stopcodon von *ubiA*, was dazu führte, daß der His₆-Tag in Überexpressionsversuchen nicht mit der membrangebundenen Prenyltransferase UbiA fusioniert wurde. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA pALMU3	100 ng
Primer ubiA_P01f (10 pmol/μl)	20 pmol
Primer ubiA_P01r (10 pmol/μl)	20 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Temperaturprofil

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	90 s	30
Annealing	45°C	90 s	
Elongation	72°C	2 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Das PCR-Produkt wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft und nach *Nco*I-*Bgl*II-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Überexpressionsvektors pQE60 ligiert. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pUG016.

7.5.4 *cloL*

Für die Klonierung von *cloL* als C-terminales 6xHistidin-Fusionsprotein wurde unter Verwendung der Primer cloL_P03f und cloL_P02r ein ca. 1,6 kb großes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer cloL_P03f eine *Sph*I-Schnittstelle eingeführt und dadurch eine Änderung des Startcodons von GTG nach ATG bewirkt. Durch den Primer cloL_P02r wurde eine *Bgl*II-Schnittstelle eingeführt, die eine Entfernung des natürlichen Stopcodons bewirkte und zu einer In-Frame-Ligation des C-Terminus an den 6xHis-Tag führte. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,2 mM
Template-DNA pCloLM	100 ng
Primer cloL_P03f (10 pmol/μl)	20 pmol
Primer cloL_P02r (10 pmol/μl)	20 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Temperaturprofil

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	90 s	25
Annealing	56°C	90 s	
Elongation	72°C	2 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Das PCR-Produkt wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft und nach *SphI*-*BglII*-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Überexpressionsvektors pQE70 ligiert. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pUG018.

7.5.5 FRT und *apra* für die Klonierung von pUG019

Für das PCR-Targeting System sollte eine neue Apramycin-Resistenzkassette ohne *oriT*, aber mit FRT- und Primer-Sites hergestellt werden. Dazu wurden aus pIJ773 ein ca. 100 bp großes DNA-Fragment, das die FRT- sowie die entsprechende Primer-Site enthält, und ein ca. 1,0 kb großes DNA-Fragment, das die FRT-, die Primer-Site sowie das Apramycin-Resistenzgen enthält, mit PCR amplifiziert. Mit Hilfe der verwendeten Primer wurden die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen eingeführt. Außerdem wurden über diese Technik weitere Schnittstellen eingeführt, die für die Einsatzmöglichkeiten dieses Konstruktes eine entscheidende Rolle spielten. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz für FRT

Komponente	Endkonzentration
Expand High Fidelity PCR System PCR-Reaktions-Puffer mit MgCl ₂ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,4 mM
Template-DNA pIJ773	100 ng
Primer FRT_P01f (10 pmol/μl)	50 pmol
Primer FRT_P01r (10 pmol/μl)	50 pmol
Enzyme Mix (2,5 U/μl) des Expand High Fidelity PCR Systems	2,5 Units/Ansatz
Gesamtvolumen	50 μl

Temperaturprofil FRT

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	55°C	45 s	10
Elongation	72°C	90 s	
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	60°C	45 s	15
Elongation	72°C	90 s	
terminale Elongation	72°C	5 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Ansatz für *apra*

Komponente	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10x)	1x
DMSO	5% (v/v)
dNTP (20 mM) (Stratagene)	0,4 mM
Template-DNA pIJ773	100 ng
Primer <i>apra</i> _P03f (10 pmol/μl)	20 pmol
Primer <i>apra</i> _P02r (10 pmol/μl)	20 pmol
<i>Pfu</i> -Polymerase (3 U/μl)	3 Units/Ansatz

Temperaturprofil *apra*

Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	90 s	
Annealing	40°C	90 s	30
Elongation	72°C	2 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
	4°C	∞	Kühlung

Die PCR-Produkte wurde durch geeignete Restriktionsverdau geprüft. Nach *EcoRI-EcoRV*-Verdau wurde FRT in die gleichen Schnittstellen pBluescript SK (-) ligiert. Das Konstrukt wurde als pUG017 bezeichnet. Anschließend wurde das PCR-Fragment apra nach *EcoRV-HindIII*-Verdau in die gleichen Schnittstellen von pUG017 hinter FRT ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pUG019.

7.6 *CaCl*₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

(verändert nach Sambrook and Russel, 2001)

7.6.1 Herstellung *CaCl*₂-kompetenter Zellen

5 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli*-Einzelkolonie unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums inokuliert und bei 37°C und 170 rpm über Nacht inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur dienten als Inokulum für 100 ml LB-Medium, das bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 unter den angegebenen Bedingungen weiterkultiviert wurde. Die nun folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach Zentrifugation (2.750 x g, 4°C, 10 min) wurde das Zellpellet in 30 ml eiskalter 0,1 M *CaCl*₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2.100 x g, 4°C, 10 min). Die Zellen wurden vorsichtig in 30 ml eiskalter 0,1 M *CaCl*₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2.100 x g, 4°C, 10 min) wurden die Zellen vorsichtig in 3-5 ml eiskalter 0,1 M *CaCl*₂-Lösung mit 15% Glycerin (v/v) resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

7.6.2 *CaCl*₂-vermittelte Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

Für jeden Transformationsansatz wurden 200 µl *CaCl*₂-kompetente *E. coli*-Zellen (s. 7.6.1) mit 1-5 µl der entsprechenden DNA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zur Aufnahme der DNA einer 2-minütigen Hitzeschockbehandlung bei 42°C unterworfen und direkt im Anschluß daran einige Minuten auf Eis abgekühlt. Um den Zellen eine Regeneration sowie die Expression der entsprechenden Antibiotikaresistenz zu erlauben, wurde den Ansätzen 1 ml LB-Medium steril zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach kurzer Zentrifugation des restlichen Ansatzes (420 x g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine weitere LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden 16-18 h bei 37°C bebrütet.

Blau-Weiß-Selektion

Bei Verwendung von Klonierungsvektoren mit *lacZ'*-Gen wurde zur Detektion rekombinanter Plasmide eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurde während der 1-stündigen Regeneration der Zellen ein Gemisch von 40 µl X-Gal-Lösung (s.

4.3.4), 10 µl IPTG-Lösung (s. 4.3.4) und 150 µl H₂O (steril) pro Platte auf den antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Zum Verdampfen von toxischem DMF wurden die Platten danach 30 min unter der Sterilbank getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

7.7 Protoplastierung von *Streptomyces antibioticus* Tü 6040

50 ml TSB-Medium mit 0,4% Glycin und 10% Saccharose (s. 4.1.5) wurden mit 200 µl Glycerinkultur von *S. antibioticus* Tü 6040 beimpft und 24-48 h bei 170 rpm, 28°C kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2100 x g, 4°C, 10 min) und 2 mal mit je 10 ml TE-Puffer (pH 8,0) mit 10%-igem (w/v) Saccharose-Zusatz gewaschen (Zentrifugation: 2100 x g, 4°C, 10 min). Das Zellpellet (ca. 2-4 g) wurde in 3 ml P-Puffer (s. 4.3.5) pro g Zellen mit 4 mg/ml Lysozym (Fluka) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde 30-60 min bei 30°C, 120 rpm inkubiert. Dabei wurde der Vorgang der Protoplastierung in 15-minütigen Abständen durch Mikroskopieren kontrolliert. Nach ausreichender Protoplastierung wurde die Reaktion durch Kühlen auf Eis gestoppt und alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der gesamte Ansatz wurde zur Abtrennung von Mycelresten durch sterile Glaswolle filtriert, die Filtrationseinheit noch einmal mit 2 ml P-Puffer gespült und das Filtrat abzentrifugiert (2100 x g, 4°C, 5 min) und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Die Protoplasten wurden in 0,5-3 ml P-Medium resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und auf Eis langsam über Nacht bei -70°C eingefroren. Die Protoplasten wurden anschließend bei -70°C gelagert.

Zur Überprüfung des Anteils nicht-protoplastierter Zellen wurden 20 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl sterilem H₂O_{bidest} gemischt und der Ansatz auf eine R₂YE-Platte (s. 4.1.5) ausplattiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die gleiche Menge Protoplastensuspension mit 200 µl P-Puffer ausplattiert wurde. Die Bestimmung der Anzahl der regenerierungsfähigen Protoplasten erfolgte durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungsstufen in P-Puffer auf R₂YE-Platten.

7.8 PEG-vermittelte Transformation von *Streptomyceten*

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *Streptomyceten*-Protoplasten wurde durch die Polyethylenglykol-vermittelte Transformation nach Kieser et al. (2000) realisiert. Für die Transformation wurden 100 µl der Protoplastensuspension (etwa 10⁶ regenerationsfähige Zellen) mit 100 µl P-Puffer verdünnt und mit 10-20 µg doppelsträngiger, unmethylierter (aus *E. coli* ET12567 isoliert) DNA bei Raumtemperatur vermischt. Der Ansatz wurde mit 500 µl T-Puffer (s. 4.3.5) versetzt und durch sofortiges Invertieren vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz (100 µl, 200 µl und 400 µl) wurde anschließend mit Hilfe von 40-50°C warmem R₂YE-

Weichagar auf 3 R₂YE-Platten verteilt und die Platten wurden 16 h bei 30°C inkubiert. Für die Selektion wurden die Platten mit 3 ml R₂YE-Weichagar mit 166 µg Thiostrepton / ml bzw. mit 100 µg Apramycin / ml überschichtet. Nach 5-7 Tagen weiterer Kultivierung bei 30°C wurden mit sterilen Zahnstochern Einzelkolonien gepickt und zur weiteren Selektion auf HA-Agarplatten mit 50 µg/ml Thiostrepton bzw. 25 µg/ml Apramycin ausgestrichen.

7.9 Southern Hybridisierung

Alle Puffer und Lösungen, die für die Southern Hybridisierung verwendeten wurden, sind unter 4.3.3 aufgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach den Angaben der jeweils benutzten Kits durchgeführt.

7.9.1 Enzymabhängige „Random Prime“-DIG-Markierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente als Sonden für die Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin zu markieren, wurde der DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, Mannheim) eingesetzt. Mit diesem Kit können DNA-Stücke von 200-1000 bp Länge markiert werden. 0,5-1 µg der betreffenden DNA-Probe, die entweder durch PCR gewonnen oder nach einem präparativen Restriktionsverdau aus einem Agarosegel isoliert wurde, wurde gefällt und in 6 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA für 10 min bei 100°C und Abkühlen in flüssigem Stickstoff wurde der Ansatz mit 4 µl DIG High Prime-Lösung versetzt und 20 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Sonde durch zufälligen enzymatischen Einbau von DIG-gekoppeltem dUTP während der DNA-Synthese mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I markiert. Überschüssiges DIG-dUTP wurde anschließend durch LiCl-Ethanol-Fällung entfernt. Die Quantifizierung der Sonde bzw. die Überprüfung der Reaktionseffizienz wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Herstellung der Sonde für das Screening der Cosmidbank von *S. antibioticus* Tü 6040 wurde ein 1,3 kb großes *XhoI-NcoI*-Fragment nach präparativem Verdau von pMS88 aus einem Agarosegel isoliert (s. 7.2.3). Anschließend wurde dieses Fragment wie hier beschrieben mit Digoxigenin markiert. Die Sonde enthielt das Cytochrom P₄₅₀-Gen *novI* aus dem Novobiocinproduzenten *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891.

Die 1,2 kb große Sonde S-simJ1 wurde durch *BamHI-EcoRV*-Verdau von pUG012, Isolierung des Fragmentes aus einem Agarosegel sowie Digoxigenin-Markierung

gewonnen. Diese Sonde wurde zur Analyse der *simJ1*-Integrationsmutanten verwendet.

Die 1,1 kb große Sonde S-*simJ2* wurde durch *EcoRI-PvuII*-Verdau von pUG014, Isolierung des Fragmentes aus einem Agarosegel sowie Digoxigenin-Markierung gewonnen. Diese Sonde wurde zur Analyse der *simJ2*-Integrationsmutanten verwendet.

7.9.2 Southern Blot

2-5 µg genomische DNA bzw. 10-750 ng Cosmid-DNA wurden mit den ausgewählten Enzymen 4 h bei 37°C verdaut, anschließend alkoholisch gefällt (s. 7.1.2), in TE-Puffer aufgenommen und gelelektrophoretisch (s. 7.2) über 4-5 h aufgetrennt. Als Marker wurden der 1 kb-Marker und der DIG Marker No. VII eingesetzt. Nach Färben mit Ethidiumbromid wurde das Agarosegel 5 min bei Raumtemperatur mit Depurinierungslösung (s. 4.3.3) behandelt, dann mit H₂O *bidest.* kurz gewaschen und anschließend 2 mal 15 min unter leichtem Schütteln in Denaturierungslösung (s. 4.3.3) inkubiert. Durch die Depurinierung mit HCl wurden bei größeren DNA-Fragmenten (> 10 kb) Strangbrüche bewirkt, was den Transfer der DNA-Stücke beim Blotten erleichterte. Das Gel wurde erneut kurz mit H₂O *bidest.* gewaschen und danach 2 mal 15 min in Neutralisierungslösung (s. 4.3.3) unter leichtem Schütteln neutralisiert. Mittels Kapillartransfer mit 20x SSC-Lösung (s. 4.3.3) erfolgte anschließend die Übertragung der einzelsträngigen DNA innerhalb von 16 h auf eine Hybond-N Nylon Membran (Amersham, Braunschweig, Germany). Nach Abbau des Blots wurde die transferierte DNA durch Bestrahlen der Membran mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm für 60 s auf der Vorder- und für 30 s auf der Rückseite fixiert.

7.9.3 Hybridisierung, Waschbedingungen und Detektion

Zur Hybridisierung der Membran wurde diese in eine Hybridisierungsröhre überführt und mit 20 ml Prähybridisierungslösung (s. 4.3.3) für 2-4 h bei 68°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die markierte Sonde wurde zur Hybridisierungslösung (s. 4.3.3) gegeben, sodass ihre Konzentration 5-25 ng/ml betrug. Die Sonde wurde in der Hybridisierungslösung 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach Abdekantieren der Prähybridisierungslösung wurden 5-10 ml der noch fast gefrorenen Hybridisierungslösung zur Membran gegeben und die Membran über Nacht bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung der unspezifischen Bindungen 2 mal 5 min mit je 10 ml 2x SSC-Waschpuffer (s. 4.3.3) bei RT und 2 mal 15 min mit je 10 ml 0,5x SSC-Waschpuffer (s. 4.3.3) bei 68°C behandelt.

Die Detektion der Membran wurde mit Hilfe von Chemilumineszenz durchgeführt. Dazu wurde die Membran unter leichtem Schütteln 5 min mit Waschpuffer (s. 4.3.3), 60 min mit Blocking Solution (s. 4.3.3) und 30 min mit Antikörperlösung (s. 4.3.3) inkubiert. Für die Entfernung überschüssiger Antikörper-Lösung wurde die Membran 2 mal 15 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 5 min mit Detektionspuffer (s. 4.3.3) behandelt. Dann wurde die Membran mit einigen Tropfen CSPD-Lösung benetzt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann in eine Fotokassette eingelegt und 30-60 min bei 37°C mit einem Hyperfilm ECL-Röntgenfilm (Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Der Film wurde anschließend 1 min entwickelt sowie 5 min fixiert und gut getrocknet. Die eingesetzten Volumina der Waschlösungen richtete sich nach der Größe der Membran und betrug ca. 100 ml / 100 cm².

Entfernung der Sonden:

Um die Membran für eine zweite Detektion verwenden zu können, wurde diese mit sterilem Wasser gewaschen, 2 mal 15 min bei 37°C in 0,2 M NaOH mit 0,1%-igem SDS-Zusatz behandelt, gründlich mit 2 x SSC-Lösung gewaschen und bei 4°C gelagert bzw. erneut prähybridisiert.

7.10 Herstellung und Screening einer Cosmidbank von *S. antibioticus* Tü 6040

Die chromosomale DNA von *S. antibioticus* Tü 6040 wurde mit *Sau3AI* partiell verdaut (s. 7.3.1), dephosphoryliert (s. 7.3.2) und in den mit *BamHI* verdauten Cosmidvektor SuperCosI ligiert. Der Ligationsansatz wurde mit Hilfe des Gigapack® III XL Packaging Extraktes (Stratagene, Heidelberg, Germany) in Phagen verpackt und in *E. coli* XL1 Blue MRF' transduziert. Unter Verwendung dieses Kits werden bevorzugt ca. 40 kb große DNA-Fragmente verpackt. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 µg Carbenicillin / ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

960 Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in sterile Mikrotiterplatten mit LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) überführt und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die so erstellte Cosmidbank von *S. antibioticus* Tü 6040 mittels eines Stempels erneut auf carbenicillinhaltige (50 µg/ml) LB-Agarplatten übertragen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Mikrotiterplatten wurden durch Zusatz von 60%-igem Glycerin konserviert und die Cosmidbank so bei -70°C gelagert.

Das Screening der Cosmidbank wurde in drei Runden mittels Southern Blot Hybridisierung (s. 7.9) durchgeführt. Als Sonde diente ein 1,3 kb großes *XhoI/NcoI*-Fragment aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster von *S. spheroides* NCIMB 11891. Dieses DNA-Fragment enthielt das Gen *novI*, das für ein Cytochrom P₄₅₀-

Enzym codiert, und wurde mit dem Digoxigenin High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer, Mannheim, Germany) markiert (s. 7.9.1).

Für die erste Screening-Runde wurden die 960 Klone in 20 Pools á 48 Klone unterteilt. Diejenigen Pools, die mit der eingesetzten Sonde ein Hybridisierungssignal zeigten, wurden für die zweite Screeningrunde in je 6 Unterpools á 8 Klone unterteilt. Unterpools, die erneut ein Hybridisierungssignal mit *novI* aufwiesen, wurden in der dritten Runde als Einzelklone untersucht. Positive Klone wurden anschließend mittels Restriktionskartierung und Sequenzierung näher untersucht.

7.11 DNA-Sequenzierung und computerunterstützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany) mit Hilfe der Dideoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer durchgeführt. Für die Sequenzierung des Cosmides VII-8g, welches ein 39,428 kb großes Insert genomischer DNA von *S. antibioticus* Tü 6040 trägt, wurde eine Shotgun-Bibliothek mit Fragmentgrößen von 1,5-2,0 kb verwendet.

Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes DNASIS for Windows Version 2.1 (1995), Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA. Homologievergleiche auf DNA- und Aminosäureebene wurden unter Verwendung des BLAST-Programmes (Version 2.0) über Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt.

8 Methoden der Biochemie und Biologie

8.1 Überexpression und Reinigung rekombinant exprimierter Enzyme aus *E. coli*

8.1.1 Herstellung zellfreier Enzymrohextrakte zur Reinigung der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL

Zur heterologen Überexpression und Reinigung der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL als C-terminale 6xHis-Fusionsproteine diente *E. coli* XL1 Blue MRF' als Wirtsstamm. Hierzu wurden die Expressionskonstrukte pMS80 (für NovL-His₆), pUG018 (für CloL-His₆) und pMS90 (für CouL-His₆) wie unter 7.6.2 beschrieben in *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert, was in transgenem *E. coli* XL1 Blue MRF':pMS80, *E. coli* XL1 Blue MRF':pUG018 und *E. coli* XL1 Blue MRF':pMS90 resultierte.

5 ml einer mit einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli* XL1 Blue MRF'-Stammes beimpften LB-ÜN-Kultur mit 50 µg/ml Carbenicillin dienten als Vorkultur für die Inokulation von 100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin. Die Kultur wurde bei 30°C, 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 inkubiert und anschließend mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG induziert. 3 Stunden nach Induktion wurden die

Zellen geerntet (Zentrifugation: 6.200 x g, 4°C, 10 min), mit 100 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation (6.200 x g, 4°C, 10 min) eingefroren. Die Zellen wurden bei 4°C aufgetaut, in 1 ml Lysepuffer (s. 4.3.6) pro g Zellen Feuchtgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 6 x 30 Sekunden Beschallung bei 200 W mit jeweils 30 Sekunden Intervallpause mittels Sonifier-Gerät (Branson Sonifier 250, Mikrospitze) bei 4°C im Eisbad aufgeschlossen. Nach Zugabe von 10 µg/ml RNase A und 5 µg/ml DNase I wurde die Mischung für 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend zur Abtrennung der Zellfragmente zentrifugiert (17.500 x g, 4°C, 30 min). Das klare Lysat wurde anschließend einer Proteingehaltsbestimmung sowie weiteren Reinigungsschritten unterworfen.

8.1.2 Reinigung der rekombinant exprimierten Enzyme mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie

Für die drei als 6xHis-Fusionsproteine exprimierte Amidsynthetasen (s. 8.1.1) war die Reinigung mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie geeignet. Die Reinigung wurde wie im Herstellerhandbuch „The QIAexpressionist“ beschrieben unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitriloacetat-Agarose) als Matrix durchgeführt. Je nach Proteingehalt wurden 3-4 ml klares Lysat aus 8.1.1 mit 1 ml Ni-NTA-Suspension (50% [w/v] Ni-NTA-Agarose in 30 % [v/v] Ethanol; Bindungskapazität: 5-10 mg 6xHis-Fusionsprotein pro ml Säulenmaterial) versetzt und 60 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Nach Überführung der Protein-Matrix-Suspension in eine leere Säule und Waschen der Säule mit 2x4 ml Waschpuffer (s. 4.3.6) wurden die gereinigten C-terminalen 6xHis-Fusionsproteine mit 2 ml Elutionspuffer (s. 4.3.6) eluiert und das Eluat über eine Sephadex G-25 Säule in Aufbewahrungspuffer (s. 4.3.6) umgepuffert.

8.1.3 Herstellung zellfreier Enzymrohextrakte zur Aktivitätsbestimmung der Prenyltransferase UbiA

100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur von transgenem *E. coli* K12:pALMU3, *E. coli* XL1 Blue MRF':pUG016 oder *E. coli* BL21 (DE3):pUG016 inokuliert und bei 37°C bzw. 30°C, 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 inkubiert. Dann wurde mit 0,5 bzw. 1,0 mM IPTG induziert und weitere 3-4 h bei 37°C bzw. 30°C, 170 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (6200 x g, 4°C, 10 min), einmal mit Tris-Puffer (50 mM, pH 8,0) gewaschen und bei -70°C schockgefroren.

Zur Gewinnung von Enzymrohextrakt wurden die Zellen aufgetaut, mit 1 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM DTT, 1 mg/ml Lysozym) pro g Zellen Feuchtgewicht versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Sonifier-Gerät bei 4°C im Eisbad durch 6 x 30 Sekunden Beschallung bei 200

W mit jeweils 30 Sekunden Intervallpause. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 µg/ml RNase und 5 µg/ml DNase versetzt, weitere 10 min. auf Eis inkubiert und zur Abtrennung von Zellfragmenten 30 min bei 17500 x g, 4°C abzentrifugiert. Das erhaltene klare Lysat wurde über Sephadex G-25 Säulen (PD10 oder NAP10) in Aufbewahrungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM DTT, 15 % Glycerin) umgepuffert und bei -70°C gelagert.

8.1.4 Entsalzung der gereinigten Proteine

Für die Entsalzung von Proteinlösungen sowie deren Umpufferung in Aufbewahrungspuffer wurden Sephadex G-25 Säulen in unterschiedlichen Größen (NAP10 und PD10) verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit dem entsprechenden Aufbewahrungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung in dem vom Hersteller angegebenen maximalen Probenvolumen aufgetragen und mit Aufbewahrungspuffer (Volumen gemäß Herstellerangaben) eluiert. Nach Gebrauch wurden die Säulen mit dem jeweils 5-fachen Säulenvolumen H₂O_{bidest} und 0,1 N NaOH gespült. Anschließend wurde bis zum Erreichen eines neutralen pH-Wertes mit H₂O_{bidest} gewaschen.

8.2 Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt von Enzymlösungen und Rohextrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) über eine Kalibriergerade mit BSA als Standard ermittelt. 100 µl der mit dem entsprechenden Puffer verdünnten Enzym- oder BSA-Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (s. 4.3.7) versetzt und die Absorption nach 5 min Inkubation bei RT spektralphotometrisch bei 595 nm vermessen. Als Referenz wurden 100 µl des jeweiligen zur Verdünnung verwendeten Puffers mit 1 ml Bradfordlösung eingesetzt.

8.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) herangezogen. Vor Auftragen auf das Gel wurden die zu analysierenden Proteinproben im Verhältnis 1:4 mit 1x-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 12%-igen Polyacrylamidtrenngel (Gelgröße 70 x 80 x 0,5 mm) bei 200 V über 45 min in einer Mini-PROTEAN II Elektrophorese-Zelle der Firma BIO-RAD (Cell). Die dazu verwendeten Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers wie unter 4.3.8 beschrieben angefertigt. Das Gel wurde 10 min in Fixierlösung fixiert und 5-10 min in Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung gefärbt. Durch Entfärben des

Hintergrundes für maximal 90 min in Entfärberlösung und Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde die Entwicklung des Geles abgeschlossen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Proteinbanden mit den Banden eines Molekulargewichtsstandards. Dazu wurden 14,4 μg Low Molecular Weight-Standard (Amersham Pharmacia Biotech) mit Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) eingesetzt.

8.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

8.4.1 Bestimmung der Amidsynthetase-Aktivität

Der Amidsynthetase-Assay enthielt in einem Reaktionsvolumen von 100 μl 1 mM Ring A oder Ring A-Analogon, 1 mM Ring B von Novobiocin (methyliert an C-8), 5 mM ATP, 5 mM MnCl_2 , 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 0,5-2,0 μg der entsprechenden Amidsynthetase (NovL, CloL oder CouL). Die Reaktionsansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert und dann mit 5 μl 1,5 M Trichloressigsäure-Lösung abgestoppt. Für die Analyse der Assayprodukte wurden die Ansätze wie unter 9.1.3 beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Als Kontrolle wurden jeweils Aktivitätsbestimmungen mit hitzeinaktiviertem Protein (30 min, 100°C) in Anwesenheit aller Assaykomponenten durchgeführt.

8.4.2 Bestimmung der Prenyltransferase-Aktivität

Der Prenyltransferase-Assay enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 μl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 400 μM Geranyldiphosphat (GPP), 800 μM 4-Hydroxybenzoesäure (4HB), 50 mM MgCl_2 und ca. 40-50 μg Proteinrohextrakt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μl Ameisensäure (p.a.) abgestoppt. Die Ansätze wurden wie unter 9.1.5 beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Als Kontrolle wurden jeweils Aktivitätsbestimmungen mit hitzeinaktiviertem Protein (30 min, 100°C) in Anwesenheit aller Assaykomponenten durchgeführt.

8.5 Fütterungsexperimente

8.5.1 Fütterung der simJ1-Defektmutante mit Ring B aus Novobiocin

Die Single-Crossover-Mutante *S. antibioticus* UG J1-21, die die Fähigkeit zur Simocyclinon D-Produktion verloren hatte, stattdessen jedoch Simocyclinon C akkumulierte, wurde in 50 ml komplexem Produktionsmedium 1 (s. 4.1.3) bei 28°C, 120 rpm angezogen. 42 h nach Inokulation sowie 5 h später wurde der Kultur je 1 mg

Ring B (gelöst in 10 µl Methanol) steril zugesetzt. Nach weiteren 43 h Kultivierung wurden die gebildeten Sekundärstoffe wie unter 9.1.2 beschrieben extrahiert und über HPLC analysiert.

Als Kontrollen wurden *S. antibioticus* Tü 6040 Wildtyp sowie die entsprechende Mutante parallel ohne Fütterung, jedoch unter Zugabe von je 10 µl Methanol kultiviert und ebenfalls extrahiert und analysiert.

8.5.2 Fütterung der *cloQ*-Defektmutante mit verschiedenen synthetischen Ring A-Analoga

Für die Mutasynthese-Versuche mit Ring A-Analoga wurde die *cloQ*⁻-Mutante des Clorobiocin-Produzenten *S. roseochromogenes* (Pojer et al., 2003a; Pojer et al., 2003b) verwendet. Bei dieser Mutante war ein für die Ring A-Biosynthese essentielles Gen inaktiviert worden.

50 ml YMG-Medium (s. 4.1.2) in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) wurden mit 300 µl Glycerinkultur der *cloQ*⁻-Mutante bzw. des Wildtyps *S. roseochromogenes* beimpft und 2 Tage bei 30°C, 180 rpm kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden anschließend 50 ml Corn Starch-Vorkulturmedium (s. 4.1.4) in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) inokuliert und 2 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert. 5 ml dieser zweiten Vorkultur wurden dann in 50 ml Distillers solubles-Produktionsmediums (s. 4.1.4) in 500 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) übführt und insgesamt 7-9 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert. Die zu fütternden Kulturen wurden 2 Tage nach Inokulation des Produktionsmediums mit 1 mg der betreffenden Substanz gelöst in 200 µl Ethanol versetzt und dann weiterkultiviert. Nach weiteren 3-5 Tagen Kultivierung wurden die gebildeten Sekundärstoffe wie unter 9.1.4 bzw. 9.2 beschrieben extrahiert und über HPLC analysiert.

Als Kontrollen wurden parallel *S. roseochromogenes* Wildtyp sowie die *cloQ*⁻-Mutante ohne Fütterung und ebenfalls extrahiert und analysiert.

8.6 Bestimmung antimikrobieller und gyrasehemmender Aktivitäten der Aminocoumarin-Antibiotika

8.6.1 Bioassay mit *Bacillus subtilis*

Die antibakterielle Aktivität von Novobiocin, Clorobiocin sowie den mutasynthetisch hergestellten Novoclobiocinen wurde mit Hilfe eines Agardiffusionstests unter Verwendung von *Bacillus subtilis* ATCC 14893 als Teststamm überprüft.

4,6 g Nutrient Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) wurden in 200 ml Wasser suspendiert und autoklaviert (Kieser et al., 2000). Nach Abkühlen auf 45°C wurden ca. 2×10^5 *Bacillus subtilis*-Sporen / ml Medium zugesetzt. Unterschiedliche Mengen der zu testenden Substanzen wurden als methanolische Lösung in einem Volumen von 1-10 µl auf Filterplättchen (Ø 3 mm; MN 440 B blotting paper; Macherey-Nagel,

Düren, Germany), die bereits auf die Agarplatten aufgebracht worden waren, aufgetragen und 30 min an der Luft getrocknet. Als Negativkontrolle dienten 10 µl reines Methanol. Die Bioassay-Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Maß für die antibiotische Aktivität diente der resultierende Hemmhofdurchmesser im Vergleich zu Clorobiocin als Standard.

8.6.2 MIC-Bestimmung

Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen der Novclobiocine sowie von Novobiocin und Clorobiocin als Standard wurden mit Hilfe einer Medien-Verdünnungsmethode im µl-Maßstab nach den Angaben des National Committee for Clinical Laboratory Standards durchgeführt (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Dazu wurden Mikrotiterplatten (96 Wells / Platte; Endvolumen der Assays: 100 µl pro Well) zunächst mit 50 µl eines geeigneten Wachstumsmediums für den jeweiligen Teststamm befüllt. In diesem Medium wurden Verdünnungsreihen der Testsubstanzen (0,06-32 µg/ml) angelegt. Die Platten wurden mit 5×10^5 Zellen einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase pro ml Assayansatz inokuliert und über Nacht bei 35°C als Standkultur inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte durch optische Inspektion mit Hilfe eines beleuchteten Mikrotiterplatten-Lesegerätes mit Vergrößerungsspiegel (MIC-2000, Cooke Laboratory Products, Alexandria, Virginia).

Für *Streptococcus pneumoniae* wurden die MIC-Bestimmungen in Kationen-angepaßtem Mueller-Hinton-Medium (CAMHB; BBL, Cokeysville, MD, USA), das mit 5% (v/v) Pferdeserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplementiert wurde, durchgeführt. Alle übrigen Teststämme wurden für die MIC-Bestimmungen in Kationen-angepaßtem Mueller-Hinton-Medium ohne Serumzusatz kultiviert. Die Novclobiocine sowie Novobiocin und Clorobiocin wurden für diese Experimente in DMSO gelöst; die Endkonzentration an DMSO pro Assayansatz betrug maximal 2% (v/v).

8.6.3 Supercoiling-Assay

Für die Testung der Novclobiocine auf DNA-Gyrase-hemmende Aktivität wurde der DNA Gyrase Assay Kit (John Innes Enterprises Ltd., Norwich, UK) eingesetzt. Der Supercoiling-Assay enthielt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 35 mM Tris-HCl (pH 7.5), 24 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1.8 mM Spermidin, 1 mM ATP, 6.5% (w/v) Glycerol, 2 µg BSA, 1 U DNA Gyrase (von *E. coli*), 100 ng relaxierte pBR322-DNA sowie unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanzen. Hierfür wurden unterschiedlich konzentrierte Stammlösungen der Substanzen (10 µM bis 1 mM) in Methanol-Wasser-Gemischen (0,2-20,0% Methanol) verwendet. Die Ansätze wurden 60 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion wurde anschließend durch Abkühlen auf Eis

sowie durch den Zusatz von 3 µl Ladepuffer (s. 4.3.2) gestoppt und mittels DNA Gelelektrophorese (s. 7.2) in einem 0,8%-igen Agarosegel analysiert.

Eine Einheit (1 U) DNA Gyrase Aktivität wurde definiert als diejenige Gyrasemenge, die 0,5 µg relaxierte pBR322-DNA in 30 min bei 37°C überspiralisiert. Der inhibitorische Effekt der verschiedenen Novclobiocine wurde als IC₅₀ ausgedrückt, d.h. als diejenige Aminocoumarin-Konzentration, die eine Hemmung der Supercoiling Aktivität der Gyrase um 50% bewirkte.

9 Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen

9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

9.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Analytik und Isolierung niedermolekularer, enzymatisch und mutasynthetisch gebildeter Substanzen eine HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) verwendet. Die Anlage setzte sich zusammen aus zwei Pumpen (Waters 510), einem Autosampler (Waters 717) sowie einem UV-Detektor (Waters 486 Absorbance Detector). Sowohl die Steuerung der HPLC-Systeme als auch die Auswertung erfolgte über die Millenium-Software.

Zu analytischen Zwecken erfolgte die Trennung bei einer Flußrate von 1 ml/min über eine Multosphere RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war. Für die präparative Isolierung wurde eine Trennsäule mit größerem Durchmesser eingesetzt (s. 9.2.3).

Als Fließmittelkomponenten wurden Methanol (Lichrosolv, Merck), Ameisensäure (p.a.) und H₂O_{bidest.} verwendet. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) von Partikeln befreit und unter Vakuum entgast.

9.1.2 Analytik der Simocyclinone

Zur Überprüfung der Simocyclinon-Produktion in *S. antibioticus* Tü 6040 bzw. in den entsprechenden ungefütterten und gefütterten Mutanten wurden 50 ml Gesamtkultur mit HCl auf pH 4 eingestellt und anschließend zweimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde unter Vakuum einrotiert und der Rückstand in 5 ml Methanol aufgenommen. Die HPLC-Analytik von Simocyclinon D8 und anderen Sekundärstoffen wurde im Arbeitskreis von Professor Fiedler in einem Gradienten aus 0,1%-iger Phosphorsäure und Acetonitril bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt (Theobald et al., 2000).

9.1.3 Analytik von Novobiocinsäure und Novobiocinsäurederivaten

Für die Detektion der im Amidsynthetase-Assay gebildeten Novobiocinsäure bzw. Novobiocinsäure-Derivate wurden die Ansätze zweimal mit je 500 µl Ethylacetat extrahiert und die Ethylacetat-Phase nach Vereinigung (900 µl) in einer Vakuumzentrifuge bei 30°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 105 µl Methanol gelöst und mittels HPLC (Injektionsvolumen 80 µl) analysiert. Die Gradienten-Elution wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Fließmittel A: Wasser : Methanol : Ameisensäure (79:20:1)
 Fließmittel B: Methanol : Ameisensäure (99:1)
 Detektionswellenlänge: 305 nm

Zeit [min]	Flow [ml]	A [%]	B [%]
0,0	1,0	50	50
2,0	1,0	50	50
20,0	1,0	0	100
23,0	1,0	0	100
23,1	1,0	50	50
30,0	1,0	50	50

Eine Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade mit Novobiocinsäure (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA). Die Standardsubstanz wurde zu diesem Zweck in Methanol gelöst.

9.1.4 Analytik von Clorobiocin und Clorobiocin-Analoga

Zu analytischen Zwecken wurden 10 ml einer Kultur von *S. roseochromogenes* bzw. von der entsprechenden ungefütterten und gefütterten Mutante mit HCl auf pH 4 eingestellt und anschließend zweimal mit je 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde unter Vakuum einrotiert und der Rückstand in 0,5 ml Methanol resuspendiert. Nach Zentrifugation wurden 100 µl des klaren Überstandes mittels HPLC analysiert. Die Gradienten-Elution wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Fließmittel A: Wasser : Methanol : Ameisensäure (79:20:1)
 Fließmittel B: Methanol : Ameisensäure (99:1)
 Detektionswellenlänge: 340 nm

Zeit [min]	Flow [ml]	A [%]	B [%]
0,0	1,0	40	60
2,0	1,0	40	60
30,0	1,0	0	100
33,0	1,0	0	100
33,1	1,0	40	60
37,0	1,0	40	60

Eine Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade mit Clorobiocin (Aventis). Die Standardsubstanz wurde zu diesem Zweck in Methanol gelöst.

9.1.5 Analytik von 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure

Für die Detektion der im Prenyltransferase-Assay gebildeten 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (GBA) wurden die Ansätze zweimal mit je 150 µl Ethylacetat extrahiert und die Ethylacetat-Phase nach Vereinigung (250 µl) in einer Vakuumzentrifuge bei 30°C abgedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Methanol gelöst und mittels HPLC (Injektionsvolumen 90 µl) analysiert. Die Gradienten-Elution wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Fließmittel A: Wasser : Methanol : Ameisensäure (79:20:1)
 Fließmittel B: Methanol : Ameisensäure (99:1)
 Detektionswellenlänge: 270 nm

Zeit [min]	Flow [ml]	A [%]	B [%]
0,0	1,0	85	15
250	1,0	85	15
15,0	1,0	0	100
17,0	1,0	0	100
17,1	1,0	85	15
25,0	1,0	85	15

Eine Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergerade mit 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure (s. 1). Die Standardsubstanz wurde zu diesem Zweck in Methanol gelöst.

9.2 Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika

9.2.1 Extraktion aus Zellkulturen

Zur präparativen Isolierung der neuen Novclobiocine wurden 500-1000 ml einer zuvor mit dem entsprechenden Ring A-Analogen gefütterten Zellkultur mit HCl auf pH 4 angesäuert. Zur Entfernung lipophiler Bestandteile wurde die Kultur zunächst mit

Petrolether ausgeschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Phase zwei mal mit Ethylacetat extrahiert, die Ethylacetat-Phase wurde einrotiert und der Rückstand in 3 ml Methanol gelöst.

9.2.2 Säulenchromatographie and Sephadex LH-20

Eine Glassäule (100 x 2,6 cm) wurde mit Sephadex LH 20 (Amersham Biosciences, Freiburg) befüllt. Auf diese Säule wurde ein Probenvolumen von maximal 3 ml Kulturextrakt aufgetragen und mit entgastem Methanol bei einer Flußrate von 0,5 ml/min eluiert. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen von je ca. 10 ml gesammelt und unter Verwendung des Gradienten für Clorobiocin-Derivate mit HPLC analysiert (s. 9.1.4). Novclobiocinhaltige Fraktionen wurden anschließend gepoolt, einrotiert und für die präparative HPLC-Reinigung in 500-1000 µl Methanol aufgenommen.

9.2.3 Präparative HPLC-Reinigung

Die HPLC-Reinigung der Novclobiocine erfolgte an einer Multosphere 120 RP18-5-Säule (250 mm × 20 mm, Partikelgröße 5 µm) (C&S Chromatographie Service, Düren). Für die Isolierung wurde folgender Gradient verwendet:

Fließmittel A: Wasser : Methanol : Ameisensäure (79:20:1)
 Fließmittel B: Methanol : Ameisensäure (99:1)
 Detektionswellenlänge: 340 nm

Zeit (min)	Flow (ml)	A (%)	B (%)
0,0	2,5	40	60
2,0	2,5	40	60
30,0	2,5	0	100
35,0	2,5	0	100
35,1	2,5	40	60
40,0	2,5	40	60

Die isolierten Substanzen wurden durch Einrotieren vom Fließmittel befreit, getrocknet und zur Strukturaufklärung weiteren spektroskopischen Methoden unterworfen.

9.3 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung

9.3.1 LC-MS-Analyse von Simocyclinon D_{met}

Die massenspektrometrischen Messungen wurden von Jürgen Schmidt am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle durchgeführt. Die negativen EI-MS-Spektren wurden durch Messung an einem MAT TSQ 7000 Spektrometer von Finnigan, Bremen (Elektrospray-Spannung: 4,5 kV; Temperatur der Heizkapillare: 220°C; Hüll- und Hilfsgas: Stickstoff) gekoppelt an ein Micro-Tech Ultra-Plus MicroLC System mit RP18-Säule (4 µm, 1x100 mm, SepServ) erhalten. Zur Trennung mittels HPLC wurde ein Gradient aus H₂O:MeOH 90:10 (jeweils mit 0,2% HAc) bis 10:90 innerhalb von 15 min gefolgt von isokratischer Elution mit einer 10:90-Mischung aus beiden Fließmitteln für 25 min bei einer Flussrate von 70 µl min⁻¹ verwendet. Alle Massenspektren wurden gemittelt und der Hintergrund abgezogen.

9.3.2 LC-MS- und CID-Analyse der enzymatischen Produkte sowie der neuen Aminocoumarin-Antibiotika

Die positiven und negativen Elektrospray (ES)-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT TSQ 7000 Spektrometer (Elektrospray-Spannung: 4.5 kV; Kapillartemperatur: 220°C; Trenn- und Hilfsgas: Stickstoff) gekoppelt an ein Micro-Tech Ultra-Plus MicroLC System aufgenommen. Die flüssigchromatographische Trennung erfolgte über eine RP18-Säule (4 µm, 1x100 mm, SepServ, Berlin) in einem Gradienten von 10% bis 90% MeOH in 0,2% wässriger Essigsäure mit einer Flussrate von 70 µl min⁻¹. Mit Hilfe eines UV-Detektors wurden die Substanzen bei 305 nm analysiert. Die Massenspektren wurden gemittelt und der Hintergrund abgezogen. Kollisionsinduzierte Dissoziations (CID)-Spektren sowie die Reaktionen des Selected Reaction Monitoring (SRM) wurden während eines HPLC-Laufes mit einer Kollisionsenergie von -20 eV für positive Ionen sowie mit +25 eV für negative Ionen aufgezeichnet. Als Kollisionsgas wurde Argon verwendet, der Druck betrug 1,8 x 10⁻³ Torr.

9.3.3 MS-Analyse neuer Aminocoumarin-Antibiotika

Die Strukturen der neu isolierten Novclobiocine wurden mittels negativer Fast-Atom-Bombardment (FAB)-Massenspektroskopie untersucht. Diethanolamin diente hierzu als Matrix für die Proben. Die Analysen wurden an einem TSQ70 Spektrometer (Finnigan, Bremen, Germany) durchgeführt.

9.3.4 ¹H-NMR-Analyse neuer Aminocoumarin-Antibiotika

Für die Strukturaufklärung der neuen Aminocoumarine wurden neben massenspektroskopischen Untersuchungen auch ¹H-NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Proben über Nacht gut im Exsikkator getrocknet und in deuteriertem Methanol (CD₃OD, Merck) aufgenommen. Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit Hilfe eines AMX 400 Spektrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany) aufgenommen.

III Ergebnisse

1 Identifizierung des Simocyclinon D8-Biosynthesegenclusters aus *S. antibioticus* Tü 6040

1.1 Einleitung

Simocyclinon D8 ist ein neues Antibiotikum, das aus *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 isoliert wurde (Schimana et al., 2000; Holzenkämpfer et al., 2002; Theobald et al., 2000). Von der chemischen Struktur her ist diese neue Substanz ein interessantes natürliches Hybridantibiotikum (Abb. 2), bestehend aus zwei Polyketideinheiten (einem polyzyklischen Angucyclinon-Ringsystem und der linearen Octatetraendicarbonsäure), die mit einem Deoxyzucker verknüpft sind, sowie einem 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin (ADHC)-Ring. *S. antibioticus* Tü 6040 produziert neben Simocyclinon D8 auch Simocyclinon D4, dem das Halogenatom in Position 8 des ADHC-Ringes fehlt, sowie andere verwandte Substanzen (Schimana et al., 2001). Simocyclinone weisen antibiotische Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien sowie zytostatische Effekte gegenüber bestimmten humanen Tumorzell-Linien auf (Schimana et al., 2000).

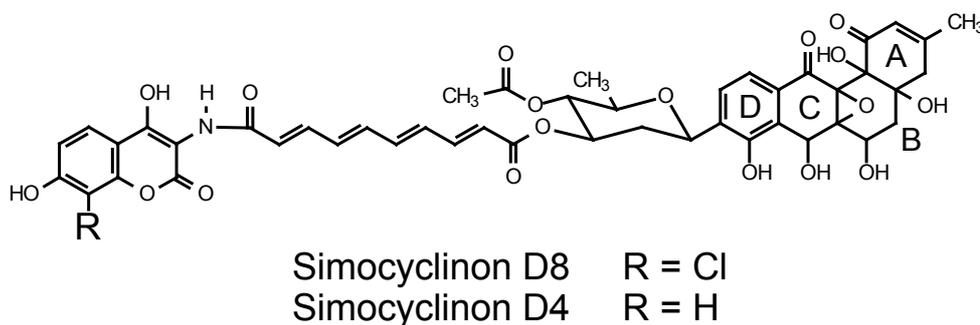


Abb. 2: Struktur von Simocyclinon D8 und D4

Die ADHC-Einheit ist auch in den Strukturen der Aminocoumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ enthalten. Diese Substanzen sind starke Gyrasehemmer (Maxwell, 1999), wobei der ADHC-Ring eine zentrale Bedeutung für ihre Bindung an die B-Untereinheit der bakteriellen DNA-Gyrase (Lewis et al., 1996a; Tsai et al., 1997) hat. Neueste Experimente legen nahe, daß Simocyclinon D8 ein stärkerer Gyrasehemmer ist als Novobiocin (A.J. Howells und A. Maxwell, John Innes Centre, Norwich, UK; persönliche Mitteilung). Diese Tatsache macht Simocyclinon D8 zu einer sehr interessanten Ausgangssubstanz für die Entwicklung neuer antiinfektiver und zytostatischer Substanzen. Eine geeignete Methode zur Entwicklung solcher neuer Arzneistoffe könnte die kombinatorische Biosynthese darstellen (Hutchinson, 1998). Für derartige Untersuchungen ist die Kenntnis der jeweiligen Biosynthesegenclusters eine Grundvoraussetzung.

1.2 Klonierung und Sequenzierung des Simocyclinon D8-Biosynthesegenclusters

Eine mögliche Strategie zur Identifizierung des Simocyclinon-Biosynthesegenclusters war das Screening einer Cosmidbank mit Sonden, die von Polyketidsynthase (PKS)-Genen oder von Deoxyzucker-Biosynthesegenen gewonnen wurden. Viele Streptomyceten besitzen jedoch mehrere unterschiedliche Biosynthesegencluster für Polyketide, die oft auch Deoxyzucker-Biosynthesegene enthalten. Da der ADHC-Ring von Simocyclinonen der D-Reihe in der Natur relativ selten vorkommt, sollte eines der Aminocoumarin-Biosynthesegene als Sonde eingesetzt werden.

Für NovH und NovI aus dem Novobiocin-Produzenten *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891 war bereits gezeigt worden, dass sie an der ADHC-Biosynthese beteiligt sind (Chen and Walsh, 2001). *novH* weist Sequenzhomologien mit nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS)-Genen auf und machte daher eine Hybridisierung mit Genen wahrscheinlich, die zu Biosynthesegenclustern für Peptidantibiotika gehören. Derartige Cluster wurden ebenso wie Polyketid-Biosynthesegencluster häufig in Streptomyceten neben Clustern für andere Sekundärstoffe detektiert. Demgegenüber codiert *novI* für ein Cytochrom P₄₅₀-Enzym, das für die Hydroxylierung von enzymgebundenem Tyrosin (Tyrosyl-S-NovH) zu β -Hydroxy-Tyrosin verantwortlich ist. Dies ist ein essentieller Schritt der ADHC-Biosynthese und *novI* erschien daher geeignet als Sonde für die Suche nach ADHC-Biosynthesegenen in genomischer DNA von *S. antibioticus* Tü 6040. Ein 1,3 kb großes *XhoI-NcoI*-Fragment, das dieses Gen enthielt, wurde als Sonde mit Digoxigenin markiert (s. Kapitel II 7.9.1) und zunächst mit genomischer DNA von *S. antibioticus* Tü 6040 hybridisiert und resultierte im Auftreten von nur einer einzigen Hybridisierungsbande. Diese Southern Blot-Ergebnisse bestätigten, dass *novI* als Sonde für die weiteren Untersuchungen geeignet war.

1.2.1 Restriktionskartierung der hybridisierenden Cosmide

Eine Cosmidbank der genomischen DNA von *S. antibioticus* Tü 6040 in SuperCos I wurde wie in Kapitel II 7.10 beschrieben hergestellt und mit *novI* als Sonde gescreent. Fünf Cosmide (III-3h, IV-7a, VII-8g, VII-9b und VIII-2g) hybridisierten mit *novI*. Die Überlappung dieser Cosmide wurde durch Restriktionskartierung mit *Bam*HI untersucht und ist im Folgenden graphisch dargestellt (s. Abb. 3).

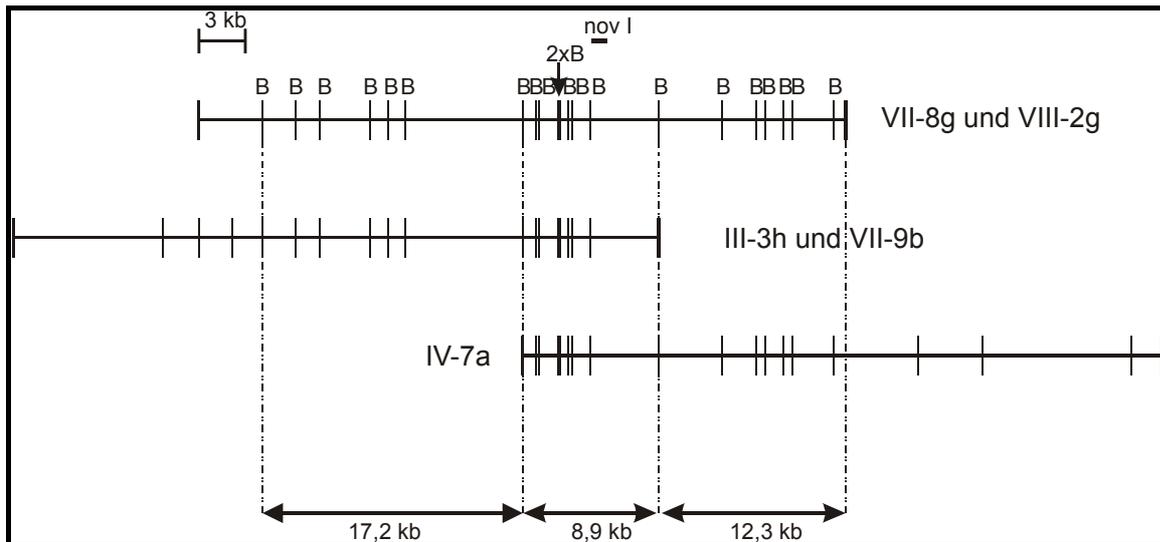


Abb. 3: Relative Lage der hybridisierenden Cosmide zueinander. Die Sonde nov I ist als schwarzer Balken dargestellt. Die Markierungsstriche auf den Cosmiden entsprechen *Bam*HI (B)-Schnittstellen.

Je 2 der überlappenden Cosmide (III-3h und VII-9b; VII-8g und VIII-2g) schienen aufgrund dieser Ergebnisse identisch zu sein. Die hybridisierenden Cosmide deckten insgesamt einen ca. 51 kb großen zusammenhängenden Bereich des *S. antibioticus* Tü 6040-Chromosomes ab.

1.2.2 Sequenzierung und Analyse des Cosmides VII-8g

Das Cosmid VII-8g wurde für die Sequenzierung ausgewählt, da es einen großen Bereich der überlappenden Cosmide abdeckt. Die Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) mit Hilfe einer Bibliothek von Shotgun-Klonen durchgeführt. Nach Auswertung mit entsprechenden Analyse-Programmen (s. II 7.11) konnten in der resultierenden Sequenz von 39,4 kb Länge insgesamt 38 ORFs identifiziert werden (Abb. 4). Für die meisten ORFs konnte eine hypothetische Funktion in der Simocyclinon D8-Biosynthese angegeben werden (Abb. 4). Die in den Datenbankrecherchen gefundenen Homologien zu bereits bekannten Genprodukten sind in Tab. 18 aufgelistet. 7 ORFs wiesen hohe Homologien zu entsprechenden Genen des Novobiocin- (Steffensky et al., 2000b) und Coumermycin A₁-Biosynthesegenclusters (Wang et al., 2000) auf und hatten zudem die gleiche Orientierung wie diese Gene (Abb. 4).

Eine ca. 10 kb umfassende Sequenz, die die 7 Gene mit Homologie zum Novobiocin- und Coumermycin A₁-Cluster enthielt, wurde in der Datenbank GenBank unter der Datenbanknummer AF321122 hinterlegt. Die Gesamtsequenz von 39,4 kb wurde in der gleichen Datenbank unter der Datenbanknummer AF322256 hinterlegt.

Tab. 18: Identifizierte ORFs im Biosynthesegencluster von Simocyclinon

ORF	Produktgröße (Aminosäuren)	Sequenzähnlichkeit mit:	% Identität der Produkte	Herkunft	Datenbanknummer
<i>sim2</i>	partielle Sequenz	Ketosynthase (<i>lanA</i>)	60	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim3</i>	404	Chain length determinant (<i>lanB</i>)	70	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim4</i>	88	Acylcarrier Protein (<i>lanC</i>)	59	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim5</i>	261	Ketoreduktase (<i>lanD</i>)	77	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim6</i>	315	Cyclase / Dehydratase (<i>lanL</i>)	66	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim7</i>	494	Oxygenase (<i>lanM</i>)	58	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim8</i>	254	Oxidoreduktase (<i>lanV</i>)	63	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim9</i>	190	Reduktase (<i>lanO</i>)	56	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim10</i>	228	Phosphopantetheinyltransferase (<i>jadM</i>)	48	<i>S. venezuelae</i>	AF222693
<i>sim11</i>	528	Carboxyltransferase / Decarboxylase (<i>lanP</i>)	78	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim12</i>	72	hypothetisches Protein	54	<i>S. coelicolor</i>	AL031124
<i>sim13</i>	257	Thioesterase	37	<i>S. avermitilis</i>	AB070950
<i>sim14</i>	456	Dioxygenase	49	<i>S. coelicolor</i>	AL117669
<i>sim15</i>	446	Aldehyddehydrogenase / Alkoholdehydrogenase	47	<i>Homo sapiens</i>	XM_045535
<i>sim16</i>	261	Transkriptionsregulator (?)	38	<i>S. avermitilis</i>	AB070947
<i>sim17</i>	534	Transporter (<i>lanJ</i>)	45	<i>S. cyanogenus</i>	AF080235
<i>sim18</i>	293	Hypothetisches Protein	61	<i>S. coelicolor</i>	AL031107
<i>sim19</i>	220	4'-Phosphopantetheinyltransferase (<i>nysF</i>)	50	<i>S. noursei</i>	AF263912
<i>simK</i>	236	Reduktase (?) (<i>novK</i>)	41	<i>S. spheroides</i>	AF170880
<i>simL</i>	519	Amidsynthetase (<i>novL</i>)	41	<i>S. spheroides</i>	AF170880
<i>simH</i>	997	Tyrosin-aktivierendes Enzym (<i>novH</i>)	53	<i>S. spheroides</i>	AF170880
<i>simI</i>	416	Cytochrom P ₄₅₀ (<i>novI</i>)	62	<i>S. spheroides</i>	AF170880
<i>simY</i>	70	<i>couY</i>	51	<i>S. rishiriensis</i>	AF235050
<i>simJ1</i>	273	3-Oxoacyl-[ACP]-reduktase (<i>novJ</i>)	59	<i>S. spheroides</i>	AF170880
<i>sim1</i>	251	Regulator (?) (<i>jadR1</i>)	42	<i>S. venezuelae</i>	U24659
<i>simJ2</i>	246	3-Oxoacyl-[ACP]-reduktase	49	<i>S. avermitilis</i>	AB070946
<i>sim20</i>	482	dTDP-4-Keto-6-deoxy-glucose-2,3-dehydratase	54	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	AF040570
<i>sim21</i>	450	Acyltransferase (?)	31	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AB017061
<i>sim22</i>	92	Hypothetisches Protein			
<i>sim23</i>	295	Glucose-1-phosphat-thymidyltransferase	50	<i>Salmonella enterica</i>	AF279619
<i>sim24</i>	319	dTDP-Glucose-4,6-dehydratase (<i>aprE</i>)	56	<i>S. tenebrarius</i>	AF306787
<i>orf 25</i>	282	Endonuklease / N-Glycosylase	83	<i>S. coelicolor</i>	AL079353
<i>orf 26</i>	233	Hypothetisches Protein	80	<i>S. coelicolor</i>	AL079353
<i>orf 27</i>	402	Serinprotease	80	<i>S. coelicolor</i>	AL035636
<i>orf 28</i>	302	Hydrolase	82	<i>S. coelicolor</i>	AL035636
<i>orf 29</i>	162	Membranprotein (?)	85	<i>S. coelicolor</i>	AL035636
<i>orf 30</i>	480	Natrium / H ⁺ Antiporter	81	<i>S. coelicolor</i>	AL035636
<i>orf 31</i>	partielle Sequenz	Acetyl-CoA synthetase	92	<i>S. coelicolor</i>	AL035636

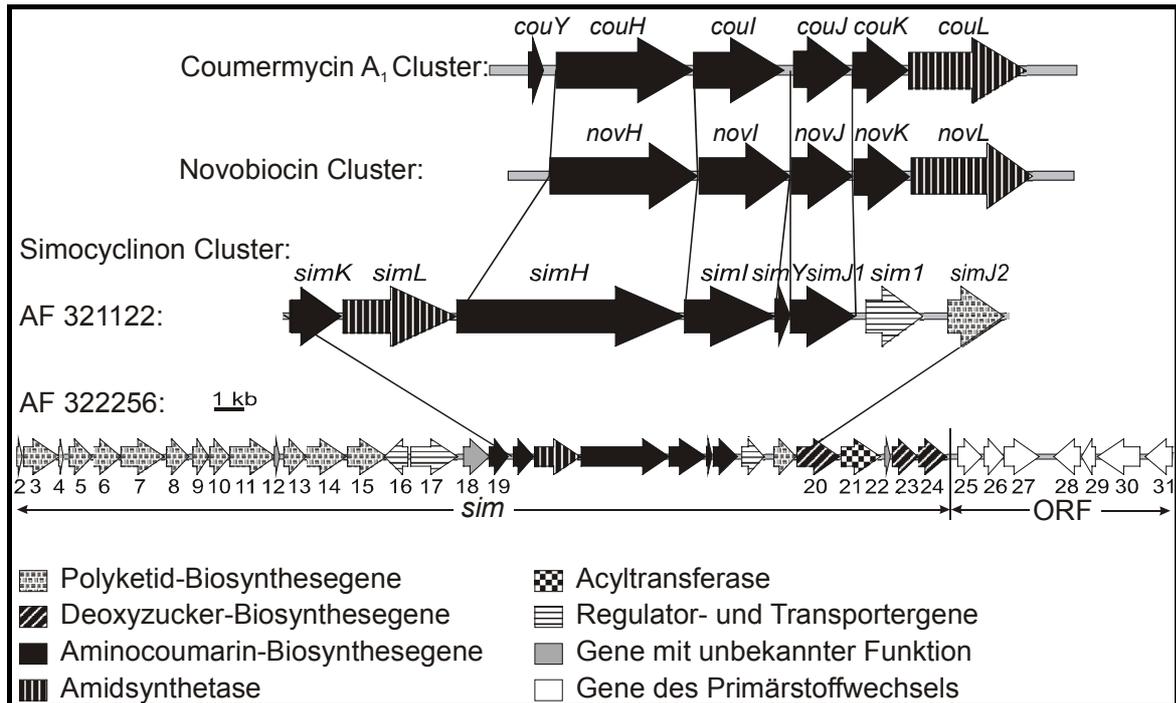


Abb. 4: Karte des Cosmides VII-8g mit Teilen des Simocyclinon-Clusters aus *S. antibioticus* Tü 6040. Die homologen Bereiche des Novobiocin- und Coumermycin A₁-Biosynthesegenclusters sind zum Vergleich dargestellt.

1.2.2.1 Gene der Aminocoumarin-Biosynthese

Die Genprodukte der ersten 6 ORFs in AF321122 wiesen auf Aminosäureebene durchschnittlich 51% Identität zu den Genprodukten von *novK*, *novL*, *novH*, *novI*, *couY* und *novJ* aus dem Novobiocin- und Coumermycin-Cluster auf. Dementsprechend erhielten diese ORFs die Namen *simKLHIY* und *simJ1*. Da die charakteristische Aminocoumarin-Einheit den Strukturen von Novobiocin, Coumermycin A₁ und Simocyclinon D8 gemeinsam ist, war auch die Präsenz der entsprechenden Biosynthesegene in allen Clustern erwartet worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legten daher nahe, dass die Gene *simKLHIYJ1* an der ADHC-Biosynthese von Simocyclinon D8 beteiligt sind. Die Funktionen, die für die einzelnen Genprodukte vorgeschlagen wurden, sind im Kapitel IV 1.1 beschrieben.

Im Simocyclinon-Cluster waren diese Gene anders angeordnet als im Novobiocin- bzw. Coumermycin A₁-Cluster (s. Abb. 4). Die ORFs *simKLHIYJ1* wurden durch sehr kurze intergenische Bereiche voneinander getrennt und es erschien daher wahrscheinlich, dass sie als ein einziges Operon transkribiert werden. Stromabwärts von *simJ1* befand sich eine intergenische Region von 170 bp, gefolgt von ORF *sim1*, welcher Homologie zu *jadR1* zeigte. *jadR1* ist ein positiver Regulator der Biosynthese des Angucyclinon-Antibiotikums Jadomycin (Yang et al., 1995). Nach einem weiteren intergenischen Bereich von 322 bp schloss sich das putative 3-

Oxoacyl-[ACP]-Reduktasegen *simJ2* an, dessen Produkt Ähnlichkeit mit Proteinen hatte, die an der Lipidbiosynthese von *Bacillus subtilis* (Morbidoni et al., 1996) und an der Fettsäurebiosynthese von *Vibrio harveyi* (Shen and Byers, 1996) beteiligt sind. Daher konnte ihm eine Funktion in der Biosynthese der Polyketideinheit von Simocyclinon zugeordnet werden. Allerdings zeigte SimJ2 auch Homologie zu NovJ vom Novobiocin- und CouJ vom Coumermycin-Cluster, und eine Beteiligung an der Aminocoumarin-Biosynthese war daher nicht auszuschließen.

1.2.2.2 Polyketid-Biosynthesegene

Sieben ORFs (ORF 25 bis ORF 31), die sich am rechten Ende der in Abb. 4 dargestellten Sequenz befanden, hatten extrem hohe Ähnlichkeit mit Primärstoffwechselgenen von *S. coelicolor* (s. Tab. 18). Daher gehörten diese Gene sehr wahrscheinlich zum Primärstoffwechsel von *S. antibioticus* Tü 6040 und ORF 25 stellte somit die Grenze des Biosynthesegenclusters von Simocyclinon D8 dar. Stromaufwärts von ORF 25 wurden 31 ORFs identifiziert, die vermutlich an der Simocyclinon-Biosynthese beteiligt sind.

In der Strukturformel von Simocyclinon D8 sind zwei Polyketid-Anteile enthalten: die Angucyclinon-Einheit und die Octatetraendicarbonsäure (s. Abb. 2). Ein ähnlicher Angucyclinon-Anteil ist auch in anderen Antibiotika wie z.B. Landomycin (Westrich et al., 1999) und Urdamycin (Decker and Haag, 1995) enthalten. Ring A und Ring B des Angucyclinon-Anteils (s. Abb. 2) weisen die gleiche Struktur wie in den Substanzen WS 009A und WS 009B (Miyata et al., 1992) auf, Ring C ist jedoch nicht chinoid und trägt eine Epoxidgruppe wie Elmycin (Dobreff, 1989) und Rubiginon (Puder et al., 2000).

Die Gene, die zwischen *sim2* und *sim15* im Simocyclinon-Cluster liegen, konnten mit Polyketid-Biosynthesegenen in Verbindung gebracht werden. *sim2*, *sim3* und *sim4* zeigten hohe Ähnlichkeit mit *lanABC* aus dem Landomycin-Biosynthesegencluster und codierten sehr wahrscheinlich für die minimale Einheit der iterativen Typ II PKS, die für die Biosynthese des Angucyclinon-Ringsystemes von Simocyclinon verantwortlich ist. Ebenso hatten die fünf Gene *sim5* bis *sim9* und *sim11* Sequenzähnlichkeiten mit anderen Landomycin-Biosynthesegenen und sind vermutlich an der Angucyclinon-Biosynthese beteiligt (s. Tab. 18). Das vorhergesagte Genprodukt für *sim10* wies Homologie zu der 4-Phosphopantetheinyltransferase JadM auf, die in die Biosynthese des Angucyclinon-Antibiotikums Jadomycin involviert ist. Sim10 überträgt daher vermutlich den 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktor auf das Acyl-Carrier-Protein Sim4. Die Genprodukte von *sim13*, *sim14* und *sim15* hatten Ähnlichkeit mit Thioesterasen, Dioxygenasen (besonders mit neoxanthin-spaltenden Enzymen) und mit Aldehyddehydrogenasen. Eine Funktion dieser Gene bei der Biosynthese der Octatetraendicarbonsäure von Simocyclinon durfte daher vermutet werden. Die

Dioxygenase Sim14 könnte dabei eine enzymgebundene mehrfach ungesättigte Vorstufe als Aldehyd vom Enzym abspalten, ähnlich der Reaktion, die von neoxanthin-spaltenden Enzymen katalysiert wird. Sim15 könnte anschließend die Aldehydgruppe zur Carboxylgruppe oxidieren und Sim13 könnte die resultierende Dicarbonsäure freisetzen oder auf den Zucker der Simocyclinon-Vorstufe übertragen.

Octatetraendicarbonsäure ist die zweite Polyketideinheit von Simocyclinon (s. Abb. 2). Dieses Strukturelement ist auch in Fumagillin enthalten und entsteht aus fünf Acetat-Einheiten (Birch and Hussain, 1969; Holzenkämpfer et al., 2002). Bemerkenswerterweise konnte durch Klonierung und Sequenzierung eines Fragmentes stromaufwärts von *sim2* (pUG003; s. II 5.1) ein Teil einer Typ I PKS detektiert werden, die für die Biosynthese dieser Polyketideinheit verantwortlich sein könnte. Da derartige Biosynthesegene für die hier beschriebene Fragestellung jedoch nicht primär von Interesse waren, wurde die Sequenzierung in diese Richtung nicht weiter fortgesetzt. Die Arbeitsgruppe von Prof. A. Bechtold, Freiburg, untersuchte diese Region näher und konnte auch die linke Grenze des Simocyclinon-Biosynthesegenclusters definieren (Trefzer et al., 2002).

1.2.2.3 Das 4-Phosphopantetheinyltransferasegen *sim19*

Das Gen, welches direkt an die Aminocoumarin-Biosynthesegene angrenzt, *sim19*, codierte für eine weitere 4-Phosphopantetheinyltransferase und zeigte Sequenzähnlichkeit mit NysF aus dem Biosynthesegencluster des Polyen-Antibiotikums Nystatin (Brautaset et al., 2000). Während der Novobiocin-Biosynthese katalysiert NovH die Aktivierung von Tyrosin durch kovalente Bindung in Form eines Thioesters (Chen and Walsh, 2001). Für diese Reaktion konnte bereits gezeigt werden, dass zunächst ein 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktor auf NovH transferiert werden muss (Chen and Walsh, 2001). Die hierfür verantwortliche 4-Phosphopantetheinyltransferase konnte im Novobiocin-Produzenten jedoch noch nicht identifiziert werden. SimH katalysiert vermutlich die gleiche Reaktion wie NovH und wies auch die gleiche Cofaktorbindungsstelle auf. Die Funktion von Sim19 könnte es daher sein, einen 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktor entweder auf SimH, das an der Aminocoumarin-Biosynthese beteiligt ist, oder auf eine PKS, die in die Bildung einer der beiden Polyketideinheiten involviert ist, zu transferieren.

1.2.2.4 Gene der Desoxyzucker-Biosynthese

Am 3'-Ende des Clusters wurden drei ORFs gefunden, die Ähnlichkeit mit Deoxyzucker-Biosynthesegenen aufwiesen: *sim20*, *sim23* und *sim24*. Die von *sim23* codierte Aminosäuresequenz hatte starke Ähnlichkeit mit Glucose-1-phosphat-thymidyltransferasen, was nahe legte, dass das Produkt dieses Genes Glucose-1-

phosphat als Startreaktion der Deoxyzucker-Biosynthese aktiviert. Der zweite Schritt wird wahrscheinlich von dem Genprodukt von *sim24*, einer putativen dTDP-Glucose-4,6-dehydratase, katalysiert. Das abgeleitete Genprodukt von *sim20* wies Sequenzhomologien zu dTDP-4-Keto-6-deoxyglucose-2,3-dehydratasen auf und könnte daher für den dritten Schritt der postulierten Reaktionsfolge der Deoxyzucker-Biosynthese verantwortlich sein (s. Abb. 18, Seite 108). Das Produkt von *sim21* zeigte Sequenzähnlichkeit mit Acyltransferasen und könnte für die Acetylierung der 4-OH-Gruppe der Zuckerkomponente von Simocyclinon D8 verantwortlich sein (s. Abb. 18, Seite 108).

Für die komplette Biosynthese des Deoxyzuckers Olivose werden zwei weitere Enzyme benötigt (Hoffmeister et al., 2000), eine 3-Ketoreduktase und eine 4-Ketoreduktase (s. Abb. 18, Seite 108). Die für diese Produkte codierenden Gene konnten jedoch in dem hier sequenzierten und analysierten Teil des Clusters nicht detektiert werden. Ebenso wenig konnte eine Glycosyltransferase gefunden werden, die für den Transfer der Zuckerkomponente auf das Aglycon verantwortlich ist. Die Arbeitsgruppe von Prof. A. Bechtold, Freiburg, die auch die Region stromaufwärts von *sim2* untersuchte, konnte die besagten Gene in diesem Bereich identifizieren (Trefzer et al., 2002).

1.2.2.5 Regulatoren und Transporter

sim16 zeigte Sequenzhomologie zu einem mutmaßlichen Transkriptionsregulatorgen von *S. avermitilis*. Das abgeleitete Genprodukt von *sim17* wies Ähnlichkeit mit LanJ, einem Transporterprotein aus dem Landomycin-Biosynthesegencluster, auf. Bemerkenswert ist, dass auch im Landomycin-Cluster ein Transkriptionsregulatorgen, *lanK*, direkt neben dem Transporter gen *lanJ* liegt. In beiden Clustern ist der jeweilige Transkriptionsregulator das einzige Gen, das in entgegengesetzter Richtung zu allen anderen Genen des Clusters transkribiert wird. Es kann daher darüber spekuliert werden, ob *sim17* auf Transkriptionsebene durch Sim16 reguliert wird (Otten et al., 1995). Das Genprodukt von *sim17*, ein Transporterprotein, könnte für die Exkretion von Simocyclinonen aus der Zelle verantwortlich sein. Ein weiteres Regulatorgen, *sim1*, lag zwischen *simJ1* und *simJ2* und hatte Ähnlichkeit mit *jadR1*, einem mutmaßlichen Regulatorgen aus dem Biosynthesegencluster des Angucyclinon-Antibiotikums Jadomycin (Yang et al., 1995).

1.3 Inaktivierung von *simJ1*

Die hohe Ähnlichkeit der in diesen Untersuchungen identifizierten Gene mit den bereits bekannten Biosynthesegenclustern von Novobiocin und Coumermycin A₁ machten es sehr wahrscheinlich, dass diese Gene tatsächlich für die Biosynthese

der ADHC-Einheit von Simocyclinon D8 verantwortlich sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Geninaktivierungsexperiment durchgeführt. Da zwei Gene des Simocyclinon-Clusters, *simJ1* und *simJ2*, Homologien zu *novJ* bzw. *couJ* aufwiesen, war es von besonderem Interesse, durch Inaktivierung festzustellen, welches der beiden Genprodukte tatsächlich an der Simocyclinon-Biosynthese beteiligt ist. Zunächst wurde *simJ1* für die Inaktivierung ausgewählt.

1.3.1 Klonierung und Transformation der *simJ1*-Inaktivierungskonstrukte pUG012 und pUG013

Zwei Inaktivierungsvektoren, in denen *simJ1* durch In-Frame-Deletion inaktiviert war, wurden wie unter Kapitel II 7.5.1 beschrieben mittels PCR hergestellt. pUG012 (s. II 5.1, Tab. 14) wurde durch Klonierung der PCR-Fragmente in pBSKT, einen integrativen Vektor, der als Selektionsmarker ein Thiostrepton-Resistenzgen trägt, erhalten. Zur Herstellung von pUG013 wurde das komplette ca. 2,8 kb große Insert von pUG012 als *XbaI-EcoRI*-Fragment in pKC1132, einen integrativen Vektor mit Apramycin-Resistenzgen als Selektionsmarker, umkloniert. Diese Plasmide wurden durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. antibioticus* Tü 6040 eingebracht. Das Einbringen von pUG012 resultierte im Auftreten sehr vieler Klone mit Spontanresistenz gegenüber Thiostrepton. Folglich war für diesen Stamm das Thiostrepton-Resistenzgen als Selektionsmarker nicht geeignet. Demgegenüber kamen alle apramycin-resistenten Klone, die durch Transformation von pUG013 in *S. antibioticus* Tü 6040 erhalten wurden, durch Integration des Plasmides über homologe Rekombination zustande.

1.3.2 Untersuchung der Single-Crossover Mutanten UG J1-15 und UG J1-21

Die Integrationsmutanten wurden durch Southern Hybridisierung mit einer 1242 bp großen Sonde analysiert, die aus der Region stromabwärts von *simJ1* hergestellt wurde (s. II 7.9.1). Abb. 5 zeigt repräsentativ die Ergebnisse von zwei typischen Klonen, die als *S. antibioticus* UG J1-15 and UG J1-21 bezeichnet wurden. Restriktionsverdau mit *BglII* und *EcoRV* resultierte im Southern Blot, wie für Single Crossover Mutanten erwartet, in Hybridisierungsbanden von 2,77 und 1,97 kb Größe (nicht abgebildet). Die Verdau mit *BglII/NotI* und *PvuII/EcoRI* zeigten, dass in den Mutanten UG J1-15 und UG J1-21 die Reihenfolge von intaktem und inaktiviertem Gen *simJ1* verschieden ist (s. Abb. 5). Diese Anordnung kam durch das Stattfinden von Crossover-Ereignissen entweder vor oder hinter dem inaktivierten Gen in der Vektorsequenz zustande (Kieser et al., 2000). In der Mutante UG J1-15 liegt die intakte Kopie von *simJ1* direkt am Ende der mutmaßlichen Transkriptionseinheit *simKLHIYJ1*, und für diese Mutante wurde daher auch die Produktion von intaktem

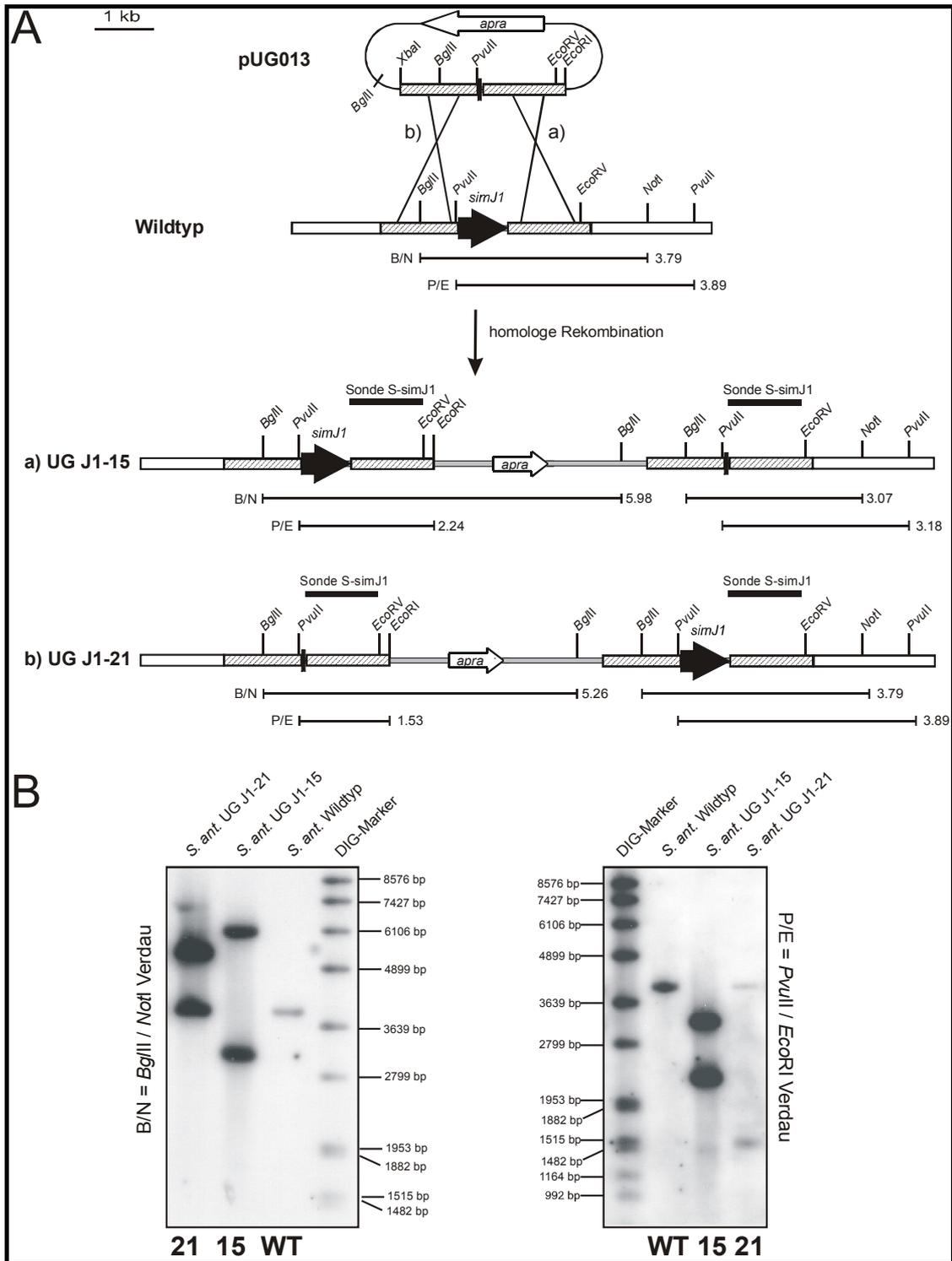


Abb. 5: Inaktivierung des Genes *simJ1* aus dem Simocyclinon-Biosynthesegencluster. (A) Schematische Darstellung des Geninaktivierungsexperimentes. Das DNA-Fragment, das als Sonde verwendet wurde, ist als schwarzer Balken dargestellt. *apra* = Apramycin-Resistenzgen (B) Southern Blot-Analyse der *simJ1*-Mutanten. Die genomische DNA der Mutanten wurde mit *BglII/NotI* (= B/N) und mit *PvuII/EcoRI* (= P/E) verdaut. Die Größe der erwarteten Banden ist in kb angegeben.

SimJ1-Protein erwartet. Tatsächlich konnte mittels HPLC-Analyse im Kulturfiltrat dieser Mutante die Bildung von Simocyclinonen der D-Reihe, die den ADHC-Ring enthalten, nachgewiesen werden (s. Abb. 6B). Im Gegensatz zu UG J1-15 liegt in der Mutante UG J1-21 die inaktivierte Kopie von *simJ1* am Ende der putativen Transkriptionseinheit *simKLHIYJ1*. Die intakte Kopie des Genes ist sowohl durch die Vektorsequenz als auch durch das Resistenzgen von diesem Operon getrennt, was die Transkription des intakten *simJ1*-Genes verhindert. Die HPLC-Analyse von Kulturfiltrat dieser Mutante zeigte, dass die Produktion von Simocyclinon D4 und D8 komplett unterbunden war (s. Abb. 6C). Stattdessen akkumulierte die Mutante das Biosyntheseintermediat Simocyclinon C4, das aus den zwei Polyketideinheiten sowie der Zuckerkomponente besteht und dem der ADHC-Ring fehlt (Theobald et al., 2000). Die Identität dieser Metabolite wurde sowohl durch HPLC- als auch durch HPLC-MS-Analysen untersucht. Die Mutante UG J1-21 bildete außer Simocyclinon C4 noch ein Isomer mit identischer Masse, das als Simocyclinon C4a bezeichnet wurde. Das Auftreten dieser Substanz war bereits von J. Schimana beobachtet (Schimana et al., 2000), ihre Struktur war jedoch nicht aufgeklärt worden.

1.3.3 Fütterung von Ring B aus Novobiocin an die Mutante UG J1-21

Für Komplementierungsversuche wurden Kulturen der Mutante UG J1-21 mit der Aminocoumarin-Einheit von Novobiocin, 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin, gefüttert. Dadurch kam es erneut zur Bildung eines Simocyclinon-Derivates, das einen Aminocoumarin-Ring trug (s. Abb. 6D). Die HPLC-MS-Analyse zeigte, dass diese Substanz im Gegensatz zu den natürlich auftretenden Simocyclinonen D4 und D8 nun eine Methylgruppe in Position 8 des Aminocoumarin-Ringes trug. Dies spiegelte die strukturellen Gegebenheiten der zugefütterten Aminocoumarin-Einheit wider.

Diese Ergebnisse lieferten den funktionellen Beweis, dass *simJ1* Teil des Simocyclinon-Biosynthesegenclusters ist und dass ein großer Teil dieses Cluster in Cosmid VII-8g kloniert wurde. Die Single Crossover-Mutante mit der intakten Transkriptionseinheit (UG J1-15) produzierte die gleichen Simocyclinone (D4 und D8) wie der Wildtyp von *S. antibioticus* Tü 6040. Die Mutante mit der unterbrochenen Transkriptionseinheit (UG J1-21) war nicht mehr fähig, den Aminocoumarin-Ring zu synthetisieren und akkumulierte das Biosyntheseintermediat Simocyclinon C4. Wurden Kulturen dieser Mutante mit der ADHC-Einheit von Novobiocin supplementiert, so konnte wieder ein komplettes Simocyclinon der D-Reihe gebildet werden.

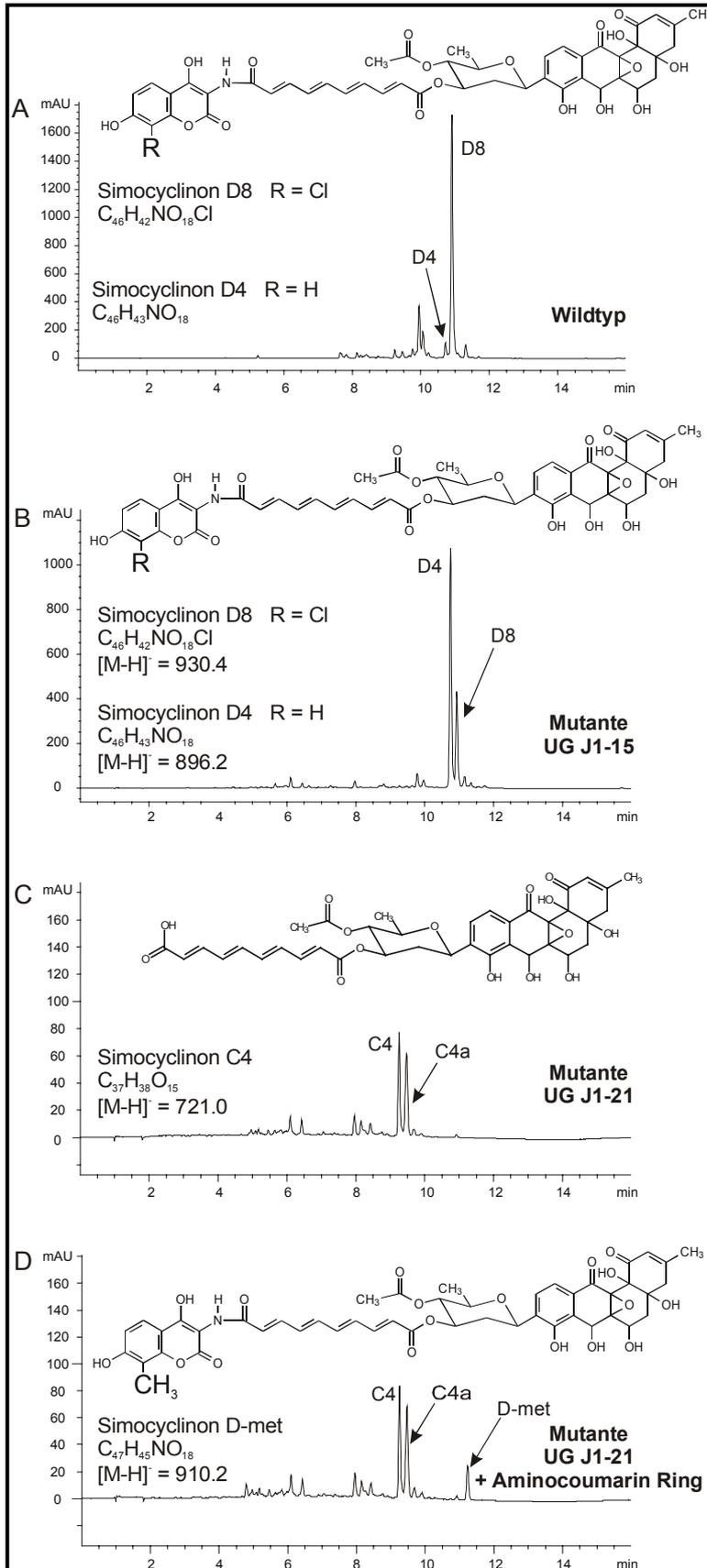


Abb. 6: HPLC-MS-Analyse von Sekundärstoffen aus *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 Wildtyp (A), Mutante UG J1-15 (B) sowie Mutante UG J1-21 (C) und Fütterung der Mutante UG J1-21 mit 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methyl-coumarin (D).

1.3.4 Untersuchung von Double Crossover Mutanten

Nach Kultivierung der Single Crossover-Mutanten in antibiotikafreiem YMG-Flüssigmedium über mehrere Passagen wurde auf das Auftreten apramycinsensitiver Klone, die aus einem Double Crossover-Ereignis resultieren, selektiert. Aus vier apramycinsensitiven Klone wurde die genomische DNA isoliert und nach *BglIII/EcoRV*-Verdau für die Southern Hybridisierung geblottet. Als Kontrolle wurde genomische DNA einer Single Crossover-Mutante sowie von *S. antibioticus* Tü 6040 Wildtyp verwendet. Bei Hybridisierung mit der Sonde S-sim-J1 sollten der Wildtyp ein 2,8 kb großes Fragment, die Double Crossover-Mutanten ein 2,0 kb großes Fragment und die Single Crossover-Mutanten beide Fragmente aufweisen.

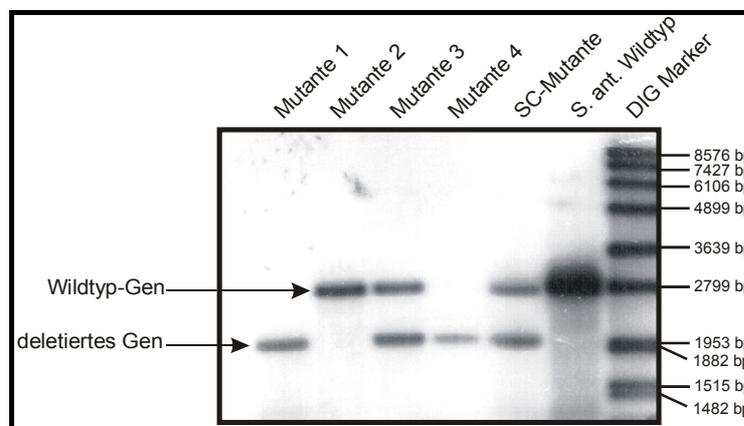


Abb. 7: Southern Hybridisierung der vier apramycinsensitiven Klone der *simJ1*-Inaktivierung nach Selektion auf Double Crossover-Ereignisse. Die erwarteten Banden sind mit Pfeilen markiert. Mutanten 1 und 4 = Double Crossover-Mutanten *S. antibioticus* UG J1-692 und UG J1-293; Mutante 2 = Reversion zum Wildtyp; Mutante 3 = Single Crossover-Mutante. SC-Mutante = Single Crossover-Mutante.

Zwei der vier untersuchten Klone wiesen nur die 2,0 kb-Bande auf. Diese Double Crossover-Mutanten erhielten die Namen *S. antibioticus* UG J1-293 und UG J1-692. Bei einem Klon wurde nur eine 2,8 kb große Bande detektiert, die aus einer Reversion zum Wildtyp resultiert. Mutante 3 zeigte trotz Apramycin-Sensitivität beide Hybridisierungsbanden (2,0 kb und 2,8 kb) und war damit als Single Crossover-Mutante anzusehen.

Sowohl die beiden Double Crossover-Mutanten *S. antibioticus* UG J1-293 und UG J1-692 als auch derjenige Klon, welcher zum Wildtyp revertiert war, wurden bezüglich ihrer Sekundärstoffproduktion untersucht. Dabei wurde erwartet, dass der zum Wildtyp revertierte Klon erneut Simocyclinone der D-Reihe produziert, während die Double Crossover Mutanten, deren *simJ1*-Gen deletiert war, nur noch zur Bildung von Simocyclinonen der C-Reihe befähigt sein sollten. Wiederholte Kultivierungsversuche aller drei Klone erbrachten jedoch, dass sowohl der zum Wildtyp revertierte Stamm als auch die beiden Defektmutanten überhaupt keine

Simocyclinone mehr produzierten, während der parallel kultivierte Wildtyp nach wie vor Simocyclinon D8 bildete. Da die Untersuchungen der Single Crossover-Mutanten jedoch bereits den Beweis erbracht hatten, dass das Genprodukt von *simJ1* für die Aminocoumarin-Biosynthese erforderlich ist, wurden diese Untersuchungen nicht weiter fortgesetzt.

1.4 Inaktivierung von *simJ2*

Ebenso wie *simJ1* wies auch *simJ2* Sequenzähnlichkeiten mit *novJ* bzw. *couJ* auf. Eine Funktion seines Produktes in der Biosynthese der Aminocoumarin-Einheit war daher nicht auszuschließen. Da der Wildtyp-Stamm von *S. antibioticus* Tü 6040 neben Simocyclinon D8, das ein Chlor-Atom an C-8 des Aminocoumarin-Ringes trägt, gleichzeitig auch Simocyclinon D4, das ein Wasserstoff-Atom an derselben Position aufweist, produziert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass je eines der beiden Genprodukte von *simJ1* und *simJ2* für die Oxidation des halogenierten bzw. unhalogenierten Intermediates verantwortlich sein könnte und dass bei Inaktivierung eines der beiden Gene eventuell das jeweilig andere Genprodukt diese Funktion übernehmen könnte. Im Sekundärstoffspektrum der Mutanten hätte dies zur Folge, dass entweder ausschließlich das halogenierte oder ausschließlich das unhalogenierte Simocyclinon der D-Reihe produziert wird bzw. dass eine 3-Oxoacyl-[ACP]-reduktase die Funktion der anderen übernimmt und beide Simocyclinone der D-Reihe gebildet werden. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte auch *simJ2* inaktiviert und deren Sekundärstoffe untersucht werden.

1.4.1 Klonierung und Transformation der *simJ2*-Inaktivierungskonstrukte pUG014 und pUG015

Zwei Inaktivierungsvektoren, in denen *simJ2* durch In-Frame-Deletion inaktiviert war, wurden wie unter Kapitel II 7.5.2 beschrieben mittels PCR hergestellt. pUG014 (s. II 5.1, Tab. 14) wurde durch Klonierung der PCR-Fragmente in pBSKT, einen integrativen Vektor, der als Selektionsmarker ein Thiostrepton-Resistenzgen trägt, erhalten. Zur Herstellung von pUG015 wurde das komplette ca. 2,8 kb große Insert von pUG014 als *XbaI-HindIII*-Fragment in pKC1132, einen integrativen Vektor mit Apramycin-Resistenzgen als Selektionsmarker, umkloniert. Diese Plasmide wurden durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. antibioticus* Tü 6040 eingebracht. Das Einbringen von pUG014 resultierte auch hier im Auftreten sehr vieler Klone mit Spontanresistenz gegenüber Thiostrepton. Demgegenüber kamen alle apramycin-resistenten Klone, die durch Transformation von pUG015 in *S. antibioticus* Tü 6040 erhalten wurden, durch Integration des Plasmides über homologe Rekombination zustande.

Aus drei apramycin-resistente Klone der Transformation von pUG015 in Protoplasten von *S. antibioticus* Tü 6040 wurde die genomische DNA isoliert und nach *EcoRV*/*PvuII*-Verdau ein Southern Blot angefertigt. Als Kontrolle wurde genomische DNA von *S. antibioticus* Tü 6040 und Plasmid-DNA des Konstruktes pUG015 verwendet. Bei Hybridisierung mit der Sonde S-sim-J2 sollten der Wildtyp ein 1,9 kb großes Fragment, die Plasmid-DNA ein 1,2 kb großes Fragment und die Single Crossover-Mutanten beide Fragmente aufweisen. Bei allen drei untersuchten Klonen konnten beide Fragmente detektiert werden (nicht abgebildet). Diese sind somit tatsächlich Single Crossover-Mutanten. Die Wildtyp-DNA wies nur die Bande bei 1,9 kb auf, das Plasmid pUG015 die 1,2 kb große Bande.

Die Sekundärstoffproduktion der Single Crossover-Mutanten wurde nicht untersucht. Da inzwischen feststand, dass die Inaktivierung von *simJ1* die Biosynthese sowohl der halogenierten als auch der unhalogenierten Aminocoumarin-Einheit komplett unterbindet und das Genprodukt von *simJ2* nicht in der Lage ist, diesen Defekt zu komplementieren, wurden die Untersuchungen zur Inaktivierung von *simJ2* eingestellt.

2 Vergleichende Untersuchung zur Substratspezifität der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL

2.1 Einleitung

Das charakteristische strukturelle Merkmal der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ (s. Abb. 8) ist eine 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Einheit (= Ring B, ADHC), die mit dem Deoxyzucker Noviose (= Ring C) verknüpft ist. Röntgenstrukturspektroskopische Untersuchungen (Lewis et al., 1996a; Maxwell, 1993; Tsai et al., 1997; Lafitte et al., 2002) haben gezeigt, daß sowohl die ADHC-Komponente als auch die substituierte Deoxyzucker-Einheit essentiell für die Bindung dieser Substanzen an die B-Untereinheit der Gyrase ist. Die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit (= Ring A, DMAHB) von Clorobiocin und Novobiocin ist wichtig für die Aufnahme dieser Antibiotika in Bakterien (Lafitte et al., 2002; Lewis et al., 1996a) und trägt nur schwach zur Bindung der Substanzen an die bakterielle Gyrase bei (Lewis et al., 1996a; Tsai et al., 1997; Lafitte et al., 2002). Biosynthetisch gesehen entsteht die DMAHB-Komponente von Clorobiocin und Novobiocin aus 4-Hydroxyphenylpyruvat (= 4HPP) und einer Isoprenoidvorstufe (Li et al., 1998; Steffensky et al., 1998; Pojer et al., 2003a; Pojer et al., 2003b).

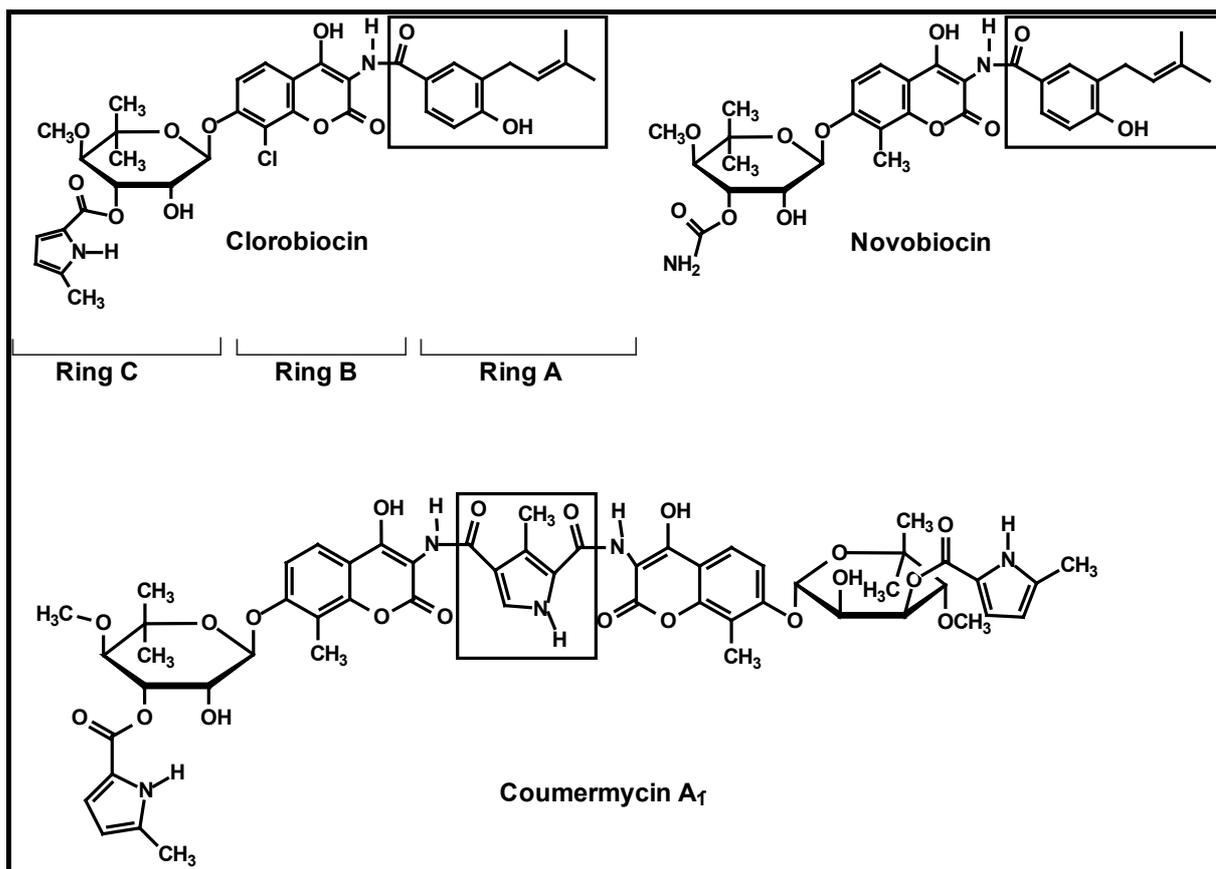


Abb. 8: Strukturformeln der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A₁. Die an der Amidbindung beteiligten Acylkomponenten sind durch Kästen markiert.

Zu Beginn dieser Untersuchungen waren die Sequenzen der Biosynthesegencluster von Clorobiocin (*clo*) (Pojer et al., 2002), Novobiocin (*nov*) (Steffensky et al., 2000b) und Coumermycin A₁ (*cou*) (Wang et al., 2000) bereits bekannt. Der Aminocoumarin-Ring (Ring B) der drei Substanzen ist über eine Amidbindung mit der aromatischen Acylkomponente (Ring A) verbunden und dementsprechend enthalten auch alle drei Gencluster ein Amidsynthetasegen (*cloL*, *novL* und *couL*).

Um später durch Fütterungsexperimente mit geeigneten Mutanten verschiedene Ring A-Analoga in neue Aminocoumarine einbauen zu können, müssen diese Benzoessäurederivate zunächst *in vitro* durch die entsprechenden Amidsynthetasen, d.h. durch *CloL*, *NovL* und *CouL*, akzeptiert werden. Für *NovL* war bereits in früheren Untersuchungen gezeigt worden, dass es die Acylkomponente (Ring A) durch Adenylatbildung aktiviert und anschließend ohne Beteiligung eines 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktors auf die Aminocoumarin-Gruppe transferiert (Steffensky et al., 2000a). Zur Identifizierung der für die Mutasynthese-Experimente meistversprechenden Substanzen sowie des für die Fütterung am besten geeigneten Produzenten wurden die drei Amidsynthetasen überexprimiert, gereinigt und mit den verschiedenen Ring A-Analoga *in vitro* getestet.

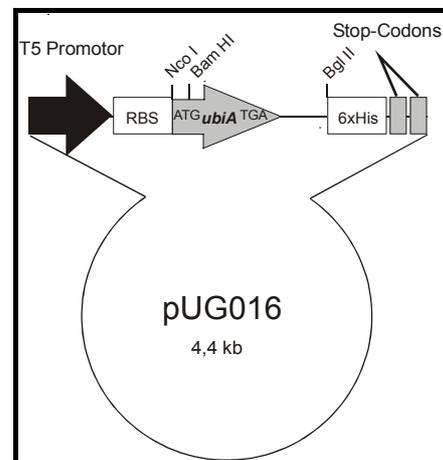
2.2 Versuche zur heterologen Überexpression der Prenyltransferase UbiA

Das Gen *ubiA* aus *Escherichia coli* codiert für eine membrangebundene 4HB-Polyprenyltransferase, die die Prenylierung von 4HB mit Octaprenyldiphosphat als den ersten spezifischen Schritt der Ubichinon-Biosynthese katalysiert (el Hachimi et al., 1974). Für die semisynthetische Herstellung neuer prenylierter Aromaten im Arbeitskreis von Prof. L. Wessjohann wurde ein geeignetes Überexpressionskonstrukt für diese Prenyltransferase benötigt. Die mit Hilfe von UbiA enzymatisch hergestellten prenylierten Aromaten sollen zukünftig für den Amidsynthetase-Assay mit CloL, NovL und CouL verwendet werden.

2.2.1 Klonierung des Expressionskonstruktes pUG016

Das Gen *ubiA* wurde wie in Kapitel II unter 7.5.3 beschrieben mittels PCR aus dem Plasmid pALMU1 amplifiziert und nach *Nco*I-*Bgl*II-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pQE60 hinter den starken T5-Promotor ligiert. Da eine Reinigung dieses membrangebundenen Proteins über His₆-Tag nicht in Frage kam, wurde das natürliche Stop-Codon des Gens als Terminator mitkloniert. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pUG016 und ist in Abb. 9 dargestellt.

Abb. 9: Darstellung des UbiA-Überexpressionskonstruktes pUG016. Die *Nco*I- und *Bgl*II-Schnittstellen des Vektors pQE60 dienen zur Klonierung.



2.2.2 Überexpression von UbiA

In dem Überexpressionskonstrukt pUG016 stand das Gen *ubiA* unter einem IPTG-induzierbaren Promotor. Für die Expressionsversuche wurde pUG016 in *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert. Als Kontrollstamm wurde der bisher im Arbeitskreis von Prof. L. Wessjohann verwendete transgene *E. coli* K12 : pALMU3 eingesetzt. Die Induktion erfolgte mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen. Obwohl UbiA als membrangebundenes Protein unlöslich ist, wurde versucht, den Verlauf der

Überexpression von UbiA durch Untersuchung des Gesamtzellproteins mittels SDS-PAGE darzustellen.

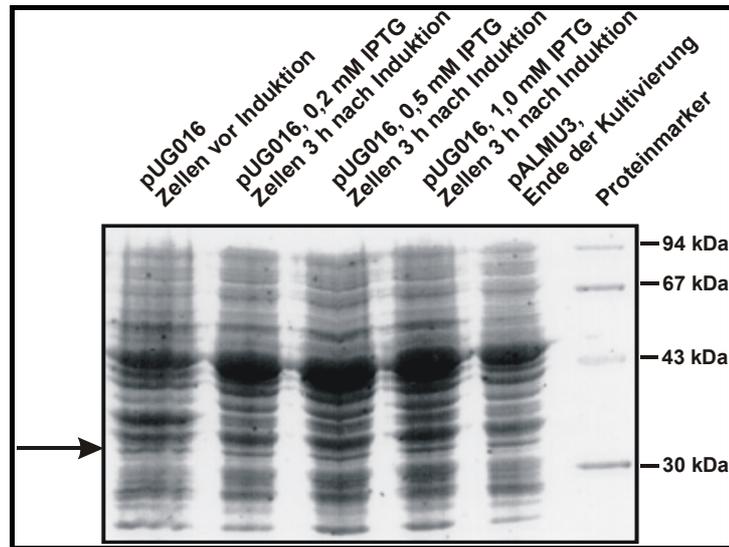


Abb. 10: Überexpression der Prenyltransferase UbiA mit Hilfe des Expressionskonstruktes pUG016 in *E. coli* XL1 Blue MRF' mit 0,2-1,0 mM IPTG. Der Pfeil markiert die Stelle, an der die Überexpressionsbande zu erwarten wäre.

Das erwartete 32,5 kDa große Protein UbiA war weder beim Kontrollstamm noch in den Expressionsversuchen mit pUG016 eindeutig identifizierbar. Eine deutlich sichtbare Überexpression des gewünschten Proteins wie in den Versuchen mit NovL war hier nicht detektierbar.

2.2.3 Prenyltransferase-Assay

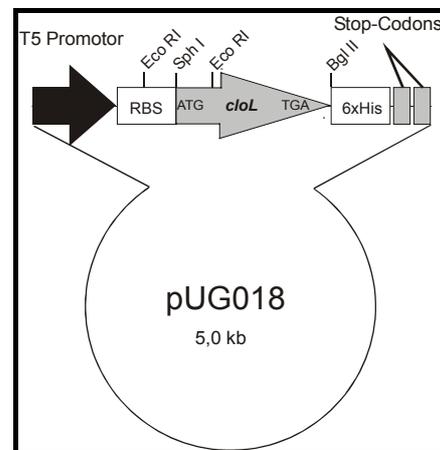
Da eine Überexpression der Prenyltransferase UbiA in der SDS-PAGE nicht beobachtet werden konnte, wurde stattdessen die Prenyltransferaseaktivität im Enzymrohextrakt bestimmt. Der Enzymrohextrakt des transgenen Kontrollstammes *E. coli* K12 : pALMU3 wies dabei eine spezifische Aktivität max. 0,30 pkat/mg Protein auf, mit transgenem *E. coli* XL1 Blue MRF' : pUG016 konnten spezifische Aktivitäten von max. 0,15 pkat/mg Protein erzielt werden. Es konnte also mit Hilfe des neuen Konstruktes zunächst keine Steigerung der spezifischen Aktivität von Enzymrohextrakten gegenüber den Versuchen mit dem bisher verwendeten Konstrukt erzielt werden. Die weitere Optimierung der Expressionsbedingungen wurde dem Arbeitskreis von Prof. L. Wessjohann überlassen.

2.3 Heterologe Überexpression von *NovL*, *CloL* und *CouL* als C-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine

2.3.1 Klonierung des *CloL*-Expressionskonstruktes pUG018

Das Gen *cloL* wurde wie in Kapitel II unter 7.5.4 beschrieben mittels PCR aus dem Plasmid pCloLM amplifiziert und nach *SphI*-*BglII*-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pQE70 ligiert. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pUG018 und ist in Abb. 11 dargestellt. Die Überexpressionskonstrukte pMS80 mit *novL* (Steffensky et al., 2000a) und pMS90 mit *couL* (Schmutz et al., 2003b) wurden auf die gleiche Weise kloniert und lagen bereits vor.

Abb. 11: Darstellung des *CloL*-Überexpressionskonstruktes pUG018. Die *SphI*- und *BglII*-Schnittstellen des Vektors pQE70 dienen zur Klonierung.



2.3.2 Überexpression und Reinigung der Amidsynthetasen

Die C-terminalen His₆-Tag Fusionsproteine CloL und NovL wurden in *E. coli* XL1 Blue MRF' überexprimiert (s. II 8.1.1) und durch Nickel-Affinitätschromatographie (s. II 8.1.2) nahezu homogen gereinigt (s. Abb. 12). Die dritte Amidsynthetase, CouL, wurde von E. Schmutz auf die gleiche Weise überexprimiert, gereinigt und für diese Versuche zur Verfügung gestellt. Gereinigtes NovL wies eine spezifische Aktivität von 14,5 nkat/mg Protein und CloL von 4,2 nkat/mg Protein auf. Für beide Proteine wurde die spezifische Aktivität mit dem natürlichen Substrat 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (= Ring A, DMAHB) bestimmt. CouL zeigte eine spezifische Aktivität von 7,4 nkat/mg Protein, ebenfalls gegenüber seinem natürlichen Substrate, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure. Alle Amidsynthetasen wurden unter Verwendung der Aminocoumarin-Einheit (= Ring B) von Novobiocin, ATP sowie der entsprechenden Acylkomponente als Substrat untersucht.

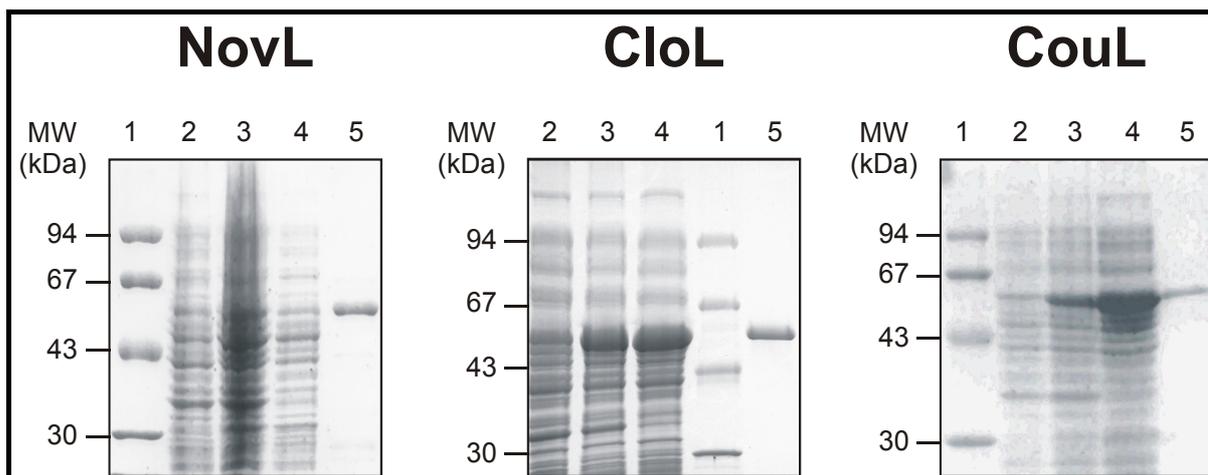


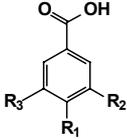
Abb. 12: Reinigung der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL nach Überexpression als Fusionsprotein mit einem C-terminalen His₆-Tag in *E. coli* XL1 Blue MRF⁷. Spur 1: Molekulargewichtsstandard (MW); Spur 2: Gesamtzellprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtzellprotein nach IPTG-Induktion; Spur 4: lösliches Protein nach IPTG-Induktion; Spur 5: Eluat nach Ni²⁺-Affinitätschromatographie.

2.4 Untersuchung der Substratspezifität mit verschiedenen Ring A-Analoga

Um die Substratspezifität von CloL, NovL und CouL bezüglich verschiedener aromatischer Acylkomponenten vergleichen zu können, wurden das jeweilige natürliche Substrat der drei Amidsynthetasen (Ring A bzw. 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure) und 22 synthetische Ring A-Analoga im Amidsynthetase-Assay eingesetzt. Die Strukturformeln der genannten Ring A-Analoga sind in Tab. 19 dargestellt. Die Bildung der resultierenden Amide im Assay wurde mittels HPLC-Analyse beobachtet (s. II 9.1.3). In Abb. 13 ist die Produktbildung im Assay dargestellt, ausgedrückt als relative Aktivitäten im Vergleich zur Produktbildung mit dem jeweiligen genuinen Substrat.

Ring A (= DMAHB) ist das natürliche Substrat von CloL und NovL, wurde allerdings auch sehr gut von CouL akzeptiert (s. Abb. 13). Im Gegensatz dazu wurde 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, das natürliche Substrat von CouL, weder von CloL noch von NovL akzeptiert. 4HB wurde von den Amidsynthetasen CloL und CouL akzeptiert, in geringerem Ausmaß jedoch auch von NovL (s. Abb. 13). Die Anwesenheit einer linearen Alkyl-Seitenkette an C-3 der 4HB (in RAA 200, 210 und 300) erhöhte die Umsatzrate der CloL- und NovL-Reaktionen. Demgegenüber führte ein Cyclohexyl-Substituent an der gleichen Position (RAA 520) zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Acylkomponenten, die eine Hydroxy-, Keto- oder Ether-Funktion in der Seitenkette aufwiesen (RAA 530, 510, 230) waren schlechte Substrate. Andererseits wurden Substanzen mit einer Amidbindung in der Seitenkette besonders von CloL gut akzeptiert, sofern sie eine ausreichend große N-

Tab. 19: Strukturformeln der im Amidsynthetase-Assay sowie für die Fütterungsexperimente eingesetzten Ring A-Analoga (RAAs)

Bezeichnung	R ₁	R ₂	R ₃	Literatur oder Hersteller
				
Ring A	OH		H	(Kominek and Meyer, 1975)
RAA 200	OH	CH ₃	CH ₃	Lancaster
RAA 210	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 220	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 230	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 240	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 250	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 260	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 270	OH	Cl	H	(Dessoy, 2003)
RAA 280	OH	Br	H	(Dessoy, 2003)
RAA 290	OH	Br	Br	Aldrich
RAA 300	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 380	NH ₂	CH ₃	H	Sigma
RAA 390		H	H	Fluka
RAA 500	OH	H	H	Fluka
RAA 510	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 520	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 530	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 540	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 550	OH		H	(Dessoy, 2003)
RAA 560	NH ₂	H	H	Merck
RAA 570	NH ₂	NH ₂	H	Fluka
RAA 580	CH ₃	NH ₂	H	Fluka

Alkyl-Seitenkette trugen (RAA 240, 250 und 260). 3-Halogenierte 4-Hydroxybenzoesäuren (RAA 270 und 280) wurden von allen drei Amidsynthetasen akzeptiert. Interessanterweise wurde 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoesäure (RAA 290) von CouL sehr gut, von CloL und NovL jedoch überhaupt nicht akzeptiert. Eine ähnliche Beobachtung wurde in geringerem Ausmaß für 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure (RAA 200) gemacht. Von den 4-Aminobenzoesäure-Derivaten RAA 560, 380, 570 und 390) wurde nur RAA 380, welches eine 3-Methylgruppe trägt, von CloL und CouL als Substrat akzeptiert.

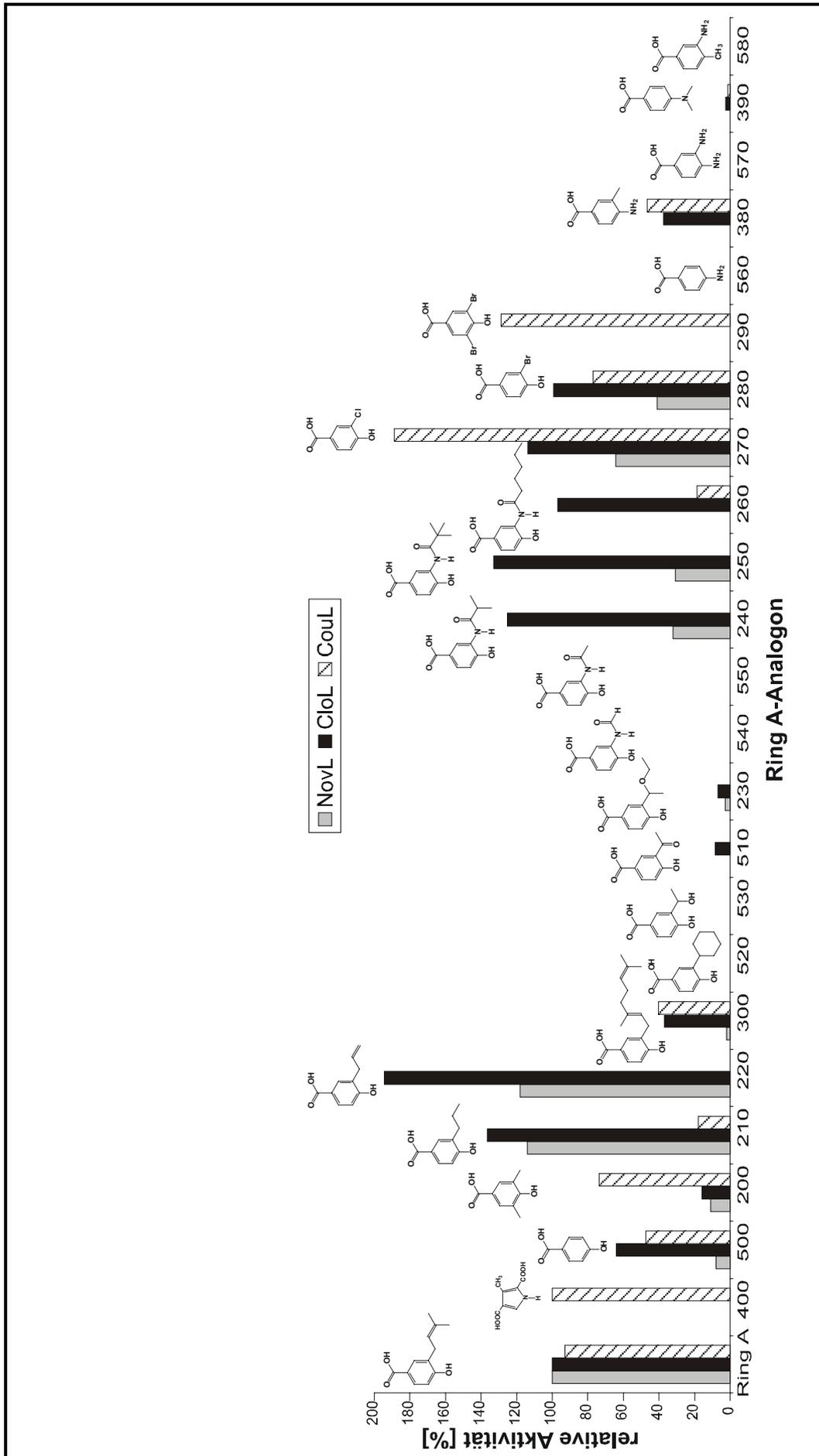


Abb. 13: Relative Aktivitäten der Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL mit verschiedenen aromatischen Carbonsäuren.
Die spezifischen Aktivitäten mit den natürlichen Substraten der Enzyme wurden gleich 100% gesetzt.

2.4.1 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte

Die Struktur aller in Abb. 13 dargestellten enzymatisch gebildeten Amide wurde durch LC-MS- und LC-MS/MS-Experimente bestätigt (s. Tab. 20). Obwohl die drei Amidsynthetasen CloL, NovL und CouL auf Aminosäureebene 80-86% Identität aufweisen und sich in ihrer Größe nur um zwei Aminosäuren unterscheiden, wiesen sie eine deutlich unterschiedliche Substratspezifität auf. CloL akzeptierte problemlos viele der synthetischen Substrate, daher wurde eine Mutante des Clorobiocin-Produzenten (*S. roseochromogenes*) für die anschließenden Fütterungsexperimente ausgewählt. Dies war auch deshalb von Vorteil, weil Clorobiocin ein besonders starker DNA-Gyrase-Inhibitor und sechs mal aktiver als Novobiocin ist (Hooper et al., 1982).

Tab. 20: Enzymatische Produkte: durch Scan CID-Spektren untersucht^a

Bezeichnung:	MW	Schlüsselionen der Full Scan CID-Spektren der [M-H] ⁻ und [M+H] ⁺ Ionen (m/z)		
		[M-H] ⁻	[206] ⁻	[M-206] ⁺
Novclobiocinsäure 200	355	354	+	149
Novclobiocinsäure 210	369	368	+	163
Novclobiocinsäure 220	367	366	+	161
Novclobiocinsäure 230	399	398	+	193
Novclobiocinsäure 240	412	411	+	206
Novclobiocinsäure 250	426	425	+	220
Novclobiocinsäure 260	440	439	+	234
Novclobiocinsäure 270	361	360 / 362	+	155 (³⁵ Cl)
Novclobiocinsäure 280	406	404 / 406	+	199 (⁷⁹ Br)
Novclobiocinsäure 290	485	482 / 484 / 486	+	279(⁷⁹ Br ⁸¹ Br)
Novclobiocinsäure 300	464	diese Struktur wurde bereits von M. Steffensky untersucht (Steffensky et al., 2000a)		
Novclobiocinsäure 380	340	339	(+)	134
Novclobiocinsäure 390	354	353	n.d.	148
Novclobiocinsäure 500	327	326	+	121
Novclobiocinsäure 510	369	368	+	163

^a Symbole und Abkürzungen: +, detektierbar; n.d., not detektierbar; x/y, zwei oder mehr Signale, die aus der Anwesenheit von Chlor- oder Brom-Isotopen im Molekül resultieren. Die Strukturen von R₁, R₂ und R₃ sind in Tab. 19 dargestellt.

3 Herstellung neuer Aminocoumarin-Antibiotika durch Mutasynthese

3.1 Einleitung

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, unter Ausnutzung der Kenntnisse aus den *in vitro*-Experimenten neue Aminocoumarine durch Fütterung synthetischer Ring A-Analoga an Ring A-defekte Mutanten der Aminocoumarin-Produzenten zu generieren. Die enzymatischen Versuche führten zu der Erkenntnis, dass CloL sowohl die größte Anzahl an angebotenen Substraten als auch die interessanteste Auswahl an Ring A-Analoga akzeptierte (s. Abb. 13). Daher wurde der Clorobiocin-Produzent *S. roseochromogenes* für die Mutasynthese-Experimente ausgewählt und die Biosynthese der DMAHB-Einheit von Clorobiocin durch Inaktivierung des Dimethylallyltransferase-Genes *cloQ* blockiert (Pojer et al., 2003b).

3.2 Fütterung verschiedener Ring A-Analoga an die *cloQ*⁻ - Mutante

Zur Produktion neuer Aminocoumarin-Antibiotika durch Fütterung verschiedener Acylkomponenten wurde diese *cloQ*⁻-Mutante eingesetzt, die in der Ring A-Biosynthese defekt ist. Die Mutasynthese-Experimente wurden mit denjenigen Ring A-Analoga durchgeführt, die schon *in vitro* durch CloL akzeptiert worden waren (mit Ausnahme von RAA 300, das nicht in ausreichender Menge vorhanden war). Die parallel inkubierte Kontrollkultur von *S. roseochromogenes* Wildtyp produzierte 15 µg/ml Clorobiocin, während die *cloQ*⁻ - Mutante kein Clorobiocin produzierte. In den Fütterungsexperimenten wurden 10-20 mg des entsprechenden Ring A-Analogons zwei Tage nach Inokulation den insgesamt 500-1000 ml Kulturmedium der *cloQ*⁻ - Mutante zugesetzt. Fünf bis acht Tage später wurden die Kulturen extrahiert und die Kulturextrakte mittels HPLC analysiert. Zu analytischen Zwecken wurde dabei wie unter Kapitel II 9.1.4 beschrieben vorgegangen. Insgesamt konnten 13 verschiedene Ring A-Analoga gefüttert werden. Neun dieser Experimente führten zur Bildung neuer Aminocoumarine, die unter Verwendung einer Sephadex LH 20-Säule präparativ isoliert und anschließend mittels HPLC weiter gereinigt wurden (s. Kapitel II 9.2). Die Strukturen der insgesamt 35 isolierten Substanzen (s. Tab. 21) wurden durch FAB-MS-Analyse unter Messung der negativen Ionen sowie durch ¹H-NMR-Analyse aufgeklärt.

3.3 Strukturaufklärung der neuen Novclobiocine

Alle neu isolierten Substanzen wurden, in Anlehnung an frühere Untersuchungen unseres Arbeitskreises (Eustáquio et al., 2003; Westrich et al., 2003; Xu et al., 2003), als Novclobiocine bezeichnet. Ihre massenspektrometrischen Daten sind in Tab. 22 aufgeführt, die Ergebnisse der ¹H-NMR-Analysen im Anhang (s. VI 3).

Tab. 21: Chemische Strukturen der neuen, aus Mutasyntthese-Experimenten gewonnenen Aminocoumarine

Bezeichnung:	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Novobiocin		CH ₃	H	CONH ₂	CH ₃
Clorobiocin		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 211		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 212		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 213		Cl	H	H	CH ₃
Novclobiocin 214		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocinsäure 215 ^a		Cl	-	-	-
Novclobiocinsäure 216 ^a		H	-	-	-
Novclobiocin 221		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 222		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocinsäure 223 ^a		Cl	-	-	-
Novclobiocinsäure 224 ^a		H	-	-	-
Novclobiocin 231		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 232		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 233		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 241		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 242		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 243		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 251		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 252		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 253		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 261		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 262		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocinsäure 265 ^a		H	-	-	-
Novclobiocin 271		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 272		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 281		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 282		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 283		Cl	H	H	CH ₃
Novclobiocin 311		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 312		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 313		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 381		Cl	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 382		Cl	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 383		H	H	Py	CH ₃
Novclobiocin 384		H	Py	H	CH ₃
Novclobiocin 385		Cl	H	Py	H

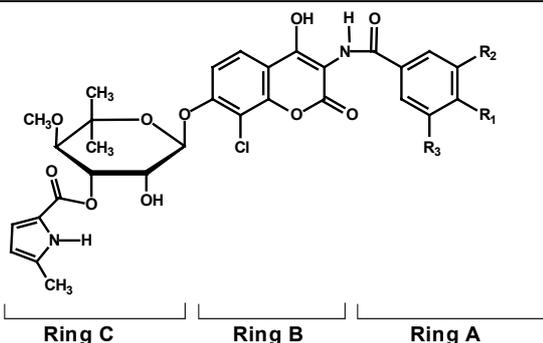
^a Den Novclobiocinsäuren fehlt die komplette Deoxyzucker-Einheit.

Aus jedem der neun erfolgreichen Fütterungsexperimente konnte das erwartete direkte Clorobiocin-Analogon isoliert werden, d.h. eine Substanz, die statt der DMAHB-Einheit das extern zugesetzte Ring A-Analogon enthielt, aber sonst strukturell identisch mit Clorobiocin war. Die direkten Clorobiocin-Analoga erhielten die Namen Novclobiocin 211, 221 etc. (s. Tab. 21) entsprechend der Nummerierung der zugefütterten Ring A-Analoga (s. Tab. 19). Zusätzlich zu diesen direkten Clorobiocin-Analoga wurde eine weitere Serie von Substanzen aus allen erfolgreichen Fütterungsexperimenten isoliert (Novclobiocin 212, 222 et.), die in HPLC-Chromatogrammen eine etwas längere Retentionszeit als das entsprechende direkte Clorobiocin-Analogon aufwiesen. Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten zeigten, dass bei diesen „Isoclorobiocinen“ die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure mit der 2-OH-Gruppe anstatt mit der 3-OH-Gruppe des Deoxyzuckers verknüpft ist. Dies konnte durch eine Signalverschiebung des Protons an C-2' von 4,34 ppm im Clorobiocin-Derivat auf 5,39 ppm im Isoclorobiocin-Derivat und des Protons an C-3' von 5,71 ppm auf 4,44 ppm demonstriert werden. FAB-MS-Analysen der Substanzen bestätigten das Molekulargewicht der Isoclorobiocine. Über das natürliche Vorkommen eines ähnlichen Isomers von Novobiocin, das zudem auch ähnliche Signalverschiebungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufwies, wurde von Crow et al. bereits früher berichtet (Crow et al., 1999). Ebenso konnten kürzlich derartige Isomere in Kulturen des Clorobiocin-Produzenten *S. roseochromogenes* beobachtet werden (Pojer et al., 2002; Westrich et al., 2003).

In fünf Fütterungsexperimenten konnten Substanzen mit etwas kürzeren HPLC-Retentionszeiten als die direkten Clorobiocin-Analoga beobachtet und als „Desclorobiocine“ identifiziert werden: FAB-MS-Analysen zeigten, dass ihr Molekulargewicht um 34 Da kleiner war als das der entsprechenden Muttersubstanz, was mit dem Verlust eines Chlor-Atomes übereinstimmt. Während die Massenspektren der Clorobiocin- und Isoclorobiocin-Derivate das typische Isotopenmuster aufwiesen, das durch die Chlor-Isotope ^{35}Cl und ^{37}Cl verursacht wird, zeigten die Desclorobiocine dieses Muster nicht, was das Fehlen des Chlor-Atomes bestätigte. Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten bewiesen anschließend, dass diese neuen Substanzen ein Wasserstoff-Atom anstelle eines Chlor-Atomes an C-8' von Ring B trugen. Das Signal bei 7,20-7,29 ppm, das zu H-6' des direkten Clorobiocin-Derivates gehört, fehlte. Dafür konnte ein Signal für zwei Protonen bei 7,01-7,04 ppm als breites Singulett beobachtet werden, das den beiden Protonen H-6' und H-8' zugeordnet wurde. Dieses Zusammenfallen der Signale von H-6' und H-8' als breites Singulett wurde bereits früher für ein natürlich vorkommendes Novobiocin-Derivat, dem die 8'-Methylgruppe fehlte, sowie für ein natürlich vorkommendes Clorobiocin-Derivat, dem das 8'-Chlor-Atom fehlte, berichtet (Sasaki et al., 2001; Eustáquio et al., 2003). Diese neuen Desclorobiocine erhielten die Namen Novclobiocin 214, 233, 242, 252 und 383.

Aus zwei Fütterungsexperimenten wurden Substanzen isoliert, denen die 5-Methyl-

Tab. 22: FAB-massenspektrometrische Daten der isolierten Aminocoumarine unter Messung negativer Ionen^a



Bezeichnung	MW	FAB-MS (<i>m/z</i>) negativer Ionen			
		[M-H] ⁻	[M-Ring C] ⁻	Ring A-Analogon	Ring B
Novclobiocin 211	670	669 / 671	388	162	225
Novclobiocin 212	670	669 / 671	n.d.	162	n.d.
Novclobiocin 213	563	562	n.d.	162	n.d.
Novclobiocin 214	636	635	354	162	191
Novclobiocinsäure 215	389	388 / 390	-	162	n.d.
Novclobiocinsäure 216	355	354	-	162	191
Novclobiocin 221	668	667 / 669	386 / 388	n.d.	225
Novclobiocin 222	668	667 / 669	386	n.d.	225
Novclobiocinsäure 223	387	386 / 388	-	n.d.	n.d.
Novclobiocinsäure 224	353	352	-	n.d.	n.d.
Novclobiocin 231	700	699 / 701	418	n.d.	225
Novclobiocin 232	700	699 / 701	418	n.d.	225
Novclobiocin 233	666	665	384	192	191
Novclobiocin 241	713	712 / 714	431 / 433	205	225
Novclobiocin 242	713	712 / 714	431	205	225
Novclobiocin 243	679	678	397	205	191
Novclobiocin 251	727	726 / 728	445	n.d.	225
Novclobiocin 252	727	726 / 728	445	219	225
Novclobiocin 253	693	692	411	219	191
Novclobiocin 261	741	740 / 742	459 / 461	233	225
Novclobiocin 262	741	740 / 742	459	233	225
Novclobiocinsäure 265	426	425	-	233	191
Novclobiocin 271	662	661 / 663 / 665	380	n.d.	225
novclobiocin 272	662	661 / 663 / 665	n.d.	n.d.	225
Nnovclobiocin 281	706	705 / 707 / 709	424	n.d.	225
Novclobiocin 282	706	705 / 707 / 709	424	198	225
Novclobiocin 283	599	598 / 600 / 602	n.d.	198	225
Novclobiocin 311	658	657 / 659	376	n.d.	n.d.
Novclobiocin 312	658	657 / 659	n.d.	n.d.	225
Novclobiocin 313	624	623	342	n.d.	191
Novclobiocin 381	641	640 / 642	359 / 361	n.d.	225
Novclobiocin 382	641	640 / 642	359 / 361	n.d.	225
Novclobiocin 383	607	606	325	n.d.	191
Novclobiocin 384	607	606	325	n.d.	191
Novclobiocin 385	627	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Symbole und Abkürzungen: *x/y*, zwei oder mehr Signale, die aus der Anwesenheit von Chlor- und / oder Brom-Isotopen im Molekül resultieren; n.d., nicht detektierbar.

pyrrol-2-carbonsäure-Einheit vollständig fehlte. Dies konnte aus ihrem gegenüber dem entsprechenden direkten Clorobiocin-Derivat um 107 reduzierten Molekulargewicht, sowie aus den Signalen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren abgeleitet werden (s. VI 3); die beiden Substanzen wurden als Novclobiocine 213 und 283 bezeichnet.

Die Fütterung von 3-Methyl-4-aminobenzoessäure (RAA 380) resultierte in ähnlichen Clorobiocin-, Isoclorobiocin- und Desclorobiocin-Derivaten, aber auch in zwei weiteren Substanzen. Einer dieser Strukturen fehlte das Chlor-Atom an Position 8 der Aminocoumarin-Einheit, wobei sie gleichzeitig die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure an der 2''-OH-Gruppe anstatt an der 3''-OH-Gruppe des Deoxyzuckers trug, was aus den $^1\text{H-NMR}$ -Daten abgeleitet werden konnte. Diese Substanz erhielt den Namen Novclobiocin 384. Die zweite Substanz enthielt sowohl das Chlor-Atom als auch die 3''-Acylgruppe, dafür fehlte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum das Signal bei 3,51 ppm, was für das Fehlen der Methylgruppe an Position 4 der L-Noviose sprach. Die Substanz wurde als Novclobiocin 385 bezeichnet. Das Molekulargewicht dieser Substanzen wurde ebenfalls mittels FAB-MS-Analyse untersucht (s. Tab. 22).

In einigen Mutasynthese-Experimenten konnten die Aminocoumarin-Aglyka, d.h. Substanzen, denen die Deoxyzucker-Einheit fehlt, gefunden werden; ihre Strukturen wurden durch massenspektrometrische und $^1\text{H-NMR}$ -Daten bestätigt. In Analogie zu Novobiocinsäure, einer Vorstufe von Novobiocin, wurden diese Substanzen Novclobiocinsäuren genannt. Ihre Strukturen sind ebenfalls in Tab. 21 beschrieben.

Aus den neun erfolgreichen mutasynthetischen Fütterungsexperimenten konnten durchschnittlich 1,7 mg reines Clorobiocin-Derivat (zwischen 0,7 und 2,9 mg), 0,7 mg reines Isoclorobiocin-Derivat und 0,1 mg reines Desclorobiocin-Derivat bezogen auf 10 mg gefüttertes Ring A-Analogon isoliert werden (s. Tab. 23). Zwischen der *in vitro*-Umsetzung der Ring A-Analoga durch CloL (s. Abb. 13) und der Gesamtausbeute der Aminocoumarine aus allen 13 Fütterungsexperimenten bestand eine statistisch signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,649$; $p = 0,0164$; Abb. 14). Zum Beispiel resultierte die Fütterung von RAA 200, 390 und 510, welche *in vitro* schlechte Substrate für CloL waren, nicht in der Bildung detektierbarer Mengen eines Aminocoumarin-Antibiotikums. Eine Ausnahme stellte 4HB (= RAA 500) dar, das *in vitro* gut akzeptiert wurde, *in vivo* jedoch nicht zur Bildung eines neuen Aminocoumarins führte.

Im Gegensatz dazu resultierte die Fütterung von RAA 210, 220, 230, 240, 250, 270, 280 und 380 in der Isolierung von insgesamt 32 neuen Aminocoumarinen, die die gefütterten Substrate enthielten. Verglichen mit früheren Mutasynthese-Experimenten, z.B. durch Ankenbauer et al., der 13 verschiedene Vorstufen fütterte und nur drei neue Substanzen isolieren konnte (Ankenbauer et al., 1991), sind dies sehr erfolgreiche Ergebnisse, die die Nützlichkeit mutasynthetischer Methoden für die Herstellung neuer Aminocoumarin-Derivate demonstrieren.

Tab. 23: Relative Ausbeute der Novclobiocine und Novclobiocinsäuren der Fütterungsexperimente verglichen mit der relativen Aktivität der Substrate mit CloL.

Eingesetzte Substratmengen				Ausbeute der Produkte					relative Aktivität von CloL mit RAA [%]				
Ring A Analogon	MW	Menge [mg]	Menge [mmol]	Novclobiocin	MW	Menge [mg]	Menge [mmol]	relative Ausbeute [%]					
210	180	10	0,06	211	670	2,89	0,0043	7,76					
				212	670	0,97	0,0014	2,61					
				214	636	0,59	0,0009	1,67					
				213	563	0,44	0,0008	1,41					
				NCA 215	389	0,11	0,0003	0,51					
				NCA 216	355	0,12	0,0003	0,61					
				Gesamtausbeute:								14,56	136
220	178	20	0,11	221	668	1,97	0,0029	2,62					
				222	668	0,64	0,0010	0,85					
				NCA 223	387	1,10	0,0028	2,53					
				NCA 224	353	1,01	0,0029	2,55					
				Gesamtausbeute:								8,55	194
230	210	10	0,05	231	700	1,67	0,0024	5,01					
				232	700	0,61	0,0009	1,83					
				233	666	0,86	0,0013	2,71					
				Gesamtausbeute:								9,55	7
240	223	5	0,02	241	713	1,11	0,0016	6,94					
				242	713	0,56	0,0008	3,50					
				243	679	0,54	0,0008	3,55					
				Gesamtausbeute:								13,99	125
250	237	3	0,01	251	727	0,67	0,0009	7,28					
				252	727	0,30	0,0004	3,26					
				253	693	0,37	0,0005	4,22					
				Gesamtausbeute:								14,76	133
260	251	20	0,08	261	741	0,95	0,0013	1,61					
				262	741	0,51	0,0007	0,86					
				NCA 265	426	1,25	0,0029	3,68					
				Gesamtausbeute:								6,16	97
270	172	13	0,08	271	662	1,95	0,0029	3,90					
				272	662	0,68	0,0010	1,36					
				Gesamtausbeute:								5,26	114
280	216	10	0,05	281	706	2,34	0,0033	7,16					
				282	706	0,96	0,0014	2,94					
				283	599	0,47	0,0008	1,69					
				Gesamtausbeute:								11,79	99
380	151	18	0,12	381	641	2,46	0,0038	3,22					
				382	641	0,65	0,0010	0,85					
				383	607	0,96	0,0016	1,33					
				384	607	0,42	0,0007	0,58					
				385	627	0,85	0,0014	1,14					
				Gesamtausbeute:								7,11	38
200				Gesamtausbeute:								0,00	16
390				Gesamtausbeute:								0,00	3
500				Gesamtausbeute:								0,00	64
510				Gesamtausbeute:								0,00	8

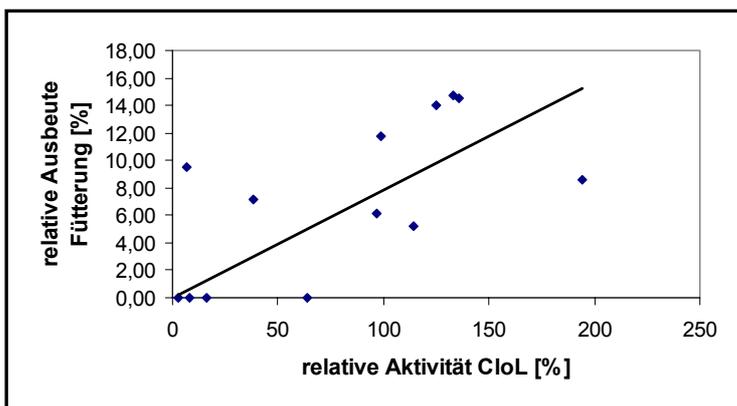


Abb. 14: *In vitro* – *in vivo*-Korrelation der Produktbildung im Amidsynthetase-Assay sowie in den Mutasynthese-Experimenten

Darüberhinaus wurden aus einigen Fütterungsexperimenten drei Substanzen isoliert, deren Acylkomponente Vanillinsäure war. Das Auftreten von Vanillinsäure (= 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure) als Acylkomponente konnte nicht durch die zugefütterten Substrate oder Abbauprodukte davon erklärt werden. Vielmehr wurde vermutet, dass die Vanillinsäure aus einem anderen Stoffwechselweg des Produzenten bzw. der Mutante stammt und alternativ zu der natürlichen DMAHB-Einheit allerdings mit geringerer Umsatzrate in das Aminocoumarin-Antibiotikum eingebaut wird. Durch FAB-MS- sowie $^1\text{H-NMR}$ -Analysen wurde die Struktur dieser neuen, natürlich vorkommenden Aminocoumarine untersucht und die Substanzen erhielten die Namen Novclobiocin 311 (= Vanillobiocin, direktes Clorobiocin-Derivat), Novclobiocin 312 (= Isovanillobiocin, Isoclorobiocin-Derivat) und Novclobiocin 313 (= Desclorovanillobiocin, Desclorobiocin-Derivat). Die gleichen Substanzen konnten auch ohne Fütterung eines Ring A-Anlaogons aus der kultivierten cloQ⁻ - Mutante isoliert werden (A. Freitag, persönliche Mitteilung).

4 Untersuchung der antimikrobiellen und gyraseinhibitorischen Aktivität neuer Clorobiocinderivate

4.1 Einleitung

Die Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Clorobiocin bestehen aus der ADHC-Einheit, die auf der einen Seite von L-Noviose und auf der anderen Seite von der DMAHB-Einheit flankiert wird (s. Abb. 8, S. 83). Erste Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung der Aminocoumarine (Hooper et al., 1982; Reusser and Dolak, 1986) zeigten, dass sowohl der ADHC-Ring als auch die L-Noviose für die antibakterielle Aktivität essentiell sind und dass die Substituenten, die mit diesen Teilstrukturen verknüpft sind, signifikanten Einfluß auf die Bioaktivität der Substanzen haben. Daher wurden strukturell modifizierte Aminocoumarine synthetisiert und bezüglich ihrer Bioaktivität verglichen mit Novobiocin untersucht (Laurin et al., 1999b; Laurin et al., 1999a; Musicki et al., 2000; Peixoto et al., 2000; Periers et al., 2000; Ferroud et al., 1999). Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche scheint eine Verstärkung der Bioaktivität von Aminocoumarinen bei gleichzeitiger Verbesserung

ihrer toxikologischen und pharmakologischen Eigenschaften ein realisierbares Ziel zu sein.

Röntgenstrukturspektroskopische Untersuchungen des Antibiotikum-Enzym-Komplexes (Lewis et al., 1996a; Tsai et al., 1997; Lafitte et al., 2002) zeigten, dass ADHC- und L-Noviose-Einheit in die Bindung dieser Antibiotika an die B-Untereinheit der DNA-Gyrase involviert sind. Der Hauptunterschied zwischen den Strukturen von Clorobiocin und Novobiocin im Komplex mit einem 24 kDa großen Fragment der *E. coli* DNA-Gyrase B-Untereinheit ist, dass die 5-Methylpyrrol-1H-pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an der O-3''-Position von L-Noviose eine hydrophobe Tasche des Enzymes besetzt und dabei zwei Wassermoleküle verdrängt, die im Komplex mit Novobiocin (das an dieser Stelle carbamoyliert ist) vorhanden sind. Dieser Unterschied scheint entropisch gesehen von Vorteil zu sein, was die Vermutung nahelegt, dass er für die stärkere Bindung von Clorobiocin an die DNA-Gyrase verantwortlich ist (Lewis et al., 1996b). Die Benzoyl-Einheit an der 3-Aminogruppe des ADHC-Ringes trägt wahrscheinlich nur schwach durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Affinität der Aminocoumarin-Antibiotika zur B-Untereinheit der DNA-Gyrase bei, könnte allerdings den Transport von Aminocoumarinen durch die bakterielle Zellmembran wesentlich beeinflussen (Lafitte et al., 2002; Lewis et al., 1996a). Die hier dargestellten Untersuchungen konzentrieren sich im Wesentlichen auf die antimikrobiellen und DNA-gyraseinhibitorischen Eigenschaften neuer mutasynthetisch hergestellter Aminocoumarin-Antibiotika.

4.2 Antibakterielle Aktivität der Novclobiocine gegenüber *Bacillus subtilis*

23 Aminocoumarine einschließlich Novobiocin und Clorobiocin wurden auf ihre wachstumshemmende Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* ATCC 14893 in einem Agar-Diffusionsassay mit drei verschiedenen Mengen der entsprechenden Substanz untersucht (s. Abb. 15). Die antibakteriellen Aktivitäten, die durch Auswertung der erzielten Hemmhofdurchmesser quantifiziert wurden, sind in Abb. 15 relativ zu Clorobiocin ausgedrückt.

Die mutasynthetisch hergestellten direkten Clorobiocin-Derivate wiesen gegenüber *B. subtilis* Aktivitäten von 6-100% verglichen mit Clorobiocin auf (s. Abb. 15A). Die am stärksten aktiven neuen Substanzen waren die Novclobiocine 211, 221 und 281. Die Isoclorobiocin-Derivate (s. Abb. 15B) hatten eine geringere Aktivität gegenüber *B. subtilis* als die Novclobiocine 211, 221 und 281. Der Vergleich von Novobiocin und Clorobiocin gegenüber diesem Teststamm ergab für Novobiocin eine dreimal höhere Aktivität als für Clorobiocin. Entsprechend diesem Assayprotokoll wiesen Novclobiocin 211 (mit 3-*n*-Propyl-4-hydroxybenzoesäure als Acylkomponente) und 221 (mit 3-Allyl-4-hydroxybenzoesäure als Acylkomponente) 50-100% bzw. 25-50%

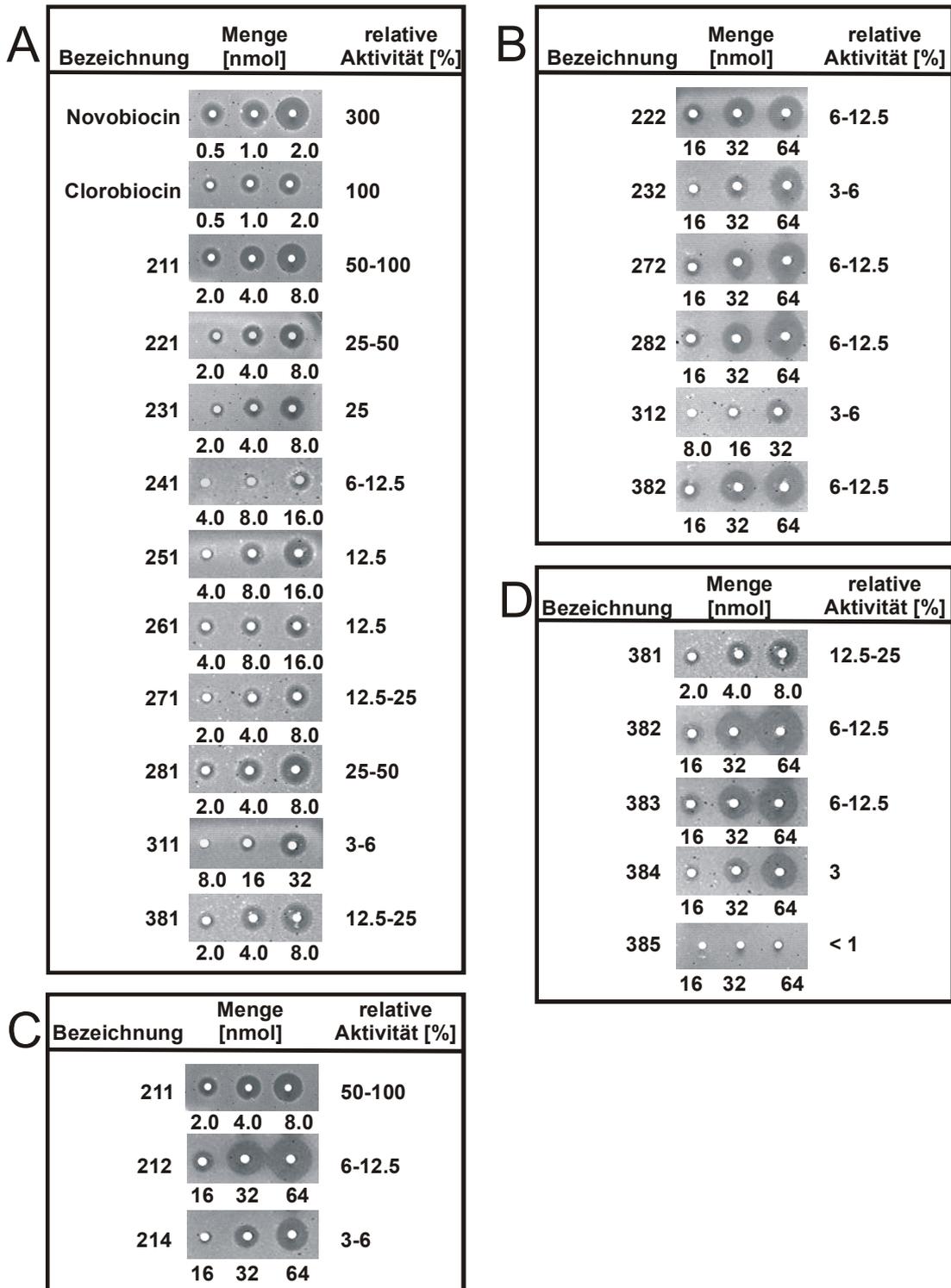


Abb. 15: Bioassays von (A) Novobiocin, Clorobiocin und direkten Clorobiocin-Derivaten, (B) Isoclorobiocin-Derivaten, (C) Novclobiocinen, die eine 3-*n*-Propyl-4-hydroxybenzoyl-Einheit enthalten und (D) Novclobiocinen, die eine 3-Methyl-4-aminobenzoyl-Einheit tragen, gegenüber *Bacillus subtilis*. Die relativen Bioaktivitäten der Substanzen wurden durch Vergleich der Hemmhofdurchmesser mit den Clorobiocin-Hemmhofdurchmessern ermittelt. Die relative Bioaktivität von Clorobiocin wurde dabei gleich 100% gesetzt.

der Aktivität von Clorobiocin auf. Innerhalb der Familie der Clorobiocin-Derivate hatte die Anwesenheit eines Ethoxyethyl- (bei Novclobiocin 231) und besonders eines Methoxy-Substituenten (bei Novclobiocin 311 = Vanillobiocin) an Position 3 der Benzoessäure-Einheit einen negativen Einfluß auf die antibakterielle Aktivität. Derivate, die einen Substituenten mit Amidbindung in 3-Stellung der Benzoessäure-Einheit trugen (z.B. die Novclobiocine 241, 251 und 261) hatten ebenfalls eine stark reduzierte antibakterielle Aktivität. Der Austausch einer C₃-Alkylgruppe gegen ein Chlor-Atom an C-3 der Benzoyl-Einheit führte auch zu einer Reduktion der Bioaktivität. Demgegenüber war Novclobiocin 281, das eine 3-Bromo-4-hydroxybenzoessäure-Gruppe enthält, allerdings genauso aktiv wie Novclobiocin 221.

Innerhalb der Serie von Novclobiocinen, die eine 3-*n*-Propyl-4-hydroxybenzoessäure als Acylkomponente enthielten (s. Abb. 15C), war das Molekül mit dem gleichen Substitutionsmuster wie Clorobiocin (Novclobiocin 211) stärker aktiv als das korrespondierende Isoclorobiocin (Novclobiocin 212) und viel stärker aktiv als das entsprechende Desclorobiocin (Novclobiocin 214). Obwohl 3-Methyl-4-aminobenzoessäure als Acylkomponente sich nicht positiv auf die antibakterielle Aktivität der Substanzen auswirkte, konnten innerhalb dieser Substanzgruppe ähnliche Verhältnisse gefunden werden (s. Abb. 15C): die Substanz mit dem gleichen Substitutionsmuster wie Clorobiocin (Novclobiocin 381) wies die höchste Aktivität auf (12,5-25% der Aktivität von Clorobiocin), gefolgt von dem Isoclorobiocin-Derivat (Novclobiocin 382) und dem Desclorobiocin-Derivat (Novclobiocin 383). Das Isodesclorobiocin-Derivat Novclobiocin 384 hatte noch geringere Bioaktivität gegenüber *B. subtilis*, während das Clorobiocin-Derivat, dem die Methylgruppe an O-4' der L-Noviose fehlte, fast vollständig inaktiv war.

4.3 Minimale inhibitorische Konzentration (MIC) der Novclobiocine gegenüber klinisch relevanten Mikroorganismen

Für 30 Aminocoumarine einschließlich Novobiocin und Clorobiocin wurden MIC-Werte gegenüber zehn klinisch relevanten Gram-positiven Bakterien sowie vier klinisch relevanten Gram-negativen Bakterien bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 24 zusammengefaßt, ein Beispiel für die Bestimmung der MIC-Werte ist in Abb. 16 dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Agar-Diffusionsassays mit *B. subtilis* ATCC 14893, war Clorobiocin gegenüber dieser Auswahl von Teststämmen mindestens so aktiv wie Novobiocin, meistens aber stärker aktiv. Die Beziehung zwischen Clorobiocin und seinen mutasynthetischen Derivaten war grundsätzlich die gleiche, wie die bereits in den Agar-Diffusionsassays identifizierte. Die niedrigsten MIC-Werte wurden für die Clorobiocin-Derivate erhalten, gefolgt von den Isoclorobiocin- und den Desclorobiocin-Derivaten.

Derivate, die eine 3-Alkyl-4-hydroxybenzoesäure-Einheit trugen, hatten die niedrigsten MIC-Werte, diejenigen mit einer 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure- oder einer 3-Halogen-4-hydroxybenzoesäure-Einheit wiesen etwas höhere MIC-Werte auf, während die Derivate mit 3-Amido-4-hydroxybenzoesäure-Seitenketten die höchsten MIC-Werte zeigten.

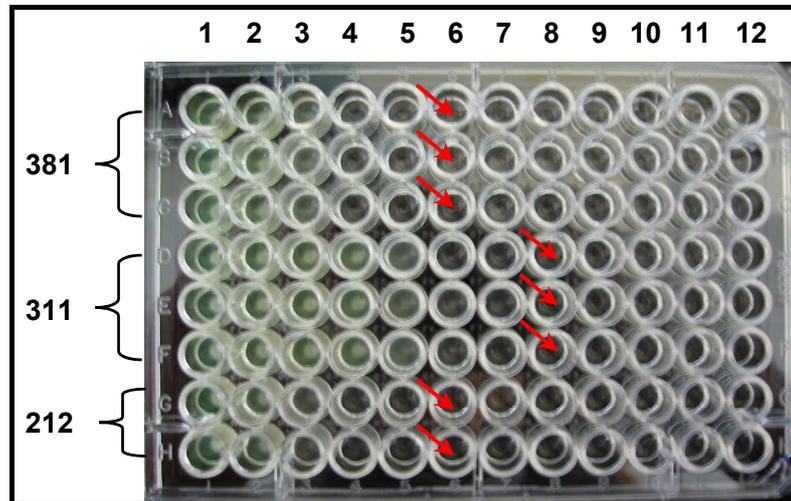


Abb. 16: MIC-Bestimmung von Novclobiocin 381, 311 und 212 gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* K799/6. Die Assays wurden optisch mit einem Plattenlesegerät mit Spiegel ausgewertet. Spur 1, Assay ohne Zusatz des Inhibitors; Spur 2-11, Zusatz des jeweiligen Inhibitors in aufsteigenden Konzentrationen von 0,06, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 $\mu\text{g/ml}$; Spur 12, Assay ohne Zusatz von Bakteriensuspension und Inhibitor; die Wells, in denen gerade kein Wachstum mehr erkennbar war, sind mit Pfeilen markiert.

Aminocoumarin-Antibiotika zeigen normalerweise eine hohe Aktivität gegenüber Gram-positiven Stämmen, besonders gegenüber Staphylokokken und Novobiocin-resistenz tritt unter Staphylokokken relativ selten auf (Jones, 1989). Nur einer von fünf untersuchten Staphylokokken-Stämmen (darunter methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Stämme) war gemäß dem von Upjohn empfohlenen mikrobiologischen Empfindlichkeits-Breakpoint von $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ (G. E. Zurenko, persönliche Mitteilung) resistent gegenüber Novobiocin. Dieser Staphylokokken-Stamm, *S. aureus* 80CR5, war jedoch wesentlich sensitiver gegenüber Clorobiocin als gegenüber Novobiocin. *S. pneumoniae* Stamm 1/1 (Serotyp 6), ein penicillin-resistenter Pneumokokken-Stamm, und drei der vier getesteten Enterokokken-Stämme (darunter der vancomycin-resistente Stamm *Enterococcus faecalis* Van B E80-8, aber nicht der vancomycin-resistente Stamm *Enterococcus faecium* Van A E25-1) waren entsprechend den mikrobiologischen Breakpoint-Kriterien des Herstellers resistent gegenüber Novobiocin (Jacobs et al., 1978), wobei der Pneumokokken-Stamm und drei der vier Enterokokken-Stämme (darunter auch beide vancomycin-resistenten Stämme) gleichzeitig $\geq 2 \log_2$ Verdünnungsstufen sensitiver gegenüber Clorobiocin als gegenüber Novobiocin waren.

Tab. 24: Effekt verschiedener Aminocoumarine auf die *E. coli* DNA- Gyrase (Verhältnis IC_{50nov}/IC_{50}) *in vitro* und auf das Wachstum ausgewählter Mikroorganismen. ^a IC_{50} für Novobiocin = 0,5 μ M. ^bDa nur eine sehr geringe Menge dieser Substanz zur Verfügung stand, wurden die MIC-Werte über einen Konzentrationsbereich von 0,03-16 μ g/ml bestimmt. ^cDa nur eine sehr geringe Menge dieser Substanz zur Verfügung stand, wurden die MIC-Werte über einen Konzentrationsbereich von 0,015-8 μ g/ml bestimmt.

	Substanz	Gyrase- hemmung Verhältnis $\frac{IC_{50nov}^a}{IC_{50comp}}$	Wachstumshemmung: MIC (μ g/ml)					
			<i>S. pneu- moniae</i> 1/1 (serotype 6)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> 80CR5	<i>S. aureus</i> 42080	<i>S. epi- dermidis</i> CNS 10	<i>S. epi- dermidis</i> CNS 184
	Novobiocin	1,00	8	$\leq 0,06$	>32	0,25	4	$\leq 0,06$
	Corobiocin	3,52	2	$\leq 0,06$	4	$\leq 0,06$	0,125	$\leq 0,06$
Clorobiocin-Derivate	211	0,91	8	$\leq 0,06$	8	$\leq 0,06$	0,25	$\leq 0,06$
	221	1,83	8	$\leq 0,06$	32	$\leq 0,06$	1	$\leq 0,06$
	231	1,75	16	$\leq 0,06$	32	0,125	2	$\leq 0,06$
	241	0,86	>32	4	>32	4	16	0,125
	251	0,84	>32	1	>32	0,5	8	$\leq 0,06$
	261	1,65	>32	2	>32	1	4	$\leq 0,06$
	271	1,85	32	1	>32	1	4	$\leq 0,06$
	281	0,87	>32	1	32	0,5	4	$\leq 0,06$
	311	0,47	>32	2	>32	2	8	0,125
	381	1,91	8	0,125	32	0,5	4	$\leq 0,06$
Isoclorobiocin-Derivate	212	0,46	32	0,25	32	$\leq 0,06$	1	$\leq 0,06$
	222	0,23	32	0,25	>32	0,25	4	$\leq 0,06$
	232	0,05	>32	1	>32	2	8	0,125
	242	0,11	>32	4	>32	4	>32	0,5
	252 ^b	0,21	>16	8	>16	4	>16	0,5
	262	0,21	>32	2	>32	2	16	0,25
	272	0,23	32	2	>32	2	8	0,25
	282	0,11	32	2	>32	2	8	$\leq 0,06$
	312	0,47	>32	2	>32	4	8	0,25
	382	0,48	8	0,5	>32	1	16	0,125
Desclorobio- cin-Derivate	214	0,48	>32	4	>32	4	16	0,5
	233	0,23	>32	4	>32	4	16	0,5
	243	0,23	>32	16	>32	32	16	2
	253	0,11	>32	16	>32	16	>32	2
	313	0,25	>32	8	>32	16	>32	2
	383	0,50	32	8	>32	8	>32	4
andere Substan- zen	384 ^c	0,25	>8	8	>8	8	>8	2
	385	0,02	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	283	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Von den vier untersuchten Gram-negativen Mikroorganismen waren *E. coli* DC2 und *Pseudomonas aeruginosa* K799/61 sehr viel sensitiver gegenüber Novobiocin und Clorobiocin als die entsprechenden Wildtyp-Stämme (*E. coli* UB1005 und *P. aeruginosa* K799/wt).

4.4 Gyrasehemmende Aktivität der Novclobiocine

Die Ergebnisse für die Hemmung der *E. coli* DNA-Gyrase Supercoiling-Aktivität durch Aminocoumarine relativ zu Novobiocin sind in Tab. 24 aufgeführt; ein Beispiel für die Hemmung durch Novclobiocin 211 ist in Abb. 17 dargestellt. Von den untersuchten Substanzen war Clorobiocin der stärkste DNA-Gyrase-Inhibitor. Fünf Clorobiocin-Derivate hatten eine um 50-100% höhere Aktivität als Novobiocin: (1) Novclobiocin 381, ein Clorobiocin-Analogon mit einer 3-Methyl-4-aminobenzoessäure-Gruppe anstelle der DMAHB-Gruppe von Clorobiocin, (2) Novclobiocin 221, das eine 3-Allyl-4-hydroxy-benzoessäure-Einheit enthält, (3) Novclobiocin 271, das eine 3-Chloro-4-hydroxybenzoessäure-Gruppe trägt und die Novclobiocine (4) 231 sowie (261) mit Ether- oder Amid-Funktionen in der Seitenkette der 4-Hydroxybenzoessäure-Einheit.

Die übrigen neuen Aminocoumarine, die getestet wurden, konnten aufgrund ihrer DNA-gyraseinhibitorischen Aktivitäten in drei Gruppen eingeteilt werden: diejenigen, deren Aktivität ähnlich der von Novobiocin war (Novclobiocin 211, 241, 251 und 281), diejenigen, deren Aktivitäten sich im Bereich von 20-50% der Aktivität von Novobiocin bewegten (Novclobiocine 212, 214, 222, 233, 243, 252, 262, 272, 311, 312, 313, 382, 383 und 384) und diejenigen mit vernachlässigbarer DNA-gyraseinhibitorischer Aktivität (Novclobiocine 232, 242, 253, 282, 283 und 385).

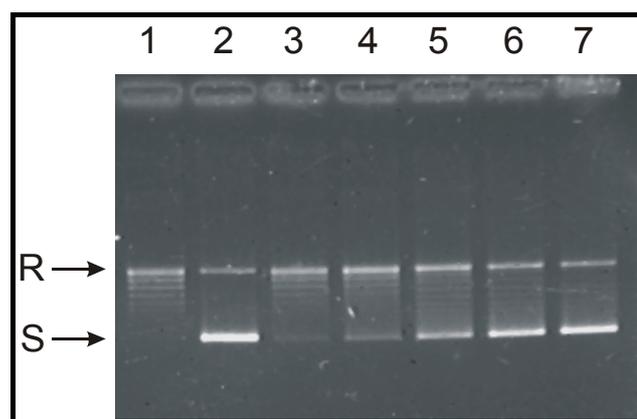


Abb. 17: Hemmung der *E. coli* DNA-Gyrase Supercoiling-Aktivität durch Novclobiocin 211. Die pBR322-Topoisomere wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Spur 1, Assay ohne Enzym; Spur 2, Assay ohne Zusatz des Inhibitors; Spur 3-7, Novclobiocin 211-Zusatz in abnehmenden Konzentrationen von 2, 1, 0,5, 0,25 und 0,125 μM ; R, relaxierte pBR322-DNA; S, supercoiled pBR322-DNA.

5 Konstruktion eines neuen Vektors für Anwendungen mittels PCR targeting protocol

5.1 Einleitung

Das PCR-Targeting-System wurde vom John Innes Centre, Norwich, UK, für die Geninaktivierung in Streptomycceten entwickelt (Gust et al., 2003). Dabei wird das zu inaktivierende Gen fast vollständig durch eine Antibiotika-Resistenzkassette ersetzt, die aus dem entsprechenden Resistenzgen, *oriT* für die Konjugation in Streptomycceten, den FRT-Sites für die Entfernung der Kassette mittels Flip-Rekombinase sowie den Primer-Sites für die PCR-Amplifikation der Kassette besteht. Dieses System erlaubt die Inaktivierung einzelner Gene schnell und zuverlässig durchzuführen, insbesondere dann, wenn die Resistenzkassette im Genom des veränderten Stammes verbleiben kann und die Transkription der nachfolgenden Gene nicht beeinträchtigt.

Sollen mehrere Gene auf einem Cosmid inaktiviert werden, so treten einige Schwierigkeiten auf:

- wird die Resistenzkassette, die bei der ersten Geninaktivierung eingebracht wurde, später nicht entfernt, benötigt man für die zweite Inaktivierung ein anderes Resistenzgen als Marker
- bei Einbringen einer zweiten Resistenzkassette mit *oriT* in das Cosmid würde es auch zu unerwünschten Rekombinationen zwischen dem bereits vorhandenen und dem neu eingeführten *oriT* kommen
- wird die Resistenzkassette mit Hilfe der Flip-Rekombinase unter Ausnutzung der FRT-Sites entfernt, so ist im Cosmid kein *oriT* mehr vorhanden und das Cosmid muß über Protoplastentransformation anstatt über Konjugation in den Streptomycceten eingebracht werden
- wird die Resistenzkassette mit Hilfe der Flip-Rekombinase unter Ausnutzung der FRT-Sites entfernt, so kann ein zweites Gen nicht problemlos auf diese Weise inaktiviert und die Kassette über Flip-Rekombinase entfernt werden, da es dabei auch zu Rekombinationen mit der bereits im Cosmid enthaltenen FRT-Site kommen kann

Um das PCR-Targeting-System auch für derartige Anwendungen einsetzen zu können, sollte ein Vektor hergestellt werden, der eine veränderte Apramcin-Resistenzkassette ohne *oriT* enthält. Außerdem sollte die Möglichkeit zur Entfernung der Resistenzkassette über Restriktionsverdau und anschließende Ligation geschaffen werden, wobei für den Einbau der Schnittstellen zwei Enzyme gewählt wurden, deren Erkennungssequenzen in GC-reicher Streptomycceten-DNA extrem selten sind und die gleichzeitig kompatible Enden bilden, wodurch bei der nachfolgenden Ligation die entsprechenden Schnittstellen wieder aus dem Cosmid

IV Diskussion

1 Sequenzierung des Simocyclinon D8-Biosynthesegenclusters

Ein 33 kb großer Teilbereich des Simocyclinon D8-Biosynthesegencluster konnte in den hier beschriebenen Experimenten kloniert und sequenziert werden. Die Detektion einiger Gene mit Homologie zu den Biosynthesegenclustern der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Coumermycin A₁ (Steffensky et al., 2000b; Wang et al., 2000) sowie vieler Gene mit Sequenzähnlichkeiten zu den Biosynthesegenclustern der Angucyclinon-Antibiotika Landomycin und Urdamycin (Westrich et al., 1999; Decker and Haag, 1995) legte nahe, dass die identifizierte DNA-Sequenz tatsächlich zum Simocyclinon-Biosynthesegencluster gehörte. Der Beweis für diese Vermutung konnte anschließend durch die Inaktivierung von *simJ1* erbracht werden, was zu einer Unterbrechung der Transkriptionseinheit *simKLHIYJ1*, und dadurch zu einer vollständigen Unterbindung der Simocyclinon D8-Produktion führte. Durch Fütterung des ADHC-Ringes von Novobiocin (= Ring B) zu Kulturen dieser Mutante wurde erneut ein Simocyclinon der D-Reihe, d.h. eine Substanz, die den Aminocoumarin-Ring enthält, gebildet.

Für die meisten der identifizierten ORFs konnten Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Genen anderer Biosynthesegencluster festgestellt und potentielle Funktionen in der Biosynthese von Simocyclinon D8 abgeleitet werden. Dies erlaubte die Aufstellung eines hypothetischen Biosyntheschemas für Simocyclinon D8 (s. Abb. 18), obwohl nicht alle für die Biosynthese voraussichtlich benötigten Gene in dem hier beschriebenen Sequenzbereich enthalten waren. Das Angucyclinon-Ringsystem entsteht vermutlich aus 10 Acetateinheiten mit Hilfe einer Typ II PKS und wird anschließend mit dem in fünf Reaktionsschritten gebildeten Deoxyzucker Olivose verknüpft. Die Octatetraendicarbonsäure könnte von einer PKS vom Typ I gebildet und an den Deoxyzucker angehängt werden. Die Acetylierung des Deoxyzuckers erfolgt vermutlich durch die Acetyltransferase Sim21. Ob dieser Reaktionsschritt wie im Schema dargestellt vor der Verknüpfung der Zuckerkomponente mit der Octatetraendicarbonsäure stattfindet oder auf einer späteren Biosynthesestufe, kann nicht vorhergesagt werden. In einem letzten Schritt wird die Octatetraendicarbonsäure durch die Amidsynthetase SimL mit dem Aminocoumarin-Ring verknüpft.

Durch die Klonierung und Sequenzierung des Biosynthesegenclusters von Simocyclinon D8 wurde neben den Clustern von Novobiocin, Clorobiocin (Pojer et al., 2002) und Coumermycin A₁ die insgesamt vierte Sequenz eines Aminocoumarin-Biosynthesegenclusters verfügbar. Die Nutzung dieser Sequenzdaten könnte eine Grundlage für die Produktion neuer Hybridantibiotika durch kombinatorische Biosynthese darstellen.

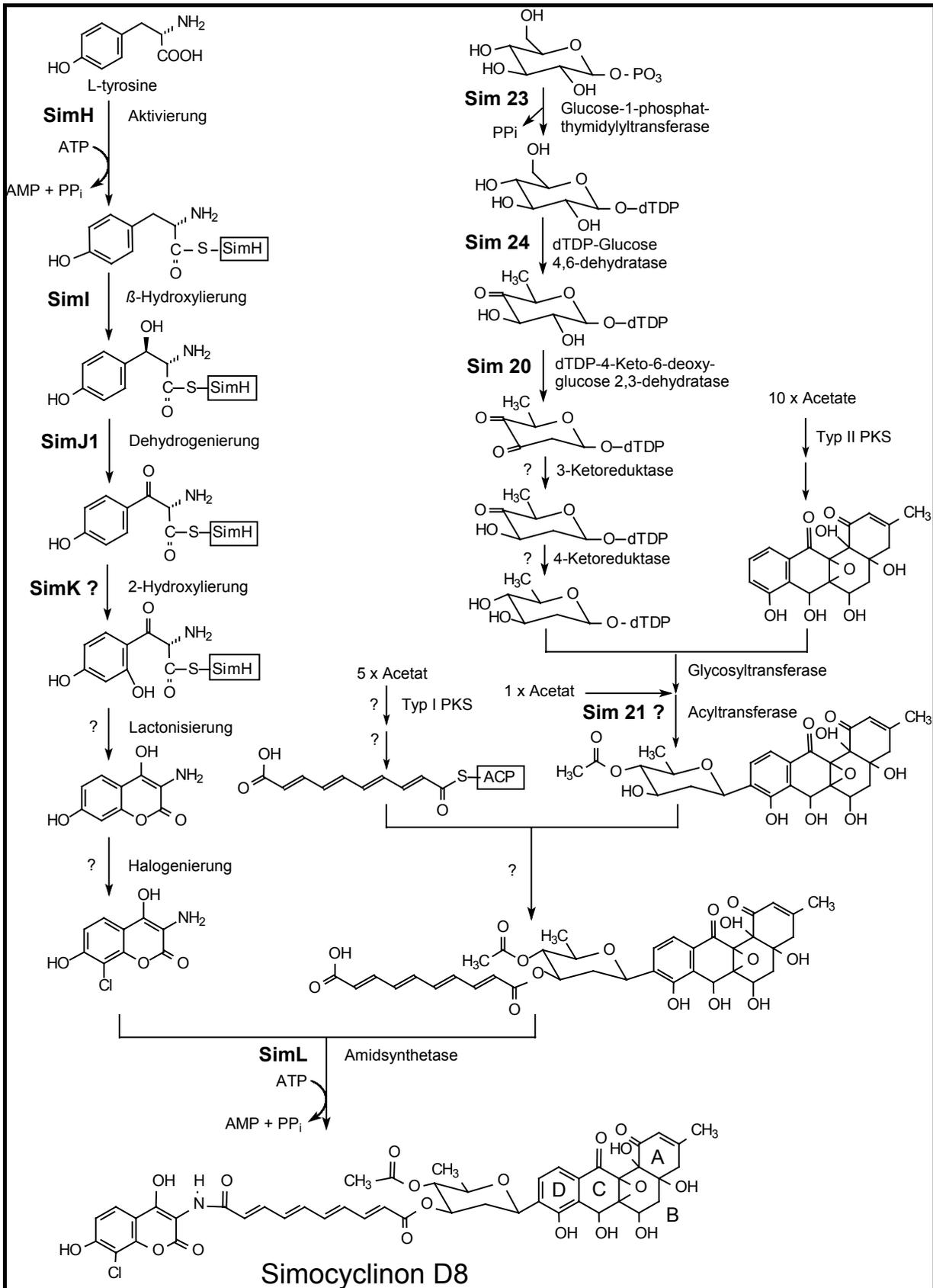


Abb. 18: Hypothetisches Biosyntheschema von Simocyclin D8

1.1 Biosynthesegene der Aminocoumarin-Einheit

Die 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin (ADHC)-Einheit ist in den Strukturformeln von Simocyclinon, Rubradirin (Hoeksema et al., 1979) sowie in Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin enthalten. Biosynthetisch entsteht sie aus Tyrosin (Kominek and Sebek, 1974; Bunton et al., 1963; Li et al., 1998; Holzenkämpfer et al., 2002), aber der genaue Mechanismus ihrer Bildung ist noch umstritten. Erste Fütterungsexperimente von Bunton et al. (Bunton et al., 1963) deuteten darauf hin, dass der Ringsauerstoff der ADHC-Einheit eher aus der Carboxylgruppe von Tyrosin stammen könnte als aus molekularem Sauerstoff. Diese Vermutung wurde jedoch kürzlich durch Untersuchungen von Holzenkämpfer und Zeeck widerlegt. Sie konnten zeigen, dass der Ringsauerstoff der ADHC-Komponente von Simocyclinon tatsächlich aus molekularem Sauerstoff stammt (Holzenkämpfer and Zeeck, 2002). Daher erfolgt die Bildung des Coumarin-Ringes wahrscheinlich, ähnlich wie in Pflanzen, über die 2-Hydroxylierung eines Tyrosin-Derivates und anschließende Lactonisierung. Die Rolle von NovH und NovI in der Novobiocin-Biosynthese konnte von Chen und Walsh auf biochemischer Ebene aufgeklärt werden (Chen and Walsh, 2001). NovH aktiviert L-Tyrosin durch covalente Bindung an einen 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktor und das Cytochrom P₄₅₀-Enzym NovI hydroxyliert anschließend die Seitenkette des aktivierten Tyrosins zu 3R,2S-3-Hydroxytyrosyl-S-NovH. Zu den dann folgenden Oxidations- und Zyklisierungs-Reaktionen, die zur Bildung des Aminocoumarin-Ringes führen, sind bisher keine experimentellen Daten veröffentlicht worden.

Die Feststellung, dass das Simocyclinon-Biosynthesegencluster Gene enthält, die zu *novH*, *novI*, *novJ*, *novK* und *couY* homolog sind, ließ vermuten, dass genau diese Gene an der Aminocoumarin-Biosynthese beteiligt sind.

1.1.1 Aktivierung von Tyrosin durch *simH*

Der C-terminale Anteil von SimH hat sehr starke Ähnlichkeit mit NovH und katalysiert daher wahrscheinlich die gleiche Reaktion in der Aminocoumyrin-Biosynthese wie NovH. In der entsprechenden Aminosäuresequenz konnten die von Marahiel et al. beschriebenen, für nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) typischen konservierten Motive nachgewiesen werden. Auch die 4-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle, die für die covalente Bindung der Aminosäure als Thioester verantwortlich ist, konnte identifiziert werden. Auf N-terminaler Seite ist SimH jedoch 400 Aminosäuren länger als NovH. Ein Teil dieser Region zeigt Homologie zu einer Condensationsdomäne, die in NovH nicht vorhanden ist. Das konservierte Motif HHxxxDG, das von Stachelhaus et al. als aktives Zentrum der Condensationsdomäne beschrieben wurde (Stachelhaus et al., 1998), fehlt jedoch. Für die Funktion von SimH und NovH ist keine Condensationsdomäne erforderlich.

Die 400 zusätzlichen Aminosäuren von SimH könnten daher auf dessen evolutionäre Abstammung von Peptidsynthetasen hinweisen und tragen vermutlich nicht zu dessen Funktion in der Simocyclinon-Biosynthese bei.

1.1.2 Das Cytochrom P₄₅₀-Enzym *simI*

Stromabwärts konnte im direkten Anschluß and *simH* das Gen *simI* identifiziert werden, das Ähnlichkeit mit Cytochrom P₄₅₀-codierenden Genen hat. Eine ähnliche Kombination eines Genes, das homolog zu Peptidsynthetasen ist, mit einem Gen, das für ein Cytochrom P₄₅₀-Enzym codiert, konnte auch in den Biosyntheseengclustern von Novobiocin (*novH* / *novI*; (Steffensky et al., 2000b), Chloroeremomycin (ORF 19 / ORF 20; (van Wageningen et al., 1998) und Nikkomycin (*nikP1* / *nikQ*; (Lauer et al., 2000) gefunden werden. In all diesen Fällen wird angenommen, dass das Cytochrom P₄₅₀-Enzym für die β -Hydroxylierung einer aktivierten Aminosäure zuständig ist (Chen et al., 2001), was für NovH und NovI auch experimentell bewiesen wurde. Daher ist anzunehmen, dass auch SimH und SimI die Aktivierung und β -Hydroxylierung von Tyrosin wie in Abb. 18 dargestellt katalysieren.

1.1.3 *simJ1* ist für die Aminocoumarin-Biosynthese essentiell

Die Funktionen von *novJ* und *novK* in der Novobiocin-Biosynthese bzw. von den homologen Genen *couJ* und *couK* der Coumermycin-Biosynthese konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Aus Abb. 18 ist ersichtlich, dass im Verlauf der Aminocoumarin-Biosynthese vermutlich die Oxidation eines β -Hydroxytyrosyl-Intermediates zu einem β -Ketotyrosyl-Intermediat auftritt. SimJ1 weist Sequenzähnlichkeit zu 3-Oxoacyl-[ACP]-reduktasen auf und könnte sehr wahrscheinlich an diesem Oxidationsschritt beteiligt sein. Die Inaktivierung von *simJ1* in den hier dargestellten Untersuchungen lieferte den ersten experimentellen Beweis dafür, dass dieses Gen für die Aminocoumarin-Biosynthese essentiell ist. Offensichtlich konnte *simJ2* die Funktion des inaktivierten Genes *simJ1* nicht übernehmen. Die Sequenzähnlichkeiten von *simJ2* zu Datenbankeinträgen legen nahe, dass das entsprechende Genprodukt eine Aufgabe in der Polyketid-Biosynthese hat.

Es ist unwahrscheinlich, dass dieses Ergebnis auf polaren Effekten beruht, da der intergenische Bereich zwischen *simJ1* und *sim1* 170 bp groß ist, derjenige zwischen *sim1* und *simJ2* 322 bp. Vermutlich besitzen *sim1* und *simJ2* eigene Promotoren und werden separat transkribiert, die charakteristischen -10- und -35-Regionen konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Demgegenüber liegen zwischen den

Genen *simK*, *simL*, *simH*, *simI*, *simY* und *simJ1* jeweils nur 10 bis 36 bp. Dies spricht dafür, dass *simKLHIYJ1* eine Transkriptionseinheit darstellen.

Die Fütterungsexperimente mit der *simJ1* Single Crossover-Mutante wurden nicht mit der natürlichen 8-Chlor-ADHC-Einheit von Simocyclinon D8 sondern mit der aus Novobiocin stammenden 8-Methyl-ADHC-Einheit durchgeführt. Da beide Aminocoumarin-Einheiten strukturell sehr ähnlich sind, überraschte es nicht, dass der 8-Methyl-ADHC-Ring von der Amidsynthetase SimL (s. unten) als Substrat akzeptiert und in ein neues, mutasynthetisch hergestelltes Simocyclinon der D-Reihe integriert wurde. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen konnte bestätigt werden, dass dieses neue Produkt, Simocyclinon D_{met}, eine Methylgruppe anstelle eines Chlor-Atomes enthielt.

1.1.4 *simK*, eine Oxidoreduktase?

Auch *simK* sowie die homologen Gene *novK* und *couK* wiesen Sequenzähnlichkeiten zu Oxidoreduktase-Genen auf, die Ähnlichkeit war jedoch nicht sehr hoch (durchschnittlich 34%). Die Funktion von *simK* ist derzeit nicht bekannt. Ein essentieller Schritt in der postulierten Reaktionsfolge der Aminocoumarin-Biosynthese ist die 2-Hydroxylierung des aktivierten Tyrosyl-Derivates (s. Abb. 18). Das Enzym, das für diesen Reaktionsschritt verantwortlich ist, wurde bisher nicht identifiziert. Aufgrund der Sequenzdaten des Novobiocin-Biosynthesegenclusters schlugen Chen und Walsh vor, dass die mutmaßliche Flavindioxygenase NovC diese Reaktion katalysieren könnte. Für diese Hypothese konnten jedoch bis heute keine experimentellen Beweise erbracht werden. Im Simocyclinon-Cluster wurde kein zu *novC* homologes Gen gefunden. Ebenso wenig konnte ein *novC*-Homolog im bzw. in der Nähe des Coumermycin A₁-Clusters detektiert werden (Wang et al., 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass *novC* nicht in die Aminocoumarin-Biosynthese involviert ist. Welches Gen für die 2-Hydroxylierung des β -Ketotyrosyl-Intermediates der Aminocoumarin-Bildung verantwortlich ist, muß noch gezeigt werden.

Die Lactonisierung des mutmaßlichen 2-hydroxylierten Tyrosyl-Derivates hätte direkt die Bildung des Aminocoumarin-Ringes zur Folge. Diese Zyklisierungs-Reaktion könnte durch eine Thioesterase katalysiert werden, wie es in der Biosynthese vieler Polyketid- und Peptid-Antibiotika der Fall ist, sie könnte aber auch spontan ablaufen.

Simocyclinon D8 enthält ein Chlor-Atom an Position 8 des Aminocoumyrin-Ringes. Ein Gen, das für die Halogenierung verantwortlich sein könnte, wurde in diesem Teil des Clusters nicht identifiziert. Wie bereits erwähnt untersuchte die Arbeitsgruppe von Prof. A. Bechthold auch den Sequenzbereich stromaufwärts von *sim2* und konnte dort ein putatives Halogenasegen detektieren (Trefzer et al., 2002). Auf

welcher Stufe der Biosynthese die Halogenierung der Aminocoumarin-Einheit erfolgt, ist jedoch unklar.

1.1.5 Die Amidsynthetase *simL*

Das Gen *simL* zeigte hohe Homologie zu *novL* aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster. NovL aktiviert eine aromatische Carbonsäure durch Bildung eines Adenylates und überträgt sie anschließend unter Bildung einer Amidbindung auf die 3-Aminogruppe des ADHC-Ringes (Steffensky et al., 2000a). Anders als bei dem Reaktionsmechanismus nichtribosomaler Peptidsynthetasen ist die Acylkomponente hier nicht an einen 4-Phosphopantetheinyl-Cofaktor gebunden. Wie NovL so weist auch SimL ein konserviertes ATP-Bindungsmotiv auf, aber keine 4-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Annahme ableiten, dass SimL in einem ähnlichen Reaktionsmechanismus wie NovL die Amidbindung zwischen der ADHC- und der Octatetraendicarbonsäure-Einheit von Simocyclinon bildet (s. Abb. 18).

1.1.6 *simY*

Der kleine ORF *simY* (70 Aminosäuren), der direkt stromabwärts von *simHI* liegt, zeigte Sequenzähnlichkeit mit *couY*, welches im Coumermycin-Cluster direkt stromabwärts von *couHI* zu finden ist (s. Abb. 4). Für SimY und CouY wurden bei Datenbankrecherchen Homologien zu dem putativen Protein MbtH von *Mycobacterium tuberculosis* gefunden. ORFs mit ähnlichen Sequenzen wurden auch in den Biosynthesegenclustern der Glycopeptidantibiotika Complestatin (Chiu et al., 2001), Chloroeremomycin (van Wageningen et al., 1998) und Balhimycin (Pelzer et al., 1999) gefunden, aber ihre Funktion ist bisher unbekannt. Außerdem weist SimY Ähnlichkeit mit dem N-terminalen Ende von NikP1 aus dem Nikkomycin-Biosynthesegencluster auf.

2 Produktion neuer Aminocoumarin-Antibiotika mittels Mutasynthese

2.1 Substratspezifität der drei Amidsynthetasen

Die sehr potenten DNA-Gyraseinhibitoren Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A₁ enthalten Amidbindungen, die unter Katalyse der Genprodukte von *cloL*, *novL* und *couL* gebildet werden. Die Amidsynthetasen CloL, NovL und CouL weisen eine Identität von 80-86% auf Aminosäureebene auf (s. Abb. 19). Dennoch sind sie in ihrer Substratspezifität sehr verschieden. 22 3,4-disubstituierte Benzoesäure-Derivate wurden als potentielle Substrate untersucht und insgesamt 15 wurden

entweder von CloL, NovL oder CouL zur Bildung von Amidbindungen mit der für diese Substanzgruppe charakteristischen Aminocoumarin-Einheit akzeptiert. Beim Sequenzvergleich der drei Amidsynthetasen fiel auf, dass diese sich nur im Bereich von Aminosäure 200 bis 210 deutlich voneinander unterscheiden (s. Abb. 19). Das lässt vermuten, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Substratspezifität der resultierenden Enzyme spielen. CouL wies die breiteste Substratspezifität auf und akzeptierte neben verschiedenen synthetischen Ring A-Analoga auch unterschiedliche Pyrrole (Schmutz et al., 2003b), darunter das natürliche Substrat des Enzymes, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure. CloL akzeptierte 14 und damit die meisten der Testsubstanzen. Daher wurde der Clorobiocin-Produzent für die weiteren Versuche verwendet.

NOVL.AMI	1	10	20	30	40	50	
CLOL.AMI	1	10	20	30	40	50	
COUL.AMI	1	10	20	30	40	50	
		60	70	80	90	100	
NOVL.AMI	51	100	100	100	100	100	
CLOL.AMI	51	100	100	100	100	100	
COUL.AMI	51	100	100	100	100	100	
		110	120	130	140	150	
NOVL.AMI	101	150	150	150	150	150	
CLOL.AMI	101	150	150	150	150	150	
COUL.AMI	101	150	150	150	150	150	
		160	170	180	190	200	
NOVL.AMI	151	200	200	200	200	200	
CLOL.AMI	151	200	200	200	200	200	
COUL.AMI	151	200	200	200	200	200	
		210	220	230	240	250	
NOVL.AMI	201	250	250	250	250	250	
CLOL.AMI	201	250	250	250	250	250	
COUL.AMI	201	250	250	250	250	250	
		260	270	280	290	300	
NOVL.AMI	251	300	300	300	300	300	
CLOL.AMI	251	300	300	300	300	300	
COUL.AMI	251	300	300	300	300	300	
		310	320	330	340	350	
NOVL.AMI	301	350	350	350	350	350	
CLOL.AMI	301	350	350	350	350	350	
COUL.AMI	301	350	350	350	350	350	
		360	370	380	390	400	
NOVL.AMI	351	400	400	400	400	400	
CLOL.AMI	351	400	400	400	400	400	
COUL.AMI	351	400	400	400	400	400	
		410	420	430	440	450	
NOVL.AMI	401	450	450	450	450	450	
CLOL.AMI	401	450	450	450	450	450	
COUL.AMI	401	450	450	450	450	450	
		460	470	480	490	500	
NOVL.AMI	451	500	500	500	500	500	
CLOL.AMI	451	500	500	500	500	500	
COUL.AMI	451	500	500	500	500	500	
		510	520	530	540	550	
NOVL.AMI	501	550	550	550	550	550	
CLOL.AMI	501	550	550	550	550	550	
COUL.AMI	501	550	550	550	550	550	

Abb. 19: Homologievergleich der drei Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL auf Aminosäureebene. Die Sequenzbereiche, die eventuell für die Substratspezifität verantwortlich sein könnten, sind umrahmt.

2.2 Fütterungsexperimente und ihr Erfolg

Die Fütterung der synthetischen Ring A-Analoga, die *in vitro* bereits von CloL akzeptiert worden waren, an die *cloQ*⁻ Mutante des Clorobiocin-Produzenten *S. roseochromogenes* resultierte in der Bildung von 32 neuen Aminocoumarin-Derivaten. Die Strukturen dieser Substanzen wurden durch FAB-MS-Spektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert. Außerdem wurden drei weitere Substanzen isoliert, die Vanillinsäure als Acylkomponente trugen und das Substitutionsmuster

von Clorobiocin, Isoclorobiocin und Desclorobiocin aufwiesen. Diese Substanzen konnten auch aus der ungefütterten *cloQ⁻* - Mutante isoliert werden. Die große Anzahl neuer Substanzen, die aus diesen Experimenten gewonnen wurden, demonstriert den hohen Stellenwert, den mutasynthetische Methoden für die Entwicklung neuer Antibiotika der Aminocoumarin-Gruppe haben.

2.3 **Bioaktivität der neuen Novclobiocine**

Das Ziel dieser Arbeiten war es, den Beitrag verschiedener struktureller Elemente zur antimikrobiellen und DNA-gyraseinhibitorischen Aktivität von Clorobiocin und verwandten Substanzen zu untersuchen. 30 neue Clorobiocin-Derivate aus den vorangegangenen Mutasynthese-Experimenten wurde auf ihre Bioaktivität hin untersucht. Für die meisten dieser Substanzen wurden MIC-Werte gegenüber einer Auswahl an klinisch relevanten bakteriellen Teststämmen bestimmt und es wurde versucht, eine Beziehung zwischen den MIC-Werten für einen bestimmten Stamm und der *in vitro*-Aktivität eines Aminocoumarins gegenüber *E. coli* DNA-Gyrase herzustellen.

Trotz der Unterschiede in ihrer Benzoesäure-Einheit zeigte die Clorobiocin-Familie der Novclobiocine (d.h. Novclobiocine mit dem gleichen R₂, R₃, R₄, R₅-Substitutionsmuster wie Clorobiocin) sowohl die höchsten antimikrobiellen als auch die höchsten gyraseinhibitorischen Aktivitäten. Im DNA-Gyrase Supercoiling-Assay war Clorobiocin nahezu vierfach stärker aktiv als Novobiocin. Die höchsten DNA-gyraseinhibitorischen Aktivitäten konnten für Novclobiocine ermittelt werden, die einen Alkyl- (Methyl-, 3-*n*-Propyl-, Dimethylallyl-, Allyl-), Ehyloxyethyl-, Chloro-, Bromo- oder Amido- (Isobutyrylamino-, Dimethylpropylamino-, Caprylamino-) Substituenten an C-3 der Benzoyl-Gruppe trugen, während ein Methoxy-Substituent an dieser Position (Novclobiocin 311) weniger effektiv war. Diese Ergebnisse stimmen mit einem früheren Bericht von Hooper et al. (Hooper et al., 1982) überein, der für Novobiocin-Derivate beobachtet hatte, dass ein Austausch des Wasserstoff-Atomes an C-3 des Benzoesäure-Substituenten gegen eine Alkyl-Gruppe in einer 10-fachen Steigerung der DNA-Gyrasehemmung resultierte. Novclobiocin 381, das eine 3-Methyl-4-aminobenzoesäure-Einheit enthält, hemmte die DNA-Gyrase etwa zweimal so stark wie Novobiocin.

In der Isoclorobiocin-Familie ist die 5-Methyl-1H-pyrrol-Gruppe von O-3'' auf O-2'' der L-Noviose-Einheit verschoben. Während sowohl für Isonovobiocin, das aus einer Verschiebung der Carbamoyl-Gruppe von 3''-O auf 2''-O der L-Noviose resultiert (Hinman et al., 1957), als auch für 2''-O-Carbamoylnovobiocin (Kuo et al., 1991; Gracheva, V and Severina, 1966) berichtet wurde, dass ihnen jegliche antibakterielle Aktivität fehlt, war die DNA-gyraseinhibitorische Aktivität der untersuchten Isoclorobiocin-Derivate verglichen mit den korrespondierenden Clorobiocinen

entweder unverändert (wie bei Novclobiocin 312) oder um weniger als eine Zehnerpotenz reduziert (wie bei Novclobiocin 212, 222, 252, 262, 272, 282 und 382). Nur Novclobiocin 232 war fast vollständig inaktiv.

Aminocoumarine, denen das Chlor-Atom an C-8 des ADHC-Ringes fehlt, waren schlechtere Inhibitoren der DNA-Gyrase als die entsprechenden chlorierten Substanzen (Novclobiocin 214 verglichen mit Novclobiocin 211, Novclobiocin 233 verglichen mit Novclobiocin 231, Novclobiocin 243 verglichen mit Novclobiocin 241, Novclobiocin 313 verglichen mit Novclobiocin 311, Novclobiocin 383 verglichen mit Novclobiocin 381, Novclobiocin 384 verglichen mit Novclobiocin 382). Die O-4''-Methyl-Gruppe von L-Noviose scheint ebenfalls wichtig für die DNA-gyraseinhibitorische Aktivität zu sein, da das Fehlen dieser Gruppe bei Novclobiocin 385 verglichen mit den Novclobiocinen 381, 382, 383 und 384 zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust führte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hooper et al. (Hooper et al., 1982) wies auch Novclobiocin 283, dem die 5-Methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure-Einheit fehlt, fast keine DNA-gyraseinhibitorische Aktivität auf.

Die Ergebnisse, die für die DNA-Gyrase-Hemmung durch Aminocoumarine erhalten wurden, stimmten mit den mikrobiologischen Ergebnissen überein, wobei höhere $IC_{50\text{nov}}/IC_{50\text{comp}}$ -Verhältnisse tendenziell mit tieferen MIC-Werten für einen bestimmten Stamm assoziiert waren. Während in den MIC-Untersuchungen alle Stämme mindestens genauso sensitiv, viele sogar deutlich sensitiver gegenüber Clorobiocin als gegenüber Novobiocin waren, war Clorobiocin in den Agar-Diffusions-Assays sehr viel weniger effektiv gegenüber *B. subtilis* ATCC 14893 als Novobiocin. Die Ursache für diese Diskrepanz ist nicht bekannt.

Novobiocin ist gegenüber den meisten Gram-negativen Bakterien nur geringfügig aktiv (Franklin, 1977), was für die beiden untersuchten Gram-negativen Wildtyp-Stämme *E. coli* UB1005 und *P. aeruginosa* K799/wt bestätigt werden konnte. Die fehlende Aktivität der Aminocoumarine gegenüber den meisten Gram-negativen Stämmen hat ihre Ursache vermutlich in der schlechten Penetration dieser Substanzen durch die äußere bakterielle Membran (El Falaha et al., 1983), und *in vitro*-Assays bestätigten, dass Novobiocin sowohl die DNA-Gyrase von *E. coli* (s. Tab. 24) als auch diejenige von *P. aeruginosa* (Miller and Scurlock, 1983) hemmt. *E. coli* DC2 ist eine Mutante von *E. coli* UB1005, deren Hypersensitivität gegenüber vielen Antibiotika strukturellen Veränderungen in den Lipopolysaccharid-Bestandteilen der äußeren Membran vermutet wird (Rocque et al., 1988). Die Hypersensitivität von *P. aeruginosa* K799/61 (auch kurz „Z61“ genannt), einer Mutante von *P. aeruginosa* K799/wt, gegenüber vielen Antibiotika wurde zunächst einer erhöhten Permeabilität der äußeren Zellmembran zugeschrieben (Angus et al., 1987), während Li et al. vorschlugen, dass ein verminderter Efflux ebenfalls zu der erhöhten Antibiotika-Sensitivität von *P. aeruginosa* K799/61 beitragen könnte (Li et

al., 1994). Die Wildtyp-Stämme von *E. coli* und *P. aeruginosa* waren hochgradig resistent gegenüber allen getesteten Aminocoumarinen. Im Gegensatz dazu wies *E. coli* DC2 stark reduzierte MIC-Werte gegenüber Novobiocin, Clorobiocin und Novclobiocin 211 und 221 auf, und bei *P. aeruginosa* K 799/61 waren die MIC-Werte gegenüber fast allen untersuchten Aminocoumarinen ebenfalls stark, manchmal sogar sehr stark reduziert.

Diese Ergebnisse demonstrieren die wichtige Rolle der Substituenten an der Benzoessäure-Einheit, des Chlor-Atomes an C-8 des ADHC-Ringes und der 5-Methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an O-3'' sowie der Methyl-Gruppe an O-4'' der L-Noviose für die antimikrobielle Aktivität und die Hemmung der *E. coli* DNA-Gyrase durch Clorobiocin und seine Derivate. Ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Aminocoumarinen könnte zur Identifizierung von Strukturen führen, die als erfolgversprechende Leitsubstanzen für die weitere Entwicklung antibakterieller Arzneistoffe verwendet werden können.

V Literatur

- Angus,B.L., Fyfe,J.A., and Hancock,R.E. (1987). Mapping and characterization of two mutations to antibiotic supersusceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 133 (Pt 10), 2905-2914.
- Ankenbauer,R.G., Staley,A.L., Rinehart,K.L., and Cox,C.D. (1991). Mutasythesis of siderophore analogues by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88, 1878-1882.
- Bentley,S.D., Chater,K.F., Cerdeno-Tarraga,A.M., Challis,G.L., Thomson,N.R., James,K.D., Harris,D.E., Quail,M.A., Kieser,H., Harper,D., Bateman,A., Brown,S., Chandra,G., Chen,C.W., Collins,M., Cronin,A., Fraser,A., Goble,A., Hidalgo,J., Hornsby,T., Howarth,S., Huang,C.H., Kieser,T., Larke,L., Murphy,L., Oliver,K., O'Neil,S., Rabinowitsch,E., Rajandream,M.A., Rutherford,K., Rutter,S., Seeger,K., Saunders,D., Sharp,S., Squares,R., Squares,S., Taylor,K., Warren,T., Wietzorrek,A., Woodward,J., Barrell,B.G., Parkhill,J., and Hopwood,D.A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417, 141-147.
- Bibb,M.J., Findlay,P.R., and Johnson,M.W. (1984). The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. Gene 30, 157-166.
- Bierman,M., Logan,R., O'Brien,K., Seno,E.T., Rao,R.N., and Schoner,B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces spp.* Gene 116, 43-49.
- Birch,A.J., Holloway,R.W., and Rickards,R.W. (1962). Biosynthesis of noviose, a branched-chain monosaccharide. Biochim. Biophys. Acta 57, 148-5.
- Birch,A.J. and Hussain,S.F. (1969). Studies in relation to biosynthesis. 38. A preliminary study of fumagillin. J. Chem Soc. [Perkin 1] 11, 1473-1474.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brautaset,T., Sekurova,O.N., Sletta,H., Ellingsen,T.E., StrLm,A.R., Valla,S., and Zotchev,S.B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. Chem. Biol. 7, 395-403.
- Bunton,C.A., Kenner,G.W., Robinson,M.J.T., and Webster,B.R. (1963). Experiments related to the biosynthesis of novobiocin and other coumarins. Tetrahedron 19, 1001-1010.
- Calvert,R.T., Spring,M.S., and Stoker,J.R. (1972). Investigations of the biosynthesis of novobiocin. J. Pharm. Pharmacol. 24, 972-978.

Chen,H., Thomas,M.G., O'Connor,S.E., Hubbard,B.K., Burkart,M.D., and Walsh,C.T. (2001). Aminoacyl-S-enzyme intermediates in *beta*-hydroxylations and *alpha,beta*-desaturations of amino acids in peptide antibiotics. *Biochemistry* 40, 11651-11659.

Chen,H. and Walsh,C.T. (2001). Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: β -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem. Biol.* 8, 301-312.

Chiu,H.T., Hubbard,B.K., Shah,A.N., Eide,J., Fredenburg,R.A., Walsh,C.T., and Khosla,C. (2001). Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8548-8553.

Contreras,A. and Maxwell,A. (1992). *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* 6, 1617-1624.

Crow,F.W., Duholke,W.K., Farley,K.A., Hadden,C.E., Hahn,D.A., Kaluzny,B.D., Mallory,C.S., Martin,G.E., Smith,R.F., and Thamann,T.J. (1999). Complete spectroscopic structural characterization of novobiocin, isonovobiocin, decarbamylnovobiocin, 2''-(O-Carbamyl)novobiocin, and novobiocin-2'',3''-carbonate. *J. Heterocycl. Chem.* 36, 365-370.

Cui,L., Ma,X., Sato,K., Okuma,K., Tenover,F.C., Mamizuka,E.M., Gemmell,C.G., Kim,M.N., Ploy,M.C., El Solh,N., Ferraz,V., and Hiramatsu,K. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5-14.

Decker,H. and Haag,S. (1995). Cloning and characterization of a polyketide synthase gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, which carries the genes for biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A and a gene probably involved in its oxygenation. *J. Bacteriol.* 177, 6126-6136.

del Castillo,I., Vizan,J.L., Rodriguez-Sainz,M.C., and Moreno,F. (1991). An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8860-8864.

Dessoy,M.A. (2003). Synthesis and Enzymatic Coupling of Prenyldiphosphates and Benzoates. PhD Thesis, Univ. Halle (Saale), Germany.

Dobreff,S. (1989). Neue Angulole. Angucyclinon-verwandte Antibiotika aus Streptomyceten: Strukturaufklärung und chemische Derivatisierung. Ph. D. Thesis, Univ. Göttingen, Germany.

Eady,E.A. and Cove,J.H. (2003). Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 103-124.

El Falaha,B.M., Russell,A.D., and Furr,J.R. (1983). Sensitivities of wild-type and envelope-defective strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Microbios* 38, 99-105.

- el Hachimi,Z., Samuel,O., and Azerad,R. (1974). Biochemical study on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* : I. Specificity of para-hydroxybenzoate: polyprenyltransferase. *Biochimie* 56, 1239-1247.
- Engel,H.W., Soedirman,N., Rost,J.A., van Leeuwen,W.J., and van Embden,J.D. (1980). Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistances between group A, B, and D streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 142, 407-413.
- Eustáquio,A.S., Gust,B., Luft,T., Li,S.-M., Chater,K.F., and Heide,L. (2003). Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces* : Identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chem. Biol.* 10, 279-288.
- Ferroud,D., Collard,J., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (1999). Synthesis and biological evaluation of coumarincarboxylic acids as inhibitors of gyrase B. L-rhamnose as an effective substitute for L-noviose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2881-2886.
- Franklin,T.J. (1977). Bacterial resistance to antibiotics. In *Pharmaceutical microbiology.*, W.B.Hugo and A.D.Russell, eds. (Oxford, U.K.: Blackwell Scientific Publications), pp. 137-154.
- Galm,U., Schimana,J., Fiedler,H.P., Schmidt,J., Li,S.-M., and Heide,L. (2002). Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Arch. Microbiol.* 178, 102-114.
- Gracheva,I., V and Severina,V.A. (1966). Production of inactive forms of novobiocin during the process of fermentation of *Act. spheroides*. *ANTIBIOTIKI* 11, 45-51.
- Gräfe,U. (1992). *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-New York.
- 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, 1541-1546.
- Hinman,J.W., Caron,E.L., and Hoeksema,H. (1957). Novobiocin. V. Carbamoyl migration and isonovobiocin. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5321-5322.
- Hiramatsu,K. (2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 1, 147-155.
- Hoeksema,H., Mizesak,S.A., and Baczynskyj,L. (1979). The chemistry of rubradirin. III. The rubradiric acids and the structure of rubradirin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 32, 773-776.
- Hoffmeister,D., Ichinose,K., Domann,S., Faust,B., Trefzer,A., Dräger,G., Kirschning,A., Fischer,C., Kunzel,E., Bearden,D., Rohr,J., and Bechthold,A. (2000). The NDP-sugar co-substrate concentration and the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. *Chem. Biol.* 7, 821-831.

Holzenkämpfer, M., Walker, M., Zeeck, A., Schimana, J., and Fiedler, H.P. (2002). Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 - II. Structure elucidation and biosynthesis. *Journal of Antibiotics* 55, 301-307.

Holzenkämpfer, M. and Zeeck, A. (2002). Biosynthesis of simocyclinone D8 in an 18O₂-rich atmosphere. *Journal of Antibiotics* 55, 341-342.

Hooper, D.C., Wolfson, J.S., McHugh, G.L., Winters, M.B., and Swartz, M.N. (1982). Effects of novobiocin, coumermycin A1, clorobiocin, and their analogs on *Escherichia coli* DNA gyrase and bacterial growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22, 662-671.

Hutchinson, C.R. (1998). Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 319-329.

Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21, 526-531.

Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I., Miller, G.B., Witcomb, M.A., Isaacson, M., Ward, J.I., and Austrian, R. (1978). Emergence of multiply resistant pneumococci. *N. Engl. J. Med.* 299, 735-740.

Jones, R.N. (1989). Should novobiocin be clinically re-evaluated? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 363-365.

Kampranis, S.C., Gormley, N.A., Tranter, R., Orphanides, G., and Maxwell, A. (1999). Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase. *Biochemistry* 38, 1967-1976.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. (Norwich: John Innes Foundation).

Kirby, W.M., Hudson, D.G., and Noyers, W.D. (1956). Clinical and laboratory studies of novobiocin, a new antibiotic. *Arch. Intern. Med.* 98, 1-7.

Kominek, L.A. and Meyer, H.F. (1975). Novobiocin acid synthetase. *Methods Enzymol.* 43, 502-508.

Kominek, L.A. and Sebek, O.K. (1974). Biosynthesis of novobiocin and related coumarin antibiotics. *Dev. Ind. Microbiol.* 15, 60-69.

Kuo, M.S., Yurek, D.A., Chirby, D.G., Cialdella, J.I., and Marshall, V.P. (1991). Microbial O-carbamylation of novobiocin. *J. Antibiot.* 44, 1096-1100.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lafitte, D., Lamour, V., Tsvetkov, P.O., Makarov, A.A., Klich, M., Deprez, P., Moras, D., Briand, C., and Gilli, R. (2002). DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* 41, 7217-7223.

- Lauer,B., Russwurm,R., and Bormann,C. (2000). Molecular characterization of two genes from *Streptomyces tendae* Tu901 required for the formation of the 4-formyl-4-imidazolin-2-one-containing nucleoside moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1698-1706.
- Laurin,P., Ferroud,D., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (1999a). Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2079-2084.
- Laurin,P., Ferroud,D., Schio,L., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (1999b). Structure-activity relationship in two series of aminoalkyl substituted coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 2875-2880.
- Lewis,R.J., Singh,O.M., Smith,C.V., Skarzynski,T., Maxwell,A., Wonacott,A.J., and Wigley,D.B. (1996a). The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **15**, 1412-1420.
- Lewis,R.J., Tsai,F.T.F., and Wigley,D.B. (1996b). Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays* **18**, 661-671.
- Li,S.-M., Hennig,S., and Heide,L. (1998). Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin via a non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2717-2720.
- Li,S.-M., Westrich,L., Schmidt,J., Kuhnt,C., and Heide,L. (2002). Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology* **148**, 3317-3326.
- Li,X.Z., Livermore,D.M., and Nikaido,H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1732-1741.
- Lombo,F., Siems,K., Brana,A.F., Mendez,C., Bindseil,K., and Salas,J.A. (1997). Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* **179**, 3354-3357.
- 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**, 61-68.
- Mancy, D., Ninet, L., and Preud'Homme, J. Antibiotic 18631 RP. (Rhone-Poulenc S.A.). 189,259[3,793,147]. 1974. U.S. 1974.
Ref Type: Patent
- Marchese,A., Schito,G.C., and Debbia,E.A. (2000). Evolution of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. *J. Chemother.* **12**, 459-462.
- Marcinak,J.F. and Frank,A.L. (2003). Treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**, 265-269.

Marcu, M.G., Schulte, T.W., and Neckers, L. (2000). Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 242-248.

Maxwell, A. (1993). The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**, 681-686.

Maxwell, A. (1997). DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5**, 102-109.

Maxwell, A. (1999). DNA gyrase as a drug target. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 48-53.

Maxwell, A. and Lawson, D.M. (2003). The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 283-303.

Méndez, C. and Salas, J.A. (2001). The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res. Microbiol.* **152**, 341-350.

Miller, R.V. and Scurlock, T.R. (1983). DNA gyrase (Topoisomerase II) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **110**, 694-700.

Miyata, S., Ohhata, N., Murai, H., Masui, Y., Ezaki, M., Takase, S., Nishikawa, M., Kiyoto, S., Okuhara, M., and Kohsaka, M. (1992). WS009 A and B, new endothelin receptor antagonists isolated from *Streptomyces* sp. no. 89009. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* **45**, 1029-1040.

Morbidoni, H.R., de Mendoza, D., and Cronan, J.E., Jr. (1996). *Bacillus subtilis* acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **178**, 4794-4800.

Musicki, B., Periers, A.M., Laurin, P., Ferroud, D., Benedetti, Y., Lachaud, S., Chatreaux, F., Haesslein, J.L., Iltis, A., Pierre, C., Khider, J., Tessot, N., Airault, M., Demassej, J., Dupuis-Hamelin, C., Lassaing, P., Bonnefoy, A., Vicat, P., and Klich, M. (2000). Improved antibacterial activities of coumarin antibiotics bearing 5',5'-dialkylnoviose: biological activity of RU79115. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1695-1699.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6, 6th edition, *NCCLS, Wayne, Pa.*

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., and Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12215-12220.

Otten, S.L., Ferguson, J., and Hutchinson, C.R. (1995). Regulation of daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by the *dnrR2* locus. *J. Bacteriol.* **177**, 1216-1224.

- Peixoto,C., Laurin,P., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (2000). Synthesis of isothiochroman 2,2-dioxide and 1,2-benzooxathiin 2,2-dioxide gyrase B inhibitors. *Tetrahedron Letters* **41**, 1741-1745.
- Pelzer,S., Sussmuth,R., Heckmann,D., Recktenwald,J., Huber,P., Jung,G., and Wohlleben,W. (1999). Identification and analysis of the balhimycin biosynthetic gene cluster and its use for manipulating glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1565-1573.
- Periers,A.M., Laurin,P., Ferroud,D., Haesslein,J.L., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (2000). Coumarin inhibitors of gyrase B with N-propargyloxy-carbamate as an effective pyrrole bioisostere. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 161-165.
- Perronne,C.M., Malinverni,R., and Glauser,M.P. (1987). Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats with coumermycin A1 and ciprofloxacin, alone or in combination. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 539-543.
- Pitlik,S. (2003). Old drugs for new bugs. *BMJ* **326**, 235-236.
- Pojer,F., Kahlich,R., Kammerer,B., Li,S.-M., and Heide,L. (2003a). CloR, a bifunctional non-heme iron oxygenase involved in clorobiocin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 30661-30668.
- Pojer,F., Li,S.-M., and Heide,L. (2002). Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**, 3901-3911.
- Pojer,F., Wemakor,E., Kammerer,B., Chen,H., Walsh,C.T., Li,S.-M., and Heide,L. (2003b). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2316-2321.
- Puder,C., Zeeck,A., and Beil,W. (2000). New biologically active rubiginones from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 329-336.
- Raad,I., Darouiche,R., Hachem,R., Sacilowski,M., and Bodey,G.P. (1995). Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2397-2400.
- Raad,I.I., Hachem,R.Y., Abi-Said,D., Rolston,K.V., Whimbey,E., Buzaid,A.C., and Legha,S. (1998). A prospective crossover randomized trial of novobiocin and rifampin prophylaxis for the prevention of intravascular catheter infections in cancer patients treated with interleukin-2. *Cancer* **82**, 403-411.
- Rappa,G., Lorico,A., and Sartorelli,A.C. (1992). Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Int. J. Cancer* **51**, 780-787.
- Rappa,G., Shyam,K., Lorico,A., Fodstad,O., and Sartorelli,A.C. (2000). Structure-activity studies of novobiocin analogs as modulators of the cytotoxicity of etoposide (VP-16). *Oncol. Res.* **12**, 113-119.

Reusser,F. and Dolak,L.A. (1986). Novenaminate is the active moiety in novobiocin. *J. Antibiot.* **39**, 272-274.

Rocque,W.J., Fesik,S.W., Haug,A., and McGroarty,E.J. (1988). Polycation binding to isolated lipopolysaccharide from antibiotic-hypersusceptible mutant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 308-313.

Sambrook,J. and Russell,D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sasaki,T., Igarashi,Y., Saito,N., and Furumai,T. (2001). TPU-0031-A and B, new antibiotics of the novobiocin group produced by *Streptomyces sp.* TP-A0556. *J. Antibiot.* **54**, 441-447.

Schimana,J., Fiedler,H.P., Groth,I., Süssmuth,R., Beil,W., Walker,M., and Zeeck,A. (2000). Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 779-787.

Schimana,J., Walker,M., Zeeck,A., and Fiedler,P. (2001). Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 144-148.

Schmutz,E., Mühlenweg,A., Li,S.-M., and Heide,L. (2003a). Resistance genes of aminocoumarin producers: Two type II topoisomerase genes confer resistance against coumermycin A1 and clorobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 869-877.

Schmutz,E., Steffensky,M., Schmidt,J., Porzel,A., Li,S.-M., and Heide,L. (2003b). An unusual amide synthetase (CouL) from the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4413-4419.

Shen,Z. and Byers,D.M. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* acyl carrier protein and the *fabG*, *acpP*, and *fabF* genes involved in fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**, 571-573.

Siebert,M., Bechthold,A., Melzer,M., May,U., Berger,U., Schroder,G., Schroder,J., Severin,K., and Heide,L. (1992). Ubiquinone biosynthesis. Cloning of the genes coding for chorismate pyruvate-lyase and 4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **307**, 347-350.

Siebert,M., Severin,K., and Heide,L. (1994). Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase. *Microbiology* **140 (Pt 4)**, 897-904.

Stachelhaus,T., Mootz,H.D., Bergendahl,V., and Marahiel,M.A. (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 22773-22781.

Steffensky,M., Li,S.M., and Heide,L. (2000a). Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. *J. Biol. Chem.* **275**, 21754-21760.

- Steffensky,M., Li,S.-M., Vogler,B., and Heide,L. (1998). Novobiocin biosynthesis in *Streptomyces spheroides*: identification of a dimethylallyl diphosphate:4-hydroxyphenylpyruvate dimethylallyl transferase. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 69-74.
- Steffensky,M., Muhlenweg,A., Wang,Z.X., Li,S.M., and Heide,L. (2000b). Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1214-1222.
- Theobald,U., Schimana,J., and Fiedler,H.P. (2000). Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 307-313.
- Thiara,A.S. and Cundliffe,E. (1988). Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.* 7, 2255-2259.
- Thiara,A.S. and Cundliffe,E. (1989). Interplay of novobiocin-resistant and -sensitive DNA gyrase activities in self-protection of the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Gene* 81, 65-72.
- Thiara,A.S. and Cundliffe,E. (1993). Expression and analysis of two gyrB genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* 8, 495-506.
- Trefzer,A., Pelzer,S., Schimana,J., Stöckert,S., Bihlmaier,C., Fiedler,H.P., Welzel,K., Vente,A., and Bechthold,A. (2002). Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1174-1182.
- Tsai,F.T., Singh,O.M., Skarzynski,T., Wonacott,A.J., Weston,S., Tucker,A., Pauptit,R.A., Breeze,A.L., Poyser,J.P., O'Brien,R., Ladbury,J.E., and Wigley,D.B. (1997). The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins* 28, 41-52.
- van Wageningen,A.M., Kirkpatrick,P.N., Williams,D.H., Harris,B.R., Kershaw,J.K., Lennard,N.J., Jones,M., Jones,S.J., and Solenberg,P.J. (1998). Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* 5, 155-162.
- von Döhren,H. and Gräfe,U. (1997). General aspects of secondary metabolism. In *Products of Secondary Metabolism*, H.Kleinkauf and H.v.Döhren, eds. VCH), pp. 1-55.
- Walsh,T.J., Standiford,H.C., Reboli,A.C., John,J.F., Mulligan,M.E., Ribner,B.S., Montgomerie,J.Z., Goetz,M.B., Mayhall,C.G., Rimland,D., and . (1993). Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1334-1342.
- Wang,Z.-X., Li,S.-M., and Heide,L. (2000). Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3040-3048.

Watve,M.G., Tickoo,R., Jog,M.M., and Bhole,B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch. Microbiol. 176, 386-390.

Westrich,L., Domann,S., Faust,B., Bedford,D., Hopwood,D.A., and Bechthold,A. (1999). Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 170, 381-387.

Westrich,L., Heide,L., and Li,S.-M. (2003). CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin. Chembiochem. 4, 768-773.

Xu,H., Kahlich,R., Kammerer,B., Heide,L., and Li,S.-M. (2003). CloN2, a novel acyltransferase involved in the attachment of the pyrrole-2-carboxyl moiety to the deoxysugar of clorobiocin. Microbiology 149, 2183-2191.

Yang,K., Han,L., and Vining,L.C. (1995). Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, *jadR2*. J. Bacteriol. 177, 6111-6117.

VI Anhang

1 Nomenklatur der Ring A-Analoga, Novclobiocinsäuren sowie Novclobiocine

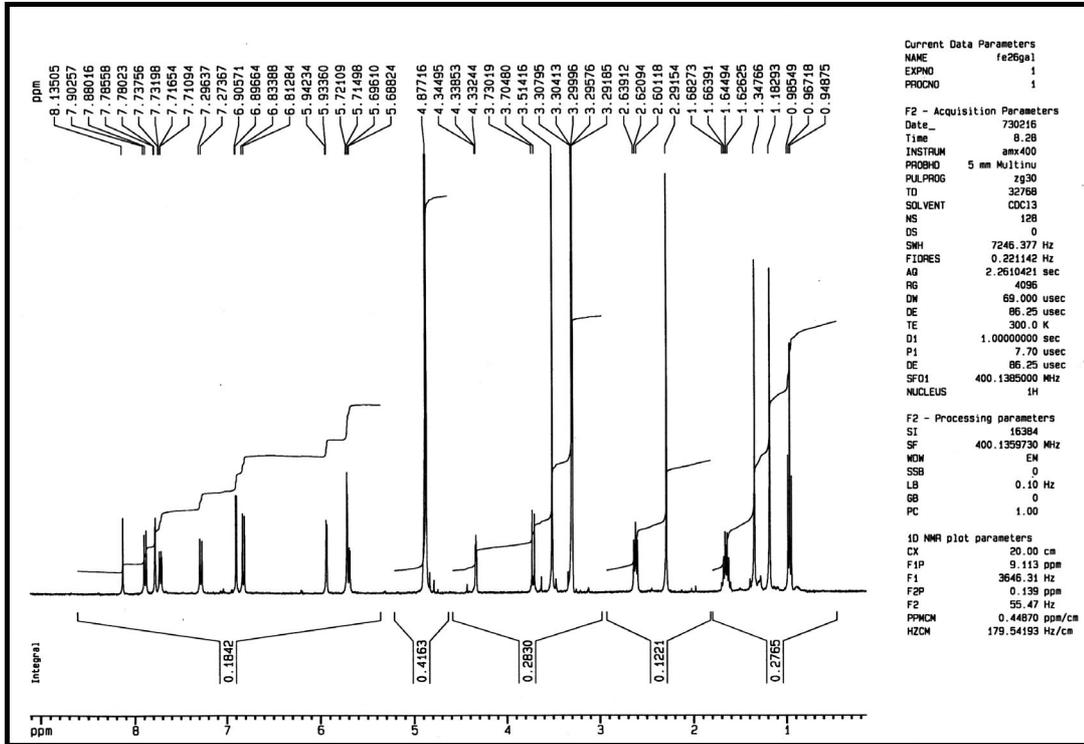
RAA		NCA		NC	
Ring A-Analogon		Novclobiocinsäure		Novclobiocin	
vorläufige Bezeichnung (Wessjohann)	offizielle Bezeichnung (Publikation)	vorläufige Bezeichnung	offizielle Bezeichnung (Publikation)	vorläufige Bezeichnung	offizielle Bezeichnung (Publikation)
3,5-Dimethyl-PHB	200	UG14	200		
XSG079	210	UG6 NCA215 NCA216	210 215 216	ABC211 ABC212 ABC213 ABC214	211 212 213 214
MAD610	220	UG4 NCA223 NCA224	220 223 224	ABC221 ABC222	221 222
MAD385	230	UG1	230	ABC231 ABC232 ABC233	231 232 233
MAD166	240	UG5	240	ABC241 ABC242 ABC243	241 242 243
MAD167b	250	UG7	250	ABC251 ABC252 ABC253	251 252 253
MAD177	260	UG8 NCA265	260 265	ABC261 ABC262	261 262
3-Chlor-PHB	270	UG10	270	ABC271 ABC272	271 272
MAD379	280	UG9	280	ABC281 ABC282 ABC283	281 282 283
3,5-Dibrom-PHB	290	UG15	290		
GBA	300		300		
Vanillinsäure	310			Vanillobiocin Isovanillo- biocin Declovanillo- biocin	311 312 313

RAA		NCA		NC	
Ring A-Analogon		Novclobiocinsäure		Novclobiocin	
vorläufige Bezeichnung (Wessjohann)	offizielle Bezeichnung (Publikation)	vorläufige Bezeichnung	offizielle Bezeichnung (Publikation)	vorläufige Bezeichnung	offizielle Bezeichnung (Publikation)
3-Methyl-4-Amino- benzoesäure	380	UG11	380	ABC381 ABC382 ABC383 ABC384 ABC385	381 382 383 384 385
4-Dimethylamino- benzoesäure	390	UG13	390		
3-Methyl-pyrrol- 2,4-dicarbonensäure	400		400		
3,5-Dimethyl- pyrrol-2,4- dicarbonensäure	410				
4-Methyl-pyrrol- 2,3-dicarbonensäure	420				
PHB	500	UG12	500		
3-Acetyl-PHB	510	UG16	510		
3-Cyclohexyl-PHB	520				
MAD384	530				
MAD175	540				
MAD103	550				
4-Amino- benzoesäure	560				
3,4-Diamino- benzoesäure	570				
3-Amino-4-methyl- benzoesäure	580				

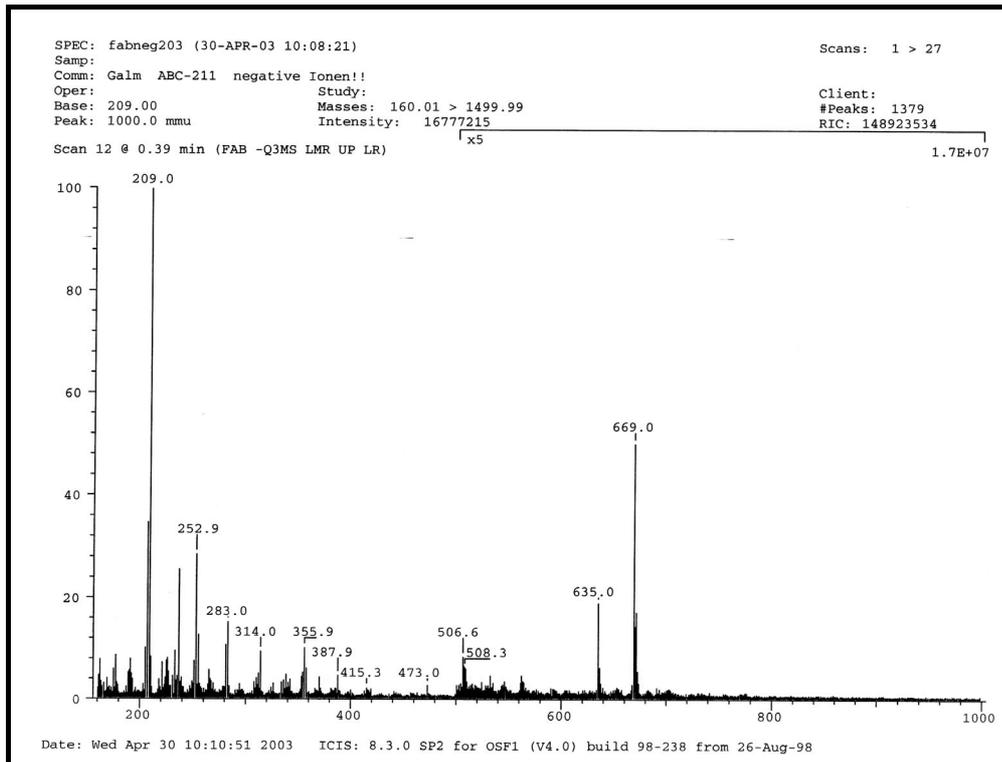
2 MS- und ¹H-NMR-Spektren der Novclobiocine

Novclobiocin 211

¹H-NMR-Spektrum

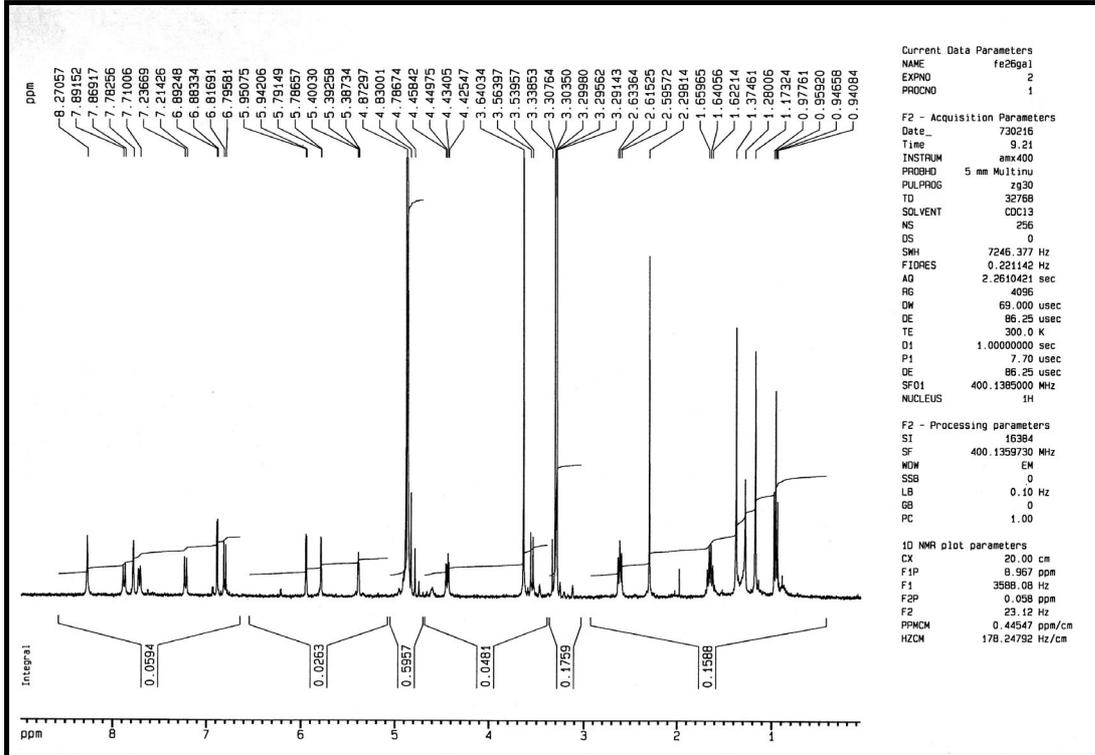


MS-Spektrum

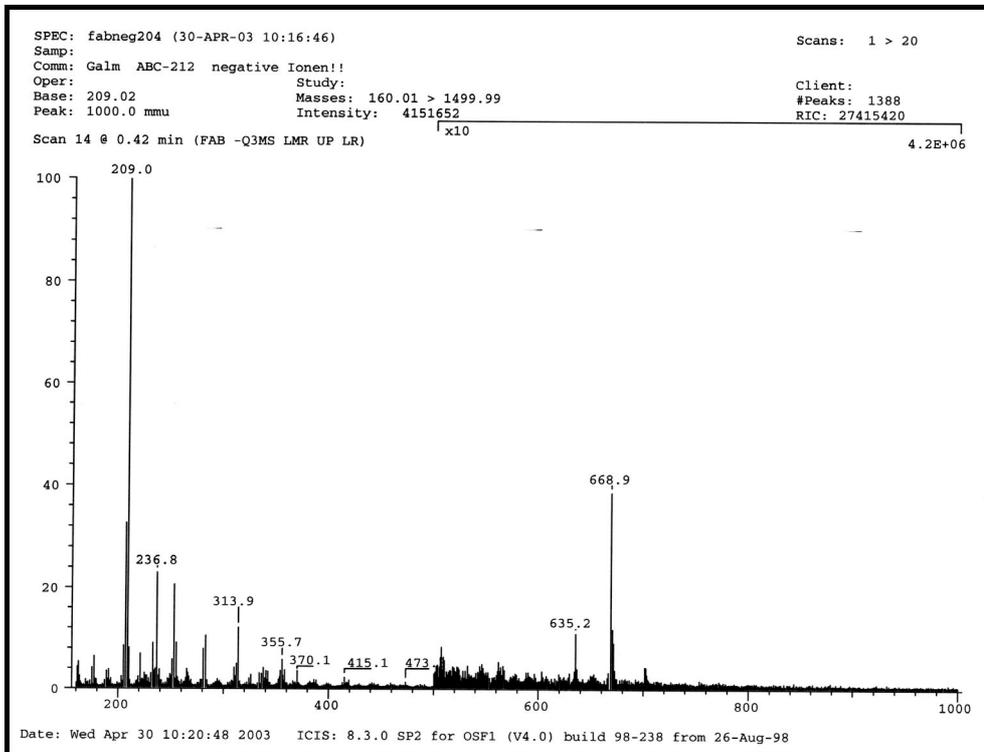


Novclobiocin 212

¹H-NMR-Spektrum

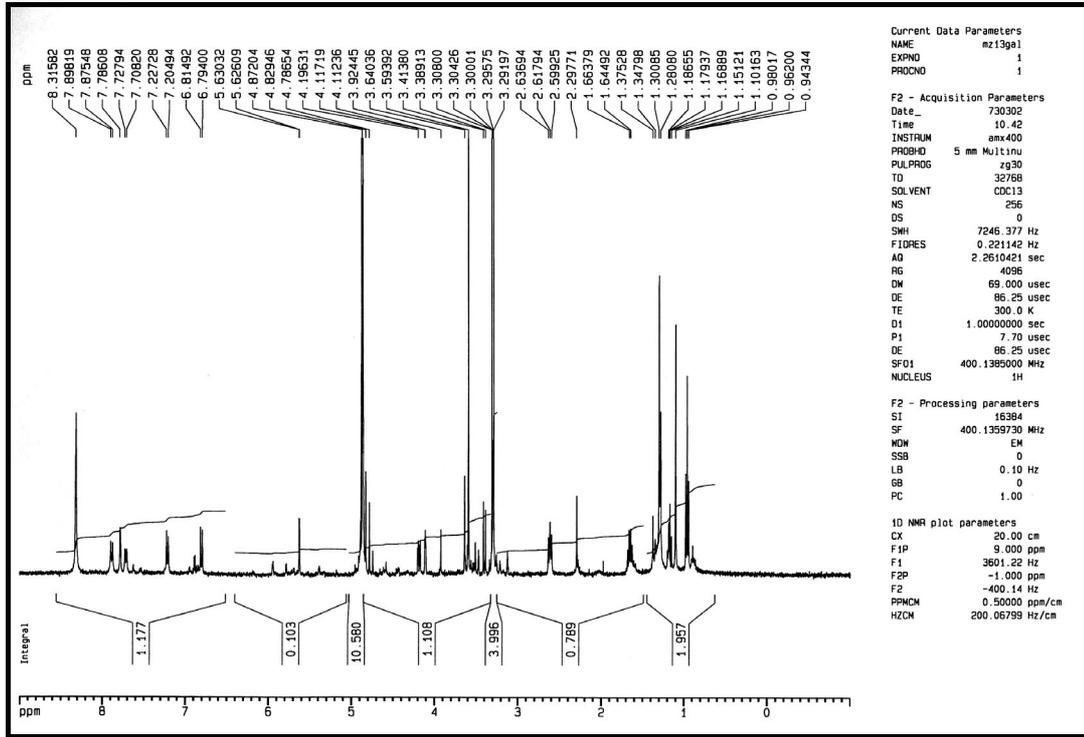


MS-Spektrum

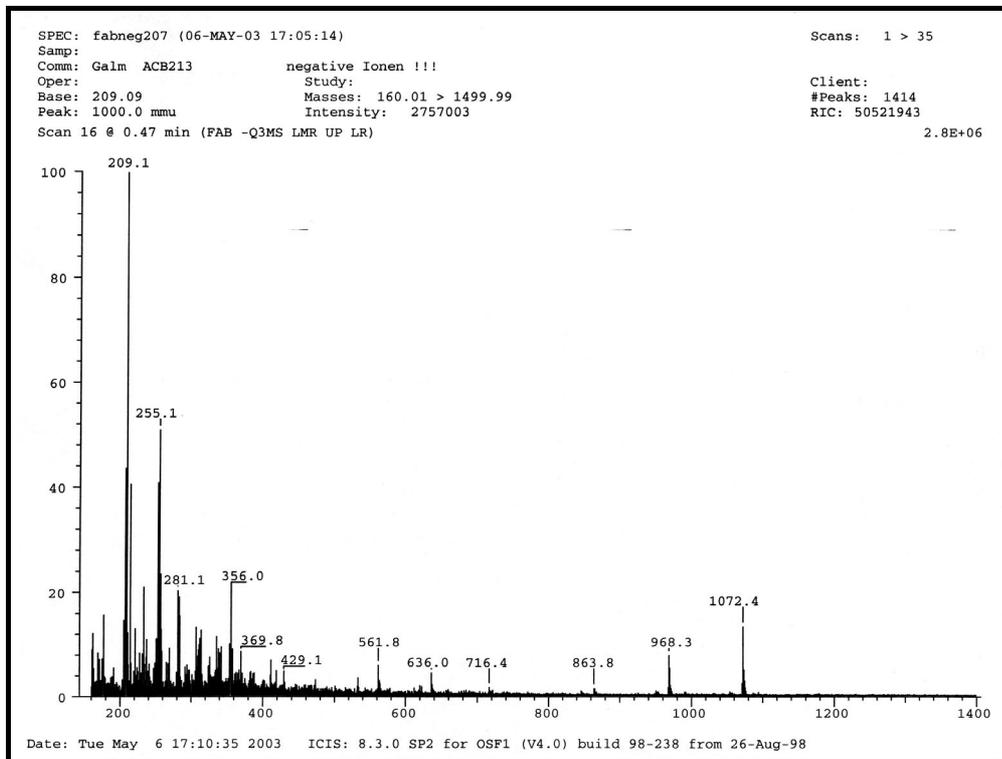


Novclobiocin 213

¹H-NMR-Spektrum

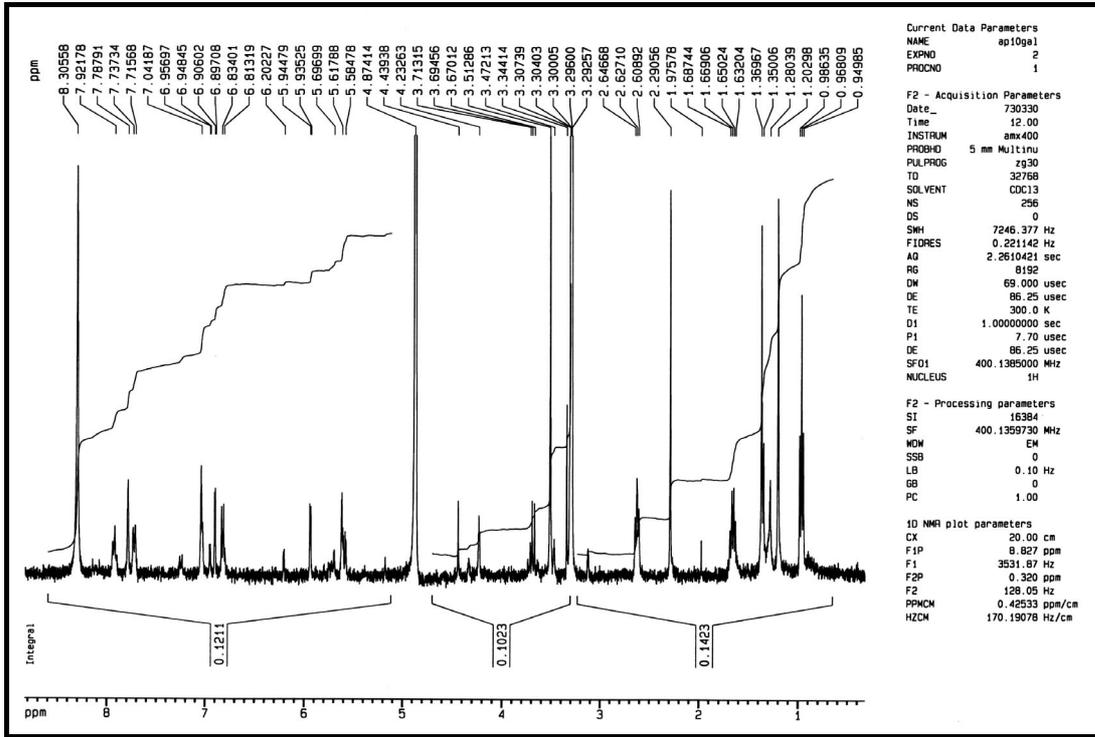


MS-Spektrum

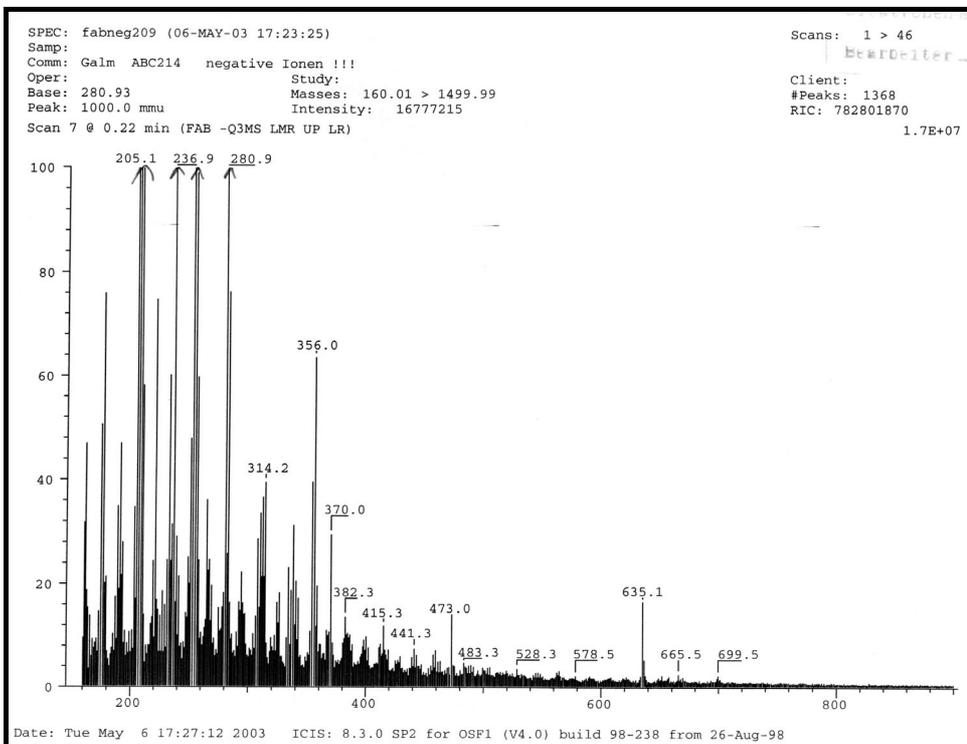


Novclobiocin 214

¹H-NMR-Spektrum

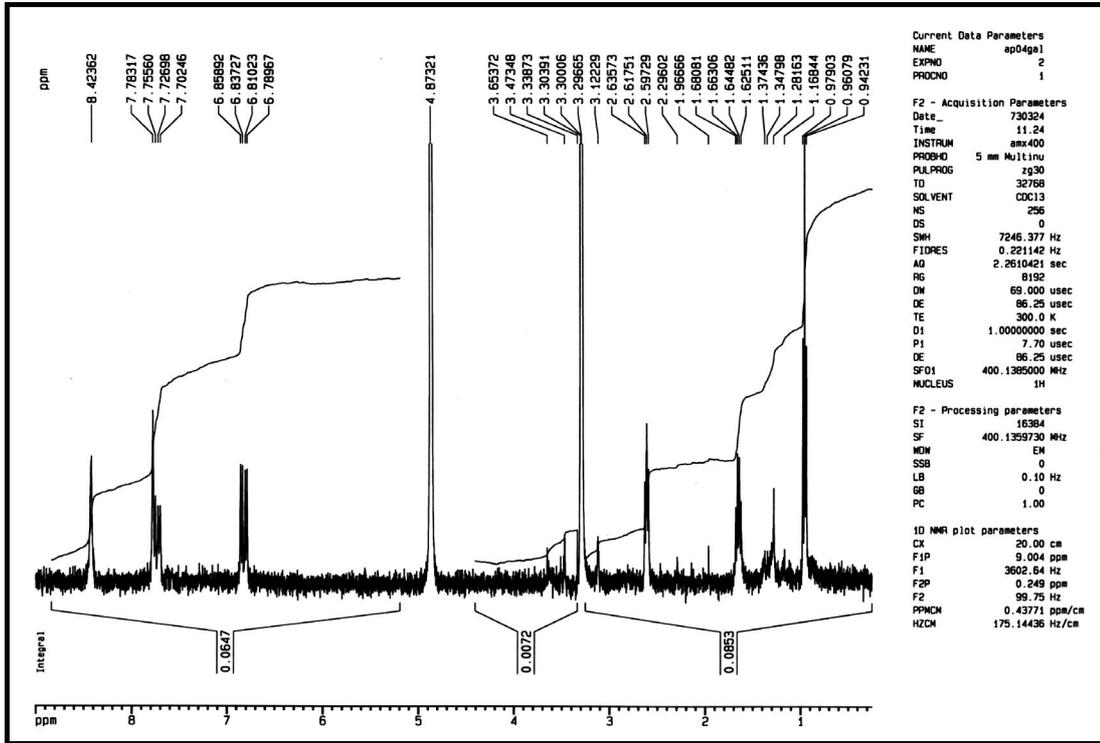


MS-Spektrum

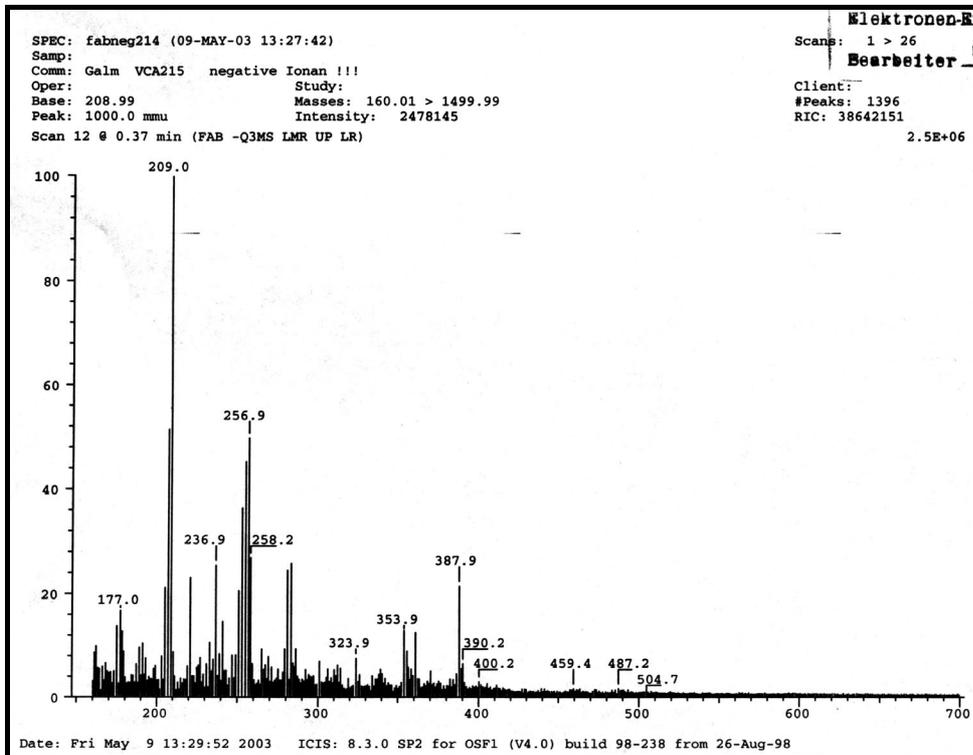


Novclobiocinsäure 215

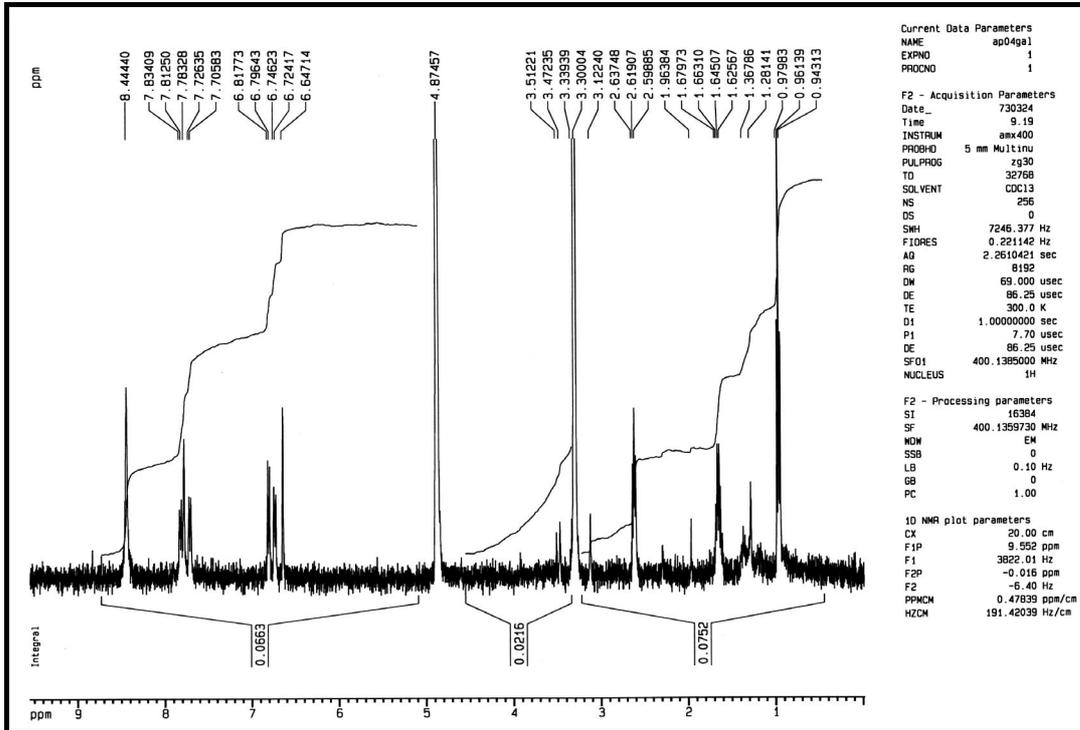
¹H-NMR-Spektrum



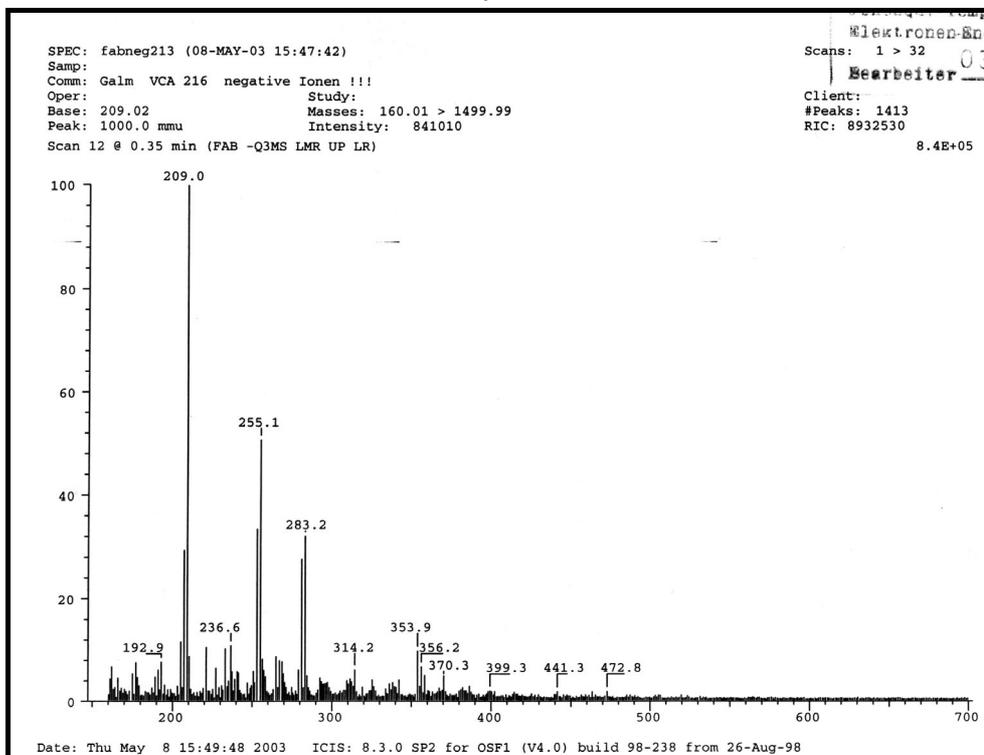
MS-Spektrum



Novclobiocinsäure 216

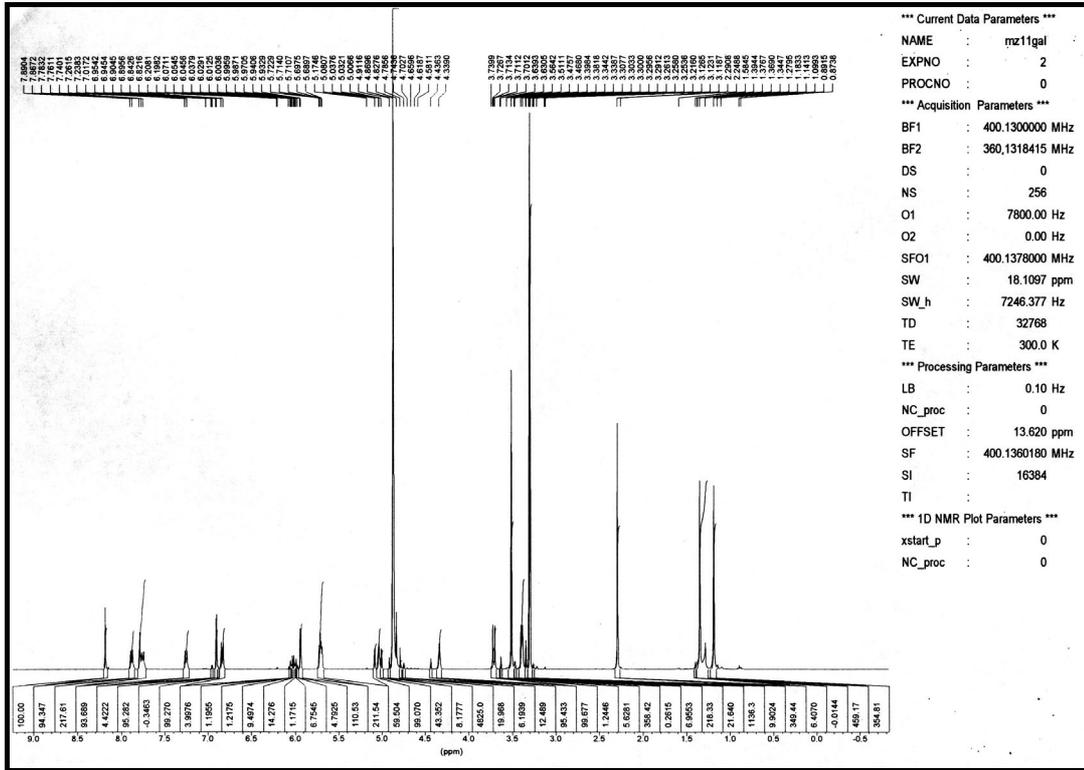
¹H-NMR-Spektrum

MS-Spektrum

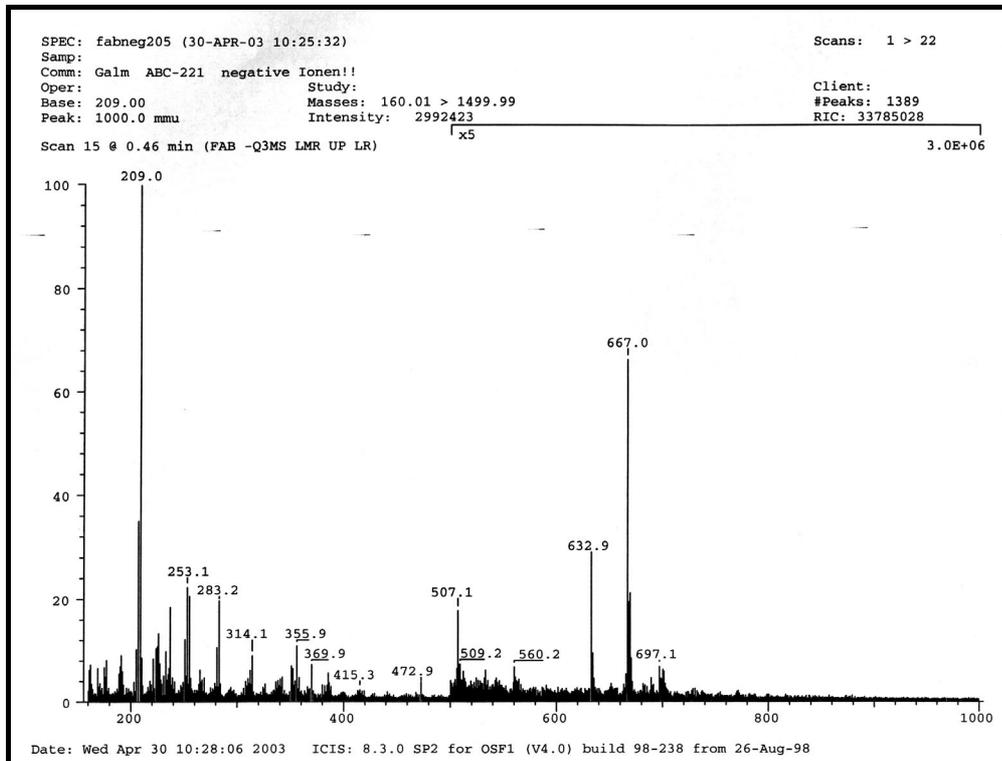


Novclobiocin 221

¹H-NMR-Spektrum

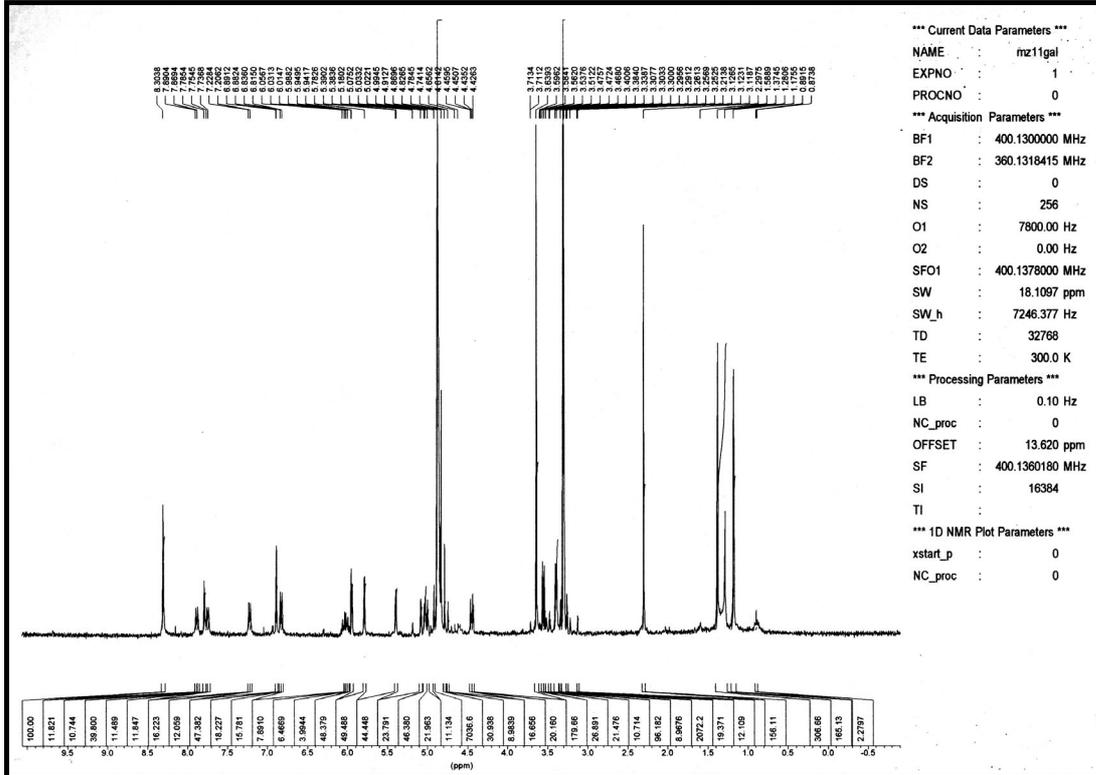


MS-Spektrum

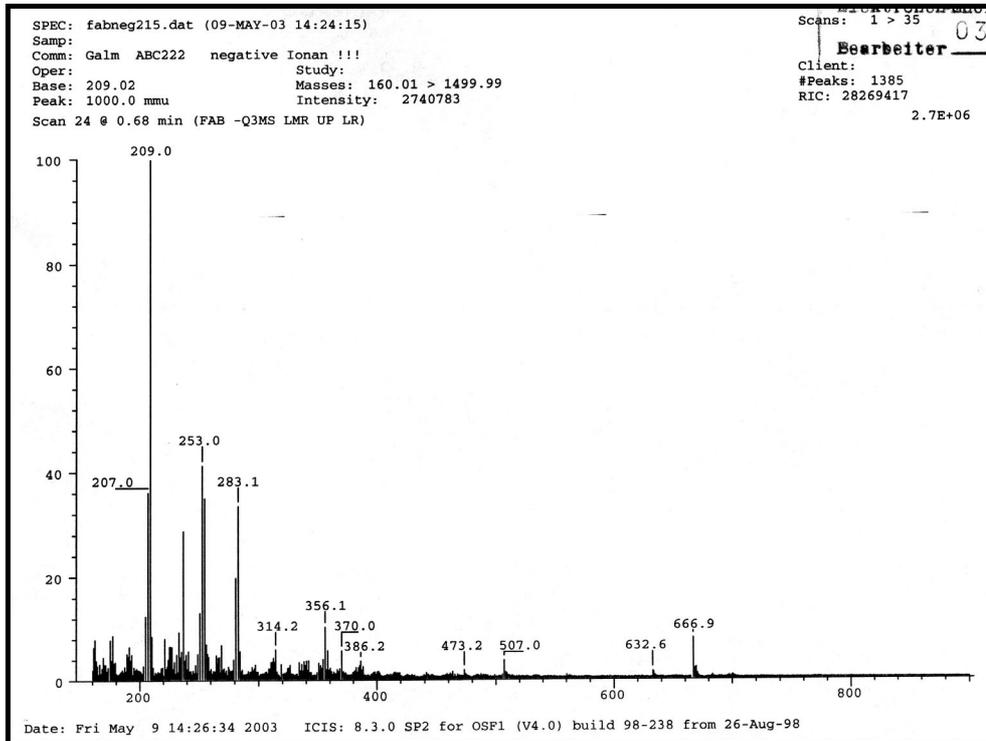


Novclobiocin 222

¹H-NMR-Spektrum

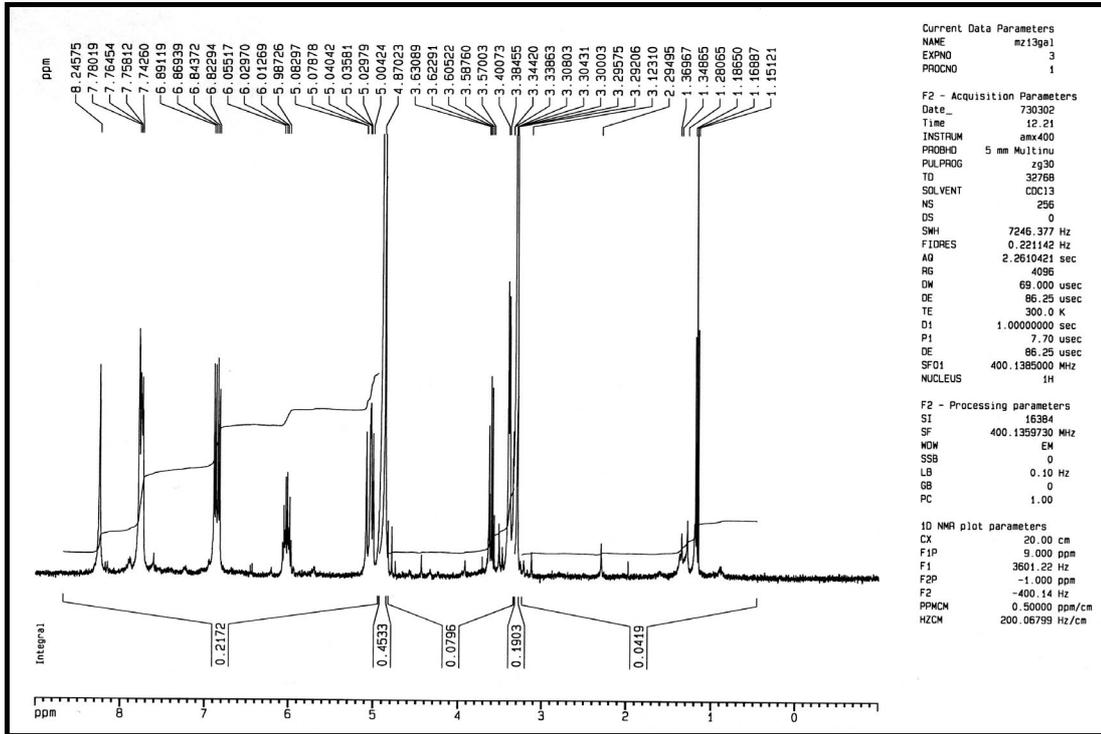


MS-Spektrum

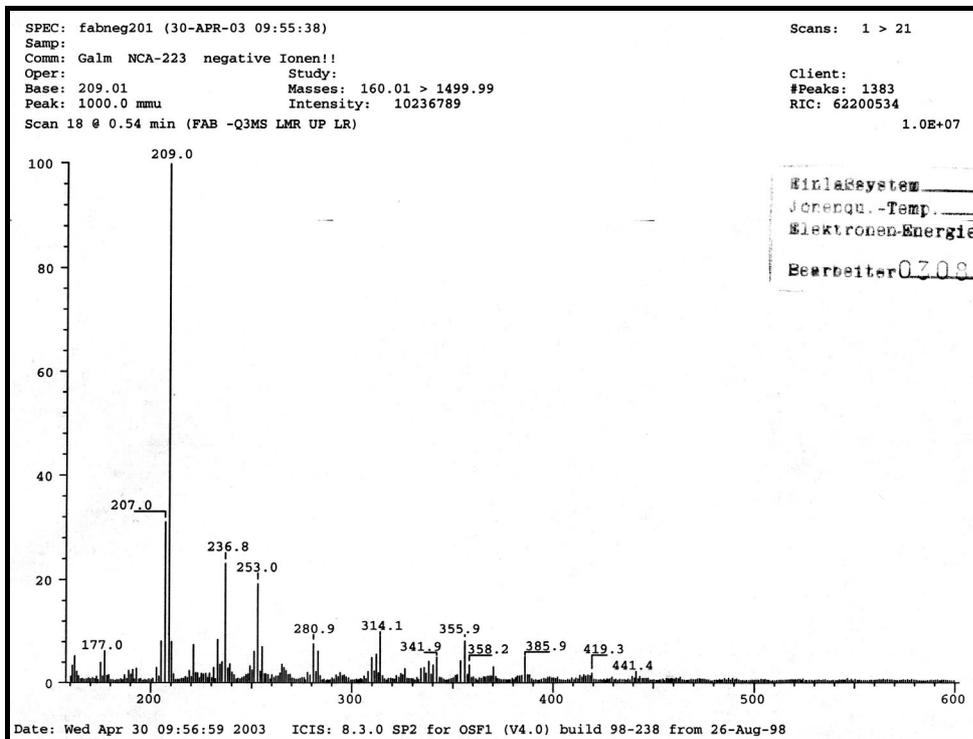


Novclobiocinsäure 223

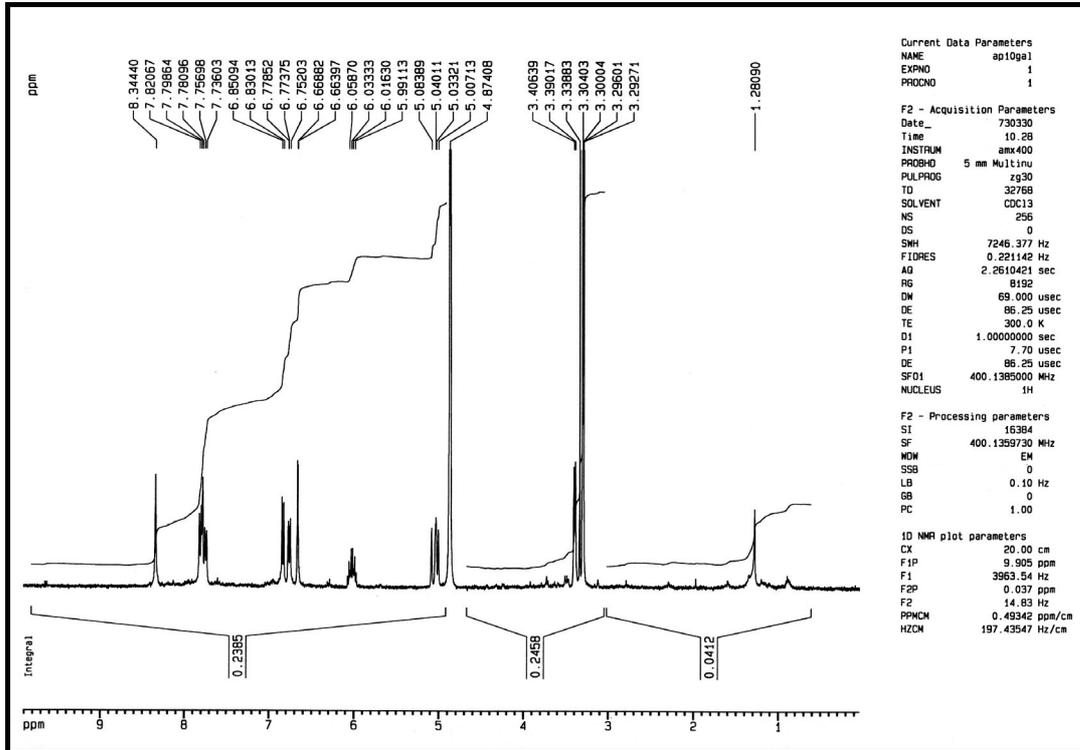
¹H-NMR-Spektrum



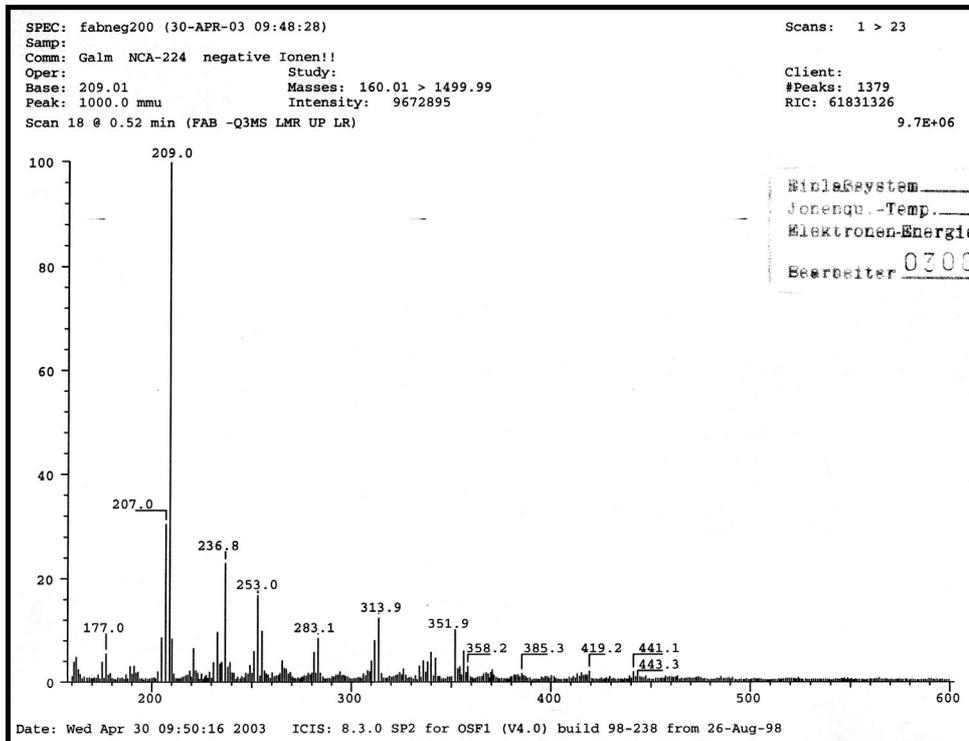
MS-Spektrum



Novclobiocinsäure 224

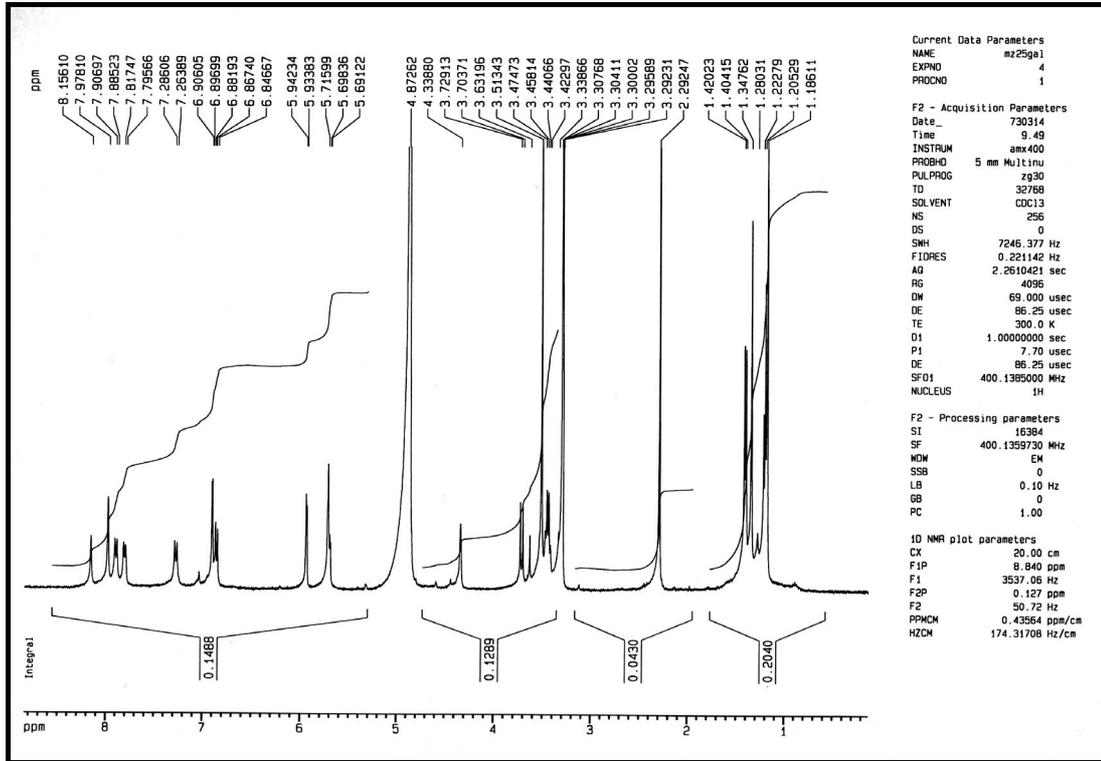
¹H-NMR-Spektrum

MS-Spektrum

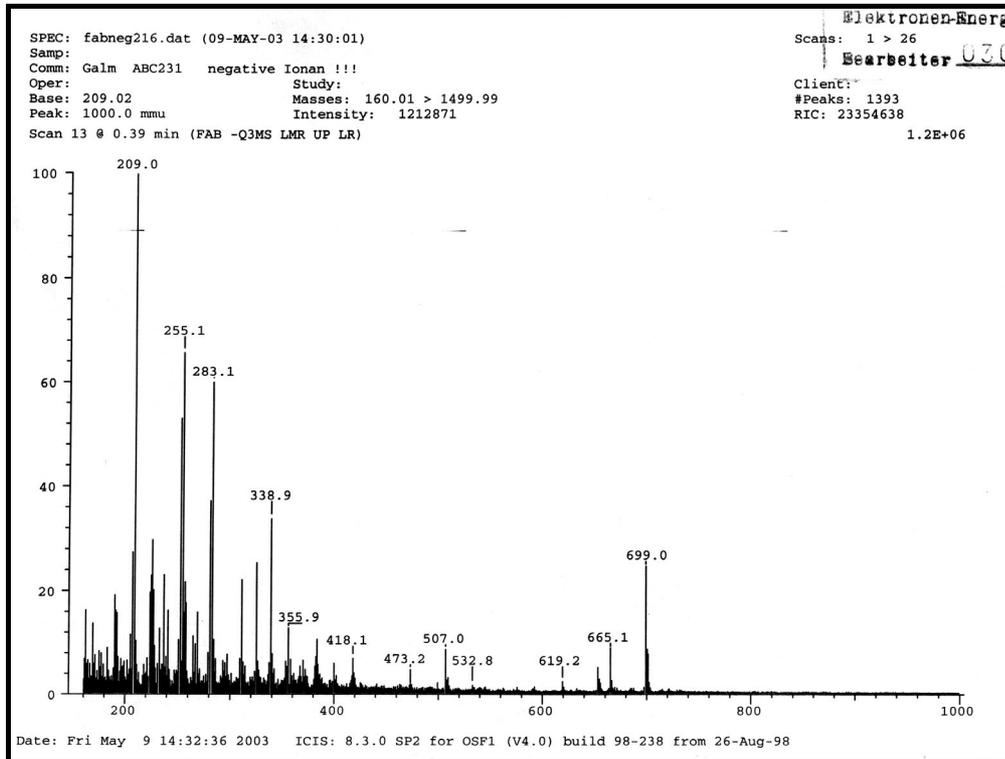


Novclobiocin 231

¹H-NMR-Spektrum

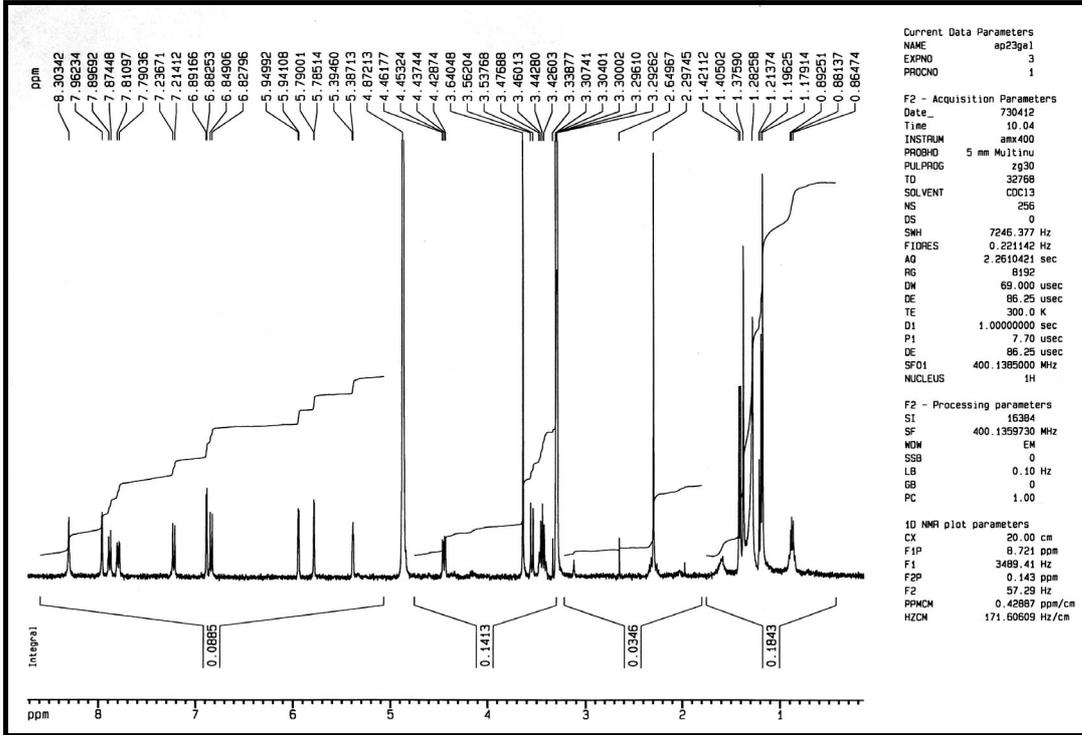


MS-Spektrum



Novclobiocin 232

¹H-NMR-Spektrum



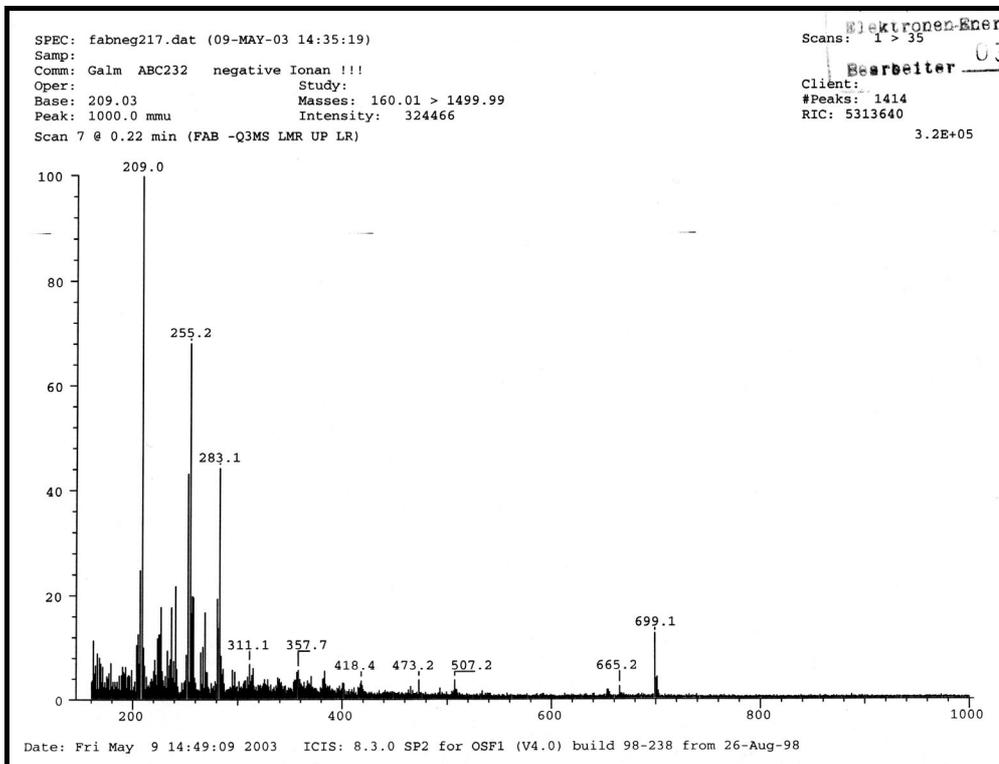
Current Data Parameters
 NAME ap23gal
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 730412
 Time 10.04
 INSTRUM amx400
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 256
 DS 0
 SMH 7246.377 Hz
 FIDRES 0.221142 Hz
 AQ 2.2810421 sec
 RG 8192
 DM 69.000 usec
 DE 86.25 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 7.70 usec
 DE 86.25 usec
 SFO1 400.1395000 MHz
 NUCLEUS 1H

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 400.1395730 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

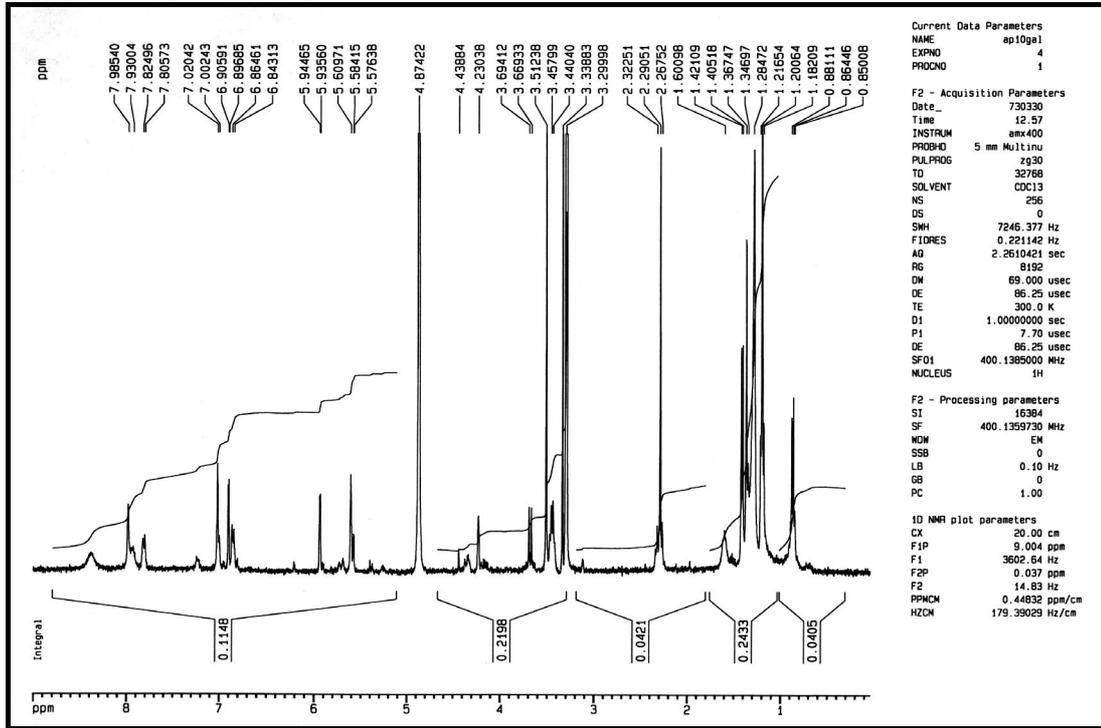
1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.721 ppm
 F1 3489.41 Hz
 F2P 0.143 ppm
 F2 57.29 Hz
 PPMCM 0.42887 ppm/cm
 HZCM 171.60609 Hz/cm

MS-Spektrum

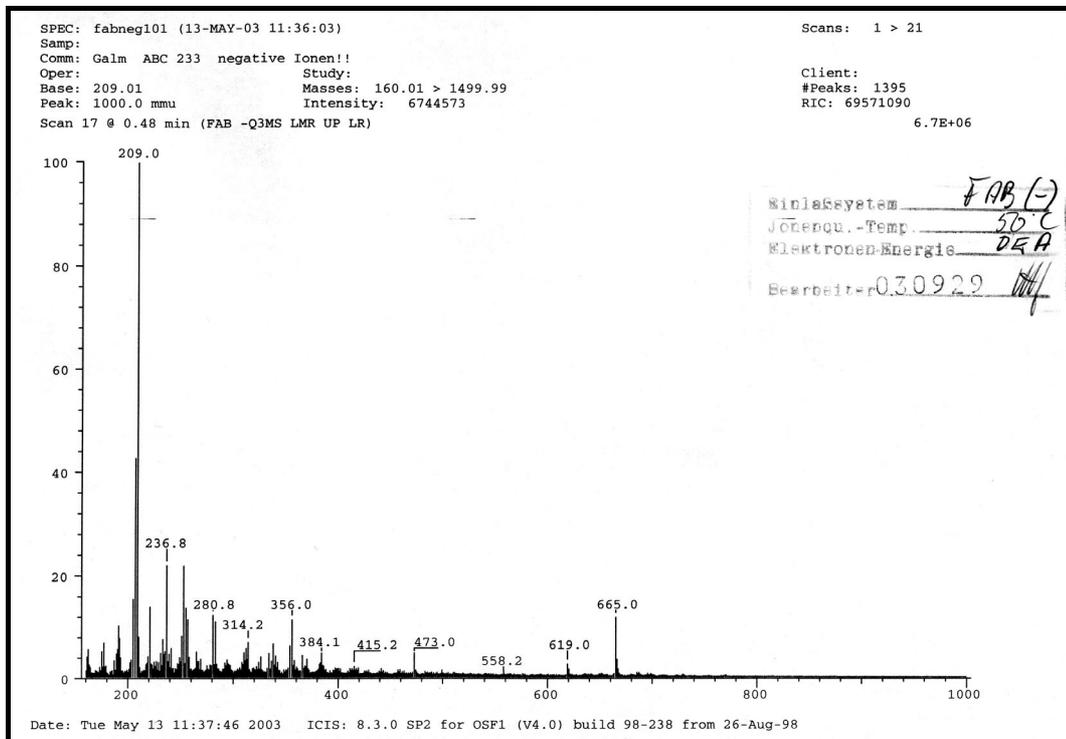


Novclobiocin 233

¹H-NMR-Spektrum

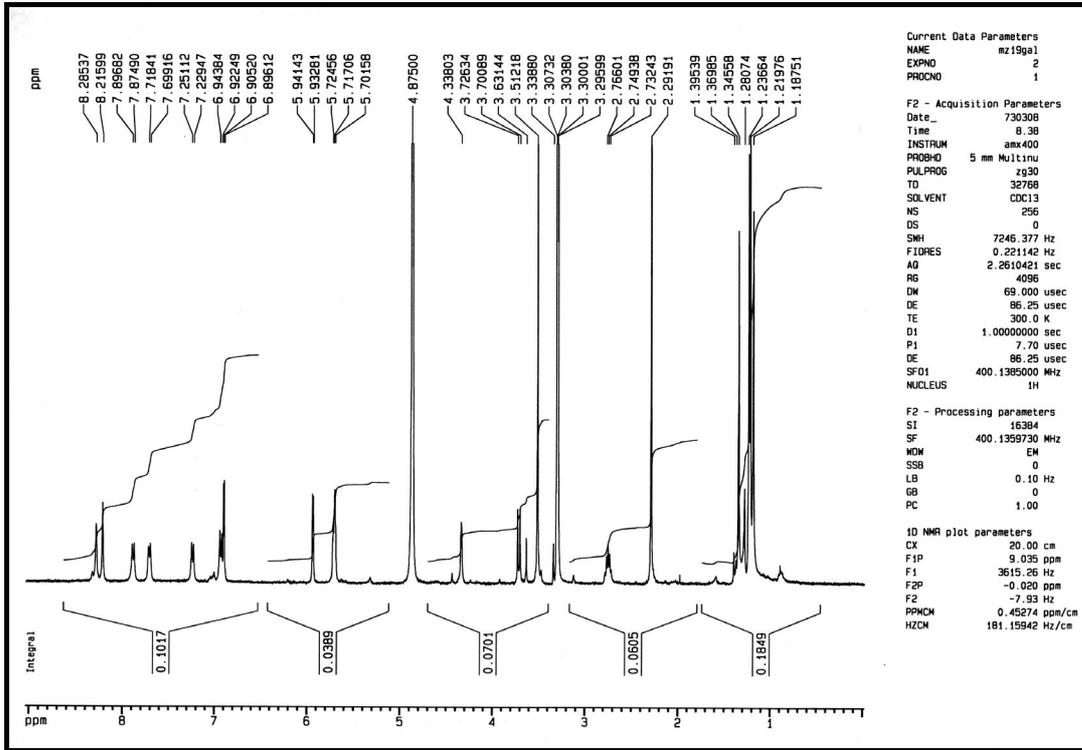


MS-Spektrum

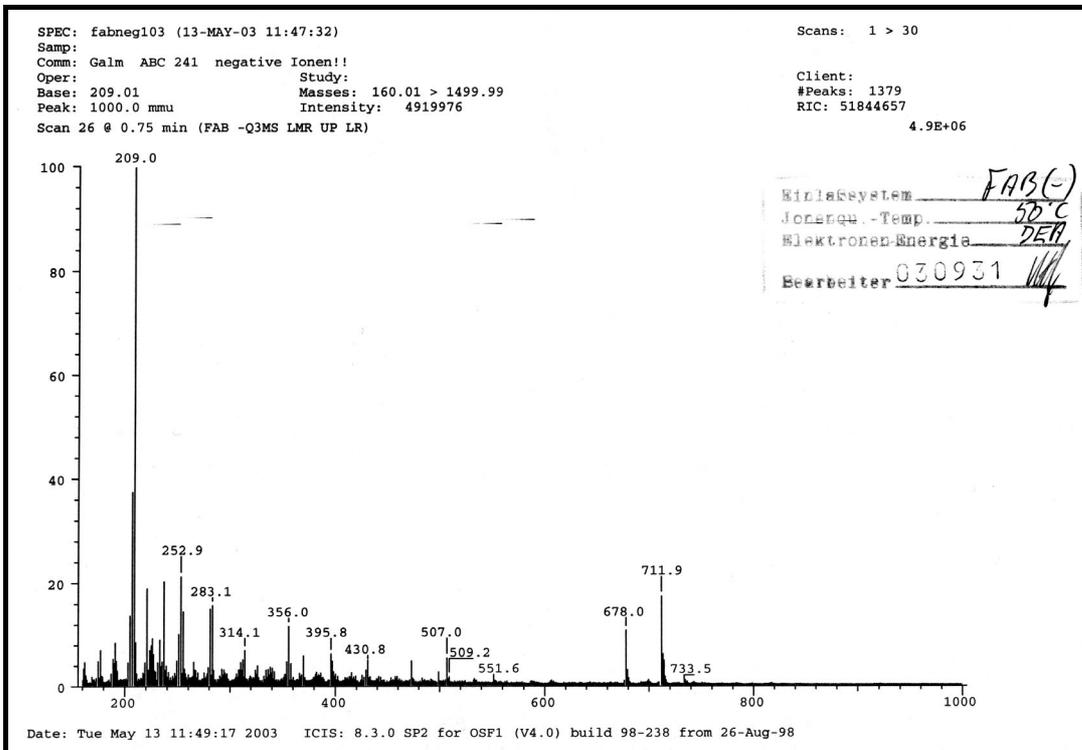


Novclobiocin 241

¹H-NMR-Spektrum

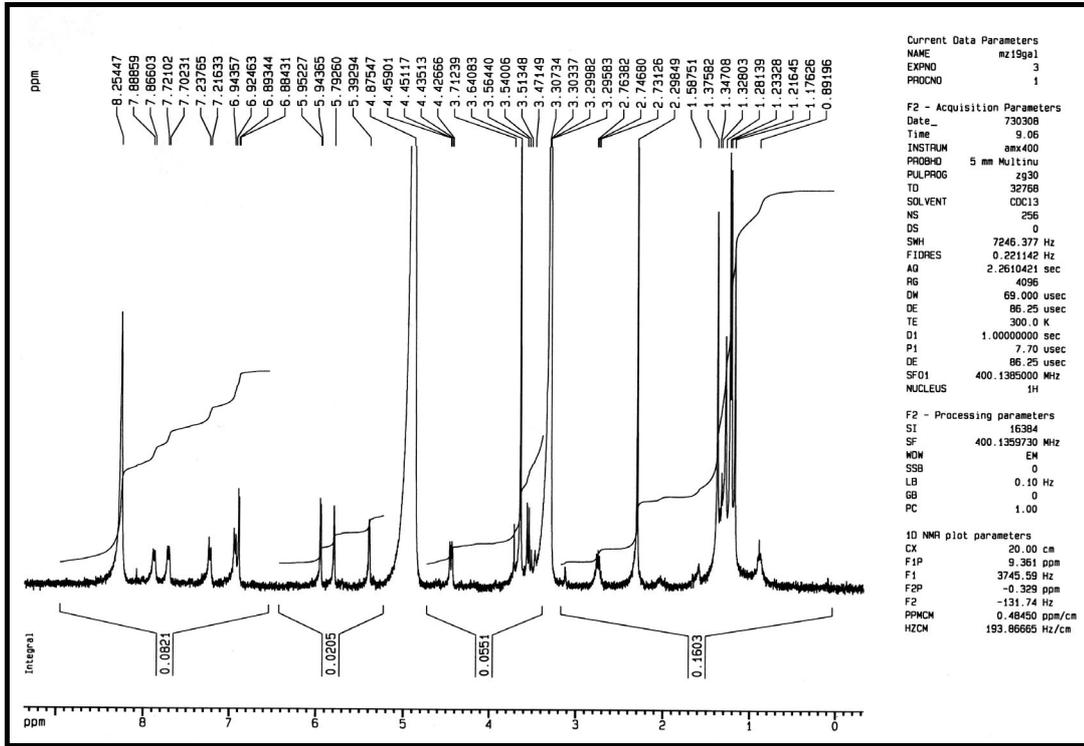


MS-Spektrum

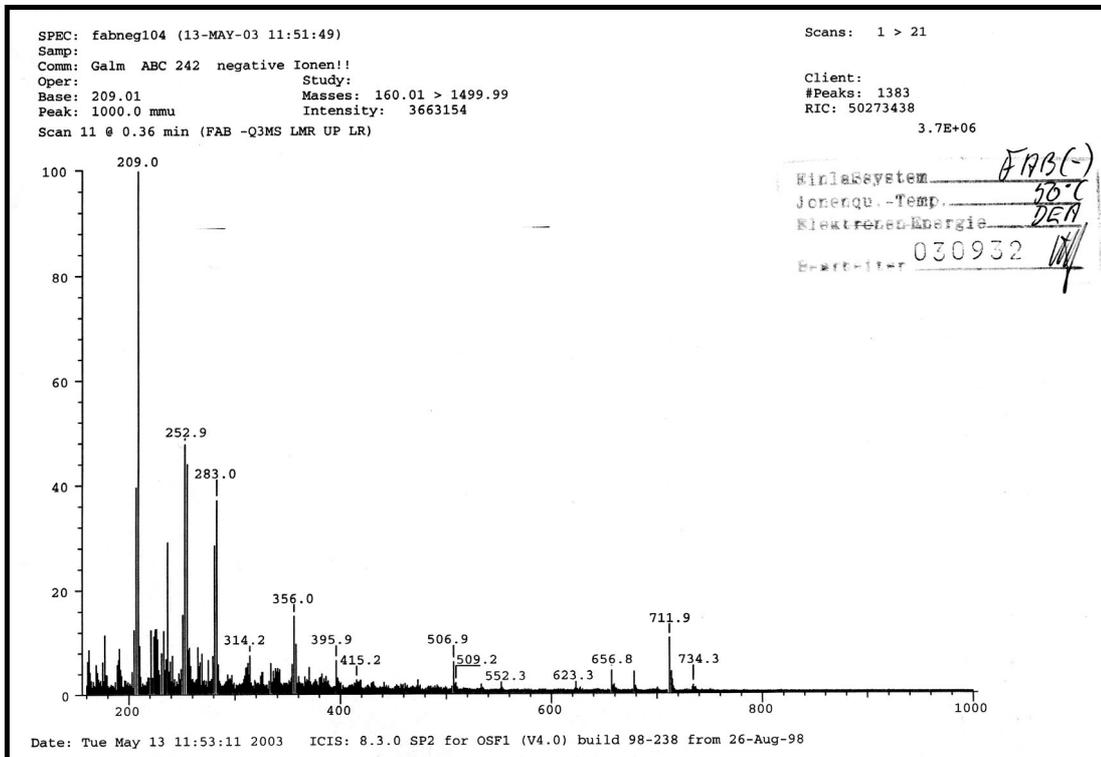


Novclobiocin 242

¹H-NMR-Spektrum

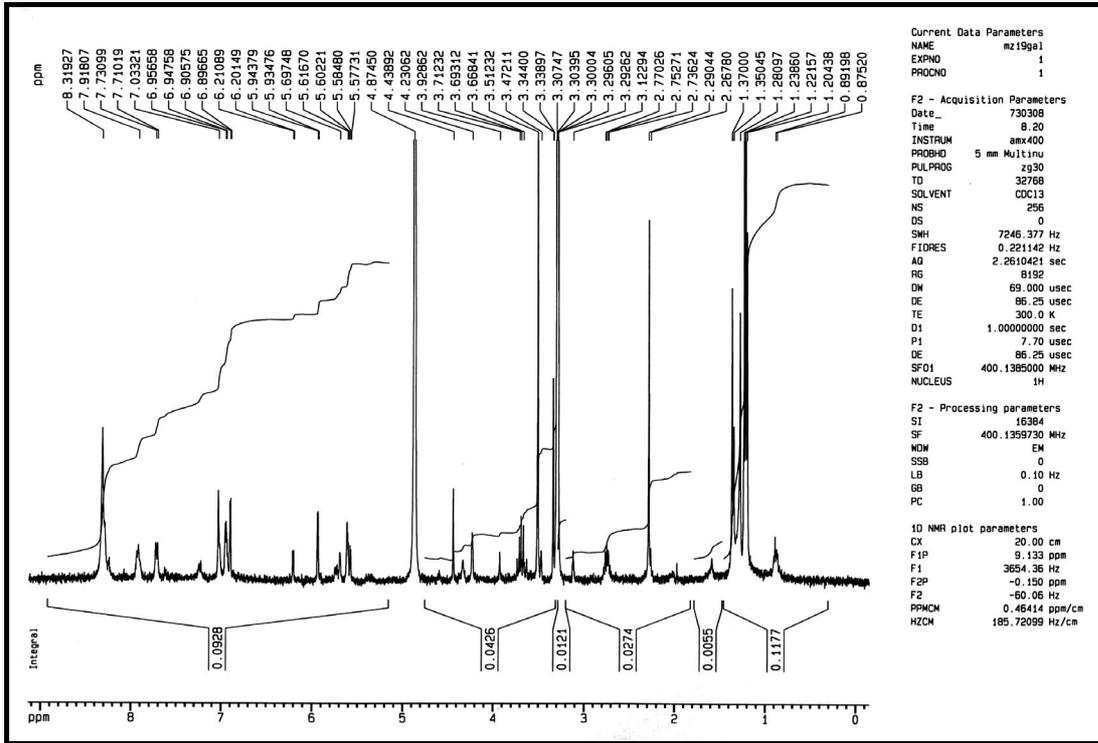


MS-Spektrum

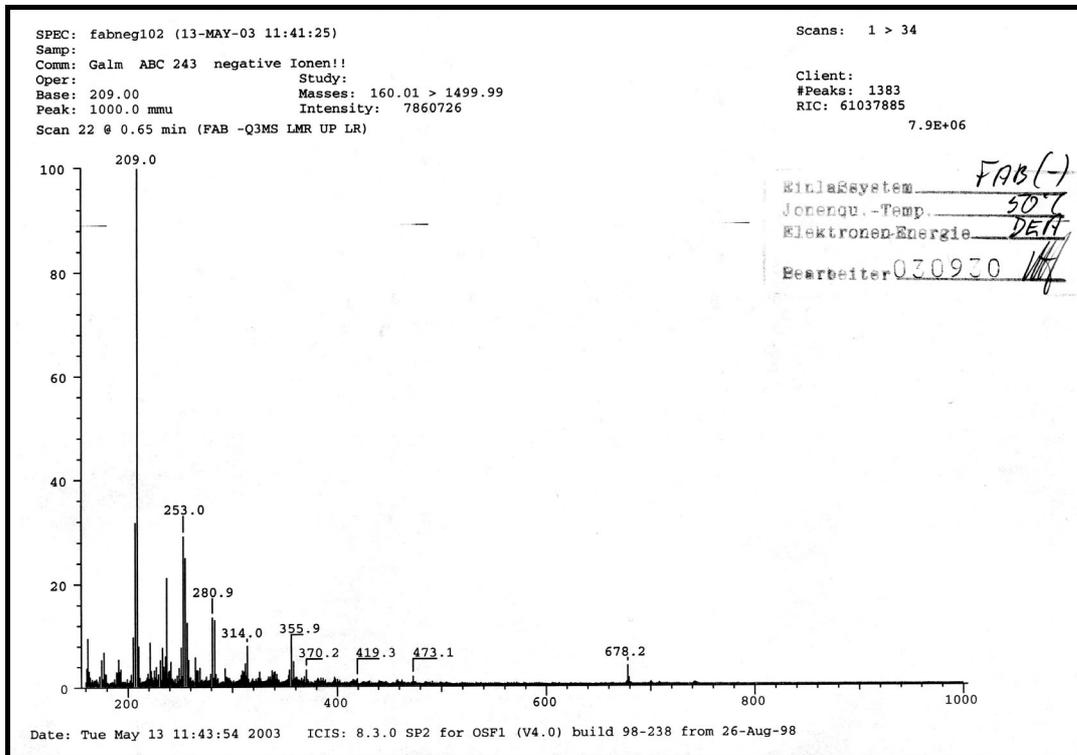


Novclobiocin 243

¹H-NMR-Spektrum

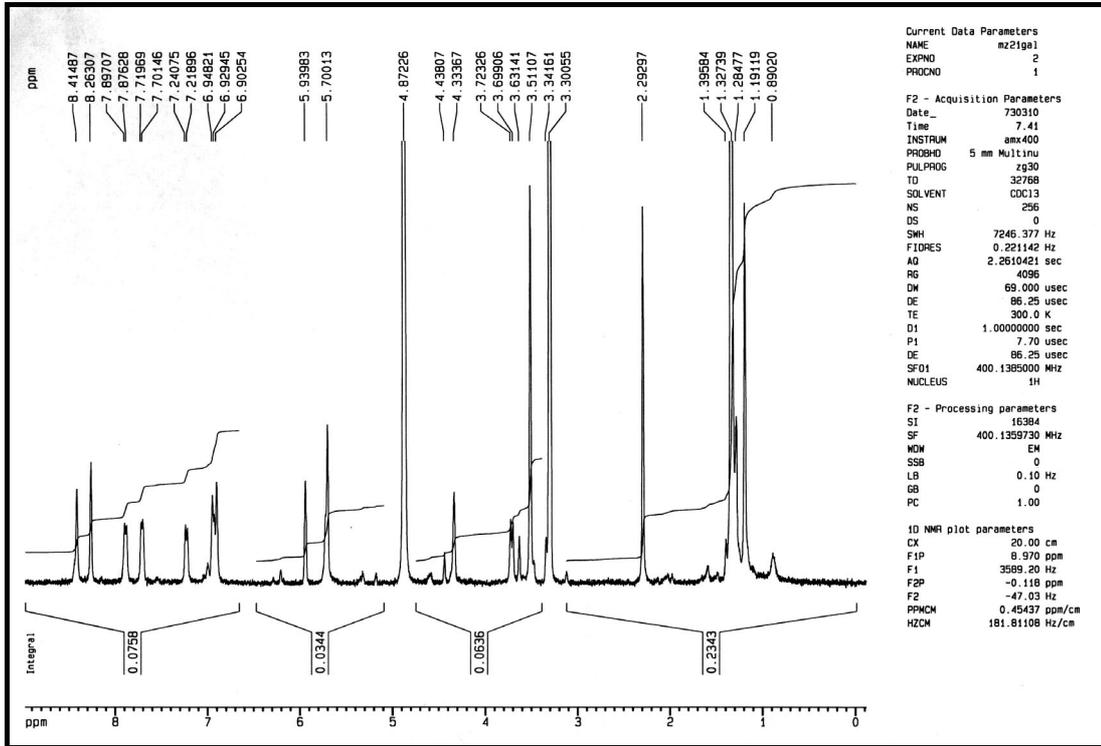


MS-Spektrum

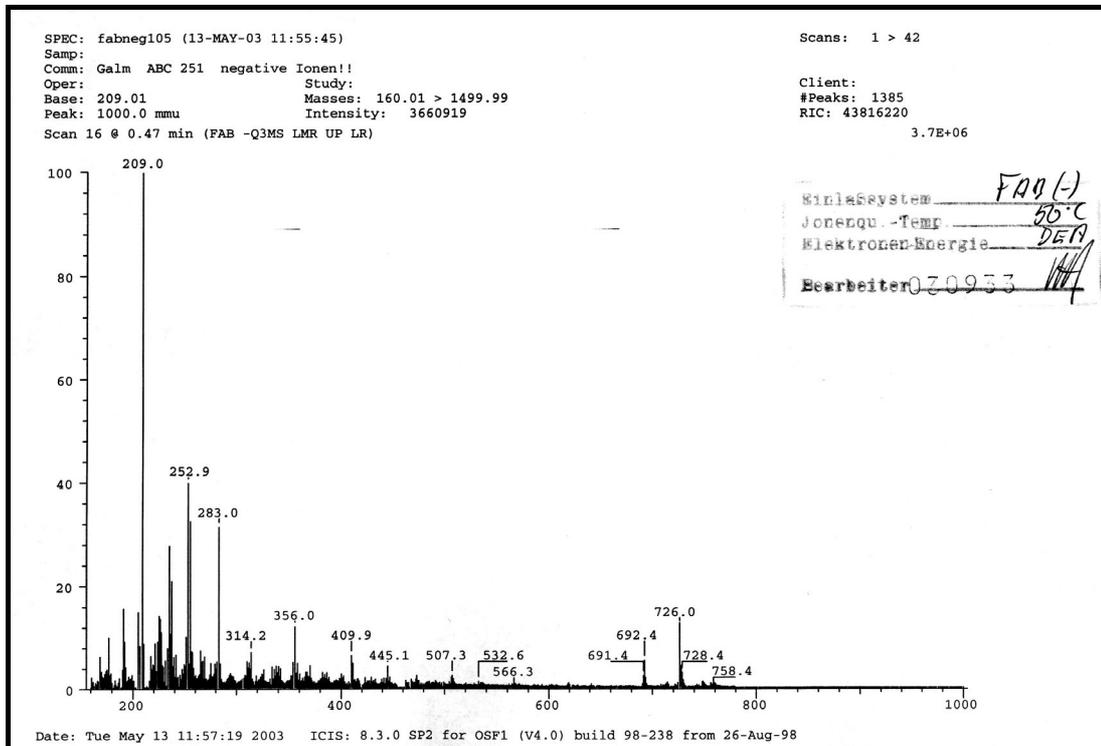


Novclobiocin 251

¹H-NMR-Spektrum

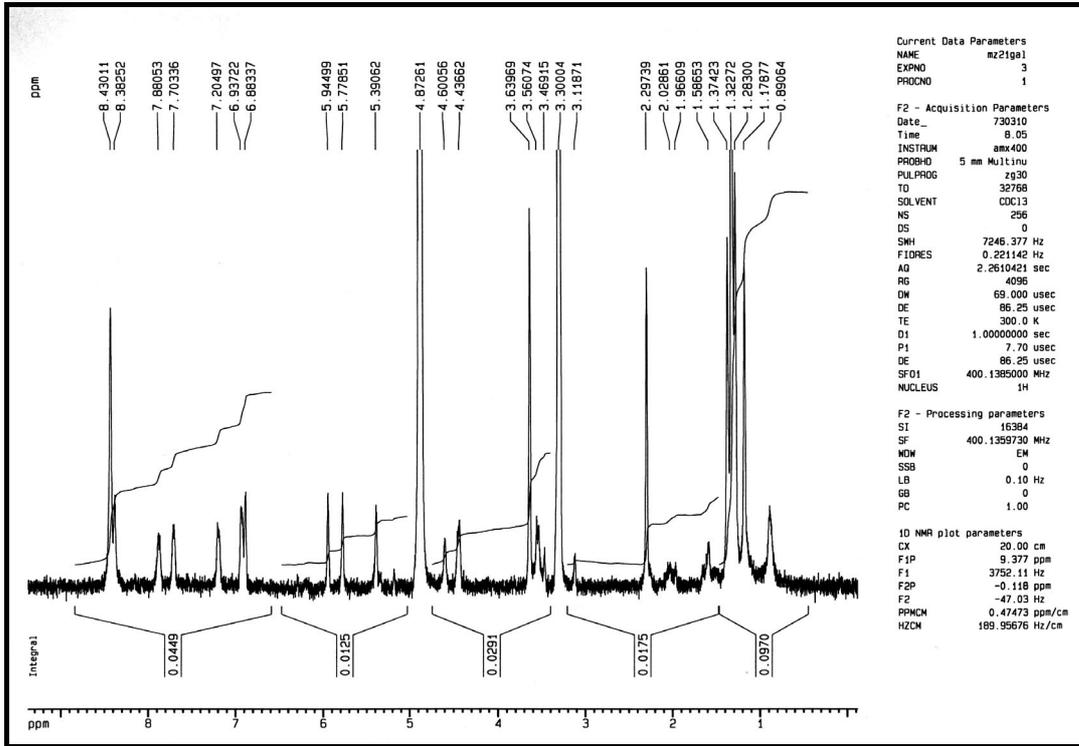


MS-Spektrum

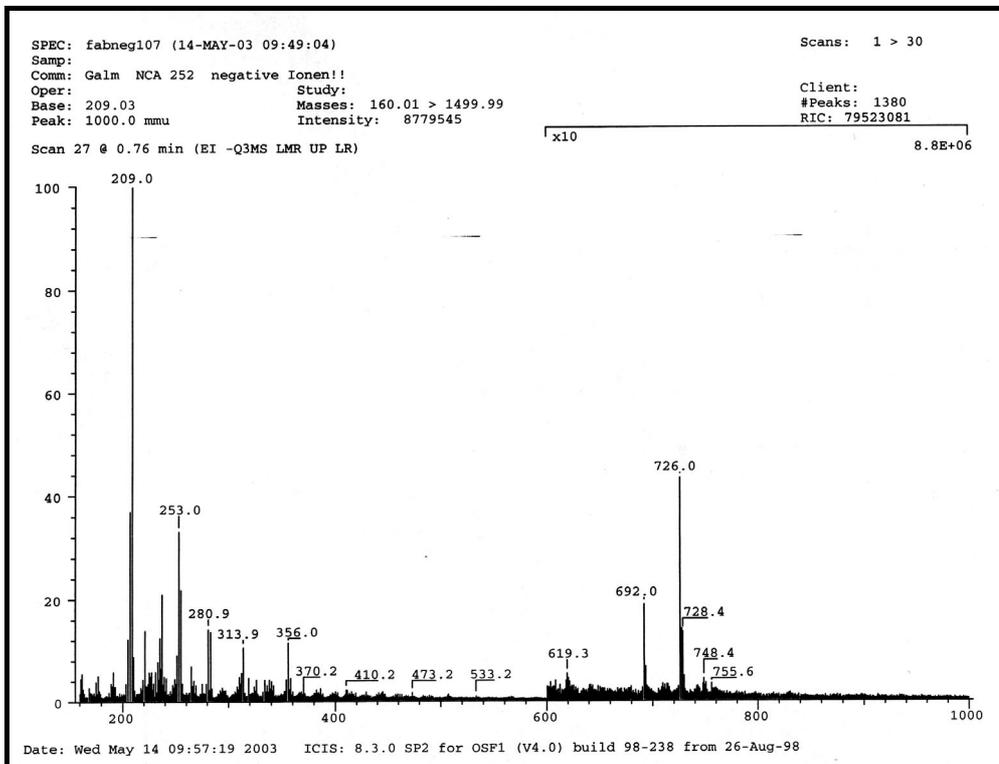


Novclobiocin 252

¹H-NMR-Spektrum

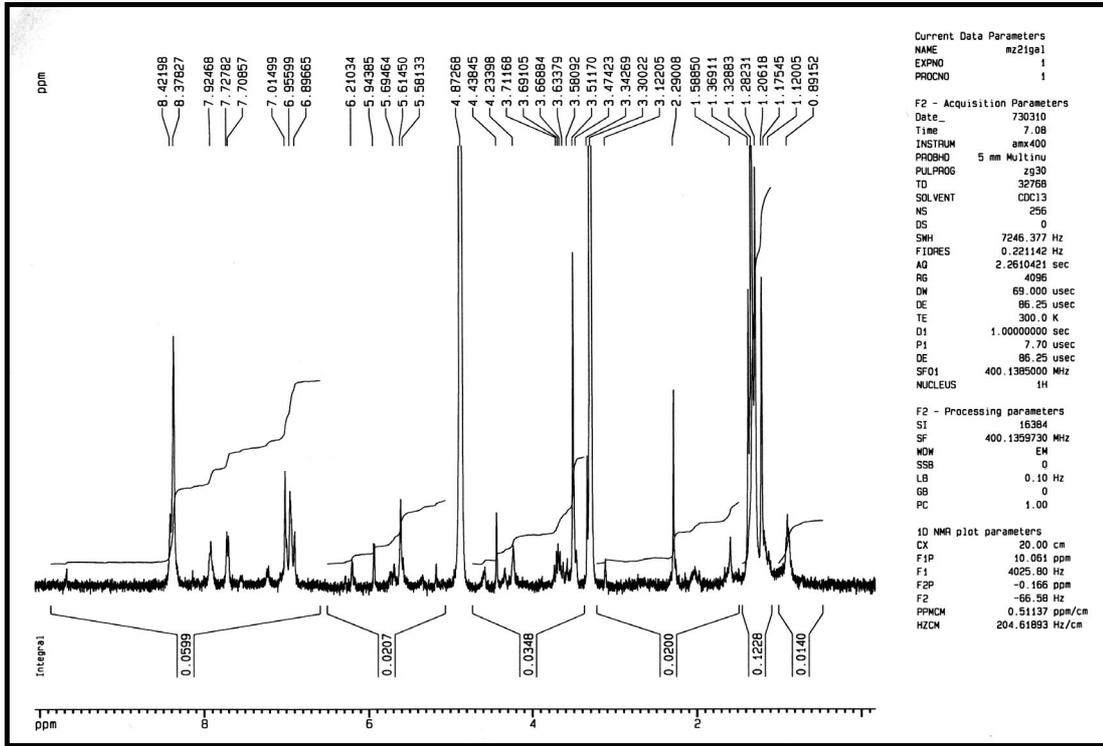


MS-Spektrum

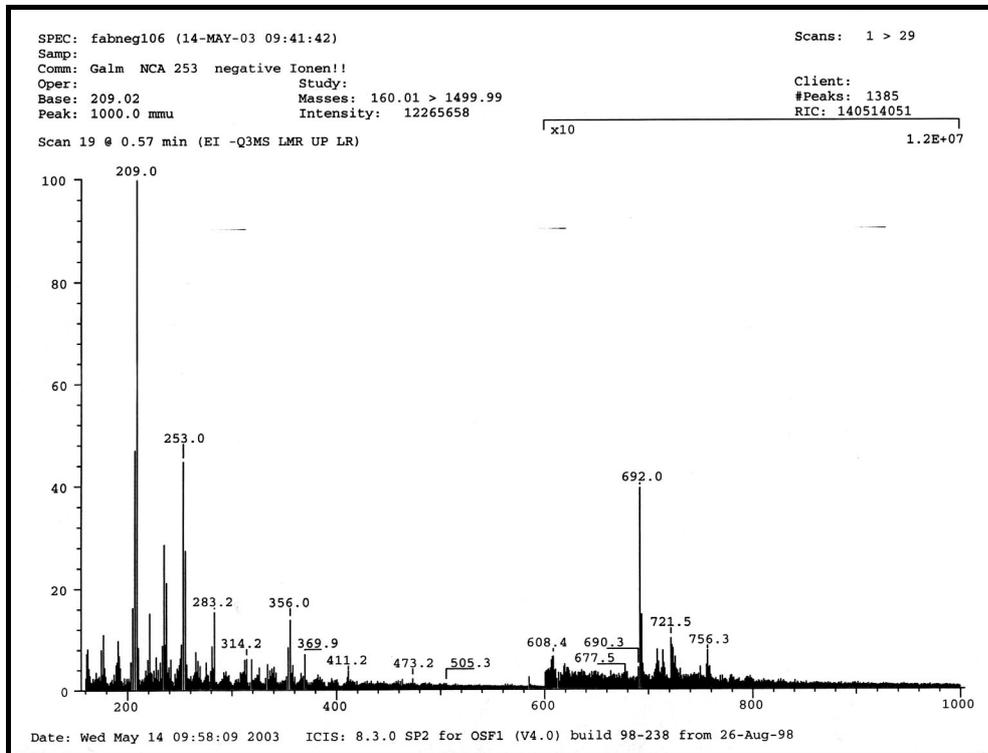


Novclobiocin 253

¹H-NMR-Spektrum

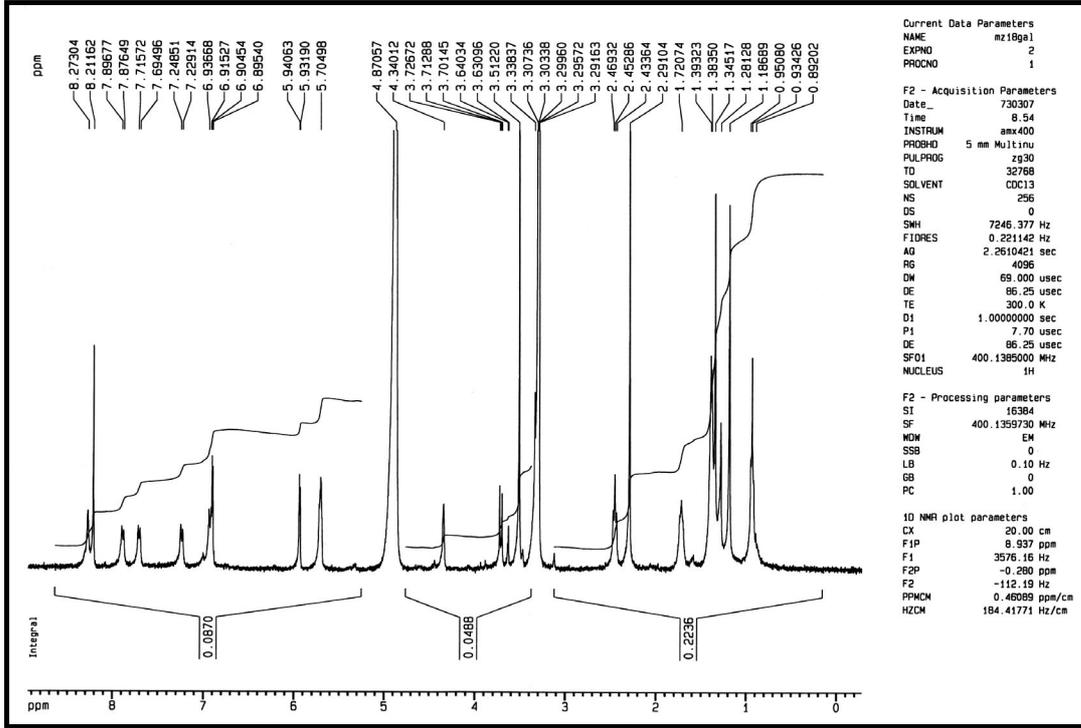


MS-Spektrum

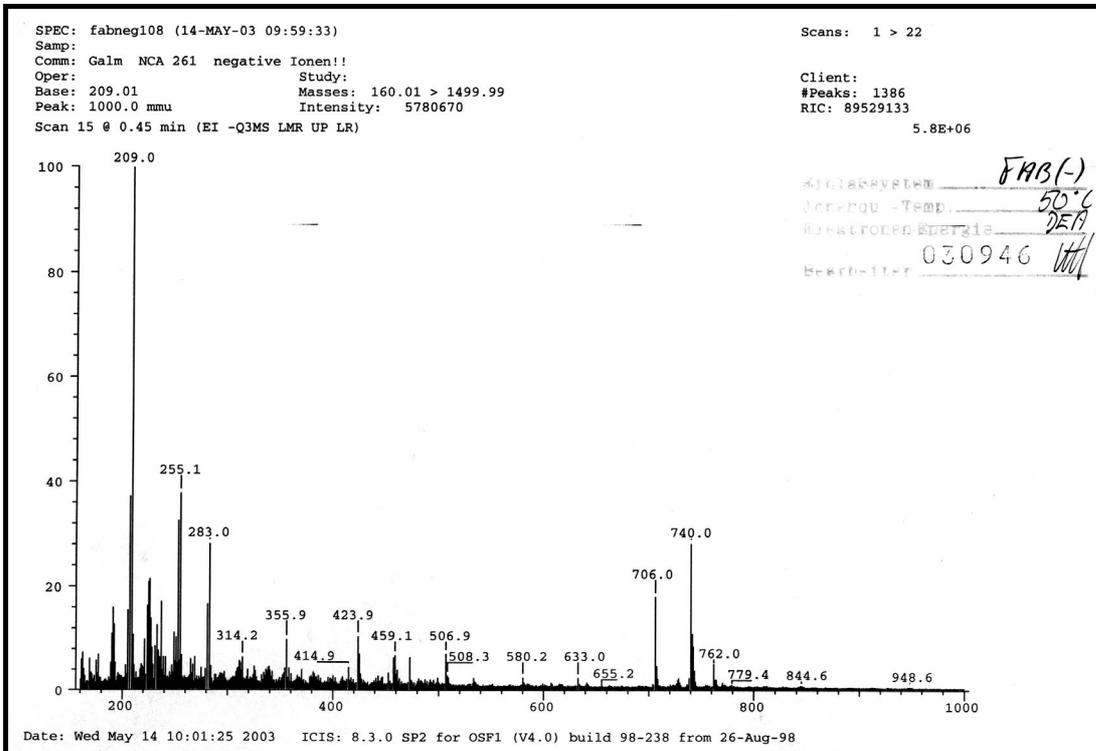


Novclobiocin 261

¹H-NMR-Spektrum

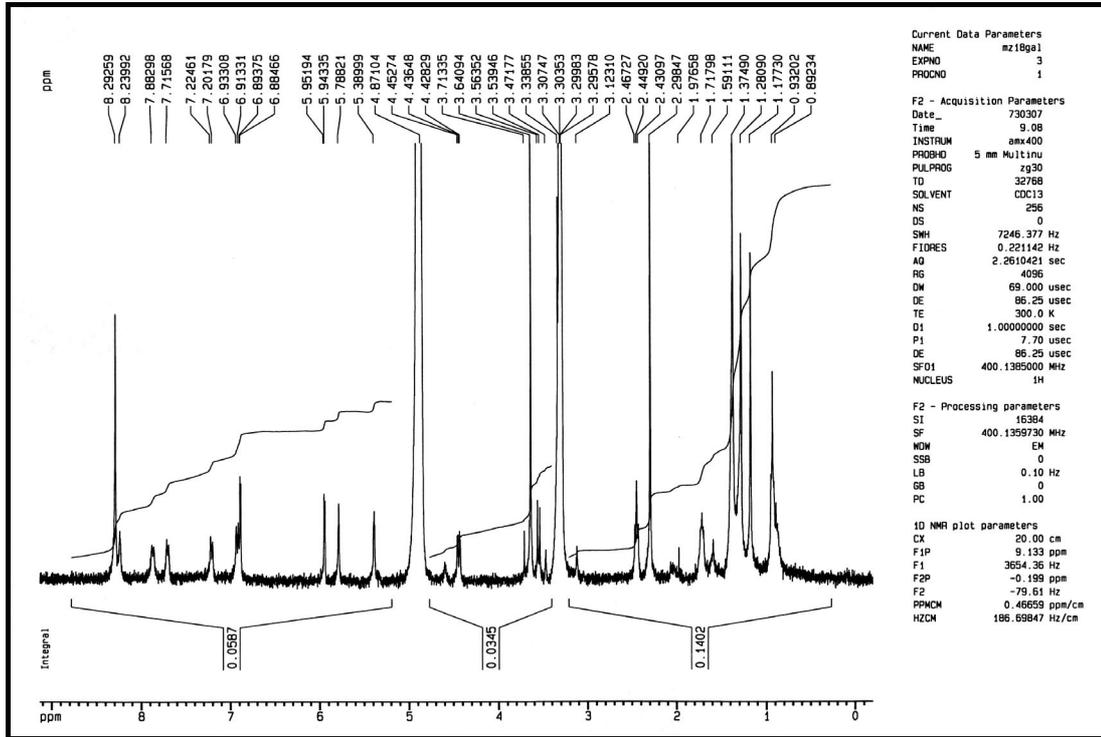


MS-Spektrum

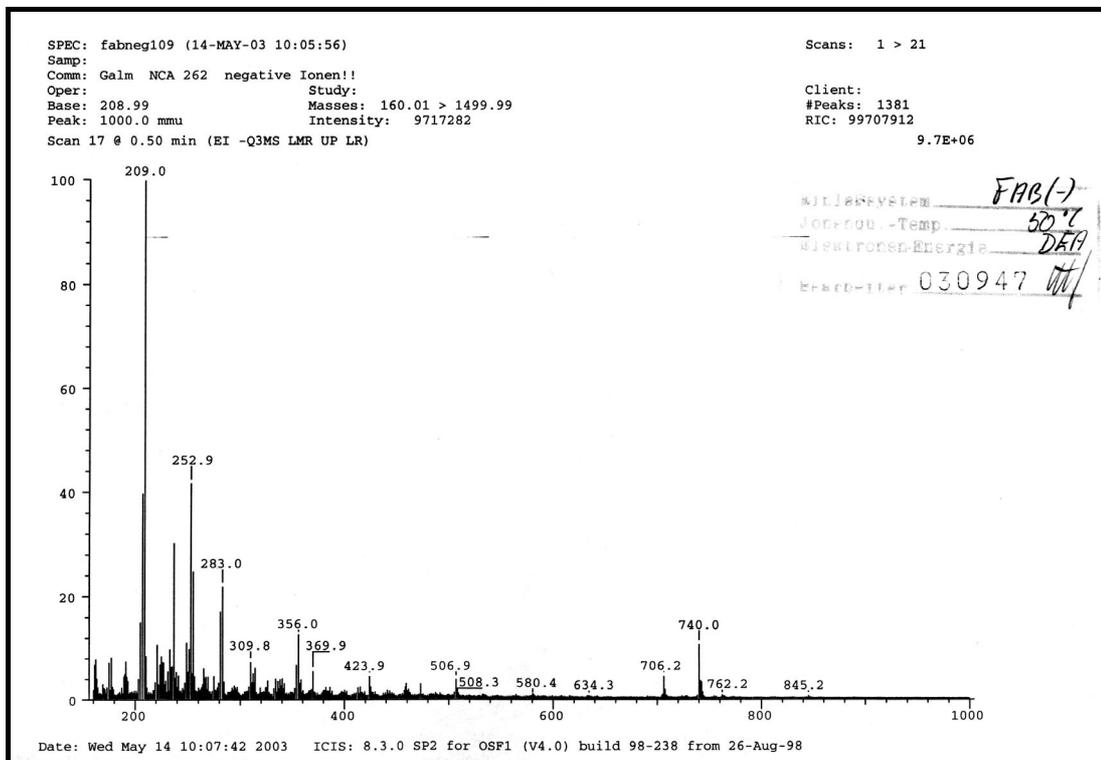


Novclobiocin 262

¹H-NMR-Spektrum

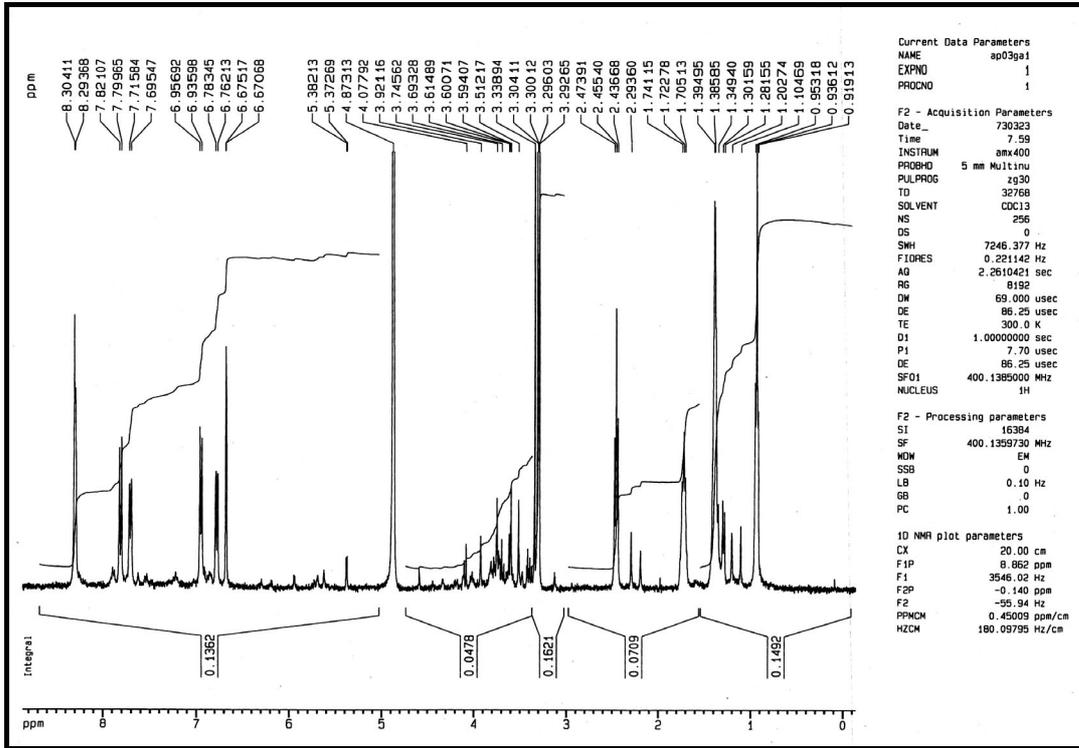


MS-Spektrum

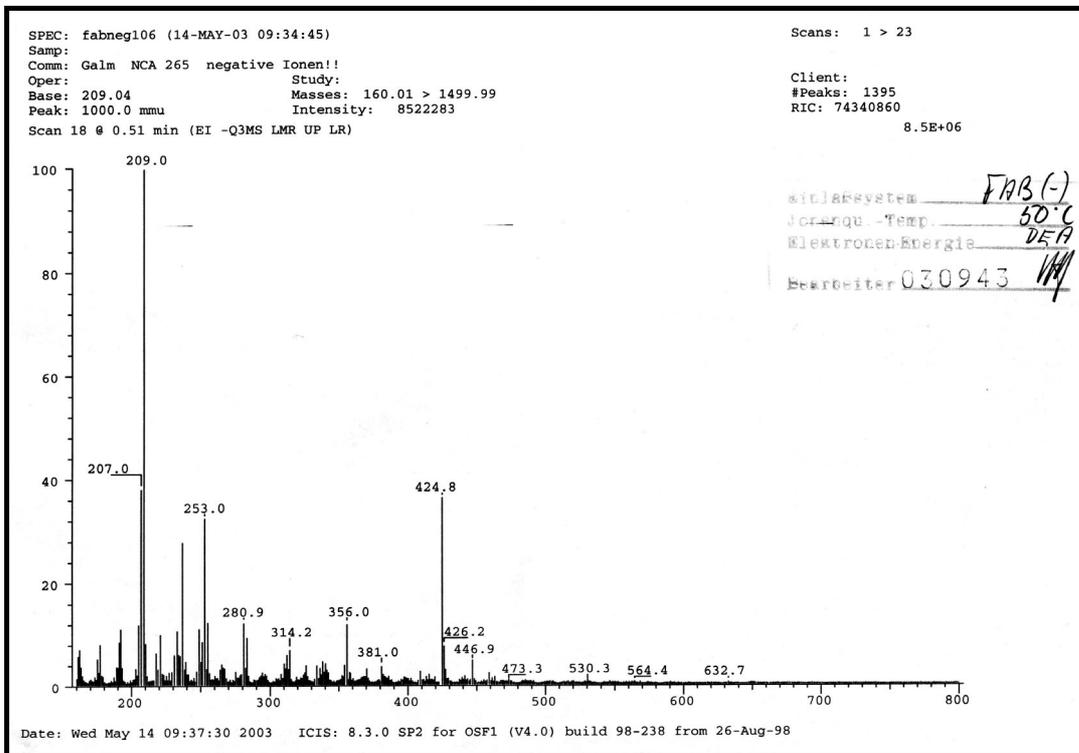


Novclobiocinsäure 265

¹H-NMR-Spektrum

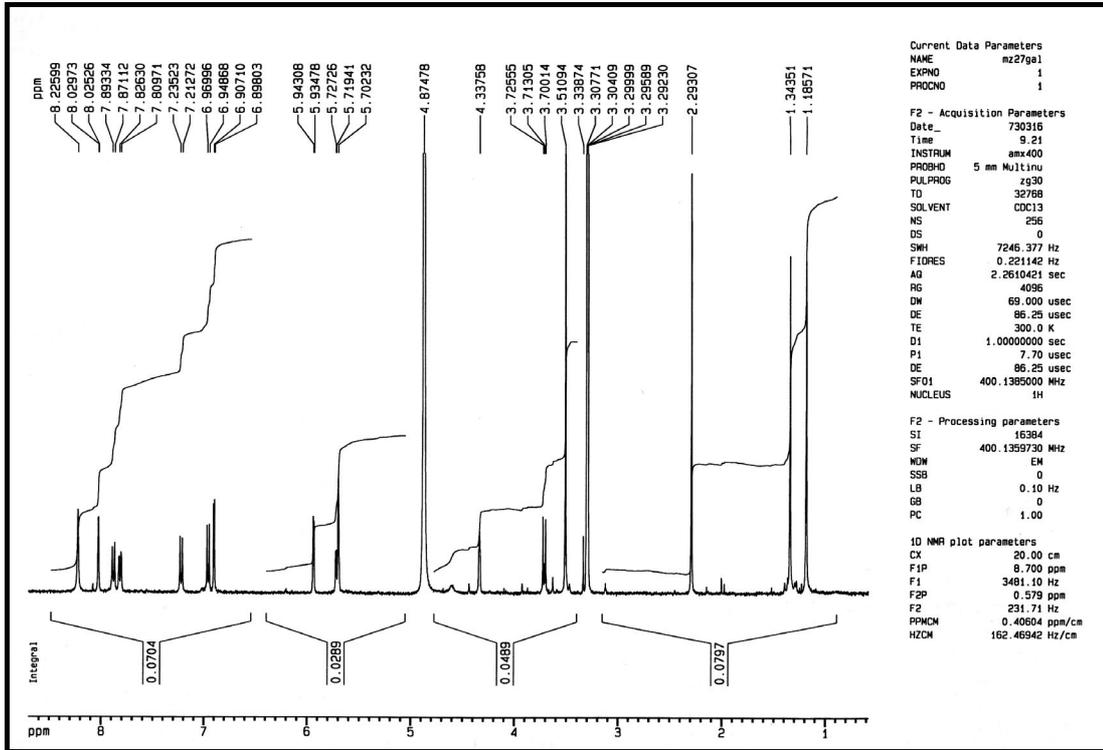


MS-Spektrum

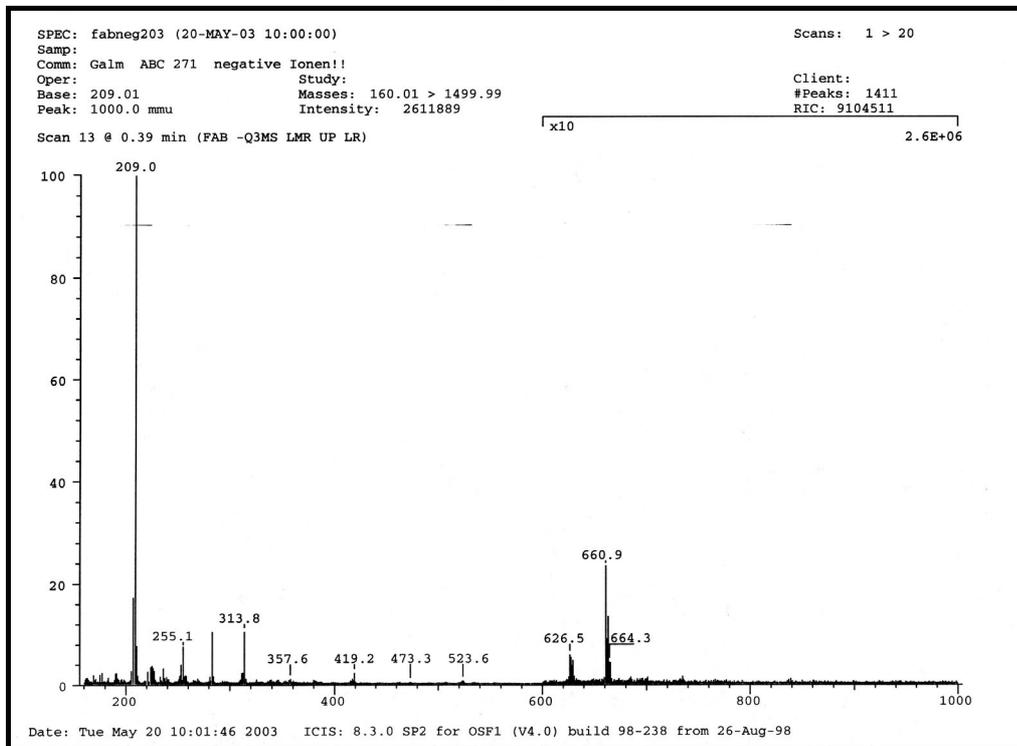


Novclobiocin 271

¹H-NMR-Spektrum

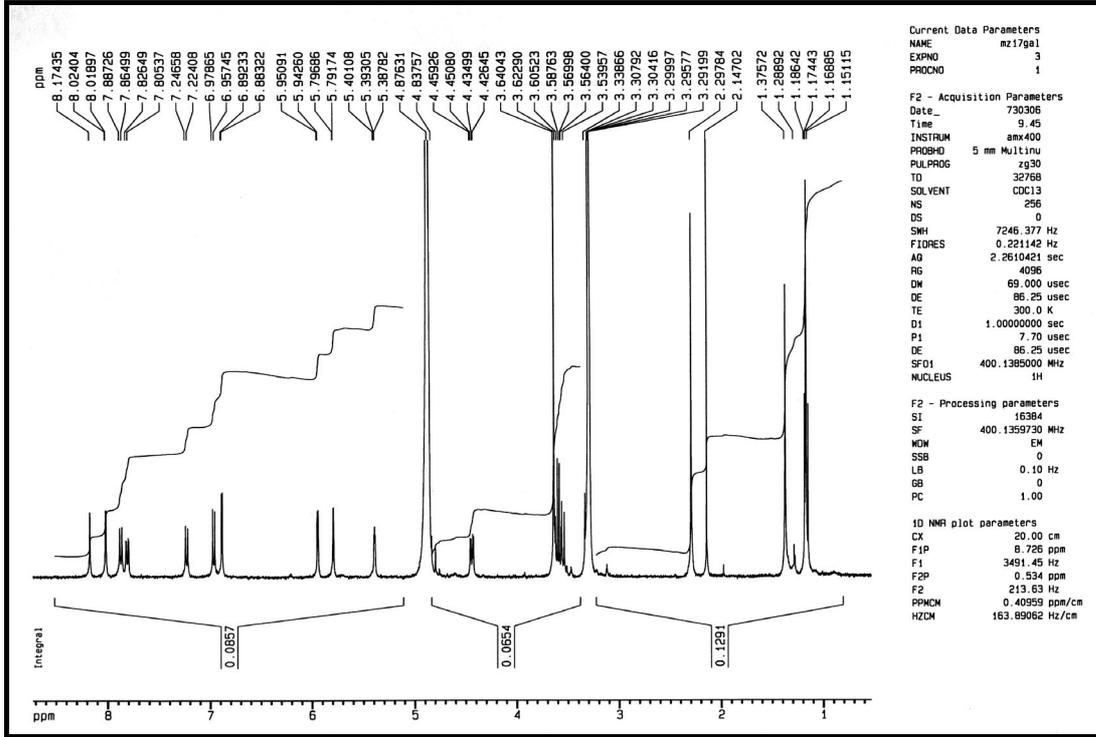


MS-Spektrum

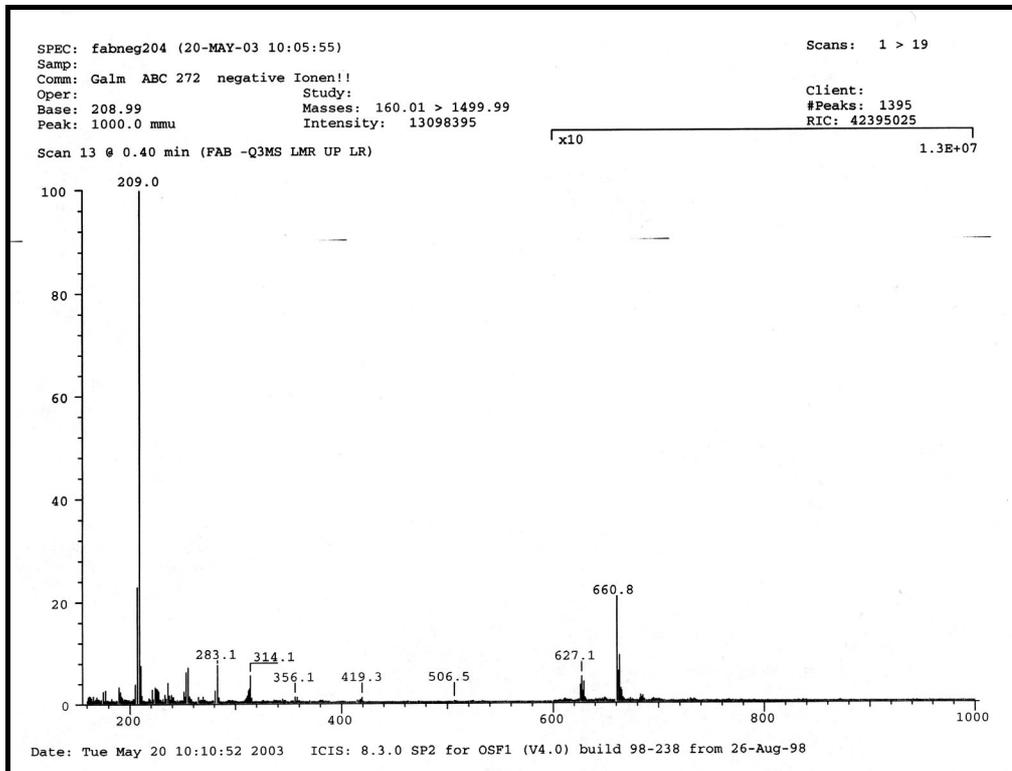


Novclobiocin 272

¹H-NMR-Spektrum

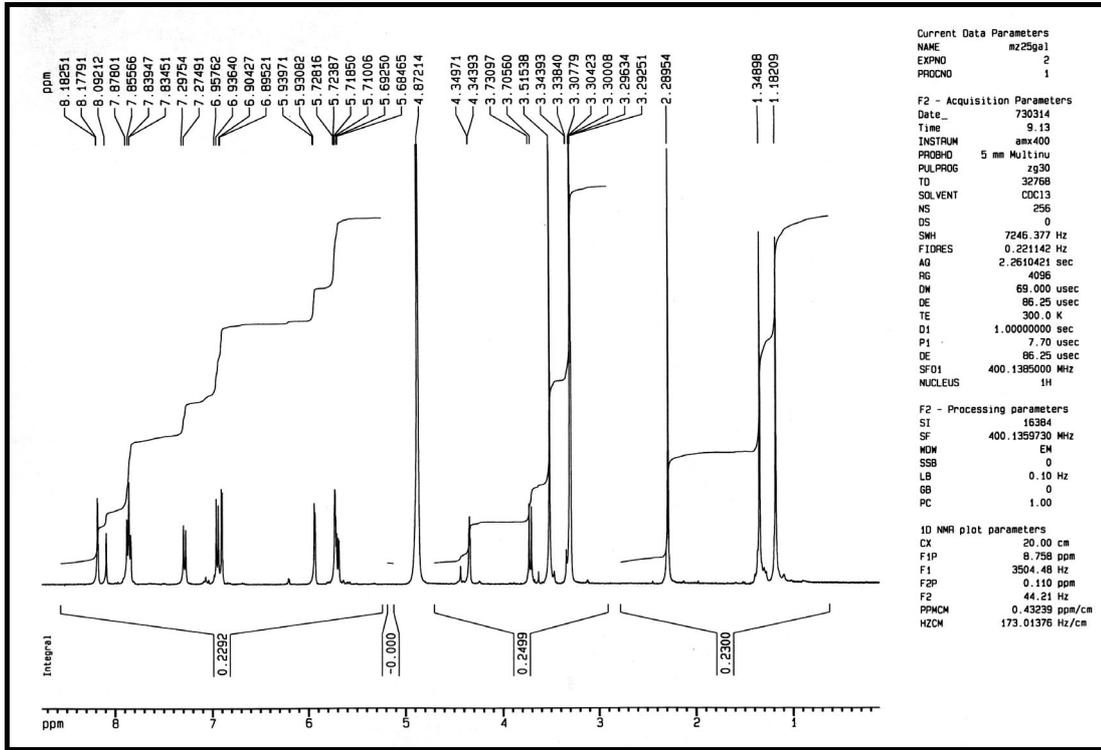


MS-Spektrum



Novclobiocin 281

¹H-NMR-Spektrum



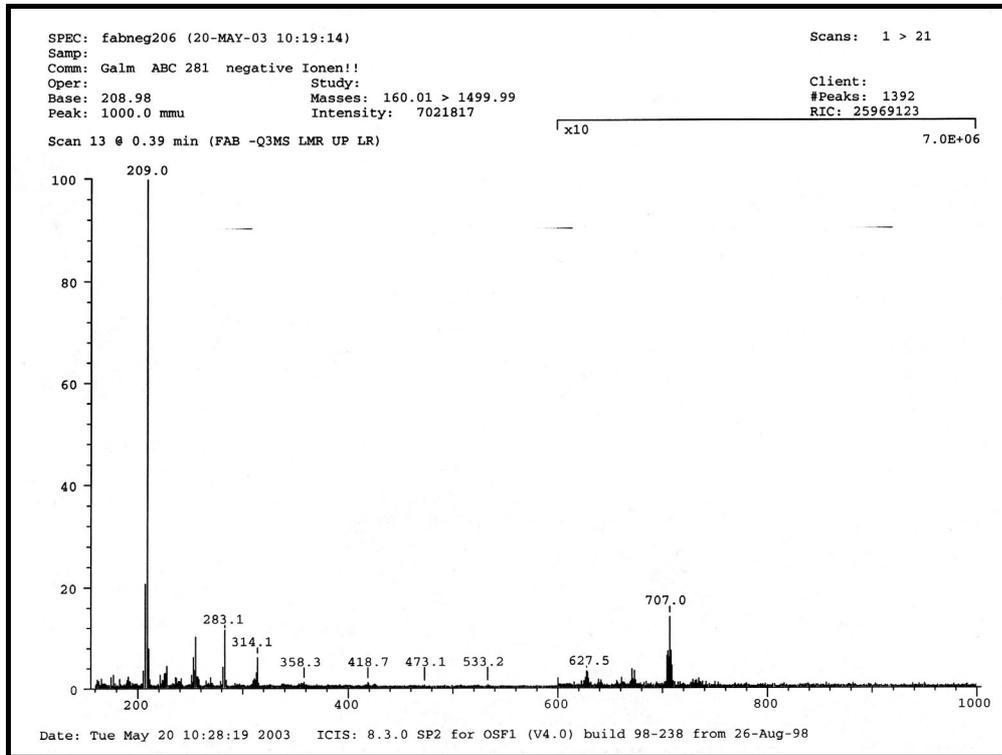
Current Data Parameters
 NAME mz25gal
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 730314
 Time 9.13
 INSTRUM amx400
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 256
 DS 0
 SMH 7246.377 Hz
 FIDRES 0.221142 Hz
 AQ 2.2610421 sec
 RG 4096
 DW 69.000 usec
 DE 86.25 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 7.70 usec
 DE 86.25 usec
 SFO1 400.1365000 MHz
 NUCLEUS 1H

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 400.1359730 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

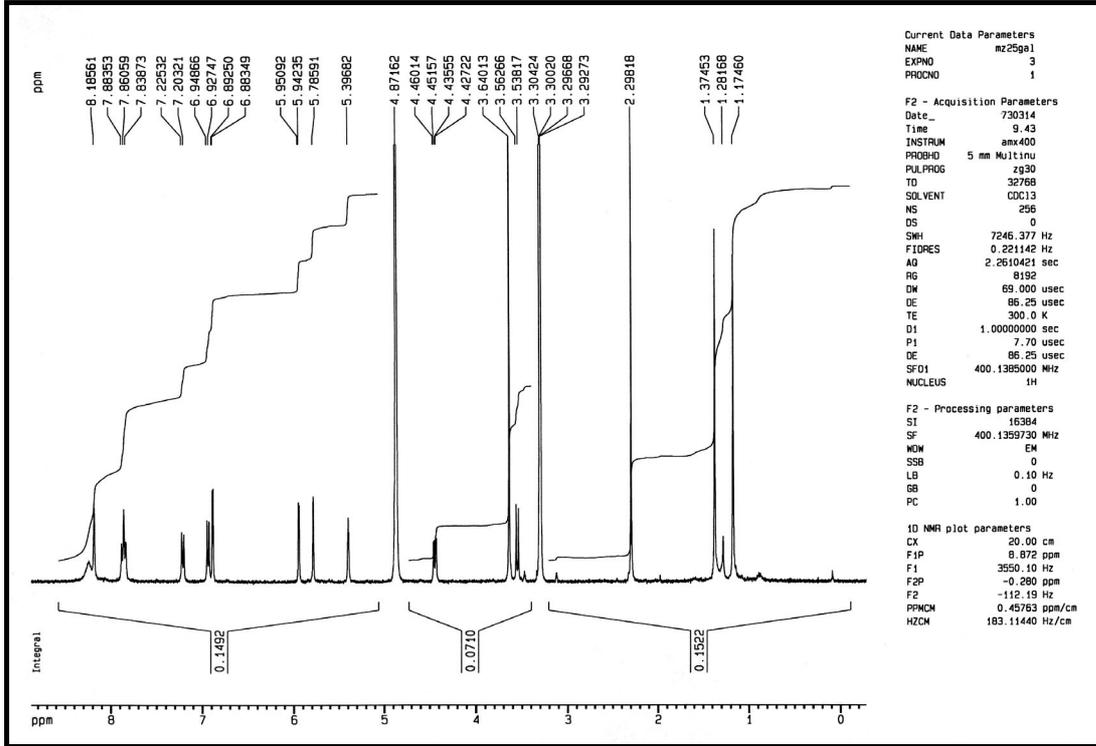
1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.758 ppm
 F1 3504.48 Hz
 F2P 0.110 ppm
 F2 44.21 Hz
 FWHM 0.43239 ppm/cm
 HZCM 173.01376 Hz/cm

MS-Spektrum

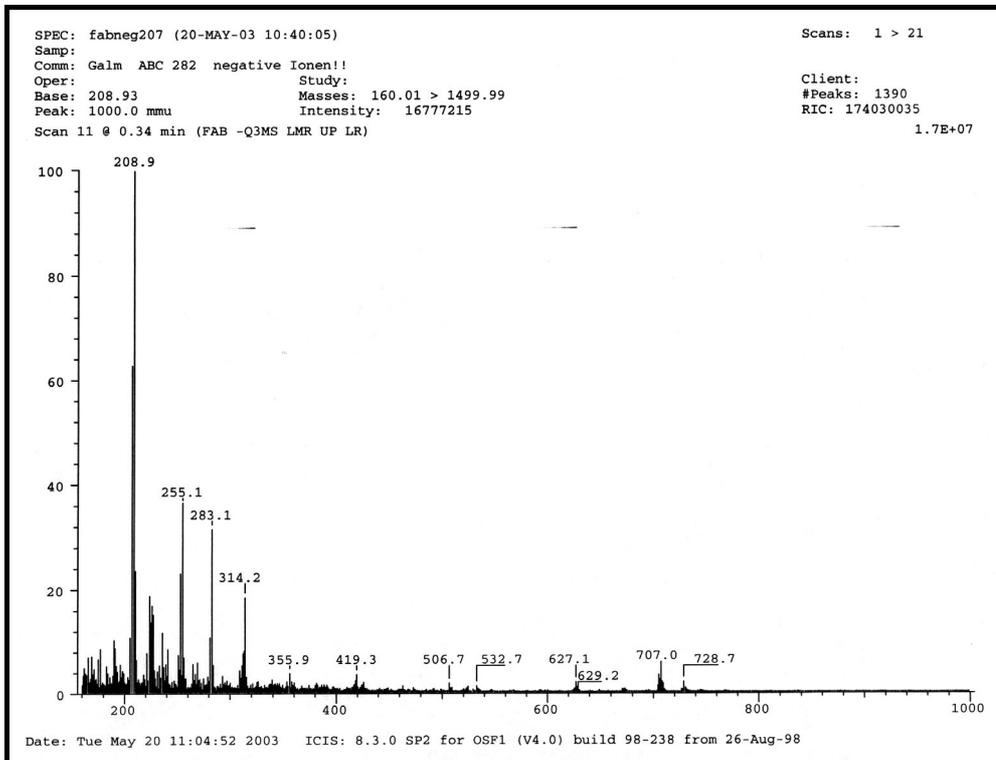


Novclobiocin 282

¹H-NMR-Spektrum

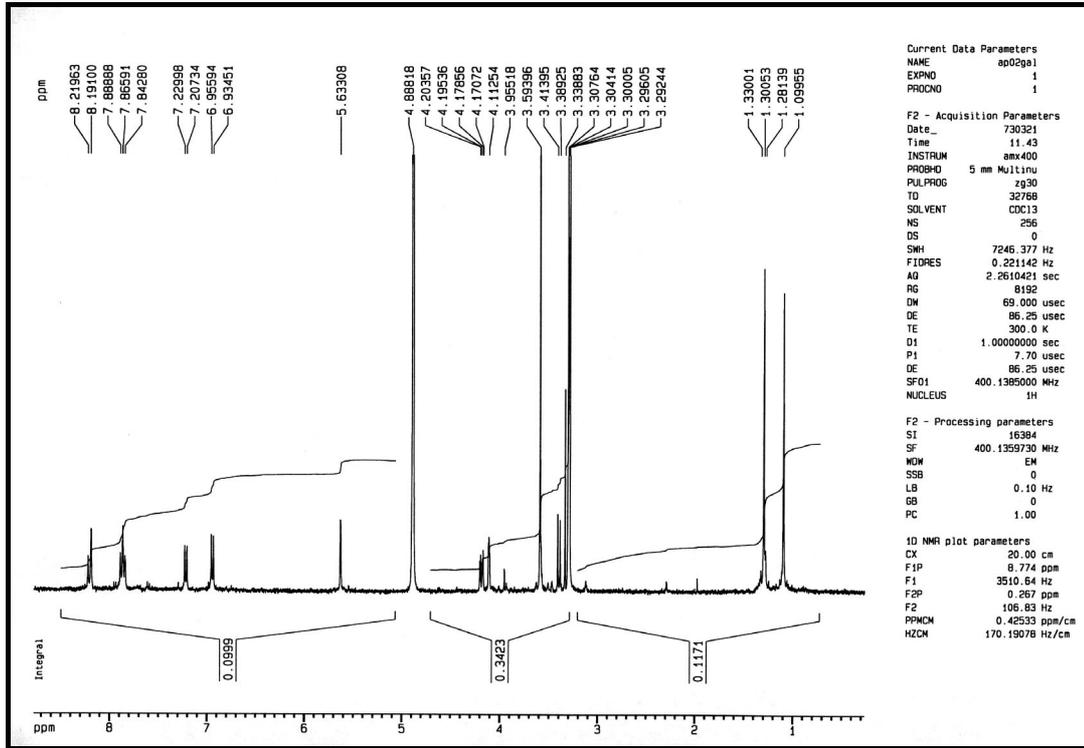


MS-Spektrum

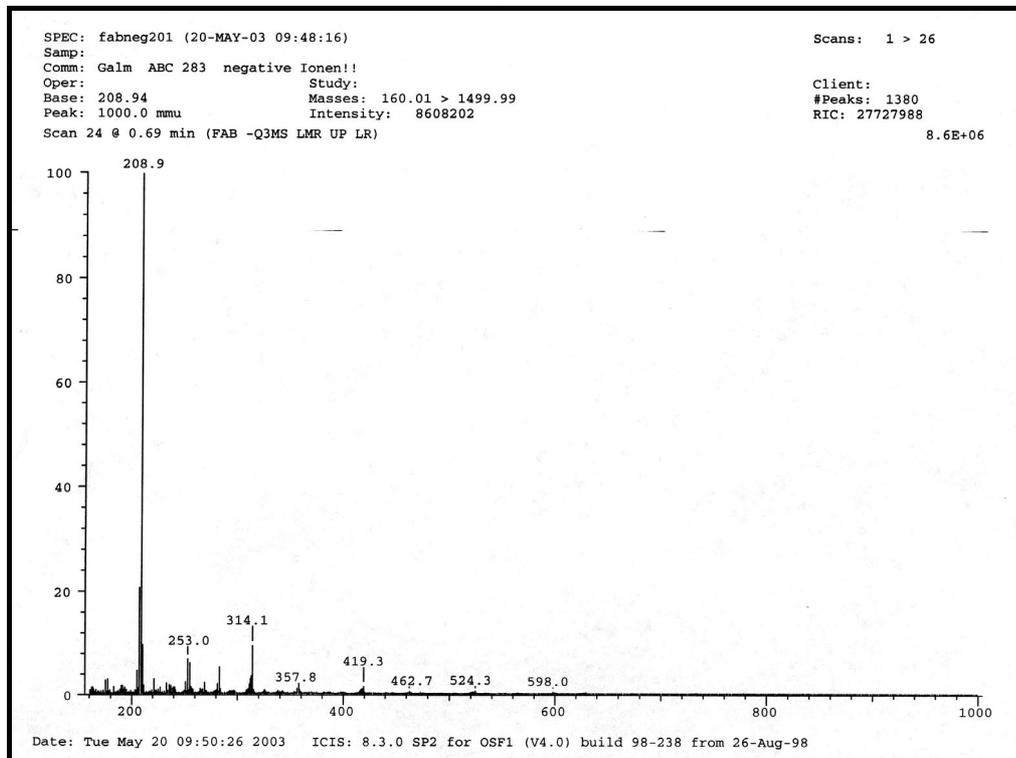


Novclobiocin 283

¹H-NMR-Spektrum

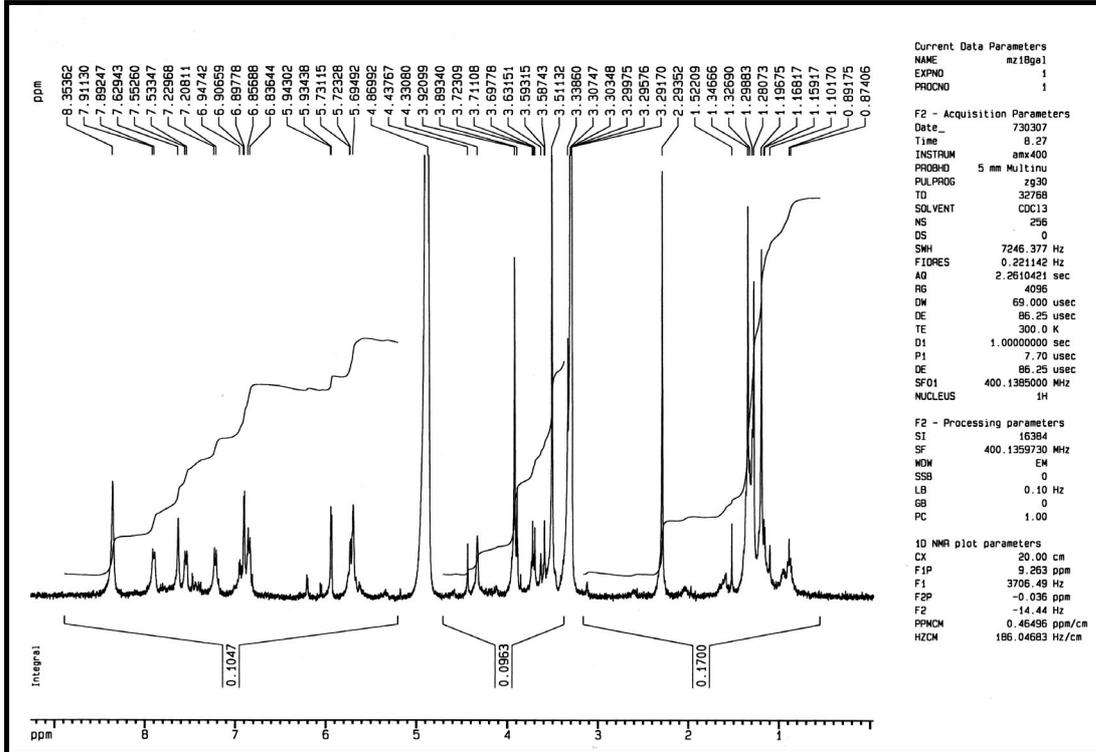


MS-Spektrum

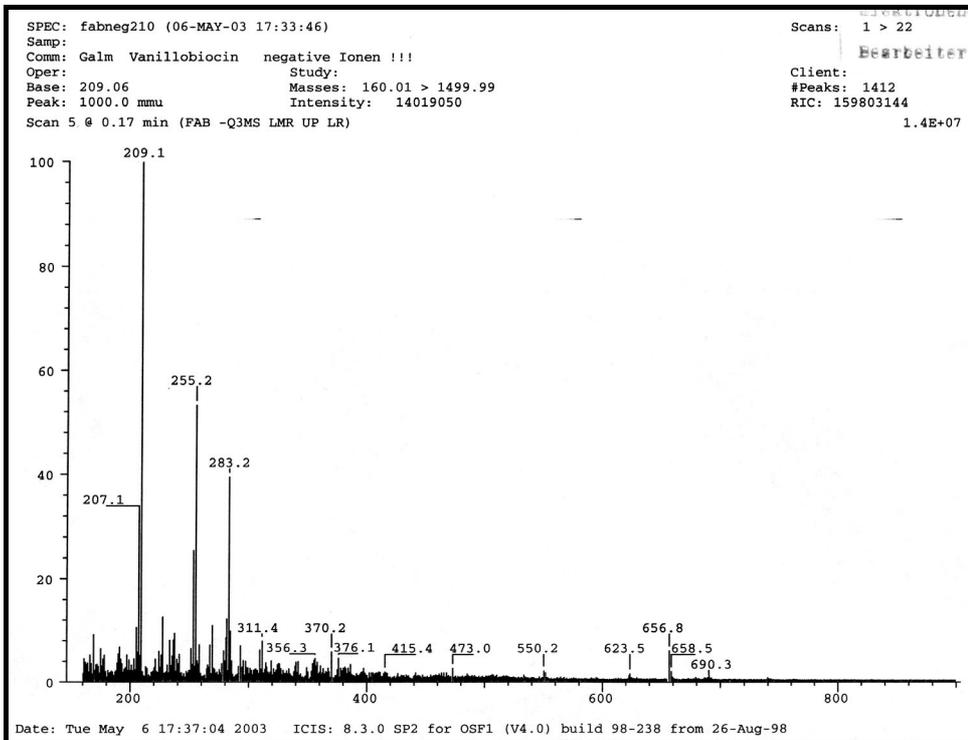


Novclobiocinsäure 311 (Vanillobiocin)

¹H-NMR-Spektrum

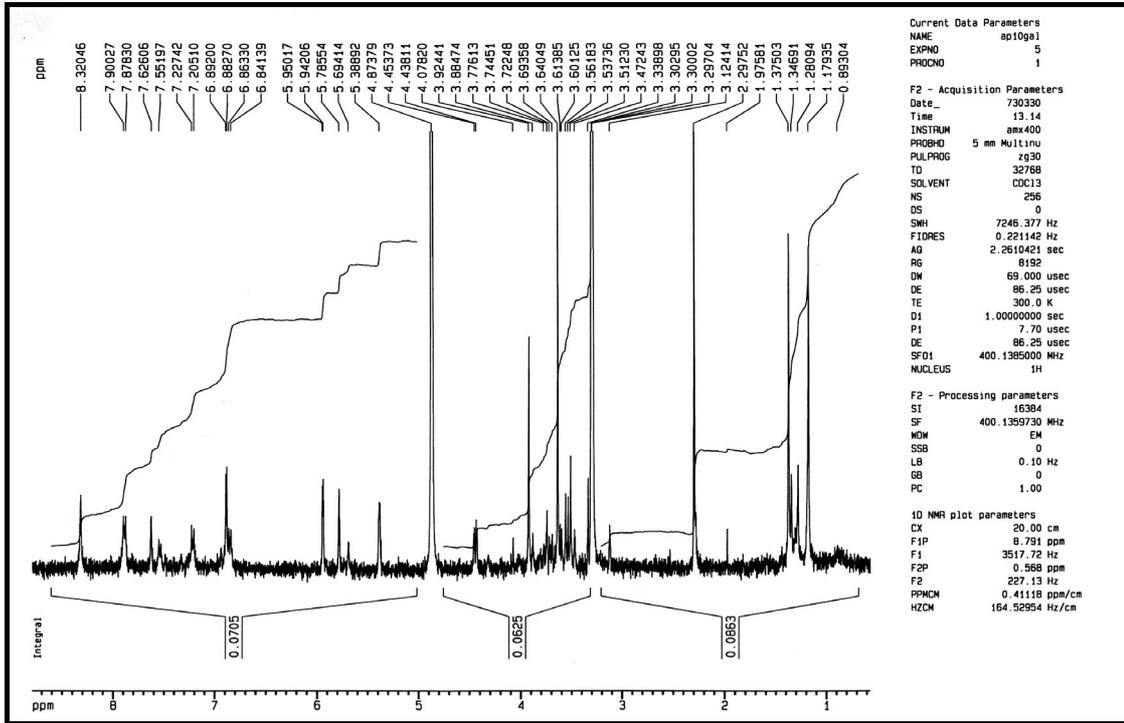


MS-Spektrum

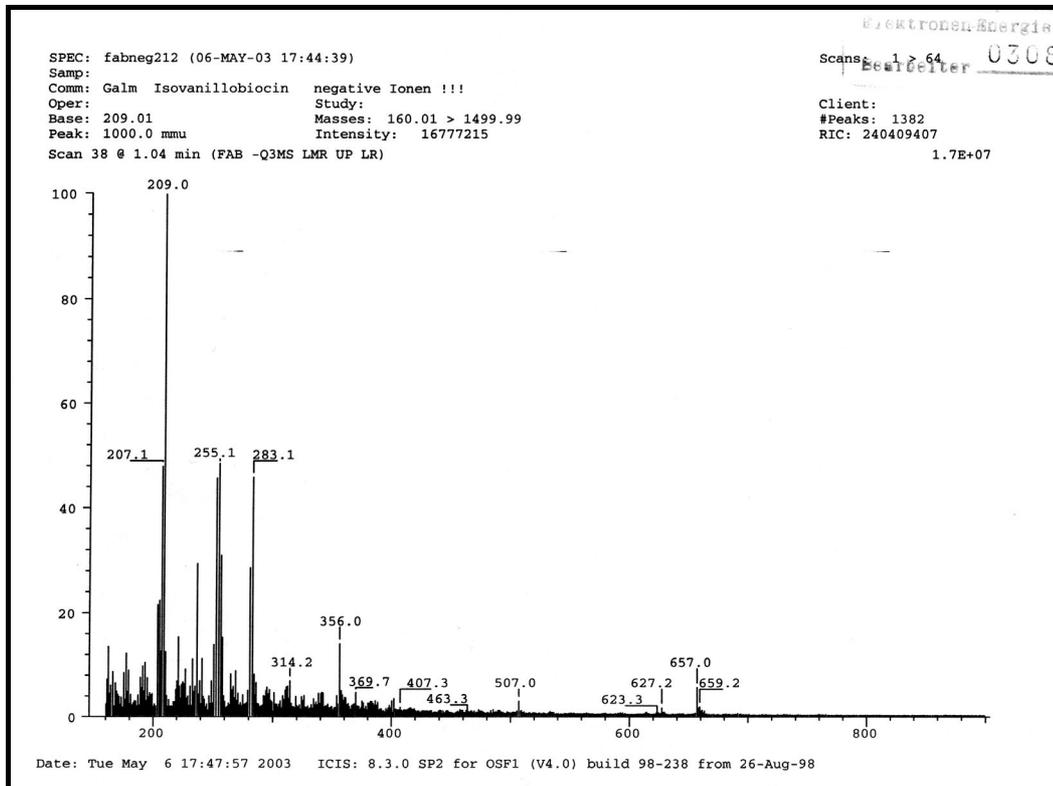


Novclobiocin 312 (Isovanillobiocin)

¹H-NMR-Spektrum

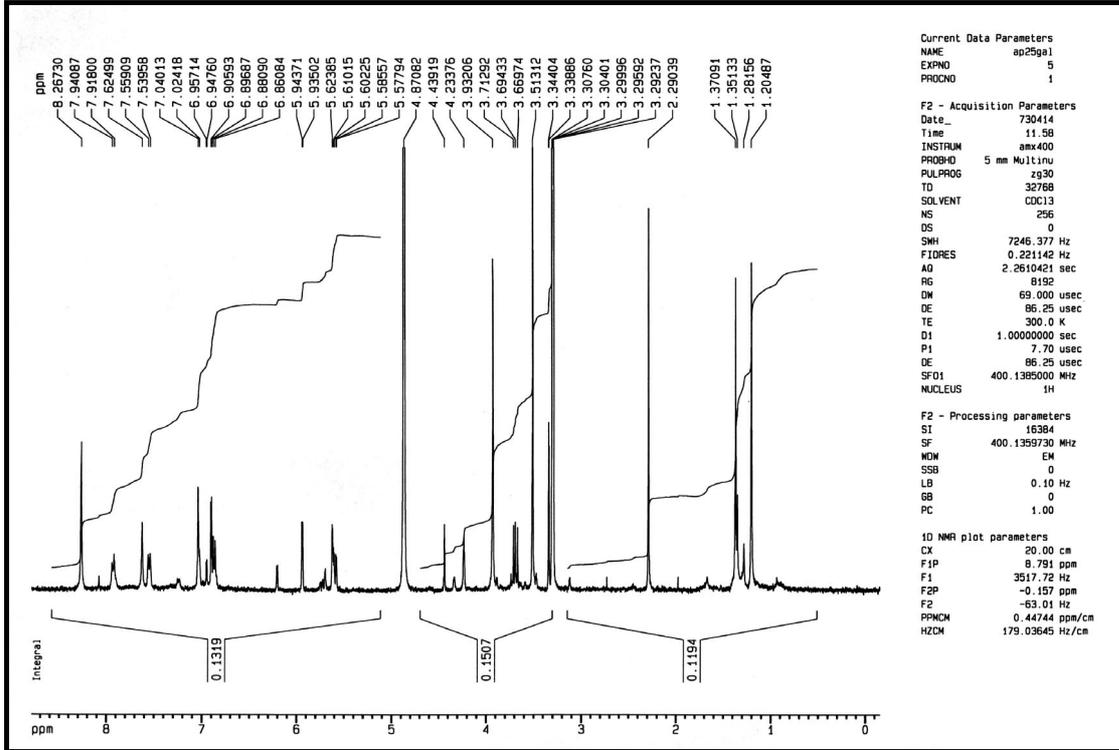


MS-Spektrum

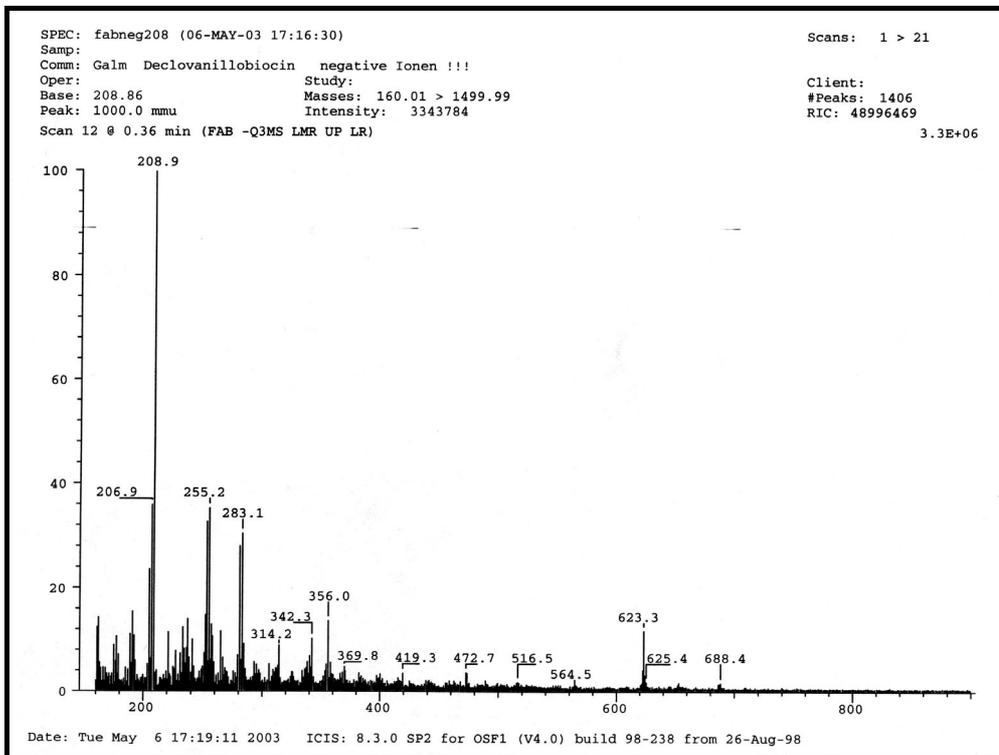


Novclobiocin 313 (Declovanillobiocin)

¹H-NMR-Spektrum

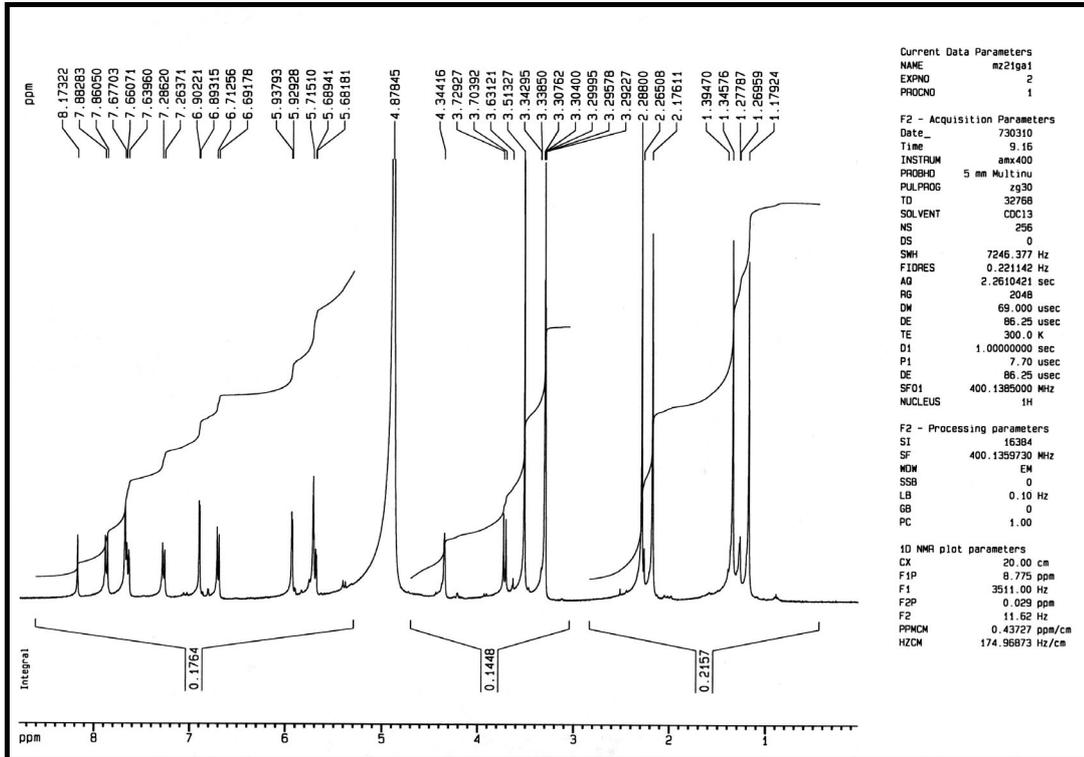


MS-Spektrum

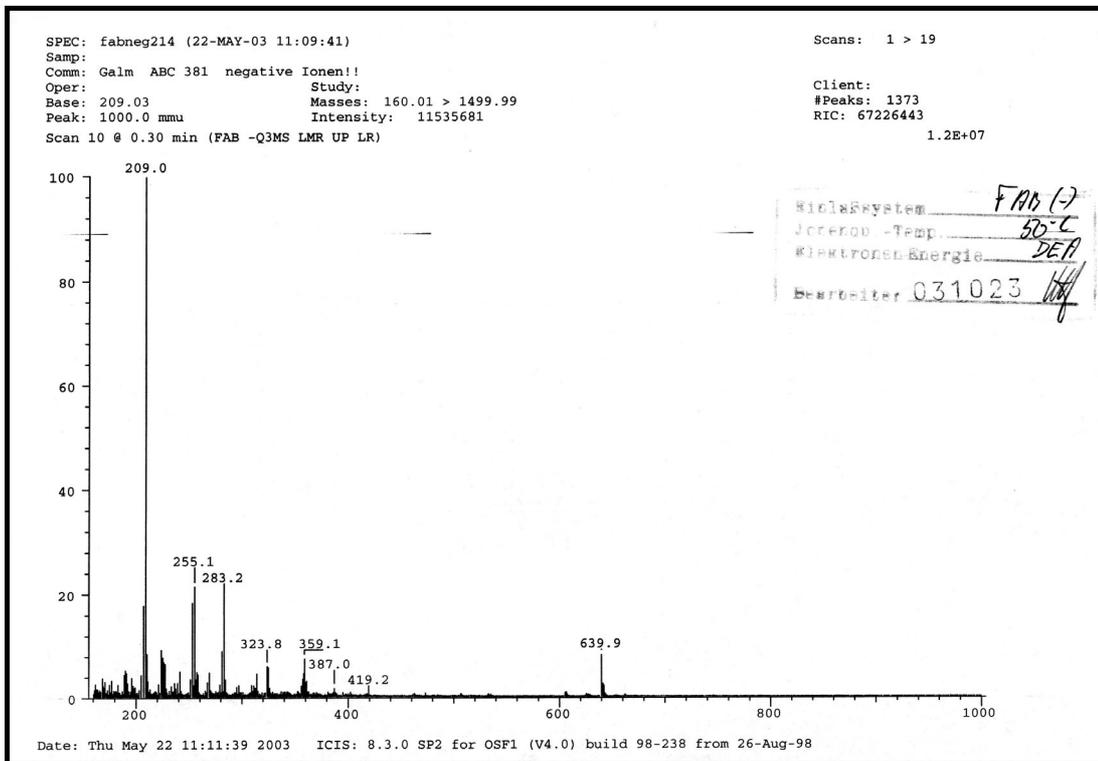


Novclobiocin 381

¹H-NMR-Spektrum

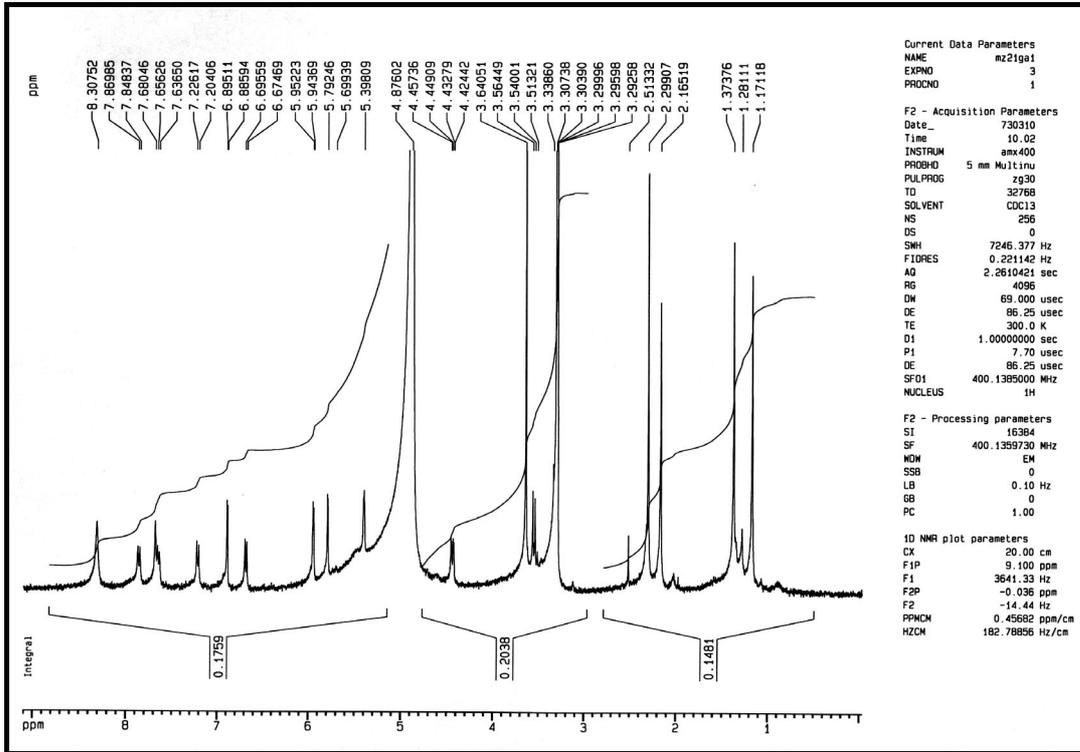


MS-Spektrum

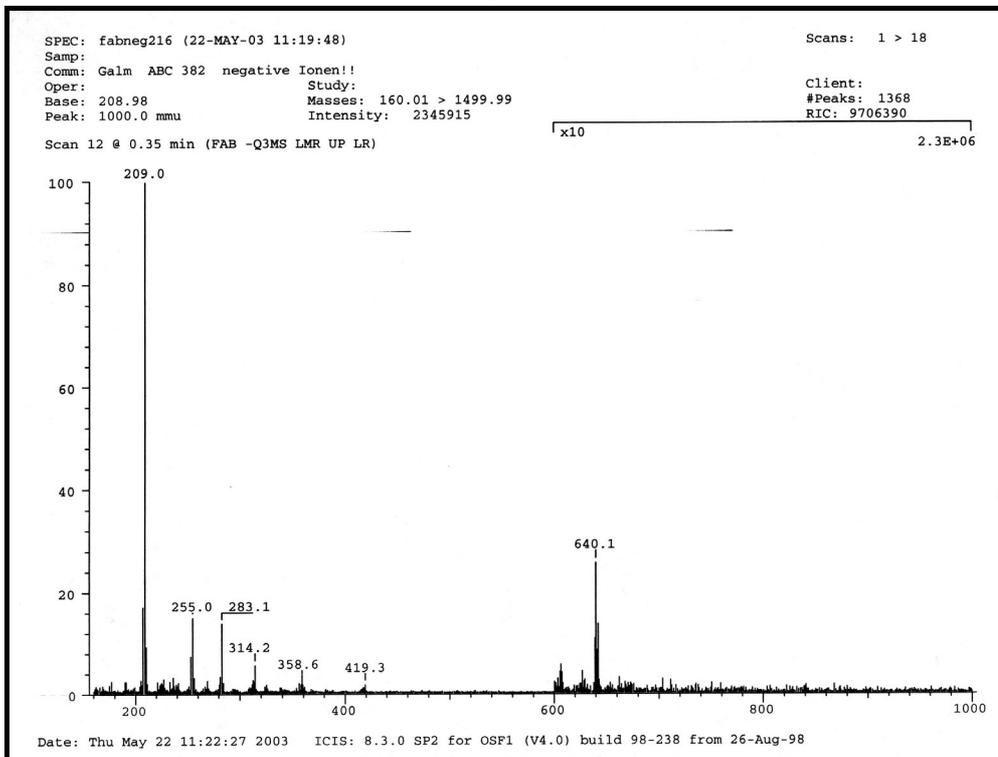


Novclobiocin 382

¹H-NMR-Spektrum

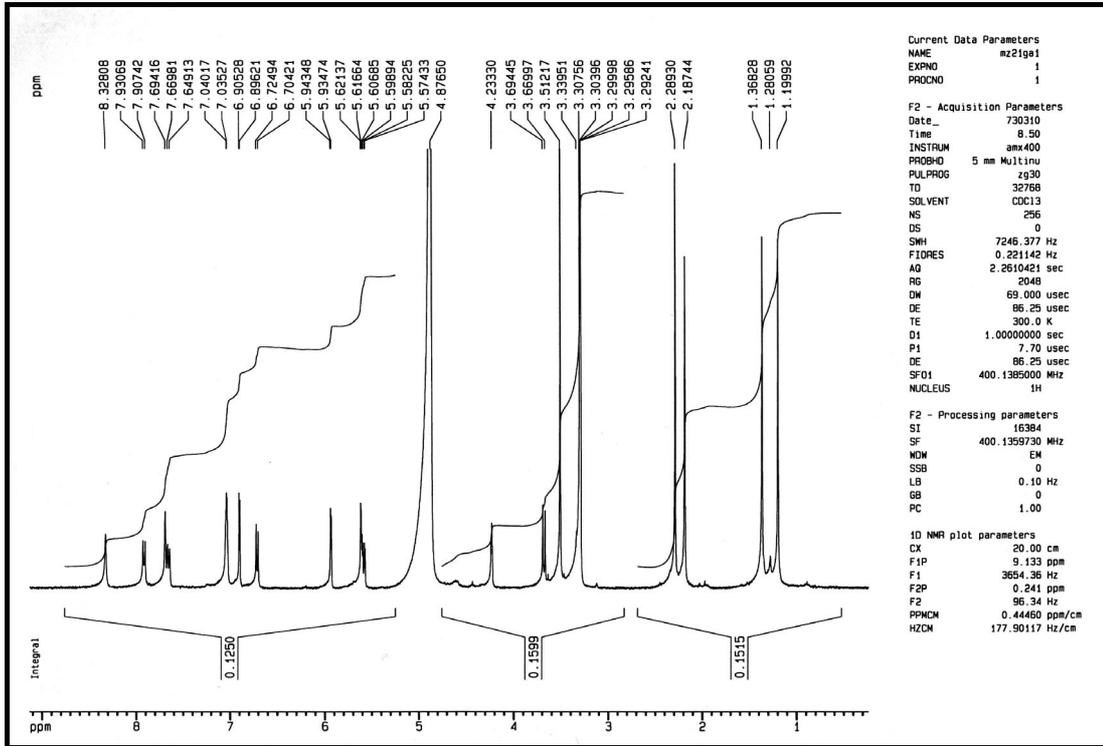


MS-Spektrum

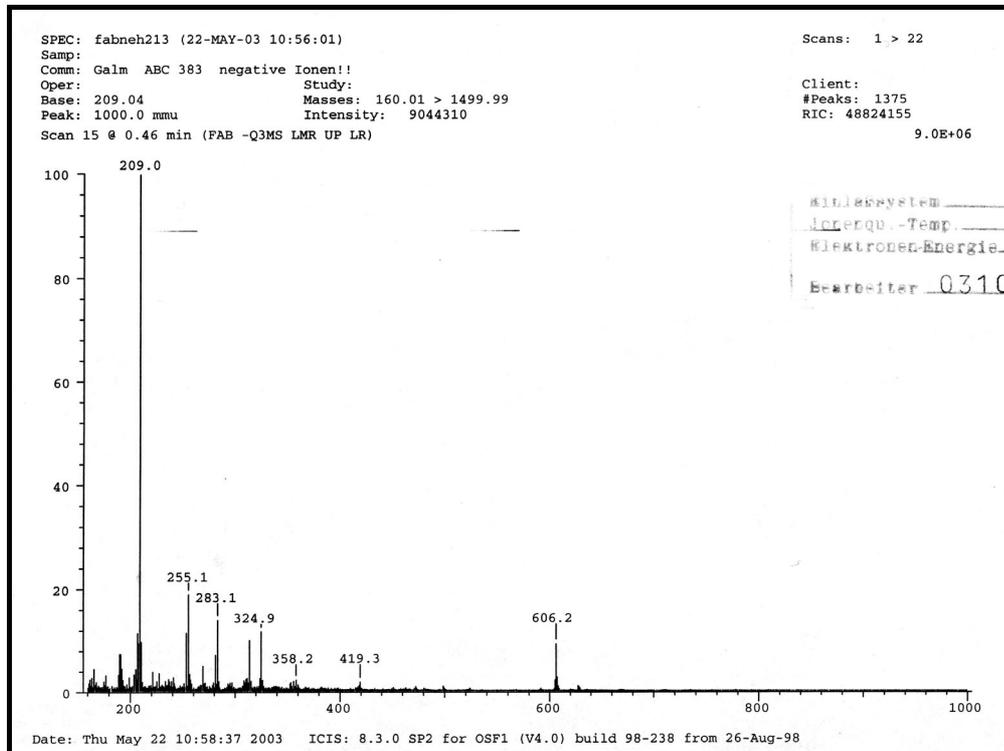


Novclobiocin 383

¹H-NMR-Spektrum

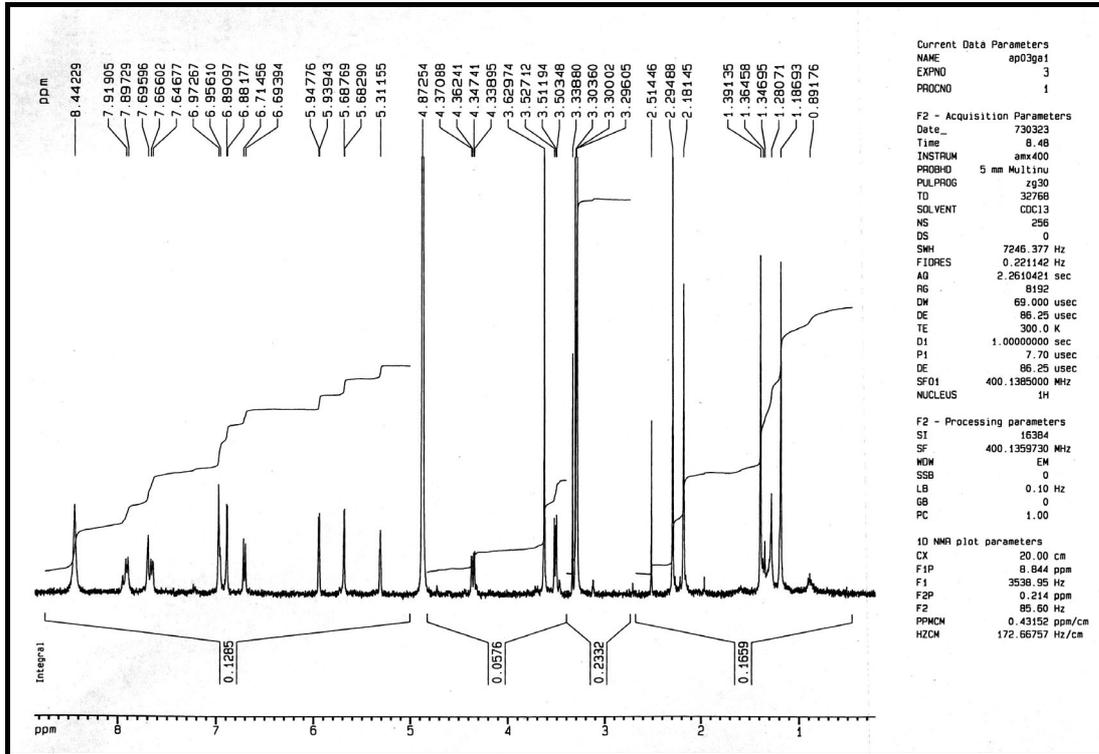


MS-Spektrum

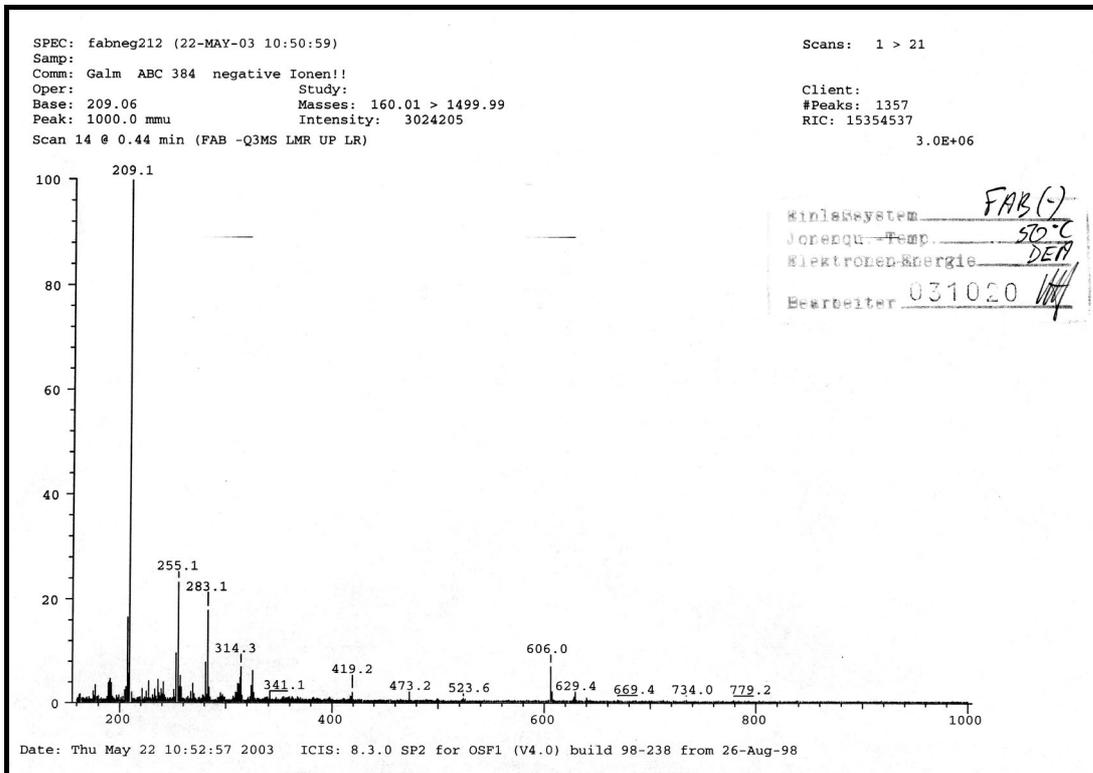


Novclobiocin 384

¹H-NMR-Spektrum

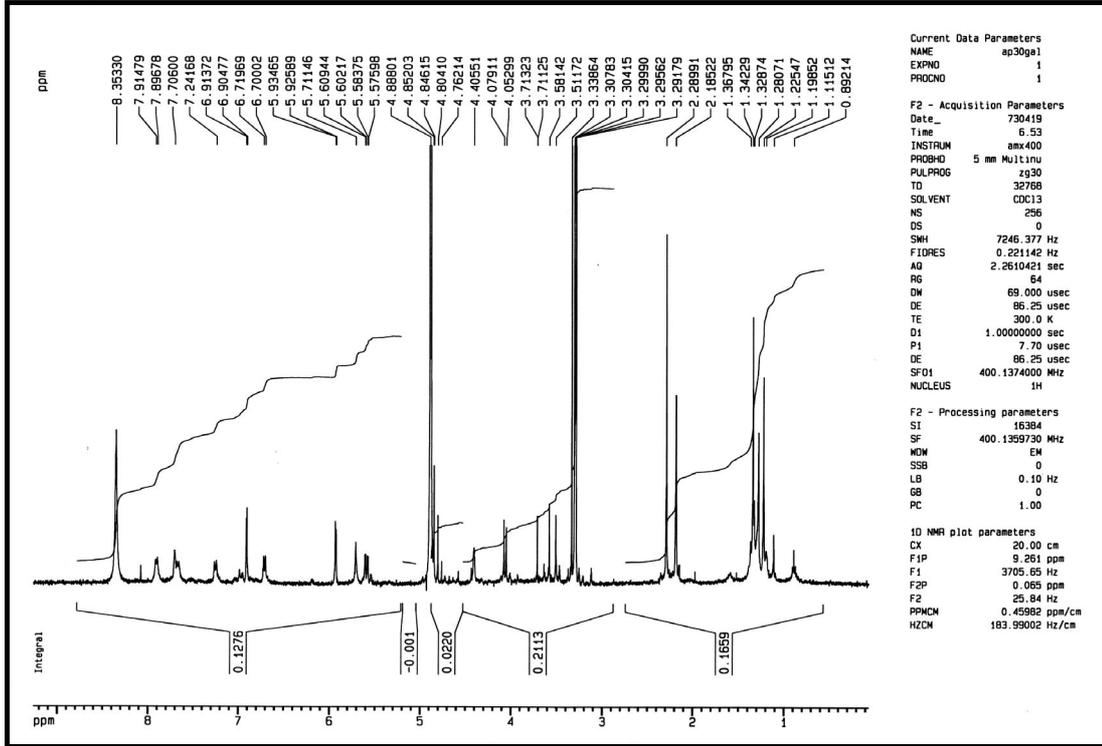


MS-Spektrum



Novclobiocin 385

¹H-NMR-Spektrum



3 ¹H-NMR-Daten der Novclobiocine

In den unten aufgeführten Tabellen sind die ¹H-NMR-Daten von Clorobiocin sowie den isolierten Novclobiocinen in *d*4-Methanol aufgelistet. Die chemische Verschiebung *d* ist in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal (3.30 ppm) wurde als Referenz verwendet. Die Spektren wurden durch Messung bei 400 MHz erhalten.

^abr = breites Singulett.

^bKomplexes, überlappendes Signal; Kopplungskonstante *J* nicht bestimmbar.

Position	<i>d</i> , Multiplizität (J/Hz)			
	Clorobiocin	Novclobiocin 211	Novclobiocin 212	Novclobiocin 213
2-H	7.76, d (2.5)	7.78, d (2.1)	7.78, s	7.79, d (2.0)
5-H	6.84, d (8.4)	6.82, d (8.4)	6.81, d (8.4)	6.80, d (8.4)
6-H	7.72, dd (8.4; 2.5)	7.72, dd (8.4, 2.2)	7.72, dd (8.4, 2.1)	7.72, dd (7.9, 2.0)
7-H2	3.34, d (7.1)	2.62, t (7.9)	2.61, t (7.4)	2.62, t (7.6)
8-H	5.35, br ^a t (7.1)	-	-	-
8-H2	-	1.65, sext. (7.5)	1.65, sext. (7.4)	1.65, sext. (7.5)
9-H3	-	0.97, t (7.4)	0.96, t (7.4)	0.96, t (7.3)
10-H3	1.74, s	-	-	-
11-H3	1.75, s	-	-	-
5'-H	7.90, d (9.2)	7.89, d (9.0)	7.88, d (8.9)	7.89, d (9.1)
6'-H	7.33, d (9.2)	7.29, d (9.1)	7.23, d (9.0)	7.22, d (8.9)
8'-H	-	-	-	-
1''-H	5.73, d (1.8)	5.72, d (2.4)	5.79, d (2.0)	5.63, d (1.7)
2''-H	4.34, t (2.7)	4.34, t (2.6)	5.39, t (3.1)	4.11, t (1.9)
3''-H	5.71, dd (10.3; 2.9)	5.71, dd (10.3, 3.1)	4.44, dd (9.7, 3.5)	4.19, dd (9.8, 3.2)
4''-H	3.72, d (10.3)	3.72, d (10.2)	3.55, d (9.8)	3.40, d (9.9)
6''-H3	1.18, s	1.18, s	1.17, s	1.10, s
7''-H3	1.35, s	1.35, s	1.37, s	1.30, s
8''-OCH3	3.52, s	3.51, s	3.64, s	3.59, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.7)	-
4'''-H	5.94, br d (3.6)	5.94, d (3.5)	5.95, d (3.5)	-
6'''-H3	2.29, s	2.29, s	2.30, s	-

Position	d, Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 214	Novclobiocinsäure 215	Novclobiocinsäure 216
2-H	7.79, br s	7.78, br s	7.78, br s
5-H	6.82, d (8.3)	6.80, d (8.2)	6.81, d (8.5)
6-H	7.73, d (8.7)	7.71, dd (9.8, 2.3)	7.72, dd (8.2, 2.6)
7-H2	2.63, t (7.8)	2.62, t (7.3)	2.62, t (7.4)
8-H2	1.66, sext. (7.5)	1.65, q (7.3)	1.65, sext. (7.2)
9-H3	0.97, t (7.3)	0.96, t (7.3)	0.96, t (7.4)
5'-H	7.92, d (8.7)	7.77, d (11.0)	7.82, d (8.6)
6'-H	7.04 br ^b	6.85, d (8.7)	6.74, dd (8.8, 1.3)
8'-H	7.04, br ^b	-	6.65, d (1.3)
1''-H	5.70, br s	-	-
2''-H	4.23, br s	-	-
3''-H	5.60, dd (13.2, 3.5)	-	-
4''-H	3.68, d (9.8)	-	-
6''-H3	1.20, s	-	-
7''-H3	1.37, s	-	-
8''-OCH3	3.51, s	-	-
3'''-H	6.90, d (3.6)	-	-
4'''-H	5.94, d (3.8)	-	-
6'''-H3	2.29, s	-	-

Position	d, Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 221	Novclobiocin 222	Novclobiocinsäure 223	Novclobiocinsäure 224
2-H	7.78, s	7.79, s	7.78, s	7.78, s
5-H	6.83, d (8.4)	6.83, d (8.4)	6.83, d (8.3)	6.84, d (8.3)
6-H	7.75, d (8.4)	7.75, d (7.1)	7.75, db	7.75, d (8.4)
7-H2	3.39, d (6.6)	3.39, d (6.6)	3.39, d (6.5)	3.40, d (6.5)
8-H	6.02, m	6.02, m	6.02, m	6.02, m
9a-H (trans)	5.02, dd (10.2, 1.8)	5.01, dd (11.0, 1.3)	5.02, dd (10.2, 1.7)	5.02, dd (10.4, 1.9)
9b-H (cis)	5.06, dd (17.2, 1.8)	5.05, dd (16.8, 1.3)	5.06, dd (17.1, 1.7)	5.06, dd (17.5, 1.9)
5'-H	7.88, d (9.3)	7.89, d (8.4)	7.75, db	7.81, d (8.8)
6'-H	7.25, d (9.3)	7.22, d (8.9)	6.88, d (8.7)	6.76, dd (9.6, 1.9)
8'-H	-	-	-	6.67, d (1.9)
1''-H	5.72, d (3.6)	5.78, d (2.0)	-	-
2''-H	4.34, br s	5.38, t (2.6)	-	-
3''-H	5.70 ^b	4.44 dd (9.7, 3.5)	-	-
4''-H	3.71, d (10.2)	3.55, d (9.8)	-	-
6''-H3	1.18, s	1.18, s	-	-
7''-H3	1.34, s	1.37, s	-	-
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	-	-
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.5)	-	-
4'''-H	5.94, d (3.1)	5.95, d (3.1)	-	-
6'''-H3	2.29, s	2.30, s	-	-

Position	d, Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 231	Novclobiocin 232	Novclobiocin 233
2-H	7.98, s	7.96, d (3.5)	7.99, br s
5-H	6.86, d (8.3)	6.84, d (8.4)	6.85, d (8.6)
6-H	7.81, d (8.7)	7.80, dd (8.2, 3.5)	7.82, d (7.7)
7-H	4.87 ^b	4.87 ^b	4.87 ^b
9-H2	3.45, q (7.0)	3.45, q (6.9)	3.45, q (7.0)
10-H3	1.20, t (7.0)	1.20, t (7.0)	1.20, t (6.4)
11-H3	1.41, d (6.4)	1.41, d (6.4)	1.41, d (6.4)
5'-H	7.90, d (8.7)	7.89, d (9.0)	7.93, d (9.0)
6'-H	7.28, d (8.9)	7.23, d (9.0)	7.01, d (7.2)
8'-H	-	-	7.01, d (7.2)
1''-H	5.72, s	5.79, d (1.9)	5.61, s
2''-H	4.34, s	5.39, t (3.0)	4.23, br s
3''-H	5.71, dd (8.5, 2.9)	4.45, dd (9.8, 3.4)	5.59, dd (11.8, 3.1)
4''-H	3.72, d (10.2)	3.55, d (9.7)	3.68, d (9.9)
6''-H3	1.19, s	1.18, s	1.20, s
7''-H3	1.35, s	1.38, s	1.37, s
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	3.51, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.7)	6.90, d (3.6)
4'''-H	5.94, d (3.4)	5.95, d (3.5)	5.94, d (3.6)
6'''-H3	2.29, s	2.30, s	2.29, s

Position	d, Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 241	Novclobiocin 242	Novclobiocin 243
2-H	8.22, s	8.25, br s	8.32, br s
5-H	6.93, d (8.5)	6.93, d (7.6)	6.95, d (3.6)
6-H	7.71, d (7.7)	7.71, d (7.5)	7.72, d (8.3)
9-H	2.75, sept. (6.7)	2.75, sept. (6.8)	2.75, sept. (7.0)
10-H3	1.23, d (6.8)	1.23, d (6.7)	1.23, d (6.8)
11-H3	1.23, d (6.8)	1.23, d (6.7)	1.23, d (6.8)
5'-H	7.89, d (8.8)	7.88, d (9.0)	7.92, d (5.8)
6'-H	7.24, d (8.7)	7.23, d (8.5)	7.03 ^b
8'-H	-	-	7.03 ^b
1''-H	5.71 ^b	5.79, s	5.62, s
2''-H	4.34, s	5.39, br s	4.23, br s
3''-H	5.71 ^b	4.44, dd (9.7, 3.1)	5.60, dd (11.4, 3.0)
4''-H	3.71, d (10.2)	3.55, d (9.7)	3.70, d (7.7)
6''-H3	1.19, s	1.18, s	1.20, s
7''-H3	1.35, s	1.38, s	1.37, s
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	3.51, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.7)	6.90, d (3.6)
4'''-H	5.94, d (3.4)	5.95, d (3.4)	5.94, d (3.6)
6'''-H3	2.29, s	2.30, s	2.29, s

Position	d, Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 251	Novclobiocin 252	Novclobiocin 253
2-H	8.26, s	8.38, br s	8.38, br s
5-H	6.94, d (7.5)	6.94, br s	6.96, d (2.5)
6-H	7.71, d (7.3)	7.70, br s	7.72, d (7.7)
10-H3	1.33, s	1.32, s	1.33, s
11-H3	1.33, s	1.32, s	1.33, s
12-H3	1.33, s	1.32, s	1.33, s
5'-H	7.89, d (8.3)	7.88, br s	7.92, br s
6'-H	7.23, d (8.7)	7.20, br s	7.01b
8'-H	-	-	7.01b
1''-H	5.70, br s ^b	5.78, s	5.61, s
2''-H	4.33, s	5.39, s	4.23, s
3''-H	5.70 ^b	4.44, br s	5.60b
4''-H	3.71, d (9.7)	3.56, d (7.9)	3.70, d (8.3)
6''-H3	1.19, s	1.18, s	1.21, s
7''-H3	1.33, s	1.37, s	1.37, s
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	3.51, s
3'''-H	6.90, s	6.88, br s	6.90, d (5.0)
4'''-H	5.94, s	5.94, br s	5.94, d (5.0)
6'''-H3	2.29, s	2.29, s	2.29, s

Position	d, Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 261	Novclobiocin 262	Novclobiocinsäure 265	Novclobiocin 271
2-H	8.21, s	8.24, br s	8.29, s	8.02, d (1.8)
5-H	6.93, d (8.6)	6.92, d (7.9)	6.95, d (8.4)	6.96, d (8.6)
6-H	7.71, d (8.3)	7.72, d (7.9)	7.71, d (8.1)	7.81, dd (8.5, 1.9)
9-H2	2.45, t (6.6)	2.45, t (7.2)	2.46, t (7.4)	-
10-H2	1.72, m	1.72, m	1.72, t (7.3)	-
11-H2	1.39 ^b	1.37 ^b	1.39 ^b	-
12-H2	1.39 ^b	1.37 ^b	1.39 ^b	-
13-H3	0.93, t (6.6)	0.93, t (6.2)	0.94, t (6.8)	-
5'-H	7.89, d (8.1)	7.88, d (9.1)	7.81, d (8.6)	7.86, d (8.9)
6'-H	7.24, d (7.7)	7.21, d (9.1)	6.77, br d (8.5)	7.25, d (9.0)
1''-H	5.70, d ^b	5.79, s	6.67, d (1.8)	5.72, d (2.2)
2''-H	4.34, s	5.39, s	-	4.35, t (2.5)
3''-H	5.70, ddb	4.44, dd (8.1, 3.3)	-	5.70, dd (9.8, 3.1)
4''-H	3.71, d (5.5)	3.55, d (9.6)	-	3.72, d (10.2)
6''-H3	1.19, s	1.18, s	-	1.18, s
7''-H3	1.35, s	1.37 ^b	-	1.34, s
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	-	3.51, s
3'''-H	6.90, d (3.7)	6.89, d (3.6)	-	6.90, d (3.6)
4'''-H	5.94, d (3.5)	5.95, d (3.4)	-	5.94, d (3.4)
6'''-H3	2.29, s	2.30, s	-	2.29, s

Position	d, Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 272	Novclobiocin 281	Novclobiocin 282	Novclobiocin 283
2-H	8.02, d (2.0)	8.18, d (1.8)	8.19, br s	8.19, br s
5-H	6.97, d (8.5)	6.95, d (8.5)	6.94, d (8.5)	6.95, d (8.6)
6-H	7.81, dd (8.5, 2.1)	7.85, dd (7.5, 2.0)	7.85, d (8.7)	7.85, d (9.2)
5'-H	7.88, d (8.9)	7.87, d (8.9)	7.87, d (9.2)	7.88, d (9.2)
6'-H	7.24, d (9.0)	7.29, d (9.1)	7.21, d (8.8)	7.22, d (9.1)
1''-H	5.79, d (2.0)	5.73, d (1.7)	5.79, s	5.63, s
2''-H	5.39, t (2.1)	4.35, t (2.3)	4.40, s	4.11, s
3''-H	4.44, dd (9.7, 3.4)	5.70, dd (10.3, 3.1)	4.44, dd (9.8, 3.3)	4.19, dd (9.9, 3.3)
4''-H	3.55, d (9.8)	3.72, d (10.1)	3.55, d (9.8)	3.40, d (9.9)
6''-H3	1.17, s	1.18, s	1.17, s	1.10, s
7''-H3	1.38, s	1.35, s	1.37, s	1.30, s
8''-OCH3	3.64, s	3.52, s	3.64, s	3.59, s
3'''-H	6.89, d (3.6)	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.6)	-
4'''-H	5.95, d (3.3)	5.94, d (3.6)	5.95, d (3.4)	-
6'''-H3	2.30, s	2.29, s	2.30, s	-

Position	d, Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 381	Novclobiocin 382	Novclobiocin 383	Novclobiocin 384
2-H	7.68, s	7.68, s	7.69, s	7.70, br s
5-H	6.70, d (8.3)	6.69, d (8.4)	6.71, d (8.3)	6.70, d (8.2)
6-H	7.65, d (8.4)	7.65, d (7.9)	7.66, d (8.3)	7.66, d (7.7)
7-H3	2.18, s	2.17, s	2.19, s	2.18, s
5'-H	7.87, d (8.9)	7.86, d (8.6)	7.92, d (9.3)	7.91, d (8.7)
6'-H	7.27, d (9.0)	7.22, d (8.8)	7.04, d (2.0) ^b	6.97 ^b
8'-H	-	-	7.04, d (2.0) ^b	6.97 ^b
1''-H	5.71, s	5.79, s	5.62, s	5.69, d (1.9)
2''-H	4.34, s	5.40, s	4.23, s	5.31, br s
3''-H	5.70, dd (11.8, 3.0)	4.44, dd (9.8, 3.3)	5.59, dd (9.8, 3.2)	4.35, dd (9.4, 3.4)
4''-H	3.72, d (10.1)	3.55, d (9.8)	3.68, d (9.8)	3.52, d (9.5)
6''-H3	1.18, s	1.17, s	1.20, s	1.19, s
7''-H3	1.35, s	1.37, s	1.37, s	1.39, s
8''-OCH3	3.51, s	3.64, s	3.51, s	3.62, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.7)	6.90, d (3.6)	6.89, d (3.7)
4'''-H	5.94, d (3.5)	5.95, d (3.4)	5.94, d (3.5)	5.94, d (3.3)
6'''-H3	2.29, s	2.30, s	2.29, s	2.29, s

Position	d, Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 385	Novclobiocin 311 = Vanillobiocin	Novclobiocin 312 = Isovanillobiocin	Novclobiocin 313 = Declovanillobiocin
2-H	7.71, br s	7.63, s	7.63, s	7.62, s
5-H	6.71, d (7.9)	6.85, d (8.2)	6.85, d (8.0)	6.87, d (8.0)
6-H	7.67, d (8.2)	7.54, d (7.7)	7.55, d (6.6)	7.55, d (7.8)
7-H3	2.19, s	-	-	-
7-OCH3	-	3.92, s	3.92, s	3.93, s
5'-H	7.91, d (7.2)	7.90, d (7.5)	7.90, d (nd)	7.93, d (9.1)
6'-H	7.25, d (9.1)	7.22, d (8.6)	7.21, d (9.9)	7.04 ^b
8'-H	-	-	-	7.04 ^b
1''-H	5.71, br s	5.69, br s	5.78, s	5.62, s
2''-H	4.41, br s	4.33, br s	5.39, br s	4.23, br s
3''-H	5.59, dd (10.4, 2.9)	5.71, dd (12.9, 3.1)	4.44, dd (7.9, 3.2)	5.59, dd (9.8, 3.1)
4''-H	4.07, d (10.4)	3.71, d (10.1)	3.55, d (9.9)	3.70, d (7.4)
6''-H3	1.23, s	1.20, s	1.18, s	1.20, s
7''-H3	1.34, s	1.35, s	1.37, s	1.37, s
8''-OCH3	-	3.51, s	3.64, s	3.51, s
3'''-H	6.91, d (3.6)	6.90, d (3.5)	6.89, d (3.7)	6.90, d (3.6)
4'''-H	5.93, d (3.5)	5.94, d (3.5)	5.95, d (3.4)	5.94, d (3.5)
6'''-H3	2.29, s	2.29, s	2.30, s	2.29, s

4 Sequenz und Karte von pUG019

Plasmid: pUG019
 Definition: Ligation der Apra-Kassette mit FRT- und Primer-Sites
 ohne oriT in pBluescript SK(-)
 Größe: 3957 bp

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     CDS               699..717
                       /marker="Primer site reverse"
                       /product="ACT AGT CTG GAG CTG CTT C"
     CDS               complement (718..751)
                       /region="FRT"
                       /product="Natural FRT site"
     CDS               complement (764..1547)
                       /gene="aac(3) IV"
                       /product="aminoglycoside acetyltransferase
inactivating apramycin"
     CDS               1635..1668
                       /region="FRT"
                       /product="Natural FRT site"
     CDS               complement (1677..1696)
                       /marker="Primer site forward"
                       /product="ATT CCG GGG ATC TCT AGA TC"
     CDS               complement (2972..3832)
                       /gene="amp"
                       /product="b-lactamase"

```

Sequenz:

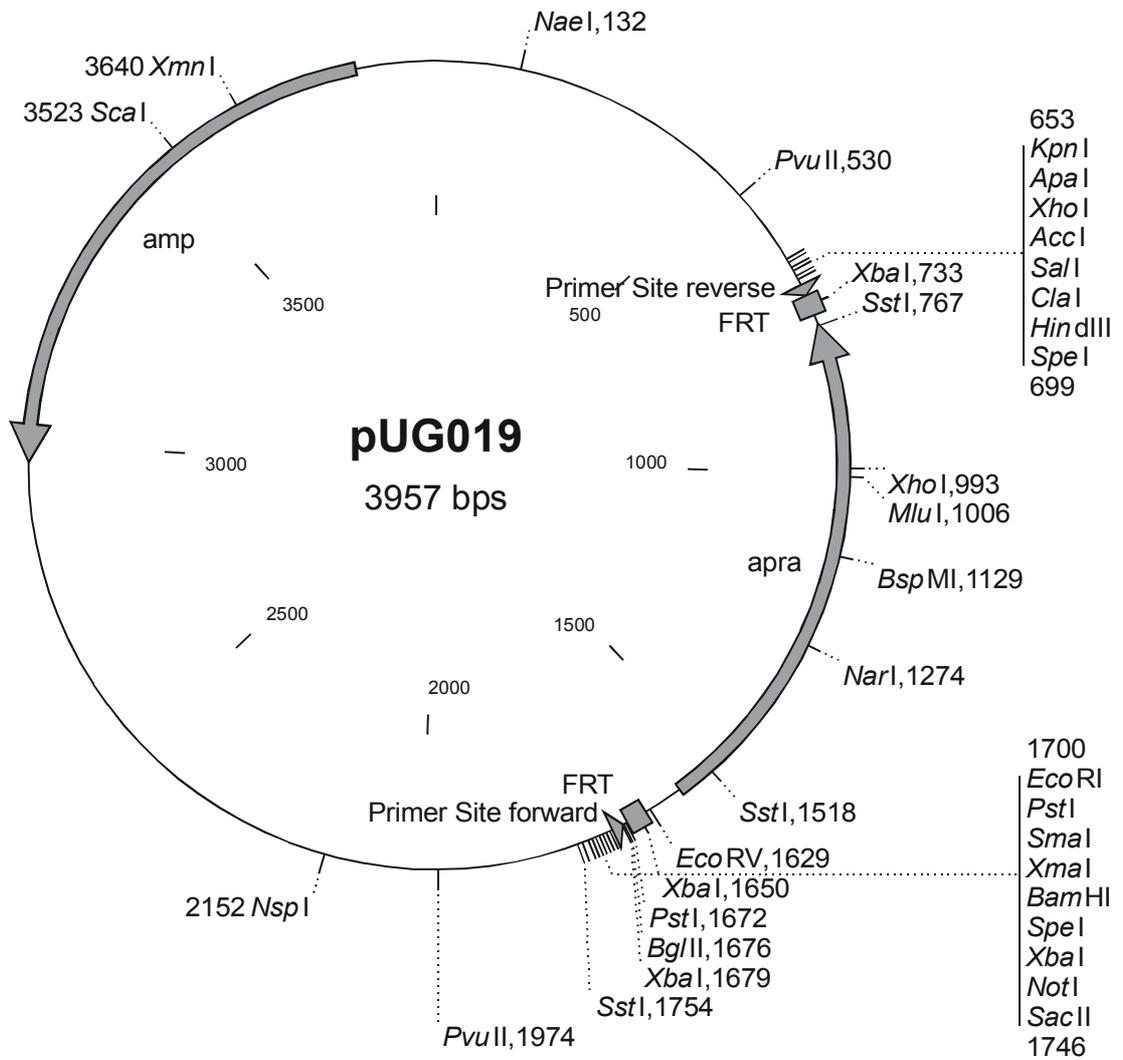
```

1  CACCTGACGC GCCCTGTAGC GCGCATTAAG GCGCGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG
61 TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC CCGCTCCTTT CGCTTCTTTC CCTTCCTTTC
121 TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC

```

181 GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA AAAAATTGA TTAGGGTGAT GGTTACGTA
 241 GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC GCCCTTTGAC GTTGGAGTCC ACGTTCTTTA
 301 ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA CACTCAACCC TATCTCGGTC TATTCTTTTG
 361 ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTCCGGCT ATTTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA
 421 AATTTAACGC GAATTTTAAC AAAATATTA CGCTTACAAT TTCCATTTCGC CATTACAGGCT
 481 GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA
 541 AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG
 601 TTGTAAAACG ACGGCCAGTG AATTGTAATA CGACTACTA TAGGGCGAAT TGGGTACCGG
 661 GCCCCCTC GAGTTCGACG GTATCGATAA GCTTGATGAC TAGTCTGGAG CTGCTTCGAA
 721 GTTCCCTATAC TTTCTAGAGA ATAGGAACTT CGGAATAGGA ACTTATGAGC CTAGCCAATC
 781 GACTGGCGAG CGGCATCGCA TTCTTCGCAT CCCGCCTCTG GCGGATGCAG GAAGATCAAC
 841 GGATCTCGGC CCAGTTGACC CAGGGCTGTC GCCACAATGT CGCGGGAGCG GATCAACCGA
 901 GCAAAGGCAT GACCGACTGG ACCTTCCTTC TGAAGGCTCT TCTCCTTGAG CCACCTGTCC
 961 GCCAAGGCAA AGCGCTCACA GCAGTGGTCA TTCTCGAGAT AATCGACGCG TACCAACTTG
 1021 CCATCCTGAA GAATGGTGCA GTGTCTCGGC ACCCCATAGG GAACCTTTGC CATCAACTCG
 1081 GCAAGATGCA GCGTCGTGTT GGCATCGTGT CCCACGCCGA GGAGAAGTAC CTGCCCATCG
 1141 AGTTCATGGA CACGGGCGAC CGGGCTTGCA GCGGAGTGAG GTGGCAGGGG CAATGGATCA
 1201 GAGATGATCT GCTCTGCCTG TGGCCCCGCT GCCGCAAAGG CAAATGGATG GGCCTGCGC
 1261 TTTACATTTG GCAGGCGCCA GAATGTGTCA GAGACAACCT CAAGGTCCGG TGTAAACGGG
 1321 GACGTGGCAG GATCGAACGG CTCGTCTGTC AGACCTGACC ACGAGGGCAT GACGAGCGTC
 1381 CCTCCCGGAC CCAGCGCAGC ACGCAGGGCC TCGATCAGTC CAAGTGGCCC ATCTTCGAGG
 1441 GGCCGGACGC TACGGAAGGA GCTGTGGACC AGCAGCACAC CGCCGGGGGT AACCCCAAGG
 1501 TTGAGAAGCT GACCGATGAG CTCGGCTTTT CGCCATTCGT ATTGCACGAC ATTGCACTCC
 1561 ACCGCTGATG ACATCAGTCG ATCATAGCAC GATCAACGGC ACTGTTGCAA ATAGTCGGTG
 1621 GTGATAAAGA TATCGAAGTT CCTATACTTT CTAGAGAATA GGAACCTCGA ACTGCAGATC
 1681 TAGAGTCCC CGGAATATCG AATTTCTGCA GCCCGGGGGA TCCACTAGTT CTAGACTGGC
 1741 GCCCACCGCC GTGAGCTCC AGCTTTTGTG CCCTTTAGTG AGGGTTAATT TCGAGCTTGG
 1801 CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA
 1861 ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA
 1921 CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC
 1981 ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT
 2041 CCTCGCTCAC TGAATCGCTG CGCTCGGTG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT
 2101 CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
 2161 CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCCATA
 2221 GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC
 2281 CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTT CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG
 2341 TTCCGACCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC
 2401 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCCGGTGT GGTTCGTTTCG TCCAAGCTGG
 2461 GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC
 2521 TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA
 2581 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG
 2641 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
 2701 AAAGATTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG
 2761 TTTGCAAGCA CGAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATTTTTT
 2821 CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
 2881 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT
 2941 AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA
 3001 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
 3061 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC
 3121 GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA
 3181 GTGGTCTGCA AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG
 3241 TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCACA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG
 3301 TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 3361 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT CCGATCGTTG
 3421 TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC
 3481 TTACTGTGAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT
 3541 TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GGCGTCAATA CGGGATAATA
 3601 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 3661 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA
 3721 ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTACCA CCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGTAAGGC
 3781 AAAATGCCGC AAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC
 3841 TTTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG
 3901 AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGC

Karte von pUG019



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. L. Heide für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie für die wissenschaftliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Fiedler danke ich für die Übernahme des Koreferates und für die Unterstützung bei der Analytik der Simocyclinone.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Dr. S.-M. Li, der immer ein offenes Ohr für wissenschaftliche sowie organisatorische Fragen hatte und dessen Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn H.-P. Trefzer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Produktion und Isolierung neuer Aminocoumarine sowie für die netten und interessanten Gespräche bedanken.

Frau Dr. J. Schimana danke ich für die Hilfe bei Fragen zur Kultivierung von *S. antibioticus* Tü 6040 und bei der Analytik der Simocyclinone.

Prof. Dr. L. A. Wessjohann und Dr. M.-A. Dessoy (Halle (Saale)) danke ich für die Überlassung verschiedener synthetischer 3,4-disubstituierter Benzoessäure-Derivate und bei Herrn Dr. J. Schmidt (Halle (Saale)) möchte ich mich für die LC-MS-Analysen von enzymatisch und mutasynthetisch generierten Produkten bedanken.

Bei Prof. Dr. A. Maxwell (John Innes Centre, Norwich, UK) bedanke ich mich für die freundliche Versorgung mit gereinigter *E. coli* DNA-Gyrase und relaxierter pBR322-DNA.

Prof. Dr. M. Page, Dr. S. Shapiro und Frau S. Heller (Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz) danke ich für die Ermöglichung der MIC-Bestimmungen mit humanpathogenen Mikroorganismen und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Experimente.

Danken möchte ich auch Frau Lörcher für die stete Hilfsbereitschaft bei verwaltungstechnischen Fragen sowie Frau Bauer für die nette Betreuung und beiden für die zahlreichen netten Gespräche.

Ganz herzlich danke ich allen ehemaligen und jetzigen Kollegen Agnes, Alessandra, Andreas, Anja, Anne, Bettina, Claudia, Christine, Daniela, Dirk, Elisabeth, Emmanuel, Florence, Gabriele, Hui, Inge, Irmela, Karin, Katja, Lucy, Manuel, Marion, Robert, Silvie, Shuming, Susanne, Thomas, Yvonne und Zhaoxin für die ausgesprochen freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die schönen gemeinsamen Unternehmungen.

Außerdem danke ich ganz besonders herzlich meiner großen Liebe Steffen, der mir durch seelische und moralische Unterstützung, konstruktive Kritik sowie seine endlose Geduld in all den Jahren der beste Freund war.

Akademische Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrern, den Herren Professoren und Privatdozenten:

H. P. T. Ammon
K. Botzenhart
G. Gauglitz
P. Grabmayr
L. Heide
K.-A. Kovar
U. Nagel
H. Pommer
E. Reinhard
H. J. Roth
P. C. Schmidt
J. E. Schultz
A. Wankmüller

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ute Gisela Galm
 Geburtsdatum: 24. Juli 1972
 Geburtsort: Kempten (Allgäu)

Schulbildung

1979 – 1983 Grundschole in Stuttgart
 1983 – 1992 Leibniz-Gymnasium in Stuttgart
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung und Praktika

Oktober 1992 Beginn des Pharmaziestudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 März 1995 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 April 1997 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 Mai 1997 – Oktober 1997 Pharmaziepraktikantin in der Dr. Beck'schen Apotheke in Stuttgart
 November 1997 – April 1998 Pharmaziepraktikantin bei der Firma Azupharma GmbH in Gerlingen
 Mai 1998 – Juli 1998 Assistentin der Herstellungsleitung bei der Firma Azupharma GmbH in Gerlingen
 Mai 1998 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
 Juni 1998 Approbation als Apothekerin
 September 1998 – Oktober 2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-antibiotika Simocyclinon D8, Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁“ am Institut für Pharmazeutische Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. L. Heide
 Juli 1999 Certificate in Pharmacy Practice, London School of Pharmacy

Lehrtätigkeit

September 1998 – Oktober 2003 Organisation und Betreuung verschiedener Praktika für Pharmaziestudenten der Universität Tübingen sowie des „Zertifikatskurses Klinische Pharmazie“ für approbierte Apotheker an der Universität Tübingen.