

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen zur Biosynthese der
Aminocoumarin-Antibiotika
Clorobiocin und Coumermycin A₁**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Anja Freitag

Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.2006
Dekan:	Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. L. Heide
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S.-M. Li

Für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. L. Heide am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Prof. Dr. L. Heide, für die Überlassung des Themas sowie seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. S.-M. Li danke ich für die gute Betreuung, für die Möglichkeit ihn jederzeit mit wissenschaftlichen und organisatorischen Fragestellungen konsultieren zu können und für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. C. Mendez und Prof. Dr. J.A. Salas von der Universidad de Oviedo für die Bereitstellung der beiden Plasmidkonstrukte pRHAM und pMPU.

Dem N40-Laborteam Lucy Westrich und Thomas Luft danke ich für das tolle und freundschaftliche Laborklima, die gute Zusammenarbeit, die so manche PCR, Ligation oder Southern Blot zum Erfolg gebracht hat, und für die vielen Gespräche, die auch über das Fachliche hinausgingen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben: Frau Christine Anderle, Frau Silke Alt, Frau Bauer, Frau Dr. Claudia Biegert, Frau Daniela Brügel, Herrn Volker Dangel, Frau Dr. Alessandra da Silva Eustaquio, Frau Katja Fay, Frau Fischer, Frau Frickmann, Frau Dr. Ute Galm, Frau Kerstin Glück, Herrn Alexander Grundmann, Herrn Dr. Bertolt Gust, Frau Yvonne Haagen, Frau Susanne Hennig, Herrn Leonard Kaysser, Frau Lörcher, Frau Ute Metzger, Frau Dr. Florence Pojer, Frau Heike Rapp, Herrn Orwah Saleh, Frau Dr. Elisabeth Schmutz, Frau Katharina Sedding, Frau Nicola Steffan, Herrn Trefzer, Frau Inge Unsöld, Frau Dr. Irmela Wagner, Herrn Emmanuel Wemakor, Herrn Manuel Wolpert und Frau Dr. Hui Xu.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder & Familie und Andy bedanken, ohne deren Liebe, Hilfe und Beistand diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	1
ABKÜRZUNGEN	2
I EINLEITUNG	5
1. ANTIBIOTIKA UND IHRE PRODUZENTEN	5
2. AMINOCOUMARIN-ANTIBIOTIKA	8
2.1 Struktur der Aminocoumarine.....	8
2.2 Wirkung der Aminocoumarine.....	10
2.3 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung	11
2.4 Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika.....	12
2.4.1 Funktionelle Analyse der Biosynthesegene.....	13
2.4.1.1 Resistenzgene	13
2.4.1.2 Regulatorgene	14
2.4.1.3 Gene der Aminocoumarinring-Biosynthese.....	15
2.4.1.4 Gene der Desoxyzucker-Biosynthese.....	16
2.4.1.5 Gene für die Biosynthese der Acylkomponenten.....	17
2.4.1.6 Gene für die Verknüpfung der verschiedenen Strukturelemente.....	18
2.4.1.7 Gene für die 4''-O-Methylierung und 3''-O-Acylierung des Desoxyzuckers.....	19
3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
II MATERIAL UND METHODEN	25
1. CHEMIKALIEN	25
2. SÄULENMATERIALIEN	27
3. ENZYME UND KITS	27
4. NÄHRMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	28
4.1 Medien für Bakterienkultivierung	28
4.1.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	28
4.1.2 Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	28
4.1.3 Clorobiocin- Produktionsmedium	30
4.1.4 Elloramycin-Produktionsmedium.....	31
4.1.5 Coumermycin A ₁ -Produktionsmedium.....	31
4.1.6 Protoplastentransformation von <i>Streptomyces</i>	31
4.2 Antibiotikallösungen	33
4.3 Puffer und Lösungen	33
4.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	33
4.3.2 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese	34
4.3.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von <i>Streptomyces</i>	35

4.3.4	<i>Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung</i>	35
4.3.5	<i>Lösungen zur Transformation und Selektion von E.coli</i>	37
4.3.6	<i>Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung von Proteingelen</i>	37
4.3.7	<i>Puffer zur Enzymreinigung über Nickelaffinitätschromatographie</i>	38
5.	PLASMIDE, PRIMER UND BAKTERIENSTÄMME	39
5.1	Vektoren	39
5.2	PCR-Primer	44
5.3	Bakterienstämme	45
6.	KULTURBEDINGUNGEN	47
6.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	47
6.2	Anzucht und Kultivierung von <i>Streptomycceten</i>	48
6.2.1	<i>Generelle Kultivierung</i>	48
6.2.2	<i>Produktion von Sekundärmetaboliten</i>	48
6.2.3	<i>Herstellung von Glycerinkulturen und Sporensuspensionen</i>	49
7.	METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	49
7.1	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA	49
7.1.1	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	49
7.1.2	<i>Alkoholfällung</i>	50
7.1.3	<i>DNA-Quantifizierung</i>	50
7.2	DNA-Isolierung	50
7.2.1	<i>Isolierung von Plasmiden aus E. coli</i>	50
7.2.2	<i>Isolierung von Plasmiden aus Streptomycceten</i>	51
7.2.3	<i>Isolierung genomischer DNA aus Streptomycceten</i>	51
7.3	DNA-Denaturierung für ssDNA Transformation in <i>Streptomycceten</i>	52
7.3.1	<i>Alkalibehandlung</i>	52
7.4	Enzymatische DNA-Manipulation	52
7.4.1	<i>Restriktionsspaltung der DNA</i>	52
7.4.2	<i>DNA-Ligation mittels der T4-DNA-Ligase</i>	52
7.5	Agarose-Gelelektrophorese	52
7.5.1	<i>Trennbedingungen</i>	52
7.5.2	<i>Auswertung von Agarose-Gelen</i>	53
7.5.3	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen</i>	53
7.6	PCR-Methoden	53
7.6.1	<i>PCR zur Klonierung von couR1-couR4</i>	53
7.6.2	<i>PCR-Amplifikation des Gens cloU</i>	54
7.6.3	<i>PCR-Amplifikation des Gens cloN1</i>	55
7.6.4	<i>PCR-Amplifikation der Gene cloN1, cloN2 und cloN7</i>	56
7.6.5	<i>Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette von pUG019 und pIJ773</i>	57
7.7	Southern Hybridisierung	58
7.7.1	<i>Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde</i>	58
7.7.2	<i>Southern Blot</i>	59
7.7.3	<i>Hybridisierung und Detektion</i>	59
7.8	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	60

7.8.1	CaCl ₂ -vermittelte Transformation.....	60
7.8.2	Elektroporation.....	61
7.9	Transformation von DNA in <i>Streptomyces</i>	61
7.9.1	Protoplastierung von <i>S. coelicolor</i> und <i>S. lividans</i>	61
7.9.2	Transformation.....	62
7.10	DNA-Sequenzierung und Computerunterstützte Sequenzanalyse.....	63
8.	METHODEN DER BIOCHEMIE UND BIOLOGIE.....	63
8.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
8.2	Heterologe Expression von Proteinen.....	64
8.2.1	Expression in <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF.....	64
8.2.2	Expression in <i>E. coli</i> BL21/pLys.....	64
8.2.3	Expression in <i>S. lividans</i> T7.....	64
8.3	Herstellung zellfreier Rohextrakte.....	64
8.4	Reinigung von Hexahistidin –Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie....	65
8.5	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Aminocoumarin-Antibiotika.....	65
9.	KONSTRUKTION DER DELETIONS-MUTANTEN.....	66
9.1	Inaktivierung des Gens <i>cloN1</i> im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des $\Delta cloN1$ Cosmids.....	66
9.2	Inaktivierung des Gens <i>cloN7</i> im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des <i>cloN7</i> Cosmids.....	67
9.3	Inaktivierung des Gens <i>cloU</i> im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des $\Delta cloU$ Cosmid.....	67
9.4	Inaktivierung der Gene <i>couR1-couR4</i> in <i>S. rishiriensis</i>	67
10.	ANALYTIK UND ISOLIERUNG NIEDERMOLEKULARER VERBINDUNGEN.....	68
10.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	68
10.1.1	Analytik des Clorobiocin und Derivaten.....	68
10.1.2	Analytik der Pyrrol-2-carbonsäure.....	69
10.1.3	Analytik des 8-Demethyltracenomycin C und Elloramycin.....	70
10.1.4	Analytik des Coumermycin A ₁ und Derivaten.....	70
10.2	Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika.....	71
10.2.1	Extraktion aus Zellkulturen.....	71
10.2.2	Säulenchromatographie mit Sephadex LH20.....	72
10.2.3	Präparative HPLC- Reinigung.....	72
10.3	Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.....	72
10.3.1	Massenspektroskopie (MS).....	72
10.3.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	72
III	ERGEBNISSE.....	74
1.	TRANSFER DER PYRROL-2-CARBONSÄURE AUF DEN DESOXYZUCKER IN DER CLOROBIOCIN-BIOSYNTHESE.....	74
1.1	Sequenzanalyse von <i>cloN1</i> und <i>cloN7</i>	74
1.2	Inaktivierung der Gene <i>cloN1</i> und <i>cloN7</i> im Cosmid clo-BG1.....	75
1.3	Integration der modifizierten Cosmide in das Genom von <i>S. coelicolor</i> M512.....	76

1.4	Charakterisierung der Sekundärstoffmetabolite	79
1.5	Komplementierung der <i>cloN1</i> – Mutation	82
1.6	Versuche zur heterologen Überexpression von CloN1, CloN2 und CloN7 als N- oder C-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine	82
1.6.1	Klonierung der Expressionskonstrukte	82
1.6.2	Überexpression von <i>cloN1</i> , <i>cloN2</i> und <i>cloN7</i>	83
2.	BIOSYNTHESE DES 5,5-DIMETHYL-DESOXYZUCKERS NOVIOSE - UNTERSUCHUNGEN DES METHYLTRANSFERASEGENS <i>CLOU</i>	84
2.1	Sequenzanalyse von <i>cloU</i>	85
2.2	Inaktivierung von <i>cloU</i>	85
2.3	Analyse der Sekundärstoffproduktion	86
2.4	Strukturaufklärung der neuen Novclobiocine.....	89
2.5	Komplementierung der <i>cloU</i> – Mutation.....	90
2.6	Biologische Aktivität der Novclobiocine	92
3.	METABOLISCHES ENGINEERING DER HETEROLOGEN PRODUKTION VON CLOROBIOCIN- DERIVATEN UND ELLORAMYCIN IN <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> M512	93
3.1	Heterologe Expression von einem Teil des Elloramycin Biosynthese- genclusters in dem <i>cloU</i> - Defektstamm.....	94
3.2	Heterologe Expression der Gene für die Bildung von dTDP-L- Rhamnose vom Oleandomycin- Biosynthesegencluster	95
3.3	Heterologe Expression der 4-Ketoreduktase OleU	97
4.	GEWINNUNG NEUER AMINOCOUMARIN- ANTIBIOTIKA VON DER <i>CLOQ</i>- DEFEKTMUTANTE DES CLOROBIOCIN- PRODUZENTEN <i>S. ROSEOCHROMOGENES</i> DS12.976	99
4.1	Isolierung und Strukturaufklärung der Vanillobiocine	100
4.2	Antibakterielle Aktivität der Vanillobiocine gegenüber <i>Bacillus subtilis</i>	102
4.3	Untersuchungen der <i>cloR</i> ⁻ Mutante auf die Anwesenheit von Vanillobiocin.....	103
5.	UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG DER 3-METHYLPYRROL-2,4-DICARBON- SÄURE IM COUMERMYCIN A₁	104
5.1	Überexpression der Gene <i>couR1-couR4</i>	105
5.1.1	Gewinnung des Expressionskonstruktes.....	105
5.1.2	Charakterisierung der Sekundärstoffproduktion.....	107
5.2	Inaktivierung der Gene <i>couR1-couR4</i>	107
5.3	Analyse der Sekundärstoffproduktion der <i>couR1-4</i> -Mutanten	109
5.4	Fütterungsversuche von 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, Ring A und Ring A-Analoga an die <i>couR1-4</i> -Mutanten	110
IV	DISKUSSION	112
1.	CLON1 / CLON7 UND IHRE BETEILIGUNG AM TRANSFER DER PYRROL-2- CARBONSÄURE AUF DEN DESOXYZUCKER VON NOVCLOBIOCIN 104.....	112
1.1	Inaktivierung der Gene <i>cloN1</i> und <i>cloN7</i>	112
1.2	Möglicher Mechanismus des Acyltransfers.....	113
2.	CLOU, EINE UNGEWÖHNLICHE C-METHYLTRANSFERASE AUS DER DESOXYZUCKER- BIOSYNTHESE DES CLOROBIOCINS	115

2.1	Identifizierung von <i>cloU</i> als Gen für die C-Methyltransferase	115
2.2	Produktionsausbeute von Novclobiocin 122 und 123	116
2.3	Biologische Aktivität der neuen Novclobiocine	116
2.4	CloW, eine 3,5-Epimerase in der Desoxyzucker-Biosynthese	117
3.	URSACHENFINDUNG UND BEHEBUNG DER GERINGEN PRODUKTION AN NOVCLOBIOCIN 122 UND 123 IN DEM <i>CLOU</i>-DEFEKTSTAMM DURCH METABOLISCHES ENGINEERING	118
4.	DIE BILDUNG DER VANILLOBIOCINE	121
5	DIE 3-METHYLPYRROL-2,4-DICARBONSÄURE DES COUMERMYCIN A₁.....	122
5.1	<i>couR1-4</i> – verantwortlich für die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4- dicarbonsäure des Coumermycin A ₁ ?	122
V	ZUSAMMENFASSUNG	124
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
VII	ANHANG.....	139
1.	HPLC-CHROMATOGRAMM UND ¹ H-NMR-SPEKTRUM VON PYRROL-2-CARBONSÄURE	139
2.	¹ H-NMR- UND MS-SPEKTREN DER CLOROBIOCIN-DERIVATE	140
VIII	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	149
IX	LEBENS LAUF.....	151

Publikationen und Tagungsbeiträge

Wissenschaftliche Publikationen

Freitag, A., Galm, U., Li, S.-M., & Heide, L. (2004) New aminocoumarin antibiotics from a *cloQ*-defective mutant of the clorobiocin producer *Streptomyces roseochromogenes* DS12.976. *J. Antibiot.*, **57**, 205-209.

Freitag, A., Rapp, H., Heide, L., & Li, S.-M. (2005) Metabolic engineering of aminocoumarins: Inactivation of the methyltransferase gene *cloP* and generation of new clorobiocin derivatives in a heterologous host. *Chembiochem*, **6**, 1-9

Freitag, A., Wemakor, E., Li, S.-M., & Heide, L. (2005) Acyl transfer in clorobiocin biosynthesis: Involvement of several proteins in the transfer of the pyrrole-2-carboxyl moiety to the deoxysugar. *Chembiochem*, **6**, 2316-2325

Freitag, A., Li, S.-M., & Heide, L. (2006) Biosynthesis of the unusual 5,5-gem-dimethyl-deoxysugar noviose: investigation of the C-methyltransferase gene *cloU*. *Microbiology*, **in press**

Freitag, A., Mendez, C., Salas, J.A., Kammerer, B., S.-M., & Heide, L. (2006) Metabolic engineering of the heterologous production of clorobiocin derivatives and elloramycin in *Streptomyces coelicolor* M512. **submitted**

Tagungsbeiträge:

Poster:

Freitag, A., Galm, U., Li, S.-M., & Heide, L. New aminocoumarin antibiotics from a *cloQ*-defective mutant of the clorobiocin producer *Streptomyces roseochromogenes*. VAAM-Workshop "International Meeting of the Biology of Bacteria producing Natural Compounds". Groningen, Netherlands (September 27-29, 2003)

Freitag, A., Li, S.-M., & Heide, L. Clorobiocin Biosynthesis: Inactivation of the methyltransferase *cloU* and implications for the specificity of the glycosyltransferase. VAAM-Workshop "International Meeting of the Biology of Bacteria producing Natural Products". Jena, Germany (September 26-28, 2004)

Rapp, H., Freitag, A., Li, S.-M., & Heide, L. Production of 4'-desmethylclorobiocin and related new aminocoumarins in a heterologous host. VAAM-Workshop "International Meeting of the Biology of Bacteria producing Natural Products". Jena, Germany (September 26-28, 2004)

Vorträge:

Freitag, A., Li, S.-M., & Heide, L. Production of clorobiocin derivatives by genetic engineering. DPhG-Jahrestagung. Mainz, Germany (Oktober 06-08, 2005)

Freitag, A., Li, S.-M., & Heide, L. Production of clorobiocin derivatives by genetic engineering, Combigyrase Workshop. Padova, Italy (Oktober 20-22, 2005)

Abkürzungen

<i>aac(3)IV</i>	Apramycin-Resistenzgen
ACP	Acylcarrierprotein
Arg	Arginin
AMP	Ampicillin
Apra	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CSPD	Chemilumineszenzsubstrat
bp	Basenpaare
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
CoA	Coenzym A
d	Durchmesser
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTC	8-Demethyltetracenomycin C
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxynucleosiddiphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAB	Fast atom bombardment
FRT	FLP recognition targets
g	Gramm
GC-Gehalt	Gehalt an Guanosin und Cytosin
GyrB	Gyrase B Untereinheit

h	Stunde
(His) ₆	Hexahistidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
J	Kopplungskonstante
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZα</i>	β -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
m	milli
M	molar
Mb	Megabasenpaar
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
n	nano
Neo	Neomycin/Kanamycin
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
nt	Nucleotide
Nucl.	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
p	pico
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
^R	Resistenz
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase

rpm	Umdrehungen pro Minute
Ring A	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
Ring B	3-Amino-4,7-dihydroxy-coumarin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s	Sensivität
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
S.-ST.	Schnittstelle
U	Unit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro
°C	Grad Celcius

I Einleitung

1. Antibiotika und ihre Produzenten

Antibiotika sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte, die von Bakterien, Pilzen und Pflanzen gebildet werden und in geringen Mengen das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder abtöten. In den letzten sechzig Jahren ist vor allem die bakterielle Gattung *Streptomyces* die reichste Quelle an Antibiotika geworden. Mehr als 2000 von den klinisch angewendeten Antibiotika sind aus *Streptomyces* isoliert worden. Hierzu gehören wichtige Antibiotika wie Tetracycline, Vancomycin, Fosfomycin und Erythromycin (Baltz, 2005). Dabei begann die Geschichte der Antibiotika dieser Gattung 1942 mit der Entdeckung des Antibiotikums Streptothricin. Jedoch erst ein Jahr später, nach der Auffindung des Streptomycins, erfolgte ein systematisches Screenen dieser Gattung auf Antibiotika, das nicht zuletzt auch durch die Entwicklung von Methoden zur Reinigung und Charakterisierung dieser Naturprodukte begünstigt wurde.

Streptomyces sind gram-positive, ubiquitär vorkommende Bodenbakterien und gehören in die Klasse der Actinomyceten. Sie weisen eine für Bakterien ungewöhnliche Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung auf, die es ihnen ermöglicht, sich gut an die wechselnden Bedingungen ihres natürlichen Lebensraumes anzupassen. Bei einem reichen Nährstoffangebot bilden die *Streptomyces* filamentöse Substratmycelien, aus denen sich bei Verschlechterung der Wachstumsbedingungen an der Oberfläche ein Luftmyzel entwickelt. Von diesem werden anschließend Sporen abgegliedert. Diese können bei verbesserten Lebensbedingungen erneut zum Substratmyzel auskeimen (Chater, 1993). Weitere charakteristische Merkmale der *Streptomyces* im Vergleich zu anderen gut untersuchten Mikroorganismen (z.B. *Escherichia coli*) sind die außergewöhnliche Größe des Genoms von 8-10 Mb und der sehr hohe GC-Gehalt der DNA (> 70%) (Bentley *et al.*, 2002). Wie bei vielen anderen Mikroorganismen liegen auch bei *Streptomyces* die Gene, die für die Biosynthese von einem Antibiotikum verantwortlich sind, geclustert vor. Dies bedeutet, dass die Gene auf einem zusammenhängenden Abschnitt des Streptomycetengenoms vorkommen.

Heutzutage sind viele marktplatzierte Antibiotika semisynthetische Varianten der natürlich vorkommenden Naturstoffe oder Verbindungen, die auf synthetischem Weg hergestellt worden. Die sehr rasche Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber jeder Klasse von Antibiotika macht es jedoch erforderlich, immer wieder neue Verbindungen für die antibakterielle Therapie zu entwickeln.

Zur Herstellung neuer Antibiotikaverbindungen kann man sich vieler Verfahren bedienen, die jedoch ihre Vor- und Nachteile enthalten. So ist als erstes Verfahren das

Screenen nach neuen Organismen (Bakterien, Pilze, Pflanzen), die eventuell antibakteriell wirksame Sekundärmetabolite produzieren, zu nennen. Dies ist jedoch eine sehr aufwendige Methode und in den letzten 30 Jahren ist sie auch immer mehr in den Hintergrund geraten, da selten neue Naturstoffklassen identifiziert wurden. Außerdem erscheint es einfacher, bereits bekannte Organismen noch gründlicher auf ihren Sekundärmetabolismus hin zu untersuchen. Genomsequenzierungen hatten gezeigt, dass viele Bakterienstämme und Pilze nicht nur in der Lage sind, ein Antibiotikum zu bilden, sondern ein viel größeres Produktionsspektrum an Sekundärmetaboliten aufweisen (Bode *et al.*, 2002). So konnte z. B. durch die Genomsequenzierung des bestuntersuchten Streptomyzeten *S. coelicolor* A(3)2 gezeigt werden, dass dieser neben den bereits bekannten Clustern für Methylenomycin, Prodigiosin, Actinorhodin und einem calciumabhängigem Antibiotikum noch weitere unbekannte Cluster besitzt (Bentley *et al.*, 2002; Lautru *et al.*, 2005). Auch Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen hatten verdeutlicht, dass die Produktion vieler noch nicht identifizierter Metabolite durch nicht optimale Kultivierungsbedingungen verhindert wird (Bode *et al.*, 2002). Diese Beobachtungen zeigen, dass bestimmte Bakterienstämme durchaus das Potential haben, ein Dutzend Naturstoffe von verschiedenen Strukturklassen zu bilden.

Eine weitere Methode ist die Strukturmodifizierung der ursprünglichen Naturstoffe auf chemische Weise. Doch dieses Verfahren ist in vielen Fällen aufgrund der Komplexität der Struktur erschwert oder sogar unmöglich (Floss, 2006). Jedoch ist diese Modifizierung für die Entwicklung neuer Arzneistoffe meist von essentieller Bedeutung.

Die Entwicklung von molekularen Techniken zur genetischen Manipulation von Bakterien als auch das wachsende Wissen an Sequenzinformationen von Biosynthesegenclustern haben zu einem besseren Verständnis der genetischen und biochemischen Basis der Sekundärmetabolit-Biosynthese geführt. Aufgrund dessen konnten Verfahren entwickelt werden, die die Bildung neuer modifizierter Naturstoffe ermöglichen. Dazu zählen vor allem die Vorstufen-gerichtete Biosynthese, die Mutasyntese, die kombinatorische Biosynthese und das metabolische Engineering.

Bei der Vorstufen-gerichteten Biosynthese wird das Kulturmedium des Sekundärstoffproduzenten mit Substanzen ergänzt, die als Konkurrenten zum eigentlichen Substrat, das in das Antibiotikum eingebaut werden soll, auftreten (Weist und Süßmuth, 2005). Im Vergleich dazu basiert die Mutasyntese auf der Zufütterung von verschiedenen geeigneten synthetischen Analoga von Vorstufen des Sekundärstoffes zu Mutanten, die in einem wichtigen Schritt der Antibiotikabiosynthese blockiert sind (Weist und Süßmuth, 2005). Sofern die zugefütterten synthetischen Substanzen in die Zellen aufgenommen werden, von den Biosynthese-Enzymen akzeptiert und eingebaut werden, können neue mutasyntetisch hergestellte Substanzen gewonnen werden. Ein Beispiel dafür zeigt die Arbeit von Galm *et al.* (2004). Sie hatte einer Mutante, die in der Bildung der 3-Dimethylallyl-4-

hydroxybenzoesäure (Ring A) des Aminocoumarin-Antibiotikums Clorobiocin blockiert war, mit unterschiedlichen Ring A-Analoga gefüttert und dadurch verschiedene Aminocoumarin-Antibiotika mit Variation im Ring A erhalten (Galm *et al.*, 2004a). Somit können mit dieser Methode unter Verwendung einer einzigen Mutante und der Zufütterung vieler Substanzen neue wirksame Naturstoffe gewonnen werden. Aber auch die Mutasyntese hat ihre Grenzen. So können die Verfügbarkeit von geeigneten Substrat-Analoga in ausreichender Menge, die Aufnahme der Substanzen in die Zellen, als auch die Akzeptanz der Substanzen durch die entsprechenden Biosynthese-Enzyme limitierende Faktoren sein.

Die kombinatorische Biosynthese, unter der man einen Austausch von Biosynthesegenen zwischen naturstoffproduzierenden Mikroorganismen versteht, als auch das metabolische Engineering, das eine gezielte Modifikation eines Biosyntheseschrittes beinhaltet, führen zur Bildung neuer modifizierter Naturstoffe (Floss, 2006; Hutchinson, 1998; Walsh, 2002). Die Durchführbarkeit der kombinatorischen Biosynthese wurde erstmals in Arbeiten von Hopwood und Kollegen (1985) berichtet. So konnte er die Gene des Biosynthesegenclusters von Actinorhodin aus *S. coelicolor* in den Medermycin-Produzenten *S. sp.* AM-7161 einbringen. Die erhaltene Mutante produzierte dabei neben Medermycin große Mengen einer neuen Verbindung, dem Mederrhodin A (Hopwood *et al.*, 1985). Die Methode nahm vor allem für die Herstellung neuer Polyketide und nicht-ribosomaler Peptide eine wichtige Rolle ein (Cane *et al.*, 1998; Khosla, 1998; Rohr, 1995). Es folgten Studien zur Manipulationen der Desoxyzucker-Biosynthese. Es ist bekannt, dass besonders Desoxyzucker, die glykosidisch an Polyketide oder Peptide gebunden sind, für die pharmazeutische Wirkung der Verbindungen essentiell sind (Salas und Mendez, 2005). So führte die Einbringung von Genen aus *S. olivaceus*, die für die Bildung des Elloramycin-Aglykons, 8-Demethyltetracenomycin C, verantwortlich sind, in den Urdamycin-Produzenten *S. fradiae* zur Bildung neuer Tetracenomycin-Glykoside, die anstelle von L-Rhamnose eine D-Olivoose als Desoxyzuckerkomponente enthielten (Decker *et al.*, 1995a). Des weiteren konnte die kombinatorische Biosynthese auch für die Gruppe der Aminocoumarin-Antibiotika erfolgreich angewendet werden (Eustáquio *et al.*, 2003a; Li *et al.*, 2002). Jedoch treten auch bei der Anwendung der kombinatorischen Biosynthese bzw. des metabolischen Engineerings eine Vielzahl von Problemen auf. Dabei sind vor allem die Substratspezifität einiger Biosynthesewegenzyme, die teilweise geringe Ausbeute der neu gebildeten Substanzen als auch der Verlust der Bioaktivität der neuen Substanzen zu nennen (Floss, 2006).

Die genannten Verfahren führen also zur Bildung neuer modifizierter Verbindungen, dennoch müssen diese weiter untersucht und optimiert werden.

2. Aminocoumarin-Antibiotika

Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ sind drei strukturell eng verwandte Aminocoumarin-Antibiotika, die von Vertretern der Gattung *Streptomyces* produziert werden. Novobiocin wurde erstmals 1955 beschrieben (Hoeksema *et al.*, 1955; Smith *et al.*, 1956) und wird vorwiegend von den Stämmen *S. niveus* (Smith *et al.*, 1956) und *S. spheroides* NCIMB 11891 (Berger und Batcho, 1978) produziert. Jedoch zeigten Southern Blot Experimente, dass diese beiden Stämme unabhängige Isolate des gleichen Stamms sein könnten (Lanoot *et al.*, 2002). Die anderen beiden Antibiotika wurden zwischen 1960 und 1980 entdeckt (Kawaguchi *et al.*, 1965; Ninet *et al.*, 1972). Die Produktion an Coumermycin A₁ ist bei verschiedenen Stämmen, wie *S. hazeliensis* var. *hazeliensis*, *S. rishiriensis*, *S. spinichromogenes* und *S. spinicoumarensis* beobachtet worden (Berger und Batcho, 1978). Clorobiocin wird von *S. albocinerescens*, *S. hygroscopius* und *S. roseochromogenes* var. *oscitans* produziert (Mancy *et al.*, 1974; Ninet *et al.*, 1972).

2.1 Struktur der Aminocoumarine

Die Aminocoumarin-Antibiotika (Abbildung I.1) sind charakterisiert durch einen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinteil (Ring B), der an Position 7 mit einem Desoxyzucker (Ring C) und an Position 3 mit einer Acylkomponente verbunden ist. Novobiocin und Clorobiocin tragen als Acylkomponente einen 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoatteil (Ring A). Im Vergleich dazu ist die Acylkomponente im Coumermycin A₁ eine 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure. In Novobiocin ist die Hydroxylgruppe an Position 3 des Desoxyzuckers mit einer Carbamoylgruppe acyliert, während in den anderen beiden Verbindungen diese Hydroxylgruppe mit einer 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure verestert ist. Des weitern weisen Novobiocin und Coumermycin A₁ eine Methylgruppe an Position 8 des Aminocoumarinringes auf. Diese Position ist in Clorobiocin mit einem Chloratom substituiert.

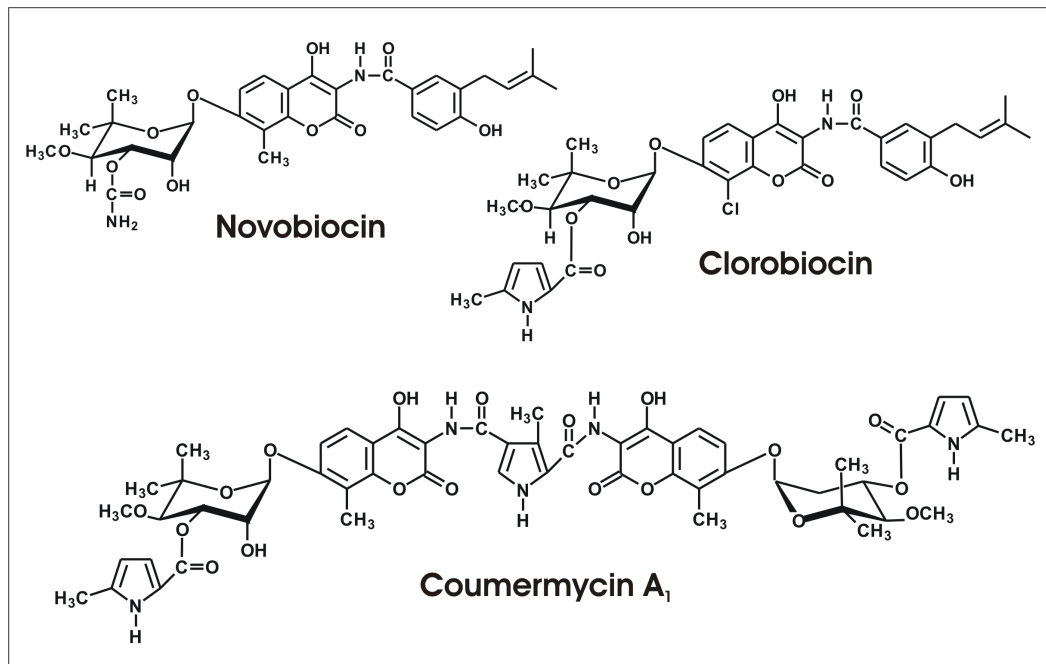


Abbildung I.1: Strukturen dreier Aminocoumarin-Antibiotika

In der Natur sind noch zwei weitere Aminocoumarine entdeckt worden, das Simocyclinon D8 (Holzenkämpfer *et al.*, 2002; Schimana *et al.*, 2000) und das Rubradirin (Bhuyan *et al.*, 1965; Meyer, 1965). Im Vergleich zu den drei vorher genannten Aminocoumarinen tragen diese beiden Verbindungen keinen Desoxyzucker an Position 7 des Aminocoumarinteils und ihre Acylkomponente ist von größerer und komplizierterer Struktur (Abbildung I.2). In Simocyclinon D8 besteht die Acylkomponente aus einem Angucyclinon-Ringsystem, das an C-9 C-glykosidisch mit dem an der 4-OH-Gruppe acetylierten Desoxyzucker β -D-Olivose verknüpft ist. Die Hydroxylgruppe an Position 3 des Desoxyzuckers ist zudem mit einer Octatetraendicarbonsäure substituiert. Des weiteren trägt Simocyclinon D8 ein Chloratom an Position 8 des Aminocoumarinrings. In Rubradirin ist die Acylkomponente eine Dihydroxydipipecolinsäure, die durch eine glykosidische Bindung mit einem 2,6-Didesoxynitrozucker und durch eine Esterbindung mit einem Ansamakrolidring verbunden ist.

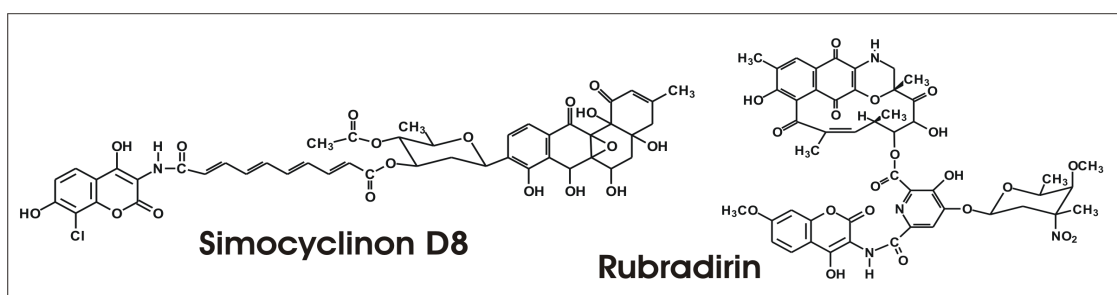


Abbildung I.2: Strukturen von Simocyclinon D8 und Rubradirin

2.2 Wirkung der Aminocoumarine

Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ sind potente Inhibitoren der bakteriellen DNA-Gyrase. Die DNA-Gyrase gehört zur Klasse der Topoisomerasen des Typs II. DNA-Topoisomerasen kommen in allen Zelltypen vor. Sie sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle und an wichtigen DNA-Prozessen wie Transkription, Rekombination und Replikation beteiligt. Aufgrund des Vorkommens der DNA-Gyrase in ausschließlich prokaryontischen Zellen stellt sie einen guten Angriffspunkt antibakteriell wirksamer Verbindungen dar. Funktionell ist die DNA-Gyrase für die ATP-abhängige Einführung von negativen Supercoils in doppelsträngige DNA verantwortlich. Sie besteht aus zwei Untereinheiten GyrA und GyrB, die zur Bildung des aktiven Enzymkomplexes ein A₂B₂-Heterodimer bilden. Die DNA-Gyrase ist schon von vielen Bakterienarten isoliert worden, jedoch die am besten charakterisierteste ist die von *E. coli*. Die GyrA-Einheit ist ein 97 kDa großes Protein, das sich aus einer N-terminalen Domäne, die in den DNA-Strangbruch und dessen Wiedervereinigung involviert ist, und einer C-terminalen Domäne, die an der DNA-Protein-Interaktion beteiligt ist, zusammensetzt. Das 90 kDa große GyrB-Protein weist ebenfalls eine N- und C-terminale Domäne auf. Dabei trägt der N-terminale Teil die ATPase Aktivität und der C-terminale Teil ist in die Interaktionen mit dem A-Protein und der DNA involviert (Maxwell, 1997).

Alle 3 Aminocoumarin-Antibiotika konkurrieren mit ATP um die Bindung an die B-Untereinheit der Gyrase und inhibieren somit die ATP-abhängige DNA-Überspiralisierung, die durch das Enzym katalysiert wird. Röntgenstrukturanalysen konnten zeigen, dass der Aminocoumarinteil und der substituierte Desoxyzuckerteil dieser Verbindungen essentiell für ihre Bindung an die B-Untereinheit der Gyrase sind (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997). Dabei spielen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Arg136 und dem Coumarinring, zwischen Asp73 und der 3''-Acylgruppe des Desoxyzuckers und zwischen Asn46 und der 2''-Hydroxylgruppe des Desoxyzuckers eine wichtige Rolle. Die Interaktion von Novobiocin mit der Gyrase kommt dabei vor allem durch die direkte Wasserstoffbrücke zwischen dem Asp-Rest und der Carbamoylgruppe und zwei weiteren Wasserstoffbrücken zwischen zwei koordinierten Wassermolekülen zustande (Lewis *et al.*, 1996). Bei Clorobiocin werden diese zwei Wassermoleküle durch die voluminöse 5-Methylpyrrol-2-carbonsäureeinheit verdrängt. Dieses spiegelt sich in einer höheren Affinität von Clorobiocin zur Gyrase-B-Untereinheit wieder (Tsai *et al.*, 1997). Aber auch das Chloratom an Position 8 des Aminocoumarinrings von Clorobiocin trägt zu der höheren biologischen Aktivität der Verbindung im Vergleich zu Novobiocin bei (Eustáquio *et al.*, 2003a). Der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäureeinheit von Clorobiocin und Novobiocin wurde anfänglich die Aufnahme der Antibiotika in die Bakterien zugeschrieben, da sie über mehrere hydrophobe Wechselwirkungen nur schwach zur Bindung dieser Substanzen an die bakterielle Gyrase beiträgt (Lewis *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1997). Jedoch konnten spätere Untersuchungen von Lafitte und

Kollegen (2002) zeigen, dass diese Einheit eine entscheidende Rolle in der Bindungsaffinität dieser Antibiotika zur Gyrase hat (Lafitte *et al.*, 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass strukturelle Veränderungen dieser prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure zu einer erhöhten Aktivitätshemmung der Gyrase führten (Galm *et al.*, 2004b).

Des Weiteren haben Molekulargewichtsstudien ergeben, dass Novobiocin und Clorobiocin die Gyrase B-Untereinheit als Monomer binden, während Coumermycin A₁ die GyrB-Einheit als Dimer stabilisiert. Diese Beobachtungen stimmen mit den Strukturmerkmalen von Coumermycin A₁ überein (Ali *et al.*, 1993; Maxwell und Lawson, 2003).

2.3 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung

Die Aminocoumarin-Antibiotika weisen eine große Wirksamkeit gegenüber gram-positiven Bakterien, einschließlich den Methicillin- und Vancomycin-resistenten *Staphylococcus*-Stämmen auf. Jedoch blieb die klinische Anwendung dieser Antibiotika aufgrund ihrer schweren Nebenwirkungen (z.B. Hautausschläge), ihrer schlechten Wasserlöslichkeit und ihrer geringen Aktivität gegenüber gram-negativen Bakterien, verursacht durch die geringe Permeabilität durch die Bakterienzellwand, eingeschränkt (Maxwell, 1993). Novobiocin wurde als einziges dieser drei Substanzen als Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten gram-positiven Bakterien in den USA (Albamycin[®]) zugelassen. Seine antibakterielle Aktivität konnte dabei sowohl in *in-vitro* Studien als auch in klinischen Studien nachgewiesen werden (French *et al.*, 1993; Raad *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1985). Dennoch verhinderte neben den auftretenden Nebenwirkungen auch eine häufige und sehr rasche Resistenzentwicklung eine breite Anwendung dieses Antibiotikums. Dessen ungeachtet konnten aber zahlreiche präklinische und klinische Studien das Wirkungspotential von Novobiocin aufzeigen. Zum Beispiel weist Novobiocin synergistische Wirkung mit Antitumormedikamenten auf, indem es die zytotoxische Wirkung der Topoisomerase II-Hemmstoffe Etoposid und Teniposid verstärkt (Rappa *et al.*, 1992). Dabei kommt diese Wirkungsverstärkung aber nicht durch die zusätzliche Hemmung der Topoisomerase II zustande, sondern durch die Hemmung des Transportes von Etoposid und Teniposid aus den Zellen (Lorico *et al.*, 1992; Rappa *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Novobiocin mit dem eukaryontischen Hitzeschockprotein Hsp90 interagiert, das eine wichtige Rolle in der Stabilität und Funktion vieler Zellsignalmoleküle, wie Transkriptionsfaktoren (Dioxin-Rezeptor, Steroidhormonrezeptor) und onkologischen Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen, spielt (Allan *et al.*, 2006; Marcu *et al.*, 2000). Marcu *et al.* (2000) konnte zeigen, dass diese Novobiocin-Hsp90-Interaktion sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* zu einer Reduktion an onkologischen Kinasen in der Zelle führt. Eine weitere Untersuchung offenbarte, dass Novobiocin eine

antiproliferative Wirkung auf menschliche Myelomzellen besitzt, in dem es die Expression des Glykoproteins CD38 in diesen Zellen induzierte (Thiele *et al.*, 2002).

2.4 Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika

Die ersten Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika erfolgten durch Fütterungsversuche mit isotopenmarkierten Vorstufen. Birch und Kollegen (1962) konnten durch ^{14}C -Fütterungsversuche beweisen, dass die Desoxyzucker-Einheit Noviose aus intakter Glucose entsteht (Birch *et al.*, 1962). Bunton und Kollegen (1963) zeigten, dass sowohl der Aminocoumarinring als auch der prenylierte 4-Hydroxybenzoanteil sich von Tyrosin ableiten (Bunton *et al.*, 1963). Des weiteren legte ein Fütterungsversuch mit ^{18}O markiertem Tyrosin nahe, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarinrings von der Carboxylgruppe des Tyrosins stammen könnte (Bunton *et al.*, 1963). Dieses Ergebnis wurde jedoch durch neuere Experimente von Holzkämpfer und Kollegen widerlegt. Sie hatte nachgewiesen, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarinringes in Simocyclinonen der D-Reihe aus molekularem Sauerstoff stammt (Holzenkämpfer und Zeck, 2002). Fütterungsexperimente mit ^{13}C -Glucose bewiesen, dass die Dimethylallylseitenkette von Ring A vom Methylerythritol-Phosphat-Weg (nicht-Mevalonat-Weg) stammt, im Vergleich zu allen früher untersuchten Isoprenoid enthaltenen Metaboliten von *Streptomyces* (Li *et al.*, 1998). Die gleichen Beobachtungen wurden auch durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -Natriumacetat und ^{13}C -Glucose von Orihara und Kollegen berichtet (Orihara *et al.*, 1998). Fütterungsexperimente mit ^{14}C -markiertem L-Prolin zu einem Coumermycin A₁-Produzenten führten zum Einbau von Radioaktivität in die Pyrrolgruppen des Moleküls. Dabei konnte jedoch nicht zwischen der zentralen und den beiden terminalen Pyrroleinheiten des Coumermycins A₁ unterschieden werden (Scannell und Kong, 1969).

Weitere Aufschlüsse über die Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika erfolgte durch die Verwendung von Mutanten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Amidbindung zwischen Ring A und Ring B vor der Übertragung auf Ring C erfolgt, denn bei Mutanten, die in der Biosynthese des Ring B blockiert waren, konnten die Novobiocin-Produktion nur durch Zufütterung von Ring B oder Novobiocinsäure (Ring A und B), aber nicht durch Fütterung mit Novenamin (Ring B und C) wiederhergestellt werden (Queener *et al.*, 1978). Andere Mutanten akkumulierten Novobiocin-Derivate mit fehlender O-Methylgruppe und/oder fehlender Carbamoylgruppe. Diese Verbindungen konnten von Mutanten, die in einem früheren Biosyntheseschritt blockiert waren, zu Novobiocin umgewandelt werden. Dies zeigte, dass die O-Methylierungsreaktion an Position 4 und die Carbamoylierungsreaktion an Position 3 des Desoxyzuckers zu Endreaktionen in der Biosynthese von Novobiocin gehören (Queener *et al.*, 1978).

Jedoch erst die Klonierung und Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthesegenclusters von *S. sphaeroides* NCIMB 11981 (Steffensky *et al.*, 2000b) gefolgt von den Clustern des Coumermycin A₁ von *S. rishiriensis* DSM 40489 (Wang *et al.*, 2000) und des Clorobiocins von *S. roseochromogenes* var. *oscitans* DS 12.976 (Pojer *et al.*, 2002) lieferten die Basis für weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene. Ein Vergleich der drei Cluster zeigte, dass sich die strukturellen Ähnlichkeiten und Unterschiede der drei Antibiotika auch in der Organisation der Biosynthesegencluster widerspiegelt (Abbildung I.3).

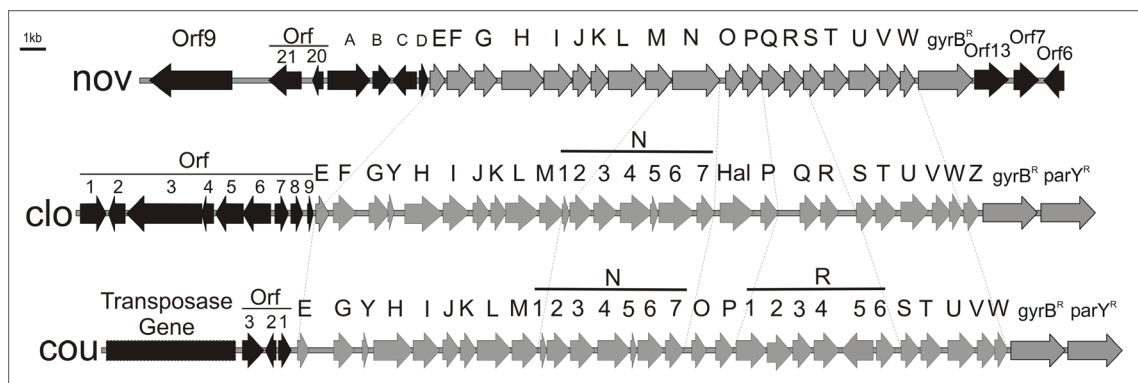


Abbildung I.3: Schematische Darstellung der Biosynthesegencluster von Novobiocin (nov), Clorobiocin (clo) und Coumermycin A₁ (cou)

2.4.1 Funktionelle Analyse der Biosynthesegene

2.4.1.1 Resistenzgene

Die Aminocoumarin-Antibiotikaproduzenten müssen sich natürlich selbst vor dem inhibitorischen Effekt ihrer Verbindungen auf ihre DNA-Gyrase während der Biosynthese schützen. Thiara und Cundliffe (Thiara und Cundliffe, 1988; Thiara und Cundliffe, 1989; Thiara und Cundliffe, 1993) hatten berichtet, dass der prinzipielle Resistenzmechanismus des Novobiocinproduzenten *S. sphaeroides* auf der de-novo Synthese einer Coumarin-resistenten Gyrase-B-Untereinheit beruht, die die sensitive Gyrase-B-Untereinheit in dem aktiven Heterotetramer ersetzt. Somit enthielt der Bakterienstamm zwei *gyrB* Gene, ein konstitutiv exprimiertes *gyrB^S*, das für das Coumarin-sensitive Protein codiert und das *gyrB^R*, das für das Resistenzprotein codiert und erst in Anwesenheit von Novobiocin exprimiert wird. In den Biosynthesegenclustern von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ konnte ein *gyrB^R* Resistenzgen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in den Clustern von Coumermycin A₁ und Clorobiocin ein ähnliches Gen namens *parY^R* gefunden, dessen Genprodukt Sequenzähnlichkeiten mit der B-Untereinheit von Typ II Topoisomerasen aufwies. Die Expression der Gene *gyrB^R* bzw. *parY^R* in *S. lividans* resultierte in der

Resistenz gegenüber Novobiocin und Coumermycin A₁ (Schmutz *et al.*, 2003a). Des Weiteren konnte durch Überexpression von GyrB^R und ParY^R vom Coumermycin-Cluster und den korrespondierenden A-Untereinheiten (GyrA und ParX) aus *S. coelicolor* gezeigt werden, dass der Komplex von GyrA und GyrB^R die ATP-abhängige Überspiralisierung der DNA katalysiert, während der Komplex von ParX und ParY^R die Entkettung und Relaxation der DNA katalysiert, die typisch für Topoisomerasen IV sind. Somit konnte erstmals eine Topoisomerase IV in der Klasse der Actinomyceten nachgewiesen werden (Schmutz *et al.*, 2004).

Im Novobiocin-Cluster befindet sich das Gen *novA* und im Coumermycin A₁-Cluster das Gen *couR5*, die beide für mögliche Transporter kodieren. Für *novA* wurde gezeigt, dass es in den Transport von Novobiocin involviert ist und möglicherweise auch Resistenz gegenüber Novobiocin verleiht (Méndez und Salas, 2001). Expression der beiden Gene in *S. lividans* TK24 führten zu einem gemäßigten Resistenzlevel gegenüber Novobiocin und Coumermycin A₁ und zeigte, dass die Gene in den Transport der Antibiotika involviert sind (Schmutz *et al.*, 2003a). Insgesamt beruht der Resistenzmechanismus dieser Antibiotika-Produzenten aber eher auf der Bildung von Coumarin-resistenten Topoisomerasen als auf Export-Mechanismen.

2.4.1.2 *Regulatorgene*

Die Biosynthese von Antibiotika ist ein Prozeß, der einer Regulation auf verschiedenen Stufen unterliegt. In den drei Biosynthesegenclustern sind jeweils zwei Gene vorhanden, die Sequenzähnlichkeiten zu Regulatorgenen aufweisen. Die Gene *novE*, *cloE* und *couE* zeigen Sequenzähnlichkeiten zu dem Gen *lmbU* aus *S. lincolnensis*, dessen Genprodukt eine Regulatorfunktion in der Biosynthese von Lincomycin aufweist (Peschke *et al.*, 1995). Ein Geninaktivierungsexperiment zeigte, dass NovE keine katalytische Funktion, sondern eine mögliche positive Regulatorfunktion in der Biosynthese von Novobiocin hat (Eustáquio *et al.*, 2003b). Die Gene *novG*, *cloG* und *couG* weisen eine Sequenzähnlichkeit zu *strR*, einem Regulatorgen des Streptomycin-Cluster von *S. griseus*, auf (Horinouchi und Beppu, 1995). Inaktivierung des Gens *novG* resultierte mit einem 98% Verlust der Novobiocin-Produktion, während die Überexpression von NovG eine 3fache Produktionssteigerung des Antibiotikums zur Folge hatte (Eustáquio *et al.*, 2005b). Diese und weitere Untersuchungen bewiesen, dass NovG ein DNA bindendes Protein ist und als positiver Regulator in der Novobiocin-Biosynthese agiert (Eustáquio *et al.*, 2005b).

Im Coumermycin A₁-Cluster befindet sich zusätzlich das Gen *couR6*, das Sequenzähnlichkeit zu LysR-Typ transkriptionellen Regulatoren aufweist und somit eine Funktion als Regulator haben könnte.

2.4.1.3 Gene der Aminocoumarinring-Biosynthese

Die Biosynthesegene für den charakteristischen Aminocoumarinring kommen in allen drei Cluster vor und konnten durch Clustervergleich als *novHIJK*, *cloHIJK* und *couHIJK* identifiziert werden. Jedoch erst biochemische Untersuchungen von Chen und Walsh (2001) führten zu einem Einblick in den Ablauf dieser Biosynthese. Chen und Walsh zeigten, dass das Enzym NovH Tyrosin durch eine Thioesterbildung mit dem 4'-Phosphopantetheinyl-Cofaktor aktiviert und anschließend das aktivierte Tyrosin durch das Cytochrom P450-Enzym NovI an β -Position hydroxyliert wird (Chen und Walsh, 2001). Vor kurzem konnte auch die Funktion von NovJ und NovK aufgezeigt werden. Diese katalysieren zusammen als Heterotetramer $NovJ_2K_2$ die Oxidation des β -Hydroxytyrosins zu β -Ketotyrosin (Pacholec *et al.*, 2005). Die Funktionen der Gene *novHIJK* lassen sich aufgrund der sehr hohen Homologie zwischen den Clustern auch auf *cloHIJK* und *couHIJK* übertragen (Abbildung I.4).

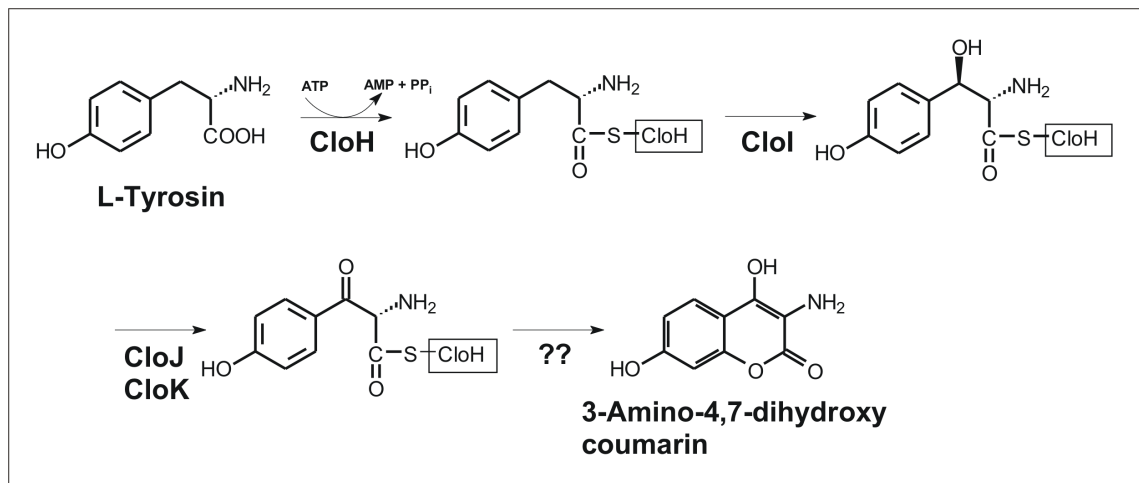


Abbildung I.4: Biosynthese des Aminocoumarinrings

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarinrings von Simocyclinon von molarem Sauerstoff stammt und durch eine Monooxygenase eingeführt wird (Holzenkämpfer und Zeeck, 2002). Chen und Walsh (Chen und Walsh, 2001) hatten spekuliert, dass NovC in diese 2-Hydroxylierung involviert sein könnte. Jedoch gibt es kein entsprechendes Homolog in den Clustern von Coumermycin A₁ und Clorobiocin. Außerdem zeigte die Expression der Gene *novDEFGHIJK* in *S. lividans* TK24, die zur Bildung von 2,4-Dihydroxy- α -oxyphenyllessigsäure führte, dass eines dieser Gene in die 2-Hydroxylierung involviert ist (Eustáquio *et al.*, 2003b).

Clorobiocin enthält an Position 8 des Aminocoumarinringes ein Chloratom, während die beiden anderen Antibiotika an dieser Position eine Methylgruppe besitzen. Dieser strukturelle Unterschied spiegelt sich auch in den drei Biosynthesegenclustern wieder. Während im Clorobiocin-Cluster ein *clo-hal* Gen vorkommt, das Sequenzähnlichkeiten

zu FADH₂-abhängigen Halogenasen aufweist, enthalten die anderen beiden Cluster an der korrespondierenden Stelle das Gen *novO* bzw. *couO*. Inaktivierung von *couO* zeigte, dass dieses Gen für eine C-Methyltransferase codiert und somit für den Transfer einer Methylgruppe an Position 8 des Aminocoumarinrings verantwortlich ist (Li *et al.*, 2002). Unterdessen führte die Inaktivierung von *clo-Hal* zu Mutanten, die nur noch ein Aminocoumarin-Derivat ohne Chloratom an Position 8 des Ringes akkumulierten (Eustáquio *et al.*, 2003a).

2.4.1.4 Gene der Desoxyzucker-Biosynthese

Neben dem Aminocoumarinring weisen alle drei Antibiotika noch den Desoxyzucker als gemeinsames Strukturelement auf. Alle drei Cluster zeigen eine zusammenhängende Gruppe von fünf Genen, *novSTUVW* und die Homologen *cloSTUVW* und *couSTUVW*, die in allen drei Fällen in der gleichen Reihenfolge enthalten sind. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Genen der Desoxyzucker-Biosynthese sind diese Gene für die Biosynthese des Desoxyzuckerteils in diesen Antibiotika verantwortlich. So zeigt NovV Sequenzähnlichkeit zu dTDP-Glucosesynthasen, NovT zu dTDP-Glucose-4,6-dehydrathasen, NovW zu dTDP-4-Keto-6-deoxy-glucoseepimerasen und NovS zu dTDP-4-Keto-hexosereduktasen. Diese Enzyme wurden auch in anderen Desoxyzucker-Biosynthesewegen gefunden (He und Liu, 2002). NovU zeigt Sequenzähnlichkeit zu S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Methyltransferasen. Ein erster funktioneller Beweis wurde durch ein Inaktivierungsexperiment mit *novT* im Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* geliefert. Die resultierende Mutante produzierte anstelle von Novobiocin nur noch Novobiocinsäure, ein Novobiocin-Derivat ohne den gesamten Zuckerteil (Steffensky *et al.*, 2000b). Analog zu anderen Desoxyzuckerbiosynthesen (He und Liu, 2002) beginnt die Synthese des Zuckers mit der Aktivierung von Glucose-1-phosphat zu dTDP-Glucose, die durch NovV/CloV/CouV katalysiert wird. Die anschließende Dehydrierung, katalysiert durch das Enzym NovT/CloT/CouT, führt zur Bildung des Intermediats dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose. Daraufhin könnte eine 3,5-Epimerisierung durch das Enzym NovW/CloW/CouW folgen. Eine C-Methylierung durch das Enzym NovU/CloU/CouU führt dann zu einem 5,5-dimethylierten Zucker. Die anschließende Reduktion, katalysiert durch NovS/CloS/CouS, würde dann zu dem aktivierten Zucker dTDP-5-Methyl-L-rhamnose führen (Abbildung I.5). Aus chemischer Sicht betrachtet, können die letzten drei Reaktionen aber auch folgendermaßen ablaufen: 1. NovW/CloW/CouW katalysiert nur eine 3-Epimerisierung, gefolgt von einer 5-C-Methylierung durch NovU/CloU/CouU und einer 4-Ketoreduktion durch NovS/CloS/CouS. 2. NovU/CloU/CouU methyliert C-5 der dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose, gefolgt von einer 3-Epimerisierung durch NovW/CloW/CouW und einer 4-Ketoreduktion durch NovS/CloS/CouS. Alle aufgeführten Reaktionsschritte würden zu dem gleichen aktivierten Zucker führen. Der tatsächliche

Ablauf dieser Reaktionen ist noch unklar. Insbesondere wurde die 5-C-Methylierung des Zuckers in anderen Desoxyzuckerbiosynthesen noch nicht beschrieben.

Jedoch konnten erste biochemische Untersuchungen von NovWUS durch Thuy *et al.* (2005) zeigen, dass die Epimerisierung durch NovW der Methylierung durch NovU vorausgehen muss (Thuy *et al.*, 2005).

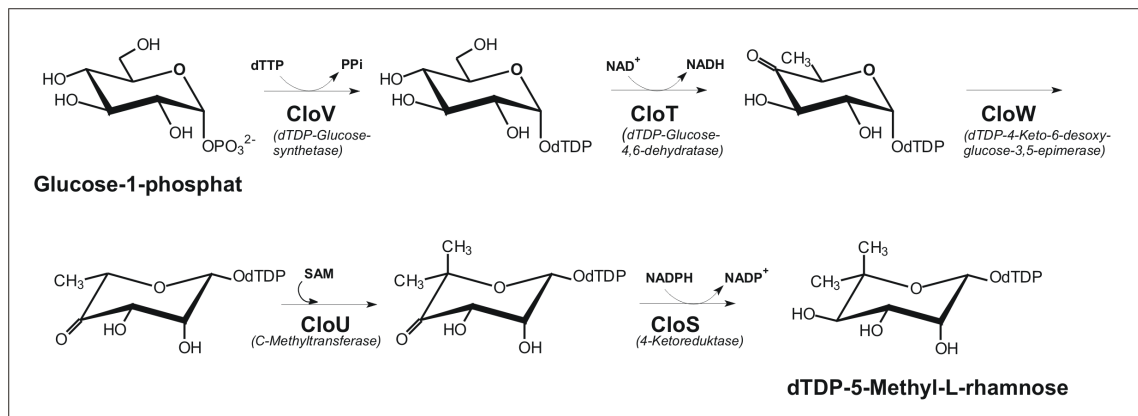


Abbildung I.5: Biosynthese des aktivierten Desoxyzuckers

2.4.1.5 Gene für die Biosynthese der Acylkomponenten

Novobiocin und Clorobiocin enthalten eine prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) als Acylkomponente. Im Novobiocin- und Clorobiocin-Cluster kommen drei Gene vor *novF/cloF*, *novQ/cloQ* und *novR/cloR*, die im Coumermycin A₁-Cluster fehlen. Pojer *et al.* (2003) lieferte sowohl durch Inaktivierungsexperimente von *cloQ* und *cloR* in dem Clorobiocin-Produzenten *S. roseochromogenes* var. *oscitans* DS 12.976 als auch durch Zufütterungsexperimente mit den *cloQ*- und *cloR*-Mutanten den Beweis, dass die Gene bei der Biosynthese des Ring A involviert sind (Pojer *et al.*, 2003b; Pojer *et al.*, 2003a). CloQ ist eine Prenyltransferase und katalysiert die Umwandlung von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat. CloR ist eine bifunktionelle non-heme Eisenoxxygenase, die das 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenyl-pyruvat durch zwei aufeinanderfolgende Decarboxylierungsschritte zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure umwandelt (Abbildung I.6). Die gleichen Funktionen könnten auch auf die entsprechenden Gene im Novobiocin-Cluster übertragen werden.

Datenbankvergleiche zeigten außerdem, dass CloF und NovF Sequenzähnlichkeiten zu Prephenatdehydrogenasen aufweisen, deren Produkt 4-Hydroxyphenylpyruvat ist, das wiederum das Substrat von CloQ/NovQ ist (Abbildung I.6). Deshalb sind diese Enzyme vermutlich an der Bildung des substituierten Benzoylteil von Clorobiocin und Novobiocin mitbeteiligt.

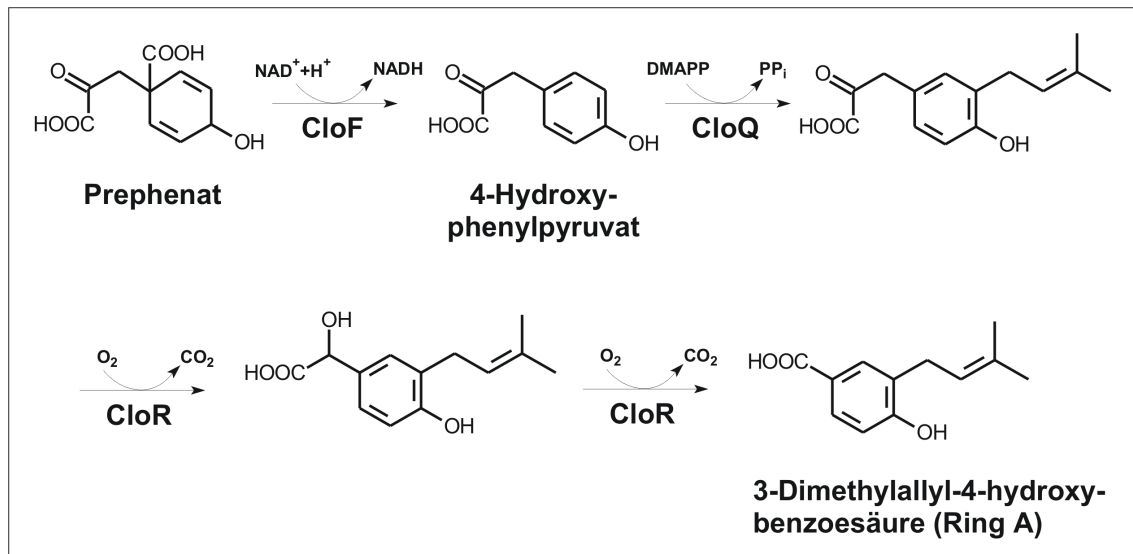


Abbildung I.6: Biosynthese der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoensäure (Ring A)

Im Coumermycin A_1 -Cluster wurden an der gleichen Position von *novQR* in Novobiocin bzw. *cloQR* in Clorobiocin die vier Gene *couR1-couR4* gefunden, die wiederum in den beiden anderen Clustern nicht vorkommen. Strukturell könnte man sich dies durch das Vorhandensein einer 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure als Acylkomponente im Coumermycin A_1 erklären und somit spekulieren, dass diese Gene an der Bildung dieser Pyrroleinheit beteiligt sind. Jedoch wurde bis jetzt kein Nachweis für diese Hypothese erbracht.

2.4.1.6 Gene für die Verknüpfung der verschiedenen Strukturelemente

Die Verknüpfung des Aminocoumarinringes mit der Acylkomponente ist ein zentraler Schritt in der Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika. So führt diese Reaktion bei Clorobiocin zu Clorobiocinsäure und bei Novobiocin zur entsprechenden Novobiocinsäure. Im Coumermycin A_1 wird die Acylkomponente 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure über zwei Amidbindungen mit zwei Aminocoumarinringen verbunden. Überexpressionsexperimente von NovL (Steffensky *et al.*, 2000a), CouL (Schmutz *et al.*, 2003b) und CloL (Galm *et al.*, 2004a) hatten gezeigt, dass diese Enzyme die Verknüpfungsreaktion katalysieren.

Die anschließende Übertragung des Desoxyzuckers auf die 7-OH-Gruppe des Aminocoumarinringes wird in allen drei Antibiotika durch eine Glykosyltransferase bewerkstelligt. In den drei Clustern wurden drei sehr ähnliche putative Glykosyltransferasogene *cloM*, *novM* und *couM* gefunden, die jeweils an der gleichen Position im Cluster lokalisiert sind. Für NovM konnte bewiesen werden, dass es die Glykosylierung der Novobiocinsäure katalysiert (Albermann *et al.*, 2003; Freel Meyers

et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NovM mit verschiedenen Coumarin-Aglyka Aktivität aufweist, jedoch eine hohe Substratspezifität in Bezug auf aktivierte Desoxyzucker besitzt.

2.4.1.7 Gene für die 4''-O-Methylierung und 3''-O-Acylierung des Desoxyzuckers

In der Biosynthese der 3 bestuntersuchten Aminocoumarin-Antibiotika treten noch zwei finale Modifikationen des Desoxyzuckers auf, die 4''-O-Methylierung und die 3''-O-Acylierung.

4''-O-Methylierung

Vergleich der drei Biosynthesegencluster mit Datenbankeinträgen hatte gezeigt, dass die drei Gene *novP*, *cloP* und *couP* Homologie zu O-Methyltransferasen aufweisen. Inaktivierung von *couP* in dem Coumermycin A₁-Produzenten *S. rishiriensis* führte zur Akkumulation eines neuen Coumermycin-Derivats, das durch das Fehlen der Methylgruppe an Position 4 des Desoxyzuckers charakterisiert war (Li *et al.*, 2002). Die Identifizierung von NovP als O-Methyltransferase wurde durch dessen Überexpression aufgezeigt (Freel Meyers *et al.*, 2004). Die Inaktivierung von *cloP* im Clorobiocin-Cluster und anschließende heterologe Expression des modifizierten Clusters in *S. coelicolor* M512 führten zur Produktion von 4''-Desmethylclorobiocin (Novlobiocin 112), zusammen mit seinem Isomer Novclobiocin 113, das durch Verschiebung seiner 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure von Position 3 zu Position 2 des Desoxyzuckers charakterisiert war (Freitag *et al.*, 2005a). Zusätzlich wurde jedoch erstmals eine Verbindung detektiert, in welcher die Acylgruppe mit der Hydroxylgruppe an Position 4 des Desoxyzuckers verknüpft war (Novclobiocin 120). Diese Beobachtungen zeigten, dass wenn die 4''-OH-Gruppe nicht durch Methylierung blockiert ist, der produzierende Organismus eine Mischung von Verbindungen akkumuliert, die an der 3''-OH-, 2''-OH- oder 4''-OH-Gruppe des Desoxyzuckers acyliert sind. Gleichzeitig verdeutlicht es auch, dass die 4''-O-Methylierung der 3''-O-Acylierung in der natürlichen Biosynthesereaktionssequenz vorangeht.

3''-O-Acylierung

Die beiden Antibiotika Clorobiocin und Coumermycin A₁ haben an Position 3 des Desoxyzuckers einen 5-Methylpyrrol-2-carboxylteil, während Novobiocin an dieser Position eine Carbamoylgruppe trägt. Dementsprechend enthält das Novobiocin-Cluster das Carbamoyltransferasegen *novN*. An der gleichen Position im Cluster ist in den Genclustern von Clorobiocin und Coumermycin A₁ eine Gruppe von sieben Genen *cloN1-cloN7* bzw. *couN1-couN7* vorzufinden.

Datenbankvergleiche zeigten, dass CouN3, CouN4 und CouN5 Homologie sowohl zu PltE, PltF und PltL der Pyoluteroin-Biosynthese (Thomas *et al.*, 2002) als auch zu RedW, RedM und RedO der Undecylprodigiosin-Biosynthese (Cerdeno *et al.*, 2001) aufweisen. Beide Verbindungen enthalten Pyrrol-2-carboxylteile, deren Biosynthese ausgehend von L-Prolin durch die zuvor erwähnten Enzyme bewerkstelligt wird. Inaktivierungsexperimente hatten dann gezeigt, dass *couN3* und *couN4* in die Biosynthese der Pyrrol-2-carbonsäure des Coumermycin A₁ involviert sind (Xu *et al.*, 2002). Der Ablauf dieser Biosynthese konnte jedoch erst durch Überexpression von CloN3, CloN4 und CloN5 und deren *in vitro* Charakterisierung aufgezeigt werden (Garneau *et al.*, 2005). Die Bildung des Pyrrolteils (Abbildung I.7) beginnt mit einer ATP-abhängigen Aktivierung von L-Prolin zu L-Prolyl-AMP. Anschließend erfolgt eine Übertragung des aktivierten Aminoacylteils auf das Peptidyl-Carrierprotein CloN5. Beide Reaktionen werden durch CloN4 katalysiert. Das erhaltene L-Prolyl-S-CloN5 wird dann durch die Katalyse von CloN3 zu Pyrrolyl-S-CloN5 oxidiert und dann weiter zu Pyrrol-2-carboxyl-S-CloN5 umgewandelt (Garneau *et al.*, 2005).

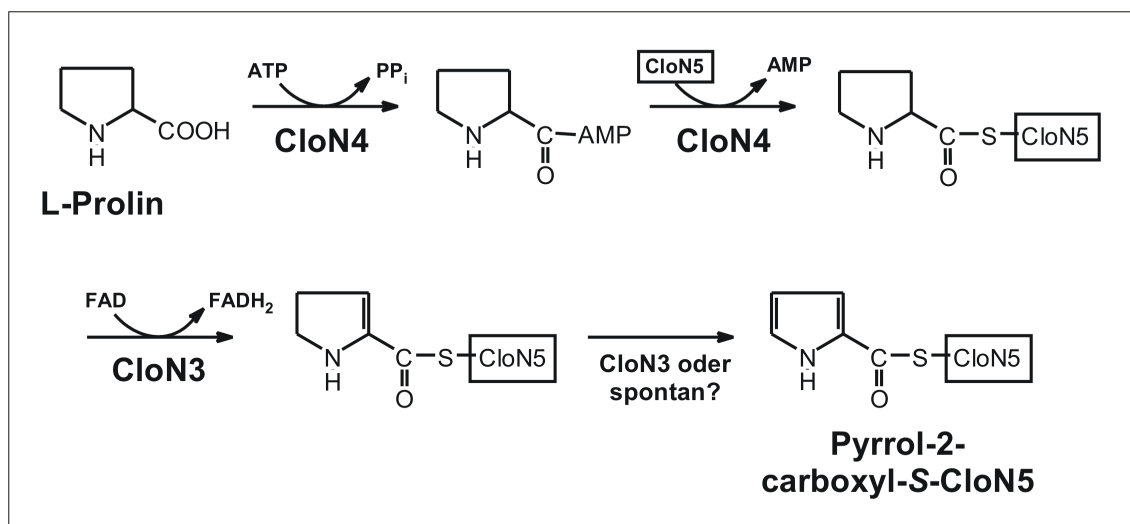


Abbildung I.7: Bildung des Pyrrol-2-carboxyl-S-CloN5

Die anschließende Übertragung dieses Pyrrolteils auf die 3''-OH des Desoxyzuckers wird durch das Genprodukt von *cloN2* katalysiert. Eine Inaktivierung dieses Gens in *S. roseochromogenes* hatte nämlich zur Akkumulation von Novclobiocin 104 und 105, zwei Aminocoumarin-Derivaten, denen der Pyrrolteil an der 3''-OH des Desoxyzuckers fehlte, und der freien Pyrrol-2-carbonsäure geführt (Xu *et al.*, 2003). Inaktivierung von *cloN6* im Wildtypstamm zeigte, dass CloN6 für die Methylierung der Pyrroleinheit verantwortlich ist, da die erhaltene *cloN6*-Defektmutante anstelle von Clorobiocin Novclobiocin 109, ein Derivat ohne Methylgruppe an Position 5 des Pyrrolringes, akkumulierte (Westrich *et al.*, 2003). Die Funktion der Gene *cloN2*, *cloN3*, *cloN4*, *cloN5* und *cloN6* lassen sich natürlich auch auf die entsprechenden Gene des

Coumermycin A₁ übertragen. Die mögliche Rolle der beiden Enzyme CloN1 und CloN7 bzw. CouN1 und CouN7 wurde bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht aufgeklärt. Man konnte spekulieren, dass beide Gene entweder am Transfer der Pyrroleinheit auf den Desoxyzucker oder an der Methylierung der Pyrroleinheit beteiligt sind. Natürlich können die beiden Gene auch in andere Biosyntheseschritte involviert sein.

Der Nachweis, dass NovN tatsächlich für die Carbamoylierung von Novobiocin verantwortlich ist, wurde durch dessen heterologe Expression in einer *couN3*-Defektmutante von *S. rishiriensis* und der damit verbundenen Bildung eines carbamoylierten Coumermycin-Derivats erbracht (Xu *et al.*, 2002).

Somit konnte durch Inaktivierungs- und Überexpressionsversuche die Funktion der meisten Gene der Cluster aufgeklärt werden und der Ablauf der Biosynthese der Antibiotika postuliert werden. Eine Übersicht über die Biosynthese von Clorobiocin ist in Abbildung I.8 aufgezeigt.

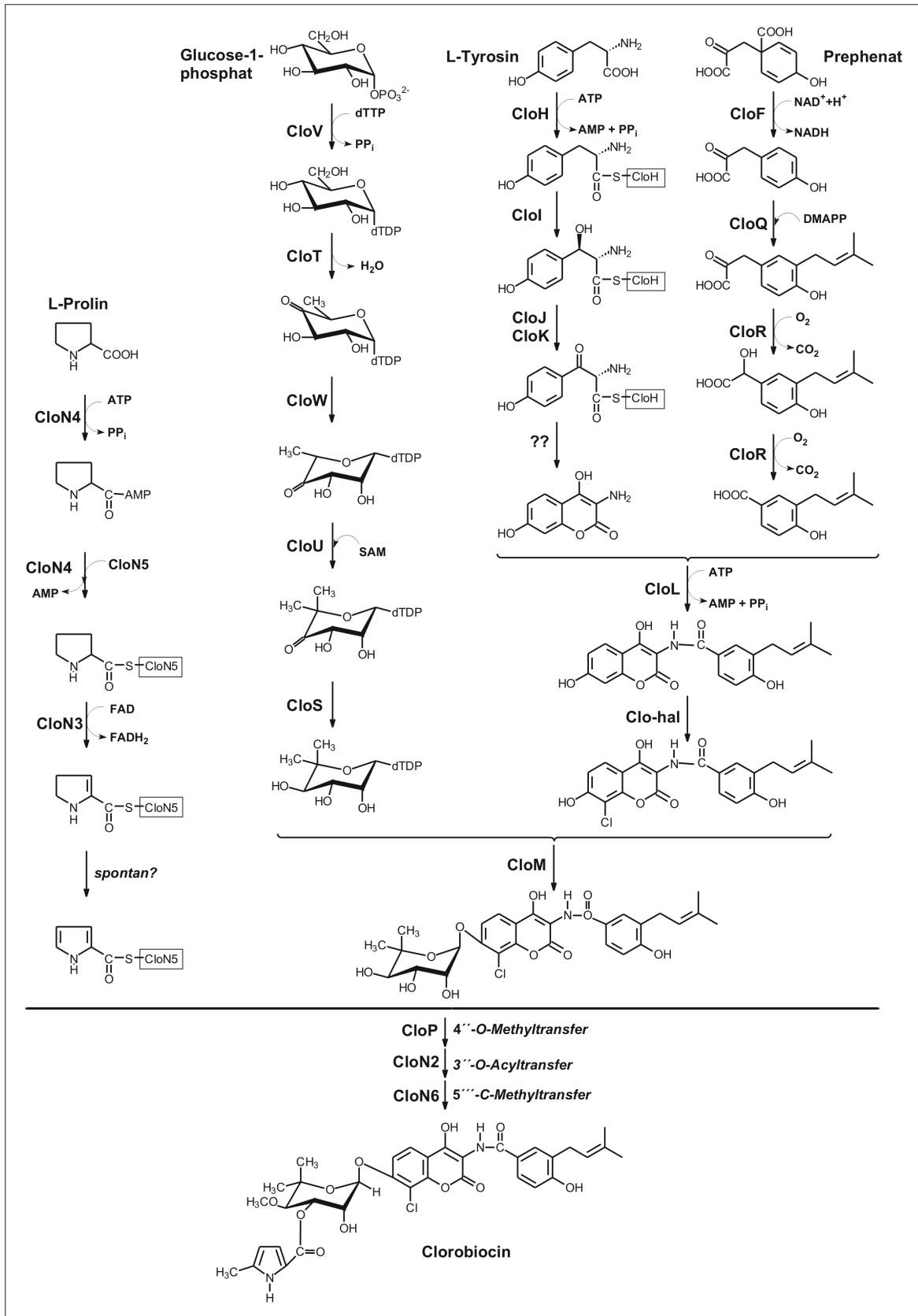


Abbildung I.8: Biosyntheseweg von Clorobiocin

3. Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit sollte der Funktionsnachweis der Gene *cloN1* und *cloN7* im Clorobiocin-Cluster sein. Beide Gene stehen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Genen *cloN2*, *cloN3*, *cloN4*, *cloN5* und *cloN6*, die in der Bildung, des Transfers und der Modifizierung der Pyrrol-2-carbonsäure von Clorobiocin involviert sind. Daher könnten auch *cloN1* und *cloN7* an einem von diesen Prozessen beteiligt sein. Um die tatsächliche Funktion beider Gene aufzuklären, sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

- Inaktivierung der Gene *cloN1* / *cloN7* im Clorobiocin-Cluster mittels PCR-Targeting
- Heterologe Expression der modifizierten Cluster in *S. coelicolor* M512
- Untersuchung der Sekundärstoffproduktion der erhaltenen Mutanten
- Charakterisierung der gebildeten Sekundärstoffe

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung des Methylierungsschrittes in der Desoxyzucker-Biosynthese von Clorobiocin. Im Hinblick auf der Funktionsaufklärung von *cloU* und dessen mögliche Anwendung im metabolischen Engineering von Desoxyzuckerbiosynthesen sollten folgende Punkte bearbeitet werden:

- Inaktivierung des Gens *cloU* im Clorobiocin-Cluster unter Anwendung der PCR-Targeting Methode
- Heterologe Expression des modifizierten Clusters in *S. coelicolor* M512
- Analyse der Produktion an Sekundärmetaboliten in der erhaltenen Mutante
- Isolierung und Strukturaufklärung der neuen Sekundärmetabolite

Des weiteren sollte die Bildung der zentralen Pyrroleinheit, der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure, von Coumermycin A₁ untersucht werden. Coumermycin A₁ besitzt als einziges der drei vorgestellten Aminocoumarin-Antibiotika diese Pyrroleinheit. Dieser Strukturunterschied ist auch in den drei Clustern wiedergegeben. So enthält das Coumermycin A₁-Cluster im Vergleich zu den Clustern von Novobiocin und Clorobiocin sechs zusätzliche Gene *couR1-couR6*. Vier von diesen Genen *couR1-couR4* können möglicherweise in der Bildung dieser Pyrroleinheit involviert sein. Deshalb sollte durch Überexpression dieser Gene gezeigt werden, ob ihnen diese Funktion zugeordnet werden kann.

Zusätzlich zu diesen drei Projekten sollte geklärt werden, warum der Kulturextrakt einer *cloQ*-Defektmutante von *S. roseochromogenes* DS 12.976, die in der Bildung der 3-

Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A) blockiert ist und somit nicht mehr in der Lage ist Clorobiocin zu bilden, immer noch antibakterielle Aktivität zeigt.

II Material und Methoden

1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg) verwendet. Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle II .1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Bezeichnung
Aventis, Bad Soden a.Ts.	Clorobiocin
Becton-Dickinson, <i>Heidelberg</i>	Casaminoacids Corn starch Hefeextrakt Nutrient Agar Peptone Tryptic Soy Broth (Soytone) Trypton
Biozym Scientific GmbH, <i>Oldendorf</i>	Agarose
Fluka, <i>Neu-Ulm</i>	Apramycin Thiostrepton N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
FMC BioProducts, <i>Rockland, USA</i>	NuSieve [®] GTG [®] Agarose
Lancaster, <i>Mühlheim a. M.</i>	3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure
Merck, <i>Darmstadt</i>	Fleischextrakt Malzextrakt β -Mercaptoethanol Phosphorpentoxid Tetracyclin Uvasol-DMSO-d6 Uvasol-Methanol-d4
Roth, <i>Karlsruhe</i>	Agar Ammoniumpersulfat 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) Carbenicillin 1,4-Dithiothreitol Glucose

Hersteller	Bezeichnung
Roth, Karlsruhe	Glycin Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) L-Prolin 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Polyethylenglykol (PEG)1000 Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Sodiumdodecylsulfat (SDS) Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminomethanmaleat (Tris-Maleat) N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanolsulfonsäure (TES)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blue R250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Bromphenolblau Chloramphenicol Coumermycin A ₁ Dimethylformamid (DMF) Dimethylsulfoxid (DMSO) Distillers grains ans solubles EDTA Imidazol Kanamycin Lard oil Maleinsäure Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Tris Base
Südzucker, Mannheim	Saccharose

Die in Tabelle II.2 aufgeführten Chemikalien wurden in den Arbeitskreisen von Prof. Heide (Schmutz, E., Hennig, S.) und Prof. Wessjohann (Dessoy, M.-A.) chemisch synthetisiert.

Tabelle II.2: Chemisch synthetisierte Chemikalien

Hersteller	Bezeichnung
Hennig, S. Synthese nach (Kominck und Meyer, 1975)	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A)
Schmutz, E.(Schmutz et al., 2003b)	3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonensäure 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure
Dessoy, M.-A.	3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure

2. Säulenmaterialien

Die verwendeten Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanz, Suspensionen oder Fertigsäulen bezogen, dessen Lagerung nach Herstellerangaben erfolgte.

Tabelle II.3: Säulenmaterialien

Hersteller	Säulenmaterial
Amersham Biosciences, Freiburg	Sephadex [®] LH-20 (Trockensubstanz) Sephadex [®] G25 NAP-10 (kommerzielle Säule)
C+S Chromatographie Service, Düren	Multosphere [®] RP 18-5 (5 µm, 250 x 4 mm) (kommerzielle Säule) Multosphere [®] RP 18-5 (5 µm, 250 x 8mm) (kommerzielle Säule) Multosphere [®] RP 18-5 (5 µm, 250 x 10mm) (kommerzielle Säule)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

3. Enzyme und Kits

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Restriktionsendonucleasen T4-DNA-Ligase
Fluka, Neu-Ulm	Lysozym (47000 U/mg) Lysozym (85400 U/mg)
Macherey-Nagel, Düren	Nucleobond [®] Kit AX100 Nucleospin [®] Extract 2 in 1
New England Biolabs, Schwalbach	Restriktionsendonucleasen T4-DNA-Ligase
Plant Bioscience Limited, Norwich, UK	REDIRECT [®] technology: PCR-targeting system in <i>Streptomyces coelicolor</i>
Promega, Madison, WI, USA	pGEM [®] -T Easy Vector System I <i>Pfu</i> -Polymerase
Qiagen, Hilden	RNase A (100 mg/ml)
Roche Biochemicals, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert Expand High Fidelity PCR System
Stratagene, Taufkirchen	1 kb- DNA –Leiter (500 µg/ml) Restriktionsendonucleasen

4. Nährmedien, Puffer und Lösungen

4.1 Medien für Bakterienkultivierung

Die Angaben für die nachfolgend aufgeführten Nährmedien beziehen sich jeweils auf 1 l Medium. Alle Medien wurden im Autoklaven mit Wasserdampf bei 121°C, 20 min sterilisiert. Im Falle von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Agar hinzugegeben. Die Zugabe von getrennt sterilisierten Lösungen und hitzelabiler Substanzen wie Antibiotika erfolgte erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen. Die Medien wurden bei RT oder 4°C gelagert.

4.1.1 Kultivierung von *E.coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium (*Sambrook und Russell, 2001*)

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

Alle Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden noch 10 ml einer sterilen 1 M MgCl₂-Lösung hinzugefügt.

4.1.2 Kultivierung von *Streptomyceten*

YMG (Yeast-Malt-Glucose)-Medium

Hefeextrakt	4,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Glucose	4,0 g

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

HA-Medium

YMG-Medium	1,0 l
------------	-------

Nach dem Autoklavieren werden steril 1,0 ml 1 M CaCl₂-Lösung zugegeben.

TSB (Tryptone Soya Broth)-Medium (Kieser et al., 2000)

Tryptone Soya Broth 30,0 g
Die Bestandteile werden in 1 l H₂O_{bidest.} gelöst und autoklaviert.

YEME (Yeast Extract-Malt Extract)-Medium (Kieser et al., 2000)

Saccharose 340,0 g
Hefeextrakt 3,0 g
Pepton 5,0 g
Malzextrakt 3,0 g
Glucose 10,0 g
Die Bestandteile werden zu 1 l in H₂O_{bidest.} gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von 2,0 ml steriler 2,5 M MgCl₂-Lösung.

MS (Mannitol Soya flour)-Agar (Kieser et al., 2000)

Mannitol 20,0 g
Sojamehl 20,0 g
Agar 20,0 g
Das Mannitol wird zu 1 l Leitungswasser gelöst und jeweils 100 ml in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit 2 g Agar und 2 g Sojamehl gegossen. Sterilisation der Lösung erfolgt durch zweimaliges Autoklavieren (115°C, 15 min) mit vorsichtigem Schütteln zwischen den beiden Autoklavievorgängen.
Dieses Medium ist für die Sporulation von *S. coelicolor* geeignet.

R5-Medium (modifiziert)(Kieser et al., 2000)

K₂SO₄ 0,25 g
MgCl₂ x 6 H₂O 10,1 g
Glucose 10,0 g
Casaminoacid 0,1 g
Spurenelementlösung 2,0 ml
Hefeextrakt 5,0 g
TES 5,7 g
Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden noch folgende sterile Lösungen zugegeben:

0,5 % KH₂PO₄ 1,0 ml
5 M CaCl₂ x 2 H₂O 0,4 ml
20 % L-Prolin 1,5 ml
1 M NaOH 0,7 ml

Spurenelementlösung

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₆ x 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

4.1.3 Clorobiocin- Produktionsmedium

Corn starch-Medium (Vorkulturmedium) (Mancy, Ninet, und Preud'Homme, 1974)

Corn starch	10,0 g
Pepton	10,0 g
Fleischextrakt	5,0 g

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Distillers solubles-Medium (Produktionsmedium) (Mancy, Ninet, und Preud'Homme, 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 700 ml H₂O_{bidest.} gelöst und auf pH 7,8 eingestellt.

Anschließend Zugabe von:

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

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

Lösung B:

(NH ₄) ₂ SO ₄	32,0 g
---	--------

Das Salz wird in 100 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf 200 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Lösung C:

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

Die Glucose wird in 200 ml 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 versetzt.

4.1.4 Elloramycin-Produktionsmedium

R5A-Medium (Fernandez et al., 1998)

Saccharose	100,0 g/l
K ₂ SO ₄	0,25 g/l
MgCl ₂	10,12 g/l
Glucose	10,0 g/l
Casaminoacid	0,1 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
MOPS	21,0 g/l
Spurenelementlösung	2,0 ml/l

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

4.1.5 Coumermycin A₁-Produktionsmedium

SK-Medium (Scannell und Kong, 1969)

Corn starch	20,0 g
Schweinefett	20,0 g
Maisstärke	20,0 g
Hefeextrakt	4,0 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	2,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	202 µg

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

4.1.6 Protoplastentransformation von *Streptomyceten*

CRM-Medium

Saccharose	103,0 g
Tryptic Soy Broth	20,0 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,1 g
Hefeextrakt	10,0 g
Glycin	7,5 g

Die Bestandteile werden in 800 ml H₂O_{bidest.} gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgt die Zugabe von 10,0 ml steriler 1 M CaCl₂-Lösung.

YEME-Medium mit Glycin (Kieser et al., 2000)

Für die Präparation von Protoplasten von *S. coelicolor* wurden 25,0 ml Glycin 20% (w/v) zu 1 l YEME-Medium hinzugegeben. Endkonzentration = 0,5 %.

R2YE-Medium (Kieser et al., 2000)

Saccharose	103,0 g
Glucose	10,0 g
Beide Substanzen werden in 200 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst und auf 300 ml aufgefüllt.	
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,12 g
Beide Substanzen werden in 100 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst und auf 200 ml aufgefüllt.	
Casaminosäuren	0,1 g
Hefeextrakt	5,0 g
Agar (Platten)	20,0 g
Die Bestandteile werden in 100 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst und auf 288 ml aufgefüllt.	
Alle drei Lösungen werden separat autoklaviert. Nach dem Autoklavieren werden die Lösungen vereinigt und folgende sterile Lösungen hinzugefügt.	
TES (250 mM)	100,0 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (250 mM)	80,0 ml
L-Prolin (20%)	15,0 ml
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	10,0 ml
Spurenelementlösung	2,0 ml
NaOH (1 M)	5,0 ml

R3-Weichagar

Saccharose	171,0 g
Glucose	10,0 g
Pepton	4,0 g
KCl	0,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,2 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8,1 g
Agar	8,0 g
Alle Bestandteile werden in einem Endvolumen von 1 l H ₂ O _{bidest.} gelöst und autoklaviert. Anschließend werden folgende Lösungen dazu gegeben:	
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	40 ml
TES (250 mM, pH 7,2)	100 ml

Soft Nutrient-Agar (Kieser et al., 2000)

Nutrient broth	8,0 g
Agar	5,0 g
Diese Bestandteile werden in einem Endvolumen von 1 l H ₂ O _{bidest.} gelöst und autoklaviert.	

4.2 Antibiotikallösungen

Die Antibiotikallösungen wurden in Stammlösungen mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei -20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$) sterilfiltriert. Lösungen in Ethanol und DMSO sind autosteril. Die Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50°C steril zugesetzt.

Tabelle II.4: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration in		Lösungsmittel
	Stammlösung[mg/ml]	Medium[$\mu\text{g/ml}$]	
Apramycin	50	15-50	H ₂ O
Carbenicillin	50	50	H ₂ O
Chloramphenicol	50	25-50	Ethanol
Kanamycin	50	10-50	H ₂ O
Tetracyclin	25	12	Ethanol
Thiostrepton	50	6-50	DMSO

4.3 Puffer und Lösungen

4.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle II.5: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*: Alle Lösungen wurden mit H₂O_{bidest.} hergestellt und mit Ausnahme von L2-Puffer autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Herstellung
L1-Puffer	Tris-Base	50 mM	mit HCl auf pH 8,0 einstellen; RNase A kurz vor Gebrauch zugeben
	EDTA	10 mM	
	RNase A	100 $\mu\text{g/ml}$	
L2-Puffer	NaOH	0,2 M	
	SDS	1,0% (w/v)	
L3-Puffer	NaAc x 3 H ₂ O	3 M	auf pH 5,2 einstellen
TE-Puffer	Tris-Base	10 mM	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
	EDTA	1 mM	

Tabelle II.6: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden und genomischer DNA aus *Streptomyces*: Alle Lösungen wurden mit H₂O_{bidest.} hergestellt und mit Ausnahme von Lösung B autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonzentration	Herstellung
Lösung A	Glucose	50 mM	mit HCl auf pH 8,0 einstellen; RNase A und Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben
	Tris-Base	25 mM	
	EDTA	10 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
	Lysozym	4-6 mg/ml	
Lösung B	NaOH	0,2 M	
	SDS	1,0% (w/v)	
Lösung C	NaAc x 3 H ₂ O	3 M	auf pH 5,2 einstellen
TSE-Puffer	Tris-Base	25 mM	mit HCl auf pH 8,0 einstellen; RNase A und Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben
	Saccharose	10,3% (m/v)	
	EDTA	25 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
	Lysozym	3,0 mg/ml	

4.3.2 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle II.7: Puffer zur DNA-Gelelektrophorese. Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest.} hergestellt, autoklaviert und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	Herstellung
50 x TAE-Puffer	Tris-Base	2,0 M	mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen
	EDTA	0,05 M	
	Eisessig	57,1 ml/l	
Ladepuffer	Glycerin	30% (w/v)	nicht autoklavieren; Lagerung bei 4°C
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)	
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 mg/l	

4.3.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von *Streptomyces*

Die Lösungen für den Protoplastierungs- und Transformationspuffer wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ angesetzt, getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen gemischt. Die Puffer wurden nach Aliquotierung bei -20°C gelagert.

Tabelle II.8: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von *Streptomyces*

Puffer	Zusammensetzung	Menge
Protoplastierungspuffer (P-Puffer)	Saccharoselösung [12% (m/v)]	85,5 ml
	Spurenelementlösung (s. 4.1.2)	0,2 ml
	K_2SO_4 (140 mM)	1,0 ml
	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)	1,0 ml
	KH_2PO_4 (40 mM)	1,0 ml
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (250 mM)	1,0 ml
	TES (0,25 M, pH 7,2)	10,0 ml
Transformationspuffer (T-Puffer)	Saccharoselösung [25% (m/v)]	1,0 ml
	PEG 1000 [50% (m/v)]	5,0 ml
	Spurenelementlösung (s. 4.1.2)	0,03 ml
	K_2SO_4 (140 mM)	0,1 ml
	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 M)	0,1 ml
	KH_2PO_4 (40 mM)	0,1 ml
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (250 mM)	1,0 ml
	Tris-Maleat (0,5 M, pH 8,0)	1,0 ml
	H_2O	2,0 ml

4.3.4 Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung

Tabelle II.9: Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung. Alle Puffer und Lösungen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
Depurinierungslösung	HCl	250 mM	

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

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
Stripping-Lösung	NaOH	0,2 M	
	SDS (als 2%ige (w/v) Lsg.)	0,1%	

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

Tabelle II.10: Stammlösungen zur Blau-Weiß-Selektion. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

Lösung	Zusammensetzung	pro Platte
IPTG	47 mg/ml in H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert (0,2 µm Membranfilter)	20 µl
X-Gal	20 mg/ml in DMF, autosteril	20 µl

4.3.6 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.

Tabelle II.11: Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge	Herstellung
Trenngel (12%)	H ₂ O _{bidest.}	3,35 ml	APS und TEMED werden erst kurz vor Gießen des Geles hinzugefügt
	1,5 M Tris (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	
Sammelgel (4%)	H ₂ O _{bidest.}	6,1 ml	APS und TEMED werden erst kurz vor Gießen des Geles zugegeben
	0,5 M Tris (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	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge	Herstellung
Probenpuffer (1x)	H ₂ O _{bidest.}	3,55 ml	5 µl β-Mercaptoethanol werden zu 95 µl Puffer kurz vor Gebrauch zugegeben
	0,5 M Tris (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	
10x Laufpuffer	Tris Base	30,0 g	Die Bestandteile werden in einem Endvolumen von 1 l gelöst. Lagerung erfolgt bei 4°C.
	Glycin	144,0 g	
	SDS	10,0 g	
Fixierlösung	H ₂ O _{bidest.}	70% (v/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	20% (v/v)	
Coomassie Brilliant Blau G 250-Lösung	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25% (w/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	H ₂ O _{bidest.}	70% (v/v)	
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	20% (v/v)	
Entfärberlösung	H ₂ O _{bidest.}	45% (v/v)	Lagerung bei Raumtemperatur
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	45% (v/v)	

4.3.7 Puffer zur Enzymreinigung über Nickelaffinitätschromatographie

Tabelle II.12: Puffer zur Enzymreinigung. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden in H₂O_{bidest} angesetzt und bei 4°C gelagert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM	Imidazol und Lysozym werden erst kurz vor Gebrauch
	Na ₂ HPO ₄	50 mM	
	NaCl	300 mM	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
	Imidazol	10 mM	zugegeben
	Lysozym	2 mg/ml	
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM	
	Na ₂ HPO ₄	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	20 mM	
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄	50 mM	
	Na ₂ HPO ₄	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	250 mM	

5. Plasmide, Primer und Bakterienstämme

5.1 Vektoren

Tabelle II.13: Vektoren, Plasmide und Cosmide

NAME	GRÖÖE [KB]	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/ REFERENZ
Vektoren			
pBluescript SK(-)	2,958	Klonierungsvektor, Amp ^R , lacZ'α, fl(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene
pGEM-T	3,000	linearisierter Vektor mit T-Überhang für direktes Klonieren von PCR-Fragmenten mit A-Überhang, Amp ^R , lacZ'α, fl-origin	Promega
pGEM-7Zf(-)	2,997	Klonierungsvektor, Amp ^R , lacZ'α, fl(-)-origin, ColE1-origin	Promega
pGEM-11Zf(+)	3,221	Klonierungsvektor, Amp ^R , lacZ'α, fl(-)-origin, ColE1-origin	Promega
pGM9	6,264	<i>Streptomyces</i> Vektor, Amp ^R , Thio ^R , Kana ^R , pSG5-origin	(Muth <i>et al.</i> , 1989)
pHGF7505	4,148	Klonierungsvektor, Amp ^R , lacZ'α, ColE1-origin, enthält NEB193 basierende <i>actII-orf4/pactIII-actI</i> -Kassette	(Yu <i>et al.</i> , 2001)

NAME	GRÖÖE [KB]	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/ REFERENZ
pHGF7604	22,300	<i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttle-Vektor Amp ^R , Thio ^R , ColE1-origin, SCP2- origin, enthält <i>actII-orf4</i> -Promotor, Biosynthesegene für 3-Amino-5- hydroxybenzoesäure	(Yu <i>et al.</i> , 2001)
pHGF7669	23,671	<i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttle- Vektor, Apra ^R , ColE1-origin, SCP2-origin, enthält <i>actII-orf4</i> -Promotor und Ansamitocin Polyketid Expressions- kassette	T.-W. Yun
pLitmus 28	2,823	Klonierungsvektor, Amp ^R , lacZ'α, M13-origin, ColE1-origin	New England Biolabs
pQE60	3,431	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , T5-Promotor, ColE1-origin, C-terminaler (His) ₆ -Tag	Qiagen
pRSETB	2,900	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^R , T7-Promotor, ColE1-origin, pUC- origin, N-terminaler (His) ₆ -Tag	Invitrogen
SuperCos1	7,939	Cosmidvektor, Amp ^R , Neo ^R , S40-origin	Stratagene
pUWL201	6,590	<i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttle- Vektor, , Amp ^R , Thio ^R , konstitutiver <i>ermE*</i> -Promotor, pIJ101-origin, ColE1-origin	(Doumith <i>et al.</i> , 2000)
pWHM3	7,200	<i>E.coli-Streptomyces</i> -Shuttle- Vektor, Amp ^R , Thio ^R , lacZ'α	(Vara <i>et al.</i> , 1989)
Plasmide			
pMPU	7,900	pWHM3 basierendes Plasmid, Amp ^R , Thio ^R , pUC19-origin, <i>ermE*</i> - Promotor, enthält das Gen <i>oleU</i> aus dem Oleandomycin-Biosynthesegen- cluster	M.Perez, C.Mendez (persönliche Mitteilung)
pRHAM	12,216	pEM4 basierendes Plasmid, Amp ^R , Thio ^R , pUC21-origin, <i>ermE*</i> - Promotor, enthält die Gene <i>oleL</i> , <i>oleS</i> , <i>oleE</i> und <i>oleU</i> sowie das 5'-Ende von <i>oleN1</i> aus dem Oleandomycin- Biosynthesegencluster	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2000)

NAME	GRÖßE [KB]	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/REFERENZ
pUG019	3,959	pBluescript SK(-)-Derivat, enthält eine Apramycin-Resistenz (<i>aac(3)IV</i>)-Kassette flankiert durch <i>XbaI</i> und <i>SpeI</i> Restriktionsschnittstellen, Amp ^R	Ute Galm (Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
pZW10	15,706	12,748 kb <i>BglII</i> -Fragment (Position 15530 (T7)-28278 (T3) von AF235050) in die <i>BamHI</i> -Schnittstelle von pBluescript SK(-), Amp ^R	(Wang <i>et al.</i> , 2000)
<i>Cosmide</i>			
Cosmid 4-2H	Größe nicht genau bekannt	Cosmid aus der Genbank von <i>S. rishiriensis</i> DSM 40489, enthält die rechte Region des Coumermycin A ₁ -Clusters in SuperCos1	(Wang <i>et al.</i> , 2000)
Cosmid 5A-46	45,000	Cosmid aus der Genbank von <i>S. rishiriensis</i> DSM 40489, enthält das Coumermycin A ₁ -Cluster ab <i>couI</i> in SuperCos1	M. Wolpert persönliche Mitteilung
Cosmid D1A8	42,735	SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält das Clorobiocin-Cluster mit dem Resistenzgen <i>gyrB</i> ^R , Amp ^R , Kan ^R	(Pojer <i>et al.</i> , 2002)
Cosmid clo-BG1	55,109	vom Cosmid D1A8, <i>bla</i> -Gen durch Kassette vom pIJ787 (<i>oriT</i> , <i>tet</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31) ersetzt, Kan ^R	Bertolt Gust (Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
Cosmid 16F4	43,700	pKC505 basierendes Cosmid, Apra ^R , ColeE1-origin, SCP2-origin, enthält 25 kb großes Fragment des Elloramycin-Biosyntheseclustern	(Decker <i>et al.</i> , 1995b)

Tabelle II.14: Eigene Plasmid- und Cosmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

NAME	GRÖßE [KB]	BESCHREIBUNG
<i>Plasmide</i>		
pAF01	4,460	1,4 kb <i>NsiI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment (Position 18780-20273 in AF235050) aus pZW10 (per PCR amplifiziert) in pGEM 7Zf(-) kloniert, trägt das Gen <i>couR1</i> und Anfang von <i>couR2</i>
pAF02	3,623	0,7 kb <i>XhoI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment (Position 22803-23528 in AF235050) aus pZW10 (per PCR amplifiziert) in

NAME	GRÖßE [KB]	BESCHREIBUNG
		pBluescript SK(-) kloniert, trägt Endbereich von <i>couR4</i>
pAF04	5,438	2,5 kb <i>BamHI</i> / <i>XhoI</i> -Fragment (Position 20273-22803 in AF235050) aus pZW10 in pBluescript SK(-) kloniert, enthält Endbereich von <i>couR2</i> , <i>couR3</i> und Anfang von <i>couR4</i>
pAF05	6,949	2,5 kb <i>BamHI</i> / <i>XhoI</i> -Fragment aus pAF04 in pAF01 kloniert
pAF06	7,669	0,7 kb <i>XhoI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment aus pAF02 in pAF05 kloniert
pAF07	8,883	4,7 kb <i>NsiI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment aus pAF06 in pHGF7505 kloniert, enthält die Gene <i>couR1-couR4</i>
pAF08	13,370	6,2 kb <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Fragment aus pAF07 in pWHM3 kloniert
pAF09	19,121	6,2 kb <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Fragment aus pAF07 in pHGF7604 kloniert
pAF10	18,879	6,2 kb <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Fragment aus pAF07 in pHGF7604 kloniert
pAF15	4,278	1,3 kb <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment (Position 36579-37909 in AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pBluescript SK(-) kloniert, enthält das Gen <i>cloU</i>
pAF16	7,900	1,3 kb <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment aus pAF15 in pUWL201 kloniert, enthält das Gen <i>cloU</i>
pAF17	3,817	1,0 kb <i>NcoI</i> / <i>BglII</i> -Fragment (Position 21149-22219 in AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pLitmus 28 kloniert, trägt das Gen <i>cloN2</i>
pAF19	3,883	1,0 kb <i>BamHI</i> / <i>PstI</i> -Fragment (Position 21149-22218 in AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pLitmus 28 kloniert, trägt das Gen <i>cloN2</i>
pAF20	3,952	1,0 kb <i>BamHI</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus pAF19 in pRSETB kloniert, trägt das Gen <i>cloN2</i>
pAF21	4,484	1,0 kb <i>NcoI</i> / <i>BglII</i> -Fragment aus pAF17 in pQE60 kloniert, trägt das Gen <i>cloN2</i>
pAF22	3,636	0,8 kb <i>HindIII</i> / <i>PstI</i> -Fragment (Position 27031-27874 in AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pLitmus 28 kloniert, enthält das Gen <i>cloN7</i>
pAF23	3,715	0,8 kb <i>HindIII</i> / <i>PstI</i> -Fragment aus pAF22 in pRSETB kloniert, enthält das Gen <i>cloN7</i>
pAF24	9,961	3,7 kb <i>HindIII</i> – pAF23-Fragment in pGM9 kloniert, trägt das Gen <i>cloN7</i>
pAF25	10,203	3,9 kb <i>HindIII</i> – pAF20-Fragment in pGM9 kloniert, trägt

NAME	GRÖßE [KB]	BESCHREIBUNG
		das Gen <i>cloN2</i>
pAF26	3,310	0,31 kb <i>cloN1</i> -PCR-Fragment (Position 20841-20865 in AF329398) aus clo-BG1 in pGEM-T-Vektor kloniert
pAF27	3,704	0,28 kb <i>NcoI</i> / <i>BglII</i> -Fragment (Position 20852-21141 in AF329398) aus pAF26 in pQE60 kloniert, trägt das Gen <i>cloN1</i>
pAF29	3,367	0,36 kb <i>cloN1</i> -PCR-Fragment (Position 20813-20835 in AF329398) aus clo-BG1 in pGEM-T-Vektor kloniert
pAF30	6,934	0,33 kb <i>BamHI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment (Position 20824-21159 in AF329398) aus pAF29 in pUWL201 kloniert, trägt das Gen <i>cloN1</i>

COSMIDE	
clo-AF1	von clo-BG1 abgeleitet, Gen <i>cloU</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt
clo-AF2	von clo-AF1, Resistenzkassette durch <i>XbaI</i> / <i>SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt, $\Delta cloU$ -cosmid
clo-AF3	von clo-BG1 abgeleitet, Gen <i>cloN7</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt
clo-AF4	von clo-AF3, Resistenzkassette durch <i>XbaI</i> / <i>SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt, $\Delta cloN7$ -cosmid
clo-AF5	von clo-BG1 abgeleitet, <i>cloN1</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt
clo-AF6	von clo-AF5, Resistenzkassette durch <i>XbaI</i> / <i>SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt, $\Delta cloN1$ -cosmid
cou-AF1	von Cosmid 5A-46, <i>couR1-couR4</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pIJ773 ersetzt

5.2 PCR-Primer

Tabelle II.15: Für die Inaktivierungen mittels PCR-Targeting erfolgreich eingesetzte Primer
Sequenzbereiche vor und nach dem entsprechenden Gen sind fett dargestellt, Restriktions-
schnittstellen sind unterstrichen

NAME	SEQUENZ	S.-ST.	POSITION	ACCESSI ON-NO.	AMPLIFI ZIER- TES GEN
Primer für die Inaktivierung des Gens cloN1					
cloN1-f	5'-CACAGTGC AACACA ATCGATGGGGGAATTA CGCGAGATGATTCCGG GGATCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	20817-20855 2069-2049	AF329398 AX657066	vor <i>cloN1</i> FRT-Site
cloN1-r	5'-GGCCACGTATATAC CTGATGTCCGCATCTG TTGCGCCTAACTAGTC TGGAGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	21176-21138 699-719	AF329398 AX657066	nach <i>cloN1</i> FRT-Site
Primer für die Inaktivierung des Gens cloN7					
cloN7-f	5'-GGCAGACTCCCAA CAGCAGAGAGGACCA ACTGAGCATGATTCCG GGGATCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	26990-27027 2069-2049	AF329398 AX657066	vor <i>cloN7</i> FRT-Site
cloN7-r	5'-AGTGTGCGTGGTGC GCCAGCACTCCGACAA GCACCGTTAACTAGTC TGGAGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	27860-27898 699-719	AF329398 AX657066	nach <i>cloN7</i> FRT-Site
Primer für die Inaktivierung des Gens cloU					
cloU-f	5'-GACCGGCGGTTTGC ATCCCGTGAGGGGGA GGAAGAGTTGATTCCG GGGATCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	36566-36604 2069-2049	AF329398 AX657066	vor <i>cloU</i> FRT-Site
cloU-r	5'-TGGAACGGGATCAC CGCAGCCGACACCGTG GCCACGTCAACTAGTCT GGAGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	37900-37862 699-719	AF329398 AX657066	nach <i>cloU</i> FRT-Site
Primer für die Inaktivierung der Gene couR1-couR4					
couR1-4 f	5'-TAATCGCGGACCCG GATCAGAATGCGGTG ACCCGTAATGATTCCG GGGATCCGTCGACC-3'	–	18760-18798 2069-2049	AF235050 AX657066	vor <i>couR1-4</i> FRT-Site
couR1-4 r	5'-TTCGGCGGAACCCC GTCCCCGGTGGCGCC GGCGGTGCTATGTAGG CTGGAGCTGCTTC-3'	–	23554-23516 699-719	AF235050 AX657066	nach <i>couR1-4</i> FRT-Site

Tabelle II.16 Für die Klonierungen eingesetzte Primer. Die hervorgehobenen Buchstaben stellen die in der Originalsequenz eingeführten Mutationen dar, um die gewünschte Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) zu erhalten.

NAME	SEQUENZ	S-ST.	POSITION	ACCESSI ON-NO.	PLASM ID
couR1-f	5'-CCGGATGCATATGCG GTGACCCGTAATGTG-3'	<i>NsiI</i>	18771-18800	AF235050	pAF01
couR1-r	5'-ACCGGTCGTCAGGGA TCCGAGCGAGCCGA-3'	<i>BamHI</i>	20288-20261	AF235050	
couR4-f	5'-TGGACTGGCTGCTCG AGCGCGGCCGACGAT-3'	<i>XhoI</i>	22791-22820	AF235050	pAF02
couR4-r	5'-CGGTCTAGACGGCG GTGCTACCCGGGGATG- 3'	<i>XbaI</i>	23535-23506	AF235050	
k-cloU-f	5'-GACCGGCGGTTTGG TCCCGTGA-3'	<i>BamHI</i>	36566-36588	AF329398	pAF15
k-cloU-r	5'-TTCGGACCTTCTAG CACGTGG-3'	<i>XbaI</i>	37919-37898	AF329398	
E-cloN2-f1	5'-AGGCGCAACCCATG GGGACATCAGGT-3'	<i>NcoI</i>	21139-21164	AF329398	pAF17
E-cloN2-r1	5'-CTGTGGGCTGAGATC TAAGTCCATCG-3'	<i>BglII</i>	22230-22205	AF329398	
E-cloN2-f2	5'-CATAGGCGCAACGG ATCCGACATCAGG-3'	<i>BamHI</i>	21136-21163	AF329398	pAF19
E-cloN2-r2	5'-CTGTGGGCTGCAGTC AAAGTCCATCG-3'	<i>PstI</i>	22230-22205	AF329398	
E-cloN7-f2	5'-GGACCAACTGAGC CTGCAGATGACAAA-3'	<i>PstI</i>	27013-27040	AF329398	pAF22
E-cloN7-r2	5'-CGACAAGAAGCTTTA TGCGGGACGTG-3'	<i>HindIII</i>	27874-27849	AF329398	
E-cloN1-f1	5'-GAATTACGCGCCA TGGTAAGTGGG-3'	<i>NcoI</i>	20841-20865	AF329398	pAF26
E-cloN1-r1	5'-CTGTTGCAGATCT GGCCTCGCAGCGG-3'	<i>BglII</i>	21149-21124	AF329398	
k-cloN1-f	5'-ACGACACACTGGA TCCAATCGA-3'	<i>BamHI</i>	20813-20835	AF329398	pAF29
k-cloN1-r	5'-TCCCGGCCACGTC TAGACCTGATGTCCGCA TCTGTTGCG-3'	<i>XbaI</i>	21170-21149	AF329398	

5.3 Bakterienstämme

Tabelle II.17: Bakterienstämme von *E. coli* und *Streptomyces*

STAMM	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/ REFERENZ
<i>E. coli</i>		
XL1 Blue MRF ⁻	recA1 endA1 gyrA96 Thi-1 <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^qZAM15 Tn10 (Tet^R)</i>]	Stratagene

STAMM	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/ REFERENZ
ET12567	DNA-Methylase negativer Stamm Tet ^R (dam ⁻ , dcm ⁻ , nsdM ⁻)	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS, CM ^R	Invitrogen
BW25113	K12 Derivat, $\Delta araBAD$, $\Delta rhaBAD$	(Datsenko und Wanner, 2000)
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. coelicolor</i> M512	$\Delta redD \Delta actII-ORF4$ SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ keine Produktion von Actino- rhodin, Undecylprodigiosin und Methylenomycin	(Floriano und Bibb, 1996)
<i>S. coelicolor</i> (clo-BG1)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das Biosynthesegencluster von Clorobiocin, Kan ^R	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF2)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>cloU</i> defektive Clorobiocincluster, Kan ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF3)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>cloN7</i> defektive Clorobiocin- cluster, Kan ^R	diese Arbeit (Freitag <i>et al.</i> , 2005b)
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF6)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>cloN1</i> defektive Clorobiocin- cluster, Kan ^R	diese Arbeit (Freitag <i>et al.</i> , 2005b)
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF2) / pAF16	Kan ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF6) / pAF30	Kan ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF6) / pUWL201	Kan ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF2) / cos16F4	Kan ^R , Apra ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF2) / pRHAM	Kan ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-AF2) / pMPU	Kan ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> Yu105	<i>proA1 argA1 redE60 \Delta act (ermE)</i> $\Delta whiE$, Hyg ^R , keine Produktion von Actinorhodin	(Yu und Hopwood, 1995)
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pAF08)	Hyg ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pAF09)	Hyg ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pAF10)	Hyg ^R , Apra ^R	diese Arbeit

STAMM	BESCHREIBUNG	HERSTELLER/ REFERENZ
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pWHM3)	Hyg ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pHGF7604)	Hyg ^R , Thio ^R	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> Yu105 (pHGF7664)	Hyg ^R , Apra ^R	diese Arbeit
<i>S. lividans</i> T7	<i>S. lividans</i> TK23, <i>tsr ble</i> T7- RNA-Polymerase	(Heinzelmann <i>et al.</i> , 2001)
<i>S. lividans</i> TK64	<i>pro-2 str-6 SLP2⁻ SLP3⁻</i>	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. lividans</i> TK64 (cos16F4)	Apra ^R	
<i>S. rishiriensis</i> DSM 40489	Wildtypstamm, Coumermycin A ₁ - Produzent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. rishiriensis</i> (cou-AF1)	<i>couR1-couR4</i> -Defektmutante von <i>S. rishiriensis</i> DSM 40489	diese Arbeit
<i>S. roseochromogenes</i> <i>varietas oscitans</i> DS 12.976	Wildtypstamm, Clorobiocin- Produzent	Aventis
<i>S. roseochromogenes</i> QDCO661	<i>cloQ</i> -Defektmutante von <i>S. roseo- chromogenes</i>	(Pojer <i>et al.</i> , 2003b)
<i>S. roseochromogenes</i> RDCO30	<i>cloR</i> -Defektmutante von <i>S. roseo- chromogenes</i>	(Pojer <i>et al.</i> , 2003a)

6. Kulturbedingungen

6.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht und Kultivierung von *E. coli* erfolgte über Nacht (16-18 h) in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten unter Zusatz des entsprechenden Selektionsantibiotikum bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Die Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter leichtem Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

Bei den Überexpressionsexperimenten und dem PCR-Targeting wurde die Inkubationstemperatur auf 30°C reduziert.

Für die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden 50 ml Bakteriensuspension abzentrifugiert (10 min, 3000 x g, 4°C), die Zellen in 1-2 ml 15%ige (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und bei -70°C gelagert.

6.2 Anzucht und Kultivierung von *Streptomyceten*

6.2.1 Generelle Kultivierung

Zur Kultivierung von *Streptomyceten* wurden verschiedene Fest- und Flüssigmedien, die unter Punkt 4.1.2 beschrieben sind, verwendet. Als Standardmedium wurde generell YMG-Medium eingesetzt. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C in Erlenmeyerkolben mit Schikane und einer Metallspirale unter Schütteln bei 170-200 rpm für 2-3 Tage kultiviert. Für die Präparation von Protoplasten wurden die Stämme *S. coelicolor* und *S. lividans* in YEME-Medium mit 0,5% Glycin und *S. rishiriensis* in CRM-Medium mit 0,4% Glycin kultiviert. Die Regeneration der Protoplasten erfolgte auf R2YE-Platten. Für die Isolierung genomischer DNA wurden *S. coelicolor* und *S. rishiriensis* in YEME-Medium kultiviert. Entsprechende Selektionsantibiotika wurden den Medien zugesetzt.

6.2.2 Produktion von Sekundärmetaboliten

Für die Produktion von Clorobiocin und Clorobiocinderivaten wurden 50 ml YMG-Medium mit 300 µl Glycerinkultur des Wildtyps oder der verschiedenen Mutanten von *S. roseochromogenes* inokuliert. Nach 2 Tagen Kultivierung bei 30°C und 210 rpm wurden 50 ml Corn starch-Medium mit 1 ml YMG-Vorkultur angeimpft und bei 33°C und 210 rpm für 2 Tage kultiviert. 5 ml von dieser Vorkultur wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Distillers solubles Produktionsmedium inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 210 rpm für 9 Tage.

Die *S. coelicolor* Stämme mit kompletten oder modifizierten Clorobiocin-Cluster wurden, wie zuvor für *S. roseochromogenes* beschrieben, kultiviert.

Für die Produktion von Coumermycin A₁ und anderen Sekundärmetaboliten wurden 100 ml SK-Produktionsmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 3 ml einer 2 Tage alten HA-Vorkultur des Wildtyps oder der Mutanten von *S. rishiriensis* inokuliert und bei 30°C und 180 rpm für 9 Tage kultiviert.

Für die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure wurden 50 ml R5-Produktionsmedium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit 3 ml einer 2 Tage alten HA-Vorkultur der Mutanten von *S. coelicolor* Yu105 inokuliert und für 11 Tage bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

Für die Produktion von 8-Demethyltetracenomycin C oder Elloramycin wurden 50 ml TSB-Medium mit 200 µl Glycerinkultur der Mutanten *S. lividans* TK64/(cos16F4),

S. coelicolor M512/(cos16F4) und *S. coelicolor M512*/(cloAF2)-(cos16F4) inokuliert. Nach 24 Stunden Kultivierung bei 30°C und 210 rpm wurden 100 ml R5A-Medium, die in 500 ml Erlenmeyerkolben enthalten waren, mit 5 ml TSB-Vorkultur inokuliert und bei 30°C und 240 rpm für 5 Tage kultiviert.

6.2.3 Herstellung von Glycerinkulturen und Sporensuspensionen

Streptomyces-Stämme wurden zur Stammhaltung in Form von Glycerinkulturen oder Sporensuspensionen aufbewahrt.

Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden 2-3 Tage alte Flüssigkulturen verwendet. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C) wurden die Zellen mit 15 ml 15%iger (v/v) Glycerinlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Menge in 5-8 ml 15%iger Glycerinlösung resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in Aliquoten von 1 ml bei -70°C gelagert. Für die Inokulation von 50 ml Flüssigmedium wurden 100-300 µl Glycerinkultur eingesetzt.

Zur Gewinnung von Sporen wurden 1 ml Flüssigkultur oder 200 µl Glycerinkultur auf HA- oder MS-Agarplatten ausplattiert, 15-20 min unter der Sterilbank getrocknet und anschließend für 5-7 Tage bei 30°C inkubiert. Nach ausreichender Sporulation wurden durch Zugabe von 9 ml einer sterilen 0,1%igen Tween® 20-Lösung die Sporen mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und abgeschwemmt. Die Suspension wurde 1 min lang stark gevortext und zur Abtrennung von Mycelresten über sterile Watte filtriert. Anschließend wurden die Sporen pelletiert (5 min, 3000 x g, 4°C) und in 1-3 ml 20%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Sporensuspension wurde in Aliquoten von 1 ml bei -70°C gelagert.

7. Methoden der Molekularbiologie

7.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

7.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Rotiphenol®, Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Dafür wurde die zu extrahierende Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt, durch Vortexen intensiv gemischt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (5-10 min, 21000 x g, 4°C). Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Der

Vorgang wurde gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Eine anschließende Ethanol-fällung (s. 7.1.2) führte zur Entfernung verbleibender Phenolreste aus der Lösung.

7.1.2 Alkoholfällung

Zur Aufkonzentrierung oder weiteren Reinigung der DNA von niedermolekularen Substanzen wurde die Alkoholfällung angewendet. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5fachen Volumen an eiskaltem 98%igem Ethanol oder 0,8-1fachen Volumen an Isopropanol versetzt und durch Invertieren vermischt. Bei Verwendung von Ethanol wurde das Gemisch 20 min bei -70°C aufbewahrt, während bei Anwendung von Isopropanol die Lösung 10 min bei RT inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (20 min, 21000 x g, 4°C) wurde das DNA-Präzipitat mit 0,5 ml eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} gelöst.

7.1.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mit einem GeneQuant Photometer (Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wurde die DNA-Lösung nach geeigneter Verdünnung mit H₂O_{bidest.} in eine Quarzglas-Präzisionsküvette überführt und vermessen. Eine Absorption von 1,0 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Zur Quantifizierung von verunreinigter DNA (durch RNA oder Proteine) wurde die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der eines geeigneten DNA-Größenstandards mit bekannter Konzentration nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Ethidium-bromid-Färbung abgeschätzt.

7.2 DNA-Isolierung

7.2.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

E. coli –Einzelkolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Die Zellen von 2 ml Bakteriensuspension wurden durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, 4°C) geerntet und das Zellpellet in 250 µl L1-Puffer resuspendiert. Die Lösung wurde mit 250 µl L2-Puffer versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl eiskalter L3-Puffer zugegeben, erneut durch Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 21000 x g, 4°C), die zur Abtrennung denaturierter Proteine und genomischer DNA dient, wurde der Überstand in

ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Zentrifugation für 20 min bei 21000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} gelöst.

Für die Isolation größerer Plasmidmengen aus *E. coli* wurden Nucleobond® AX 100 Säulen (Machery-Nagel, Düren) verwendet. Die Aufarbeitung des Zellmaterials aus 50-100 ml Bakteriensuspension erfolgte nach den Angaben des Herstellers in „Nucleobond® AX properties and applications“.

7.2.2 Isolierung von Plasmiden aus *Streptomyces*

2 ml einer zwei Tage alten, in YEME- oder YMG-Medium bei 30°C gewachsenen Kultur wurden abzentrifugiert (10 min, 4000 x g, 4°C). Nach Waschen des Zellpellets mit 1 ml L1-Puffer wurden die Zellen in 500 µl Lösung A resuspendiert und 30 min bei 37°C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Anschließend wurden 650 µl Lösung B zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 650 µl Lösung C und eine 10minütige Inkubation der Lösung auf Eis. Nach Zentrifugation (20 min, 21000 x g, 4°C) wurden zweimal 900 µl des Überstandes in neue Eppendorfgefäße überführt und mit je 300 µl Phenol-Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe des 0,8fachen Volumens an Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 700 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, 30 min bei RT getrocknet und in 10 µl TE-Puffer oder H₂O_{bidest.} gelöst.

7.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *Streptomyces*

Die Isolierung genomischer DNA aus *Streptomyces* erfolgte durch Lysozym-Behandlung und Phenol-Chloroform-Extraktion.

Das Zellmaterial von 50 ml einer 2-3 Tagen alten in YEME-Medium bei 30°C gewachsenen Kultur wurde geerntet (10 min, 3000 x g, 4°C) und anschließend mit 15 ml TSE-Puffer gewaschen. Ca. 100 mg Zellen wurden in 500 µl TSE-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert und 30 min bei 37°C im Wasserbad unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2%iger SDS-Lösung und eine 10minütige Inkubation dieses Ansatzes bei 60°C, gefolgt von einer 10minütigen Inkubation bei RT. Das erhaltene Zell-Lysat wurde zur Abtrennung von Proteinen dreimal mit 250 µl Rotiphenol® extrahiert. Dabei wurden bei der dritten Extraktion noch zusätzlich 70 µl 3 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,2) zugesetzt. Die Fällung der genomische DNA aus der wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 0,8fachem Volumen an Isopropanol. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach 30minütigem Trocknen bei RT in 50 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

7.3 DNA-Denaturierung für ssDNA Transformation in *Streptomyces*

7.3.1 Alkalibehandlung

9 µl doppelsträngige DNA wurde mit 2 µl 1 M NaOH versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach rascher Abkühlung auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 1 M HCl beendet. Die so erhaltenen denaturierte DNA wurde sofort für die Transformation weiterverwendet (Oh und Chater, 1997).

7.4 Enzymatische DNA-Manipulation

7.4.1 Restriktionsspaltung der DNA

Analytische oder präparative Restriktionsverdau erfolgen gemäß bei der vom Hersteller angegeben, enzymespezifischen Inkubationstemperatur unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer und einer Inkubationsdauer von 1-3 h. Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 10 µl und präparative in einem größeren Volumen bis zu 150 µl durchgeführt. Erfolgte direkt nach dem Verdau keine Gelelektrophorese wurden die Restriktionsendonucleasen durch Ethanol-fällung oder durch Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert.

7.4.2 DNA-Ligation mittels der T4-DNA-Ligase

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH-Ende und den 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA katalysiert, eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten 1 U T4-DNA-Ligase, 1x Ligationpuffer und eine 1:1 molare Mischung aus Insert und Vektor in einem Gesamtvolumen von 10-15 µl. Die Ansätze wurden entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

7.5 Agarose-Gelelektrophorese

7.5.1 Trennbedingungen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Molekülgröße wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Die Verwendung von 0,4-1,5%igen Agarose-

Konzentrationen führte zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,5 bis 50 kb. Zur Trennung kleinerer Fragmente im Größenbereich von 0,1 bis 0,5 kb wurde 2% (w/v) Nusieve[®] GTG[®] Agarose eingesetzt. 1x TAE-Puffer diente als Elektrophoresepuffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit DNA-Ladepuffer in einem Verhältnis von 3:1 versetzt. Die Elektrophorese wurde bei analytischen Gelen mit einer konstanten Spannung von 70-80 V bei RT und bei präparativen Gelen bei 15-20 V bei RT durchgeführt.

7.5.2 Auswertung von Agarose-Gelen

Zur Detektion wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 10-15 min in einem wässrigen Ethidiumbromidbad gefärbt, unter UV-Durchlicht bei 312 nm (Transilluminator IL-200 M, Bachofer, Reutlingen) analysiert und mit dem Eagle-Eye II-System (Stratagene, Heidelberg) dokumentiert.

7.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte mit Hilfe des Nucleospin Extract 2 in 1 Kits nach Angaben des Herstellers.

7.6 PCR-Methoden

Für die Durchführung der PCR-Reaktionen wurde einer der drei folgenden PCR-Geräte verwendet: GeneAmp[®] PCR-System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt), GeneAmp[®] PCR-System 9700 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) oder iCycler PCR-System (Bio-Rad, München). Die verwendeten Oligonucleotid-Primer sind in Tabelle II-15 und II-16 aufgelistet und wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt.

Zur Überprüfung der PCR wurden von 5 µl des erhaltenen PCR-Produktes unter Zusatz von 5 µl Ladepuffer und unter Einsatz eines entsprechenden DNA-Größenstandards eine Gelelektrophorese angefertigt.

7.6.1 PCR zur Klonierung von *couR1-couR4*

Für die Expression der Gene *couR1-couR4* aus *S. rishiriensis* sollten zwei Bereiche dieses Genabschnittes per PCR amplifiziert werden. Die Verwendung des Primerpaares *couR1-f / couR1-r* führte zur Amplifikation eines 1,4 kb großen Fragmentes, in dem durch den Primer *couR1-f* eine *NsiI*-Schnittstelle eingeführt wurde. Durch Verwendung der Primer *couR4-f* und *couR4-r* wurde ein 0,7 kb großes DNA-Fragment amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer *couR4-r* eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt.

Die PCR-Amplifikation beider Fragmente wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz (100 µl)	
Komponente	Endkonzentration
Pfu-PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10 x)	1 x
Template pZW10	300 ng
Primer	20 pmol (je Primer)
dNTPs	0,2 mM (je Nucl.)
DMSO	5% (v/v)
<i>Pfu</i> -Polymerase (3U/µl)	3 U

Temperaturprofil			
Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	96°C	4 min	1
Denaturierung	96°C	1,5 min	
Annealing	55°C/65°C*	2 min	25
Elongation	72°C	1,5 min	
Terminale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°C	∞	

55°C für Primerpaar couR1-f / couR1-r;

* 65°C für Primerpaar couR4-f / couR4-r

Das 1,4 kb PCR-Produkt wurde nach *NsiI* / *BamHI*-Verdau in die gleichen Schnittstellen von pGEM 7Zf(-) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde als pAF01 bezeichnet. Das 0,7 kb große PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *XhoI* / *XbaI* in den Klonierungsvektor pBluescript SK(-) kloniert. Das erhaltene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pAF02.

7.6.2 PCR-Amplifikation des Gens *cloU*

Zur Klonierung und Expression des Gens *cloU* wurde unter Verwendung des Primerpaares k-cloU-f und k-cloU-r ein 1,3 kb großes Fragment mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer k-cloU-f eine *BamHI*-Schnittstelle und durch den Primer k-cloU-r eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt, die für die weitere Klonierung notwendig waren.

Die PCR wurde unter Anwendung des Expand High Fidelity PCR Systems mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

Ansatz (100 µl)	
Komponente	Endkonzentration
Reaktionspuffer	1 x
Template clo-BG1	100 ng
Primer k-cloU-f, k-cloU-r	100 pmol (je Primer)
dNTP-Mix	0,2 mM (je Nucl.)
DMSO	5% (v/v)
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U

Temperaturprofil			
Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	1,5 min	
Annealing	65°C	45 s	35
Elongation	72°C	3 min	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	

Das PCR-Produkt wurde zunächst durch *Bam*HI / *Xba*I-Verdau in die gleichen Schnittstellen von pBluescript SK(-) ligiert und somit das Plasmid pAF15 erhalten. Anschließend erfolgte eine Umklonierung des *Bam*HI / *Xba*I-Fragmentes in den Expressionsvektor pUWL201. Das fertige Konstrukt wurde als pAF16 bezeichnet.

7.6.3 PCR-Amplifikation des Gens *cloN1*

Für die Klonierung und Expression des Gens *cloN1* wurde ein 0,3 kb großes Fragment unter Verwendung der Primer k-cloN1-f und k-cloN1-r mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden durch die Primer die Schnittstellen für *Bam*HI und *Xba*I eingeführt.

Die PCR wurde unter den nachstehenden Bedingungen durchgeführt.

Ansatz (100 µl)	
Komponente	Endkonzentration
Pfu-PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10 x)	1 x
Template clo-BG1	100 ng
Primer k-cloN1-f, k-cloN1-r	100 pmol (je Primer)
dNTP-Mix	0,25 mM (je Nucl.)
DMSO	5% (v/v)
<i>Pfu</i> -Polymerase (3U/µl)	3 U

Temperaturprofil			
<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklen</i>
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	1,5 min	
Annealing	60°C	45 s	35
Elongation	72°C	3 min	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pAF29 erhalten wurde. Eine anschließende Umklonierung des *BamHI/XbaI*-Fragmentes in den Expressionsvektor pUWL201 führte zu dem Konstrukt pAF30.

7.6.4 PCR-Amplifikation der Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7*

Für die Amplifikation der Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7* aus *S. roseochromogenes* wurde in allen drei Fällen das Cosmid clo-BG1 als Template verwendet.

Für die Klonierung und Überexpression des Gens *cloN1* wurde ein 0,3 kb großes DNA-Fragment per PCR amplifiziert, welches durch Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle in Primer E-cloN1-f und einer *BglII*-Schnittstelle in Primer E-cloN1-r in den Expressionvektor pQE60 mit C-terminalen (His)₆-Tag kloniert werden konnte. Die Einführung der *BglII*-Schnittstelle bewirkte die Entfernung des natürlichen Stopcodons und führte zu einer In-Frame Ligation des C-Terminus an den (His)₆-Tag.

Für die Amplifikation des Gens *cloN2* wurden zwei verschiedene Primerpaare unter Bildung eines 1,0 kb großen DNA-Fragmentes angewendet. Unter Verwendung des Primerpaares E-cloN2-f1 und E-cloN2-r1 wurden die Schnittstellen *NcoI* und *BglII* eingeführt, die eine Klonierung in den Expressionsvektor pQE60 erlauben. Dabei bewirkte die Einführung der *BglII*-Schnittstelle die Entfernung des natürlichen Stopcodons. Während die Benutzung des Primerpaares E-cloN2-f2 und E-cloN2-r2 zu einer Einführung der Schnittstellen für *BamHI* und *PstI* führte, die eine Klonierung in den Expressionsvektor pRSETB mit N-terminalen (His)₆-Tag gestatten.

Für die Klonierung von *cloN7* als N-terminales (His)₆-Tag-Fusionsprotein wurde unter Verwendung der Primer E-cloN7-f2 und E-cloN7-r2 ein ca. 0,8 kb großes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde durch den Primer E-cloN7-f2 eine *PstI*-Schnittstelle eingeführt, die eine Entfernung des natürlichen Startcodons bewirkte, und durch den Primer E-cloN7-r2 eine *HindIII*-Schnittstelle eingeführt.

Die verschiedenen PCR-Amplifikationen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Ansatz (100 μ l)	
<i>Komponente</i>	<i>Endkonzentration</i>
Pfu-PCR-Puffer mit MgSO ₄ (10 x)	1 x
Template clo-BG1	100 ng
Primer	100 pmol (je Primer)
dNTPs	0,25 mM (je Nucl.)
DMSO	5% (v/v)
<i>Pfu</i> -Polymerase (3U/ μ l)	3 U

Temperaturprofil			
<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklen</i>
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	1,5 min	
Annealing	je nach Primerpaar*	45 s	30
Elongation	72°C	3 min	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	

*69°C für Primerpaar E-cloN1-f1/ E-cloN1-r1

65°C für Primerpaar E-cloN2-f1/ E-cloN2-r1 und E-cloN2-f2/ E-cloN2-r2

63°C für Primerpaar E-cloN7-f2/ E-cloN7-r2

Die erhaltenen PCR-Produkte bei der Amplifikation der Gene *cloN2* und *cloN7* wurden zunächst über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pLitmus28 kloniert. Die dabei erhaltenen Plasmide wurden als pAF17, pAF19 und pAF22 bezeichnet. Anschließend erfolgte eine Umklonierung dieser Fragmente in die Expressionsvektoren pQE60 oder pRSETB und führte zur Bildung der Konstrukte pAF20, pAF21 und pAF23. Das 0,3 kb große amplifizierte *cloN1*-Fragment wurde zunächst in den pGEM-T-Vektor kloniert (pAF26) und anschließend nach *NcoI* / *BglII*-Verdau in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pQE60 kloniert. Das erhaltenen Konstrukt wurde als pAF27 bezeichnet.

7.6.5 Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette von pUG019 und pIJ773

Für die Amplifikation der Apramycin Resistenzkassette von pUG019 und pIJ773 (REDIRECT[®] technology kit for PCR targeting (Gust *et al.*, 2003)) wurde unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR System (Roche Biochemicals, Mannheim) folgende PCR-Bedingung verwendet.

Ansatz (50 μ l)			
<i>Komponente</i>	<i>Endkonzentration</i>		
Reaktionspuffer (10 x)	1 x		
Template-DNA	100 ng		
Primer	50 pmol (je Primer)		
dNTPs	0,25 mM (je Nucl.)		
DMSO	5% (v/v)		
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U		

Temperaturprofil			
<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklen</i>
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	45°C	45 s	10
Elongation	72°C	90 s	
Denaturierung	94°C	45 s	
Annaeling	48°C	45 s	20
Elongation	72°C	90 s	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	

Die Template-DNA wurde durch Verdau von 10 μ g pIJ773 bzw. 16 μ g pUG019 mit *EcoRI*, *HindIII* und *DraI* vorbereitet. *DraI* schneidet dreimal im Vektor-Backbone und wird verwendet, um die Zerstörung von Spuren von cccDNA zu garantieren und die Aufreinigung der Kasette durch Gelelektrophorese zu vermeiden. Nach Verdau wurde der Ansatz durch Isopropanolfällung aufkonzentriert.

7.7 Southern Hybridisierung

Alle verwendeten Lösungen und Puffer für die Southern Hybridisierung sind in Tabelle II.9 aufgelistet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach den Angaben der jeweils benutzten Kits durchgeführt.

7.7.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Um DNA-Fragmente als Sonden für die Southern Hybridisierung nicht radioaktiv zu markieren, wurde das DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, *Mannheim*) eingesetzt. Die zu markierende DNA (300 ng – 1 μ g) wurde nach Restriktionsverdau gefällt und in 16 μ l TE-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA für 10 min bei 100°C und Abkühlen in flüssigem Stickstoff wurde der Ansatz mit 4 μ l Digh High Prime-Lösung versetzt und 20 h bei

37°C inkubiert. Dabei kommt es zum zufälligen Einbau von DIG-gekoppeltem dUTP während der DNA-Synthese mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Nach beendeter Reaktion wurde überschüssiges DIG-dUTP durch eine Lithiumchlorid-Ethanol-Fällung entfernt. Die Quantifizierung der Sonde bzw. die Überprüfung der Labeling-Effizienz wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

7.7.2 Southern Blot

Genomische DNA der zu untersuchenden *Streptomyces*-Stämme wurde mit dem ausgewählten Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C verdaut, anschließend alkoholisch gefällt, in 10 µl TE-Puffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente der DIG Marker Nr. VII. Nach Überprüfung der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 2 min bei RT mit Depurinierungslösung behandelt, dann mit Wasser kurz gewaschen und anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Behandlung des Agarosegels mit Depurinierungslösung bewirkt bei größeren DNA-Fragmenten Strangbrüche, die den Transfer dieser DNA-Stücke beim Blotten erleichtert. Nach zweimaligem Waschen des Gels von je 15 min in Neutralisierungslösung wurde der Transfer der einzelsträngigen DNA auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) mittels Kapillartransfer mit 20x SSC-Puffer über einen Zeitraum von 16 h durchgeführt. Die transferierte DNA wurde anschließend durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm für 60 s auf der Vorder- und 30 s auf der Rückseite fixiert.

7.7.3 Hybridisierung und Detektion

Zur Hybridisierung der Membran wurde diese in eine Hybridisierungsröhre überführt und zunächst mit 20 ml Prähybridisierungslösung für 4 h bei 68° C im Hybridisierungsofen prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 10 ml Hybridisierungslösung und der entsprechenden unmittelbar zuvor denaturierten (Erhitzen auf 100 °C für 10 min, gefolgt von schnellem Abkühlen in flüssigem Stickstoff) Sonde mit einer Konzentration von 25 ng/ml über Nacht bei 68° C. Zur Entfernung der unspezifischen Bindungen wurde die Membran anschließend zweimal 5 min mit je 10 ml 2x SSC-Waschpuffer bei RT und zweimal 15 min mit je 10 ml 0,5x SSC-Waschpuffer bei 68° C behandelt.

Die Detektion der Membran erfolgte unter Anwendung der Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran zunächst 1 min mit Maleinsäure-Puffer äquilibriert, dann 30 min mit Blocking-Lösung und 30 min mit Antikörperlösung inkubiert. Für die Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran zweimal 15 min in Tween-Waschpuffer geschwenkt und anschließend 5 min mit Detektions-Puffer behandelt. Danach wurde die Membran mit einigen Tropfen CSPD-Lösung benetzt, in eine Fotokassette eingelegt und 30-60 min bei 37°C mit einem Hyperfilm ECL-

Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, *Freiburg*) inkubiert. Der Film wurde anschließend 3 min entwickelt, 3 min fixiert und gut getrocknet.

7.8 Transformation von DNA in *E. coli*

7.8.1 CaCl₂-vermittelte Transformation

Herstellung kompetenter Zellen:

3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer *E. coli* Einzelkolonie inokuliert und bei 37°C und 170 rpm über Nacht inkubiert. Mit 1 ml dieser Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei 600 nm unter den zuvor angegebenen Bedingungen weiterkultiviert. Die nun folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C unter sterilen Bedingungen. Nach Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C) wurden die Zellen in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut unter den obigen Bedingungen pelletiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 3000 x g, 4°C) wurde das Pellet in 2-5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin (v/v) resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Transformation:

200 µl der transformationskompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu den gerade aufgetauten Zellen wurden 5-10 µl der entsprechenden DNA-Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Nach Abkühlung des Ansatzes wurde zur Regeneration der Zellen 1 ml LB-Medium zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Volumina (50 µl, 100 µl, 150 µl und 200 µl) des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion:

Bei Verwendung von Klonierungsvektoren mit *lacZ'*-Gen wurde zur Detektion rekombinanter Plasmide eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurden 20 µl der IPTG-Lösung (47 mg/ml) mit 80 µl H₂O_{bidest.} gemischt, auf die Agarplatte pipettiert und ausplattiert. Nach kurzem Antrocknen wurden 20 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) mit 80 µl H₂O_{bidest.} gemischt und ebenfalls auf die Platte ausplattiert. Zum

Verdampfen des toxischen DMF wurden die Platte 30 min lang unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden die Transformationsansätze wie zuvor beschrieben ausplattiert und inkubiert.

7.8.2 Elektroporation

Herstellung elektro-kompetenter Zellen:

50 ml SOB- oder LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* inokuliert und bei 30 / 37°C* und 170 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 weiterkultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4°C) geerntet und zweimal mit 5 und 25 ml eiskalter 10%iger (w/v) Glycerinlösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in dem verbleibenden Tropfen des Waschüberstandes resuspendiert, in Aliquots zu je 50 µl geteilt und bei -70°C eingefroren.

* Um das Plasmid pIJ790 in *E. coli* BW25113 (REDIRECT© technology kit for PCR targeting, (Gust *et al.*, 2003) zu behalten, mussten die Zellen bei 30°C kultiviert werden. pIJ790 enthält ein temperatur-sensitiven Replikationsstartpunkt. Ansonsten war die Kultivierungstemperatur bei 37°C.

Elektroporation:

Die DNA (ca. 100 ng in 1-2 µl H₂O_{bidest.}) wurde mit 50 µl kompetenten Zellen gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) überführt und luftblasenfrei verschlossen. Die Elektroporation wurde mit einem BioRad Elektroporator mit einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt. Die optimalste Zeit-Konstante liegt dabei zwischen 4,5 – 5,0 ms. Anschließend wurden 1 ml LB-Medium in die Küvette pipettiert, die erhaltene Suspension in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C und 170 rpm für 60 min inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann 3 x 200 µl auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

7.9 Transformation von DNA in *Streptomyces*

7.9.1 Protoplastierung von *S. coelicolor* und *S. lividans*

50 ml YEME-Medium mit 0,5% Glycin wurden mit 1 ml HA-Vorkultur (2 Tage, bei 30°C und 170 rpm) von *S. coelicolor* /*S. lividans* inokuliert und 48 h bei 30°C und 170 rpm kultiviert. Nach Abtrennung des Mediums (10 min, 3000 x g, 4°C) wurden die Zellen zweimal mit 15 ml 10,3%ige Saccharoselösung gewaschen, in lysozymhaltigen Protoplastierungspuffer (3-4 ml P-Puffer/g Zellen; 4 mg Lysozym/ml P-Puffer)

resuspendiert und bei 30°C für 15-60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei wurde der Vorgang der Protoplastierung durch wiederholte Mikroskopie in Zeitintervallen von 15 min kontrolliert. Nach ausreichender Protoplastierung wurde die Reaktion durch Kühlen auf Eis gestoppt. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine weitere Schädigung der Zellen zu vermeiden. Zur Abtrennung von Mycelresten wurde nach Zugabe von 5 ml eiskaltem P-Puffer und dreimaligem vorsichtigen Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer 10 ml Pipette der Ansatz durch sterile Glaswolle filtriert. Anschließend wurden die Protoplasten durch Zentrifugation (5 min, 3000 x g, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml P-Puffer resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und auf Eis langsam über Nacht bei -70°C eingefroren.

Zur Überprüfung der Protoplasteneffizienz wurden 10 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl H₂O_{bidest.} verdünnt und auf eine R2YE-Platte 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 Ausplattierung geeigneter Verdünnungsstufen der Protoplastensuspension mit P-Puffer. Die Ausplattierung wurde durch Überschichtung mit 3 ml R3-Weichagar durchgeführt, um mechanischen Streß und Lyse zu vermeiden. Die Platten wurden bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

Die Protoplastierung von *S. rishiriensis* wurde, wie zuvor beschrieben, mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Zellanzucht erfolgte in CRM-Medium mit 0,4% Glycin; Einsatz von 0,3 mg Lysozym/ml P-Puffer.

7.9.2 Transformation

Die Transformation der *Streptomyces*-Stämme wurde durch die modifizierte Polyethylenglykol-vermittelte Transformation nach Kieser *et al.* (2000) bewerkstelligt. Für die Transformation wurden 10-20 µg unmethylierte DNA (in maximal 20 µl TE-Puffer, isoliert aus *E. coli* ET12567) zu 200 µl Protoplastensuspension, die etwa 10⁸ Protoplasten pro ml enthielt, zugegeben. Danach wurden sofort 500 µl Transformations-Puffer (T-Puffer) hinzugefügt, durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und 1 min bei RT inkubiert. Verschiedene Volumina des Transformationsansatzes (50 µl, 100 µl und 2 x 200 µl) wurden mit Hilfe von 40-50°C warmen R3-Weichagar (3 ml/Platte) auf R2YE-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 16-18 h inkubiert. Für die Selektion der Mutanten wurden die Platten mit 3 ml Nutrient-Weichagar mit entsprechendem Antibiotikum überschichtet und für weitere 5-12 Tage bei 30°C inkubiert. Zur weiteren Untersuchung der erhaltenen Transformanden wurden diese mit sterilen Zahnstochern gepickt und quadratförmig auf MS-Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

7.10 DNA-Sequenzierung und Computerunterstützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wurde mit Hilfe der Didesoxy-nucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt. Das Programm DNASIS für Windows Version 2.1 (Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA) ermöglichte die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen. Homologievergleiche auf Nucleinsäure- und Aminosäureebene wurden unter Verwendung des BLAST-Programmes (Version 2.0) über die Internetseite "www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/" erzielt.

8. Methoden der Biochemie und Biologie

8.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein diskontinuierliches Trennsystem mit einem Sammelgel (4 % Polyacrylamid) und einem Trenngel (12 % Polyacrylamid). Für die Elektrophorese wurde die Mini-Protean 3 Apparatur von BIORAD, München verwendet. Die dazu verwendeten Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers, wie unter 4.3.6 beschrieben, angefertigt. Die Trenngellösung wurde für die Dauer der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um zu verhindern, dass die Geloberfläche durch Oberflächenspannung gekrümmt wird. Nach ca. 30 min konnte das Sammelgel gegossen werden. Dazu wurde der Alkohol verworfen, die Oberfläche des Trenngels mit Aqua bidest. gewaschen und die Sammelgellösung auf das Trenngel aufgetragen. Nach weiteren 30 min waren die Gele soweit auspolymerisiert, dass sie verwendet werden konnten. Die zu analysierenden Proteinproben (10 µl) wurden unmittelbar vor dem Auftrag auf das Gel mit zweifach konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und durch 10minütiges Kochen im Wasserbad bei 100°C denaturiert. Als Markerproteinlösung wurde ein Protein Molekulargewichtsmarker (Amersham Biosciences, Freiburg) 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) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 150-200 V über 30-60 min durchgeführt. (Die Elektrophorese wurde abgebrochen, wenn die Bromphenolblaufront ca. 1 cm vom unteren Rand des Trenngels entfernt war.) Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele 5 min in Fixierlösung und anschließend 20 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Behandlung mit Entfärberlösung für 60- 90 min und anschließendem Waschen mit Wasser entfärbt.

8.2 Heterologe Expression von Proteinen

8.2.1 Expression in *E. coli* XL1 Blue MRF⁻

100 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50µg/ml) wurden mit je 2 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei 30°C oder 37°C und 170 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG (Endkonzentrationen: 0,5mM, 1,0mM, 1,5mM, 2,0mM und 3,0mM). 20 Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet (10 min, 4000 x g, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

8.2.2 Expression in *E. coli* BL21/pLys

2 ml einer mit einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli* BL21/pLys-Stammes mit Expressionskonstrukt beimpften Übernachtskultur mit Carbenicillin (50µg/ml) und Chloramphenicol (35 µg/ml) dienten als Vorkultur für die Inokulation von 100 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50µg/ml) und Chloramphenicol (35 µg/ml). Die Kulturen wurden bei 25°C, 30°C oder 37°C und 170 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG (Endkonzentrationen: 0,1nM, 1,0nM, 10nM, 0,5mM, 1,0mM,) induziert. Die Zellen wurden 20 h nach Induktion geerntet (10 min, 4000 x g, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

8.2.3 Expression in *S. lividans* T7

50 ml YEME-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin wurden mit 200 µl Glycerinkultur als Vorkultur inokuliert. Nach 2-3 Tagen Kultivierung bei 30°C und 170 rpm wurden 100 ml YEME-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin sowie 25 µg/ml Thiostrepton mit 2-5 ml der Vorkultur angeimpft. Thiostrepton dient dabei als Induktor der Expression. Nach 24stündiger Kultivierung bei 30°C und 170 rpm wurde die Kultur geerntet (10 min, 4000 x g, 4°C). Die Zellen wurden bei -20°C eingefroren.

8.3 Herstellung zellfreier Rohextrakte

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 1 ml Lysepuffer pro Gramm Zellen resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch 6 x 30 s Beschallung bei 200 W mit 30 s Intervallpausen mittels Sonifier-Gerät (Branson Sonifier 250) im Eisbad aufgeschlossen. Nach Abtrennung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 17500 x g, 4°C) wurde der Rohextrakt erhalten.

Bei Aufschluß von *S. lividans* T7 Zellen wurde Lysepuffer mit 8 mg/ml Lysozym verwendet.

8.4 Reinigung von Hexahistidin –Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung der Histidin-Fusionsproteine vom löslichen Zellextrakt wurde die Metallaffinitätschromatographie unter Verwendung von Nickel-Nitriloacetat (Ni-NTA)-Agarose (Qiagen, *Hilden*) und Anleitung des Herstellers in „The QIAexpressionist“ angewendet. Je nach Proteingehalt wurden 2-4 ml zellfreier Rohextrakt mit 0,5-1 ml Ni-NTA-Suspension (50% (w/v) Ni-NTA-Agarose in 30% (v/v) Ethanol: Bindungskapazität: 5-10 mg 6xHis-Fusionsprotein pro ml Material) gemischt und 1 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine leere Säulenhülse überführt und die Säule zweimal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Die (His)₆-Fusionsproteine wurden mit viermal je 1 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Nach erfolgreicher Aufreinigung, die durch SDS-PAGE kontrolliert wurde, konnte das Proteineluat über NAP10 Säulen in Aufbewahrungspuffer umgepuffert und bei -70°C gelagert werden.

8.5 Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Aminocoumarin-Antibiotika

Die antibakterielle Aktivität von Clorobiocin (*Aventis, Bad Soden a.Ts.*) und den neuen Novclobiocinen wurde mit Hilfe eines Agardiffusionstest unter Verwendung von *Bacillus subtilis* ATCC 14893 als Teststamm überprüft.

4,6 g Nutrient-Agar 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 und die Platten gegossen. Unterschiedliche Mengen der zu testenden Substanzen wurden als methanolische Lösung in einem Volumen von 1-15 µl auf Antibiotika-Testblättchen (d = 6 mm, *Macherey-Nagel, Düren*), die bereits auf den Agarplatten aufgebracht worden waren, aufgetragen und 30 min unter der Sterilbank 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.

9. Konstruktion der Deletions-Mutanten

Für die Inaktivierung der Gene *cloN1*, *cloN7* und *cloU* im Cosmid clo-BG1 wurde das PCR-Targeting angewendet.

Die Apramycin Resistenzkassette (*aac(3)IV*) wurde durch Verdau mit *EcoRI* und *HindIII* vom Plasmid pUG019 gewonnen und per PCR unter Verwendung der Primer P-forward 5'-(N)₃₉ ATT CCG GGG ATC TCT AGA TCT-3' und P-reverse 5'-(N)₃₉ ACT AGT CTG GAG CTG CTT C-3' amplifiziert. Dabei präsentieren die 39 nt den Bereich für die λ -RED vermittelte Rekombination und sind homolog zu der Region vor und nach dem DNA-Fragment, welches deletiert werden soll. Die unterstrichenen Buchstaben zeigen die Restriktionsschnittstellen für die Endonucleasen *XbaI* und *SpeI* auf. Die Amplifizierung der Kassette erfolgte mittels des Expand High Fidelity PCR System wie unter 7.6.5 beschrieben. Das erhaltene PCR-Produkt wurde für die Gendeletion im Cosmid durch λ -RED vermittelte Rekombination nach Angaben des Herstellers REDIRECT[®] Technology Kit (Gust *et al.*, 2003) verwendet. Cosmide, welche die Resistenzkassette integriert hatten, wurden isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert. Für die Entfernung der Resistenzkassette wurde die Cosmid-DNA zunächst in *E. coli* ET12567 transformiert, die DNA isoliert, mit *XbaI* und *SpeI* geschnitten und über Nacht bei 16°C religiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz durch CaCl₂-vermittelte Transformation in *E. coli* XL1 Blue MRF⁻ eingebracht und die Apramycin-sensitiven und Kanamycin-resistenten Klone durch Restriktionsverdau analysiert. Eine vollständige Entfernung der Kassette war durch Abwesenheit der Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* charakterisiert.

9.1 Inaktivierung des Gens *cloN1* im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des Δ *cloN1* Cosmids

Die Resistenzkassette zur Deletion von *cloN1* wurde per PCR unter Verwendung des Primerpaares cloN1-f (5'-CAC AGT GGA ACA CAA TCG ATG GGG GAA TTA CGC GAG ATG ATT CCG GGG ATC TCT AGA TC-3') und cloN1-r (5'-GGC CAC GTA TAT ACC TGA TGT CCG CAT CTG TTG CGC CTA ACT AGT CTG GAG CTG CTT C-3') amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben präsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *cloN1* einschließlich dem putativen Start- und Stopcodon für *cloN1*, während die unterstrichenen Buchstaben die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* aufzeigen.

Nach Entfernung der Resistenzkassette wurde das Δ *cloN1* Cosmid clo-AF6, welches das Kanamycin Resistenzgen *aphII* besitzt, durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Kanamycin-resistenten Klone wurden durch Southern Blot Analyse auf die spezifische Integration des Cosmids in die Φ C31 Attachment site des Genoms von *S. coelicolor* M512 untersucht.

9.2 Inaktivierung des Gens *cloN7* im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des *cloN7*- Cosmids

Für die Inaktivierung des Gens *cloN7* wurde die Resistenzkassette unter Verwendung der Primer cloN7-f (5'-GGC AGA CTC CCC AAC AGC AGA GAG GAC CAA CTG AGC ATG ATT CCG GGG ATC TCT AGA TC-3') and cloN7-r (5'-AGT GTG CGT GGT GCG CCA GCA CTC CGA CAA GCA CCG TTA ACT AGT CTG GAG CTG CTT C-3') per PCR amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben präsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *cloN7*, einschließlich dem putativen Start- und Stopcodon für *cloN7*. Die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* sind durch die unterstrichenen Buchstaben markiert.

Die Entfernung der Resistenzkassette war in diesem Fall nicht notwendig. Das resultierende Cosmid clo-AF3 wurde durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Apramycin- und Kanamycin-resistenten Klone wurden durch Southern Blot Analyse auf die spezifische Integration des Cosmids in die Φ C31 Attachment site des Genoms von *S. coelicolor* M512 untersucht.

9.3 Inaktivierung des Gens *cloU* im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression des Δ *cloU* Cosmid

Für die Deletion von *cloU* wurde die Resistenzkassette unter Verwendung des Primerpaares cloU-f (5'-GAC CGG CGG TTT GCA TCC CGT GAG GGG GAG GAA GAG TTG ATT CCG GGG ATC TCT AGA TC-3') and cloU-r (5'-TGG AAC GGG ATC ACC GCA GCC GAC ACC GTG GCC ACG TCA ACT AGT CTG GAG CTG CTT C-3') per PCR amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben zeigen den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *cloU* inklusive dem putativen Start- und Stopcodon von *cloU*. Die unterstrichenen Buchstaben präsentieren die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI*.

Das Δ *cloU* Cosmid clo-AF2, das nach Entfernung der Resistenzkassette erhalten wurde, wurde durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Kanamycin-resistenten Klone wurden durch Southern Blot auf die spezifische Integration des Cosmids in die Φ C31 Attachment site des Genoms von *S. coelicolor* M512 analysiert.

9.4 Inaktivierung der Gene *couR1-couR4* in *S. rishiriensis*

Die Inaktivierung der Gene *couR1-couR4* wurde ebenfalls unter Anwendung des PCR-Targeting bewerkstelligt. Die verwendete Apramycin Resistenzkassette zur Ersetzung der Gene *couR1-couR4* wurde durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* vom Plasmid pIJ773 gewonnen und per PCR unter Anwendung der Primer couR1-4 f (5'-

TAA TCG CGG ACC CGG ATC AGA ATG CGG TGA CCC GTA ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC-3') und **couR1-4 r (5'-TTC GGC GGA ACC CCG TCC CCG GTG GCG CCG GCG GTG CTA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3')** amplifiziert. Dabei präsentieren die hervorgehobenen Buchstaben den 39 nt Homologiebereich der DNA-Region unmittelbar vor und nach *couR1-4* inklusive dem putativen Startcodon von *couR1* und dem putativen Stopcodon von *couR4*. Die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* sind durch die unterstrichenen Buchstaben markiert. Die Kassette wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790, der zusätzlich das Cosmid 5A-46 enthielt, mittels Elektroporation eingebracht. Die Ersetzung der Gene *couR1-4* durch die Resistenzkassette wurde durch Restriktionsverdau überprüft. Die Entfernung der Resistenzkassette wurde nicht durchgeführt, da sie weiterhin als Selektionsmarker dienen sollte. Das modifizierte Cosmid (cou-AF1) wurde durch PEG-vermittelte Protoplasten-transformation in *S. rishiriensis* eingebracht. Homologe Rekombination führte zu Apramycin-resistenten Transformanden, die durch Southern Blot Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft wurden.

10. Analytik und Isolierung niedermolekularer Verbindungen

10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Waters (*Eschborn*) verwendet. Die Anlage setzte sich aus zwei Pumpen (Waters 510), einem Autosampler (Waters 717 plus) und einem UV-Detektor (Waters 486 Absorbance Detektor) zusammen. Die Steuerung der HPLC-Komponenten und die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die Millennium-Software.

Analytische Auftrennungen erfolgten bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multisphere[®] RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (40 µm, 30 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*) vorgeschaltet war. Für präparative Isolierungen wurden Trennsäulen mit größerem Durchmesser (s. 10.2.3) eingesetzt. Die verwendeten Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (0,45 µm, Millipore) von Partikeln befreit.

10.1.1 Analytik des Clorobiocin und Derivaten

Der Wildtyp und die Mutanten von *S. roseochromogenes* sowie der *S. coelicolor* Stamm mit Clorobiocin-Cluster und seine abgeleiteten Mutanten wurden in Produktionsmedium, wie unter 6.2.2 beschrieben, kultiviert. 1 ml Bakterienkultur wurden mit 1 M HCl auf einen pH von 4 angesäuert und zweimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurde der Extrakt in 200-500 µl Methanol resuspendiert. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) wurden 50-100 µl des

klaren Überstandes unter den folgenden Bedingungen per HPLC analysiert. Authentisches Clorobiocin (Aventis, *Bad Soden a.Ts.*) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen		
Fließmittel A	H ₂ O : CH ₃ OH : HCOOH (79:20:1)	
Fließmittel B	CH ₃ OH : HCOOH (99:1)	
Detektionwellenlänge	340 nm	

HPLC-Gradient		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Fließmittel A [%]</i>	<i>Fließmittel B [%]</i>
0,0	40	60
2,0	40	60
30,0	0	100
33,0	0	100
33,1	40	60
37,0	40	60

10.1.2 Analytik der Pyrrol-2-carbonsäure

Zur Analyse der Pyrrol-2-carbonsäure wurden die nachstehenden HPLC- Bedingungen gewählt. Pyrrol-2-carbonsäure (Lancaster, *Mühlheim a.M.*) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen		
Fließmittel A	H ₂ O : HCOOH (99:1)	
Fließmittel B	CH ₃ OH : HCOOH (99:1)	
Detektionwellenlänge	262 nm	

HPLC-Gradient		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Fließmittel A [%]</i>	<i>Fließmittel B [%]</i>
0,0	100	0
10,0	100	0
25,0	55	45
25,1	0	100
30,0	0	100
30,1	100	0
35,0	100	0

10.1.3 Analytik des 8-Demethyltetracenomycin C und Elloramycin

Von 15 ml Bakteriensuspension der Mutanten *S. lividans* TK64/(cos16F4), *S. coelicolor* M512/(cos16F4) und *S. coelicolor* M512/(cloAF2)-(cos16F4) wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C) entfernt. Anschließend wurde der Überstand mit HCOOH auf einen pH von 3 angesäuert und mit 5 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Verdampfung des Extraktionsmittels wurde der Rückstand in 500 µl Methanol aufgenommen. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) wurden 50-100 µl des klaren Überstandes per HPLC analysiert. Die Gradienten-Elution wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Chromatographie-Bedingungen		
Fließmittel A	0,1 % H ₃ PO ₄ in H ₂ O	
Fließmittel B	100% CH ₃ CN	
Detektionwellenlänge	386 nm	

HPLC-Gradient		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Fließmittel A [%]</i>	<i>Fließmittel B [%]</i>
0,0	75	25
2,0	75	25
30,0	0	100
33,0	0	100
33,1	75	25
37,0	75	25

10.1.4 Analytik des Coumermycin A₁ und Derivaten

20 ml Bakterienkultur des Wildtyps oder der Mutanten von *S. rishiriensis* wurden mit 1 N HCl auf einen pH von 3 angesäuert. Nach Entfernung lipophiler Verbindungen durch Behandlung mit Petrolether erfolgte eine zweifache Extraktion mit einem äquivalenten Volumen an Ethylacetat. Nach Verdampfen des Extraktionsmittels wurde der Rückstand in 500 µl Ethanol aufgenommen. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) des Extraktes wurden 100 µl des Überstandes unter den nachstehenden Bedingungen per HPLC analysiert. Authentisches Coumermycin A₁ (Sigma-Aldrich, *Deisenhofen*) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen	
Fließmittel A	0,1 % H ₃ PO ₄ in H ₂ O
Fließmittel B	100% CH ₃ CN
Detektionwellenlänge	345 nm, 254 nm

HPLC-Gradient		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Fließmittel A [%]</i>	<i>Fließmittel B [%]</i>
0,0	70	30
20,0	0	100
25,0	0	100
25,1	70	30
30,0	70	30

Die Mutanten von *S. coelicolor* Yu105 wurden in Produktionsmedium wie unter 6.2.2 beschrieben kultiviert. 10 ml Bakterienkultur wurden mit 1 M HCl auf einen pH von 3 angesäuert und zweimal mit einem äquivalenten Volumen an Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Extraktückstand in 500 µl Ethanol aufgenommen. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) wurden 100 µl des klaren Überstandes per HPLC analysiert. Die Gradienten-Elution wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. 3-Methypyrrol-2,4-dicarbonsäure (E. Schmutz, *Tübingen*) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen	
Fließmittel A	0,1 % H ₃ PO ₄ in H ₂ O
Fließmittel B	100% CH ₃ CN
Detektionwellenlänge	259 nm

HPLC-Gradient		
<i>Zeit [min]</i>	<i>Fließmittel A [%]</i>	<i>Fließmittel B [%]</i>
0,0	100	0
20,0	0	100
30,0	0	100
30,1	100	0
37,0	100	0

10.2 Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika

10.2.1 Extraktion aus Zellkulturen

Zur präparativen Isolierung neuer Aminocoumarine wurden 200-5000 ml einer Zellkultur mit 1 N HCl auf eine pH von 4 angesäuert. Nach Entfernung lipophiler Kulturbestandteile durch Ausschütteln mit Petrolether wurde die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde das Extraktionsmittel entfernt und der Rückstand in 3-5 ml Methanol aufgenommen.

10.2.2 Säulenchromatographie mit Sephadex LH20

Zur Aufreinigung von Kulturextrakten wurde die Gelfiltration angewendet. Ein Probenvolumen von 3-5 ml Kulturextrakt wurden auf eine Glassäule (2,6 x 65 cm), die mit Sephadex LH20 (Amersham Biosciences, *Freiburg*) befüllt war, aufgetragen und mit entgastem Methanol bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Unter Verwendung eines Fraktionssammlers wurden 15 ml Fraktionen gesammelt, die auf die Anwesenheit der Aminocoumarine per HPLC analysiert wurden. Die Fraktionen, die die neuen Aminocoumarine enthielten, wurden gepoolt, einrotiert und für die weitere HPLC-Reinigung in Methanol aufgenommen.

10.2.3 Präparative HPLC- Reinigung

Die präparative HPLC- Reinigung wurde entweder mit einer Multospere[®] RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 8 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*) mit einer vorgeschalteten Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (40 µm, 30 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*) oder einer Multospere[®] RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 10 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*) mit einer vorgeschalteten Multoprep RP-18 gefüllten Vorsäule (40 µm, 50 x 10 mm) (C&S Chromatographie Service, *Düren*) durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Fließmittel und Gradienten, wie zuvor unter 10.1 beschrieben, aber mit einer Flussrate von 2-2,5 ml/min verwendet.

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

10.3 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung

10.3.1 Massenspektroskopie (MS)

Die negative Fast-Atom-Bombardment (FAB)-Massenspektroskopie wurde an einem TSQ70 Spektrometer (Finnigan, *Bremen*) durchgeführt. Diethanolamin diente dabei als Matrix für die Proben.

10.3.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung isolierter Substanzen wurden ¹H-NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Proben über Nacht im Exsikkator mit Phosphorpentoxid (Merck, *Darmstadt*) getrocknet und in deuteriertem Methanol (Merck, *Darmstadt*) oder deuteriertem Dimethylsulfonamid (Merck, *Darmstadt*) aufgenommen. Die ¹H-NMR Spektren wurden mit einem AC 250 Spektrometer

(Bruker, *Karlsruhe*) oder einem AMX 400 Spektrometer (Bruker, *Karlsruhe*) aufgenommen.

III Ergebnisse

1. Transfer der Pyrrol-2-carbonsäure auf den Desoxyzucker in der Clorobiocin- Biosynthese

Das Clorobiocin-Cluster besteht aus insgesamt 29 ORFs. Experimentelle Untersuchungen, die meist mit den Genen und Gen-Produkten des Clorobiocin-Clusters und in einigen Fällen mit den entsprechenden Genen des Novobiocin- oder Coumermycin A₁-Cluster durchgeführt wurden, haben die Funktionen der meisten Gene aufgeklärt. So konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass der Pyrrol-2-carboxylteil von Clorobiocin ausgehend von L-Prolin durch die Katalyse der Genprodukte von *cloN3*, *cloN4* und *cloN5* gebildet wird (Garneau *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2002), während das Genprodukt von *cloN2* am Transfer dieser Einheit auf den Desoxyzucker beteiligt ist (Xu *et al.*, 2003). Die Position 5 des Pyrrolteils wird durch das Genprodukt von *cloN6* methyliert (Westrich *et al.*, 2003). Im Clorobiocin-Cluster kommen bei der cloN-Gruppe aber noch zwei weitere Gene, *cloN1* und *cloN7*, vor, deren Funktionen unbekannt waren. Wir vermuteten, dass beide Gene entweder am Acyltransfer der Pyrroleinheit oder an dessen Methylierung beteiligt sind. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass *cloN1* und *cloN7* an ganz anderen Biosyntheseprozessen involviert sind. Um die Funktion beider Gene nachzuweisen, wurden sie im Cosmid clo-BG1 mittels PCR-Targeting inaktiviert. Anschließend wurden die modifizierten Cosmide in den heterologen Stamm *S. coelicolor* M512 eingebracht und die erhaltenen Mutanten auf ihre Sekundärstoffproduktion untersucht.

1.1 Sequenzanalyse von *cloN1* und *cloN7*

Das Gen *cloN1* ist ein kleines ORF und codiert für ein Protein von 95 Aminosäuren. Datenbankvergleiche zeigten, dass dieses Protein 86% Homologie (auf Aminosäureebene) zu CouN1 vom Coumermycin A₁-Cluster, aber keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen aufweist. Jedoch konnten weitere Sequenzuntersuchungen ein Asparagin-Serin-Leucin-Motiv an Position 44-46 sowohl im CloN1 als auch im CouN1 aufzeigen. Sekundärstrukturvorhersagen offenbarten, dass dieses Motiv am N-Terminus der Zweiten von vier α -Helices in dem Protein lokalisiert ist. Dies deutete auf eine 4'Phosphopantetheinyl-(=4'-PP) Cofaktorbindungsstelle hin, die in Acylcarrierproteinen (ACP) der Fettsäurebiosynthese (Wong *et al.*, 2002) und der Peptid- und Polyketid-Antibiotikabiosynthese (Stachelhaus *et al.*, 1996) enthalten ist. Stachelhaus *et al.* hatte die Konsensussequenz für diese Acylcarrierproteine mit (L/I)GxDS(L/I)

definiert. Diese stimmte mit dem LGVDSL-Motiv von CloN1 und CouN1 überein. Auch ein Vergleich von CloN1 und CouN1 mit den Acylcarrierproteinen CloN5 und CouN5 (Garneau *et al.*, 2005), als auch mit den ähnlich kleinen Acylcarrierproteinen SCO2389, SCO5089, SCO5316 und SCO5877 von *S. coelicolor* zeigte eine nahe identische Position des Asparagin-Serin-Leucin-Motivs in allen Proteinen. Deshalb könnte CloN1 ein Acylcarrierprotein repräsentieren und somit an einem Acyltransfer beteiligt sein. Acyltransfers sind in der Biosynthese von Clorobiocin vor allem in einem Teil der Aminocoumarinring-Biosynthese, in der Ausbildung der Amidbindung, in der Bildung des Pyrrol-2-carbonsäureteils und in der Übertragung von diesem Teil auf den Desoxyzuckers von Clorobiocin zu erwarten.

Das Gen *cloN7* codiert für ein Protein von 278 Aminosäuren und zeigt 82% Homologie zu *couN7* aus dem Coumermycin A₁-Cluster. Ein Datenbankvergleich zeigte Ähnlichkeit zu vielen Einträgen in der Datenbank, vor allem zu bakteriellen Genomsequenzprojekten. Eine Untersuchung auf konservierte Domänen wies eine α/β Hydrolase-Falte in CloN7 auf. Die α/β Hydrolase-Superfamilie besteht aus einer breiten Anzahl an Enzymen, die vor allem als Hydrolasen oder Acyltransferasen aktiv sind. Diese Familie schließt aber auch die Thioesterasen mit ein, die an der Abspaltung von Peptidyl- oder β -Ketoacylresten von den 4'-PP-Cofaktoren der Acylcarrierproteine in der Peptidantibiotikum- oder Polyketidantibiotikum-Biosynthese beteiligt sind. CloN7 zeigt vor allem Ähnlichkeit zu den Thioesterasegenen *bhp* und PCZA361.30 der Balhimycin- und Vancomycin-Biosynthese (Puk *et al.*, 2002; van Wageningen *et al.*, 1998). Diese Glykopeptid-Antibiotika enthalten β -Hydroxytyrosyl, die in einer ähnlichen Reaktionssequenz gebildet werden, wie die β -Hydroxytyrosyl-ACP Intermediate in der Clorobiocin und Novobiocin Biosynthese (Chen und Walsh, 2001; Puk *et al.*, 2002; Puk *et al.*, 2004).

1.2 Inaktivierung der Gene *cloN1* und *cloN7* im Cosmid clo-BG1

Die Inaktivierung der Gene *cloN1* und *cloN7* im Cosmid clo-BG1 wurde durch PCR-Targeting bewerkstelligt. Dafür wurde das Apramycinresistenzgen *aac(3)IV* vom Plasmid pUG019 unter Verwendung von Primern mit 39 bp Homologie zu den Bereichen unmittelbar vor und nach *cloN1* bzw. *cloN7* per PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend zur Ersetzung der Open Reading Frames (ORFs) von *cloN1* und *cloN7* im Cosmid clo-BG1 verwendet. Die modifizierten Cosmide erhielten die Bezeichnung clo-AF5 ($\Delta cloN1$, *apra*^R) und clo-AF3 ($\Delta cloN7$, *apra*^R).

Das *aac(3)IV*-Gen befand sich in diesen Konstrukten zwischen den Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI*. Um einen möglichen polaren Effekt der *cloN1* Inaktivierungskassette auf nachfolgende Gene auszuschließen, wurde die Apramycinresistenzkassette durch Verdau mit *XbaI* und *SpeI* und Religation der kompatiblen Enden entfernt. Dabei wurde eine 18 bp in frame „Scar“- Sequenz statt des Gens *cloN1* hinterlassen. Das resultierende Cosmid wurde als clo-AF6 (*cloN1*, *apra*^S) bezeichnet.

Aufgrund der Einführung des *cloN7* Inaktivierungskonstruktes am Ende einer vermeintlichen Transkriptionseinheit wurde das Entfernen dieser Kassette für die Vermeidung von polaren Effekten unnötig. In Abbildung III.1A und III.2A sind die beiden Cosmidkonstrukte clo-AF6 und clo-AF3 dargestellt.

1.3 Integration der modifizierten Cosmide in das Genom von *S. coelicolor* M512

Die Cosmide clo-AF6 und clo-AF3 wurden, wie unter Kapitel II /7.9.2 beschrieben, durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Fünf Mutanten, die von der Integration des Cosmids clo-AF6 in das Wirtsgenom resultierten, wurden durch ihre Kanamycinresistenz selektiert. Zehn clo-AF3 Integrationsmutanten wurden durch ihre Apramycin- und Kanamycinresistenz selektiert. Der korrekte Genotyp dieser *cloN1*- und *cloN7*-Defektmutanten wurde durch Southern Blot Analyse unter Verwendung des Cosmids clo-BG1 als Sonde untersucht.

Abbildung III.1 D zeigt die Ergebnisse von zwei clo-AF6- Integrationsmutanten, die als *S.c.* (clo-AF6)1 und *S.c.*(clo-AF6)2 bezeichnet wurden. Die Deletion des Gens *cloN1* in diesen $\Delta cloN1$ Integrationsmutanten wurde sowohl durch die Abwesenheit der 2,4 kb und 4,6 kb *EcoRI*-Banden als auch durch die Anwesenheit der 6,8 kb Bande in den Mutanten nachgewiesen.

Abbildung III.2 D zeigt die Integrationsergebnisse einer *cloN7*-Defektmutante. Das Ersetzen des Gens *cloN7* durch die Apramycinresistenzkassette in dieser Mutante wurde durch die Präsenz der 9,8 kb *BamHI*-Bande, anstelle der originalen 7,2 kb und 2,4 kb Banden in clo-BG1 gezeigt.

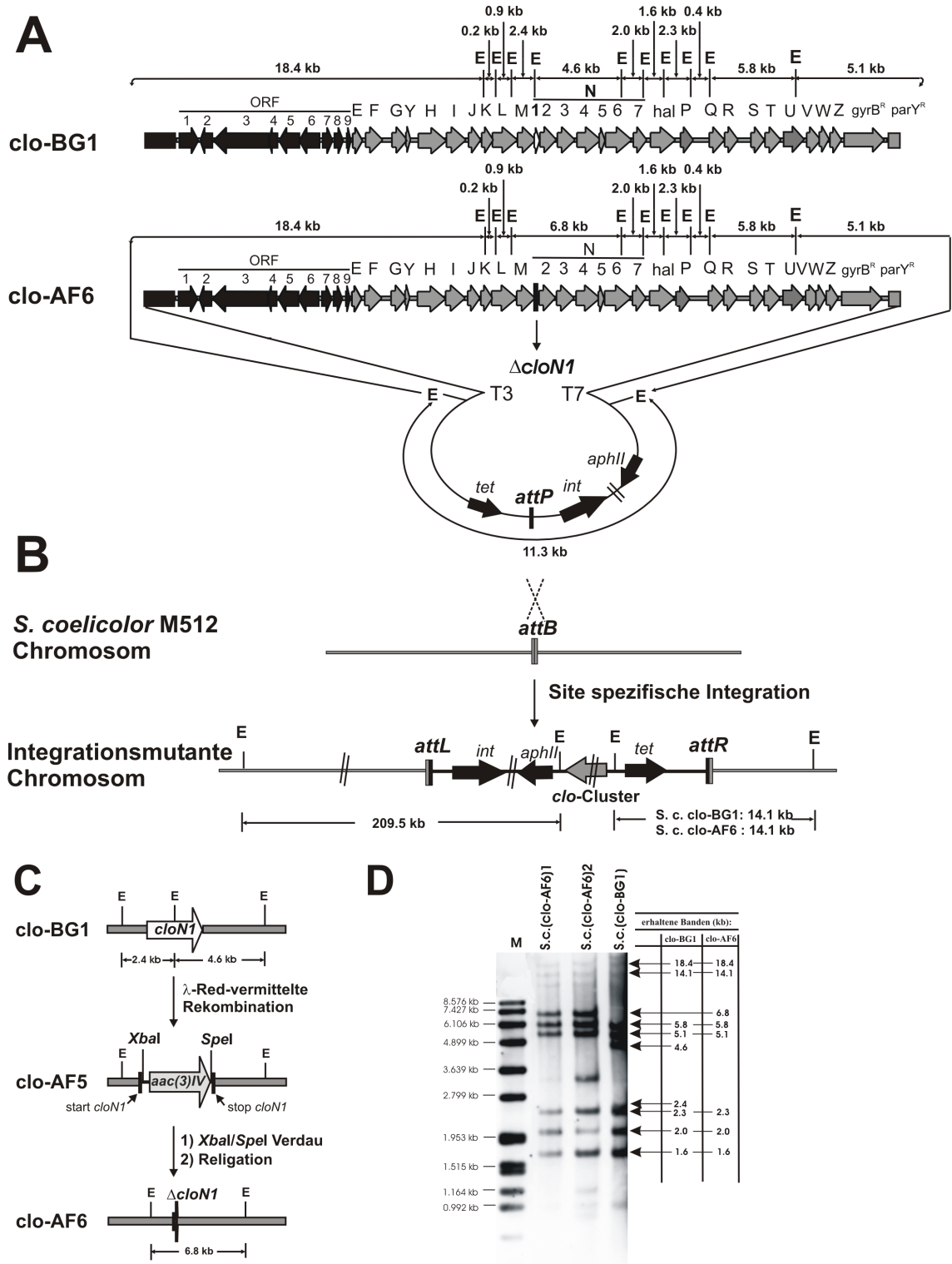


Abbildung III.1: A) Cosmidkonstrukte clo-BG1 und clo-AF6 (*cloN1*), die das Clorobiocin Biosynthesegencluster und die Φ C31 Integrationsfunktionen enthalten. B) schematische Darstellung der Site-spezifischen Integration von clo-AF6 in das *S. coelicolor* Genom. E= *EcoRI*-Schnittstelle, T3,T7= T3,T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegeben Fragmentgrößen resultieren vom *EcoRI*-Verdau. C) detaillierte Ansicht der Ersetzung des Gens *cloN1* durch die Apramycinresistenzkassette, flankiert durch die *XbaI* /*SpeI*- Erkennungsstellen. D) Southern Blot Analyse der clo-AF6 Integrationsmutanten. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Genomische und Cosmid-DNA wurden mit *EcoRI* verdaut.

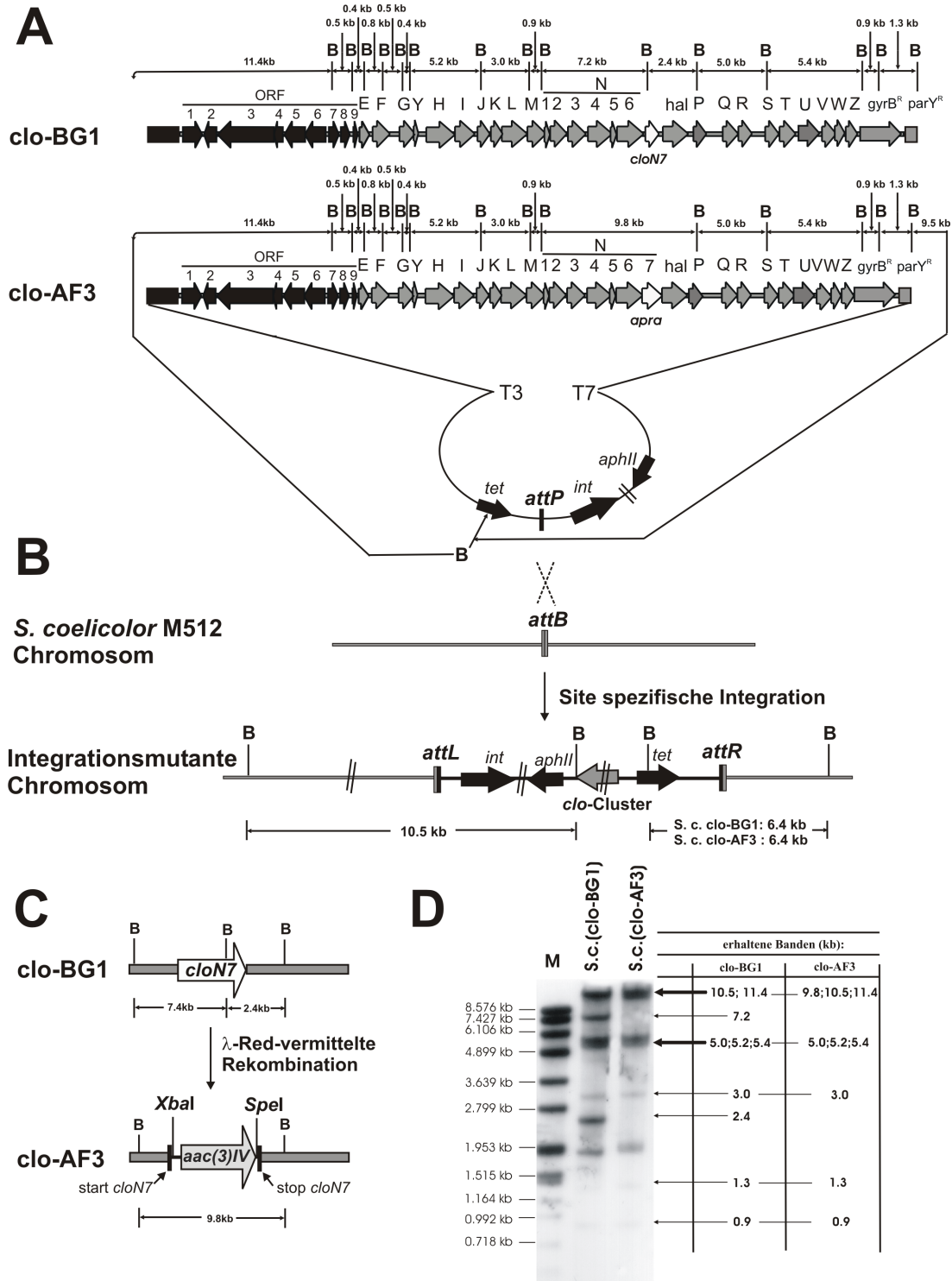


Abbildung III.2: A) Cosmide clo-BG1 und clo-AF3 (*cloN7*), die das Clorobiocin Biosynthesegencluster und die Φ C31 Integrationsfunktionen enthalten. B) schematische Darstellung der Site-spezifischen Integration von clo-AF3 in das *S. coelicolor* Genom. B= *BamHI*-Schnittstelle, T3,T7= T3,T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegebene Fragmentgrößen resultieren vom *BamHI*-Verdau. C) detaillierte Ansicht der Ersetzung des Gens *cloN7* durch die Apramycin-Resistenzkassette, flankiert durch die *XbaI* /*SpeI*- Erkennungsstellen. D) Southern Blot Analyse der clo-AF3 Integrationsmutante. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Genomische und Cosmid-DNA wurden mit *BamHI* verdaut.

1.4 Charakterisierung der Sekundärstoffmetabolite

Für die Analyse der Sekundärstoffmetabolite wurden die *S. coelicolor* M512 Integrationsmutanten, die entweder das intakte Clorobiocin-Cluster oder das *cloN1* bzw. *cloN7* Defektcluster enthielten, in Produktionsmedium, wie unter Kapitel II/6.2.2 beschrieben, kultiviert. Die Ethylacetatextrakte dieser Kulturen wurden durch HPLC analysiert.

Die HPLC-Analyse der Integrationsmutante von *S. coelicolor* M512 mit dem unmodifizierten Cosmid clo-BG1 zeigte Clorobiocin als dominantes Produkt zusammen mit seinem strukturellen Isomer Isoclorobiocin und seinem nicht chloriertem Derivat Novclobiocin 101 (Abbildung III.3A). Dagegen produzierten die *cloN1*- und *cloN7*-Defektmutanten kein Clorobiocin. Dafür wurde eine Substanz mit einer Retentionszeit von 19 min als Hauptprodukt detektiert und als Novclobiocin 104 identifiziert (Abbildung III.3B und C). Das FAB-MS-Spektrum dieser Verbindung zeigte ein negatives Ion von 588 ($[M-H]^-$), das 107 Da kleiner war als das von Clorobiocin und mit dem Verlust des 5-Methylpyrrol-2-carboxylteils übereinstimmte. Das 1H -NMR-Spektrum wies die gleichen Signale wie Clorobiocin für die Protonen des Aminocoumarinrings, des prenylierten 4-Hydroxybenzoatteils und des Desoxyzuckeranteils auf. Jedoch die Signale für die Protonen der methylierten Pyrroleinheit fehlten (Tabelle III.1). Außerdem korrespondierte dieses Spektrum zu dem des Novclobiocins 104, das bei der *cloN2*-Defektmutante in einer anderen Studie (Xu *et al.*, 2003) beobachtet wurde. Die *cloN1*-Mutante produzierte 35 mg/l Novclobiocin 104, während bei der *cloN7*-Mutante nur eine Produktion von 10 mg/l zu verzeichnen war.

Die *cloN1*-Mutante produzierte noch ein zusätzliches Produkt (Retentionszeit 18 min)(Abbildung III.3B). Das negative FAB-MS-Spektrum dieser Substanz zeigte ein negatives Ion von m/z 554 ($[M-H]^-$). Dies entsprach 35 Da weniger als das von Novclobiocin 104 und korrespondierte mit dem Verlust eines Chloratoms. Anhand der Vergleiche seiner MS und 1H -NMR-Daten mit beobachteten Daten von früheren Studien wurde diese Substanz als Novclobiocin 107 identifiziert. Die HPLC-Analyse zeigte, dass diese Substanz auch von der *cloN7*-Mutante produziert wurde, jedoch in viel geringen Mengen.

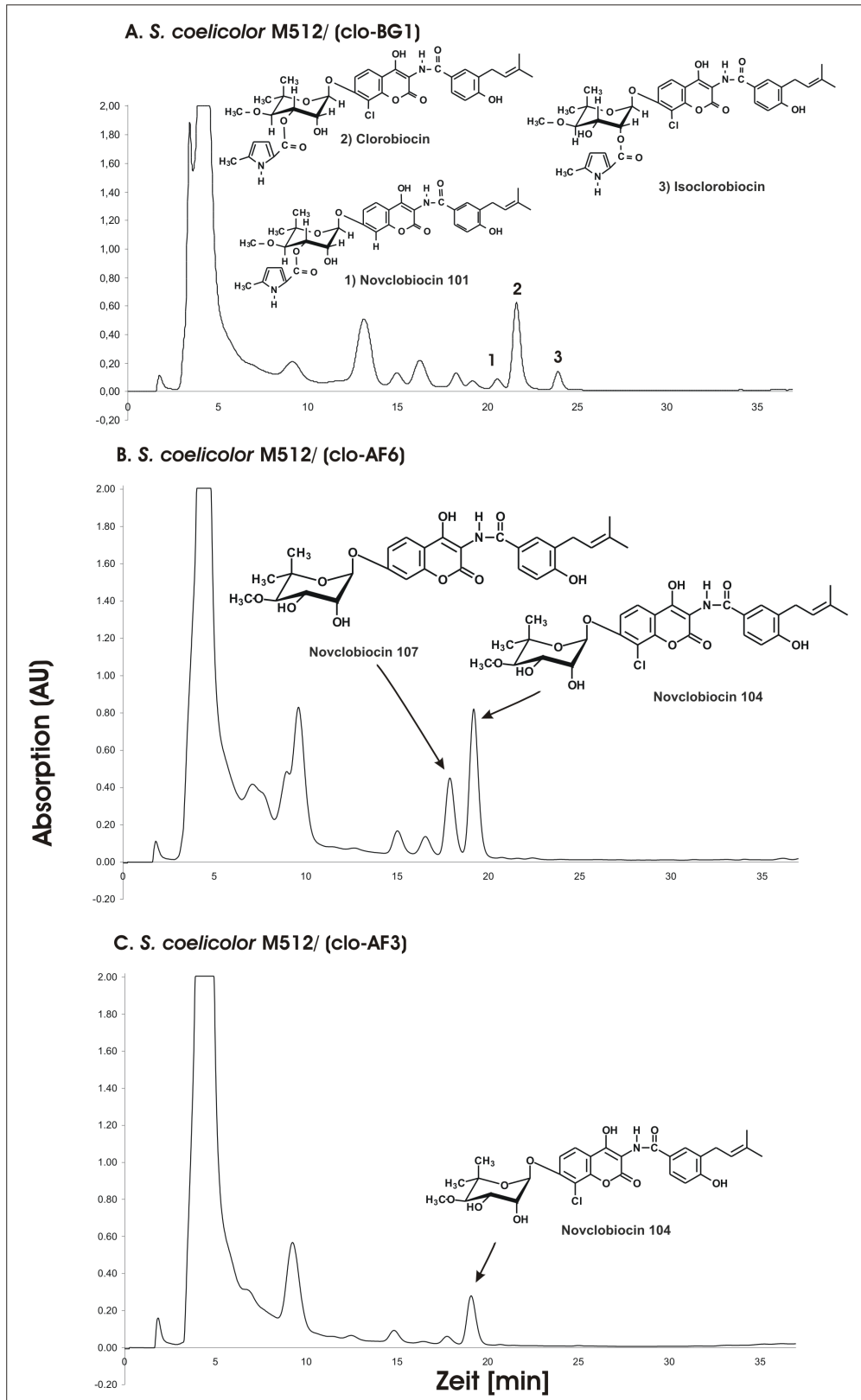
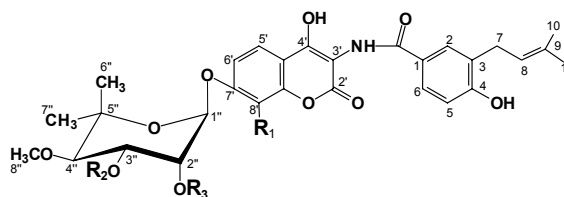


Abbildung III.3: HPLC-Analyse der Clorobiocin-Derivate der heterologen Produktionsstämme: A) *S. coelicolor* M512 mit Cosmid clo-BG1, der das intakte Clorobiocin-Cluster trägt. B) *S. coelicolor* M512 mit Cosmid clo-AF6, der das *cloN1*- Defektcluster enthält. C) *S. coelicolor* M512 mit Cosmid clo-AF3, der das *cloN7*- Defektcluster trägt.

Tabelle III.1: ¹H-NMR-Daten von Clorobiocin, Novclobiocin 104, Novclobiocin 107. Die Spektren wurden durch Messung bei 250 MHz erhalten. Die Spektren wurden in Methanol vermessen.



	R ₁	R ₂	R ₃
Clorobiocin	Cl		H
Novclobiocin 104	Cl	H	H
Novclobiocin 107	H	H	H

Position	Clorobiocin	Novclobiocin 104	Novclobiocin 107
	δ, Multiplizität (J/ Hz)	δ, Multiplizität (J/ Hz)	δ, Multiplizität (J/ Hz)
2-H	7.76, d (2.5)	7.75, d (2.5)	7.75, s ^a
5-H	6.84, d (8.4)	6.81, d (8.3)	6.80, d (8.4)
6-H	7.72, dd (8.4; 2.5)	7.71, dd (8.2, 2.0)	7.74, d (8.4)
7-H ₂	3.34, d (7.1)	3.33 d ^b	3.30, d ^b
8-H	5.35, br ^a t (7.1)	5.35, t (7.5)	5.35, t (7.6)
10-H ₃	1.74, s	1.73, s	1.73, s
11-H ₃	1.75, s	1.73, s	1.73, s
5'-H	7.90, d (9.2)	7.87, d (8.9)	7.89, d (7.8)
6'-H	7.33, d (9.2)	7.23, d (9.0)	6.94 ^b
8'-H	-	-	6.94 ^b
1''-H	5.73, d (1.8)	5.63, d (1.8)	5.52, d (2.3)
2''-H	4.34, t (2.7)	4.11, dd (1.8, 3.3)	4.01, dd (2.3, 3.3)
3''-H	5.71, dd (10.3; 2.9)	4.18, dd (3.3, 9.8)	4.09, dd (3.3, 9.3)
4''-H	3.72, d (10.3)	3.40, d (9.7)	3.36, d (9.4)
6''-H ₃	1.18, s	1.10, s	1.12, s
7''-H ₃	1.35, s	1.30, s	1.32, s
8''-OCH ₃	3.52, s	3.59, s	3.58, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	-	-
4'''-H	5.94, br d (3.6)	-	-
6'''-H ₃	2.29, s	-	-

Chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. ^abr = breites Signal. ^bKomplex, überlappendes Signal, J nicht bestimmbar.

Die Kulturextrakte beider Defektmutanten wurden auch auf die Anwesenheit der freien Pyrrol-2-carbonsäure untersucht. Dabei konnte die Präsenz der Pyrrol-2-carbonsäure nicht nur durch HPLC-Analyse, sondern auch durch spektroskopische Methoden (¹H-NMR) nachgewiesen werden (siehe Anhang). Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte drei Doppeldupletts mit den Signalen 6,91 ppm, 6,81 ppm und 6,15 ppm. Diese Signale

waren identisch zu denen von authentischer Pyrrol-2-carbonsäure und stimmten auch mit Literaturdaten (Xu *et al.*, 2003) überein.

1.5 Komplementierung der *cloN1* – Mutation

Aufgrund der kleinen Größe des *cloN1*-ORFs und dem geringen Abstand von 10 bp zum ORF *cloN2* wurde geprüft, ob nur die Inaktivierung von *cloN1* für die Produktion von Novclobiocin 104 und 107 verantwortlich war. Zu diesem Zweck wurde die *cloN1*-Defektmutante durch Expression einer intakten Kopie von *cloN1* unter Verwendung des Vektors pUWL201, in welchem *cloN1* unter der Kontrolle des konstitutiven *ermE*-Promotors steht, komplementiert. Nach Transformation des *cloN1*-Expressionskonstrukts pAF30 in die *cloN1*-Defektmutante zeigte die HPLC-Analyse, dass die Clorobiocinproduktion zu etwa 60% der vor der *cloN1* Inaktivierung beobachteten Produktivität wieder hergestellt war.

1.6 Versuche zur heterologen Überexpression von CloN1, CloN2 und CloN7 als N- oder C-terminale Hexahistidin-Fusionsproteine

Die Inaktivierung von *cloN1* und *cloN7* führte bei den Defektmutanten zur Akkumulation von Pyrrol-2-carbonsäure und Novclobiocin 104. Diese beiden Substanzen wurden auch bei der *cloN2*-Defektmutante in einer früheren Studie nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass *cloN2* in den Acyltransfer der Pyrrol-2-carbonsäure auf den Desoxyzuckerteil von Novclobiocin 104 involviert ist (Xu *et al.*, 2003). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass auch die Gene *cloN1* und *cloN7* für diesen Acyltransfer essentiell sind. Um nun den genauen Ablauf dieser Reaktion zu verstehen, sollten die Enzyme CloN1, CloN2 und CloN7 überexprimiert, gereinigt und in einem geeigneten Assay getestet werden.

1.6.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Für die Herstellung der Expressionskonstrukte wurden die beiden Expressionsvektoren pRSETB und pQE60 verwendet. pRSETB enthält einen N-terminalen His-Tag und pQE60 einen C-terminalen His-Tag.

Das Gen *cloN1* wurde wie unter Kapitel II/7.6.4 beschrieben mittels PCR aus dem Cosmid clo-BG1 amplifiziert und zunächst in den pGEM-T-Vektor kloniert. Nach *NcoI*/*BglII*-Verdau wurde das Gen in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pQE60 hinter den T5-Promotor ligiert. Das fertige Konstrukt erhielt den Namen pAF27.

Das Gen *cloN2* wurde ebenfalls mittels PCR aus dem Cosmid clo-BG1 amplifiziert (s. Kapitel II/7.6.4) und sowohl in den Expressionsvektor pRSETB als auch den Expressionsvektor pQE60 kloniert. Die erhaltenen Konstrukte wurden als pAF20 und pAF21 bezeichnet.

Die Amplifizierung des Gens *cloN7* erfolgte wie unter Kapitel II/7.6.4 beschrieben mittels PCR aus dem Cosmid clo-BG1. Das erhaltene PCR-Produkt wurde zunächst in pLitmus28 kloniert (pAF22). Nach *HindIII* / *PstI*-Verdau wurde das Gen in die gleichen Schnittstellen des Expressionsvektors pRSETB hinter den T7-Promotor ligiert. Das fertige Konstrukt erhielt die Bezeichnung pAF23.

1.6.2 Überexpression von CloN1, CloN2 und CloN7

In den verschiedenen Expressionskonstrukten standen die Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7* unter IPTG induzierbaren Promotoren. Für die Expressionsversuche wurden die Konstrukte pAF20, pAF21, pAF23 und pAF27 in *E. coli* XL1 Blue MRF⁻ transformiert. Die Induktion erfolgte mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen.

Eine Expression des 10 kDa großen Proteins CloN1 konnte unter den gewählten Expressionsbedingungen (Kapitel II/8.2.1) nicht erzielt werden (nicht gezeigt). Das Protein CloN2 wurde nur in den Expressionsversuchen mit pAF21 mit einer Größe von 38,1 kDa detektiert (Abbildung III.4). Jedoch war eine saubere Aufreinigung des Proteins nicht möglich, da das Protein unter den getesteten Bedingungen nur in unlöslicher Form vorlag. Eine Überexpression des 34,4 kDa großen CloN7-Proteins wurde ebenfalls in der SDS-PAGE nicht beobachtet (nicht gezeigt).

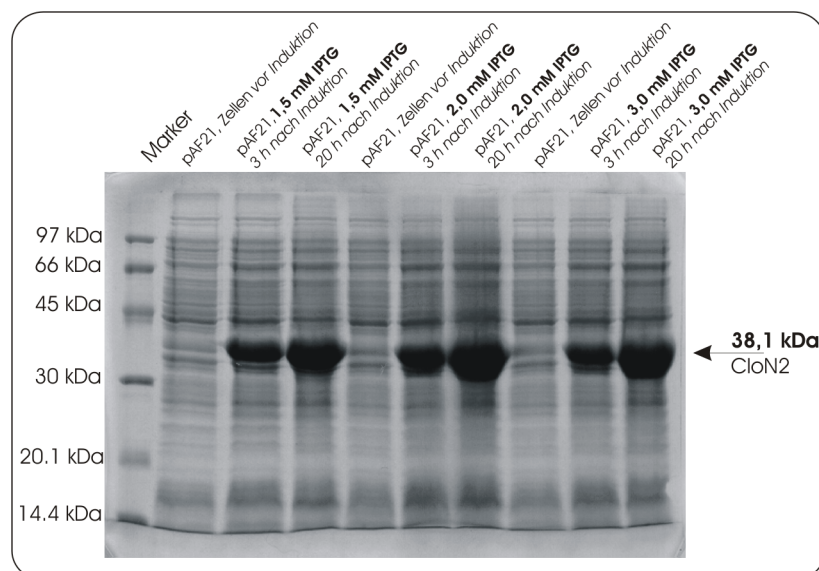


Abbildung III.4: Überexpression der Acyl-ACP-synthase CloN2 mit Hilfe des Expressions-Konstruktes pAF21 in *E. coli* XL1 Blue MRF⁻ mit 1,5-3,0 mM IPTG.

Weitere Optimierungen der Expressionsbedingungen, wie Induktion mit anderen IPTG-Konzentrationen, veränderte Kultivierungstemperaturen oder die Verwendung anderer Expressionswirtstämme (*E. coli* BL21/ pLysS, *S. lividans* T7) führten bei keinem der drei Proteine zu einer Verbesserung der Expressionsergebnisse. Deshalb wurden weitere Experimente zur Überexpression von CloN1, CloN2 und CloN7 eingestellt.

Um eine Überexpression von CloN1, CloN2 und CloN7 zu erzielen, müssten neue Expressionskonstrukte erstellt und die Expression optimiert werden.

2. Biosynthese des 5,5-Dimethyl-Desoxyzuckers Noviose - Untersuchungen des Methyltransferasegens *cloU*

Die Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ enthalten einen ungewöhnlichen Desoxyzucker mit einer 5,5-*gem*-Dimethylstruktur (Abbildung III.5).

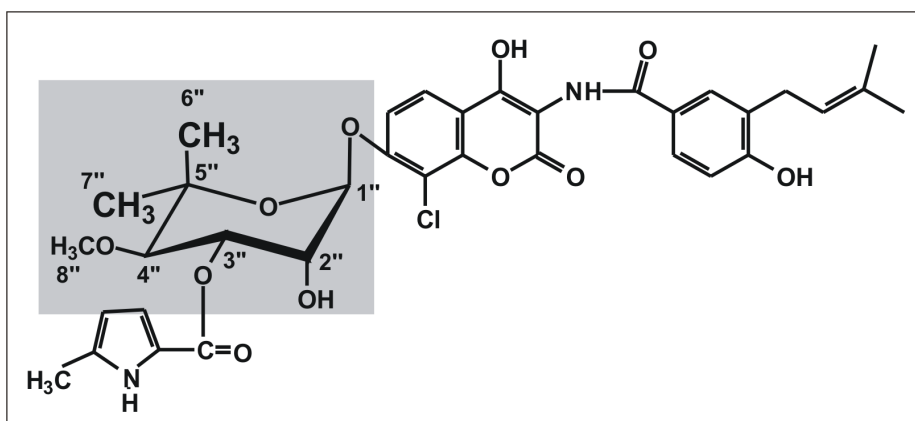


Abbildung III.5: Clorobiocin mit hervorgehobenen Zuckerteil

Fütterungsexperimente mit Isotopenmarkierten Vorläufern zeigten, dass eine Methylgruppe an Position 5 des Zuckers von Glucose (Birch *et al.*, 1962) und die andere von *S*-Adenosylmethionin stammte (Birch *et al.*, 1960). Weiterhin offenbarten Sequenzanalysen, dass für die Bildung dieses Zuckerteils eine Gruppe von fünf Genen, *novSTUVW* und seine Homologen *cloSTUVW* und *couSTUVW*, die in allen drei Biosynthesegenclustern in identischer Reihenfolge vorkommen, verantwortlich sind. Dabei zeigt NovV Sequenzähnlichkeit zu dTDP-Glucosesynthasen, NovT zu dTDP-Glucose-4,6-dehydrathasen, NovW zu dTDP-4-Keto-6-deoxy-glucoseepimerasen und NovS zu dTDP-4-Keto-hexosereduktasen. Diese Enzyme wurden auch in anderen Desoxyzucker-Biosynthesewegen gefunden (He und Liu, 2002). NovU, CloU und

CouU zeigen Sequenzähnlichkeit zu S-Adenosylmethionin-(SAM)-abhängigen Methyltransferasen. So weisen sie zum Beispiel eine 30%ige Identität zu TylC3 auf, ein Enzym, das die C-3-Methylierung in der Biosynthese des verzweigten Desoxyzuckers Mycarose während der Tylosinbildung katalysiert (Chen *et al.*, 2001). Daher wurde spekuliert, dass NovU die C-5-Methylierung in der Biosynthese von Noviose und CloU und CouU die entsprechenden Reaktionen in der Clorobiocin- und Coumermycin A₁-Biosynthese katalysieren. Um nun den Methylierungsschritt näher charakterisieren zu können, wurde das Gen *cloU* im Cosmid clo-BG1, welches das komplette Clorobiocin-Cluster beinhaltet, deletiert. Das modifizierte Cosmid wurde anschließend in den heterologen Stamm *S. coelicolor* M512 eingebracht und die Sekundärmetabolite der resultierenden Integrationsmutanten untersucht. Dabei könnten die NMR-Untersuchungen der potentiell resultierten Clorobiocin-Derivate mit einer Methylgruppe an Position 5 des Desoxyzuckers Aufschluss geben, ob der Zucker ein L-Rhamnose-Derivat oder ein 6-Desoxy-D-gulosederivat ist. Gleichzeitig könnten die Untersuchungen aufzeigen, ob die Desoxyzucker-Biosynthese eine 3,5-Epimerisierung oder nur eine 3-Epimerisierung beinhaltet.

2.1 Sequenzanalyse von *cloU*

CloU codiert für ein Protein, das sich aus 420 Aminosäuren zusammensetzt. Auf Aminosäureebene zeigt das Protein 90% Homologie zu CouU von *S. rishiriensis* (Wang *et al.*, 2000) und 88% zu NovU von *S. spheroides* (Steffensky *et al.*, 2000b). CouU und NovU sind putativ für die C-Methyltransferasereaktionen, die in der Desoxyzucker-Biosynthese von Coumermycin A₁ und Novobiocin auftreten, verantwortlich (Li und Heide, 2004). CloU enthält eine mögliche SAM-Bindungsstelle, die an Position 108-116 (VVEFGSNTG) lokalisiert ist (Kagan und Clarke, 1994). CouU und NovU wiesen das gleiche Motiv an der selben Position auf.

2.2 Inaktivierung von *cloU*

Für die *cloU*-Inaktivierung wurde das Gen durch die Apramycinresistenzkassette *aac(3)IV* im Cosmid clo-BG1, welches das komplette Biosynthesecluster von Clorobiocin trägt, ersetzt. Dafür wurde die Resistenzkassette vom Plasmid pUG019 mittels PCR unter Verwendung von Primern, die 39 Basenpaare homolog zu den Bereichen direkt vor und nach *cloU* waren, amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Ersetzung des gesamten ORF's von *cloU* im Cosmid clo-BG1 verwendet. Das erhaltene Cosmid wurde als clo-AF1 bezeichnet. Die Resistenzkassette wurde dann durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *SpeI*, gefolgt von einer Religation der äußeren kompatiblen Enden, entfernt. Die Beseitigung der Kassette wurde

durchgeführt, um mögliche polare Effekte auf nachfolgende Gene auszuschließen. Das resultierende Cosmid erhielt die Bezeichnung clo-AF2 (Abbildung III.6A).

Anschließend wurde, wie in Kapitel II/7.9.2 beschrieben, das modifizierte Cosmid clo-AF2 durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Mutanten, die durch Integration des Cosmids in das Wirtsgenom entstanden, wurden durch ihre Kanamycinresistenz selektiert. Die schematische Darstellung der Integration ist in Abbildung III.6 C wiedergegeben. Fünf unabhängige Mutanten wurden durch Southern Blot Analyse auf ihren identischen Genotyp untersucht. Das Ergebnis einer dieser Mutanten ist in Abbildung III.6 D präsentiert. Die gewünschte Deletion von *cloU* in den Mutanten war durch das Verschwinden der 1 kb *BglII*-Bande im Vergleich zum clo-BG1-Stamm ersichtlich.

2.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion

Für die Analyse der Sekundärstoffproduktion wurden eine Integrationsmutante von *S. coelicolor* M512 mit dem unmodifizierten Cosmid clo-BG1 und fünf Integrationsmutanten von *S. coelicolor* M512 mit dem *cloU*-defektiven Cluster in Produktionsmedium (s. Kapitel II/6.2.2) kultiviert. Anschließend wurden die Ethylacetatextrakte der Kulturen per HPLC analysiert. Die Integrationsmutante von *S. coelicolor* M512 mit intaktem Clorobiocin-Cluster produzierte Clorobiocin (9,0 mg/l), Isoclorobiocin (2,8 mg/l) und Novclorobiocin 101 (5,3 mg/l) (Abbildung III.7A), während bei den *cloU*-Defektstämmen keine Clorobiocin-Produktion nachgewiesen wurde. Dafür produzierten die Mutanten das Aglykon von Clorobiocin, Clorobiocinsäure (20 mg/l) als auch die dazugehörige nicht chlorierte Verbindung, Novclorobiocinsäure 106 (39 mg/l) (Abbildung III.7B). Neben diesen beiden Hauptprodukten wurden jedoch noch zwei kleinere Peaks mit Retentionszeiten von 20 und 23 min detektiert. Diese wurden als Novclorobiocin 122 und Novclorobiocin 123 bezeichnet (Abbildung III.7B). Dabei produzierte der *cloU*-Defektstamm Novclorobiocin 122 in einer Menge von 1,5 mg/l und Novclorobiocin 123 in einer Menge von 0,4 mg/l.

Um die Struktur dieser letzteren Verbindungen aufzuklären, wurde ein *cloU*-Defektstamm in 5 l Produktionsmedium kultiviert. Die Kultur wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Substanzen nach präparativer HPLC-Isolierung per MS und ¹H-NMR analysiert.

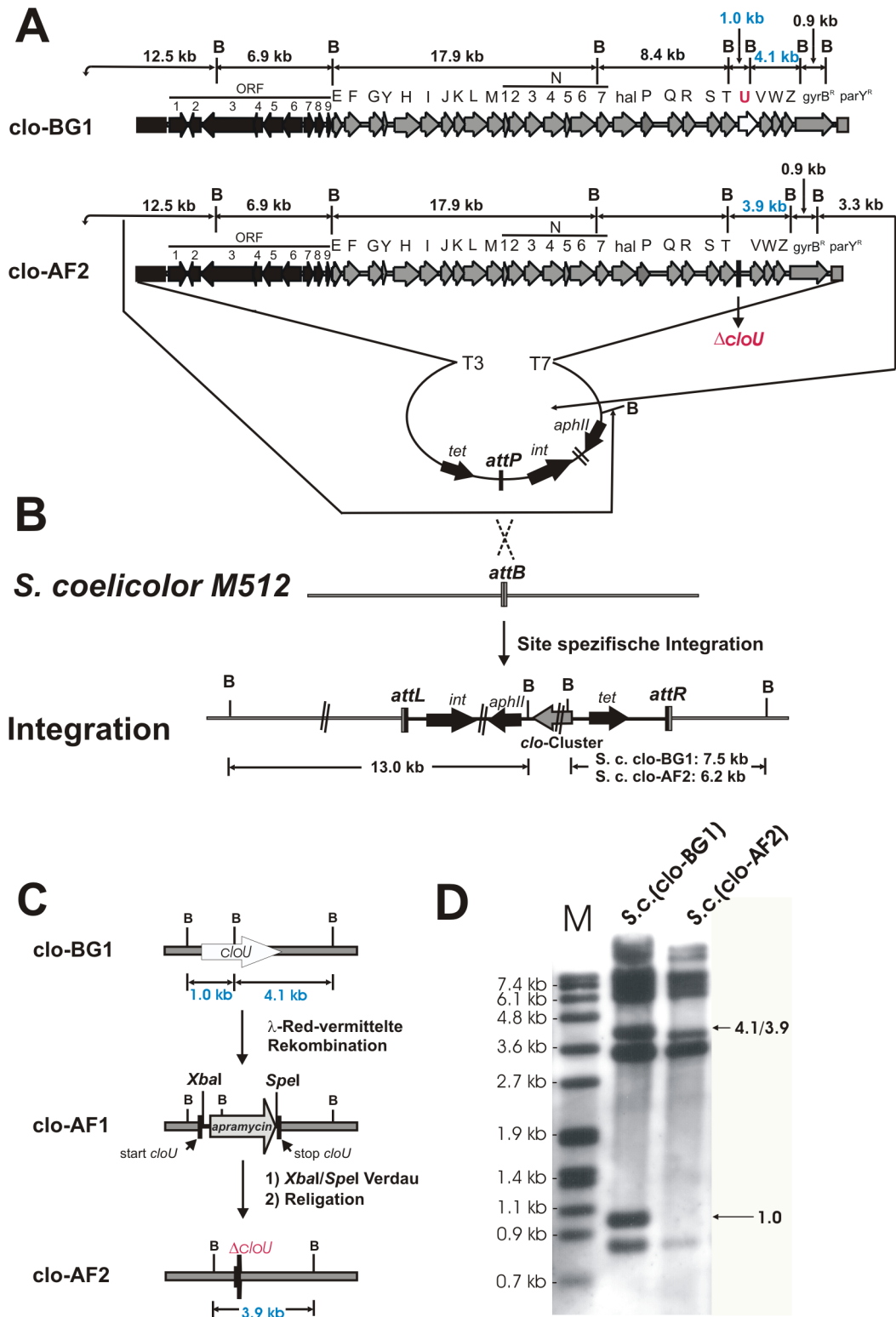


Abbildung III.6: A) Cosmide clo-BG1 und clo-AF2 (*cloU*⁻), die das Clorobiocin Biosynthesegencluster und die Φ C31 Integrationsfunktionen enthalten. B) schematische Darstellung der Site-spezifischen Integration von clo-AF2 in das *S. coelicolor* Genom. B= *Bam*HI-Schnittstelle, T3,T7= T3,T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegebene Fragmentgrößen resultieren vom *Bam*HI-Verdau. C) detaillierte Ansicht der Ersetzung des Gens *cloU* durch die Apramycin-Resistenzkassette, flankiert durch die *Xba*I/*Spe*I-Erkennungsstellen. D) Southern Blot Analyse der clo-AF2 Integrationsmutante. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Genomische und Cosmid-DNA wurden mit *Bam*HI verdaut.

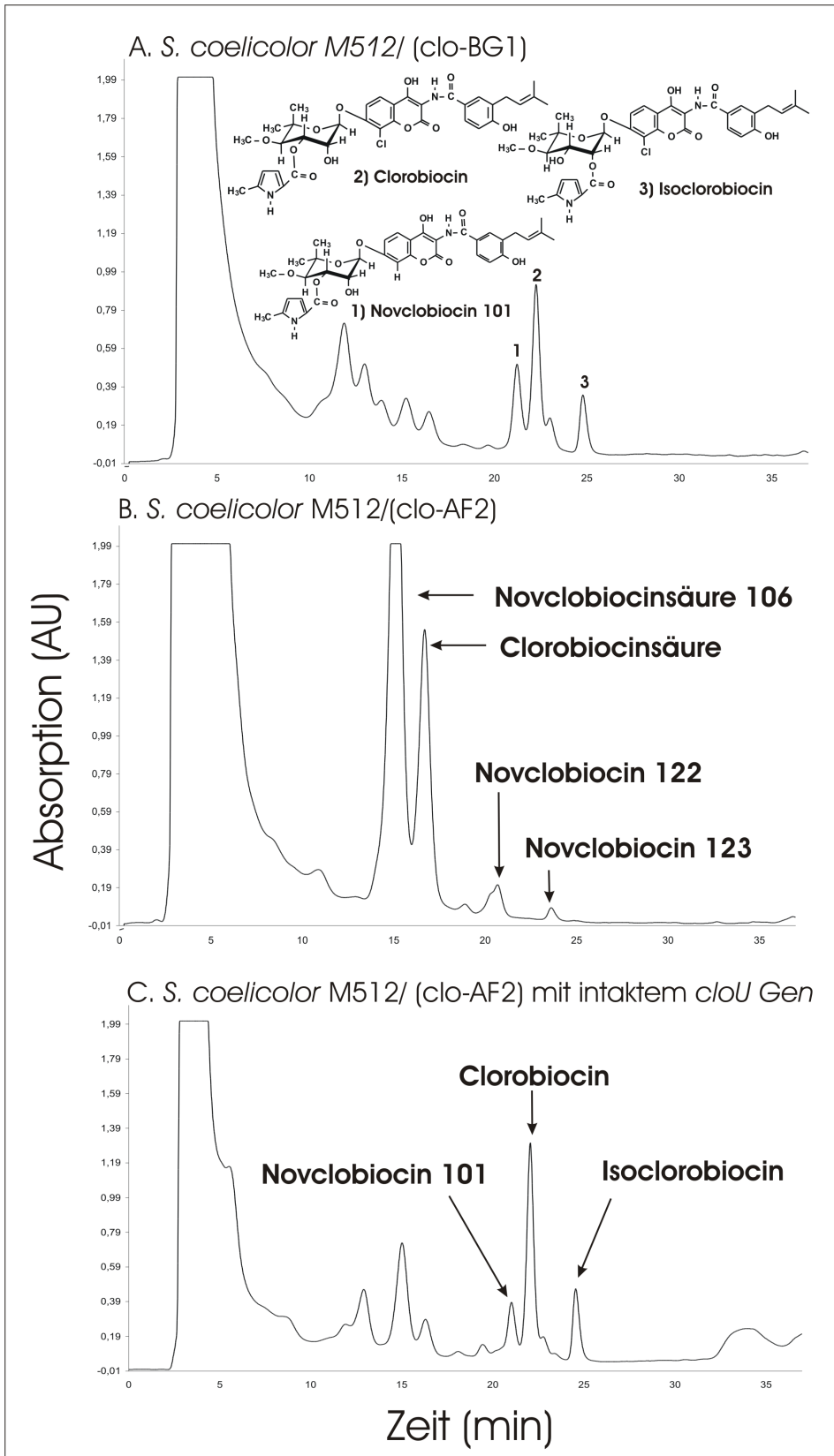


Abbildung III.7: HPLC-Analyse der Sekundärstoffproduktion von A) *S. coelicolor* M512 mit intaktem Clorobiocin-Cluster (clo-BG1). B) *S. coelicolor* M512 mit dem *cloU*-Defektcluster (clo-AF2). C) Komplementierung des *cloU*-Defektstammes mit dem Plasmid pAF16

2.4 Strukturaufklärung der neuen Novclobiocine

Das Massenspektrum von Clorobiocinsäure zeigte ein Molekulargewicht von 415. Dies entsprach 281 Da weniger als das von Clorobiocin und stimmte mit dem Verlust des gesamten Desoxyzuckerteils überein. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Abwesenheit der Signale der Zuckerprotonen und der Signale für die Protonen des 5-Methylpyrrol-2-carboxylteils in der $^1\text{H-NMR}$ -Analyse im Vergleich mit denen von Clorobiocin bestätigt. Dafür wurden die Signale für die Protonen des Aminocoumarinrings und des 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoylteils deutlich beobachtet (Tabelle III.2).

Novclobiocinsäure 106 zeigte ein Molekulargewicht von 380 in der MS-Analyse. Dies entsprach 35 Da weniger als das von Clorobiocinsäure und entsprach dem Verlust des Cloratoms. Dies wurde auch durch das Signal eines weiteren Protons mit 6,66 ppm für 8'-H bestätigt. Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten von dieser Verbindung stimmten auch mit den beobachteten Daten von früheren Studien (Eustáquio *et al.*, 2005b) überein (Tabelle III.2).

Die $^1\text{H-NMR}$ -Analyse von Novclobiocin 122 und Novclobiocin 123 zeigte ähnliche Signale wie Clorobiocin für die Protonen des Aminocoumarinteils, dem prenylierten 4-Hydroxybenzoylteils und dem 5-Methylpyrrol-2-carboxylteils. Jedoch die Signale für den Desoxyzuckerteil waren deutlich anders als im Vergleich zu denen von Clorobiocin (Tabelle III.2). Der Desoxyzuckerteil war in allen drei Verbindungen in der $^1\text{C}_4$ -Konformation präsentiert. Daher waren die Protonen von 1'' und 2'' in äquatorialer Position, während die Protonen von 3'' und 4'' in axialer Position ausgerichtet waren. Dementsprechend zeigte das Proton 3''-H in Clorobiocin eine starke Kopplung mit dem Proton 4''-H ($J = 10,3$ Hz), aber eine schwache Kopplung mit dem Proton 2''-H ($J = 2,8$ Hz), die in einem charakteristischen Doppelduplettsignal für 3''-H ($J = 2,8$ und $10,3$ Hz) und in einem Duplettsignal für 4''-H ($J = 10,3$ Hz) resultierten. Das äquatoriale Proton 2''-H zeigte zusätzlich eine Kopplung mit dem äquatorialen Proton 1''-H mit einer Kopplungskonstanten von 1,8 Hz, wodurch ein Triplettsignal für 2''-H aufgrund der niedrigen Auflösung bei der Messung resultierte. Die zwei Methylgruppen an Position 5 des Desoxyzuckers erschienen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Clorobiocins als Singulets mit 1,18 ppm und 1,35 ppm.

Dagegen wurde bei Novclobiocin 122 nur eine Methylgruppe, die als Duplettsignal bei 1,18 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 6,4 Hz auftrat, beobachtet. Das Proton an 4'' erschien als Triplettsignal mit einer Kopplungskonstanten von 9,6 Hz. Dies bedeutete, dass das Proton an 4'' eine starke Kopplung sowohl zum 5''-Proton als auch zum 3''-Proton hat. Dies bewies, dass alle Protonen in axialer Ausrichtung lokalisiert waren und dass es sich bei dem Desoxyzucker um ein L-Rhamnose-Derivat handelt. Das negative Massenspektrum dieser Verbindung zeigte einen molaren Ionenpeak von m/z 681 ($[\text{M-H}]^-$). 14 Masseinheiten weniger als das von Clorobiocin, das einem Verlust einer Methylgruppe entsprach (siehe Anhang).

In Novclobiocin 123 erschien das Proton von 3'' bei 4,29 ppm. Dagegen war das Signal für das 2''-Proton stark zu 5,36 ppm verschoben. Dies zeigte, dass der Acylteil mit der 2''-Hydroxylgruppe anstatt mit der 3''-Hydroxylgruppe des Desoxyzuckers verbunden ist. Ähnliche Beobachtungen wurden schon in früheren Studien gemacht (Freitag *et al.*, 2005a; Galm *et al.*, 2004a). Das negative Massenspektrum zeigte das gleiche molare Ion, wie es bei Novclobiocin 122 beobachtet wurde (siehe Anhang).

2.5 Komplementierung der *cloU* – Mutation

Um zu prüfen, dass nur die Inaktivierung von *cloU* für die Änderung der Sekundärstoffproduktion verantwortlich war, wurde der *cloU*- Defektstamm durch Expression einer intakten Kopie von *cloU* unter der Kontrolle des konstitutiven *ermE*-Promotors und Verwendung des Vektors pUWL201 komplementiert. Dabei zeigte die HPLC- Analyse, dass der *cloU*-Defektstamm mit dem *cloU*- Expressionskonstrukt pAF16 Clorobiocin in vergleichbaren Mengen (10 mg/l) wie *S. coelicolor* M512 mit intaktem Clorobiocin-Cluster produzierte (Abbildung III.7C).

Tabelle III.2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Clorobiocin, Novclorobiocinsäure 106, Clorobiocinsäure, Novclorobiocin 122 und Novclorobiocin 123. Die Spektren wurden durch Messung bei 250 MHz und 400 MHz erhalten. Die Spektren für Clorobiocin und der beiden Säuren wurden in Methanol vermessen, die Spektren für Novclorobiocin 122 und Novclorobiocin 123 in Dimethylsulfoxid.

	R₁	
Novclorobiocinsäure 106	H	
Clorobiocinsäure	Cl	

	R₁	R₂	R₃
Clorobiocin	CH₃		H
Novclorobiocin 122	H		H
Novclorobiocin 123	H	H	

Position	Clorobiocin	Novclorobiocin-säure	Clorobiocin-säure	Novclorobiocin 122	Novclorobiocin 123
	δ , Multiplizität (J/ Hz)	δ , Multiplizität (J/ Hz)	δ , Multiplizität (J/ Hz)	δ , Multiplizität (J/ Hz)	δ , Multiplizität (J/ Hz)
2-H	7.76, d (2.5)	7.67, d (2.5)	7.74, d ^b	7.68, br ^a s	7.75, br ^a s
5-H	6.84, d (8.4)	6.81, d (8.3)	6.85, d (8.4)	6.78, d (8.4)	6.79, d (7.8)
6-H	7.72, dd (8.4; 2.5)	7.71, dd (2.6, 8.3)	7.69, d ^b	7.63, br ^a d (8.4)	7.70, br ^a d (7.8)
7-H ₂	3.34, d (7.1)	3.33, d (7.4)	3.30, d ^b	3.24, d (7.2)	3.30 ^b
8-H	5.35, br ^a t (7.1)	5.35, t (7.4)	5.34, t (6.7)	5.32, t (7.2)	5.33, t ^b
10-H ₃	1.74, s	1.73, s	1.72, s	1.69, s	1.72, s
11-H ₃	1.75, s	1.73, s	1.72, s	1.69, s	1.72, s
5''-H	7.90, d (9.2)	7.80, d (8.6)	8.10, d (8.8)	7.71, d (9.0)	7.87, d (8.6)
6''-H	7.33, d (9.2)	6.70, dd (2.2, 8.6)	6.80, d (8.8)	7.09, d (9.0)	7.19, d (8.6)
8''-H	-	6.66, d (2.2)	-	-	-
1''-H	5.73, d (1.8)	-	-	5.60, br ^a s	5.77, br ^a s
2''-H	4.34, t (2.8)	-	-	4.20, br ^a s	5.36, t ^b
3''-H	5.71, dd (10.3; 2.8)	-	-	5.29, dd (2.8, 9.6)	4.29, dd (2.8, 9.0)
4''-H	3.72, d (10.3)	-	-	3.44, t (9.6)	3.38, t (9.0)
5''-H	-	-	-	3.71, dq (6.4, 9.2)	3.74, m ^c
6''-H ₃	1.18, s	-	-	-	-
7''-H ₃	1.35, s	-	-	1.18, d (6.4)	1.19, d (6.4)
8''-OCH ₃	3.52, s	-	-	3.42, s	3.33, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	-	-	6.76, t (2.8)	6.89, d (3.4)
4'''-H	5.94, br d (3.6)	-	-	5.91, br ^a s	5.94, d (3.4)
6'''-H ₃	2.29, s	-	-	2.23, s	2.30, s

Chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. ^abr = breites Signal. ^bKomplex, überlappendes Signal, *J* nicht bestimmbar. ^c= *J* nicht bestimmbar

2.6 Biologische Aktivität der Novclobiocine

Die erhaltenen Novclobiocine (Novclobiocin 122 und Novclobiocin 123) wurden auf ihre wachstumshemmende Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* ATTC 14893 im Vergleich zu Clorobiocin in einem Agar-Diffusionsassay mit fünf verschiedenen Mengen untersucht (Abbildung III.8). Die antibakteriellen Aktivitäten wurden durch Auswertung der erzielten Hemmhofdurchmesser quantifiziert.

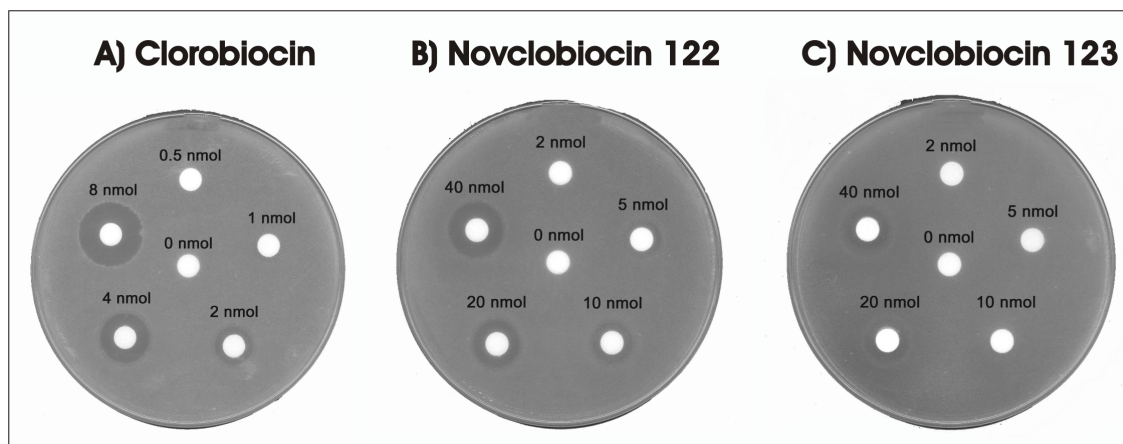


Abbildung III.8: Antibakterielle Aktivität von Clorobiocin und Derivaten. A) Clorobiocin, B) Novclobiocin 122 und C) Novclobiocin 123. Der Bioassay wurde mit *Bacillus subtilis* ATTC 14893 durchgeführt. Für die Strukturen siehe Tabelle III-2.

Novclobiocin 122 wies nur 20% der Aktivität von Clorobiocin auf. Dies zeigte, dass die Methylierung an Position 5 des Desoxyzuckers für die biologische Aktivität wichtig ist. Der Transfer des 5-Methylpyrrol-2-carboxylteils von der 3''-Hydroxylgruppe zur 2''-Hydroxylgruppe des Desoxyzuckers führte zu einer weiteren Reduktion der Aktivität. Novclobiocin 123 war nur halb so aktiv wie Novclobiocin 122.

3. Metabolisches Engineering der heterologen Produktion von Clorobiocin-Derivaten und Elloramycin in *Streptomyces coelicolor* M512

Die Inaktivierung des Methyltransferasegens *cloU* im Clorobiocin-Cluster und anschließende Expression des modifizierten Clusters in dem heterologen Wirtstamm *S. coelicolor* M512 führte zu Mutanten, die vorwiegend die Aglyka Novclobiocinsäure 106 und Clorobiocinsäure, aber nur geringe Mengen von dem L-Rhamnosid-Derivat Novclobiocin 122 und seinem strukturellen Isomer Novclobiocin 123 akkumulierten. Dabei lagen 97% der Aminocoumarine in Form der Aglyka vor und nur 2,3% in Form von Glycosiden (Freitag *et al.*, 2006). Dies war ein deutlicher Kontrast zu Bakterienstämmen, die das intakte Clorobiocin-Cluster exprimieren und über 90% der Aminocoumarine in glykosylierter Form produzieren (Eustáquio *et al.*, 2005a).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte im Transfer des Desoxyzuckerteils auf den Aminocoumarinring liegen. In der Clorobiocin-Biosynthese übernimmt die Glykosyltransferase CloM den Transfer der 5-C-Methyl-L-rhamnose von dTDP auf die 7-OH-Gruppe des Coumarinaglykons Clorobiocinsäure. Exakt die gleiche Reaktion kommt auch in der Novobiocin-Biosynthese vor. Die dafür verantwortliche Glykosyltransferase NovM, die auf Aminosäureebene 84% Identität zu CloM aufweist, wurde überexprimiert und *in vitro* charakterisiert (Albermann *et al.*, 2003; Freel Meyers *et al.*, 2003). Dabei wurde gezeigt, dass die Glykosyltransferase eine hohe Spezifität für Desoxyzucker aufweist und dTDP-L-Rhamnose mit 10000fach niedrigerer Effizienz akzeptiert als das natürliche Substrat 5-C-Methyl-dTDP-rhamnose (Freel Meyers *et al.*, 2003). Deshalb wurde vermutet, dass in dem *cloU*-Defektstamm eine effiziente Glykosylierung der Aglyka Novclobiocinsäure 106 und Clorobiocinsäure mit dem unnatürlichen Substrat dTDP-L-Rhamnose aufgrund der hohen Substratspezifität der Glykosyltransferase CloM verhindert wird.

Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass die 4-Ketoreduktase CloS, die normalerweise den 5-C-methylierten 4-Keto-6-desoxyzucker reduziert, nicht in der Lage ist den nicht 5-C methylierten Zucker als Substrat zu akzeptieren. Jedoch erschien diese Möglichkeit zunächst unwahrscheinlich, da in anderen Untersuchungen über eine Flexibilität in der Substrattoleranz von 4-Ketoreduktasen in der Desoxyzucker-Biosynthese berichtet wurde (Rodriguez *et al.*, 2000). Besonders die 4-Ketoreduktase EryBIV, die in der Erythromycin-Biosynthese auf einen 3-C-methylierten Desoxyzucker einwirkt, konnte einen nicht 3-C methylierten Desoxyzucker reduzieren (Rodriguez *et al.*, 2002).

Deshalb wurde zunächst der Grund für die geringe Glykosylierungseffizienz untersucht und anschließend neue Strategien verfolgt, um die Menge an den erwarteten glykosylierten Verbindungen zu erhöhen.

3.1 Heterologe Expression von einem Teil des Elloramycin Biosynthesegenclusters in dem *cloU*-Defektstamm

Bei vorangegangenen Untersuchungen des metabolischen Engineerings der Desoxyzucker-Biosynthese in *Streptomyces*-Stämmen wurde das Cosmid 16F4 sehr erfolgreich eingesetzt (Rodriguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002). Dieses Cosmid enthält ein 25 kb großes Insert des Elloramycin-Biosynthesegenclusters, das die Gene für die Biosynthese des Polyketidteils von Elloramycin und das Gen *elmGT* mit einschließt. Letzteres codiert für eine Glykosyltransferase mit beachtlicher Substrattoleranz (Blanco *et al.*, 2001). Jedoch enthält das Cosmid keine Gene für die Biosynthese von Desoxyzuckern. Die Expression dieses replikativen Cosmids in *S. albus* J1074 oder *S. lividans* TK64 führte zur Bildung von 8-Demethyltetracenomycin C (8-DMTC), dem Aglykon von Elloramycin. Die Expression des Cosmids in Bakterienstämmen, die verschiedene aktivierte Desoxyzucker produzieren, wie z.B. dTDP-L-Rhamnose, führte zu einer effizienten Bildung von glykosylierten 8-DMTC-Derivaten (Blanco *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000).

Deshalb wurde versucht, dieses Cosmid in dem *cloU*-Defektstamm zu exprimieren. Würde man dabei eine effiziente L-Rhamnosylierung von 8-DMTC beobachten, würde dies bedeuten, dass in dem *cloU*-Defektstamm der Biosyntheseweg zu dTDP-L-Rhamnose intakt ist und der limitierende Schritt für die Produktion von Novclobiocin 122 die Glykosyltransferasereaktion ist.

In einem ersten Experiment wurde das replikative Cosmid 16F4 in den parental Stamm *S. coelicolor* M512 transformiert. Die erwartete Produktion von 8-DMTC wurde durch HPLC-Analyse beobachtet (Abbildung III.9A) und die Identität von dem Produkt durch LC-MS-Analyse im Vergleich zu einer authentischen Referenzverbindung aufgeklärt. Glykosylierte Verbindungen wurden dabei nicht gebildet. Identische Ergebnisse wurden auch mit *S. lividans* TK64 als Wirtstamm beobachtet (Daten nicht abgebildet).

Anschließend wurde das Cosmid 16F4 in den *S. coelicolor* M512 Stamm, der das *cloU*-Defektcluster von Clorobiocin trägt, transformiert. HPLC und MS Analyse zeigten immer noch einen Peak von 8-DMTC, aber nur eine kleine Menge von Elloramycin (Retentionszeit von 19,7 min, leider nur sichtbar als eine Schulter des Peaks mit einer Retentionszeit von 20,1 min)(Abbildung III.9B). Elloramycin ist ein methyliertes Derivat von L-rhamnosyl-8-DMTC, das unter dem Einfluß von Methyltransferasen, die durch das Cosmid codiert werden, gebildet wird (Rodriguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2002). Seine Identität wurde durch LC-MS-Analyse im Vergleich zu einer authentischen Referenzverbindung identifiziert. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass der *cloU*-Defektstamm geringe Mengen an dTDP-L-Rhamnose bildet. Jedoch resultierte die Expression des Cosmids in anderen Bakterienstämmen, die dTDP-L-Rhamnose produzieren, in einer viel effizienteren Umwandlung von 8-DMTC zu Elloramycin (Rodriguez *et al.*, 2000; Vara *et al.*, 1989). Dies ließ spekulieren, dass die dTDP-L-Rhamnose Produktion in dem *cloU*-Defektstamm sehr niedrig war.

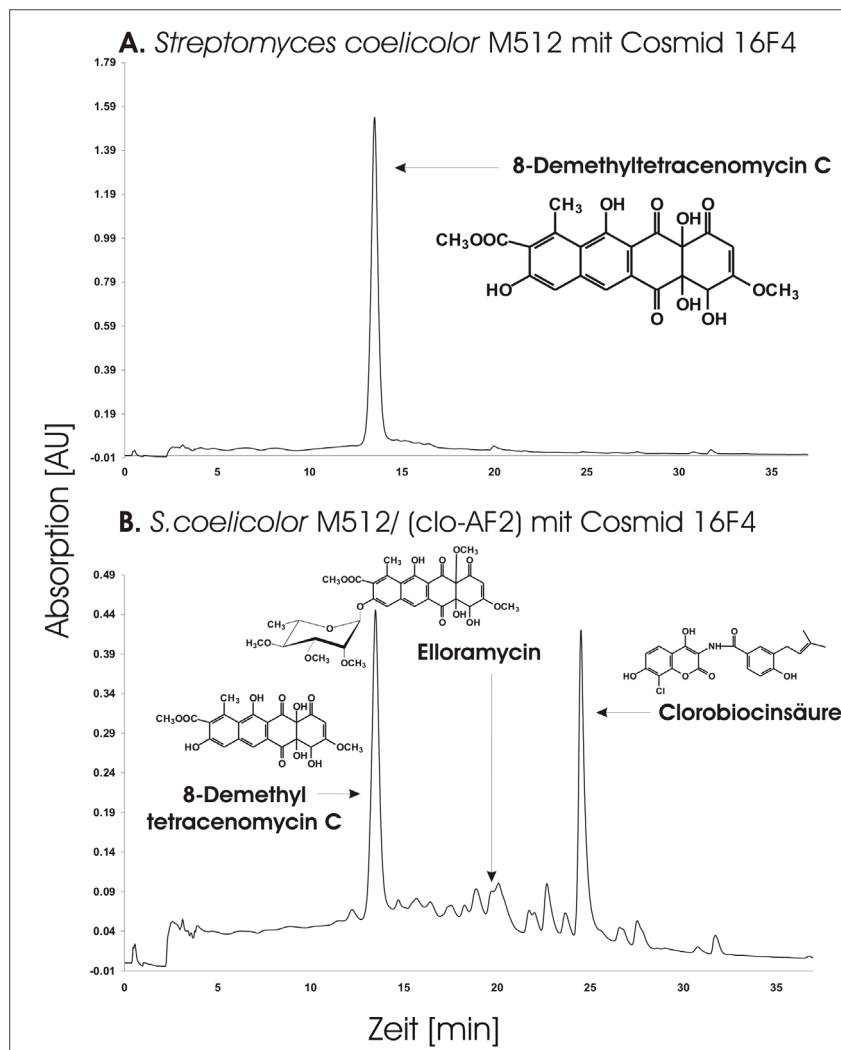


Abbildung III.9: HPLC-Analyse der Sekundärmetabolit –Produktion von A) *S. coelicolor* M512 mit Cosmid 16F4 und B) *S. coelicolor* M512 mit *cloU*-Defektcluster und Cosmid 16F4

3.2 Heterologe Expression der Gene für die Bildung von dTDP-L-Rhamnose vom Oleandomycin-Biosynthesegencluster

Um die Menge an dTDP-L-Rhamnose zu erhöhen, wurde in den *cloU*-Defektstamm das Plasmid pRHAM eingebracht. Dieses Plasmid enthält 4 Gene (*oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU*) vom Oleandomycin-Cluster, die zusammen zur Bildung von dTDP-L-Rhamnose führen. Dabei sind diese vier Gene in einem Single-Operon unter Kontrolle des konstitutiven *ermE*^{*} Promotors angeordnet.

Die HPLC-Analyse zeigte, dass der *cloU*-Defektstamm mit Plasmid pRHAM die glykosylierten Verbindungen Novclobiocin 122 und 123 in viel höheren Mengen bildete, als in der Abwesenheit von pRHAM (Abbildung III.10B). Präparative Isolierung und spektroskopische Analysen (MS- und NMR-Spektroskopie) bewiesen, dass es sich bei diesen Substanzen um die gleichen Verbindungen handelt, die zuvor in

geringerer Menge von dem *cloU*-Defektstamm ohne pRHAM isoliert worden waren (Tabelle III.3).

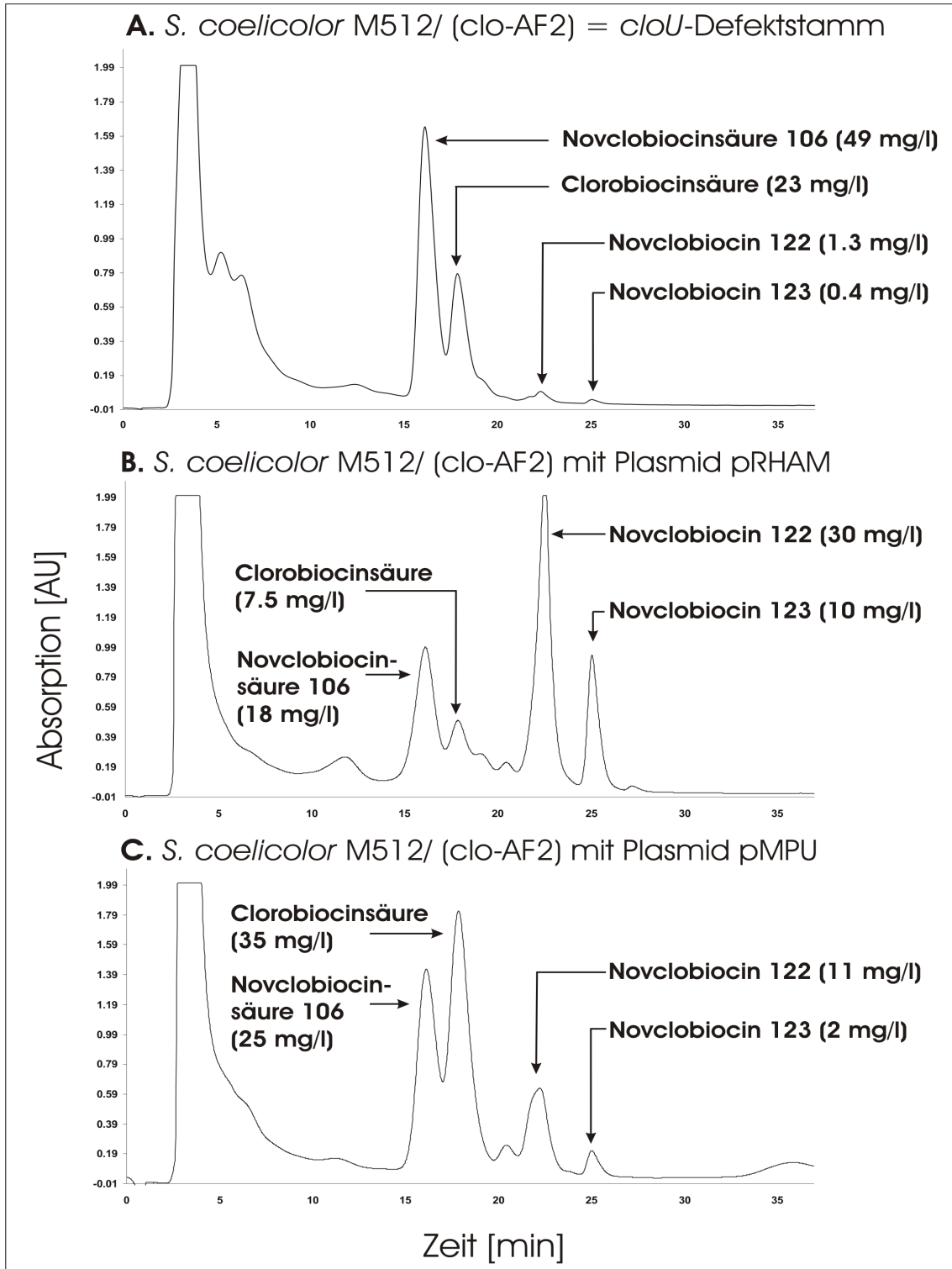
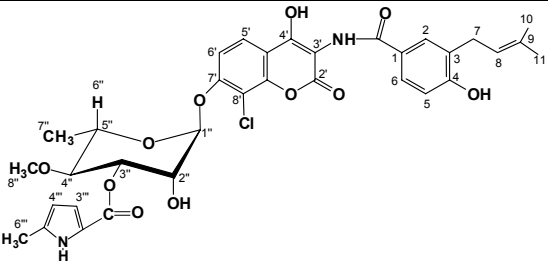
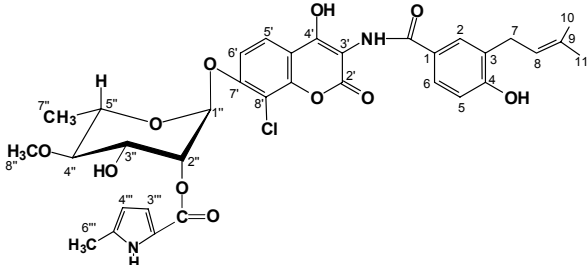


Abbildung III.10: HPLC-Analyse der Sekundärstoffe von A) *S. coelicolor* M512 mit dem *cloU*-Defektcluster. B) *S. coelicolor* M512 mit dem *cloU*-Defektcluster und Plasmid pRHAM. C) *S. coelicolor* M512 mit dem *cloU*-Defektcluster und Plasmid pMPU.

Tabelle III.3: ¹H-NMR-Daten von Novclobiocin 122 und Novclobiocin 123

Substanz	Struktur und ¹ H-NMR-Daten
Novclobiocin 122	 <p>*ppm 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H-7''), 1.69 (s, 3H-10, 3H-11), 2.24 (s, 3H-6''), 3.24 (d, J = 7.2, 2H-7), 3.42 (s, 3H-8''), 3.46 (t, J = 9.6 Hz, H-4''), 3.68 (dq, J₁ = 6.4 Hz, J₂ = 9.6 Hz, H-5''), 4.22 (m, H-2''), 5.31 (dd, J₁ = 3.6 Hz, J₂ = 9.6 Hz, H-3''), 5.35 (t, überlappend mit Lösungsmittelsignal, H-8), 5.70 (br s, H-1''), 5.92 (br s, H-4''), 6.77 (t, J = 2.8 Hz, H-3''), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.27 (d, J = 9.0 Hz, H-6'), 7.68 (br d, J = 8.5 Hz, H-6), 7.71 (br s, H-2), 7.77 (d, J = 9.0 Hz, H-5').</p>
Novclobiocin 123	 <p>*ppm 1.19 (d, J = 6.0 Hz, 3H-7''), 1.68 (s, 3H-10, 3H-11), 2.25 (s, 3H-6''), 3.24 (d, J = 7.6, 2H-7), 3.51 (s, 3H-8''), 3.32 (überlappend mit Lösungsmittelsignal, H-4''), 3.64 (dd, J₁ = 6.4 Hz, J₂ = 9.6 Hz, H-5''), 4.39 (m, H-3''), 5.26 (t, J = 1.6 Hz, H-2''), 5.30 (t, J = 7.6 Hz, H-8), 5.74 (br s, H-1''), 5.93 (br s, H-4''), 6.78 (überlappend mit Signal von H-3'', H-5), 6.78 (t, J = 3.2, H-3''), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, H-6'), 7.63 (br d, J = 8.8 Hz, H-6), 7.67 (br s, H-2), 7.69 (d, überlappend mit Signal von H-2, H-5').</p>

Dieses Experiment lieferte den Beweis, dass die Glykosyltransferase CloM in dem *cloU*-Defektstamm fähig ist, L-Rhamnose von dTDP auf das Aglykon Clorobiocinsäure zu übertragen. Es scheint daher sicher, dass diese Reaktion CloM, der einzigen Glykosyltransferase, die im Clorobiocin-Cluster vorkommt, zuzuschreiben ist. Dennoch kann die Involvement von Glykosyltransferasen des Wirtsstamm *S. coelicolor* M512 nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass diese Enzyme die beobachtete Reaktion katalysieren, denn es ist bekannt, dass die Glykosylierung spezifisch an der 7-OH des Aminocoumarinteils stattfindet und nicht an seiner 4-OH-Gruppe oder an der 4-OH-Gruppe des Benzoateils.

3.3 Heterologe Expression der 4-Ketoreduktase OleU

Das vorhergehende Experiment hatte gezeigt, dass in dem *cloU*-Defektstamm die Bildung von Novclobiocin 122 und 123 durch die Verfügbarkeit von dTDP-L-

Rhamnose limitiert war. Des Weiteren hatte die Komplementierung des *cloU*-Defektstammes mit einem replikativen Plasmid, das *cloU* enthielt, gezeigt, dass die Expression der Desoxyzuckerbiosynthesegene *cloS* und *cloT* (direkt vor *cloU*) und *cloV* und *cloW* (direkt nach *cloU*) durch die *cloU*-Inaktivierung nicht beeinträchtigt war, da die Clorobiocin-Produktion wieder völlig hergestellt war (Freitag *et al.*, 2006). Deshalb lag es nahe, dass in dem *cloU*-Defektstamm die Bildung von dTDP-L-Rhamnose aufgrund der Substratspezifität der 4-Ketoreduktase CloS limitiert war. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde in den *cloU*-Defektstamm das Plasmid pMPU eingebracht, das nur das Gen *oleU* unter der Kontrolle des konstitutiven *ermE*^{*} Promotors enthält. OleU kodiert für eine 4-Ketoreduktase der Oleandomycin-Biosynthese von *S. antibioticus* ATCC 11891, die gezeigt hatte, effizient dTDP-4-Keto-L-Rhamnose zu dTDP-L-Rhamnose zu reduzieren (Rodriguez *et al.*, 2000).

Die HPLC-Analyse des *cloU*-Defektstammes mit dem Plasmid pMPU zeigte eine 8fache Erhöhung der Produktion von Novclobiocin 122 im Vergleich zu dem Stamm ohne das Plasmid (Abbildung III.10C). Dies bewies, dass in dem *cloU*-Defektstamm tatsächlich die 4-Ketoreduktion der limitierende Schritt in der Bildung von dTDP-L-Rhamnose war. Die Komplementierung des *cloU*-Defektstammes mit *cloU* hatte bestätigt, dass der Stamm ausreichend CloS produziert um eine hohe Menge an Clorobiocin zu erreichen. Somit lag die Limitierung der Produktion von L-Rhamnose nicht an der Menge, sondern an der Spezifität von CloS. Anscheinend ist CloS spezifisch für die Reduktion des 5-C methylierten Zuckerderivats verantwortlich und akzeptiert den nicht 5-C-methylierten Zucker nur mit geringer katalytischer Effizienz.

Trotzdem resultierte die Expression von pRHAM in dem *cloU*-Defektstamm mit einer noch höheren Produktion an glykosylierten Verbindungen als die Expression von pMPU. Dies könnte jedoch auf den höheren Expressionslevel von allen Enzymen des L-Rhamnoseweges von diesem Plasmid zurückzuführen sein.

4. Gewinnung neuer Aminocoumarin- Antibiotika von der *cloQ*-Defektmutante des Clorobiocin- Produzenten *S. roseochromogenes* DS12.976

Das Aminocoumarin-Antibiotikum Clorobiocin enthält neben dem Aminocoumarinring und dem Desoxyzucker auch noch einen 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoatteil (DMAHB, Ring A) (Abbildung III.11).

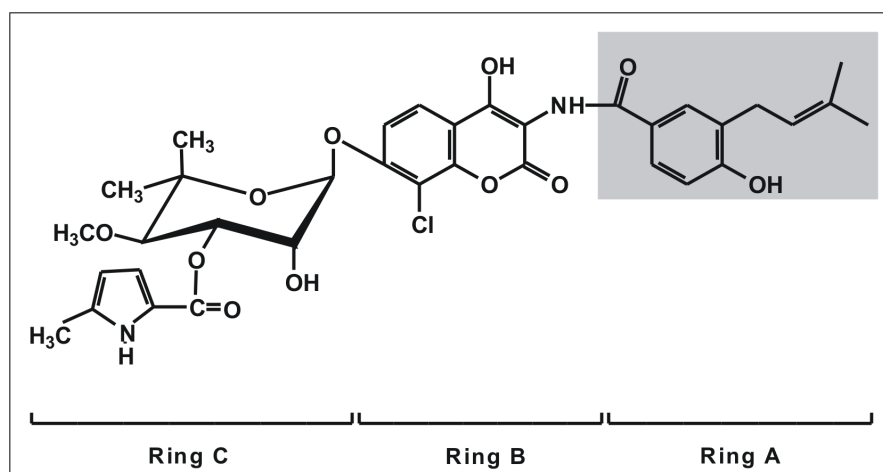


Abbildung III.11: Strukturformel von Clorobiocin mit hervorgehobenen Ring A

Diese prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit ist wichtig für die Aufnahme des Antibiotikums in das Bakterium (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996) und entsteht aus 4-Hydroxyphenylpyruvat und einer Isoprenoidvorstufe unter der Katalyse von CloQ und zwei aufeinanderfolgenden oxidativen Decarboxylierungen unter der Katalyse von CloR (Pojer *et al.*, 2003b; Pojer *et al.*, 2003a) (Abbildung III.12).

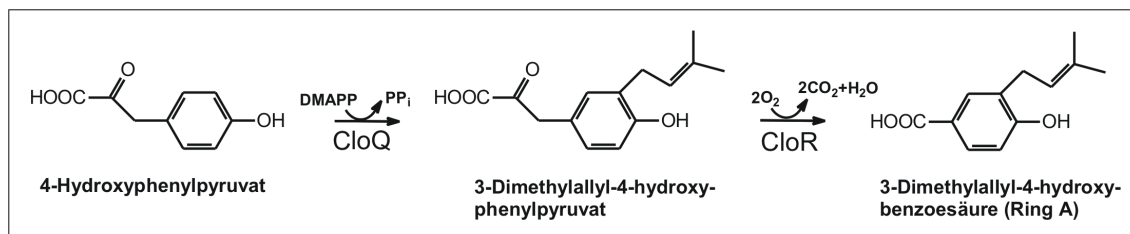


Abbildung III.12: Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure

Eine *cloQ*-Defektmutante von *S. roseochromogenes* DS12.976, die durch eine in frame Deletion innerhalb der codierenden Sequenz von *cloQ* erzeugt worden war, war nicht mehr in der Lage Clorobiocin zu produzieren. Nur durch Ergänzung mit dem

prenylierten 4-Hydroxybenzoatteil konnte die Produktion wieder hergestellt werden (Pojer *et al.*, 2003b). Jedoch zeigte der Kulturextrakt dieser *cloQ*-Defektmutante noch geringe antibakterielle Aktivität. Diese Aktivität ließ sich auf drei Substanzen zurückführen, die von der *cloQ*-Defektmutante noch produziert wurden. Dabei handelte es sich um Vanillobiocin, Isovanillobiocin und Declovanillobiocin.

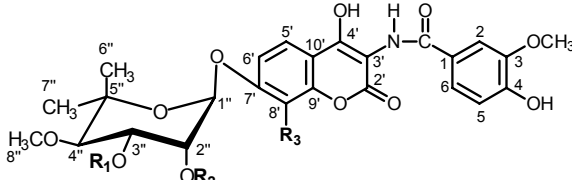
4.1 Isolierung und Strukturaufklärung der Vanillobiocine

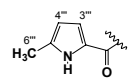
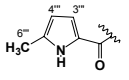
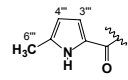
Zur Strukturaufklärung und Testung der biologischen Aktivität dieser neuen Verbindungen wurde die *cloQ*-Defektmutante in Produktionsmedium (s. Kapitel II/6.2.2) kultiviert. Nach Extraktion des Kulturmediums mit Ethylacetat und Aufreinigung des Extraktes per Gelfiltration wurden die Substanzen über eine präparative Säule isoliert. Die Strukturen dieser Verbindungen wurden durch spektroskopische Methoden aufgeklärt. Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten sind in Tabelle III.4 präsentiert. Die neuen Substanzen erhielten die Bezeichnung Vanillobiocin, Isovanillobiocin und Declovanillobiocin.

Das FAB-Massenspektrum von Vanillobiocin zeigte ein negatives Ion von m/z 657 ($[\text{M-H}]^-$) und das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dieser Verbindung war sehr ähnlich zu dem von Clorobiocin. Sie unterschieden sich nur in den Signalen für die Acylkomponente. Dabei wurden im Spektrum von Clorobiocin die Signale für den 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoylteil mit $\delta = 1,74$ (s), 1,75(s), 3,34 (d), 5,35 (t), 6,84 (d), 7,72 (dd) und 7,76 (d) ppm nachgewiesen, während bei Vanillobiocin Signale für einen 3-Methoxy-4-hydroxybenzoylteil (Vanilloylteil) mit $\delta = 3,92$ (s), 6,85 (d), 7,54 (br d) und 7,63 (br s) ppm beobachtet wurden. Somit wurde diese Verbindung als ein Clorobiocin-Analogen identifiziert, das einen Vanilloylteil enthält, der mit der Aminogruppe des 3-Aminocoumarinrings verbunden ist.

Isovanillobiocin wies in der negativen FAB MS-Analyse einen Peak auf, der identisch zu dem von Vanillobiocin war und das gleiche Fragmentierungsmuster mit m/z 623, 376 und 281 hatte. Der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Isovanillobiocin und Vanillobiocin offenbarte, dass die Signale für alle Protonen des Vanilloylteils, für Ring B und Ring C von Vanillobiocin auch im Spektrum von Isovanillobiocin vorhanden waren. Jedoch traten signifikante Unterschiede für die Protonen von 2''-H und 3''-H des Desoxyzuckers auf. Für das Proton 2''-H war eine Verschiebung von 1,06 ppm (von 4,33 ppm in Vanillobiocin zu 5,39 ppm in Isovanillobiocin) und für das Proton 3''-H eine Verschiebung von 1,27 ppm (von 5,71 ppm in Vanillobiocin zu 4,44 ppm in Isovanillobiocin) zu verzeichnen. Diese Änderungen ließen sich aber durch die Bindung der Pyrroleinheit an die 2''-Hydroxylgruppe anstatt der 3''-Hydroxylgruppe des Desoxyzuckers erklären. Ähnliche Aminocoumarin-Antibiotika mit einem Acylteil an 2''-OH anstelle von 3''-OH wurden früher schon beschrieben (Crow *et al.*, 1999; Westrich *et al.*, 2003).

Tabelle III.4: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von Clorobiocin, Vanillobiocin, Isovanillobiocin und Declovanillobiocin. Die Spektren wurden durch Messung bei 250 und 400 MHz erhalten.



	R₁	R₂	R₃
Vanillobiocin		H	Cl
Isovanillobiocin	H		Cl
Declovanillobiocin		H	H

Position	Clorobiocin	Vanillobiocin	Isovanillobiocin	Declovanillobiocin
	δ , Multiplizität (<i>J</i> / Hz)	δ , Multiplizität (<i>J</i> / Hz)	δ , Multiplizität (<i>J</i> / Hz)	δ , Multiplizität (<i>J</i> / Hz)
2-H	7.76, d (2.5)	7.63, br s	7.63, br s	7.62, br s
5-H	6.84, d (8.4)	6.85, d (7.9)	6.85, d (7.3)	6.87, d (7.9)
6-H	7.72, dd (8.4; 2.5)	7.54, d (7.9)	7.55, d (7.3)	7.55, d (7.9)
7-H ₂	3.34, d (7.1)	-	-	-
ArOCH ₃	-	3.92, s	3.92, s	3.93, s
8-H	5.35, br ^a t (7.1)	-	-	-
9-H ₂	-	-	-	-
10-H ₃	1.74, s	-	-	-
11-H ₃	1.75, s	-	-	-
5''-H	7.90, d (9.2)	7.90, d (8.0)	7.90, d (9.1)	7.93, d (9.1)
6''-H	7.33, d (9.2)	7.22, d (8.0)	7.21, d (9.1)	7.04 ^b
8''-H	-	-	-	7.04 ^{b'}
1''-H	5.73, d (1.8)	5.69, br s	5.78, s	5.62, s
2''-H	4.34, t (2.7)	4.33, br s	5.39, br s	4.23, br s
3''-H	5.71, dd (10.3; 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	3.72, d (10.3)	3.71, d (10.1)	3.55, d (9.9)	3.70, d (7.4)
6''-H ₃	1.18, s	1.20, s	1.18, s	1.20, s
7''-H ₃	1.35, s	1.35, s	1.37, s	1.37, s
8''-OCH ₃	3.52, s	3.51, s	3.64, s	3.51, s
3'''-H	6.90, d (3.6)	6.90, d (3.5)	6.89, d (3.7)	6.90, d (3.6)
4'''-H	5.94, br d (3.6)	5.94, d (3.5)	5.95, d (3.4)	5.94, d (3.5)
6'''-H ₃	2.29, s	2.29, s	2.30, s	2.29, s

Chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. ^abr = breites Signal. ^bKomplex, überlappendes Signal, *J* nicht bestimmbar.

Das negative FAB-Massenspektrum für Declovanillobiocin zeigte ein negatives Ion von *m/z* 623 ([M-H]⁻). Dies waren 34 Da weniger als das von Vanillobiocin und Isovanillobiocin und stimmte mit dem Verlust eines Chloratoms überein. Auch das

typische Isotopenmuster für Substanzen mit Chloratom wurde nicht bei Declovanillobiocin beobachtet. Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung zeigte signifikante Änderungen für die Protonen des Aminocoumarinteils im Vergleich zu Vanillobiocin bzw. Isovanillobiocin. Es wurden Signale für drei Protonen mit $\delta = 7,04$ (2H) und 7,93 (1H) ppm beobachtet. Ähnliche Signale wurden schon bei Aminocoumarinderivaten mit Verlust der Substitution an Position 8 des Aminocoumarinringes erfasst (Eustáquio *et al.*, 2003a; Sasaki *et al.*, 2001). Deshalb unterschied sich Declovanillobiocin, vom Vanillobiocin bzw. Isovanillobiocin nur durch das Fehlen des Chloratoms an Position 8 des Aminocoumarinrings.

4.2 Antibakterielle Aktivität der Vanillobiocine gegenüber *Bacillus subtilis*

Vanillobiocin und seine Derivate wurden auch auf ihre wachstumshemmende Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* ATCC 14893 in einem Agar-Diffusionsassay getestet. Abbildung III.13 zeigt die Ergebnisse der antibakteriellen Aktivitäten, die durch Auswertung der erzielten Hemmhofdurchmesser quantifiziert und relativ zu Clorobiocin ausgedrückt wurden.

Bezeichnung	Menge [nmol]	relative Aktivität [%]	Bezeichnung	Menge [nmol]	relative Aktivität [%]
Novobiocin		300	Vanillobiocin		3-6
Clorobiocin		100	Isovanillobiocin		3-6
			Declovanillobiocin		1.5-3

Abbildung III.13: Antibakterielle Aktivität von Novobiocin, Clorobiocin, Vanillobiocin und seinen Derivaten gegenüber *Bacillus subtilis*. Die relativen Aktivitäten der Substanzen wurden durch Vergleich der Hemmhofdurchmesser mit dem Clorobiocin- Hemmhofdurchmesser ermittelt. Dabei wurde die Aktivität von Clorobiocin gleich 100% gesetzt.

Declovanillobiocin wies die geringste Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* auf. Dies bestätigte die Mitwirkung des Chloratom an der antibakteriellen Aktivität und wurde auch schon in früheren Studien beobachtet (Eustáquio *et al.*, 2003a). Dagegen waren die Aktivitäten von Vanillobiocin und Isovanillobiocin ähnlich zueinander. Dies würde bedeuten, dass die Position des Pyrrol-2-carboxylteils an 2''-OH oder 3''-OH des Desoxyzuckers keinen großen Einfluß auf die antibiotische Wirkung hätte. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Studien (Freitag *et al.*, 2005a) und zu Wirkungsuntersuchungen in Abhängigkeit der Position der Carbamoylgruppe im Novobiocin (Hinman *et al.*, 1957). Vanillobiocin war deutlich weniger aktiv als

Clorobiocin. Dies zeigt somit die Bedeutung des Dimethylallylteils für die biologische Aktivität (Lafitte *et al.*, 2002).

4.3 Untersuchungen der *cloR*⁻Mutante auf die Anwesenheit von Vanillobiocin

Die Biosynthese des prenylierten 4-Hydroxybenzoatteils wird durch CloQ und CloR katalysiert. Deshalb wurde auch die *cloR*-Defektmutante auf die Produktion von Vanillobiocin und seinen Derivaten untersucht. Die *cloR*-Defektmutante war, wie die *cloQ*-Defektmutante, nicht mehr in der Lage Clorobiocin zu produzieren. Erst die Zufütterung von prenylierter 4-Hydroxybenzoesäure führte wieder zur Produktion von Clorobiocin (Pojer *et al.*, 2002).

Die HPLC-Analyse des Kulturextraktes der *cloR*-Defektmutante zeigte jedoch keine Akkumulation von Vanillobiocin und seinen Derivaten (HPLC-Daten nicht gezeigt).

5. Untersuchungen zur Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbon-säure im Coumermycin A₁

Das Aminocoumarin-Antibiotikum Coumermycin A₁ enthält im Vergleich zu Clorobiocin eine zentrale und zwei terminale Pyrroleinheiten (Abbildung III.14). Während die Synthese der terminalen Pyrroleinheiten (Garneau *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002) und dessen Transfer auf die Desoxyzuckerteile (Xu *et al.*, 2003) und anschließende Modifizierung (Westrich *et al.*, 2003) durch die Gene *couN1-couN7* bewerkstelligt wird, ist die Bildung der zentralen Pyrroleinheit, der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbon-säure, noch unklar.

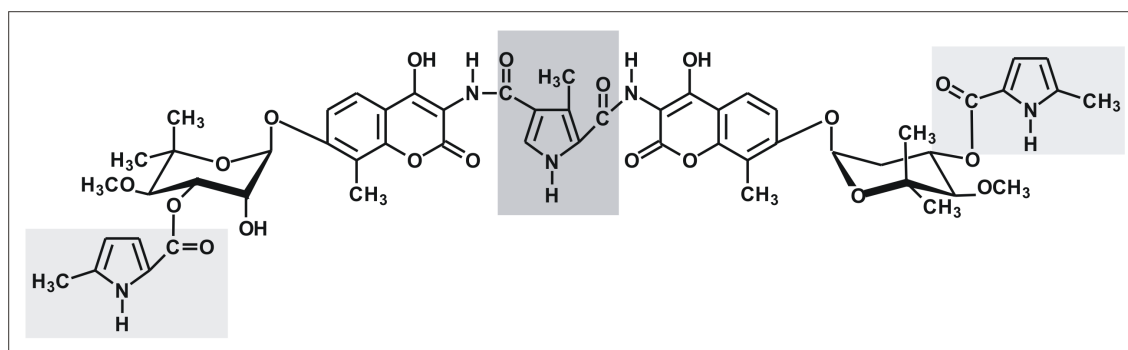


Abbildung III.14: Coumermycin A₁-Struktur mit zentraler und den zwei terminalen Pyrroleinheiten

Ein Vergleich der Biosynthesegencluster der drei Aminocoumarine zeigte, dass Coumermycin A₁ noch sechs zusätzliche Gene, *couR1-couR6*, aufweist, die möglicherweise an der Bildung der zentralen Pyrroleinheit beteiligt sind. Datenbankvergleiche offenbarten, dass CouR5 Ähnlichkeit zu prokaryotischen Multidrug-Resistenz-Proteinen hat und typische Motive für Transmembran-Proteine aufweist. Die Expression des Gens in *S. lividans* führte zur Resistenz des Stammes gegenüber Novobiocin und Coumermycin A₁ (Schmutz *et al.*, 2003a). CouR6 weist Homologie zu Regulatorgenen auf. Somit sind diese beiden Genen wahrscheinlich nicht an der Synthese der zentralen Pyrroleinheit beteiligt. CouR1 und CouR3 zeigen keine Homologie zu bekannten Proteinen. CouR2 weist Ähnlichkeiten zu Decarboxylasen auf und CouR4 besitzt Homologien zu Dehydrogenasen. Inaktivierung von *couR2* in *S. rishiriensis* führte zu Mutanten, die immer noch in der Lage waren, Coumermycin A₁ zu produzieren (Brügel, 2003). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass entweder die Biosynthese der zentralen Pyrroleinheit nur durch die Katalyse der Genprodukte von *couR1*, *couR3* und *couR4* bewerkstelligt wird oder dass die Funktion von *couR2* in den Mutanten von einem Enzym aus dem Primärstoffwechsel übernommen wurde.

Um zu beweisen, dass die vier Gene *couR1-4* (oder eventuell nur die Gene *couR1*, *couR3* und *couR4*) für die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure verantwortlich sind, sollten die Gene zunächst in dem Thiostrepton-sensitiven Stamm *S. coelicolor* Yu105 überexprimiert werden und die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure per HPLC nachgewiesen werden.

5.1 Überexpression der Gene *couR1-couR4*

5.1.1 Gewinnung des Expressionskonstruktes

Für die Klonierung der Gene *couR1-4* in den Expressionsvektor pHGF7505 wurde der Genbereich in drei Abschnitte unterteilt (Abbildung III.15). Zwei dieser Genabschnitte wurde mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare *couR1-f/couR1-r* und *couR4-f/couR4-r* amplifiziert (s. Kapitel II/7.6.1), während das dritte Fragment durch Restriktionsverdau mit *BamHI/XhoI* aus dem Plasmid pZW10 gewonnen wurde. Alle drei Fragmente wurden nacheinander in den Klonierungsvektor pGEM 7Zf(-) eingebracht. Das dabei erhaltene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pAF06. Anschließend erfolgte die Umklonierung des 4,7 kb großen *couR1-couR4*-Fragmentes in den Vektor pHGF7505, wodurch die vier Gene unter die Kontrolle des *actIII*-Promotors gelangten, der wiederum durch den *actIII-orf4*-Regulator kontrolliert wird. Das erhaltenen Konstrukt wurde als pAF07 bezeichnet. Der 6,2 kb große Promotor-*couR1-4*-Genabschnitt wurde dann in drei verschiedene *E. coli-Streptomyceten*-Shuttle-Vektoren (pWHM3, pHGF7604 und pHGF7669) aufgrund ihrer unterschiedlichen *Streptomyceten*-Replikons kloniert. pWHM3 enthält ein *Streptomyceten*-Replikon von dem Plasmid pIJ101 aus *S. lividans* ISP5434, während die beiden anderen Vektoren ein Replikon vom Plasmid SCP2 aus *S. coelicolor* A3(2) beinhalten. Die erhaltenen Konstrukte wurden mit pAF08, pAF09 und pAF10 bezeichnet (Abbildung III.15).

Anschließend wurden sowohl die Leervektoren pWHM3, pHGF7604 und pHGF7669 als auch die Konstrukte pAF08, pAF09 und pAF10 durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* Yu105 eingebracht (s. Kapitel II/ 7.9.2). Die erhaltenen Mutanten wurden durch ihre Thiostrepton-Resistenz (außer bei pHGF7669 Apramycinresistenz) selektiert. Die Anwesenheit der Konstrukte in den Mutanten wurde durch deren Reisolierung und anschließenden Restriktionsverdau überprüft (nicht gezeigt).

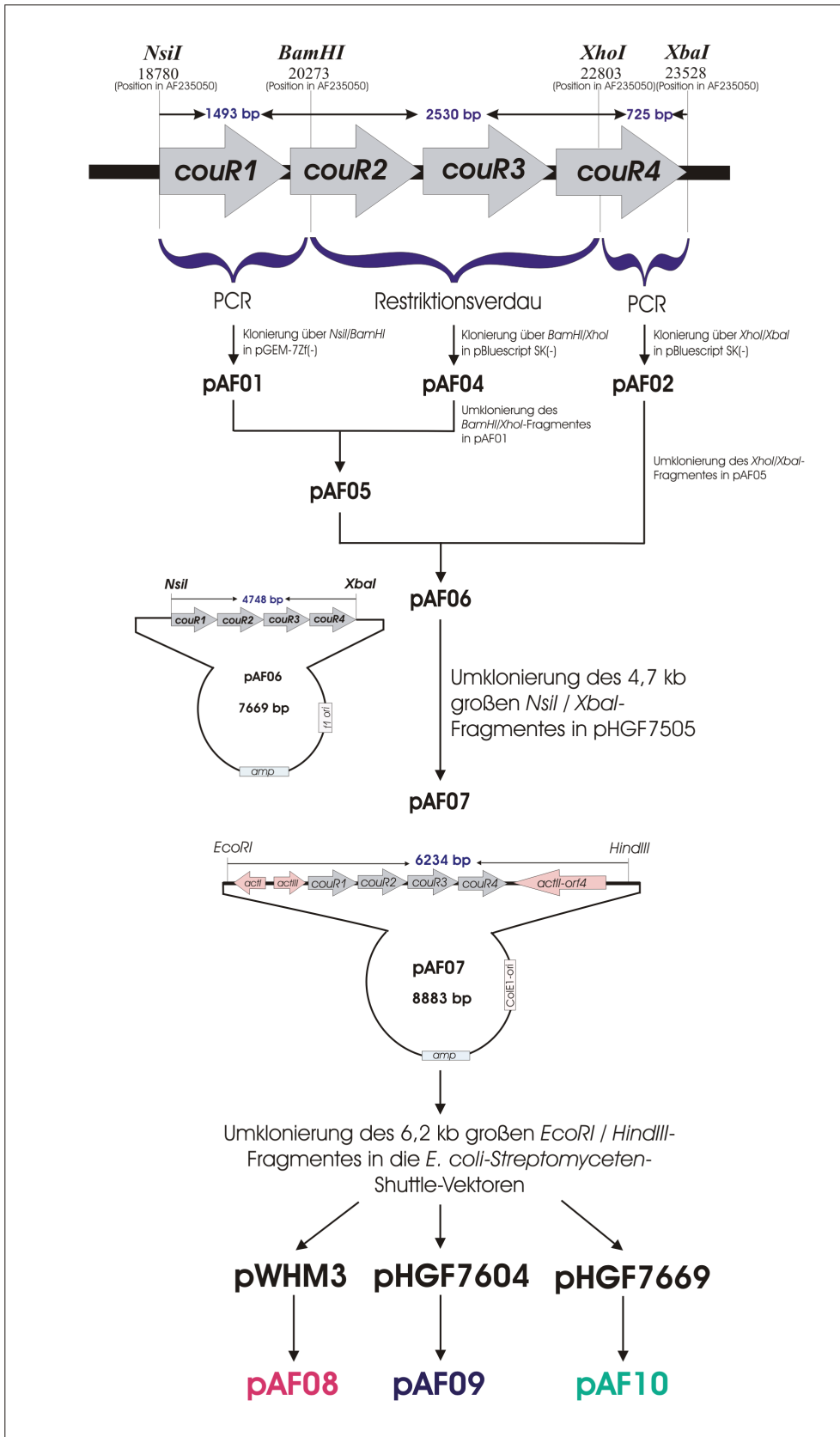


Abbildung III.15: Schematische Darstellung der Gewinnung der *couR1-4*-Expressionskonstrukte, *amp* = Ampicillinresistenzgen, *ori* = Replikationsstartpunkt, *actI*, *actIII* = Promotorgene, *actIII-orf4* = Regulatorgen, *NsiI*, *BamHI*, *XhoI*, *XbaI*, *EcoRI* und *HindIII* = Restriktionsschnittstellen

5.1.2 Charakterisierung der Sekundärstoffproduktion

Für die Analyse der Sekundärstoffmetabolite wurden die verschiedenen *S. coelicolor* Yu105-Mutanten in Produktionsmedium, wie unter Kapitel II/6.2.2 beschrieben, kultiviert. Die Ethylacetatextrakte dieser Kulturen wurden durch HPLC analysiert.

Dabei zeigte die HPLC-Analyse keine Unterschiede zwischen den Mutanten *S. coelicolor* Yu105 mit Leervektoren in Bezug zu den Mutanten *S. coelicolor* Yu105 mit den entsprechenden Konstrukten pAF08, pAF09 und pAF10 (HPLC-Daten nicht gezeigt). Die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen, die Kultivierungskinetiken, Veränderungen des Kulturmediums und Optimierung der HPLC-Analyse beinhalteten, führten zum gleichen Ergebnis wie zuvor beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen konnte sein, dass die Expression der vier Gene unter den gewählten Bedingungen, wie z.B. der verwendete *Streptomyces*-Stamm, nicht möglich ist. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vier Gene möglicherweise an der Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure nicht beteiligt sind oder zumindest nicht für die Bildung dieser Substanz ausreichen. Um dennoch einen Funktionsnachweis der Gene aufzuzeigen, wurden die Gene im Wildtypstamm *S. rishiriensis* inaktiviert und die Sekundärstoffproduktion der erhaltenen Mutante untersucht.

5.2 Inaktivierung der Gene *couR1-couR4*

Für die *couR1-couR4*-Inaktivierung wurden die Gene durch die Apramycin-resistenzkassette *aac(3)IV/oriT* im Cosmid 5A-46, das einen Teil des Coumermycin A₁-Cluster beginnend von *couI* bis mindestens *gyrB^R* enthält, ersetzt. Dafür wurde die Resistenzkassette aus dem Plasmid pIJ773 mittels PCR unter Verwendung von Primern, die 39 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor *couR1* und nach *couR4* waren, amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Ersetzung von *couR1-couR4* im Cosmid 5A-46 verwendet. Das erhaltene Cosmid erhielt die Bezeichnung cou-AF1.

Das modifizierte Cosmid wurde anschließend durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. rishiriensis* eingebracht (s. Kapitel II/7.9.2). Die Mutanten, die durch homologe Rekombination entstanden, wurden anhand ihrer Apramycinresistenz selektiert. Die schematische Darstellung der Inaktivierung ist in Abbildung III.16A präsentiert. Zehn unabhängige double cross-over Mutanten wurden durch Southern Blot Analyse auf ihren identischen Genotyp hin untersucht. In Abbildung III.16B sind die Ergebnisse vier dieser Mutanten dargestellt. Die Ersetzung der Gene *couR1-4* durch die Apramycinresistenzkassette in diesen Mutanten wurde durch die Abwesenheit der 3,9 kb *XhoI*-Bande und der Präsenz der 2,1 kb und 3,5 kb *XhoI*-Banden nachgewiesen.

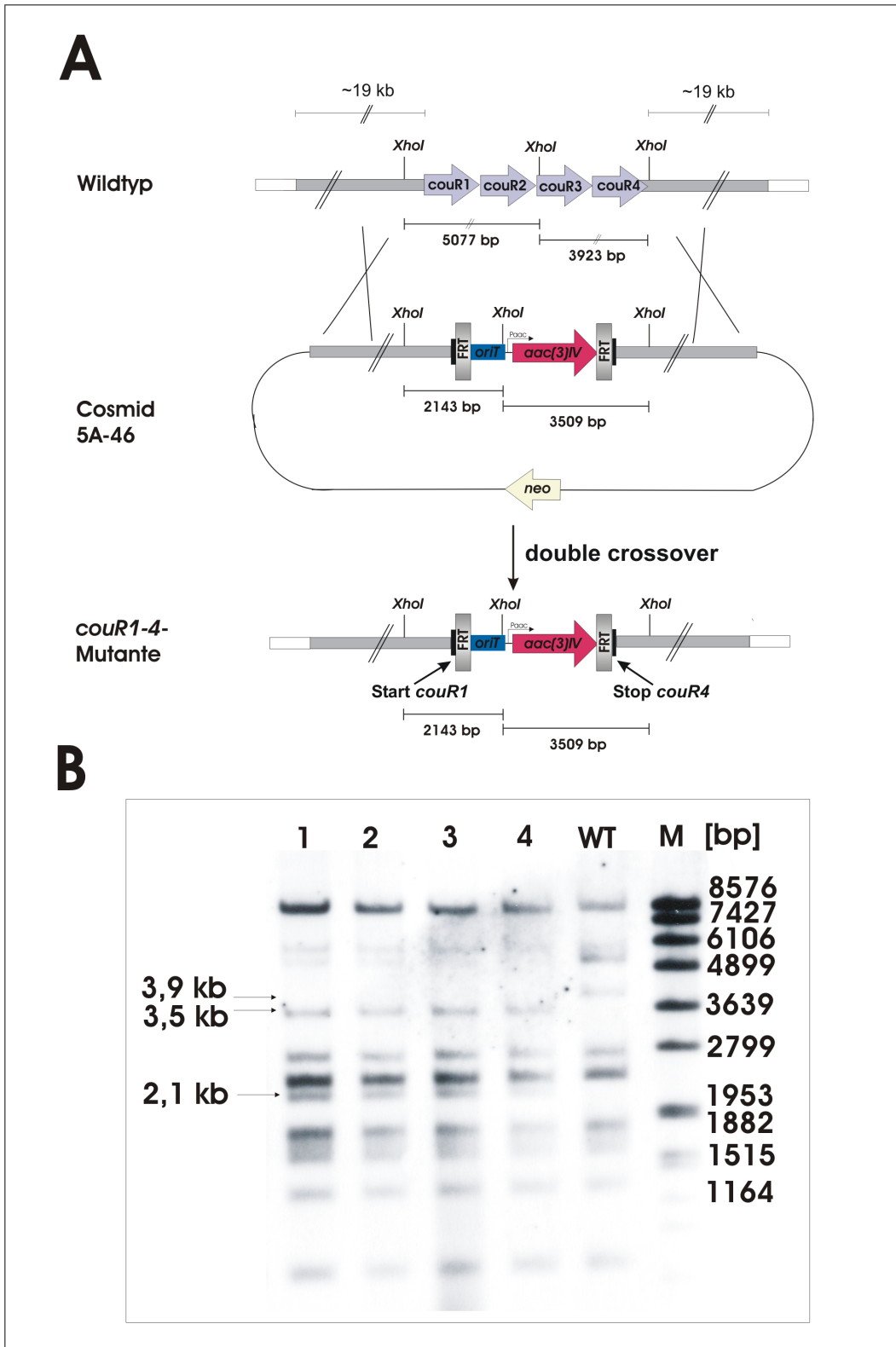


Abbildung III.16: A) Schematische Präsentation des Inaktivierungsexperimentes der Gene *couR1-4*, *aac(3)IV* = Apramycinresistenzgen, Paac = Promotor des Apramycinresistenzgens, FRT = FLP Erkennungsziel, *oriT* = Origin des Transfers von RK2, *neo* = Kanamycinresistenzgen. B) Southern Blot Analyse vom Wildtyp und den *couR1-4*-Mutanten. Genomische DNA wurde mit *XhoI* geschnitten. M = DIG labeled DNA Molecular Weight Marker VII (Roche), WT = *S. rishiriensis* Wildtyp, 1-4 = *couR1-4*-Mutanten (Stämme *S. r. (couR1-4)* 30, *S. r. (couR1-4)* 34, *S. r. (couR1-4)* 39 und *S. r. (couR1-4)* 48)

5.3 Analyse der Sekundärstoffproduktion der *couR1-4*-Mutanten

Für die Analyse der Sekundärstoffproduktion wurde der Wildtyp *S. rishiriensis* und zehn *couR1-4*-Mutanten in Produktionsmedium, wie unter Kapitel II/6.2.2 beschrieben, kultiviert. Anschließend wurden die Ethylacetatextrakte der Kulturen per HPLC analysiert.

Der Wildtyp *S. rishiriensis* produzierte Coumermycin A₁ (0,3 µg/ml) (Abbildung III.17A). Bei den *couR1-4*-Mutanten konnte keine Produktion des Antibiotikums nachgewiesen werden (Abbildung III.17B).

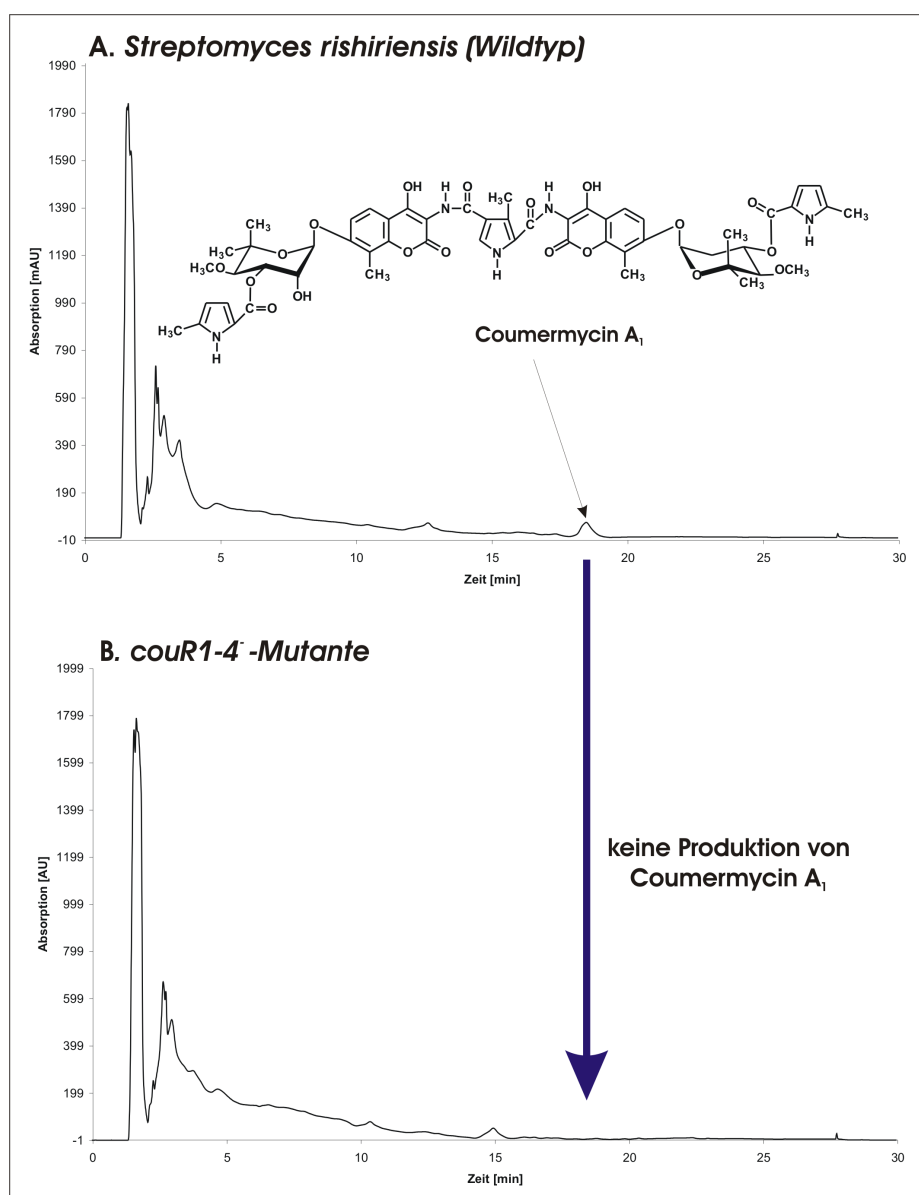


Abbildung III.17: HPLC-Analyse der Sekundärstoffe. A) *S. rishiriensis* (Wildtyp). B) *couR1-4*-Mutante

5.4 Fütterungsversuche von 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, Ring A und Ring A-Analoga an die *couR1-4*-Mutanten

Um nun zu beweisen, dass die fehlende Coumermycin A₁-Produktion in den *couR1-4*-Defektmutanten auf die Abwesenheit der zentralen Pyrroleinheit und somit auf die Inaktivierung der Gene *couR1-4* zurückzuführen ist, wurde den *couR1-4*-Defektmutanten ein synthetisch hergestelltes Pyrrol-Analogon, die 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, zugefüttert (Abbildung III.18).

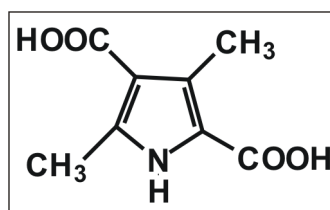


Abbildung III.18: Struktur von 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Dafür wurden die *couR1-4*-Defektmutanten in Produktionsmedium (s. Kapitel II/6.2.2) kultiviert. Die Zufütterung der Substanz (1 mg Substanz / Kolben) erfolgte sowohl direkt bei Inokulation des Produktionsmedium mit Vorkultur der Defektmutanten als auch 24 h danach.

Jedoch zeigte die HPLC-Analyse der Ethylacetatextrakte dieser Kulturen keine Wiederherstellung der Produktion an Coumermycin A₁ (Abbildung III.19).

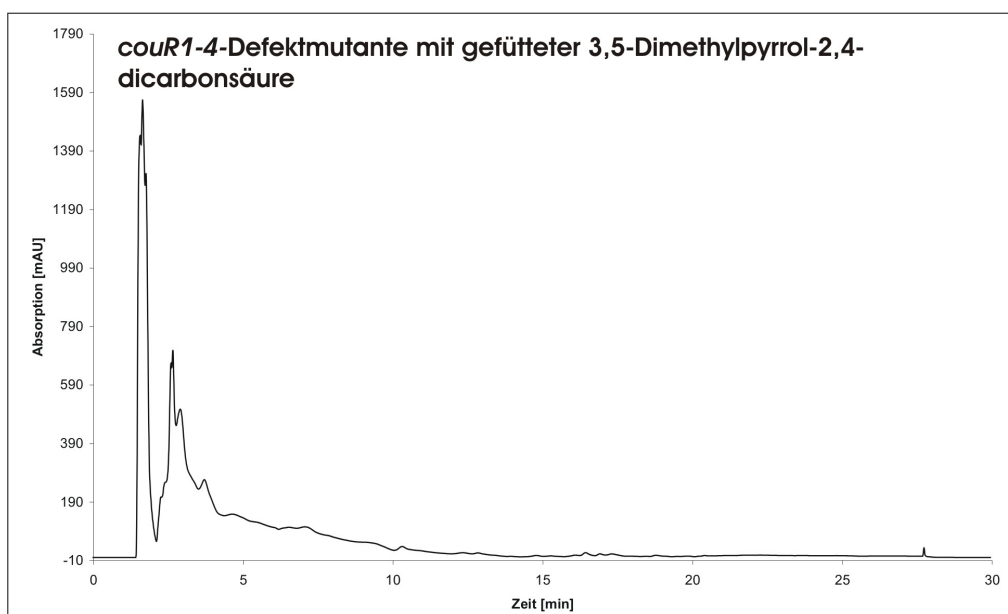


Abbildung III.19: HPLC-Analyse des Ethylacetatextraktes einer *couR1-4*-Defektmutante nach Zufütterung mit 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen könnten sein, dass die *couRI-4*-Mutanten entweder nicht in der Lage sind diese Substanz aufzunehmen oder dass sie relativ schnell von dem Bakterienstamm metabolisiert wird und somit nicht bei der Synthese des Coumermycin A₁ eingebaut werden kann. In den Ethylacetatextrakten der Mutanten wurde die zugefütterte Pyrroleinheit nicht nachgewiesen.

Des Weiteren wurde versucht, die Bildung der restlichen Strukturkomponenten des Coumermycin A₁, wie den Aminocoumarinring mit Desoxyzucker, in den *couRI-4*-Defektmutanten nachzuweisen. Dafür wurden die Mutanten mit Ring A (3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure) und zwei weiteren Ring A-Analoga (3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure und 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure), die in früheren Untersuchungen sehr gut von der Amidsynthetase CouL (Galm *et al.*, 2004a), die die Verknüpfung zwischen Ring A und dem Aminocoumarinring bewerkstelligt, gefüttert (Abbildung III.20).

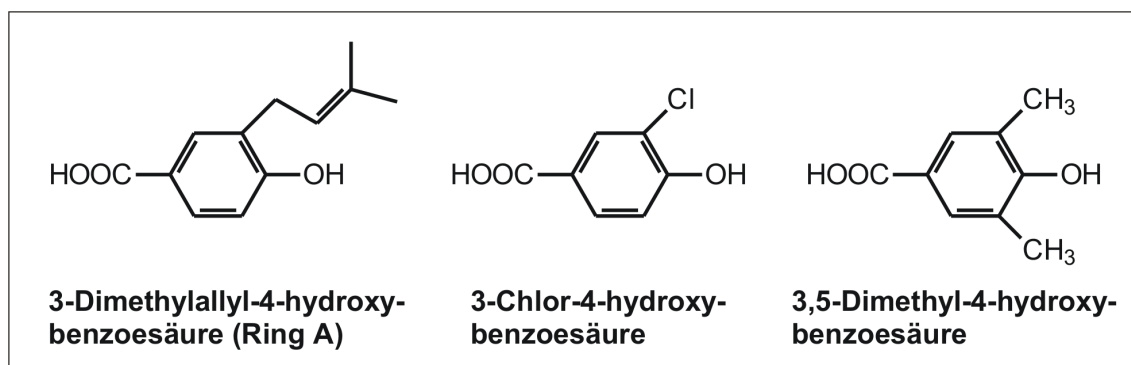


Abbildung III.20: Struktur von Ring A und den Ring A-Analoga

Sind die *couRI-4*-Defektmutanten noch in der Lage die restlichen Strukturelemente des Coumermycin A₁ zu bilden, so würde die Verknüpfung mit Ring A zu Novclobiocin 102 führen (Eustáquio *et al.*, 2003a), während die Verknüpfung mit 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure zu Novclobiocin 271 (Galm *et al.*, 2004a) und mit 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure zur Bildung eines neuen Novclobiocins führen würde. Die Mutanten wurden wie zuvor in Produktionsmedium kultiviert (s. Kapitel II/6.2.2). Die Zufütterung (1 mg Substanz / Kolben) erfolgte direkt bei Inokulation des Produktionsmedium mit Vorkulturmedium der *couRI-4*-Defektmutanten.

Untersuchungen der Ethylacetatextrakte der Kulturen per HPLC konnten jedoch keine Produktion der erwarteten Novclobiocine aufzeigen (HPLC-Daten nicht gezeigt).

Somit konnte auch mit der Inaktivierung der Gene *couRI-4* im Wildtypstamm *S. rishiriensis* kein eindeutiger Funktionsnachweis der Gene erbracht werden und letztendlich auch die Involvierung der Gene in der Biosynthese der zentralen Pyrroleinheit des Coumermycin A₁ nicht nachgewiesen werden.

IV Diskussion

1. CloN1 / CloN7 und ihre Beteiligung am Transfer der Pyrrol-2-carbonsäure auf den Desoxyzucker von Novclobiocin 104

1.1 Inaktivierung der Gene *cloN1* und *cloN7*

Die Inaktivierung der Gene *cloN1* und *cloN7* erfolgte im Cosmid clo-BG1 unter Anwendung der PCR-Targeting Methode. Die anschließende heterologe Expression der modifizierten Cosmide (clo-AF6 und clo-AF3) in *S. coelicolor* M512 führte zu Mutanten, die die gleichen Sekundärmetabolite, Novclobiocin 104 und die Pyrrol-2-carbonsäure, akkumulierten. Dieses Ergebnis zeigt, dass weder *cloN1* noch *cloN7* eine essentielle Rolle in der Synthese von Novclobiocin 104 spielen. Dieses schließt den Acyltransferprozeß in der Aminocoumarinringbildung (Chen und Walsh, 2001) und die Bildung der Amidbindung zwischen dem Aminocoumarinring und der substituierten Benzoessäure (Steffensky *et al.*, 2000a) mit ein. Des weiteren offenbart das Vorhandensein der Pyrrol-2-carbonsäure, dass sowohl *cloN1* als auch *cloN7* für die Biosynthese des Pyrrol-2-carboxylteils nicht erforderlich sind. Dies entspricht auch den Daten aus *in vitro* Studien, die zeigten, dass CloN3, CloN4 und CloN5 für die Umwandlung von L-Prolin zu Pyrrol-2-carboxyl-*S*-CloN5 ausreichen (Garneau *et al.*, 2005).

Somit waren die *cloN1*- und *cloN7*-Defektmutanten nicht mehr in der Lage den Pyrrol-2-carboxylteil auf die 3''-OH-Gruppe von Novclobiocin 104 zu übertragen, während der Wildtyp durch diese Verknüpfungsreaktion Novclobiocin 109 (5''-Desmethylchlorobiocin) produziert, das anschließend durch CloN6 an Position 5 der Pyrroleinheit methyliert wird und infolgedessen Clorobiocin ergibt (Westrich *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003).

Die Inaktivierung von *cloN2* (Xu *et al.*, 2003) hatte ebenfalls zur Akkumulation von Pyrrol-2-carbonsäure und Novclobiocin 104 geführt. Daraus kann man schlussfolgern, dass jeder dieser drei Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7* für den Acyltransferprozeß, d.h. dem Transfer des Pyrrol-2-carboxylteils vom Acylcarrierprotein CloN5 auf den Desoxyzuckerteil von Novclobiocin 104, notwendig ist.

1.2 Möglicher Mechanismus des Acyltransfers

Aufgrund der Sequenzanalysen der drei Gene und den Inaktivierungsergebnissen kann man einen möglichen Mechanismus des Acyltransfers vorhersagen. CloN1 zeigt die typische Struktur von einem Acylcarrierprotein (ACP). Nach 4'-Phosphopantetheinylierung der Asp44-Ser45-Leu46-Cofaktorbindungsseite könnte es mit dem Pyrrol-2-carboxylteil vom Pyrrol-2-carboxyl-*S*-CloN5 acyliert werden. Der Transfer dieses Acylteils von CloN5 auf CloN1 könnte durch die Katalyse von CloN2 bewerkstelligt werden, da CloN2 Sequenzähnlichkeiten zu vielen Acyl-ACP-Synthasen aufweist. Eine Ähnlichkeit besteht zu DpsC von *S. peuceticus*, einem Enzym, das gezeigt hatte, den Transfer eines Propionylteils von Propionyl-*S*-CoA auf den 4'-Phosphopantetheinyl-Cofaktor eines Acylcarrierproteins zu katalysieren (Bao *et al.*, 1999). Diese Reaktion ist ähnlich zu der, die für CloN2 postuliert wird. CloN7 gehört zu der großen und weit verbreiteten Familie der α/β -Hydrolasen. Diese Familie schließt aber auch die Thioesterasen mit ein, die in die Biosynthese von Peptid- und Polyketid-Antibiotika involviert sind. Diese Thioesterasen transferieren Acylteile von dem 4'-PP-Cofaktor der Acylcarrierproteine entweder auf Wasser und erhalten somit die freie Säure oder auf Hydroxy- oder Aminogruppen, wodurch Ester, Lactone, Amide oder Lactame entstehen. Dementsprechend könnte also CloN7 den Pyrrol-2-carboxylteil von dem 4'-PP-Cofaktor des CloN1 auf die 3''-OH-Gruppe des Novclobiocins 104 übertragen. Eine schematische Darstellung dieses Transfers ist in Abbildung IV.1 wiedergegeben.

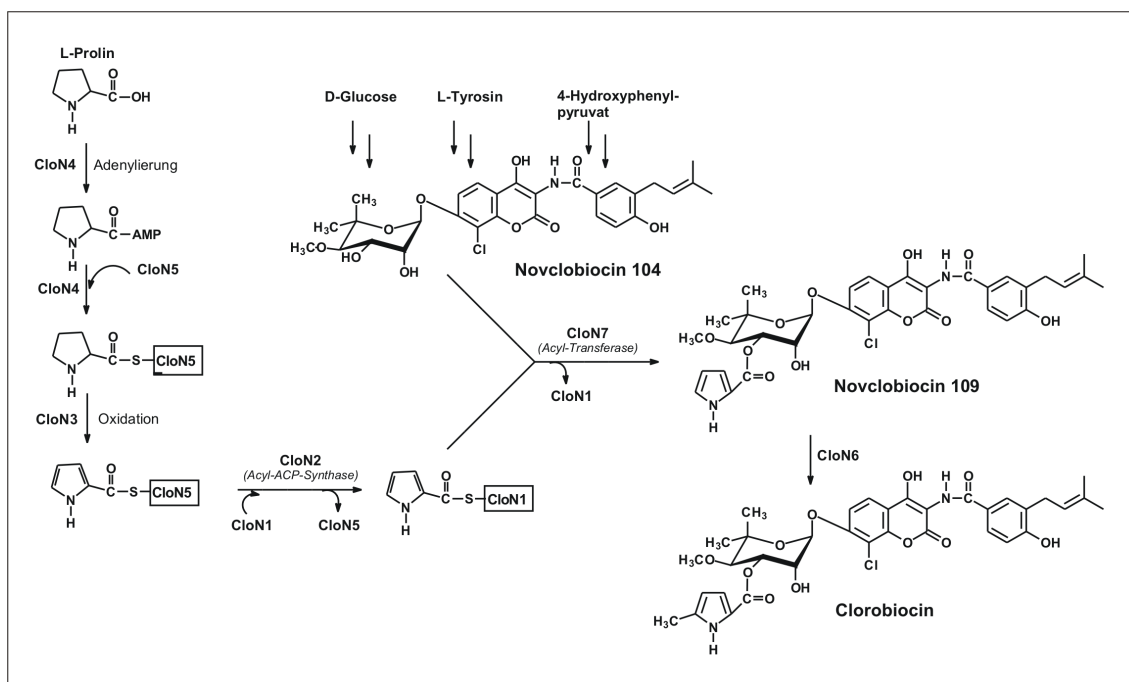


Abbildung IV.1: Schematische Darstellung der letzten Schritte der Clorobiocin-Biosynthese und die möglichen Rollen von CloN1, CloN2 und CloN7

Übereinstimmend mit diesem hypothetischen Ablauf sind auch die orthologen Gene *cloN1* und *cloN7* in dem Biosynthesegencluster von Coumermycin A₁ (*couN1* und *couN7*) zu finden. Dieses Antibiotikum enthält ebenfalls einen Pyrrol-2-carboxylteil, der mit dem Desoxyzuckerteil verknüpft ist. Novobiocin besitzt keinen Pyrrol-2-carboxylteil und dementsprechend sind auch keine ähnlichen Gene zu *cloN1* und *cloN7* in dessen Biosynthesegencluster anzutreffen.

Der formulierte Reaktionsmechanismus des Acyltransfers ist spekulativ, aber trotzdem konnte durch die Inaktivierung der Gene gezeigt werden, dass für den Transfer des Pyrrol-2-carboxylteils vom Acylcarrierprotein CloN5 auf Novclobiocin 104 die beiden putativen Transferasen CloN2 und CloN7, sowie das putative Acylcarrierprotein CloN1 erforderlich sind. Unklar bleibt, warum für diese Reaktion zwei Acylcarrierproteine notwendig sind. Man könnte vermuten, dass der vollständige CloN3/CloN4/CloN5 Weg für die Pyrrol-2-carbonsäurebiosynthese, die in der Pyoluteorin-Biosynthese in *Pseudomonas fluorescens* und in der Undecylprodigiosin-Biosynthese in *S. coelicolor* durch ein ähnliches Drei-Enzym-System katalysiert ist (Thomas *et al.*, 2002), von dem Vorfahren des Clorobiocinproduzenten in Form des *cloN3/cloN4/cloN5*-Genfragmentes erworben worden sein kann. Die drei Enzyme, die durch das Fragment codiert werden, könnten dann mit einem existierenden ACP/Acyl-ACP-Synthase/Thioesterase-System, das durch die Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7* codiert wird, interagieren und somit zu Clorobiocin führen.

Um den tatsächlichen biochemischen Ablauf des Acyltransfers zu zeigen, müsste man 4'-PP-CloN1, CloN2, CloN3, CloN4, 4'-PP-CloN5 und CloN7 aktiv exprimieren, reinigen und in einem geeigneten Assay testen. Versuche zur Überexpression der Enzyme CloN1, CloN2 und CloN7 als Hexahistidin-Fusionsproteine führten nur zum Erhalt des CloN2-Proteins, das jedoch nicht aufgereinigt werden konnte. Somit erwies sich schon die Gewinnung der aktiven Enzyme als eine Hürde, um den Reaktionsablauf aus biochemischer Sicht zu präsentieren.

Des Weiteren ist durch die *cloN1/cloN7*-Inaktivierung gezeigt worden, dass die Methylierung an Position 5 des Pyrrol-2-carboxylteils, die durch CloN6 bewerkstelligt wird (Westrich *et al.*, 2003), erst nach dem Transfer des Pyrrolteils auf Novclobiocin 104 stattfindet. Dementsprechend akkumulierten die *cloN1*- und *cloN7*-Defektmutanten nur Pyrrol-2-carbonsäure. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde eine *cloN6*-Defektmutante gefunden, die Novclobiocin 109 (= 5''-Desmethylclorobiocin) als Hauptprodukt produziert (Westrich *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass die *cloN1*-, *cloN2*- und *cloN7*-Defektmutanten Novclobiocin 104 akkumulieren, in welchem die 4-Hydroxygruppe des Desoxyzuckers methyliert ist, bestätigt frühere Schlussfolgerungen, dass die 4''-O-Methylierung vor der 3''-O-Acylierung in der Clorobiocin-Biosynthese abläuft (Freitag *et al.*, 2005a).

2. CloU, eine ungewöhnliche C-Methyltransferase aus der Desoxyzucker-Biosynthese des Clorobiocins

2.1 Identifizierung von *cloU* als Gen für die C-Methyltransferase

Zum Funktionsnachweis von *cloU* wurde das Gen im Cosmid clo-BG1 mittels PCR-Targeting Methode inaktiviert. Heterologe Expression des modifizierten Cosmids in *S. coelicolor* M512 führte zur Bildung von Novclorobiocin 122 und 123 (Abbildung IV.2). Kennzeichnendes Merkmal diese beiden Clorobiocin-Analoga ist, dass ihr Desoxyzuckerteil eine substituierte L-Rhamnose-Struktur aufweist, die sich klar durch die charakteristischen Kopplungen der Desoxyzucker-Protonen widerspiegelt. Außerdem stimmten die NMR-Daten dieser Verbindungen mit denen bereits veröffentlichter anderer L-Rhamnosiden überein (Igarashi *et al.*, 2005; Ströch, 2003) und stehen gleichzeitig in Kontrast zu denen von 6-Desoxy-D-gulosiden (Patroni und Stick, 1987). Somit führte die *cloU*-Inaktivierung zu einem Verlust der axialen Methylgruppe an Position 5 des Desoxyzuckerteils von Clorobiocin und zeigt gleichzeitig die Funktion von *cloU* als C-Methyltransferase in der Biosynthese des Antibiotikums auf. Die gleichen Funktionen kann man auch CouU aus dem Coumermycin A₁-Cluster von *S. rishiriensis* (Wang *et al.*, 2000) und NovU aus dem Novobiocin-Cluster von *S. spheroides* (Steffensky *et al.*, 2000b), aufgrund der sehr hohen Homologie von CloU zu diesen Enzymen (88-90% auf Aminosäureebene), zuordnen.

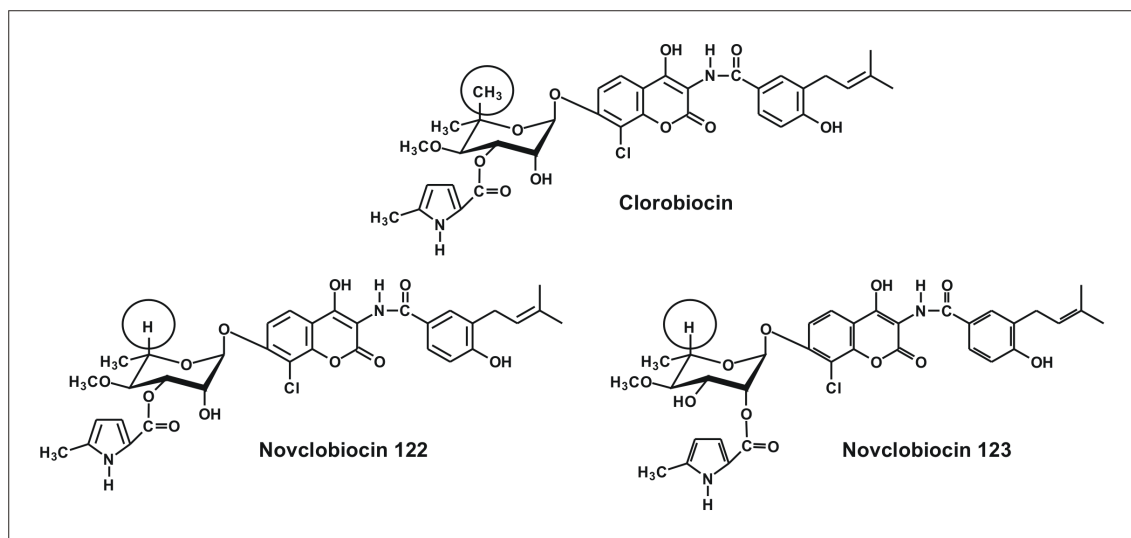


Abbildung IV.2: Strukturen von Clorobiocin, Novclorobiocin 122 und Novclorobiocin 123

CloU und seine zwei Homologen sind die ersten 5-C-Methyltransferasen, die in der Biosynthese von verzweigten Zuckern identifiziert wurden. Es sind viele verschiedene

Enzyme bekannt, die in der Lage sind eine 3-C-Methylierung von Desoxyzuckern zu katalysieren. Dazu zählen z.B. TylC3 (He und Liu, 2002), EryBIII (Lombo *et al.*, 2004) und AviG1 (Weitnauer *et al.*, 2002). Jedoch die 5-C-Methyltransferase CloU und seine Homologen fügen nun eine einzigartige und neue Funktion zu den vorhandenen bekannten Desoxyzucker-Biosynthesegenen hinzu, die auf eine kombinatorischen Art und Weise für die Erzeugung einer größeren Vielfalt an aktivierten Desoxyzuckern zusammengesetzt sein können (Lombo *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2002; Salas und Mendez, 2005).

2.2 Produktionsausbeute von Novclobiocin 122 und 123

Die *cloU*-Inaktivierung führte zwar zu neuen Clorobiocin-Derivaten, aber die Ausbeute an diesen Verbindungen war sehr gering. So produzierte der *cloU*-Defektstamm nur 1,5 mg/l Novclobiocin 122 und 0,4 mg/l Novclobiocin 123. Bei der Überexpression des intakten Clorobiocin-Clusters in *S. coelicolor* M512 wurde der Hauptteil der Aminocoumarine in Form von glykosylierten Verbindungen produziert, während in dem *cloU*-Defektstamm 97% der Aminocoumarine hauptsächlich in Form von Aglyka und nur 2,3% in glykosylierter Form vorlagen. Dies deutet darauf hin, dass entweder die Desoxyzucker-Biosynthese oder der Glykosyltransfer als ein Ergebnis der *cloU*-Inaktivierung beeinträchtigt worden sind. Die Möglichkeit, dass die Inaktivierung die Transkription oder Translation der nachfolgenden Gene von *cloU*, also *cloV* und *cloW*, reduziert hatte, konnte durch ein Komplementationsexperiment des *cloU*-Defektstammes mit einem *cloU*-Expressionsplasmids, das die Produktion der glykosylierten Verbindungen zum Originallevel wiederherstellte, widerlegt werden. Aufgrund einiger Studien zufolge, die berichteten, dass dTDP-L-Rhamnose ein schwaches Substrat für die Glykosyltransferase NovM ist (Albermann *et al.*, 2003; Freil Meyers *et al.*, 2003), könnte eine plausible Erklärung für die geringe Ausbeute an Novclobiocin 122 und 123 in dem *cloU*-Defektstamm sein, dass die Glykosyltransferase CloM den modifizierten Desoxyzucker mit deutlich geringerer katalytischer Effizienz transferiert als das natürliche Substrat. Die tatsächliche Ursache der geringen Produktion der neuen Novclobiocine war jedoch nicht die Transferreaktion, die durch die Glykosyltransferase CloM katalysiert wird, sondern lag an der Substratspezifität der 4-Ketoreduktase CloS.

2.3 Biologische Aktivität der neuen Novclobiocine

Novclobiocin 122 und 123 repräsentieren zwei neue Clorobiocin-Analoga. Untersuchungen ihrer antibakteriellen Aktivität in einem Agar-Diffusionsassay gegenüber *Bacillus subtilis* ATCC 14893 zeigten, dass Novclobiocin 122 nur 20% der

Aktivität von Clorobiocin aufweist. Dies bedeutet, dass die hydrophoben Kontakte zwischen der 5,5-*gem*-Dimethylgruppe des Desoxyzuckers und der Gyrase zu der Bindung des Antibiotikums an sein Target beitragen (Maxwell, 1999). Die Verschiebung des 5-Methylpyrrol-2-carboxylteils von Position 3 zu Position 2 des Desoxyzuckers führt zu einer weiteren Reduzierung der Aktivität. Diese Beobachtungen wurden schon in anderen Studien verzeichnet (Li und Heide, 2005).

2.4 CloW, eine 3,5-Epimerase in der Desoxyzucker-Biosynthese

Die Bildung der Clorobiocin-Derivate, deren Desoxyzuckerteil substituierte L-Rhamnose-Struktur aufwies, zeigte gleichzeitig, dass das Intermediat dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose in der Biosynthese des Desoxyzuckerteils der Aminocoumarin-Antibiotika einer Epimerisierung sowohl an C-3 als auch an C-5 unterliegt. Dabei scheint es sehr wahrscheinlich, dass die Epimerase CloW diese beiden Epimerisierungen katalysiert. CloW und seine Homologen NovW und CouW zeigen Sequenzähnlichkeiten zu (d)NDP-4-keto-6-desoxyglucose-epimerasen. Diese schließen z.B. die Di-Epimerase RmlC, welche die Epimerisierung an Position 3 und 5 in der Biosynthese von L-Rhamnose in *E. coli* bewerkstelligt (Giraud *et al.*, 2000), sowie die Monoepimerase WbcA, die die Epimerisierung nur an Position 3 in der Biosynthese von 6-Desoxy-D-Gulose während der Bildung des O-Antigen von *Yersinia enterocolitidis* durchführt (Trefzer *et al.*, 1999), mit ein.

Die kürzliche Aufklärung der Struktur von NovW hatte gezeigt, dass eine Tyrosinseitenkette im aktiven Zentrum anders orientiert war als in RmlC (Jakimowicz *et al.*, 2006), aber Ähnlichkeiten zu der in der 5-Epimerase EvaD der Chloroeremomycin-Biosynthese aufwies. Das natürliche Substrat von EvaD ist ein Zucker, der eine Amino- und eine Methylgruppe an Position 3 enthält, und deshalb nur an Position 5 leicht epimerisiert werden kann. Jedoch bei der Inkubation von EvaD mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose, dem natürlichen Substrat von NovW und CloW, wurde eine schnelle Epimerisierung an C-5, aber auch eine langsame Epimerisierung an C-3 beobachtet (Merkel *et al.*, 2004). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass EvaD *in vivo* als 5-Monoepimerase tätig ist, aber auch eine 3,5-Doppelepimerisierung eines geeigneten Substrates *in vitro* katalysieren kann. Von der Struktur des NovW ausgehend, stellten Jakimowicz und Kollegen (2006) die Frage, ob NovW eine Funktion als 3-Monoepimerase haben kann (Jakimowicz *et al.*, 2006). Diese Frage wurde durch die Ergebnisse von Tello *et al.* (2006) beantwortet (Tello *et al.*, 2006). In ihren Untersuchungen wurde NovW zunächst mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose und der 4-Ketoreduktase RmlD, die in die Biosynthese von dTDP-Rhamnose in *E. coli* involviert ist, inkubiert. Dabei fand sie anhand des gemessenen NADPH-Verbrauchs nur geringe katalytische Effizienz von NovW. In einem zweiten Experiment wurde NovW in deuteriertem Wasser mit dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose in einer Gleichgewichtsreaktion inkubiert und der Einbau des Deuteriums an Position 3 und 5 des Substrates

gemessen. Da der Einbau an Position 3 beträchtlich schneller war als an Position 5, schloss sie daraus, dass NovW *in vitro* eine chemisch kompetente dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose-3,5-epimerase ist, aber kinetisch gesehen, es sich nur um eine 3-Epimerase handelt. Es sollte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der sehr langsame Deuterium-Einbau an Position 5 der dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose auf einen sequenziellen Mechanismus der enzymatischen Reaktion, in welchem die 3-Epimerisierung der 5-Epimerisierung vorangeht, zurückzuführen ist. Über ein Beispiel von solch einem sequentiellen Mechanismus einer 3,5-Epimerase wurde vor kurzem berichtet (Wolucka und Van Montagu, 2003).

Die Ergebnisse der *cloU*-Inaktivierung zeigen zumindest, dass die Epimerase CloW als eine 3,5-Doppelepimerase der dTDP-4-Keto-6-desoxyglucose *in vivo* tätig sein muss. Dieser Befund steht auch im Einklang mit den berichteten natürlichen Vorkommen eines L-Rhamnosid-Analogons des Novobiocins (Sasaki *et al.*, 2001), das beweist, dass die 3,5-Epimerisierung in dem Novobiocin-Produzenten vorkommt.

3. Ursachenfindung und Behebung der geringen Produktion an Novclobiocin 122 und 123 in dem *cloU*-Defektstamm durch metabolisches Engineering

Die Menge des erwarteten Glykosids Novclobiocin 122 könnte durch die Spezifität der Enzyme, die nach der *cloU*-Reaktion im Biosyntheseweg auftreten, limitiert sein. Untersuchungen des *cloU*-Defektstamms mit den Plasmidkonstrukten pRHAM und pMPU zeigten, dass die Spezifität der dTDP-4-Ketoreduktase CloS der prinzipiell limitierende Faktor für die Glykosidbildung in dem *cloU*-Defektstamm war (Abbildung IV.3). Das Einbringen einer heterologen 4-Ketoreduktase mit passender Spezifität (OleU) erhöhte die Menge an glykosylierten Produkten um das 8fache. Das Einbringen eines kompletten heterologen Weges, um dTDP-Desoxyhexose zu erhalten, erhöhte die Menge sogar um das 26fache und erreichte einen ähnlichen Produktionslevel für die neue Verbindung Novclobiocin 122 (30 mg/l) wie für Clorobiocin in Stämmen mit intaktem Clorobiocin-Cluster (35 mg/l). Im Vergleich zu Stämmen, die das intakte Clorobiocin-Cluster enthalten (Eustáquio *et al.*, 2005a), produzierte der *cloU*-Defektstamm mit Plasmid pRHAM aber noch 38% der Aminocoumarine in Form von Aglyka. Dies zeigt, dass die Glykosyltransferase CloM weniger effizient im Transfer des modifizierten Desoxyzuckers, L-Rhamnose, ist als bei dem natürlichen Zucker (5-Methyl-L-rhamnose) auf das Aglykon. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass CloM die Hauptmenge der Aminocoumarine in dem *cloU*-Defektstamm glykosylieren kann, sobald das unnatürliche Substrat, dTDP-L-Rhamnose, in ausreichender Menge verfügbar war. Dies ist ein überraschender Gegensatz zu den Daten, die von den *in vitro* Studien der Glykosyltransferase NovM des sehr ähnlichen Novobiocin-Biosynthesegenclusters, berichtet worden waren (Albermann *et al.*, 2003; Freel Meyers *et al.*,

2003). NovM, dass auf Aminosäureebene 84% Identität zu CloM aufweist, hatte mindestens 10.000fach niedrigere katalytische Effizienz mit dTDP-L-Rhamnose gezeigt, als mit seinem natürlichen Substrat (Freel Meyers *et al.*, 2003). Im Vergleich zu diesen *in vitro* Beobachtungen wurde aber auch über das natürliche Vorkommen eines L-rhamnosylierten Novclobiocins in einem *Streptomyces*-Stamm berichtet (Sasaki *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass in dem Novobiocin-Produzenten der L-Rhamnosyltransfer auf das Aminocoumarin-Aglykon durchaus möglich ist.

Die Komplementierung des *cloU*-Defektstammes mit pMPU zeigen, dass die 4-Ketoreduktase CloS spezifisch für das 5-C-methylierte Intermediat ist und den nicht 5-C-methylierten Zucker mit viel geringerer Effizienz akzeptiert. Diese Spezifität von CloS kann im evolutionären Verlauf nützlich sein: Clorobiocin ist biologisch fünffach mehr aktiv als die nicht methylierte Verbindung Novclobiocin 122. Wenn CloS das nicht methylierte Substrat akzeptieren würde, könnte ein Teil der Desoxyzucker-Intermediate der Methylierung durch CloU entgehen und somit zur Bildung des weniger aktiven Novclobiocins 122 führen. Dies wiederum würde eine Verschwendung von metabolischen Mitteln bedeuten. Ein sehr ähnlicher Fall für eine evolutionär nützliche Spezifität kann für die Glykosyltransferase CloM gemacht werden: die Halogenierung des Aglykons Novclobiocinsäure 106 zu Clorobiocinsäure war in dem *cloU*-Defektstamm noch nicht vollständig abgeschlossen. Trotzdem führte nach Transformation mit pRHAM die Glykosylierung vorwiegend zur Bildung der chlorierten Verbindungen Novclobiocin 122 und 123. Dies zeigt die Präferenz von CloM für das chlorierte Substrat. Die chlorierten Glykoside sind achtmal mehr antibakteriell aktiv als ihre unsubstituierten Analoga (Eustáquio *et al.*, 2003a; Galm *et al.*, 2004b). Deshalb garantiert die Spezifität von CloM, dass die Biosynthese zur Bildung der meist aktiven Verbindung führt.

Des Weiteren bestätigen die Experimente den Nutzen der 4-Ketoreduktase OleU und des Plasmids pRHAM für das metabolische Engineering der Desoxyzucker-Biosynthese und demonstrieren gleichzeitig, wie wichtig die Verfügbarkeit von Genen für Desoxyzucker-Biosynthesenzyme mit verschiedener Substratspezifität ist, um die Bildung von neuen glykosylierten Produkten durch genetischen Engineering zu fördern.

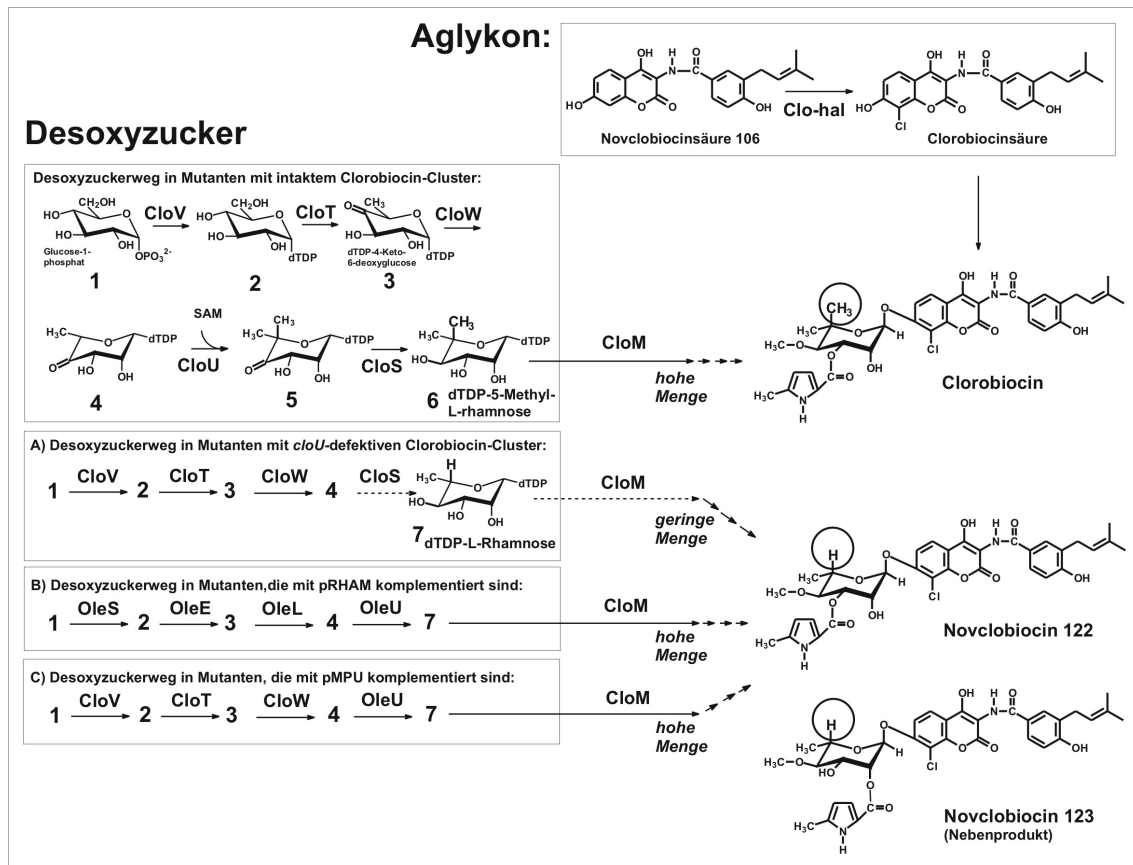


Abbildung IV.3: Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika in den genetisch veränderten *Streptomyces*-Stämmen

In der Clorobiocin-Biosynthese schließen sich der 4-Ketoreduktion (katalysiert durch CloS) und dem Glykosyltransfer (durch CloM) die 4-O-Methylierung und die 3-O-Acylierung des Desoxyzuckerteils und schließlich die C-Methylierung des Pyrrolringes an (Li und Heide, 2004). In dem *cloU*-Defektstamm akzeptieren die Enzyme, die für diese späten Biosynthesereaktionen verantwortlich sind, anscheinend die modifizierten Substrate, denen die 5-Methylgruppe am Desoxyzuckerteil fehlt. Ähnliche Beobachtungen wurden in früheren Experimenten von metabolischem Engineering der Aminocoumarin-Biosynthese gemacht (Li und Heide, 2005). Offenbar ist die Spezifität der biosynthetischen Enzyme in dem enzymatischen Schritt, der unmittelbar einer Einführung eines biologisch wichtigen Strukturelements folgt, besonders hoch. Während die Spezifität in enzymatischen Schritten weiter abwärts im Biosyntheseweg nicht so hoch sein muß.

4. Die Bildung der Vanillobiocine

Der Kulturextrakt einer *cloQ*-Defektmutante des Clorobiocin-Produzenten *S. roseochromogenes* DS 12.976, die in der Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) blockiert war (Pojer *et al.*, 2003b), zeigte noch antibakterielle Wirkung. Weitere Untersuchungen dieses Kulturextraktes offenbarten die Anwesenheit drei neuer Aminocoumarin-Derivate, die einen Vanilloyl-Teil (3-Methoxy-4-hydroxybenzoylteil), der mit der Aminogruppe des Aminocoumarinrings verbunden ist, enthalten. Dabei lag die Menge der Vanillobiocine zusammen über 3 mg/l Kultur. Dies entsprach einer 7fachen Verringerung der Produktion im Vergleich zu Clorobiocin des Wildtypstammes. Der Wildtypstamm selber akkumulierte keine detektierbare Mengen an Vanillobiocinen (per HPLC). Anscheinend ist der Wildtyp in der Lage, sowohl die 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure als auch die Vanillinsäure zu produzieren. Jedoch wird die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure bevorzugt von der Amidsynthetase CloL in das Antibiotikum eingebaut. Dadurch produziert der Wildtyp überwiegend Clorobiocin (Abbildung IV.4) Wenn jedoch die Bildung der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure durch Inaktivierung von *cloQ* blockiert ist, wird die Vanillinsäure, die weiterhin produziert werden kann, in das Antibiotikum eingebaut. Infolgedessen entsteht Vanillobiocin (Abbildung IV.4). Interessant ist, dass eine *cloR*-Defektmutante des Clorobiocin-Produzenten keine Vanillobiocine akkumulierte. Dies könnte bedeuten, dass *cloR* in die Biosynthese der Vanillinsäure dieses Stammes involviert ist.

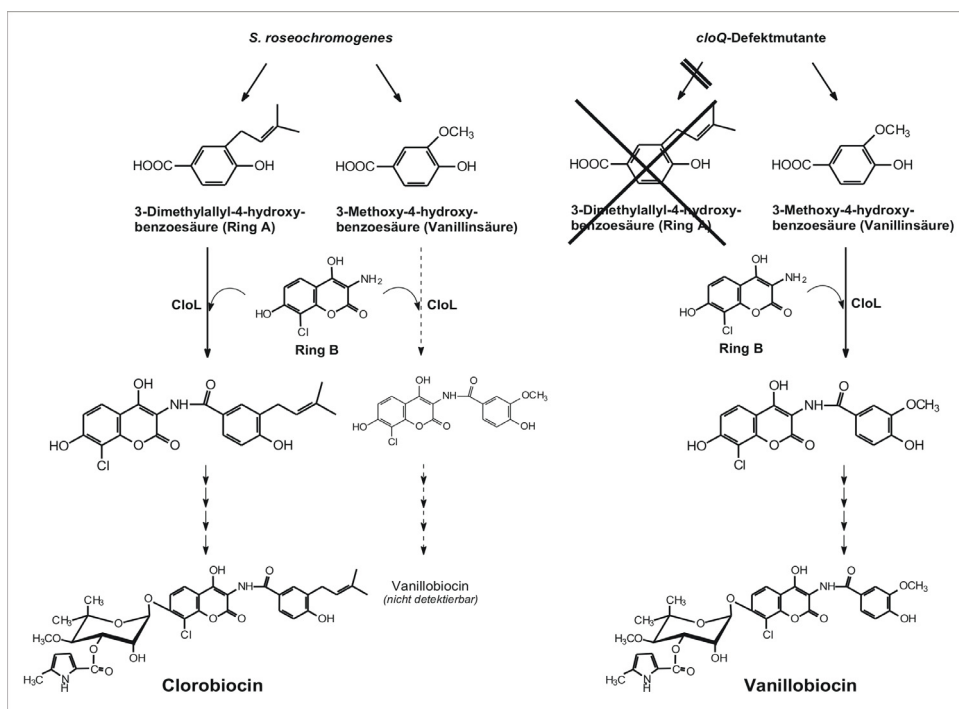


Abbildung IV.4: Schematische Darstellung der Ursache für die Bildung der Vanillobiocine

5 Die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure des Coumermycin A₁

Die Struktur des Coumermycin A₁ enthält neben dem Aminocoumarinring, dem Desoxyzucker und der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure noch eine zentrale Pyrroleinheit, die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure. Novobiocin und Clorobiocin besitzen diese Pyrroleinheit nicht. Dieser strukturelle Unterschied spiegelt sich auch in den Biosynthesegenclustern wieder, in dem das Coumermycin A₁-Cluster sechs zusätzliche Gene *couR1-couR6* aufweist. CouR6 wurde aufgrund von Datenbankvergleichen als putativer Regulator eingestuft. CouR5 zeigt Homologie zu Transportergenen und ist aufgrund von Expressionsexperimenten (Schmutz *et al.*, 2003a) höchstwahrscheinlich am Resistenzmechanismus und Transportvorgängen beteiligt. Somit sind die Gene *couR1-couR4* vermutlich für die Bildung der zentralen Pyrroleinheit verantwortlich. Jedoch zeigte eine Inaktivierung von *couR2* im Wildtypstamm *S. rishiriensis* weiterhin die Akkumulation von Coumermycin A₁ (Brügel, 2003). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die Funktion von *couR2* eventuell von einem Enzym des Primärstoffwechsels übernommen wurde oder dass nur die Gene *couR1*, *couR3* und *couR4* an der Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure beteiligt sind.

Ziel dieser Arbeit war es nun, die mögliche Beteiligung der Gene *couR1-4* an der Synthese der zentralen Pyrroleinheit nachzuweisen.

5.1 *couR1-4* – verantwortlich für die Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure des Coumermycin A₁?

Der Nachweis der Beteiligung der Gene an der Bildung der Pyrroleinheit sollte durch ihre Überexpression in *S. coelicolor* Yu105 erfolgen. Dafür wurden die vier Gene zunächst in den Vektor pHGF7505, der eine *actII-orf4/pactIII-actI*-Kassette enthält, kloniert und anschließend das erhaltene Promotor-Gen-Fragment in drei *E. coli-Streptomyces*-Shuttle-Vektoren umkloniert. Diese *actII-orf4/pactIII-actI*-Promotor-Kassette mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen, die eine Klonierung der Zielgene erlauben, reguliert die transkriptionelle Kontrolle durch einen *pactI* oder *pactIII*-Promotor. Die heterologe Expression der *couR1-4* Gene in *S. coelicolor* Yu105 sollte dann zu einer Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure führen. In einer anderen Studie wurde berichtet, dass die heterologe Expression bestimmter *rif*-Gene aus *Amycolatopsis mediterranei* S699, die an der Bildung der 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure, einem Vorläufer des Rifamycins, beteiligt sind, in *S. coelicolor* Yu105 zu einer signifikanten Produktion an 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure geführt hatte (Yu *et al.*, 2001). Jedoch konnte in unserem Fall die Produktion von 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure nicht nachgewiesen werden. Nun stellte sich die Frage, war die Expression der Gene in diesem Bakterienstamm nicht möglich oder sind die vier Gene vielleicht gar nicht an der Bildung der zentralen Pyrroleinheit beteiligt? Um diese Frage beantworten zu können, wurden die vier Gene im Coumermycin A₁-

Produzenten *S. rishiriensis* inaktiviert. Die dabei erhaltene *couR1-4*-Defektmutante war nicht mehr in der Lage Coumermycin A₁ zu produzieren. Dieses Ergebnis zeigt zwar, dass durch die Inaktivierung die Bildung des Antibiotikums verhindert wird, aber es klärt nicht, welche Funktion den Genen *couR1-4* zuzuordnen ist. Eine Zufütterung des chemisch synthetisierten Pyrrol-Analogons, 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, zu der *couR1-4*-Defektmutante führte nicht zu der eigentlich erwarteten Wiederherstellung der Coumermycin A₁-Produktion. Auch der Bildungsnachweis der restlichen Strukturelemente des Coumermycin A₁, wie z.B. der Aminocoumarinring, konnte durch Zufütterung von Ring A bzw. Ring A-Analoga nicht erzielt werden. Dies deutet darauf hin, dass durch Inaktivierung der vier Gene vielleicht die Transkription oder Translation benachbarter Gene beeinträchtigt worden ist. Dies wiederum könnte durch ein Komplementationsexperiment der *couR1-4*-Defektmutante mit einem *couR1-4*-Expressionsplasmids widerlegt werden. Natürlich kann auch die geringe Aufnahmemöglichkeit der zugefütterten Substanzen in die Defektmutante eine Ursache für die zuvor beschriebenen Ergebnisse sein. Des weiteren könnte man spekulieren, dass die Defektmutante nach Zufütterung der verschiedenen Substanzen zwar die erwarteten Produkte bildet, diese jedoch aufgrund zu geringer Mengen nicht detektierbar waren. Denn wie in Kapitel III./5.4 gezeigt, produzierte der Wildtypstamm *S. rishiriensis* selbst nur sehr wenig Coumermycin A₁. Daher sollte man versuchen, dass Coumermycin A₁-Cluster in *S. coelicolor* M512, einem gut manipulierbaren Bakterienstamm, heterolog zu exprimieren, um zunächst eine höhere Coumermycin A₁ Ausbeute zu erhalten. Anschließend könnte man den Inaktivierungsversuch von *couR1-4* und die Zufütterungsversuche in dieses Stamm nochmals durchführen.

Somit konnte die tatsächliche Beteiligung der Gene *couR1-couR4* an der Bildung der zentralen Pyrroleinheit durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht nachgewiesen werden.

V Zusammenfassung

Die Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ sind Hemmstoffe der bakteriellen DNA-Gyrase. Ihre therapeutische Anwendung blieb jedoch durch ihre schlechte Wasserlöslichkeit, die geringe Aktivität gegenüber gram-negativen Bakterien und ihre relativ hohe Toxizität in Eukaryonten eingeschränkt. Für die Gewinnung neuer strukturell modifizierter Aminocoumarin-Antibiotika durch genetische Manipulation benötigt man genaue Informationen über die Biosynthese dieser Antibiotika. Die Biosynthesegencluster dieser drei Antibiotika sind bereits kloniert, sequenziert und die Funktion vieler Gene aufgeklärt. Dennoch bedarf es immer noch weiteren gezielten Untersuchungen, um die Biosynthese vollständig zu verstehen.

Clorobiocin enthält einen Pyrrol-2-carboxylteil, der über eine Esterbindung mit dem Desoxyzucker verbunden ist. Dieser Pyrrolteil ist wichtig für die Bindung des Antibiotikums an sein biologisches Target, die DNA-Gyrase. Die Gene, die an der Biosynthese der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Einheit beteiligt sind sowie die für die Übertragung der Acylkomponente auf den Desoxyzucker verantwortlich sind, konnten bereits durch Geninaktivierung, Expression und biochemische Untersuchungen identifiziert werden. Dabei handelt es sich um *cloN2*, *cloN3*, *cloN4*, *cloN5* und *cloN6*. Im Cluster von Clorobiocin treten aber noch zwei weitere Gene *cloN1* und *cloN7* auf, die zu dieser Gengruppe gehören. Ein Ziel dieser Arbeit war die Funktion dieser beiden Gene durch Geninaktivierung aufzuklären.

Die Inaktivierung von *cloN1* bzw. *cloN7* wurde in einem Cosmid, das das komplette Clorobiocin-Cluster enthält, mittels λ -RED-vermittelter Rekombination in *Escherichia coli* erzielt. Anschließende Integration der modifizierten Cosmide in das *S. coelicolor* M512 Genom und deren heterologe Expression führte in beiden Fällen zur Akkumulation von Novclobiocin 104, einem Clorobiocin-Derivat ohne Pyrroleinheit am Desoxyzucker, und der freien Pyrrol-2-carbonsäure. Dies zeigte, dass CloN1 und CloN7 zusammen mit dem schon untersuchten CloN2 in den Transfer der Pyrroleinheit auf den Desoxyzucker von Clorobiocin involviert sind. Ein möglicher Ablauf dieses Prozesses konnte vorgeschlagen werden.

Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A₁ enthalten als gemeinsames Strukturelement einen ungewöhnlichen Desoxyzucker mit einer 5,5-Dimethylstruktur. Die Biosynthese dieses Desoxyzuckers beinhaltet eine C-Methylierungsreaktion, die in anderen Desoxyzucker-Biosynthesewegen noch nicht beschrieben worden ist. Deshalb war eine weiteres Ziel dieser Arbeit diesen Methylierungsschritt näher zu charakterisieren. Die Inaktivierung des putativen C-Methyltransferasegens *cloU* im

Clorobiocin-Cluster führte zu einem Verlust der axialen Methylgruppe an Position 5 des Desoxyzuckers. Somit konnte die Funktion von *cloU* als C-Methyltransferase nachgewiesen werden. Gleichzeitig beweist es aber auch, dass die Biosynthese des Desoxyzuckerteils von Clorobiocin über eine 3,5-Epimerisierung des dTDP-4-Keto-6-Desoxyglucose-Intermediats verläuft.

Die Inaktivierung von *cloU* erfolgte in einem Cosmid, das das gesamte Clorobiocin-Cluster enthielt. Expression des modifizierten Clusters in dem heterologen Stamm *S. coelicolor* M512 führte zur Produktion von Novclorobiocin 122 und seinem Isomer Novclorobiocin 123, zwei Clorobiocin-Derivate deren Desoxyzuckerteil eine substituierte L-Rhamnosestruktur aufweist. Der Vergleich der antibakteriellen Aktivität von Clorobiocin und den beiden Novclorobiocinen zeigte, dass die Methylgruppe an C-5 des Desoxyzuckers eine essentielle Rolle für die biologische Aktivität spielt.

Die *cloU*-Defektmutante akkumulierte die Aminocoumarine jedoch vorwiegend in Form der Aglyka und nur geringe Mengen in Form der Glykoside. So war eine weitere Aufgabe, die Ursache für diese geringe Glykosylierungseffizienz zu finden. Eine heterologe Expression von einem Teil des Elloramycin-Biosynthesegenclustern in der *cloU*-Defektmutante zeigte, dass die Synthese der dTDP-L-Rhamnose der wichtigste Faktor für die Aminocoumaringlykosidbildung war, und nicht wie vorher erwartet der Glykosyltransfer. Um nun diese Limitation zu beheben, wurden Genkonstrukte, die verschiedene Desoxyzuckerbiosynthesegene enthielten, in die *cloU*-Defektmutante eingebracht. Das Plasmid pRHAM, welches die Gene *oleL*, *oleS*, *oleE* und *oleU* vom Oleandomycin-Cluster enthält und zusammen dTDP-L-Rhamnose bilden, führte zu einer 26-fachen Produktionssteigerung der glykosylierten Aminocoumarine. Eine Expression der 4-Ketoreduktase *OleU* alleine resultierte mit einer 8-fachen Produktionssteigerung. Somit konnte gezeigt werden, dass die 4-Ketoreduktase *CloS* eine hohe Spezifität für C-5-methylierte Intermediate aufweist. Außerdem verdeutlichen diese Experimente, dass man durch Überexpression von heterologen Desoxyzucker-Biosynthesegenen mit geeigneter Spezifität, höhere Mengen der erwarteten glykosylierten Verbindungen erzielen kann. Dabei ist vor allem die Verfügbarkeit der verschiedenen Desoxyzucker-Biosynthesegene für die Bildung von neuen glykosylierten Verbindungen durch genetisches Engineering wichtig.

Des Weiteren konnten die drei neuen Antibiotika Vanillobiocin, Isovanillobiocin und Declovanillobiocin aus dem Kulturmedium einer *cloQ*-Defektmutante von *S. roseochromogenes* DS12.976, die in der Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure des Clorobiocins blockiert ist, isoliert werden. Spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die isolierten Verbindungen eine ähnliche Struktur wie Clorobiocin aufwiesen. Jedoch enthielten die neuen Verbindungen anstelle der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure die Vanillinsäure als Acylkomponente. Isovanillobiocin unterscheidet sich von Vanillobiocin durch die Position der Pyrroleinheit am Desoxyzucker und Declovanillobiocin fehlt das Chloratom am

Aminocoumarinring. Alle drei Antibiotika besaßen im Vergleich zu Clorobiocin nur geringe biologische Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis*. Dies zeigt die Bedeutung der Acylkomponente von Clorobiocin für die biologische Aktivität.

Coumermycin A₁ enthält als einziges Aminocoumarin-Antibiotikum die zentrale Pyrroleinheit 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, deren Bildung noch nicht aufgeklärt wurde. Der Strukturunterschied spiegelt sich auch in den Biosynthesegenclustern der drei Antibiotika wieder. So weist das Cluster von Coumermycin A₁ sechs zusätzliche Gene *couR1-couR6* auf. Aufgrund von Datenbankvergleiche konnte gezeigt werden, dass nur die Gene *couR1-couR4* für die Synthese dieser Pyrroleinheit verantwortlich sein können. Eine Überexpression der vier Gene in *S. coelicolor* Yu105 führte jedoch zu keiner Bildung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure. Inaktivierung der Gene *couR1-couR4* im Coumermycin A₁-Produzenten *S. rishiriensis* führte zu Mutanten, die kein Coumermycin A₁ mehr produzierten. Jedoch konnte durch anschließende Fütterung der Mutanten mit 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure keine Wiederherstellung der Coumermycin A₁-Produktion erzielt werden. Auch Fütterungsexperimente mit Ring A und Ring A-Analoga konnten die restlichen Strukturelemente von Coumermycin A₁ in den Mutanten nicht nachweisen. Somit bleibt die genaue Funktion der Gene *couR1-couR4* zur Zeit noch unbewiesen.

VI Literaturverzeichnis

Albermann, C., Soriano, A., Jiang, J., Vollmer, H., Biggins, J.B., Barton, W.A., Lesniak, J., Nikolov, D.B., und Thorson, J.S. (2003) Substrate specificity of NovM: Implications for novobiocin biosynthesis and glycorandomization. *Org.Lett.* **5**, 933-936

Ali, J.A., Jackson, A.P., Howells, A.J., und Maxwell, A. (1993) The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry.* **32**, 2717-2724

Allan, R.K., Mok, D., Ward, B.K., und Ratajczak, T. (2006) Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90:evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *J.Biol.Chem.* **281**, 7161-7171

Baltz, R.H. (2005) Antibiotic discovery from actinomycetes: Will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News.* **55**, 186-196

Bao, W., Sheldon, P.J., und Hutchinson, C.R. (1999) Purification and properties of the *Streptomyces peucetius* DpsC beta-ketoacyl:acyl carrier protein synthase III that specifies the propionate-starter unit for type II polyketide biosynthesis. *Biochemistry.* **38**, 9752-9757

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L. et al., (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**, 141-147

Berger, J. und Batcho, A.D. (1978) Coumarin-glycoside antibiotics. *J.Chromatogr.Libr.* **15**, 101-158

Bhuyan, B.K., Owen, S.P., und Dietz, A. (1965) Rubradirin, a new antibiotic. I. Fermentation and biological properties. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 91-96

Birch, A.J., Cameron, D.W., Holloway, P.W., und Rickards, R.W. (1960) Further examples of biological C-methylation. Novobiocin and actinomycin. *Tetrahedron Letters.* **1**, 26-31

Birch, A.J., Holloway, R.W., und Rickards, R.W. (1962) Biosynthesis of noviose, a branched-chain monosaccharide. *Biochim.Biophys.Acta.* **57**, 148-5

Blanco, G., Patallo, E.P., Brana, A.F., Trefzer, A., Bechthold, A., Rohr, J., Mendez, C., und Salas, J.A. (2001) Identification of a sugar flexible glycosyltransferase from *Streptomyces olivaceus*, the producer of the antitumor polyketide elloramycin. *Chem Biol.* **8**, 253-263

Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R., und Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem.* **3**, 619-627

Brügel, D. (2003) Molekularbiologische Untersuchungen zur Rolle des *couR2*-Gens bei der Biosynthese der zentralen Pyrroleinheit von Coumermycin A₁ in *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Biologie.*

Bunton, C.A., Kenner, G.W., Robinson, M.J.T., und Webster, B.R. (1963) Experiments related to the biosynthesis of novobiocin and other coumarins. *Tetrahedron.* **19**, 1001-1010

Cane, D.E., Walsh, C.T., und Khosla, C. (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science.* **282**, 63-68

Cerdeno, A.M., Bibb, M.J., und Challis, G.L. (2001) Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem.Biol.* **8**, 817-829

Chater, K.F. (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annual Review of microbiology.* **47**, 685-711

Chen, H. und 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

Chen, H., Zhao, Z., Hallis, T.M., Guo, Z., und Liu, H.-W. (2001) Insights into the branched-chain formation of mycarose:methylation catalyzed by an (*S*)-adenosylmethionine-dependent methyltransferase. *Angew.Chem.Int.Ed.* **40**, 607-610

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., und 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

Datsenko, K.A. und Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**, 6640-6645

Decker, H., Haag, S., Udvarnoki, G., und Rohr, J. (1995a) Novel genetically engineered tetracenomycins. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* **34**, 1107-1109

- Decker, H., Rohr, J., Motamedi, H., Zähler, H., und Hutchinson C.R.** (1995b) Identification of *Streptomyces olivaceus* TÜ2353 genes involved in the production of the polyketide elloramycin. *Gene*. **166**, 121-126
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W., und Raynal, M.-C.** (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol.Gen.Genet.* **264**, 477-485
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Li, S.-M., Chater, K.F., und Heide, L.** (2005a) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**, 2452-2459
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Luft, T., Li, S.-M., Chater, K.F., und Heide, L.** (2003a) Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*. Identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chem.Biol.* **10**, 279-288
- Eustáquio, A.S., Li, S.-M., und Heide, L.** (2005b) NovG, a DNA-binding protein acting as a positive regulator of novobiocin biosynthesis. *Microbiology.* **151**, 1949-1961
- Eustáquio, A.S., Luft, T., Wang, Z.-X., Gust, B., Chater, K.F., Li, S.-M., und Heide, L.** (2003b) Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch.Microbiol.* **180**, 25-32
- Fernandez, E., Weißbach, U., Reillo, C.S., Brana, A.F., Mendez, C., Rohr, J., und Salas, J.A.** (1998) Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *Journal of Bacteriology.* **180**, 4929-4937
- Floriano, B. und Bibb, M.** (1996) *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol.Microbiol.* **21**, 385-396
- Floss, H.G.** (2006) Combinatorial biosynthesis-Potential and problems. *J Biotechnol.* **in press**
- Freel Meyers, C.L., Oberthuer, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D., und Walsh, C.T.** (2004) Characterization of NovP and NovN: Completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring. *Angew.Chem., Int.Ed.* **43**, 67-70
- Freel Meyers, C.L., Oberthur, M., Anderson, J.W., Kahne, D., und Walsh, C.T.** (2003) Initial characterization of novobiocin acid noviosyl transferase activity of NovM in biosynthesis of the antibiotic novobiocin. *Biochemistry.* **42**, 4179-4189

- Freitag, A., Li, S.-M., und Heide, L.** (2006) Biosynthesis of the unusual 5,5-*gem*-dimethyl-deoxysugar noviose: investigation of the C-methyltransferase gene *cloU*. *Microbiology*. **in press**
- Freitag, A., Rapp, H., Heide, L., und Li, S.-M.** (2005a) Metabolic engineering of aminocoumarins: Inactivation of the methyltransferase gene *cloP* and generation of new clorobiocin derivatives in a heterologous host. *Chembiochem*. **6**, 1411-1418
- Freitag, A., Wemakor, E., Li, S.-M., und Heide, L.** (2005b) Acyl transfer in clorobiocin biosynthesis: Involvement of several proteins in the transfer of the pyrrole-2-carboxyl moiety to the deoxysugar. *Chembiochem*. **6**, 2316-2325
- French, P., Venuti, E., und Fraimow, H.S.** (1993) In vitro activity of novobiocin against multiresistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2736-2739
- Galm, U., Dessoy, M.A., Schmidt, J., Wessjohann, L.A., und Heide, L.** (2004a) *In vitro* and *in vivo* production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic and synthetic approach. *Chem. Biol.* **11**, 173-183
- Galm, U., Heller, S., Shapiro, S., Page, M., Li, S.M., und Heide, L.** (2004b) Antimicrobial and DNA gyrase-inhibitory activities of novel clorobiocin derivatives produced by mutasynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1307-1312
- Garneau, S., Dorrestein, P.C., Kelleher, N.L., und Walsh, C.T.** (2005) Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A1 biosynthesis. *Biochemistry*. **44**, 2770-2780
- Giraud, M.-F., Leonard, G.A., Field, R.A., Berlind, C., und Naismith, J.H.** (2000) RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase. *nature structural biology*. **7**, 398-402
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T., und 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
- He, X.M. und Liu, H.W.** (2002) Formation of unusual sugars: Mechanistic studies and biosynthetic applications. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 701-754
- Heinzelmann, E., Kienzlen, G., Kaspar, S., Recktenwald, J., Wohlleben, W., und Schwartz, D.** (2001) The phosphinomethylmalate isomerase gene *pmi*, encoding an aconitase-like enzyme, is involved in the synthesis of phosphinothricin tripeptide in *Streptomyces viridochromogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3603-3609

- Hinman, J.W., Caron, E.L., und Hoeksema, H.** (1957) Novobiocin. V. Carbamoyl migration and isonovobiocin. *J.Am.Chem.Soc.* **79**, 5321-5322
- Hoeksema, H., Johnson, J.L., und Hinman, J.W.** (1955) Structural studies on streptonivicin, a new antibiotic. *J.Am.Chem.Soc.* **77**, 6710-6711
- Holzenkämpfer, M., Walker, M., Zeeck, A., Schimana, J., und 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. und Zeeck, A.** (2002) Biosynthesis of simocyclinone D8 in an 18O₂-rich atmosphere. *J.Antibiot.* **55**, 341-342
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G., und Omura, S.** (1985) Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering. *Nature.* **314**, 642-644
- Horinouchi, S. und Beppu, T.** (1995) Autoregulators. *Biotechnology.* **28**, 103-119
- Hutchinson, C.R.** (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**, 319-329
- Igarashi, M., Takahashi, Y., Shitara, T., Nakamura, H., Naganawa, H., Miyake, T., und Akamatsu, Y.** (2005) Caprazamycins, novel lipo-nucleoside antibiotics, from *Streptomyces* sp. *Journal of Antibiotics.* **58**, 327-337
- Jakimowicz, P., Tello, M., Meyers, C.L.F., Walsh, C.T., Buttner, M.J., Field, R.A., und Lawson, D.M.** (2006) The 1.6-Å resolution crystal structure of NovW: A 4-keto-6-deoxy sugar epimerase from the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides*. *Proteins:Structure, Function and Bioinformatics.* **63**, 261-265
- Kagan, R.M. und Clarke, S.** (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch.Biochem.Biophys.* **310**, 417-427
- Kawaguchi, H., Tsukiura, H., Okanishi, M., Miyaki, T., Ohmori, T., Fujisawa, K., und Koshiyama, H.** (1965) Coumermycin, a new antibiotic. I. Production, isolation, and characterization of coumermycin A1. *J.Antibiot.* **18**, 1-10
- Khosla, C.** (1998) Combinatorial biosynthesis of "unnatural" natural products. In *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*, pp 401-417. Edited by E.M. Gordon and J.F. Kerwin Jr. New York:John Wiley & Sons.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., und Hopwood, D.A.** (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. 2nd edn., Norwich, UK: John Innes Foundation.

- Kominek, L.A. und Meyer, H.F.** (1975) Novobiocin acid synthetase. *Methods Enzymol.* **43**, 502-508
- 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., und 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
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z., und Swings, J.** (2002) The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52**, 823-829
- Lautru, S., Deeth, R.J., Bailey, L.M., und Challis, G.L.** (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chem.Biol.* **1**, 265-269
- Lewis, R.J., Singh, O.M.P., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J., und Wigley, D.B.** (1996) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **15**, 1412-1420
- Li, S.-M. und Heide, L.** (2004) Functional analysis of biosynthetic genes of aminocoumarins and production of hybrid antibiotics. *Curr.Med.Chem.Anti-Infect.Agents.* **3**, 279-295
- Li, S.-M. und Heide, L.** (2005) New aminocoumarin antibiotics from genetically engineered *Streptomyces* strains. *Curr.Med.Chem.* **12**, 419-427
- Li, S.-M., Hennig, S., und Heide, L.** (1998) Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin via a non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Letters.* **39**, 2717-2720
- Li, S.-M., Westrich, L., Schmidt, J., Kuhnt, C., und Heide, L.** (2002) Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology.* **148**, 3317-3326
- Lombo, F., Braña, A.F., Salas, J.A., und Méndez, C.** (2004) Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chembiochem.* **5**, 1181-1187
- Lorico, A., Rappa, G., und Sartorelli, A.C.** (1992) Novobiocin-induced accumulation of etoposide (VP-16) in WEHI-3B D+ leukemia cells. *Int.J.Cancer.* **52**, 903-909

- 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., und Preud'Homme, J.** (1974) Antibiotic 18631 RP. **189,259**,
- Marcu, M.G., Schulte, T.W., und 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. und 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. und Salas, J.A.** (2001) The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Res.Microbiol.* **152**, 341-350
- Merkel, A.B., Major, L.L., Errey, J.C., Burkart, M.D., Field, R.A., Walsh, C.T., und Naismith, J.H.** (2004) The position of a key tyrosine in dTDP-4-Keto-6-deoxy-D-glucose-5-epimerase (EvaD) alters the substrate profile for this RmlC-like enzyme. *J Biol Chem.* **279**, 32684-32691
- Meyer, C.E.** (1965) Rubradirin, a new antibiotic. II. Isolation and chracterization. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 97-99
- Muth, G., Nussbaumer, B., Wohlleben, W., und Puehler, A.** (1989) A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *MGG, Mol.Gen.Genet.* **219**, 341-348
- Ninet, L., Benazet, F., Charpentie, Y., Dubost, M., Florent, J., Mancy, D., Preud'Homme, J., Threlfall, T.L., und Vuillemin, B.** (1972) Clorobiocin (18.631 R.P.), a new chlorinated antibiotic produced by several *Streptomyces species*. *C.R.Acad.Sci., Ser.C.* **275**, 455-458
- Oh, S.H. und Chater, K.F.** (1997) Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J.Bacteriol.* **179**, 122-127

- Orihara, N., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Furihata, K., und Seto, H.** (1998) Studies on the biosynthesis of terpenoid compounds produced by actinomycetes - 3. Biosynthesis of the isoprenoid side chain of novobiocin via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces niveus*. *Journal of Antibiotics*. **51**, 676-678
- Pacholec, M., Hillson, N.J., und Walsh, C.T.** (2005) NovJ/NovK catalyze benzylic oxidation of a β -hydroxyl tyrosyl-S-pantetheinyl enzyme during aminocoumarin ring formation in novobiocin biosynthesis. *Biochemistry*. **44**, 12819-12826
- Patroni, J.J. und Stick, R.V.** (1987) The treatment of some cyclic thiocarbonates with methyl halide/propylene oxide. *Aust.J.Chem.* **40**, 795-802
- Perez, M., Lombo, F., Zhu, L., Gibson, M., Brana, A.F., Rohr, J., Salas, J.A., und Mendez, C.** (2005) Combining sugar biosynthesis genes for the generation of L- and D-amicetose and formation of two novel antitumor tetracenomycins. *Chemical Communications*. **12**, 1604-1606
- Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z., und Piepersberg, W.** (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol.Microbiol.* **16**, 1137-1156
- Pojer, F., Kahlich, R., Kammerer, B., Li, S.-M., und 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., und 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., und Heide, L.** (2003b) CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 2316-2321
- Puk, O., Bischoff, D., Kittel, C., Pelzer, S., Weist, S., Stegmann, E., Süßmuth, R., und Wohlleben, W.** (2004) Biosynthesis of chloro- β -hydroxytyrosine, a non-proteinogenic amino acid of the peptidic backbone of vancomycin-type glycopeptide antibiotics. *J.Bacteriol.* **186**, 6093-6100
- Puk, O., Huber, P., Bischoff, D., Recktenwald, J., Jung, G., Süßmuth, R.D., van Pée, K.-H., Wohlleben, W., und Pelzer, S.** (2002) Glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908: Function of a halogenase and a haloperoxidase/perhydrolase. *Chem.Biol.* **9**, 225-235
- Queener, S.W., Sebek, O.K., und Vezina, C.** (1978) Mutants blocked in antibiotic synthesis. *Annu.Rev.Microbiol.* **32**, 593-636

- Raad, I.I., Hachem, R.Y., Abi-Said, D., Rolston, K.V.I., Whimbey, E., Buzaid, A.C., und 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., und 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., Murren, J.R., Johnson, L.M., Lorico, A., und Sartorelli, A.C.** (2000) Novobiocin-induced VP-16 accumulation and MRP expression in human leukemia and ovarian carcinoma cells. *Anticancer Drug Des.* **15**, 127-134
- Rodriguez, L., Aguirrezabalaga, I., Allende, N., Brana, A.F., Mendez, C., und Salas, J.A.** (2002) Engineering deoxysugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms. A tool to produce novel glycosylated bioactive compounds. *Chem Biol.* **9**, 721-729
- Rodriguez, L., Oelkers, C., Aguirrezabalaga, I., Brana, A.F., Rohr, J., Mendez, C., und Salas, J.A.** (2000) Generation of hybrid elloramycin analogs by combinatorial biosynthesis using genes from anthracycline-type and macrolide biosynthetic pathways. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **2**, 271-276
- Rohr, J.** (1995) Kombinatorische Biosynthese - eine Zukunftsstrategie? *Angew.Chem.* **107**, 963-967
- Salas, J.A. und Mendez, C.** (2005) Biosynthesis pathways for desoxysugars in antibiotic-producing actinomycetes: isolation, characterization and generation of novel glycosylated derivatives. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **9**, 77-85
- Sambrook, J. und Russell, D.W.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaki, T., Igarashi, Y., Saito, N., und 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
- Scannell, J. und Kong, Y.L.** (1969) Biosynthesis of coumermycin A1: incorporation of L-proline into the pyrrole groups. *Antimicrobial.Agents Chemother.* **9**, 139-143
- Schimana, J., Fiedler, H.P., Groth, I., Süßmuth, R., Beil, W., Walker, M., und Zeeck, A.** (2000) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J.Antibiot.* **53**, 779-787

- Schmutz, E., Hennig, S., Li, S.-M., und Heide, L.** (2004) Identification of a topoisomerase IV in actinobacteria: purification and characterization of ParYR and GyrBR from the coumermycin A1 producer *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Microbiology*. **150**, 641-647
- Schmutz, E., Mühlenweg, A., Li, S.-M., und 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., und 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
- Smith, C.G., Dietz, A., Sokolski, W.T., und Savage, G.M.** (1956) Streptonivicin, a new antibiotic. I. Discovery and biologic studies. *Antibiotics & Chemotherapy*. **6**, 135-142
- Stachelhaus, T., Huser, A., und Marahiel, M.A.** (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem.Biol.* **3**, 913-921
- Steffensky, M., Li, S.-M., und Heide, L.** (2000a) Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. *J.Biol.Chem.* **275**, 21754-21760
- Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M., und Heide, L.** (2000b) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**, 1214-1222
- Ströch, K.** (2003) Chemisches Screening von ausgewählten Actinomyceten sowie Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus *Micromonospora* sp. und Pflanzen. *PhD Thesis*. University of Göttingen
- Tello, M., Jakimowicz, P., Errey, J.C., Freel Meyers, C.L., Walsh, C.T., Buttner, M.J., Lawson, D.M., und Field, R.A.** (2006) Characterisation of *Streptomyces spheroides* NovW and revision of its functional assignment to a dTDP-6-deoxy-d-xylo-4-hexulose 3-epimerase. *Chem.Commun.* **10**, 1079-1081-
- Thiara, A.S. und 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. und 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

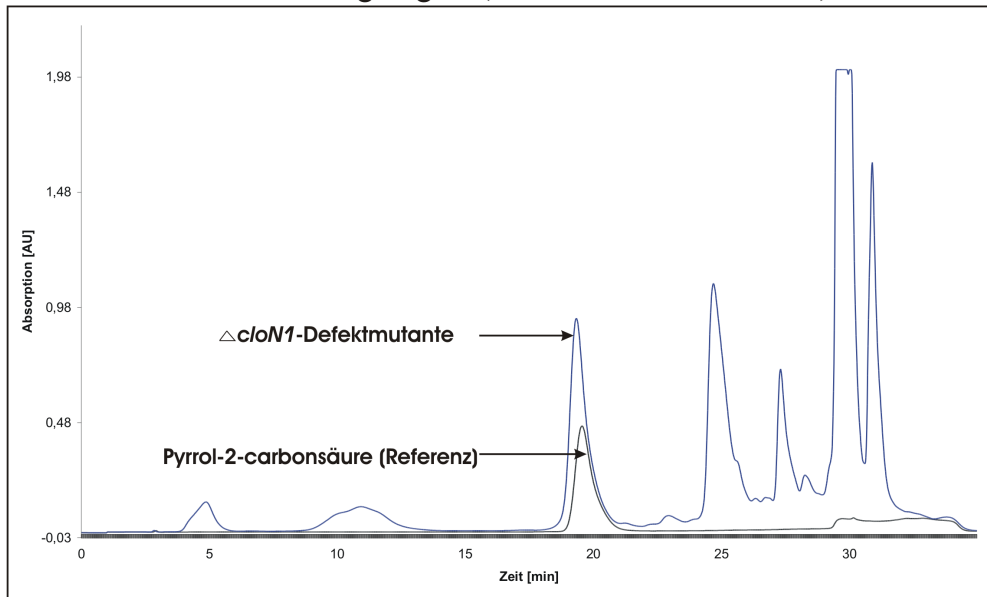
- Thiara, A.S. und Cundliffe, E.** (1993) Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol.Microbiol.* **8**, 495-506
- Thiele, A., Pfister, M., Erbes, M., Cross, M., Hänsch, M., und Hauschildt, S.** (2002) Novobiocin is a novel inducer of CD38 on cells of the myelomonocytic lineage. *Biochim.Biophys.Acta.* **1542**, 32-40
- Thomas, M.G., Burkart, M.D., und Walsh, C.T.** (2002) Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chem.Biol.* **9**, 171-184
- Thuy, T.T.T., Lee, H.C., Kim, C.G., Heide, L., und Sohng, J.K.** (2005) Functional characterizations of novWUS involved in novobiocin biosynthesis from *Streptomyces sphaeroides*. *Arch.Biochem.Biophys.* **436**, 161-167
- Trefzer, A., Salas, J.A., und Bechthold, A.** (1999) Genes and enzymes involved in deoxysugar biosynthesis in bacteria. *Nat.Prod.Rep.* **16**, 283-299
- Tsai, F.T.F., 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., und 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., und Solenberg, P.J.** (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem.Biol.* **5**, 155-162
- Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y.G., Donadio, S., und Hutchinson, C.R.** (1989) Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J.Bacteriol.* **171**, 5872-5881
- Walsh, C.T.** (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *ChemBiochem.* **3**, 124-134
- Walsh, T.J., Hansen, S.L., Tatem, B.A., Auger, F., und Standiford, H.C.** (1985) Activity of novobiocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **15**, 435-440
- Wang, Z.-X., Li, S.-M., und Heide, L.** (2000) Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**, 3040-3048

- Weist, S. und Süssmuth, R.D.** (2005) Mutational biosynthesis--a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **68**, 141-150
- Weitnauer, G., Gaisser, S., Kellenberger, L., Leadlay, P.F., und Bechthold, A.** (2002) Analysis of a C-methyltransferase gene (*aviG1*) involved in avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and complementation of a *Saccharopolyspora erythraea* eryBIII mutant by *aviG1*. *Microbiology.* **148**, 373-379
- Westrich, L., Heide, L., und Li, S.-M.** (2003) CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin. *Chembiochem.* **4**, 768-773
- Wolucka, B.A. und Van Montagu, M.** (2003) GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem.* **278**, 47483-47490
- Wong, H.C., Liu, G., Zhang, Y.M., Rock, C.O., und Zheng, J.** (2002) The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Biol.Chem.* **277**, 15874-15880
- Xu, H., Kahlich, R., Kammerer, B., Heide, L., und 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
- Xu, H., Wang, Z.-X., Schmidt, J., Heide, L., und Li, S.-M.** (2002) Genetic analysis of the biosynthesis of the pyrrole and carbamoyl moieties of coumermycin A(1) and novobiocin. *Mol.Genet.Genomics.* **268**, 387-396
- Yu, T.W., Müller, R., Müller, M., Zhang, X., Draeger, G., Kim, C.G., Leistner, E., und Floss, H.G.** (2001) Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J.Biol.Chem.* **276**, 12546-12555
- Yu, T.-W. und Hopwood, D.A.** (1995) Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor whiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the *act* genes for actinorhodin biosynthesis. *Microbiology.* **141**, 2279-2791

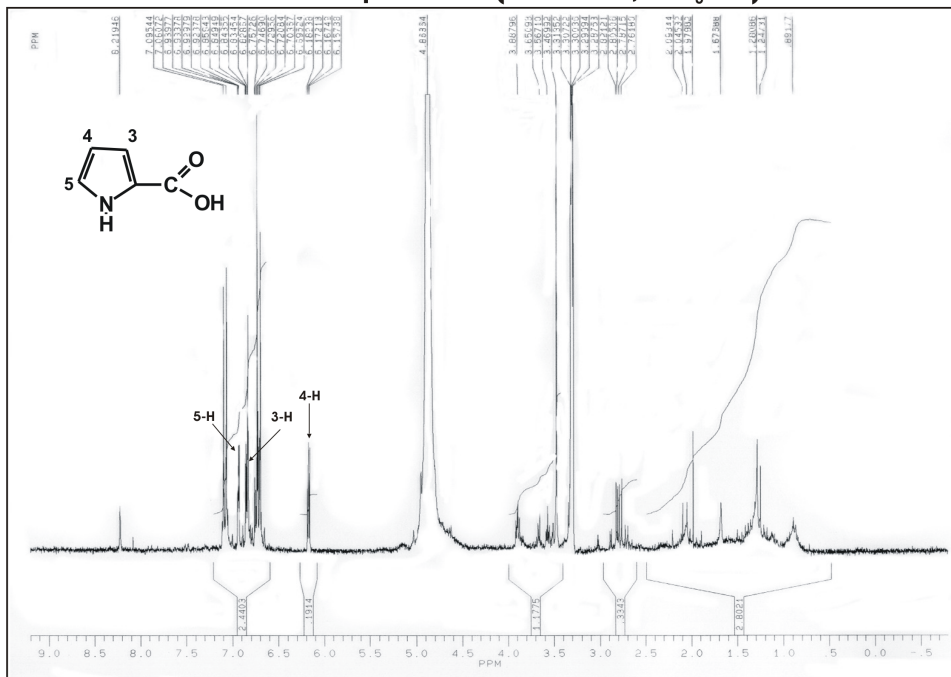
VII Anhang

1. HPLC-Chromatogramm und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Pyrrol-2-carbonsäure

HPLC-Bedingungen (s. Methodenteil unter 10.1.2)

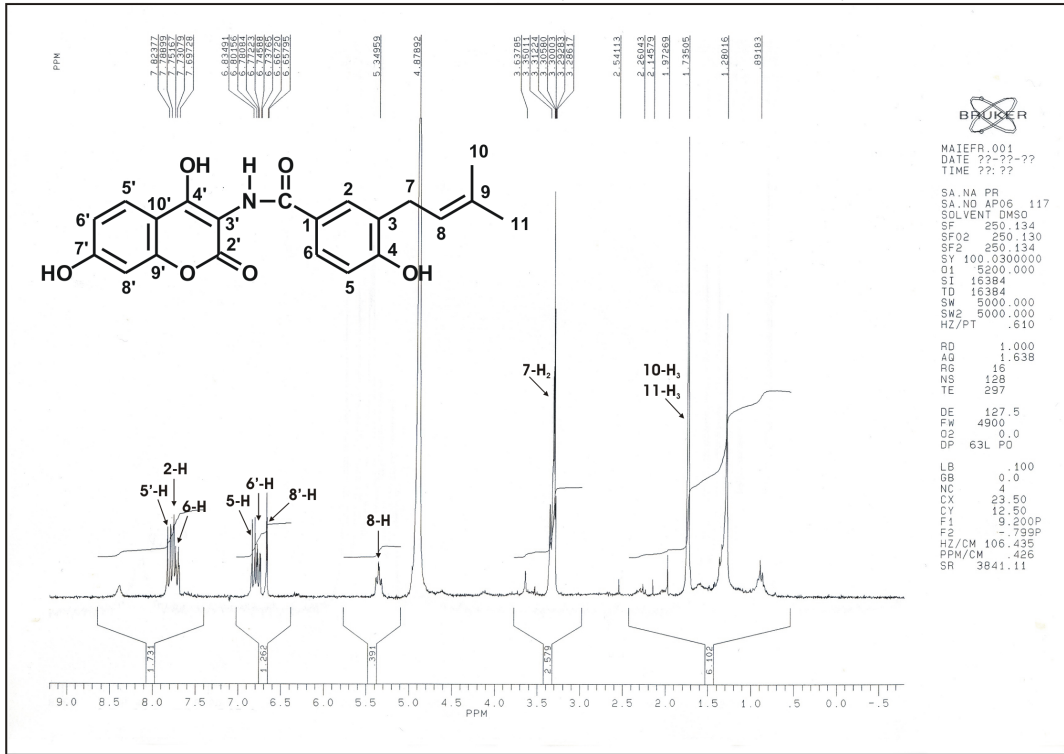


$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (250 MHz, CD_3OD)

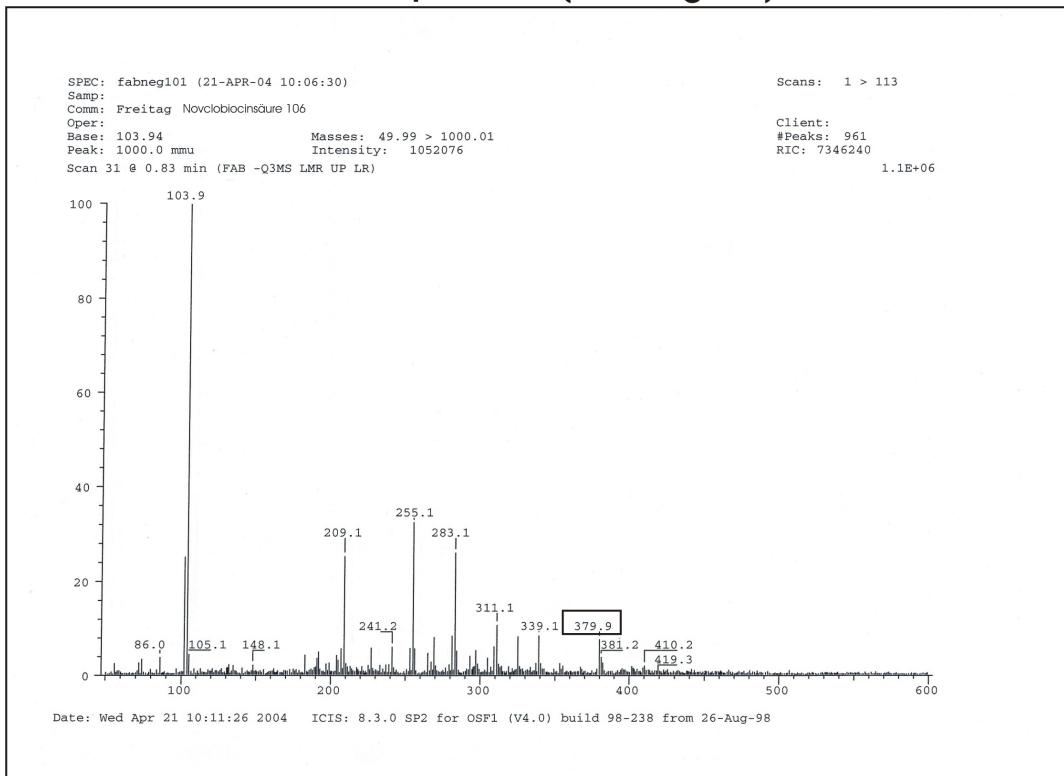


Novclobiocinsäure 106

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₃OD)

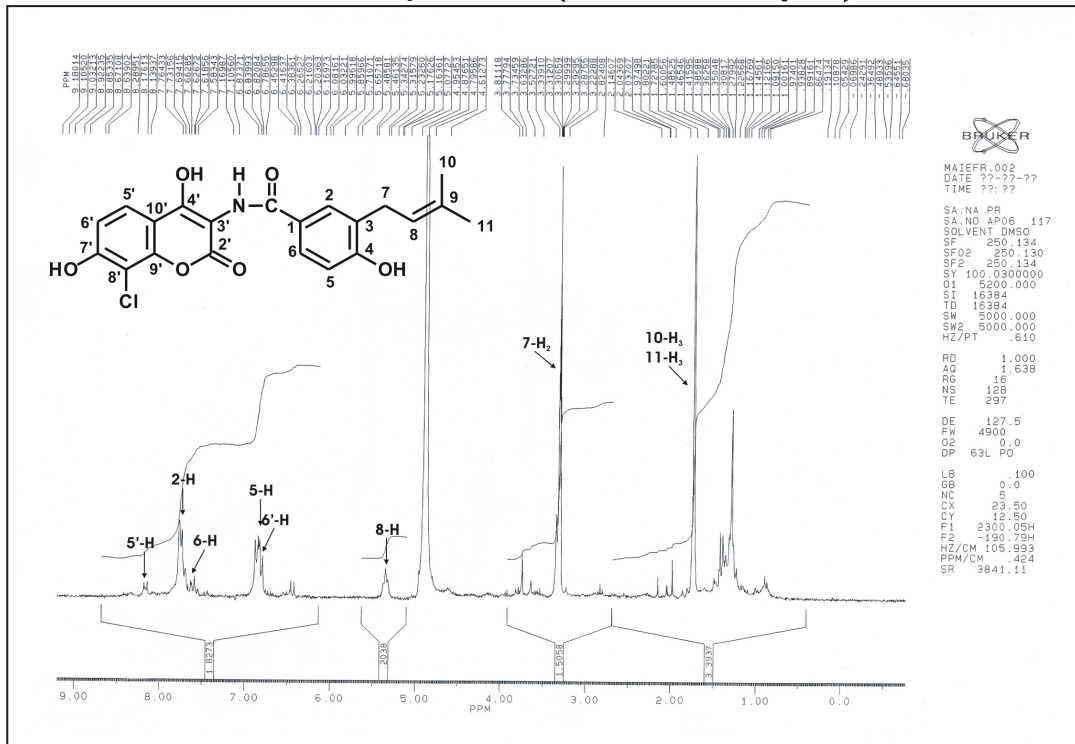


MS-Spektrum (FAB negativ)

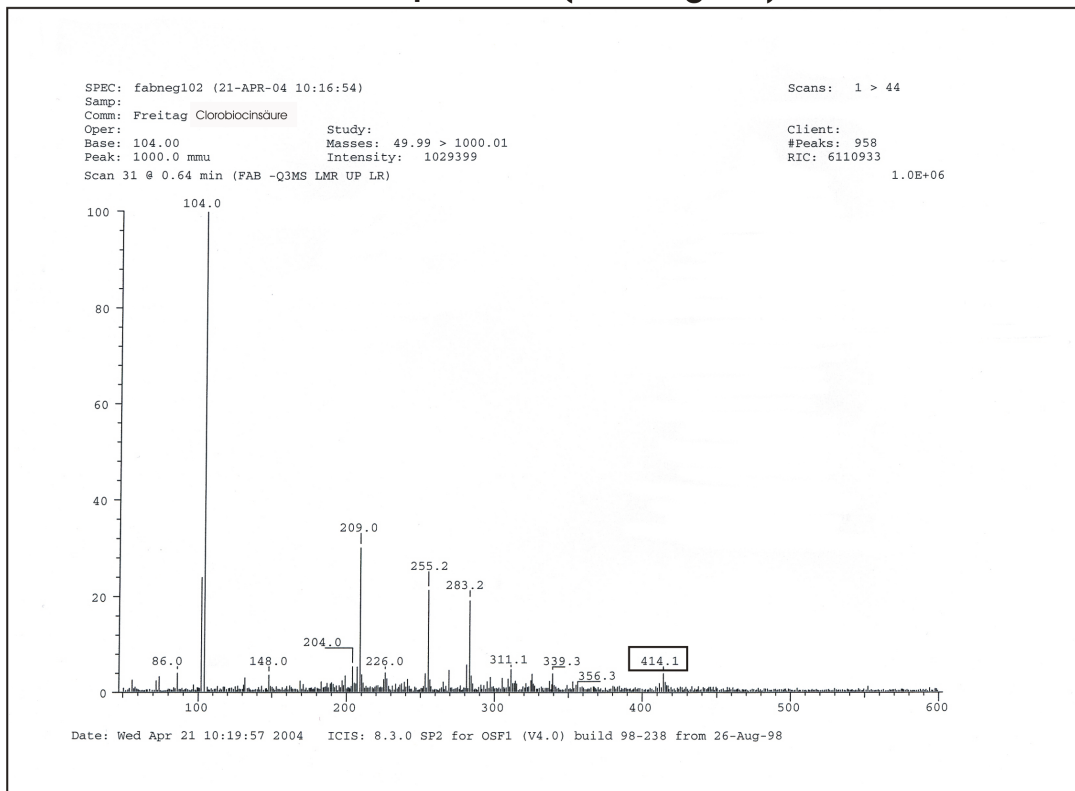


Clorobiocinsäure

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₃OD)

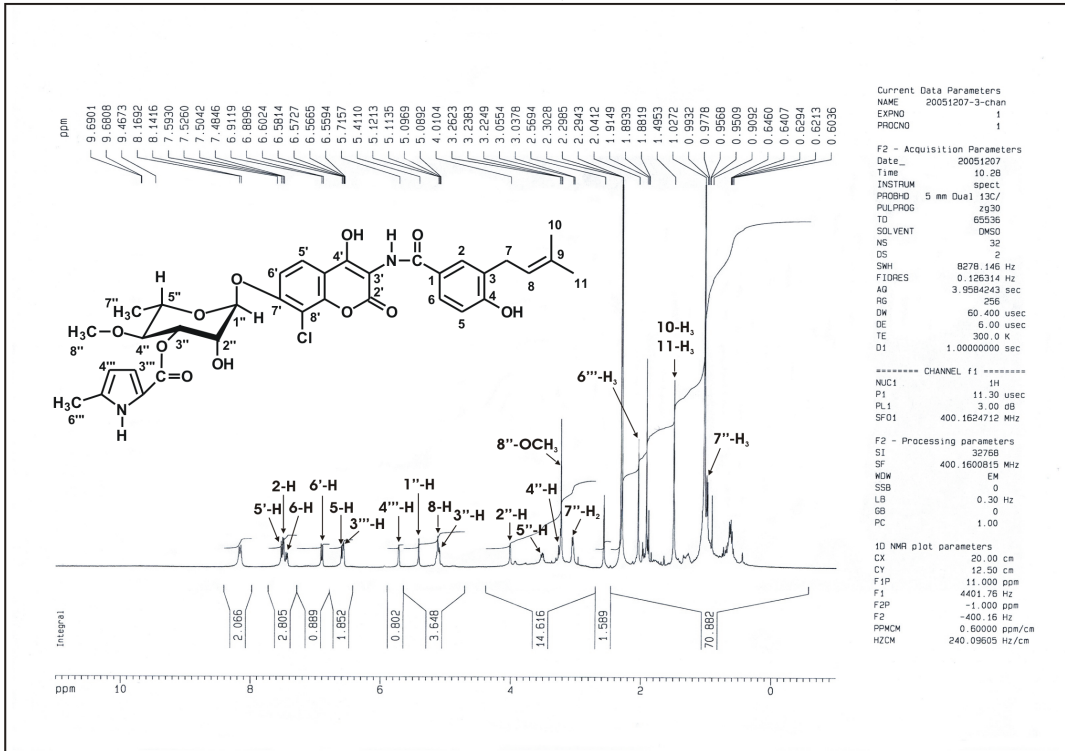


MS-Spektrum (FAB negativ)

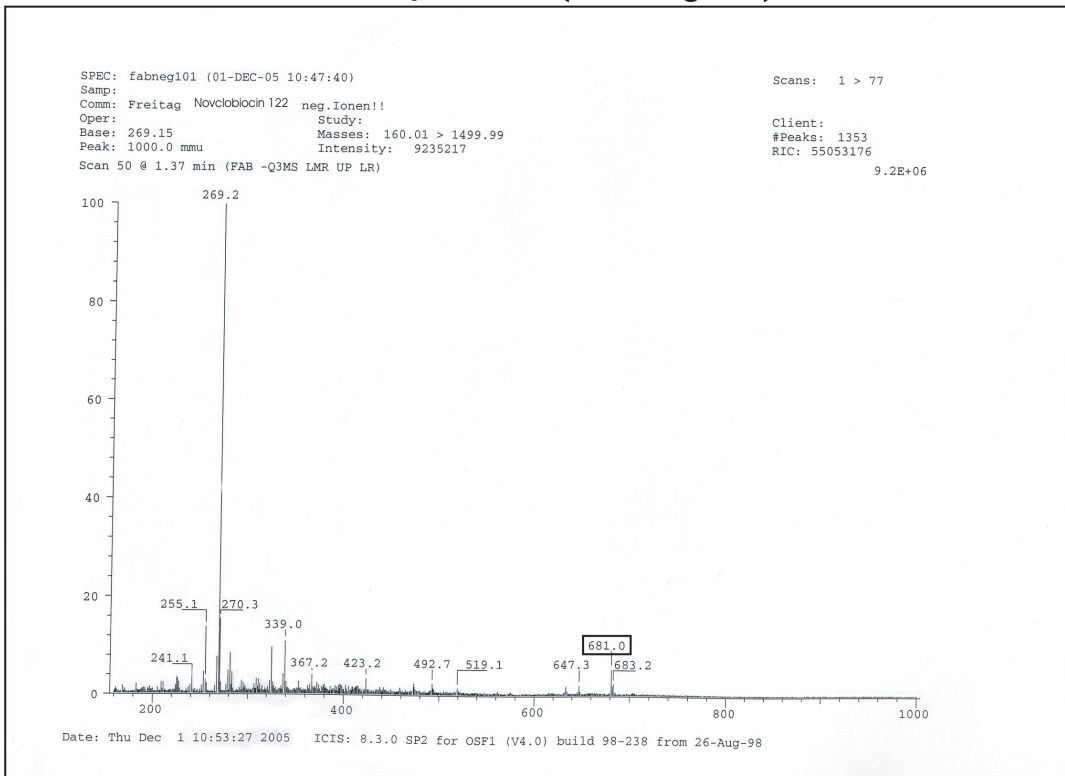


Novclobiocin 122

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃SOCD₃)

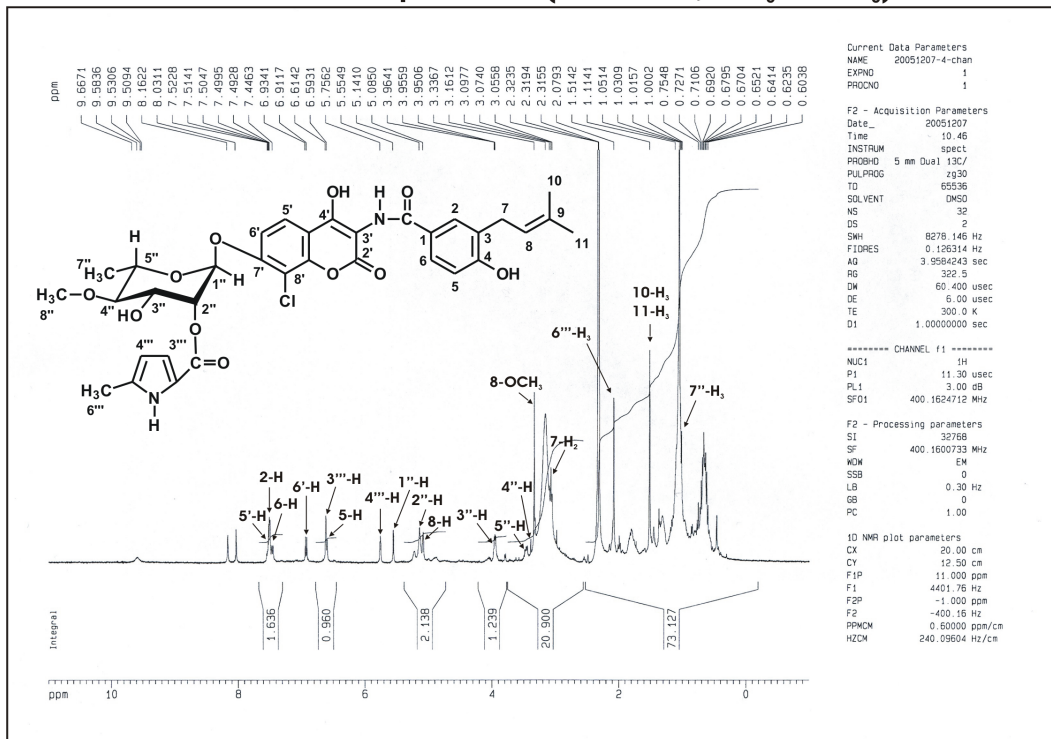


MS-Spektrum (FAB negativ)

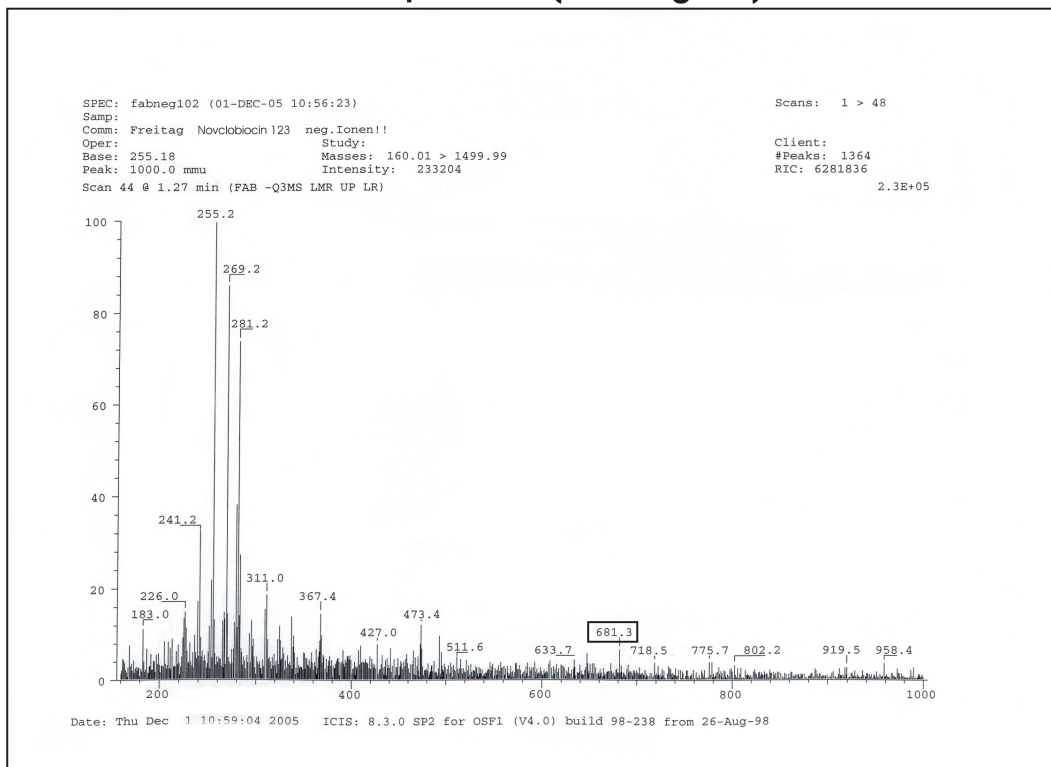


Novclobiocin 123

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃SOCD₃)

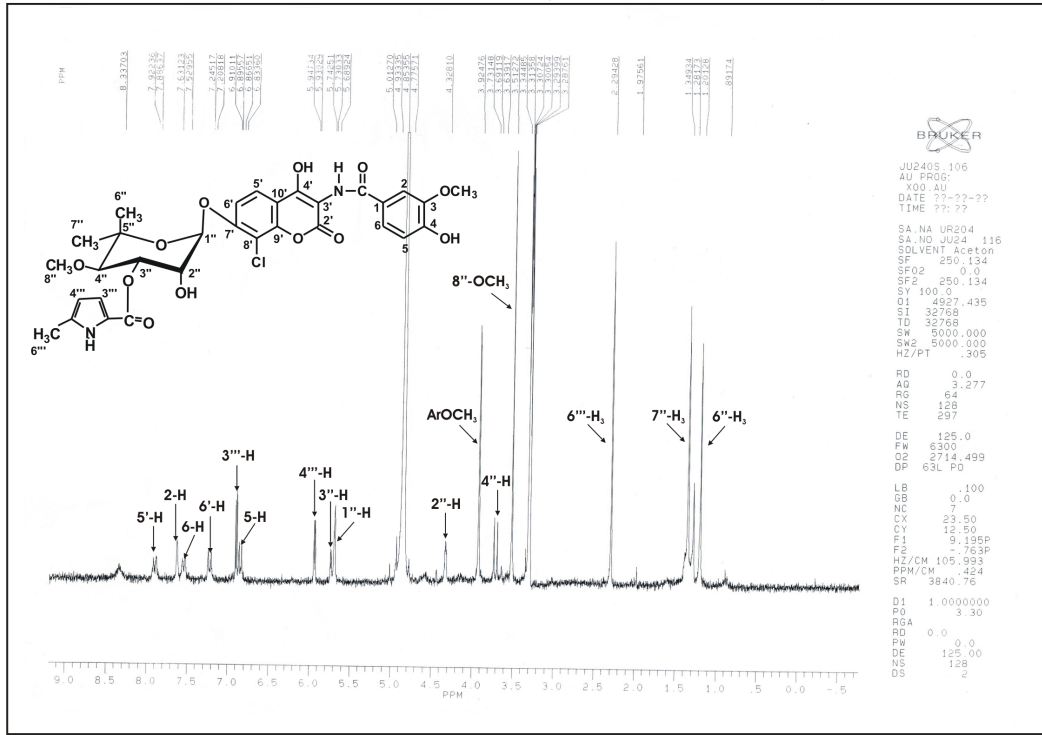


MS-Spektrum (FAB negativ)



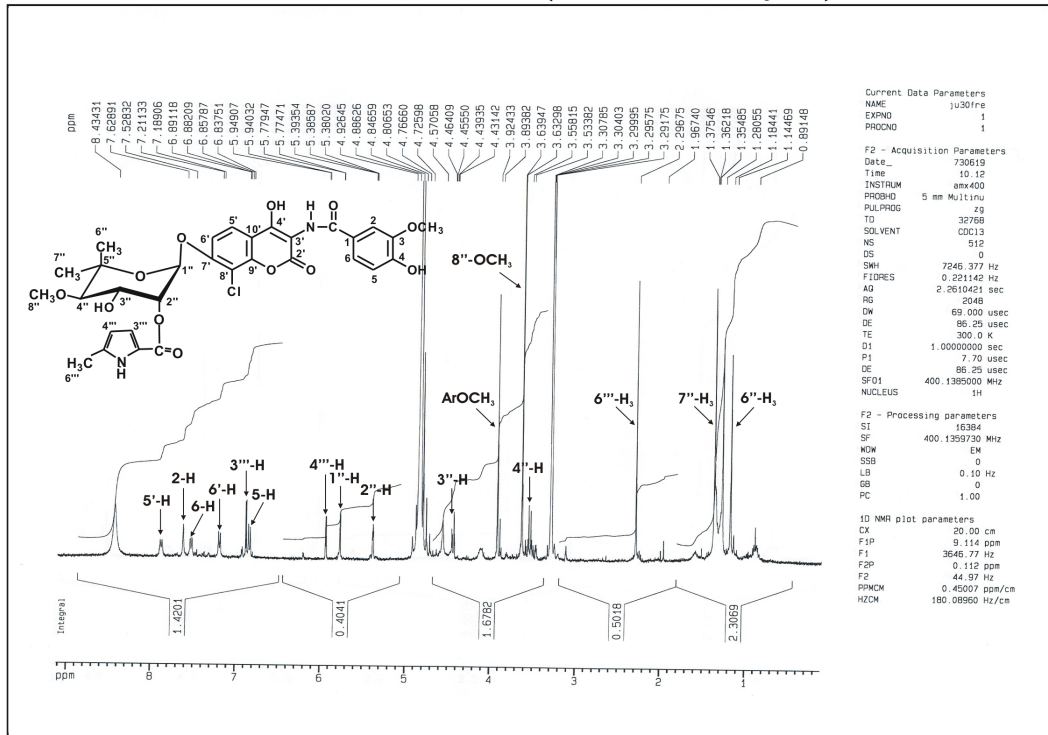
Vanillobiocin

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₃OD)

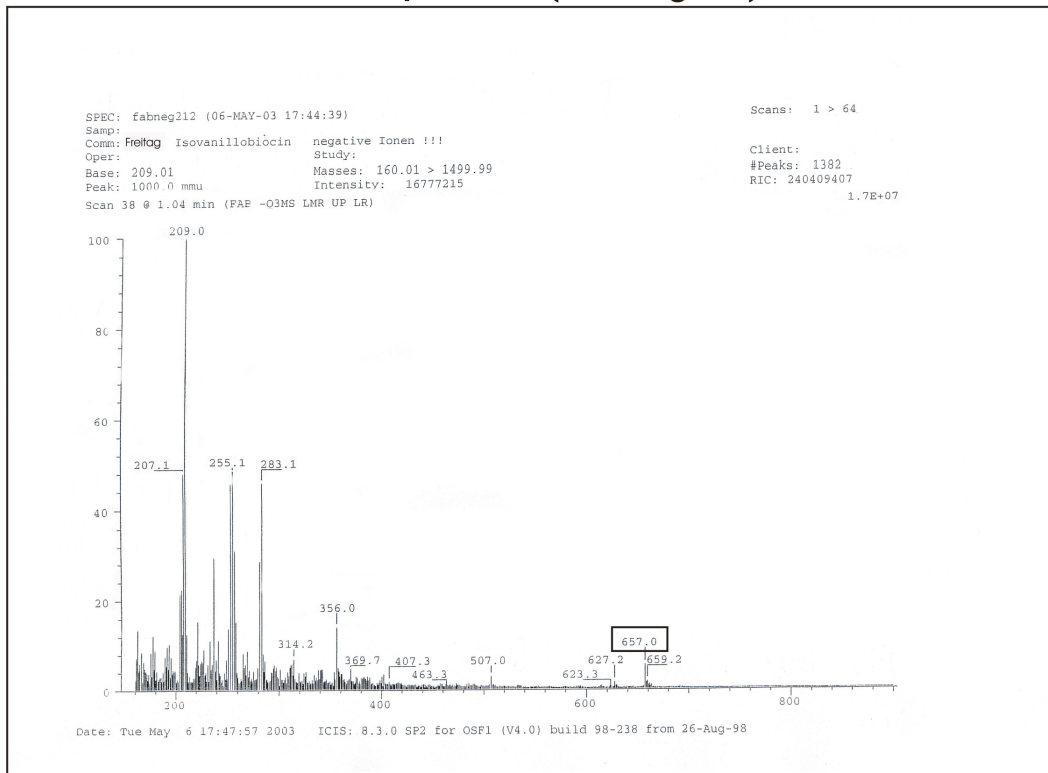


Isovanillobiocin

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD)

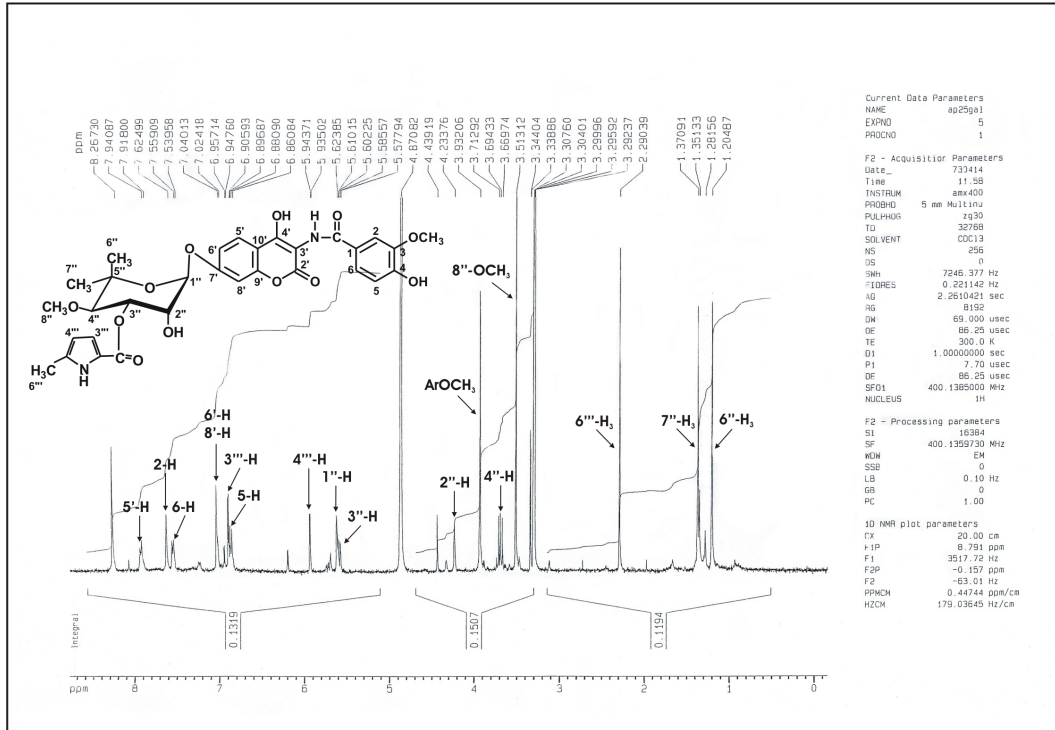


MS-Spektrum (FAB negativ)

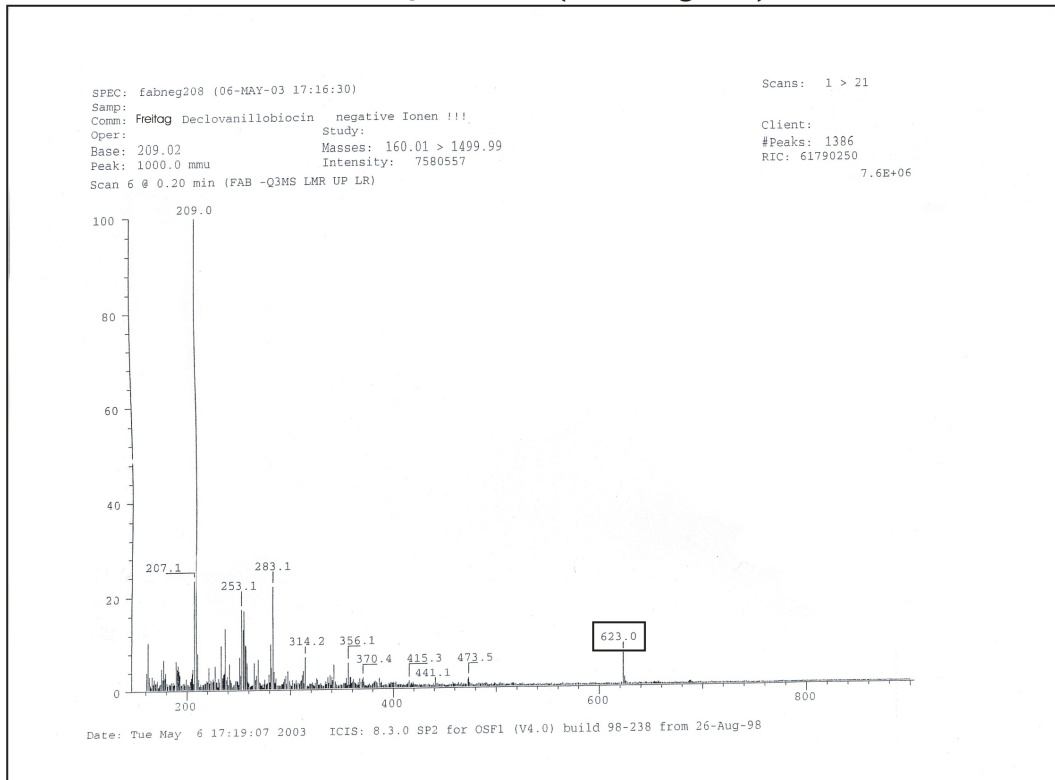


Declovanillobiocin

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD)



MS-Spektrum (FAB negativ)



VIII Verzeichnis der akademischen Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrern, den Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dr. J.R. Andreesen	Dr. G. Moritz
Dr. J. Faust	Dr. K. Neubert
Dr. R. Gattermann	Dr. E. Ohmann
Dr. G.J. Krauß	Dr. P. Reinshaus
Dr. J. Lindau	Dr. H. Schmidt
Dr. B. Mathiszik	

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Dr. H. Bisswanger	Dr. L. Heide
Dr. K.W. Bock	Dr. S.-M. Li
Dr. P. Bohley	Dr. F. Madeo
Dr.U. Breyer-Pfaff	Dr. D. Mecke
Dr. K. Eisele	Dr. E. Pfaff
Dr. W. Engels	Dr. M. Schwarz
Dr. K.-U. Fröhlich	Dr. J. Werringloer
Dr. H. Hagenmaier	Dr. W. Wohlleben

IX Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Anja Freitag
Geburtsdatum: 22.04.1978
Geburtsort: Halle/Saale

Schulbildung

09/1984-07/1991 Goetheschule in Halle
09/1991-07/1994 Kooperative Gesamtschule „Ulrich von Hutten“/Gymnasium
09/1994-07/1996 Thomas-Müntzer-Gymnasium
(Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)

Hochschulbildung

10/1996 – 09/1998 Biochemie / Grundstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/1998 Abschluss des Vordiploms im Studiengang
10/1998 – 04/2002 Biochemie / Hauptstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Studienschwerpunkt: Analytische Chemie/ Toxikologie)
06/2001 Abschluss der Diplomprüfungen im Studiengang Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
07/2001 – 04/2002 Diplomarbeit bei Prof. Dr. K. Eisele, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen mit dem Thema: „Die cAMP bindende Aktivität des Androgenrezeptorkomplexes“
07/2002-04/2006 Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin und Coumermycin A₁“, unter Anleitung von Prof. Dr. L. Heide, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen

