

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zu Resistenzmechanismen
der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten
und zur Amidsynthetase CouL
aus *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Elisabeth Schmutz

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Ruth

Weitgehende Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikationen:

E. Schmutz, A. Mühlenweg, S.-M. Li and L. Heide (2003)

Resistance genes of aminocoumarin producers: two type II topoisomerase genes confer resistance against coumermycin A₁ and clorobiocin
Antimicrob. Agents Chemother. 47: 869-877

E. Schmutz, M. Steffensky, J. Schmidt, A. Porzel, S.-M. Li and L. Heide (2003)

An unusual amide synthetase (CouL) from the coumermycin A₁ biosynthetic gene cluster from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489
Eur. J. Biochem. 270: 4413-4419

E. Schmutz, S. Hennig, S.-M. Li and L. Heide (2003)

Identification of a topoisomerase IV in actinobacteria: Purification and characterization of ParY^R and GyrB^R from the coumermycin A₁ producer *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489
eingereicht

Tagungsbeiträge:

Poster:

E. Schmutz, A. Mühlenweg, Z.-X. Wang, S.-M. Li and L. Heide

Resistance genes from producing organisms of novobiocin and coumermycin A₁
Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt/Main 1999

E. Schmutz, A. Mühlenweg, Z.-X. Wang, S.-M. Li and L. Heide

Resistance genes from novobiocin and coumermycin A₁ producing organisms
VAAM Workshop „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Bonn 2000

E. Schmutz, M. Steffensky, S.-M. Li and L. Heide

Cloning, overexpression and purification of an amide synthetase (CouL) from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489
VAAM Workshop „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Berlin 2001

E. Schmutz, M. Steffensky, S.-M. Li and L. Heide

An unusual amide synthetase (CouL) from the coumermycin A₁ biosynthetic gene cluster from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489
VAAM Workshop „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Freiburg 2002

Vortrag:

E. Schmutz, S.-M. Li and L. Heide

Resistance genes of *Streptomyces* strains producing aminocoumarin antibiotics
VAAM Workshop „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, Münster 2003

I	Einleitung	1
1.	Gyrase und Topoisomerase IV als Zielmoleküle von Antibiotika	1
1.1	Chinolone	4
1.2	Aminocoumarine	7
1.3	Cyclothialidine	12
2.	Biosynthese der Aminocoumarinantibiotika	13
3.	Resistenzmechanismen der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten	17
4.	Zielsetzung der Arbeit	19
II	Material und Methoden	21
1.	Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme	21
1.1	Chemikalien und Medienbestandteile	21
1.2	Materialien zur Chromatographie	23
1.2.1	Herstellung von Novobiocin-Sepharose	23
1.3	Enzyme und Kits	24
2.	Nährmedien und Puffer	24
2.1	Nährmedium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
2.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	25
2.3	Antibiotika	27
2.4	Puffer und Lösungen	28
2.4.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	28
2.4.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	28
2.4.3	Puffer zur Protoplastierung und Transformation von <i>Streptomyces</i>	29
2.4.4	Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung	29
2.4.5	Puffer zur Proteinreinigung	30
2.4.6	Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	31
3.	Plasmide und Bakterienstämme	32
3.1	Plasmide	32
3.2	Bakterienstämme	35
4.	Kulturbedingungen	35
4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
4.2	Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	36
4.2.1	Anzucht in Fest- und Flüssigmedien	36
4.2.2	Herstellung von Glycerindauerkulturen und Sporensuspensionen ..	36
4.2.3	Durchführung der Resistenztests von <i>S.-lividans</i> -Transformanden gegen Novobiocin und Coumermycin A ₁	37
5.	Methoden der Molekularbiologie	37
5.1	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrations- bestimmung von DNA	37
5.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	37
5.1.2	Alkoholfällung	37

5.1.3	Konzentrationsbestimmung	38
5.2	Agarosegel-Elektrophorese	38
5.2.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
5.3	DNA-Manipulation	39
5.3.1	Restriktionsverdau	39
5.3.2	Glätten überhängender Enden von DNA-Molekülen.....	39
5.3.3	Ligation von DNA-Molekülen	40
5.3.4	Relaxation überspiralisierter Plasmid-DNA mit Topoisomerase I	40
5.4	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	40
5.4.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	40
5.4.2	CaCl ₂ -vermittelte Transformation von <i>E. coli</i> und Blau-Weiß- Selektion.....	41
5.5	Protoplastierung von <i>Streptomyces lividans</i>	41
5.6	PEG-vermittelte Transformation von <i>Streptomyces</i>	42
5.7	Isolierung von DNA aus Bakterien.....	42
5.7.1	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse)	42
5.7.2	Isolierung von Plasmiden aus <i>Streptomyces</i>	43
5.7.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>Streptomyces</i>	43
5.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
5.8.1	PCR zur Klonierung von <i>parY^R</i> zur heterologen Expression in <i>S.</i> <i>lividans</i> TK24	44
5.8.2	PCR Amplifikation der Topoisomerase II Gene aus <i>Streptomyces</i> ..	45
5.9	Southern Hybridisierung	48
5.10	Sequenzanalysen	49
6.	Methoden der Biochemie	49
6.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	49
6.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	49
6.3	Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC™)	50
6.4	Heterologe Expression von Proteinen	51
6.4.1	Expression in <i>E. coli</i>	51
6.4.2	Expression in <i>S. lividans</i> TK24	51
6.4.3	Expression in <i>S. lividans</i> T7.....	51
6.5	Reinigung der Gyrase aus <i>S. lividans</i> TK24-Transformanden.....	52
6.5.1	Heparin-Affinitätschromatographie	52
6.5.2	Novobiocin-Affinitätschromatographie	52
6.6	Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel- Affinitätschromatographie.....	53
6.7	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	53
6.8	Enzym-Assays.....	54
6.8.1	Enzym-Assays für Typ-II-Topoisomerasen.....	54

6.8.2	Amidsynthetase-Assay	54
7.	Chemische Synthesen	55
7.1	Darstellung der 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	55
7.2	Darstellung des 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure-2-ethylesters... ..	55
7.3	Darstellung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	56
8.	Analytik niedermolekularer Substanzen	57
8.1	Säulenchromatographie zur Vorreinigung der chemischen Syntheseprodukte	57
8.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	58
8.2.1	Geräte, Säulen und Fließmittel	58
8.2.2	Analytik und Isolierung der chemischen Syntheseprodukte	58
8.2.3	Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte der Amidsynthetase-Reaktion.....	59
8.2.4	Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Amidsynthetase- Reaktion	60
8.3	Massenspektrometrie (MS)	61
8.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	62
8.5	LC-MS und Selected Reaction Monitoring (SRM)	62
III	Ergebnisse	65
1.	Resistenzgene der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten	65
1.1	DNA-Sequenzierung, computergestützte Sequenzanalyse und Hybridisierungsversuche	65
1.1.1	Identifizierung und Sequenzanalyse der putativen Resistenzgene <i>gyrB^R</i> , <i>parY^R</i> , <i>novA</i> und <i>couR5</i>	65
1.1.2	Detektion verschiedener Typ II-Topoisomerase-Gene im Genom der Aminocoumarin-Produzenten mittels Southern Blotting	72
1.2	Funktionelle Untersuchungen in vivo.....	74
1.2.1	Heterologe Expression der Resistenzgene <i>gyrB^R</i> , <i>parY^R</i> , <i>novA</i> und <i>couR5</i> in <i>Streptomyces lividans</i> TK24 und Resistenztests in vivo... ..	74
1.2.2	Komplementierungsversuche mit <i>gyrB⁻</i> - und <i>parE⁻</i> -Mutanten von <i>E.</i> <i>coli</i>	78
2.	Überexpression und Reinigung von GyrB ^R und ParY ^R und funktionelle Charakterisierung in vitro	79
2.1	Reinigungsversuche mit Novobiocin-Sepharose	79
2.2	Reinigungsversuche als (His) ₆ -Fusionsproteine aus <i>E. coli</i>	80
2.3	Überexpression als (His) ₆ -Fusionsproteine in <i>Streptomyces lividans</i> und Reinigung durch Affinitätschromatographie.....	80
2.4	Funktionelle Untersuchung von gereinigtem GyrB ^R und ParY ^R in vitro ..	83
3.	Überexpression, Reinigung und Charakterisierung der Amidsynthetase CouL aus der Coumermycin-Biosynthese	88

3.1	Die Amidsynthetase-Reaktion in der Aminocoumarin-Biosynthese	88
3.2	Synthese und Strukturaufklärung des genuinen Substrats 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	88
3.3	Sequenzanalyse des Gens <i>couL</i> aus dem Coumermycin A ₁ -Biosynthesegencluster	92
3.4	Heterologe Expression von CouL in <i>E. coli</i> als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein	94
3.5	Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Amidsynthetase CouL aus <i>S. rishiriensis</i>	95
3.5.1	Identifizierung der Reaktionsprodukte	95
3.5.2	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes	98
3.5.3	Abhängigkeit der Amidsynthetase-Aktivität von Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren	98
3.5.4	Bestimmung der kinetischen Parameter	99
3.5.5	Einfluss der Ring-B-Konzentration auf die Amidsynthetase-Aktivität von CouL	100
3.5.6	Substratspezifität	101
IV	Diskussion	104
1.	Typ-II-Topoisomerasen in der Gattung <i>Streptomyces</i>	104
2.	Resistenzmechanismen der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten.....	107
2.1	Die Aminocoumarin-resistenten Topoisomerase-II-Untereinheiten GyrB ^R und ParY ^R	107
2.2	Die Transporter-Gene <i>novA</i> und <i>couR5</i>	111
3.	CouL, eine ungewöhnliche Amidsynthetase aus der Coumermycin-Biosynthese.....	112
3.1	Identifizierung von <i>couL</i> als Gen für die Amidsynthetase	112
3.2	Bildung beider Amidbindungen durch CouL in vitro.....	113
3.3	Biochemische Eigenschaften von CouL	117
3.4	Substratspezifität von CouL und seiner Homologe NovL und CloL	117
V	Zusammenfassung	119
VI	Literatur	121

Abkürzungen

(His) ₆	Hexahistidin
°C	Grad Celsius
μ	mikro
6xHis	Hexahistidin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding Cassette
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bidest	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cfu	Kolonienbildende Einheiten (colony forming units)
C _q	quartäres Kohlenstoff-Atom
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
dem	demineralisiert
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Deutsche Stammsammlung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	electron impact
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
Gyr	Gyrase
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration, die 50%iger Hemmung führt
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
k	kilo
kb	Kilobasen
kDNA	Kinetoplast DNA
K _m	Michaelis-Menten-Konstante

M	molar
m	Masse
MIC	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrum
MW	Molekulargewicht
n	nano
NCBIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
p	pico
p.a.	zur Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
ppm	parts per million
RBS	ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
QRDR	Chinolon-Resistenz-vermittelnde Region
Ring A	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
Ring B	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin
R _T	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRM	Selected Reaction Monitoring
TMS	Tetramethylsilan
Topo	Topoisomerase
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit
UV	ultraviolett
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
V	Volt
v	Volumen
x g	Erdbeschleunigung

I Einleitung

1. Gyrase und Topoisomerase IV als Zielmoleküle von Antibiotika

DNA Topoisomerasen sind Enzyme, die die Topologie, d.h. die räumliche Anordnung der DNA in der Zelle regulieren (Champoux, 2001). Grundsätzlich gibt es zwei Typen von Topoisomerasen, die sich in ihrem Reaktionsmechanismus unterscheiden. Typ-I-Topoisomerasen schneiden immer nur einen DNA-Strang, während Topoisomerasen vom Typ II ihre Aufgaben durch Doppelstrangbrüche unter Verbrauch von chemischer Energie in Form von ATP ausführen (Champoux, 2001). Auf diese Weise können positive und negative Überspiralisierungen (Supercoils) beseitigt werden oder negative Überspiralisierungen in ein DNA-Molekül eingeführt werden. Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Topoisomerasen in einer Zelle wird die DNA-Topologie sehr fein kontrolliert. Jeder bisher bekannte Organismus besitzt mindestens ein Enzym von jedem der beiden Typen (Champoux, 2001).

Seit der Entdeckung der Topoisomerasen besteht großes Interesse an dieser Gruppe von Enzymen. Sie sind an nahezu allen Vorgängen des DNA-Stoffwechsels wie Transkription, Replikation und Rekombination (Champoux, 2001) beteiligt. Außerdem wurden sie bald, vor allem Topoisomerasen vom Typ II, als Zielmoleküle von Chemotherapeutika in der Krebstherapie und in der Therapie bakterieller Infektionen entdeckt.

Topoisomerase I

Typ-I-Topoisomerasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur Einzelstrangbrüche ausführen und dazu keine Energie in Form von ATP benötigen. Diese Enzyme sind monomer aufgebaut. Aufgrund wesentlicher Unterschiede in Sequenz, Struktur und Reaktionsmechanismus lassen sich die Typ-I-Topoisomerasen in zwei Unterfamilien einteilen. Während die Topo I von Bakterien (Subfamilie IA) nur negativ überspiralisierte DNA entspannen kann, ist die eukaryotische Topo I (IB) in der Lage Superhelices beider Vorzeichen zu entspannen. Neben der Topoisomerase I gehört auch die Topoisomerase III zu den Typ-I-Topoisomerasen. Sie kommt sowohl bei Prokaryoten als auch bei Eukaryoten vor und gehört zur Subfamilie IA (Champoux, 2001). Das Vorkommen und die Funktionen der Topoisomerasen sind in Tabelle I-1 zusammengefasst.

Topoisomerase II

Auch Typ-II-Topoisomerasen werden in zwei Subfamilien eingeteilt, wobei der Familie IIB bisher nur eine in Archaeobakterien gefundene Topoisomerase (Topo VI)

(Buhler et al., 1998) zugeordnet wird. Alle anderen bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen und die eukaryotische Topoisomerase II (Topo II) gehören zur selben Unterfamilie (IIA). Die Enzyme dieses Typs sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Die eukaryotische Topo II besteht aus zwei identischen Untereinheiten (Goto und Wang, 1984). In Bakterien kommen zwei Enzyme dieser Unterfamilie vor, die jeweils ein Tetramer aus zwei verschiedenen Untereinheiten bilden. Die Gyrase besteht aus den Untereinheiten GyrA und GyrB (Reece und Maxwell, 1991), die Topoisomerase IV (Topo IV) aus den Untereinheiten ParC und ParE (Kato et al., 1992). Die B-Untereinheit der Gyrase zeigt Homologien zu ParE der Topo IV und zum N-terminalen Teil der eukaryotischen Topo II. Ebenso korrespondiert GyrA mit ParC und dem C-terminalen Teil der Topo II (Champoux, 2001).

Tabelle I-1: Einteilung der Topoisomerasen

Klassifizierung		Aufbau	Wichtigste Reaktion(en)	
Typ-I-Topoisomerasen				
Prokaryoten	Topoisomerase I	Monomer	Relaxation	negativ
	Topoisomerase III	Monomer	superhelikaler DNA	
			Relaxation	negativ
			superhelikaler DNA	
Eukaryoten	Topoisomerase I	Monomer	Relaxation	negativ und positiv
	Topoisomerase III		superhelikaler DNA	
	(Isoenzyme α und β mit 2 bzw. 3 Isoformen)	Monomer	Relaxation	negativ
			superhelikaler DNA	
Typ-II-Topoisomerasen				
Prokaryoten	Gyrase	Tetramer	Einführung von	negativen
		GyrA ₂ GyrB ₂	Supercoils; Relaxation	negativ
			superhelikaler DNA	
	Topoisomerase IV	Tetramer	Decatenierung von	DNA-
		ParC ₂ ParE ₂	Molekülen nach der	Replikation; Relaxation
			superhelikaler DNA	negativ
Eukaryoten	Topoisomerase II	Dimer aus	Relaxation	negativ und positiv
	(Isoenzyme α und β mit 2 Isoformen)	identischen Untereinheiten	superhelikaler DNA	

Der ATP-abhängige Transport eines DNA-Doppelstranges durch einen zweiten Doppelstrang durch Typ-II-Topoisomerasen ist an mehreren topologischen DNA-Transformationen beteiligt wie der Catenierung und Decatenierung von doppelsträngiger DNA nach der DNA-Replikation und der Entspannung positiver und

negativer Überspiralisierungen. Die Fähigkeit, negative Supercoils in DNA einzuführen, ist einzigartig für die bakterielle Gyrase (Reece und Maxwell, 1991). Tabelle I-1 fasst das Vorkommen, den Aufbau und die wichtigsten Aufgaben der Topoisomerasen zusammen.

Als erste Typ-II-Topoisomerase wurde die DNA-Gyrase von *E. coli* (Gellert et al., 1976a) entdeckt. Ihre Fähigkeit, negative Supercoils in DNA einzuführen, ist für die Bakterienzelle lebensnotwendig, da viele DNA-Ableseprozesse das Vorhandensein negativ überspiralisierter DNA voraussetzen (Wang, 1998). Außerdem wird durch die Überspiralisierung das Bakterienchromosom so kondensiert, dass es in der Zelle Platz findet (Reece und Maxwell, 1991). Bei der Supercoiling-Reaktion werden zwei Windungen pro Reaktionszyklus in die Doppelhelix eingeführt (Reece und Maxwell, 1991). Dazu wird zunächst ein je nach Enzym-Typ unterschiedlich großes DNA-Segment an das Enzym gebunden. Nach dem Doppelstrangbruch werden die DNA-Enden über die freien Phosphat-Gruppen kovalent an Tyrosin-Reste des Enzyms gebunden. Ein zweites doppelsträngiges DNA-Segment wird durch die Lücke hindurchgeführt, und die DNA-Enden werden wieder miteinander verknüpft (Kampranis et al., 1999). Gehören die beiden beteiligten Segmente zum selben DNA-Molekül, führt diese Reaktion zu Relaxation des Moleküls. Sind zwei verschiedene DNA-Moleküle involviert, werden diese cateniert oder decateniert. Die einzigartige Fähigkeit zum Supercoiling der Gyrase hat ihre Ursache darin, dass sie ein größeres DNA-Segment gerichtet (in positiver Richtung) um das Enzym zu wickeln vermag, wobei das C-terminale Ende der GyrA-Untereinheit eine besondere Rolle zu spielen scheint (Kampranis und Maxwell, 1996). Der aktive Tyrosin-Rest für die Bindung der DNA-Enden liegt in der N-terminalen 64 kDa großen Domäne der A-Untereinheit (bzw. ParC-Untereinheit der Topo IV), die für den Strangbruch und das Wiederverschließen der DNA-Enden verantwortlich ist. Die N-terminale Domäne (43 kDa) der GyrB-Untereinheit ist für die Bereitstellung der Energie durch Hydrolyse von ATP zuständig. Über den C-Terminus (47 kDa) wird die Interaktion mit der A-Untereinheit gewährleistet. Dies gilt entsprechend für ParE der Topo IV (Wang, 1998). Ohne ATP kann die Gyrase in direkter Umkehr der Supercoiling-Reaktion negative Überspiralisierungen relaxieren, jedoch läuft diese Reaktion mindestens 20fach langsamer ab als die Supercoiling-Reaktion (Gellert et al., 1979). Bereits kurz nach der Entdeckung der Gyrase von *E. coli* wurde auch ihre Bedeutung als Zielmolekül für Antibiotika entdeckt (Gellert et al., 1976b; Gellert et al., 1977). Die meisten Bakterien besitzen neben der DNA-Gyrase auch noch die zweite bei Prokaryoten vorkommende Typ-II-Topoisomerase, die Topoisomerase IV. In den Genomen einiger Bakterien konnten jedoch keine Gene für eine Topoisomerase IV gefunden werden. Zu diesen gehören beispielsweise *Mycobacterium* und *Corynebacterium* (Cole et al., 1998; Ikeda und Nakagawa, 2003). Die Aufgaben der

Topo IV können, wenn auch weniger effektiv, von der Gyrase übernommen werden, d.h. die Gyrase kann Topo-IV-Defekte bis zu einem gewissen Grad komplementieren, der umgekehrte Fall ist jedoch nicht möglich (Kato et al., 1992).

1.1 Chinolone

Entwicklung der Chinolone

Chinolone gehören aufgrund ihrer Herkunft zu den Chemotherapeutika und nicht zu den Antibiotika im engeren Sinne, da sie rein synthetischen Ursprungs sind und nicht von lebenden Organismen produziert werden. Diese Klasse umfasst nicht nur Verbindungen mit Chinolon-Grundstruktur sondern auch Naphthyridone, Pyridopyrimidone und Cinnolone (Petersen, 2001).

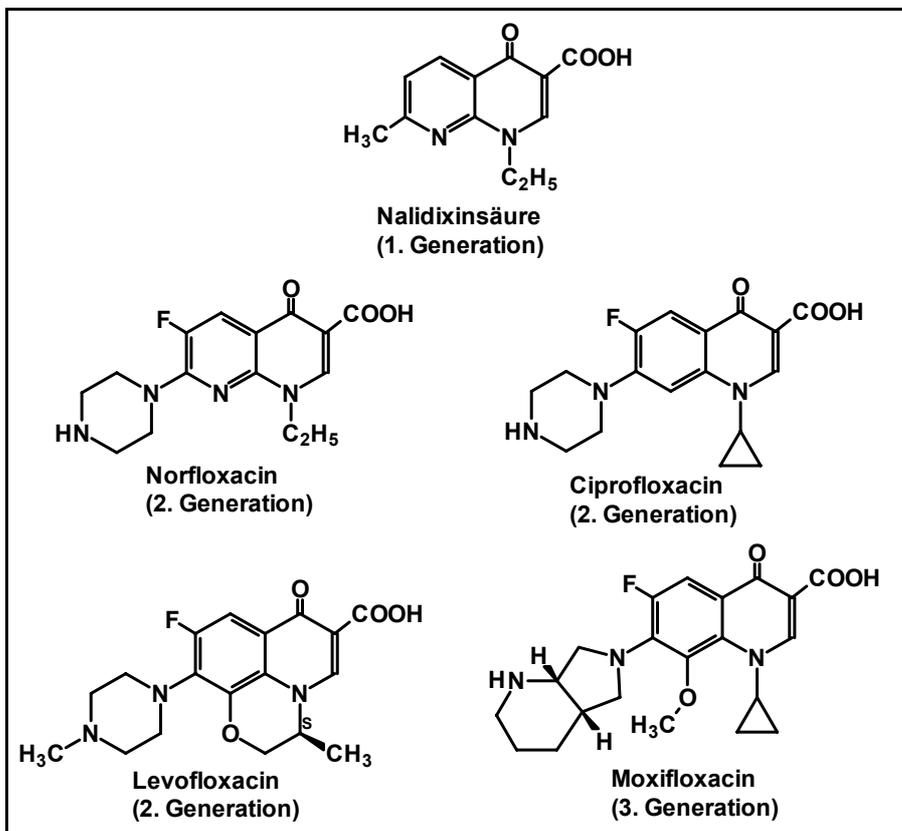


Abbildung I-1: Strukturen einiger Chinolon-Antibiotika

Der Prototyp dieser Substanzklasse ist die 1962 als Nebenprodukt der Chloroquin-Synthese entdeckte Nalidixinsäure (Abb. I-1), die antibiotische Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien zeigt (Lescher et al., 1962). Seitdem wurde eine große Zahl neuer Verbindungen synthetisiert und die Wirksamkeit der Substanzen immer weiter verbessert. Durch Einführung eines Fluor-Substituenten in Position 6 und weitere

Veränderungen der Substituenten konnte die Wirksamkeit gegenüber Nalidixinsäure wesentlich verstärkt und das Wirkungsspektrum auch auf grampositive Erreger erweitert werden. Die schrittweise Weiterentwicklung dieser Substanzklasse wird durch die Einteilung in „Generationen“ ausgedrückt. Neuere Vertreter der Chinolon-Antibiotika gehören in die 3. Generation (Petersen, 2001). Abbildung I-1 zeigt einige wichtige Vertreter der Chinolone aus allen 3 Generationen.

Fortschritte im Verständnis des Wirkmechanismus' und der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Fluorchinolone auch im Bezug auf die unerwünschten Arzneimittelwirkungen dieser Substanzgruppe werden auch in Zukunft zur Weiterentwicklung dieser Klasse von Antibiotika führen. In den letzten Jahren stieg die Zahl der in der Entwicklung befindlichen Substanzen an, und über 10.000 Verbindungen wurden bereits patentiert (Andersson und MacGowan, 2003).

Wirkungsmechanismus

Lange Zeit hielt man die Gyrase für den einzigen klinisch relevanten Angriffspunkt dieser Substanzklasse, bis für *Staphylococcus aureus* die Topo IV als primäres Target der Fluorchinolone identifiziert werden konnte (Ferrero et al., 1994). In-vitro-Studien und die Untersuchung von auftretenden Resistenzen führten zu der grundsätzlichen Aussage, dass in gramnegativen Bakterien die Gyrase, in vielen grampositiven Organismen dagegen die Topoisomerase IV das primäre Target darstellen (Ferrero et al., 1994; Pan et al., 1996). Es gibt Ausnahmen zu dieser Regel in Abhängigkeit vom Organismus und der Substanz (Pan und Fisher, 1997).

Reaktionsmechanismus und Angriffsort der Chinolone sind noch nicht vollständig bekannt, jedoch geben experimentelle Daten einige Hinweise. Es konnte nachgewiesen werden, dass Chinolone an den Enzym-DNA-Komplex binden, der durch die Chinolon-Bindung stabilisiert wird (Gellert et al., 1977; Sugino et al., 1977). Dadurch wird die weitere Replikation oder Transkription unterbrochen. Zusätzlich kommt es zu einer „Stress-Reaktion“ der Zelle. Die dauerhafte Aktivierung dieser SOS-Reaktion in der Bakterien-Zelle führt zum Zusammenbruch der Membranintegrität und schließlich zum Zelltod. Dieser Mechanismus wird durch die starke Abschwächung der bakteriziden Wirkung vor allem älterer Chinolone durch Hemmstoffe der Proteinbiosynthese wie Chloramphenicol bestätigt (Drlica und Zhao, 1997). Ein weiterer Mechanismus, der nicht durch Proteinsynthese-Hemmstoffe antagonisiert wird, ist die Freisetzung von DNA-Enden aus dem Enzym-DNA-Komplex durch höhere Fluorchinolon-Konzentrationen. Fluorchinolone wirken in niedrigen Konzentrationen nur bakteriostatisch, d.h. ihre bakterizide Wirksamkeit ist konzentrationsabhängig (Chen et al., 1996).

Die beschriebenen Wirkungen kommen durch eine Bindung der Fluorchinolone an die GyrA-Untereinheit der Gyrase bzw. ParC-Untereinheit der Topo IV zustande. Für die Gyrase von *E. coli* wurde die so genannte „quinolone resistance-determining

region“ (QRDR) beschrieben, die die Aminosäuren 67 bis 107 umfasst (Yoshida et al., 1990). Diese Region liegt nahe der Aminosäure Tyr-122, die für die kovalente Bindung der DNA-Phosphat-Gruppen während der DNA-Strang-Passage verantwortlich ist.

Indikationen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Die älteren, nicht-fluorierten Chinolone sollten heute nicht mehr eingesetzt werden, da sie in ihrer antibakteriellen Aktivität gegenüber den fluorierten Chinolonen deutlich schwächer sind. Eine Experten-Gruppe der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG) für Chemotherapie hat eine Einteilung der in Deutschland verfügbaren Fluorchinolone in vier Gruppen vorgeschlagen (Homepage der Zeitschrift für Chemotherapie, www.zct-berlin.de). Wichtigste Kriterien dieser Einteilung sind das antibakterielle Spektrum, die Pharmakokinetik und die Indikationen. Die Einteilung mit Beispielen ist in der Tabelle I-2 dargestellt.

Tabelle I-2: Einteilung der Fluorchinolone nach Gruppen nach Empfehlung der PEG (Listung innerhalb der Gruppe nach aufsteigender Aktivität in vitro).

*Nicht mehr im Handel

Gruppe	Definition	Beispiele
I	Orale Fluorchinolone mit im wesentlichen auf Harnwegsinfektionen eingeschränkter Indikation	Norfloxacin Pefloxacin*
II	Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation (Harnwegsinfekte, Atemwegsinfekte; Haut-, Weichteil-, Knocheninfektionen)	Enoxacin Fleroxacin Ofloxacin Ciprofloxacin
III	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger (Chlamydien und Mycoplasmen)	Levofloxacin Sparfloxacin* Grepafloxacin*
IV	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger sowie gegen Anaerobier	Trovafoxacin* Gatifloxacin Moxifloxacin

Einige Fluorchinolone der 2. und 3. Generation mussten aufgrund schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) kurz nach ihrer Markteinführung wieder aus dem Handel genommen werden. Dazu gehörten beispielsweise Temafloxacin, Trovafoxacin und Grepafloxacin. Die schweren UAW dieser Substanzen hängen vermutlich mit speziellen Struktur-Eigenschaften zusammen und sind keine „Klassen-Effekte“. Wie alle antimikrobiell wirksamen Arzneimittel so besitzen auch Chinolone das Potential für gastrointestinale Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Kardiale Effekte, ZNS-Störungen, Phototoxizität und die Gefahr einer Sehnenruptur (insbesondere der Achillessehne) gehören zu den so genannten „Klassen-Effekten“

und sind mehr oder weniger stark ausgeprägt (Ball, 2003). Eine Verlängerung des QT-Intervalls ist nachweisbar, spielt jedoch außer bei Risikopatienten für die zugelassenen Substanzen keine wesentliche Rolle. Zu den ZNS-assoziierten UAW gehören Schlafstörungen, Benommenheit, Kopfschmerzen und Müdigkeit. In sehr seltenen Fällen wurden auch psychotische Reaktionen mit Halluzinationen oder Depressionen mit einer Chinolon-Behandlung in Verbindung gebracht. Die phototoxische Wirkung einiger Fluorchinolone hängt mit der Halogensubstitution in Pos. 8 des Grundgerüsts dieser Substanzen zusammen. Ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Achillessehnenruptur konnte vor allem für Ofloxacin festgestellt werden. Es scheint ein Zusammenhang des Risikos dieser UAW mit höherem Lebensalter (>60 Jahre) und der gleichzeitigen Anwendung bestimmter weiterer Arzneimittelgruppen zu bestehen (Stahlmann und Riecke, 2001).

Resistenzen gegen Fluorchinolone

Resistenzen gegen Chinolon-Antibiotika beruhen auf zwei Mechanismen: Veränderung des Zielmoleküls und geringere Pharmaka-Konzentration in der Bakterienzelle.

Klinisch relevante Mutationen in der A-Untereinheit der *E.-coli*-Gyrase betreffen meist die Aminosäuren Ser83 und/oder Asp87 (Yoshida et al., 1990). Weitere nachgewiesene Mutationen sind ebenfalls in der QRDR lokalisiert (Drlica und Zhao, 1997). Entsprechende Mutationen in der ParC-Untereinheit führen zu Resistenzen in grampositiven Kokken (Ser80 und Glu84 bei *S. aureus*) (Tanaka et al., 1997). Desweiteren werden auch Mutationen in der GyrB-Untereinheit in Kombination mit GyrA-Veränderungen mit erhöhter Chinolon-Resistenz in Verbindung gebracht (Hedde und Maxwell, 2002). Einige neuere Chinolone scheinen gleichgute Affinität zu beiden bakteriellen Topoisomerasen zu besitzen, was die Entwicklung von Resistenzen verlangsamt (Zhao et al., 1997).

Neben der Veränderung des Zielmoleküls spielen auch Veränderungen in der Porin-Struktur einiger Krankheitserreger eine Rolle, was zu einer verminderten Aufnahme der Pharmaka führt. Sehr häufig führen unspezifischen Efflux-Pumpen zu Resistenzen gegen viele Antibiotika, darunter auch Chinolone (Hawkey, 2003).

1.2 Aminocoumarine

Herkunft

Die drei klassischen Aminocoumarin- oder nur Coumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ werden von Vertretern der Gattung *Streptomyces* produziert (Berger und Batcho, 1978). Novobiocin wurde Mitte der 1950er Jahre erstmals beschrieben. Später folgten Coumermycin A₁ und Clorobiocin. Allen drei Strukturen gemeinsam ist der Aminocoumarin-Ring (Ring B) mit glykosidisch

angeknüpftem Zucker (Noviose, Ring C). Die Unterschiede liegen in der Acyl-Gruppe an Pos. 3' des Zuckers und in der Säure-Komponente, die eine Amidbindung mit dem Aminocoumarin-Ring bildet (Abbildung I-5, Seite 14).

Der Aminocoumarin-Ring ist auch Bestandteil der ebenfalls antibiotisch wirksamen Verbindungen Simocyclinon und Rubradirin (Abbildung I-2). Auch hierbei handelt es sich um Naturstoffe, die von *Streptomyces*-Arten synthetisiert werden (Schimana et al., 2000; Bhuyan et al., 1965). Die Biosynthese dieser Verbindungen war in den letzten Jahren ebenfalls Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Über den genauen Wirkungsmechanismus sind jedoch keine Daten in der Literatur zugänglich.

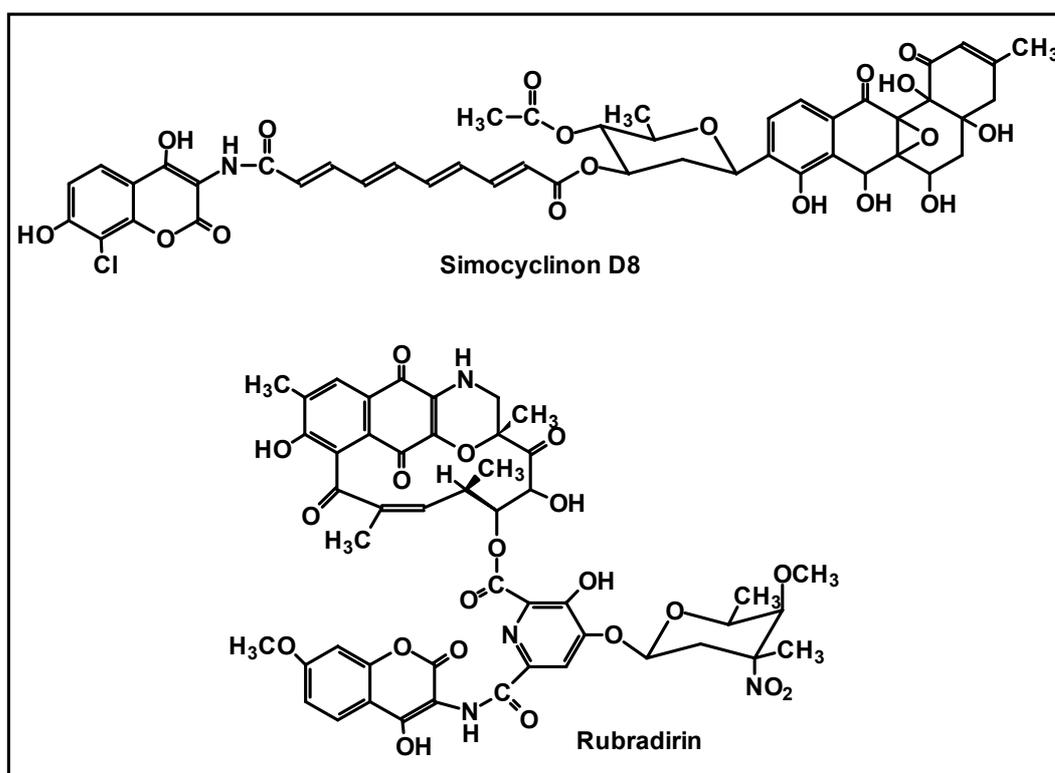


Abbildung I-2: Strukturen von Simocyclinon D8 und Rubradirin

Wirkungsmechanismus und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Bereits kurz nach der ersten Beschreibung der bakteriellen DNA-Gyrase wurde ihre Hemmbarkeit durch Coumarinantibiotika festgestellt (Gellert et al., 1976b). Anders als die Chinolone interagieren die Coumarine mit den B-Untereinheiten der bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen. Sie sind kompetitive Inhibitoren der ATPase-Aktivität, die in der 43 kDa umfassenden N-terminalen Domäne von GyrB lokalisiert ist (Maxwell, 1993). Die Bindung von Novobiocin und Clorobiocin an die 24-kDa-Subdomäne der Gyrase B von *E. coli* ist röntgenstrukturspektroskopisch untersucht worden (Lewis et al., 1996; Tsai et al., 1997). Die Bindungsstelle der

Aminocoumarine ist nicht mit der von ATP identisch, die Bindungsstellen überlappen jedoch. Aufgrund dieser Studien sind die für die Proteinbindung wichtigen Strukturelemente der Aminocoumarine gut bekannt. Abbildung I-3 zeigt schematisch die Wechselwirkungen zwischen Novobiocin und der GyrB-Untereinheit von *E. coli*.

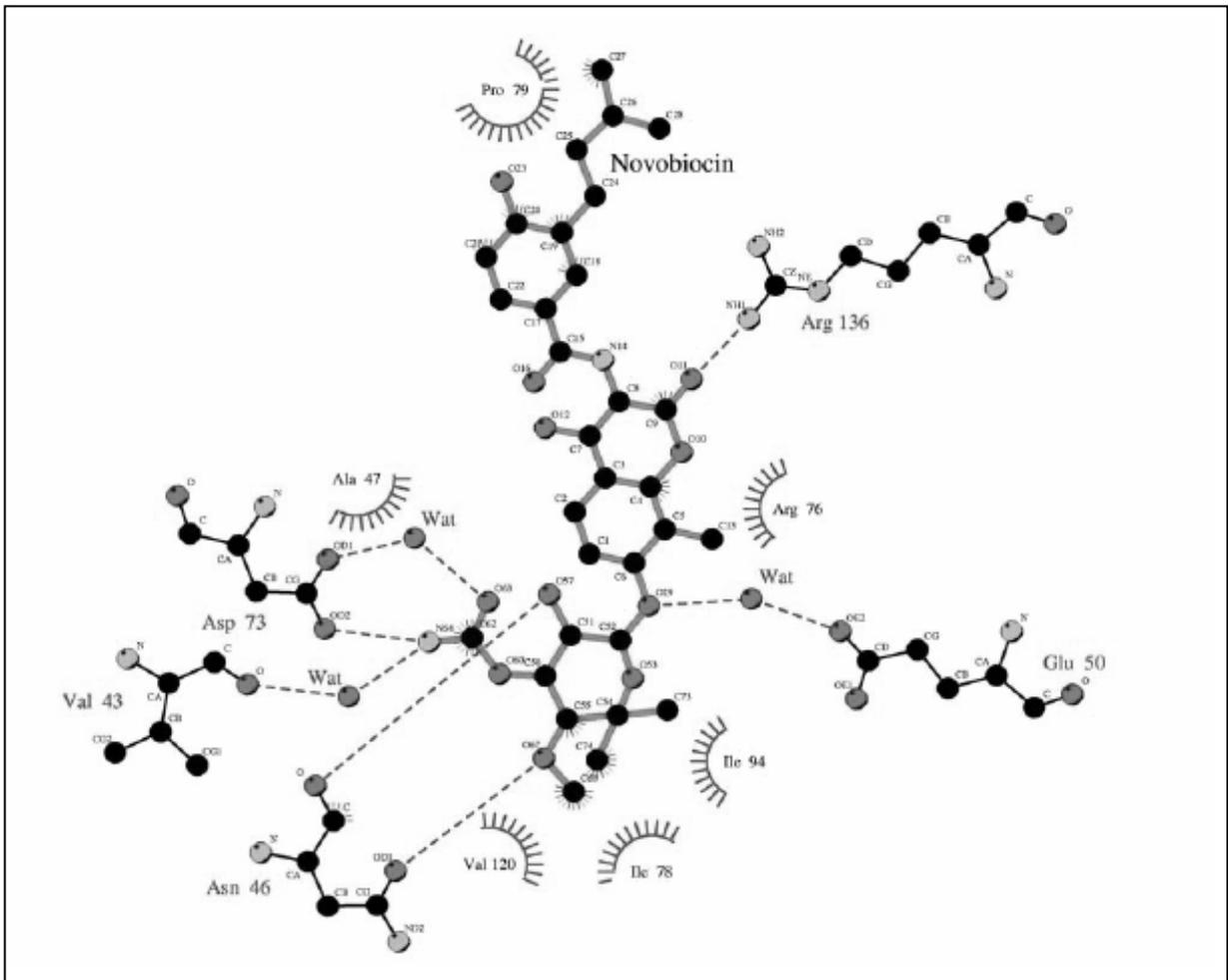


Abbildung I-3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen GyrB und Novobiocin. Nach Maxwell und Lawson, 2003

Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Aminocoumarin-Ringes und Arg136 ist die wichtigste Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Enzym. An der Novobiocin-GyrB-Bindung sind außerdem noch eine Reihe weiterer Wasserstoffbrücken zwischen dem substituierten Zucker-Anteil des Moleküls und verschiedenen Aminosäuren beteiligt. Dazu kommen noch verschiedene hydrophobe Wechselwirkungen (Maxwell und Lawson, 2003). Die Testung einzelner Strukturelemente gab weiteren Aufschluss über die für die antibiotische Wirksamkeit verantwortlichen Molekülteile. Ring A und Ring B alleine sowie Novobiocinsäure (Ring B mit Ring A) zeigten *in vitro* keine Hemmung der Supercoiling-Aktivität der Gyrase. Novenamin, d.h. der Coumarin-Ring mit dem Zucker war hingegen aktiv

(Reusser und Dolak, 1986). Dies belegt die Bedeutung des Coumarin- und des Zucker-Anteils im Molekül. Clorobiocin besitzt eine höhere antibiotische Wirksamkeit und auch in vitro eine stärkere Hemmung der Gyrase als Novobiocin (Hooper et al., 1982). Zwei Strukturelemente unterscheiden Novobiocin und Clorobiocin, zum einen das Chloratom anstelle der Methylgruppe am Aminocoumarin-Ring und zweitens der Methylpyrrolcarbonsäure-Substituent am Zucker statt der Carbamoyl-Gruppe. Beide Unterschiede tragen vermutlich zur höheren Effektivität des Clorobiocins gegenüber Novobiocin bei (Eustáquio et al., 2003a; Hooper et al., 1982). Der Substituent am Zucker spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Aminocoumarine mit dem Zielmolekül. Das Fehlen des Substituenten hat einen Verlust der Wirksamkeit zur Folge, der Transfer von der 3''- auf die 2''-Position führt zu einer starken Reduktion der Wirksamkeit (Hooper et al., 1982; Westrich et al., 2003). Die Substitution des Aminocoumarin-Ringes spielt für die Hemmung der Enzymaktivität ebenfalls eine wichtige Rolle. Das Fehlen oder die Veretherung der Hydroxylgruppe in Pos. 4 resultieren in einen Verlust der Wirksamkeit. 8-Desmethyl-Derivate besitzen eine reduzierte Wirksamkeit (Rádl, 1990). Der Acyl-Substituent an der Aminogruppe des Aminocoumarin-Ringes hat großen Einfluss sowohl auf die Enzymhemmung in vitro als auch auf die Penetration in die Bakterienzelle (Rádl, 1990; Laurin et al., 1999b). Die synthetische und semisynthetische Herstellung und Testung zahlreicher Aminocoumarin-Derivate wurde in der Literatur beschrieben (Keil et al., 1971; Laurin et al., 1999a; Musicki et al., 2000; Schio et al., 2001).

Die Literaturangaben zu den IC₅₀-Werten der Aminocoumarine im Supercoiling-Assay mit *E.-coli*-Gyrase liegen im nM-Bereich (Gormley et al., 1996).

Für die Hemmung der eukaryotischen Topoisomerase II sind wesentlich höhere Konzentrationen von Novobiocin notwendig als für die Hemmung der bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen (Pocklington et al., 1990).

Wirkungen und Anwendung

Novobiocin wurde in den USA als Albamycin[®] der Firma Upjohn zugelassen. Zwar belegen sowohl in-vitro-Studien als auch klinische Studien die gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen grampositive Keime, gerade auch gegen Problemkeime (Walsh et al., 1985; Raad et al., 1998; French et al., 1993), jedoch verhinderten schwere Nebenwirkungen und häufige und schnelle Resistenzentwicklung eine breitere Anwendung des Antibiotikums. Ein Einsatz war nur als orales Reserveantibiotikum bei schweren Infektionen insbesondere durch multiresistente Staphylokokken in Fällen von Unverträglichkeit oder Therapieversagen anderer Antibiotika vertretbar (Packungsbeilage von Albamycin[®]). Gramnegative Bakterien sind aufgrund geringer Permeabilität durch die Bakterienzellwand wenig empfindlich gegen Aminocoumarine (Maxwell, 1997). In der Packungsbeilage von Albamycin werden als häufige UAW starke Hautreaktionen wie Urtikaria und Dermatitis genannt. Weniger häufig traten

Leberfunktionsstörungen und Blutbildveränderungen auf. Novobiocin stand nur in oraler Applikationsform zur Verfügung. In der Veterinärmedizin wird Novobiocin beispielsweise in Kombination mit Penicillin zur Behandlung boviner Mastitis eingesetzt (Thornsberry et al., 1997).

Therapieresistente Tumore stellen in der Tumorthherapie ein großes Problem dar. Die Kombination von verschiedenen Arzneistoffen ist ein Lösungsansatz für dieses Problem. In zahlreichen präklinischen und klinischen Studien wurde die agonistische Wirkung von Novobiocin mit Antitumor-Medikamenten belegt. Novobiocin verstärkt die cytotoxische Wirkung der Topoisomerase-II-Hemmstoffe Etoposid und Teniposid. Es wurde jedoch festgestellt, dass diese Wirkungsverstärkung nicht auf einer zusätzlichen Hemmung der Topo II durch Novobiocin beruht sondern vielmehr auf einer Hemmung des Auswärtstransports von Etoposid und Teniposid (Rappa et al., 1992; Rappa et al., 2000). Die Verstärkung der cytotoxischen Wirkung von Alkylantien wie Cyclophosphamid und Cisplatin beruht auf einer Hemmung der Topoisomerase II, wodurch DNA-Reparatur-Mechanismen unterbunden werden (Eder et al., 1991; Ali-Osman et al., 1993; Schwartz et al., 1993). Als weitere Wirkung von Novobiocin wurde die Interaktion mit dem eukaryotischen Hitzeschock-Protein Hsp90 (Marcu et al., 2000) beschrieben. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Stabilität und Funktion vieler Zellsignalsubstanzen wie einigen onkogenen Tyrosinkinasen. Hsp90 wird daher auch als neues Zielmolekül in der Antikrebs-Therapie in Betracht gezogen. Kürzlich wurde entdeckt, dass Novobiocin in der Lage ist, die Expression des Glycoproteins CD38 in Myelom-Zellen zu induzieren. Dies führt zu einer antiproliferativen Wirkung durch Reifung und Differenzierung dieser Zellen (Thiele et al., 2002).

Coumermycin A₁ ist sehr schlecht wasserlöslich und bei oraler Applikation wird es nur zu einem sehr geringen Anteil resorbiert. Im Blut liegt es zu einem hohen Anteil an Serumproteine gebunden vor. Vor allem ihre schlechten physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften standen daher der Anwendung von Clorobiocin und Coumermycin A₁ als Arzneimittel im Wege (Godfrey und Price, 1972).

Resistenzen gegen Aminocoumarine

Bekannte Resistenzen gegen Aminocoumarinantibiotika beschränken sich im Wesentlichen auf Veränderungen in der B-Untereinheit der bakteriellen DNA-Gyrase. Literaturdaten über andere Resistenzmechanismen wie aktiven Efflux oder Veränderung der Membranpermeabilität liegen bisher nicht vor.

Die am häufigsten beschriebenen Mutationen betreffen die Aminosäure Arg136 der B-Untereinheit der Gyrase von *E. coli*. Diese Mutation hat allerdings einen negativen Einfluss auf die Supercoiling-Aktivität der Gyrase. Arg136 ist eine bis auf wenige bekannte Ausnahmen stark konservierte Position der GyrB-Untereinheit. Die

resistenzvermittelnde Eigenschaft von Mutationen in der entsprechenden Position wurde auch für andere Organismen wie *S. aureus* (Arg144) (Stieger et al., 1996), *Borrelia burgdorferi* (Arg136) (Samuels et al., 1994) und *Haloferax* (Arg138) (Holmes und Dyall-Smith, 1991) beschrieben. Eine weitere in natürlichen Isolaten auftretende Mutation in *E. coli* ist die Mutation von Gly164. Durch gezielte Mutationen in vitro konnten auch die resistenzvermittelnden Eigenschaften von Mutationen in den Positionen Asp73, Gly77, Ile78 und Thr165 nachgewiesen werden (Gross et al., 2003). Dies lässt sich auch gut durch die Röntgenstrukturanalyse der Aminocoumarin-GyrB-Bindung erklären (s. Abbildung I-3). Neben Arg144 sind für *S. aureus* auch Mutationen von Gly85 (entspricht Gly77 in *E. coli*) und Ile102 (entspricht Ile94 in *E. coli*) als resistenzvermittelnd gegen Novobiocin beschrieben. Dieselben Autoren berichten, dass für eine nennenswerte Resistenz der Gyrase gegen Coumermycin zwei Mutationen gleichzeitig notwendig seien. Damit im Zusammenhang steht möglicherweise eine langsamere Resistenzentwicklung gegen Coumermycin als gegen Novobiocin. *Streptococcus pneumoniae* ist ein Beispiel für das Fehlen der konservierten Position Arg136. Für diesen Organismus ist eine Änderung der Aminosäure Ser127 als Resistenzmechanismus gegen Novobiocin beschrieben (Munoz et al., 1995). Diese Position entspricht Val120 der Gyrase B von *E. coli*, für die zumindest hydrophobe Wechselwirkungen mit Novobiocin und Clorobiocin postuliert werden (Abbildung I-3). Del Castillo et al. (1991) konnten zeigen, dass die Überexpression der Aminocoumarin-sensitiven GyrB-Untereinheit durch Bindung der Hemmstoffe ebenfalls zu einer gewissen Resistenz führt. Hardy und Cozzarelli (2003) zeigten kürzlich durch gezielte Mutation der Topo-IV-Untereinheit ParE von *E. coli*, dass die Arg136-entsprechende Position Arg132 zu einer Novobiocin-Resistenz der Topo IV führt.

1.3 Cyclothialidine

Cyclothialidin ist ein Sekundärstoff aus *Streptomyces filipinensis* (Nakada et al., 1993) mit einer völlig anderen Struktur als die der Aminocoumarine. Es handelt sich um ein Pentapeptid mit einem zwölfgliedrigen Lactonring. Cyclothialidin und seine Derivate sind jedoch ebenfalls kompetitive Hemmstoffe der ATPase-Aktivität der Gyrase-B-Untereinheit (Nakada et al., 1995). Cyclothialidine besitzen eine andere Bindungsstelle an die 24-kDa-Subdomäne der GyrB-Untereinheit als die Aminocoumarine, jedoch überlappt auch sie mit der ATP-Bindungsstelle (Lewis et al., 1996). Studien in *S. aureus* zeigten, dass andere Mutationen in der GyrB-Untereinheit zu Resistenzen gegen Cyclothialidine als gegen Aminocoumarine führen (Stieger et al., 1996). Die IC₅₀-Werte für die Supercoiling-Aktivität der Gyrase von *E. coli* in vitro liegen ebenfalls im nM-Bereich und sind für die Cyclothialidine mindestens um den Faktor 2 geringer als für die Aminocoumarine (Nakada et al.,

1993; Oram et al., 1996). Die antibakterielle Wirkung ist jedoch relativ gering (Oram et al., 1996; Yamaji et al., 1997).

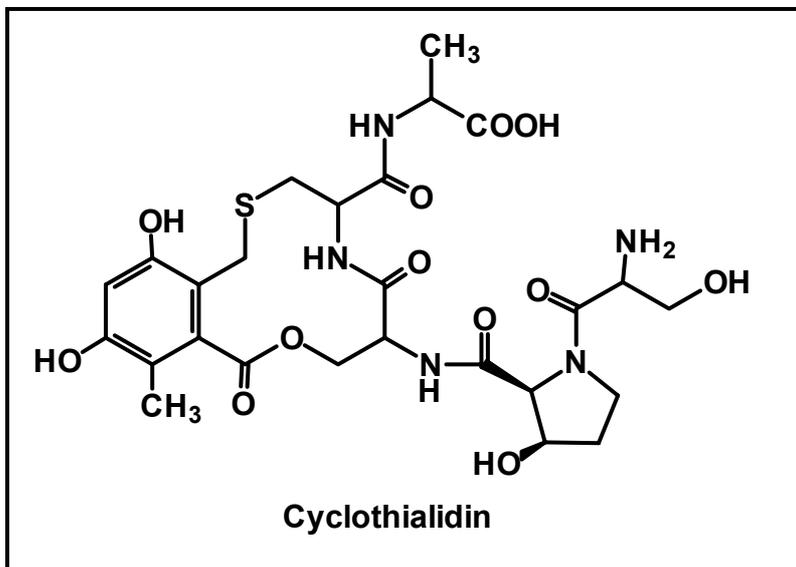


Abbildung I-4: Struktur von Cyclothialidin

2. Biosynthese der Aminocoumarinantibiotika

Die drei „klassischen“ Coumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ stammen aus dem Sekundärstoffwechsel verschiedener *Streptomyces*-Arten. Bei den Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* und *S. niveus* handelt es sich möglicherweise um zwei Isolate desselben Stammes, und beide werden mittlerweile auch unter Bezeichnung *S. caeruleus* (Lanoot et al., 2002) zusammengefasst. Clorobiocin wird ebenfalls von mehreren Stämmen produziert: *S. hygrosopicus*, *S. albocinerescens* und *S. roseochromogenes* var. *oscitans*. Coumermycine werden von *S. rishiriensis*, *S. hazeliensis* var. *hazeliensis*, *S. spinichromogenes* und *S. spinicoumarensis* synthetisiert. Neben dem Hauptprodukt Coumermycin A₁ wurden in diesen Organismen weitere eng verwandte Verbindungen gefunden (Claridge et al., 1984).

Im Novobiocin ist der für diese Antibiotika-Klasse typische 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Ring (Ring B) über eine Amidbindung mit 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A) verknüpft (s. Abbildung I-5). An Position 8 des Coumarin-Ringes befindet sich eine Methylgruppe, die 7-OH-Gruppe ist mit dem Desoxyzucker Noviose verethert. Die Noviose trägt an Position 3 einen Carbamoyl-Substituenten. Clorobiocin unterscheidet sich von dieser Struktur an zwei Positionen. Die Methylgruppe am Aminocoumarin-Ring wird durch ein Chloratom ersetzt und der Substituent an Position 3 des Zuckers ist statt der Carbamoyl-Gruppe eine

5-Methylpyrrol-2-carbonsäure. Coumermycin A₁ trägt am Zucker den gleichen Substituenten wie Clorobiocin und am Aminocoumarin-Ring wie Novobiocin eine Methylgruppe (Position 8). Zwei dieser Pyrrol-substituierten Novenam-in-Einheiten (Ring B+Zucker) sind an eine zentrale 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure über Amidbindungen gekoppelt.

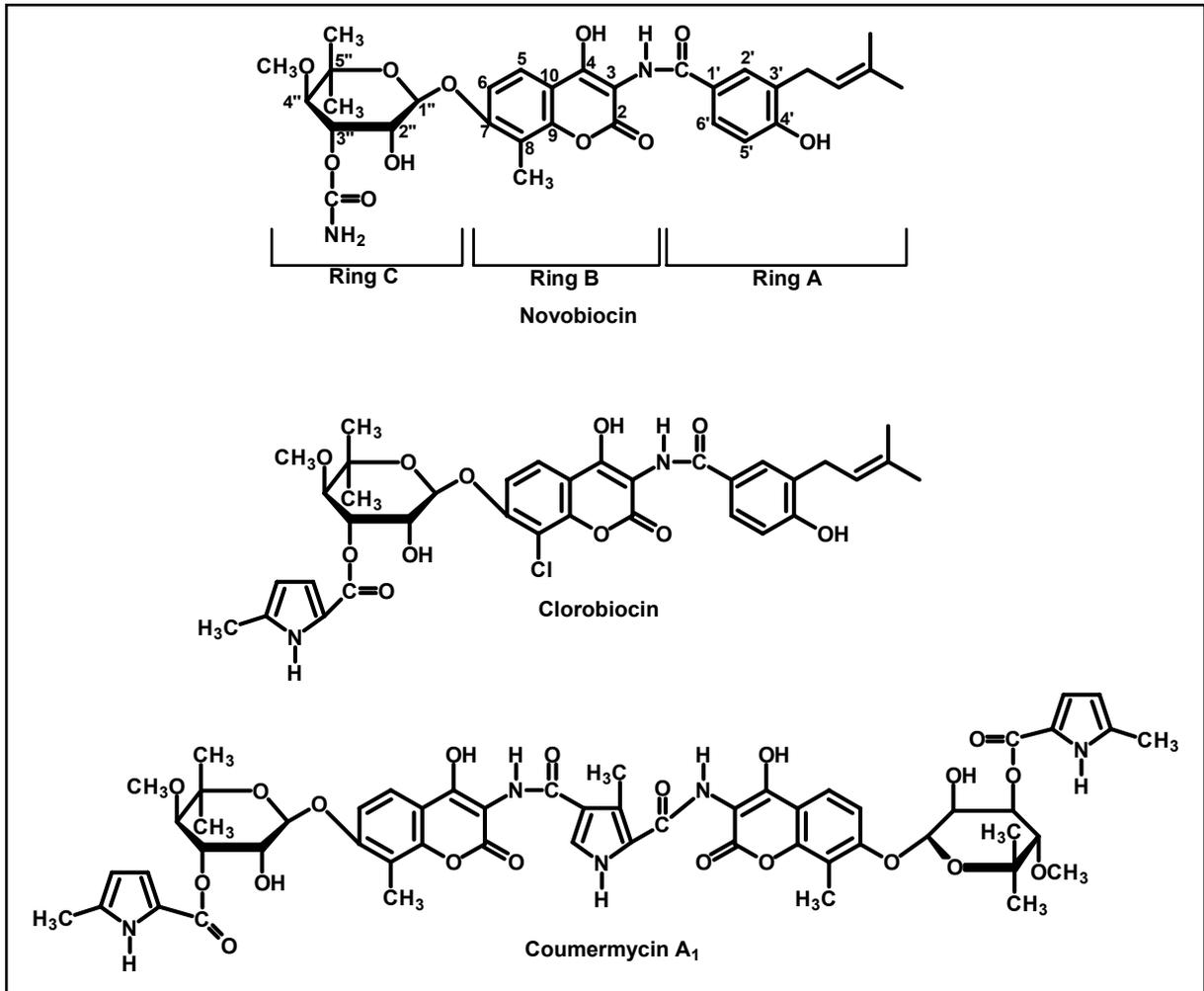


Abbildung I-5: Strukturen der drei klassischen Aminocoumarinantibiotika

Die detaillierte Aufklärung einzelner Biosynthese-Schritte wurde durch die Klonierung und Sequenzierung der drei Biosynthesegencluster möglich. Das Cluster des Novobiocins wurde als erstes kloniert und sequenziert (Steffensky et al., 2000b). Aufgrund von Datenbankvergleichen konnten mögliche Funktionen einiger Gene, wie beispielsweise für die Zuckerbiosynthese zugeordnet werden. Die Sequenzierung des Coumermycin-A₁-Biosynthesegenclusters (Wang et al., 2000) gab aufgrund der Übereinstimmungen von Genen im Zusammenhang mit gemeinsamen Strukturelementen schon nähere Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Gene, beispielsweise der Biosynthese des Aminocoumarin-Ringes. Nachdem auch das

dritte Cluster, das des Clorobiocins (Pojer et al., 2002), vorlag, wurde deutlich, wie gut die Organisation der Biosynthesegencluster der Aminocoumarinantibiotika die strukturellen Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Verbindungen widerspiegelt (s. Abbildung I-6). Mittlerweile konnten die Funktionen vieler Gene durch Inaktivierungsversuche und Proteinexpressions-Experimente nachgewiesen werden.

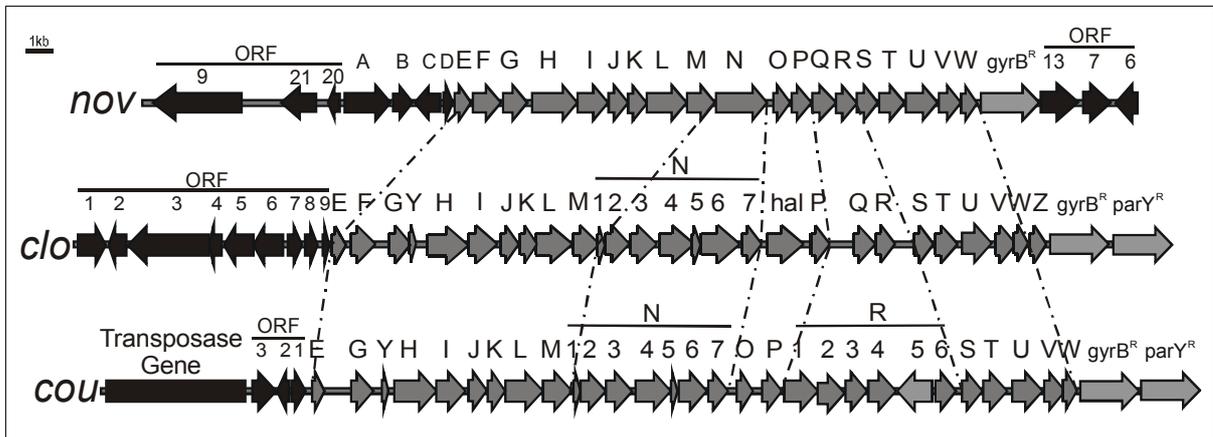


Abbildung I-6: Schematische Darstellung der Biosynthesegencluster von Novobiocin (oben), Clorobiocin (Mitte) und Coumermycin A₁ (unten)

Simocyclinon und Rubradirin enthalten ebenfalls einen substituierten Aminocoumarin-Ring. Noviose ist in diesen Strukturen jedoch nicht vorhanden und die Acyl-Komponenten sind größer und komplexer als bei den klassischen Aminocoumarinen. Untersuchungen zur Biosynthese von Simocyclinon sind für den Produzenten *S. antibioticus* TÜ 6040 (Galm et al., 2002; Trefzer et al., 2002) beschrieben. Die Biosynthese des Rubradirins von *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061 ist ebenfalls Gegenstand von laufenden Forschungen (Sohn et al., 1997).

NovL, die Amidsynthetase der Novobiocin-Biosynthese

Die Verknüpfung der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure mit dem Aminocoumarin-Ring zur Novobiocinsäure ist ein zentraler Schritt in der Biosynthese des Novobiocins. Die Aktivität der Novobiocinsäure-Synthetase konnte bereits im Rohextrakt von *S. niveus* nachgewiesen werden (Kominek und Meyer, 1975). Diese Reaktion war ATP-abhängig, was dafür sprach, dass die Carboxylgruppe von Ring A bei der Reaktion aktiviert wird. Der Mechanismus konnte jedoch nicht aufgeklärt werden.

Nach der Sequenzierung des Novobiocin-Biosynthesegenclusters war ein funktioneller Nachweis der Beteiligung dieser Gene an der Novobiocin-Biosynthese erforderlich. Steffensky et al. (2002) konnten diesen Nachweis durch Identifizierung und Charakterisierung der Novobiocinsäure-Synthetase erbringen. Novobiocinsäure-

Synthetase-Aktivität konnte nach heterologer Expression eines 9,7 kb großen Fragmentes aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster in *S. lividans* detektiert werden. Dieses Fragment enthielt zwei Gene, die für Proteine aus der Familie der Adenylat-bildenden Enzyme codieren: *novH* und *novL* (Steffensky et al., 2000a). Die Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme wird in zwei Subgruppen unterteilt (Turgay et al., 1992): Enzyme der Gruppe I, wie beispielsweise nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), enthalten eine hochkonservierte 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle. Nach Aktivierung der Säure als Acyl-Adenylat wird diese über den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor kovalent als Thioester gebunden. Enzymen der Gruppe II, zu denen 4-Coumarat-CoA-Ligasen, Luciferasen und Acetyl-CoA-Synthetasen gehören, fehlt diese 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle. Es kommt nach der Aktivierung der Acyl-Komponente nicht zu einer kovalenten Bindung an das Enzym. NovH konnte aufgrund der Identifizierung der 4'-Phosphopantetheinyl-Bindungsstelle in Gruppe I eingeordnet werden. NovL, dem dieses Motiv fehlt, wurde der Gruppe II zugeordnet.

Die Beteiligung eines oder beider dieser Enzyme an der Bildung der Amidbindung war also denkbar. Schließlich konnte jedoch gezeigt werden, dass NovL alleine für die Bildung der Novobiocinsäure verantwortlich ist, eine Coexpression mit NovH führte zu keiner Aktivitätssteigerung. Für NovH ist mittlerweile die Beteiligung an der Biosynthese von Ring B nachgewiesen (Chen und Walsh, 2001; Pojer et al., 2002). Nach der Überexpression und homogenen Reinigung von NovL konnte die Beteiligung weiterer Enzyme an der Bildung der Amidbindung ausgeschlossen werden.

Die Adenylierungsaktivität von NovL konnte im ATP-PP_i-Austausch-Assay nachgewiesen werden. Ring A wird enzymabhängig adenyliert, nicht jedoch Ring B. Nach Bildung des Säure-AMP-Intermediates erfolgt der Transfer der Acyl-Gruppe auf die Aminogruppe von Ring B. Die Aminocoumarin-Einheit wird offenbar nicht aktiviert. Damit ergibt sich der in Abbildung I-7 schematisch dargestellte Reaktionsablauf für die Bildung der Novobiocinsäure durch NovL.

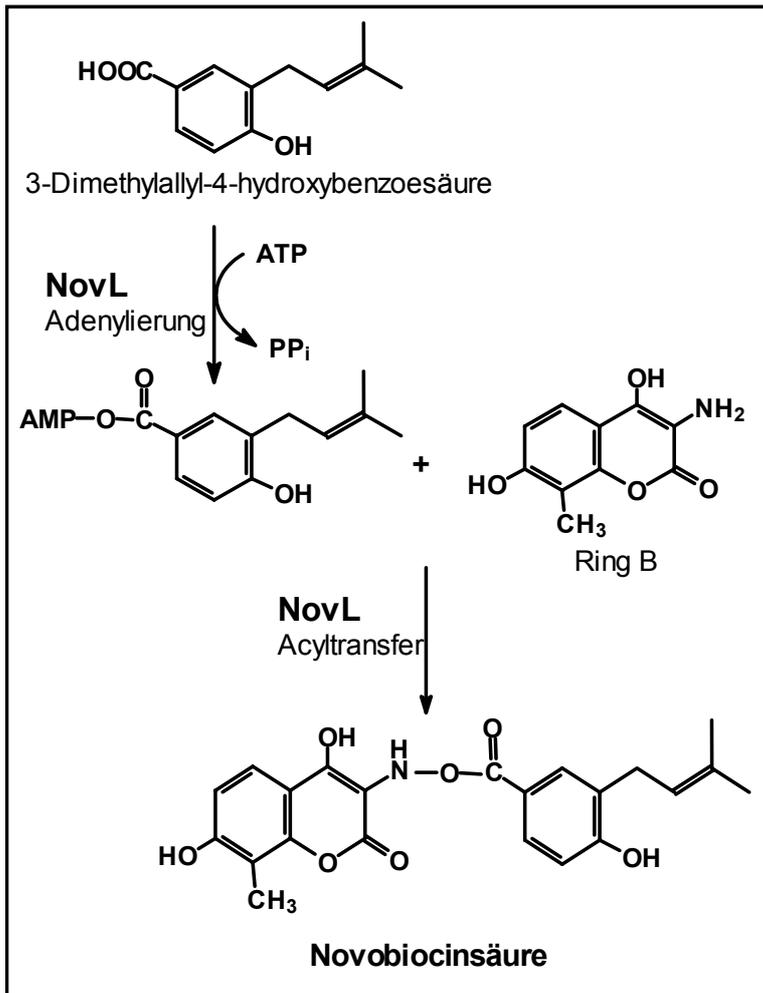


Abbildung I-7:
Schematische
Darstellung der von NovL
katalysierten Reaktionen
bei der Bildung der
Novobiocinsäure

Das etwa 58 kDa große Enzym NovL liegt in seiner aktiven Form als Monomer vor. Die Novobiocinsäure-Synthetase-Aktivität zeigte die für Adenylat-bildende Enzyme typische Abhängigkeit von divalenten Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} . Die Aktivität ist spezifisch für ATP als Nucleotid. Die größte Flexibilität in der Substratspezifität konnte für die Struktur der Acyl-Komponente festgestellt werden. So wurde beispielsweise 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure gut als Substrat akzeptiert. Die K_m -Werte für die natürlichen Substrate betragen $19 \mu M$ für Ring A und $131 \mu M$ für Ring B und liegen damit in einem Bereich, der auch für andere Enzyme aus der Gruppe II der Adenylat-bildenden Enzyme wie beispielsweise 4-Coumarat-CoA-Ligasen berichtet wurde (Lee und Douglas, 1996).

3. Resistenzmechanismen der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten

Alle Antibiotika-produzierenden Organismen müssen sich selbst gegen die toxischen Wirkungen ihres eigenen Sekundärmetaboliten schützen (Cundliffe, 1989). Die

Mechanismen, die den Produzenten dabei zur Verfügung stehen, sind vielfältig. Dazu gehört die Modifikation des Wirkstoffmoleküls, beispielsweise durch N-Acetylierung von Aminogruppen oder O-Phosphorylierung von Hydroxylgruppen, wie es für einige Aminoglykosidantibiotika beschrieben wurde (Cundliffe, 1989). Eine häufig gefundene Form der Veränderung des Targets von Antibiotika ist die enzymatische Methylierung von Ribosomen (Zalacain und Cundliffe, 1989; Weitnauer et al., 2001; Pernodet et al., 1999), worauf beispielsweise auch der häufig verwendete Thiostrepton-Resistenzmarker (*tsr*) beruht (Cundliffe, 1978). Eine andere Möglichkeit der Veränderung des Targets ist die de-novo-Synthese. Ein Beispiel dafür ist der Produzent des Pentalenolactons, der eine zweite, resistente Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase zu exprimieren vermag (Fröhlich et al., 1989). Daneben können die aktiven Substanzen auch intrazellulär gebunden werden, beispielsweise durch spezielle Bindeproteine, oder in membranumgebene Vesikel eingeschlossen werden. Durch passiven oder aktiven Efflux werden viele Metaboliten aus der Zelle ganz entfernt (Cundliffe, 1989; Cundliffe, 1992).

Häufig bedient sich ein Produzent mehrerer solcher Resistenzmechanismen, selbst wenn nur ein einziges Antibiotikum produziert wird (Cundliffe, 1992). Die Expression der Resistenzdeterminanten kann konstitutiv oder induzierbar erfolgen. Dabei kann die Induktion der Expression durch das Antibiotikum selbst oder ein Vorläufermolekül erfolgen, oder es besteht eine direkte Co-Regulation mit der Biosynthese des entsprechenden Antibiotikums. Sehr häufig sind die Gene für die Resistenzdeterminanten daher auch mit den Biosynthesegenen für das Antibiotikum geclustert (Cundliffe, 1992).

Thiara und Cundliffe (1988) beschrieben die Klonierung eines DNA-Abschnittes aus dem Novobiocin-Produzenten *Streptomyces spheroides*, der nach Transformation in *S. lividans* Resistenz gegen hohe Konzentrationen an Novobiocin verlieh (MIC > 750 µg/ml). Durch Novobiocin-Affinitätschromatographie konnte die Gyrase der Novobiocin-resistenten *S.-lividans*-Transformante gereinigt werden. Zwei Formen des Enzyms wurden erhalten. Eine Form eluierte sehr leicht bei niedriger Salzkonzentration, die zweite Form konnte nur unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff (5 M) von der Säule eluiert werden. Das Enzym, das sehr stark an die Säule gebunden hatte, wurde im Supercoiling-Assay bereits bei niedriger Novobiocin-Konzentration stark gehemmt (IC₅₀ = 1,6 µg/ml). Während für die leicht eluierte Gyrase die entsprechende Novobiocin-Konzentration etwa 100fach höher lag. Durch Southern-Blot-Experimente mit *gyrB* und *gyrA* aus *Bacillus subtilis* als Sonden konnte nachgewiesen werden, dass das klonierte Novobiocin-Resistenzvermittelnde DNA-Fragment aus *S. spheroides* nur ein *gyrB*-Gen, jedoch keine mit *gyrA* hybridisierende DNA-Sequenz enthielt. Dies zeigte, dass es sich bei dem entdeckten Resistenzprinzip um eine Novobiocin-resistente Gyrase-B-Untereinheit

(GyrB^R) handeln müsse. Durch weitere Southern-Blot-Untersuchungen konnten die Autoren nachweisen, dass der untersuchte Organismus das Gen für diese resistente GyrB^R-Untereinheit zusätzlich zu dem Gen für eine Novobiocin-sensitive GyrB-Untereinheit (GyrB^S) besitzt. Bei der Sequenzierung des Gens für die sensitive Untereinheit *gyrB^S* wurde auch das Gen für die A-Untereinheit (*gyrA*) in kurzem Abstand zu *gyrB^S* gefunden. Das Gen für *gyrB^R* war dagegen an anderer Stelle im Genom lokalisiert (Thiara und Cundliffe, 1993). Die Aktivität der Novobiocin-resistenten Gyrase konnte im Novobiocin-Produzenten nur detektiert werden, wenn dieser in Anwesenheit von Novobiocin kultiviert worden war. Der Novobiocin-induzierbare Promotor konnte kloniert und näher charakterisiert werden. Der Promotor von *gyrB^R* spricht auf Änderungen des DNA-Überspiralisierungsgrades an, verursacht durch Coumarinantibiotika oder auch Chinolone, und wird bei Abnahme negativer DNA-Überspiralisierung aktiviert (Thiara und Cundliffe, 1989). Das lässt darauf schließen, dass GyrB^S konstitutiv exprimiert wird, während die de-novo-Synthese der resistenten Variante GyrB^R im Zusammenhang mit der Antibiotika-Produktion steht.

Die Klonierung von weiteren resistenzvermittelnden DNA-Abschnitten aus den Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* (Murakami et al., 1983) und *S. niveus* (Mitchell et al., 1990; Hoggarth et al., 1994) wurde beschrieben. Da die durch diese Determinanten verliehenen Resistenzen gegen Novobiocin sehr viel geringer waren (MIC: 50-150 µg/ml), muss es sich dabei um andere als den von Thiara und Cundliffe beschriebenen Mechanismus gehandelt haben. Dazu wurden jedoch keine weiteren Angaben gemacht.

4. Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt des ersten Teiles der Arbeit standen die Identifizierung und die Charakterisierung von Resistenzmechanismen der Aminocoumarin-Produzenten gegen die von ihnen produzierten Antibiotika. Die Existenz einer Aminocoumarin-resistenten Gyrase-B-Untereinheit als Resistenzmechanismus war bereits aus früheren Arbeiten bekannt. Das für diese resistente GyrB-Untereinheit codierende Gen (*gyrB^R*) war in den Biosynthesegenclustern der Aminocoumarinantibiotika bereits identifiziert worden.

Zur Beantwortung dieser Aufgabenstellung waren folgende Arbeiten notwendig:

- Sequenzanalyse der Biosynthesegencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁

- Heterologe Expression der möglichen Resistenzgene in *Streptomyces lividans* und Überprüfung der Resistenz gegen Aminocoumarinantibiotika
- Heterologe Expression der Resistenzgene in einem geeigneten System, homogene Reinigung der Proteine und deren biochemische Charakterisierung

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bildung der beiden Amidbindungen zwischen der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4.-dicarbonsäure und zwei Aminocoumarin-Einheiten während der Biosynthese von Coumermycin A₁ untersucht werden. Die Novobiocinsäure-Synthetase NovL, die für die Amidbindung zwischen der Aminocoumarin-Einheit und 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure im Novobiocin verantwortlich ist, ist bereits charakterisiert worden. NovL besitzt einen ungewöhnlichen Reaktionsmechanismus und katalysiert sowohl die Adenylierung der Säure-Komponente als auch deren Transfer auf die Aminogruppe. Aufgrund von Sequenzvergleichen konnte CouL als mögliche Amidsynthetase der Coumermycin-Biosynthese identifiziert werden. Wie NovL enthält auch CouL nur eine Adenylierungsdomäne. Die zentrale Frage war daher, ob CouL alleine für die Bildung beider Amidbindungen verantwortlich ist, was die Aktivierung zweier sehr unterschiedlicher Säure-Substrate erfordern würde.

Im Hinblick auf diese Zielsetzung sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Chemische Synthese der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure
- Heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der putativen Amidsynthetase CouL

II Material und Methoden

1. Chemikalien, Säulenmaterialien und Enzyme

1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von der Firma Difco (Augsburg) verwendet. Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle II-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile, nach Herstellern geordnet

Hersteller	Bezeichnung
Acros Organics, Schwerte	GTP
	Pyrrol-3-carbonsäure
Alfa Aesar, Karlsruhe	Bronzepulver
Fluka, Taufkirchen	Ethanolamin Spermidin
FMC BioProducts, Rockland, USA	NuSieve®GTG® Agarose
Lancaster, Mühlheim/M.	L-Prolin Pyrrol-2-carbonsäure
Merck, Darmstadt	Brom Phosphorpentoxid Rinderserumalbumin (BSA) Sulfurylchlorid Trifluoressigsäure Uvasol DMSO-d6 Uvasol Methanol-d4
Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA	3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin (Ring B) Novobiocinsäure

Fortsetzung Tabelle II-1

Hersteller	Bezeichnung
Roth, Karlsruhe	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) 1,4-Dithiothreitol (DTT) 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) Maleinsäure Natriumdodecylsulfat (SDS) Roti [®] Phenol/Chloroform (pH 8,0) Rotiphorese [®] Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Polyethylenglycol (PEG) 1000 und 6000 N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) Trichloressigsäure N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanolsulfonsäure (TES) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat (Tris-Maleat)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau G-250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	3-Acetyl-2,4-dimethylpyrrol-5-carbonsäure (3-Carboxy-1,4-dimethyl-2-pyrrolyl)-essigsäure Ammoniumpersulfat (APS) L-Asparagin ATP Bromphenolblau Chloroquin Diphosphat CTP 2,6-Dihydroxypyridin-4-carbonsäure (Citrazinsäure) Dimethylformamid (DMF) 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonensäure-diethylester 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonensäure-4-ethylester 2,6-Dimethylpyridin-3,5-dicarbonensäure Dimethylsulfoxid (DMSO) Imidazol β -Mercaptoethanol 6-Methylpyridin-2,3-dicarbonensäure Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Pyridin-2,6-dicarbonensäure Spermidin Trihydrochlorid TTP
Südzucker, Mannheim	Saccharose, feine Raffinade

1.2 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Trockensubstanzen wurden bei Raumtemperatur, Suspensionen und Fertigsäulen bei 4 °C gelagert.

Tabelle II-2: Säulenmaterialien, nach Herstellern geordnet

Hersteller	Säulenmaterial
Merck, Darmstadt	DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ Kieselgel 60 0,0040-0,063 mm
Amersham Biosciences, Freiburg	Heparin-Sepharose CL-6B (Trockensubstanz) HiLoad 26/60 Superdex (Fertigsäule) Sephadex G-25 PD-10, NAP-10, NAP-5 (Fertigsäulen) Sephadex G-25 Suspension
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Epoxy-activated Sepharose 6 B (Trockensubstanz)

1.2.1 Herstellung von Novobiocin-Sepharose

Die Herstellung der Novobiocin-Sepharose erfolgte nach der Vorschrift von Staudenbauer und Orr (1981).

2,5 g Epoxy-activated Sepharose 6B wurden in 500 ml bidestilliertem Wasser zum Quellen gebracht (1 Stunde bei Raumtemperatur). Die in etwa auf ihr dreifaches Volumen aufgequollene Sepharose wurde über ein Glassinterfilter (Porengröße G3) filtriert und mit 500 ml einer Lösung von 0,3 M NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9,5 (Carbonat-Puffer) gewaschen. Die Kopplung des Novobiocins an die Epoxy-Gruppen erfolgte durch Zugabe von 500 mg Novobiocin, gelöst in 25 ml Carbonat-Puffer, bei 37 °C im Wasserbad 16 h (über Nacht) unter Schütteln. Anschließend wurde die Novobiocin-Sepharose filtriert und das überschüssige Novobiocin mit bidestilliertem Wasser ausgewaschen. Zur Blockade freier Epoxy-Gruppen wurde die Novobiocin-Sepharose in 25 ml 1M Ethanolamin in Carbonat-Puffer resuspendiert und weitere 8 h bei 37 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Die fertige Novobiocin-Sepharose wurde anschließend noch zweimal abwechselnd mit je 500 ml 0,5 M NaCl in Carbonat-Puffer, H₂O_{bidest}, 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat-Lösung, pH 4,0 und H₂O_{bidest} gewaschen. Die Lagerung erfolgte in Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 bei 4 °C im Dunkeln.

1.3 Enzyme und Kits

In der folgenden Tabelle sind Enzyme, DNA- und Protein-Größenstandards und Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, aufgeführt. Lagerung und Anwendung erfolgte nach den Vorschriften der Hersteller.

Tabelle II-3: Enzyme, Größenstandards und Kits, nach Herstellern geordnet

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	DNase I
	Klenow-Fragment
	Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis
	Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit
	Restriktionsendonukleasen
	T4-DNA-Ligase
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	1 kb DNA-Leiter
	DNA Gyrase
	Precision Protein Standards™
Macherey-Nagel, Düren	NucleoBond® PC 100 Kit
	NucleoSpin® Extract
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen
Promega	<i>Pfu</i> DNA Polymerase
	<i>Taq</i> DNA Polymerase
	Topoisomerase I
Qiagen	QIAEX II Gel Extraction Kit II
	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II
	DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysozym
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande	Restriktionsendonukleasen
	<i>Taq</i> 2000 DNA Polymerase
Topogen, Columbus, Ohio, USA	Kinetoplast DNA (kDNA)

2. Nährmedien und Puffer

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. Falls erforderlich erfolgte die Zugabe von getrennt sterilisierten Lösungen und hitzelabiler Substanzen wie Antibiotika nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen.

2.1 Nährmedium zur Kultivierung von *E. coli*

Als Nährmedium für *E. coli* wurde Lurient-Broth (LB) (Sambrook und Russell, 2001) als Flüssig- und Festmedium verwendet. Das Medium enthielt pro Liter 10,0 g NaCl, 10,0 g Trypton und 5,0 g Hefeextrakt bei einem pH von 7,0. Dem Festmedium wurden 1,5-2% Agar zugesetzt.

2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Streptomyces*

Tabelle II-4: Nährmedien zur Kultivierung von *Streptomyces*

Medium	Zusammensetzung	Herstellung		
CDM	tri-Natrium-Citrat x 2 H ₂ O	6,0 g	Die ersten fünf Bestandteile in H ₂ O _{bidest} lösen und mit HCl auf pH 7,2 einstellen, restliche Bestandteile zugeben und mit NaOH pH 7,2 einstellen, Volumen auf 900 ml auffüllen	
	L-Prolin	6,0 g		
	K ₂ HPO ₄	1,6 g		
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g		
	NaCl	5,0 g		
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,05 g		
	CaCl ₂	0,4 g		
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g		
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g		
		nach dem Autoklavieren zugeben:		
	Glucose 30% (m/v)	100,0 ml		
CRM	Saccharose (Südzucker)	103,0 g	Bestandteile in H ₂ O _{dem} lösen, pH 7,0 einstellen und auf 1 l auffüllen	
	Tryptic Soy Broth	20,0 g		
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,12 g		
	Hefeextrakt	10,0 g		
	Glycin	7,5 g		
		nach dem Autoklavieren zugeben:		
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)	10,0 ml		
HA	Hefeextrakt	4,0 g	Bestandteile in H ₂ O _{dem} oder Leitungswasser (für Sporengewinnung) lösen, pH 7,3 einstellen und auf 1 l auffüllen	
	Malzextrakt	10,0 g		
	Glucose	4,0 g		
		nach dem Autoklavieren zugeben:		
		CaCl ₂ x 2 H ₂ O (1 M)		1,0 ml
		für Festmedium zusätzlich:		
	Agar	20,0 g		

Fortsetzung Tabelle II-4

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
Minimal Medium	L-Asparagin	0,5 g	Bestandteile in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen, pH 7,0 einstellen und auf 1 l auffüllen
	K_2HPO_4	0,5 g	
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g	
	$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g	
	Agar	20,0 g	
	nach dem Autoklavieren zugeben: Glucose 50% (m/v)	20,0 ml	
R2YE	Saccharose	103,0 g	Bestandteile zu 1 l in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen
	K_2SO_4	0,25 g	
	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	10,12 g	
	Glucose	10,0 g	
	Casaminosäuren	0,1 g	
	Hefeextrakt	5,0 g	
	TES	5,73 g	
	Spurenelementlösung	2,0 ml	
	Agar	20,0 g	
	nach dem Autoklavieren zugeben: K_2HPO_4 (0,5%)	10,0 ml	
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (5 M)	4,0 ml	
	L-Prolin (20%)	15,0 ml	
NaOH (1M)	7,0 ml		
S-Medium	Pepton	4,0 g	Bestandteile in 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen; Glucose und MgSO_4 zusammen in 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ lösen und getrennt von der ersten Lösung autoklavieren
	Hefeextrakt	4,0 g	
	K_2HPO_4	4,0 g	
	KH_2PO_4	2,0 g	
	Glycin	10 g	
	nach dem Autoklavieren zugeben: Glucose	10,0 g	
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g	
YMG	Hefeextrakt	4,0 g	Bestandteile in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ lösen, pH 7,3 einstellen und auf 1 l auffüllen
	Malzextrakt	10,0 g	
	Glucose	4,0 g	
YEME	Saccharose (Südzucker)	340,0 g	Bestandteile zu 1 l in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ lösen
	Hefeextrakt	3,0 g	
	Pepton	5,0 g	
	Malzextrakt	3,0 g	
	Glucose	10,0 g	
	Nach dem Autoklavieren zugeben: $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (2,5 M)	2,0 ml	

Fortsetzung Tabelle II-4

Medium	Zusammensetzung	Herstellung	
YEME-PEG (Thiara und Cundliffe, 1988)	Hefeextrakt	3,0 g	Bestandteile zu 1 l in H ₂ O _{dem} lösen
	Pepton	5,0 g	
	Malzextrakt	3,0 g	
	Glucose	10,0 g	
	PEG 6000	5,0 g	
	Nach dem Autoklavieren zugeben:		
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O (2,5 M)	2,0 ml	
Spurenelemente	ZnCl ₂	40 mg	Bestandteile in 1 l H ₂ O _{bidest} lösen
	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	

2.3 Antibiotika

Antibiotikallösungen wurden auf Vorrat hergestellt und bei -20 °C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in Ethanol und DMSO wurden nicht sterilisiert. Antibiotika in Festmedien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlung des Mediums auf unter 60 °C zugesetzt.

Tabelle II-5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml] (Lösungsmittel)	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
Apramycin	100 (H ₂ O)	100	Fluka
Carbenicillin	50 (H ₂ O)	50	Roth
Chloramphenicol	25 (Ethanol)	12,5	Merck
Coumermycin A ₁	50 (DMSO)	50	Sigma-Aldrich
Kanamycin	50 (H ₂ O)	10 und 50	Sigma-Aldrich
Novobiocin	50 (H ₂ O)	50	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	25 (Ethanol)	12,5	Sigma-Aldrich
Thiostrepton	50 (DMSO)	20-50	Calbiochem

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle II-6: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und *Streptomyces* und von genomischer DNA aus *Streptomyces*. Alle Lösungen wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt und mit Ausnahme von Lösung 2 autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Lösung 1A	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	EDTA	10 mM
	RNase	100 µg/ml
Lösung 1B	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	Glucose	50 mM
	EDTA	10 mM
Lösung 2	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (m/v)
Lösung 3	Kaliumacetat	3 M
	pH 4,8	
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM (pH 8,0)
	EDTA	1 mM
TSE-Puffer	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	Saccharose	10,3% (m/v)
	EDTA	25 mM

2.4.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle II-7: Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese. Alle Lösungen wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt und bei RT gelagert. Die Elektrodenpuffer wurden autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
5 x TBE-Puffer	Tris Base	90 mM
	Borsäure	90 mM
	EDTA	10 mM
	pH 8,0	
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl	2 M (pH 7,8)
	Natriumacetat	0,5 M
	EDTA	50 mM
Ladepuffer	Glycerin	30% (m/v)
	Bromphenolblau	0,25% (m/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	1 mg/l

2.4.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von *Streptomyces*

Die verschiedenen Bestandteile wurden einzeln in H₂O_{bidest} gelöst, autoklaviert und anschließend steril gemischt. Die Puffer wurden bei -20 °C gelagert.

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

Puffer	Zusammensetzung	
Protoplastierungspuffer (P-Puffer)	Saccharoselösung [12% (m/v)]	85,5 ml
	Spurenelementelösung (s. 2.2)	0,2 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	1,0 ml
	MgCl ₂ (1 M)	1,0 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	1,0 ml
	CaCl ₂ (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 ml
	Spurenelementelösung (s. 2.2)	0,03 ml
	K ₂ SO ₄ (140 mM)	0,1 ml
	MgCl ₂ (1 M)	0,1 ml
	KH ₂ PO ₄ (40 mM)	0,1 ml
	CaCl ₂ (250 mM)	1,0 ml
	Tris-Maleat (0,5 M, pH 8,0)	1,0 ml
H ₂ O	2,0 ml	

2.4.4 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Tabelle II-9: Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung. Alle Puffer wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt und bei RT gelagert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,5	
Blocking-Puffer (frisch hergestellt)	Magermilchpulver gelöst in 100 ml Maleinsäurepuffer	3,0 g
Detektionspuffer	Tris-HCl	100 mM (pH 9,5)
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
Depurinierungslösung	HCl	250 mM
Denaturierungslösung	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris-HCl	0,5 M
	NaCl	3 M

Fortsetzung Tabelle II-9

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
20 x SSC	NaCl	3 M
	tri-Natrium-Citrat	0,3 M
	pH 7,0	
Prähybridisierungs-Puffer	20 x SSC	25,0 ml
	Magermilchpulver	3,0 g
	SDS [10% (m/v)]	0,2 ml
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)]	0,29 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 ml
Hybridisierungs-Puffer	20 x SSC	2,5 ml
	Magermilchpulver	0,15 g
	SDS [10% (m/v)]	0,02 ml
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)]	0,029 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 10,0 ml
2 x Waschpuffer	20 x SSC	10,0 ml
	SDS [10% (m/v)]	1,0 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 ml
0,5 x Waschpuffer	20 x SSC	5,0 ml
	SDS [10% (m/v)]	1,0 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 ml
Tween-Waschpuffer	Tween 20	0,2 ml
	Maleinsäure-Puffer	100,0 ml

2.4.5 Puffer zur Proteinreinigung

Alle zur Proteinreinigung verwendeten Puffer wurden mit H₂O_{bidest} hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle II-10: Puffer zur Reinigung der Gyrase aus *Streptomyces* mittels Novobiocin-Affinitätschromatographie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Aufschlusspuffer	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	50 mM (pH 7,4)
	Saccharose	10% (m/v)
	KCl	87 mM
	DTT	0,1 mM
	PMSF	1 mM
Brij-Lösung (frisch hergestellt)	Brij 58	5% (m/v)

Fortsetzung Tabelle II-10

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Puffer B	HEPES	25 mM (pH 8,0)
	KCl	50 mM
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerin	10% (v/v)
Aufbewahrungspuffer A	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	50 mM (pH 7,6)
	DTT	1 mM
	EDTA	0,2 mM
	Glycerin	50% (v/v)

Tabelle II-11: Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
	Lysozym	1 mg/ml (<i>E. coli</i>) 8 mg/ml (<i>Streptomyces</i>)
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Aufbewahrungspuffer B	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	Glycerin	10% (v/v)
	DTT	5 mM
	PMSF	50 µM
Puffer C	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	150 mM

2.4.6 Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung

70 mg Serva Blau R 250 wurden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 100 ml 85 % Phosphorsäure (m/v) gemischt. Diese Lösung wurde anschließend mit H₂O_{bidest} zu 200 ml verdünnt. Diese 5 x Stammlösung wurde bei 4 °C in einem Glasgefäß im Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:5 mit H₂O_{bidest} verdünnt und über ein Faltenfilter filtriert. (Bradford, 1976)

3. Plasmide und Bakterienstämme

3.1 Plasmide

Tabelle II-12: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Hersteller
Litmus 28	Klonierungsvektor, Amp ^r , M13-Origin, ColE1-Origin, lacZ α	New England Biolabs
Litmus 38	Klonierungsvektor, Amp ^r , M13-Origin, ColE1-Origin, lacZ α	New England Biolabs
pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor, Amp ^r , f1(-)-Origin, ColE1-Origin, lacZ α	Stratagene
pBR322	Klonierungsvektor, Amp ^r , Tet ^r , pMB1-Origin, <i>rop</i>	Promega
pET-24a(+)	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^r , f1-Origin, pMB1-Origin, T7-Promotor, Sequenz für C-terminalen (His) ₆ -tag	Novagen
pGEM-3Zf(-)	Klonierungsvektor, Amp ^r , f1(-)-Origin, ColE1-Origin, lacZ α	Promega
pGEM-11Zf(+)	Klonierungsvektor, Amp ^r , f1(-)-Origin, ColE1-Origin, lacZ α	Promega
pQE70	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^r , ColE1-Origin, T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen (His) ₆ -tag	Qiagen
pRSETB	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp ^r , ColE1-Origin, pUC-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₆ -tag	Invitrogen
SuperCos 1	Cosmidvektor, Amp ^r , Neo ^r , S40-Origin	Stratagene

Tabelle II-13: Plasmide und Cosmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
Cosmid 4-2H	Cosmid aus der Genbank von <i>S. rishiriensis</i> DSM 40489, enthält rechte Region des Coumermycin-A ₁ -Clusters in SuperCos 1	(Wang et al., 2000)
Cosmide 10-9C 9-6G	Cosmide aus der Genbank von <i>S. spheroides</i> NCIMB 11891, enthalten Gene des Novobiocin-Clusters in SuperCos 1	(Steffensky, 2000)
p10-9CE2	4,2 kb <i>EcoRI</i> -Fragment aus 10-9C in pBluescript SK(-), enthält <i>novV</i> bis <i>gyrB^R</i>	M. Steffensky, persönliche Mitteilung
pAG111	Expressionskonstrukt für <i>gyrB</i> aus <i>E. coli</i> ; <i>bla</i> ; <i>tac</i> -Promotor	(Hallett et al., 1990)
pGM9	<i>Streptomyces</i> Vektor; <i>aphII</i> , <i>ble</i> , <i>tsr</i>	(Muth et al., 1989)

Fortsetzung Tabelle II-13

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMS63	11,8 kb <i>NotI-HindIII</i> -Fragment aus 9-6G in pBluescript SK(-), enthält Orf21 bis <i>novG</i>	M. Steffensky, persönliche Mitteilung
pMS90	Überexpressionskonstrukt mit <i>couL</i> ; <i>couL</i> nach PCR-Amplifikation in pQE70 kloniert (<i>SphI-BglII</i>)	M. Steffensky, persönliche Mitteilung
pUWL201	<i>E.-coli-Streptomyces</i> -Shuttle-Vektor, <i>ble</i> , <i>tsr</i> , konstitutiver ermEp [*] -Promotor, pJ101-Origin, ColE1-Origin	(Doumith et al., 2000)
pZW10	12,75 kb <i>BglII</i> -Fragment Coumermycin A ₁ -Cluster in pBluescript SK(-), enthält <i>couM</i> bis <i>couV</i> vollständig	Z.-X. Wang, persönliche Mitteilung

Tabelle II-14: Eigene Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pGES11	Klonierungskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. spheroides</i> ; 2,3 kb <i>Apal-PstI</i> Fragment aus p10-9CE2 in Litmus28
pGES12	Klonierungskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. spheroides</i> ; 2,3 kb <i>Apal-EcoRI</i> Fragment aus pGES11 in pGEM-11Zf(+)
pGES1 ⁺	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. spheroides</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 2,3 kb <i>HindIII-EcoRI</i> -Fragment aus pGES12 in pUWL201, trägt <i>gyrB^R</i> und 107 bp upstream vom Start-Codon
pGES21	Klonierungskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; 2,2 kb <i>PvuII-MluI</i> -Fragment aus Cosmid 4-2H in Litmus 28
pGES2	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 2,2 kb <i>HindIII-SpeI</i> -Fragment aus pGES21 in pUWL201, trägt <i>gyrB^R</i> und 65 bp upstream vom Start-Codon
pGES31	Klonierungskonstrukt für <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; 2 kb <i>BamHI-XhoI</i> Fragment aus Cosmid 4-2H in pGEM-11Zf(+)
pGES32	Klonierungskonstrukt für <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; PCR amplifiziertes Fragment (179 bp, Primer <i>gyrB[*]</i> 1 und <i>gyrB[*]</i> 2) aus Cosmid 4-2H kloniert zwischen <i>XbaI-BamHI</i> in pGES31
pGES3	Expressionskonstrukt für <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 2,2 kb <i>HindIII-EcoRI</i> -Fragment aus pGES32 in pUWL201, trägt <i>parY^R</i> und 56 bp upstream vom Start-Codon
pGES41	Klonierungskonstrukt für <i>gyrB^R</i> und <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; 3,44 kb <i>PvuII-NotI</i> -Fragment aus Cosmid 4-2H kloniert zwischen <i>NsiI</i> -(blunt end hergestellt mit Klenow-Fragment) und <i>NotI</i> -Schnittstellen von pGEM-11Zf(+)
pGES42	Klonierungskonstrukt für <i>gyrB^R</i> und <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; 0,9 kb <i>NotI-XhoI</i> -Fragment aus Cosmid 4-2H kloniert in pGES41

Fortsetzung Tabelle II-14

Plasmid	Beschreibung
pGES4	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> und <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 4,3 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment aus pGES42 in pUWL201, trägt <i>gyrB^R</i> und <i>parY^R</i>
pGES5	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. spheroides</i> in <i>E. coli</i> ; PCR-Fragment von p10-9CE1 (Primer <i>gyrB-4</i> und <i>gyrB-5</i>) über <i>BamHI-HindIII</i> ligiert in pRSET B (N-terminaler (His) ₆ -tag)
pGES6	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>E. coli</i> ; PCR-Fragment von pGES21 (Primer <i>gyrBC-1</i> und <i>gyrC-2</i>) über <i>XhoI-HindIII</i> ligiert in pRSET B (N-terminaler (His) ₆ -tag)
pGES7	Expressionskonstrukt für <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>E. coli</i> ; PCR-Fragment von pGES32 (Primer <i>gyrBX-1</i> und <i>gyrBX-2</i>) über <i>XhoI-HindIII</i> ligiert in pRSET B (N-terminaler (His) ₆ -tag)
pGES8	Expressionskonstrukt für <i>gyrA</i> aus <i>S. coelicolor</i> in <i>E. coli</i> ; PCR-Fragment von genom. DNA von <i>S. coelicolor</i> (Primer <i>gyrA-4</i> und <i>gyrA-5</i>) über <i>BglII-HindIII</i> ligiert in pRSET B (N-terminaler (His) ₆ -tag)
pGES9	Expressionskonstrukt für <i>parX</i> aus <i>S. coelicolor</i> in <i>E. coli</i> ; PCR-Fragment von genom. DNA von <i>S. coelicolor</i> (Primer <i>parX-1</i> und <i>parX-2</i>) über <i>HindIII-NdeI</i> ligiert in pET-24a(+) (C-terminaler (His) ₆ -tag)
pGES15f	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. spheroides</i> in <i>S. lividans</i> T7; Fusion von pGES5 mit pGM9 über <i>HindIII</i> , Orientierung der Gene in gleicher Richtung wie Replikon in pGM9
pGES16f	Expressionskonstrukt für <i>gyrB^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> T7; Fusion von pGES6 mit pGM9 über <i>HindIII</i> , Orientierung der Gene in gleicher Richtung wie Replikon in pGM9
pGES17f	Expressionskonstrukt für <i>parY^R</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> T7; Fusion von pGES7 mit pGM9 über <i>HindIII</i> , Orientierung der Gene in gleicher Richtung wie Replikon in pGM9
pGES18f	Expressionskonstrukt für <i>gyrA</i> aus <i>S. coelicolor</i> in <i>S. lividans</i> T7; Fusion von pGES8 mit pGM9 über <i>HindIII</i> , Orientierung der Gene in gleicher Richtung wie Replikon in pGM9
pGES19f	Expressionskonstrukt für <i>parX</i> aus <i>S. coelicolor</i> in <i>S. lividans</i> T7; Fusion von pGES9 mit pGM9 über <i>BglII</i> , Orientierung von <i>parX</i> in gleicher Richtung wie Replikon in pGM9
pGES20	<i>BglII-HindIII</i> -Fragment aus pGES8 (<i>gyrA S. coel.</i>) über <i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> ligiert in pET-24a(+) (C-terminaler (His) ₆ -tag)
pTES1	Klonierungskonstrukt für <i>novA</i> aus <i>S. spheroides</i> ; 2,05 kb <i>SnaBI-PstI</i> -Fragment aus pMS63 ligiert in pBluescript SK(-)
pTES2	Klonierungskonstrukt für <i>couR5</i> aus <i>S. rishiriensis</i> ; 1,56 kb <i>PspAI-AccI</i> -Fragment aus pZW10 pGEM3Zf(-)
pTES3	Expressionskonstrukt für <i>novA</i> aus <i>S. spheroides</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 2,06 kb <i>HindIII-PstI</i> -Fragment aus pTES1 in pUWL201
pTES4	Expressionskonstrukt für <i>couR5</i> aus <i>S. rishiriensis</i> in <i>S. lividans</i> TK24; 1,6 kb <i>HindIII-EcoRI</i> -Fragment aus pTES1 in pUWL201

3.2 Bakterienstämme

Tabelle II-15: Bakterienstämme von *E. coli* und *Streptomyces*

<i>E. coli</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
XL1 Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
N4177	<i>strA galK gyrB221 (cou^R) gyrB203(ts)</i>	(Menzel und Gellert, 1983)
W3110parE10	K-12 Derivat, F' <i>lambda</i> ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 <i>rph-1</i>	(Kato et al., 1990)
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Wildtypstamm, Actinorhodin-Produzent	(Kieser et al., 2000)
<i>S. lividans</i> TK23	<i>spc-1 SLP2⁻ SLP3⁻</i>	(Kieser et al., 2000)
<i>S. lividans</i> TK24	<i>str-6 SLP2⁻ SLP3⁻</i>	(Kieser et al., 2000)
<i>S. lividans</i> T7	<i>S. lividans</i> TK23, <i>tsr ble</i> T7-RNA-Polymerase-Gen	(Heinzelmann et al., 2001)
<i>S. spheroides</i> NCIMB 11897	Wildtypstamm, Novobiocin-Produzent	The National Collection of Industrial, Food & Marine Bacteria, Ltd, Aberdeen Schottland
<i>S. rishiriensis</i> DSM 40489	Wildtypstamm, Coumermycin A ₁ -Produzent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. roseochromogenes</i> var. <i>oscitans</i> DS12.976	Wildtypstamm, Clorobiocin-Produzent	Aventis

4. Kulturbedingungen

4.1 Kultivierung von *E. coli*

Anzucht und Kultivierung von *E. coli* erfolgten ausschließlich in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten in der Regel unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums zur Selektion. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C über Nacht (16-18 h) unter Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

E.-coli-Dauerkulturen wurden durch Mischen einer Übernachtskultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 20%) hergestellt und bei -70 °C gelagert.

Zur Anzucht von Kulturen für Proteinexpressionsexperimente wurde die Inkubationstemperatur auf 30 °C gesenkt. Induktion mit IPTG erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8.

4.2 Kultivierung von *Streptomyces*

4.2.1 Anzucht in Fest- und Flüssigmedien

Zur Kultivierung von *Streptomyces* wurden verschiedene Fest- und Flüssigmedien verwendet, die alle in Tabelle II-4 beschrieben sind. Als Standardmedium für die Stammhaltung und für DNA-Isolierungen dienten HA-Festmedium oder YMG als Flüssigmedium. Zur präparativen Plasmidisolierung wurde stattdessen S-Medium verwendet. Expressionsexperimente wurden mit YEME oder YEME-PEG Flüssigmedien durchgeführt. Zur Protoplastierung wurde *S. lividans* in CRM-Medium angezogen, die Regeneration von Protoplasten erfolgte auf R2YE-Agarplatten. Entsprechende Selektionsantibiotika wurden den Medien zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 28 °C oder 30 °C in Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen und zusätzlich einigen Glasperlen (Durchmesser 2,85-3,3 mm) oder einer Metallspirale pro Kolben unter Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

4.2.2 Herstellung von Glycerindauerkulturen und Sporensuspensionen

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 1-3 Tage alte Flüssigkulturen verwendet. Nach Zentrifugation der Kultur (3.000 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in Glycerin 15% (v/v) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Menge in 10-15 ml Glycerin 15% resuspendiert und die Dauerkulturen in Aliquoten von 0,5 bis 1 ml bei -70 °C gelagert. Zur Inokulation von 50 ml Flüssigmedium wurden 250-500 µl Glycerindauerkultur eingesetzt, dabei konnte gegebenenfalls durch Verwendung von Insulinspritzen eine Homogenisierung des Mycels erreicht werden.

Zur Gewinnung von Sporen wurden 1 ml Flüssigkultur oder 100-200 µl Glycerindauerkultur auf HA-Agarplatten (s. Tabelle II-4) ausplattiert und anschließend 15-20 min unter der Sterilbank getrocknet. Bei ausreichender Sporulation nach 3-6 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden pro Platte 7-9 ml einer sterilen Lösung von 0,1% Tween 20 in Wasser zugegeben und die Sporen mit einer Impföse abgekratzt. Die Suspension wurde anschließend abgeschwemmt und 1 min stark gevortext. Nach Filtration über sterile Watte wurden die Sporen pelletiert (3.000 x g, 5 min, 4 °C) und in Glycerin 20% resuspendiert. Die Sporensuspension wurde in Aliquoten zu 200 µl bei -70 °C gelagert.

4.2.3 Durchführung der Resistenztests von *S.-lividans*-Transformanden gegen Novobiocin und Coumermycin A₁

Zur Feststellung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC) von Novobiocin für Transformanden von *S. lividans* TK24 mit Resistenzgenen der Aminocoumarin-Produzenten wurde Sporensuspension entsprechend ca. 10^6 cfu auf Minimal-Medium-Agarplatten (Innendurchmesser 84 mm) mit steigenden Konzentrationen von Novobiocin (0 bis 750 µg/ml) ausplattiert. Die Tests auf Resistenz gegen Coumermycin A₁ (0 bis 500 µg/ml) wurden auf kleineren Agarplatten mit einem Durchmesser von nur 55 mm durchgeführt. Deshalb wurde entsprechend der kleineren Oberfläche Sporensuspension mit ca. 4×10^5 cfu ausplattiert.

Alle Platten enthielten zusätzlich 20 µg/ml Thiostrepton als Selektionsantibiotikum. Nach 6 Tagen Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum durch Auszählen von Bakterienkolonien bestimmt. Weniger als 10 Kolonien wurden als nicht mehr erkennbares Wachstum bewertet.

5. Methoden der Molekularbiologie

5.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA

5.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Rotiphenol[®], Roth) durchgeführt. Die zu extrahierende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt und 1 min kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (5-10 min, 17.000 x g, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt. Der Vorgang wurde gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Durch eine anschließende Ethanol-fällung (s. 5.1.2) wurden verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt.

5.1.2 Alkoholfällung

Die Fällung von DNA mit Alkoholen diente sowohl zur Konzentrierung als auch zur Reinigung, da Salze und andere niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben.

Fällung mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5-3fachen Volumen absolutem Ethanol (Endkonzentration ca. 70%) gemischt und 15 min bei -70 °C aufbewahrt. Die DNA

wurde durch Zentrifugation (17.000 x g, 20 min, 4 °C) pelletiert, mit 500 µl eiskaltem Ethanol 70% gewaschen und nach dem Trocknen in TE-Puffer oder H₂O_{bidest} gelöst.

Fällung mit Isopropanol

Für größere Volumina wurde Isopropanol zur Fällung verwendet. Dazu wurde das 0,8-1fache Volumen reinen Isopropanols zur DNA-Lösung zugemischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem bei der Ethanol-Fällung.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm eignet sich für sehr reine DNA-Lösungen. Diese wurden nach geeigneter Verdünnung mit Wasser in einem GeneQuant Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) in einer Ultra-Mikroküvette vermessen. Die Berechnung der Konzentration doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Formel

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot F \cdot 50$$

mit F als Verdünnungsfaktor.

Zur Quantifizierung geringerer DNA-Mengen und von DNA mit Verunreinigungen durch RNA und Proteine eignete sich die Abschätzung der Bandenintensität im Vergleich zu einem DNA Größenstandard mit bekannter Konzentration nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid.

5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Alle für die Agarosegel-Elektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle II-7 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen in einer Standardkonzentration von 0,8% Agarose in TAE-Puffer. Zur Analyse von genomischer DNA wurden Gele mit 0,4% Agarose eingesetzt, kleine DNA-Fragmente unter 500 bp wurden mit 2% NuSieve[®]GTG[®] Agarose unter Verwendung von TBE-Puffer getrennt. DNA-Präparationen wurden nach Mischen mit Ladepuffer im Verhältnis 3:1 auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese-Geschwindigkeit betrug in der Regel 3-5 V/cm. Zur Detektion wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 15-30 min in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und mit UV-Durchlicht bei 312 nm analysiert. Zur Dokumentation wurde das Eagle-Eye-II-System (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt.

Gelelektrophorese mit Chloroquin im Agarosegel

Zur besseren Unterscheidung von DNA Topoisomeren kann die Auftrennung der DNA in Agarosegelen unter Zusatz von Chloroquin erfolgen. Es wurden 1,6%ige Agarosegele mit einer Chloroquin-Konzentration von 5 µg/ml Chloroquin verwendet. Der TAE-Elektrophoresepuffer enthielt dabei dieselbe Chloroquin-Konzentration wie das Gel. Die Elektrophorese wurde mit 1,7 V/cm ca. 14 über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Vor dem Färben mit Ethidiumbromid wurde das Gel jeweils 30 min mit 10 mM MgSO₄-Lösung, TAE-Puffer und H₂O_{bidest} gewaschen.

Geräte:

Gelkammern: Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200
Hofer HE 99X

Spannungsgeber: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia

Detektion: Transilluminator IL-200 M, Bachofer

Dokumentation: Eagle Eye[®] II Still Video System, Stratagene

5.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte unter Verwendung von Extraktionskits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel nach der jeweiligen Vorschrift des Herstellers. Die verwendeten Kits der Firma Qiagen waren QIAquick Gel Extraction Kit und QIAEXII. Von der Firma Macherey-Nagel wurde das System Nucleospin Extract[®] verwendet.

5.3 DNA-Manipulation

5.3.1 Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 10 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionsverdau zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in größeren Volumina bis zu 200 µl durchgeführt.

5.3.2 Glätten überhängender Enden von DNA-Molekülen

Zur Herstellung glatter Enden aus 5'- oder 3'-Überhängen nach Restriktionsverdau wurde Klenow Fragment, das große Fragment der Polymerase I aus *E. coli*, verwendet. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden ca. 5 µg DNA mit einem dNTP-Mix aus 0,025 mM je Nucleotid in 1 x Filling-In-Puffer mit 4 Units Klenow-

Fragment (Amersham Biosciences) 20 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min gestoppt. Nach Ethanolfällung (s. 5.1.2) wurde die DNA weiter bearbeitet.

5.3.3 Ligation von DNA-Molekülen

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde in der Regel durch Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h durchgeführt. Wenn dies nicht zum Erfolg führte, wurde die Ligation bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden (blunt end) wurde eine Reaktionstemperatur von 4 °C mit Inkubation über Nacht gewählt. Bei der Ligation eines kleineren Inserts mit einem Vektor wurden die beiden Komponenten in einem Verhältnis von 10:1 bis 50:1 eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1 Unit T4-DNA-Polymerase, 0,1 mM rATP und 1 x Ligationspuffer. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet.

5.3.4 Relaxation überspiralisierter Plasmid-DNA mit Topoisomerase I

Plasmid-DNA liegt nach Isolierung aus *E. coli* hauptsächlich in überspiralisierter Form vor. Topoisomerase I katalysiert die Entspannung überspiralisierter Helixwindungen durch eine Folge von Bruch- und Wiederverknüpfungsreaktionen von Phosphodiester-Bindungen.

Als Substrat für die DNA Gyrase zum Nachweis der Supercoiling-Aktivität (s. 6.8.1) diente relaxierte Plasmid-DNA von pBR322. Die Relaxation wurde mit Topoisomerase I aus Kalbsthymus (Amersham Biosciences) durchgeführt. Pro 0,5 µg Nucleobond-gereinigtes Plasmid pBR322 wurde 1 Unit Topoisomerase I eingesetzt. 2,5 µg pBR322 wurden mit 5 Units Topoisomerase I und 0,01% BSA (m/v) in 1 x Topoisomerase-I-Reaktionspuffer des Herstellers 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion gestoppt. Nach Ethanolfällung wurde die DNA in H₂O_{bidest} gelöst und bei -20 °C gelagert.

5.4 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli*

(Sambrook und Russell, 2001)

5.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli kann durch Behandlung mit CaCl₂-Lösung transformationskompetent gemacht werden. Zur Anzucht der Bakterien wurden 50-100 ml LB-Medium gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 1-3 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert (37°C, 170 rpm, ca. 2-4 h). Nach Zentrifugation (1.000 x g, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in ca. 30 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml

eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung erneut resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung wurden die Zellen je nach Menge in 3-5 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin (v/v) resuspendiert, zu 200 µl aliquotiert und bei -70 °C schockgefroren.

5.4.2 CaCl₂-vermittelte Transformation von *E. coli* und Blau-Weiß-Selektion

1-5 µl DNA-Lösung oder 5 µl eines Ligationsansatzes wurden zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock 2 min lang bei 42°C (in Wasserbad) ausgesetzt. Nach Abkühlung auf Eis wurde zur Regeneration 1 ml LB-Medium zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Transformationsansatz auf mehreren LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion

Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden 10 µl sterile IPTG-Lösung (80 mg/ml) und 40 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) mit 150 µl Wasser gemischt und schnell ausplattiert. Zur Entfernung des toxischen Lösungsmittels DMF wurden die Platten vor Ausbringung des Transformationsansatzes offen unter der Sterilbank 20-30 min stehen gelassen.

5.5 Protoplastierung von *Streptomyces lividans*

Um Streptomyceten zur Aufnahme von Fremd-DNA vorzubereiten, wurden sie zur Gewinnung von Protoplasten einer partiellen Lyse durch Lysozym-Lösung ausgesetzt.

Die Zellanzucht zur Protoplastierung erfolgte in CRM-Medium (s. Tabelle II-4) mit 0,75% Glycin 42-48 h bei 28°C unter Schütteln. Nach Abtrennung des Mediums (1.100 x g, 10 min, 4 °C) wurde zweimal mit TE-Puffer mit Saccharose 10% (m/v), pH 8,0 gewaschen und jeweils zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 2 ml Protoplastierungspuffer (P-Puffer, s. Tabelle II-8) mit 2 mg/ml Lysozym pro Gramm Zellen resuspendiert und bei 30 °C unter Schütteln 15-90 min inkubiert. Das Voranschreiten der Protoplastierung wurde dabei durch wiederholte Mikroskopie (ca. alle 15 min) kontrolliert. Nach erfolgter Protoplastierung wurde die Reaktion durch Kühlen auf Eis gestoppt und alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt, um eine weitere Schädigung der Zellen zu vermeiden. Durch Filtration durch sterile Glaswolle wurden die Protoplasten von verbleibenden Mycelresten abgetrennt. Nach Nachspülen mit frischem P-Puffer wurde das Filtrat zentrifugiert (1.100 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde äußerst vorsichtig abdekantiert und das Pellet je nach Größe in 0,5-3 ml P-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Protoplastensuspension

wurden in eisgekühlte Gefäße zu 200 µl aliquotiert und in einem Gefäß mit Eis langsam über Nacht bei -70°C eingefroren.

Zur Überprüfung der Protoplastierungseffizienz wurden 20 µl Protoplastensuspension mit Wasser zu 200 µl verdünnt und auf einer R2YE-Agarplatte (s. Tabelle II-4) ausplattiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge Protoplasten mit P-Puffer gemischt ausplattiert. Im Gegensatz zur Kontrollplatte sollten die Protoplasten im hypotonischen Milieu des Wassers platzen und nicht mehr regenerationsfähig sein.

5.6 PEG-vermittelte Transformation von *Streptomyces*

Die Protoplasten wurden vor Verwendung schnell unter warmem Wasser aufgetaut. 100 µl Protoplastensuspension wurden jeweils mit 100 µl P-Puffer vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 10-15 µg DNA in maximal 20 µl Lösung bei Raumtemperatur wurden gleich im Anschluss 500 µl Transformationspuffer (T-Puffer, s. Tabelle II-8) zugemischt (vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit abgeschnittenen Pipettenspitzen). Der Ansatz wurde auf drei bis vier Platten verteilt. Bei der verwendeten Weichagar-Methode wurden pro Platte 3 ml Weichagar (R2YE mit 0,6% Agar), der im Wasserbad auf eine Temperatur von ca. 48°C temperiert wurde, mit Aliquoten des Transformationsansatzes gemischt und schnell auf R2YE-Agarplatten durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt.

Nach 16 h Regeneration der Protoplasten durch Inkubation bei 28°C im Brutschrank erfolgte Selektion der Transformanten durch Überschichtung mit Antibiotikum ebenfalls mit der beschriebenen Weichagar-Methode. Zu diesem Zeitpunkt war das Bakterienwachstum durch leichte Trübung der Agarplatten erkennbar. Anschließend wurden die Platten weiter bei 28°C inkubiert bis zum Sichtbarwerden erster Kolonien (2-4 Tage). Zur weiteren Untersuchung wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt und quadratförmig auf HA-Agarplatten mit dem Selektions-Antibiotikum ausgestrichen.

5.7 Isolierung von DNA aus Bakterien

5.7.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Übernachtskulturen (37°C , 170 rpm) in LB-Medium (3 ml) mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. Das Pellet aus 1,5 ml Bakterienkultur (Zentrifugation $1.500 \times g$, 5 min, 4°C) wurde in 250 µl Lösung 1A durch vortexen resuspendiert, mit 250 µl Lösung 2 gemischt und einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Bakterien war an der schleimigen Konsistenz der Lösung erkennbar. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung 3 Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages

hauptsächlich aus genomischer DNA und Proteinen. Nach Zentrifugation (17.000 x g, 20 min, 4°C) wurde der klare Überstand ohne Flocken mitzuverschleppen in ein neues Gefäß überführt. Fällung der DNA erfolgte unter Verwendung von Isopropanol. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst.

Zur Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Anionen-Austauscher-Säulen Nucleobond® AX 100 (Macherey-Nagel) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers in "Nucleobond® AX, Properties and applications" mit Übernachtskulturen in 50-100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum.

5.7.2 Isolierung von Plasmiden aus *Streptomyces*

Die Zellanzucht erfolgte 1-2 Tage in YMG. Für die Plasmidisolierung wurden 2 ml Zellkultur geerntet und nach Zentrifugation (2.500 x g, 10 min, 4°C) einmal mit Lösung 1B (s. Tabelle II-6) gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Auflösung der Zellwand erfolgte Behandlung mit Lysozym. Dazu wurden die Zellen in 500 µl Lösung 1B mit 4 mg/ml Lysozym resuspendiert und 20 bis 30 min bei 37 °C unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Danach wurden 650 µl Lösung 2 zugeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zumischung von 650 µl Lösung 3 fallen weiße Flocken (vergleiche Alkalisch Lyse) aus, die nach 10 min Inkubation auf Eis abzentrifugiert wurden (20 min, 17.000 x g, 4°C). Der klare Überstand wurde nach Überführung von je 900 µl in zwei neue Gefäße mit je 300 µl Phenol-Chloroform extrahiert. Nach Fällung der Plasmid-DNA mit Isopropanol wurde das Isolat in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Kontrolle der isolierten DNA durch Restriktionsverdau wurden 5-10 µl DNA-Lösung benötigt.

5.7.3 Isolierung genomischer DNA aus *Streptomyces*

Ca. 40 mg Zellen wurden in 0,5 ml TSE-Puffer (s. Tabelle II-6) mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert und 30 min im Wasserbad bei 37 °C unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 250 µl SDS-Lösung 2% (m/v) und 15 min Inkubation im Wasserbad bei 60 °C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 250 µl Phenol-Chloroform zugegeben und ca. 1 min gevortext. Zur Phasentrennung wurde die Mischung 15 min bei 17.000 x g (4 °C) zentrifugiert. 650 µl der wässrigen Oberphase wurden in ein neues Gefäß überführt unter Vermeidung der Verunreinigungen enthaltenden Zwischenphase und nach Zugabe von 150 µl TE-Puffer erneut mit 250 µl Phenol-Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Oberphase (ca. 700 µl) wurde erneut abgenommen, mit 150 µl TE-Puffer und 70 µl 3 M Natriumacetat-Lösung gemischt und ein drittes Mal

mit 250 µl Phenol-Chloroform ausgeschüttelt und zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die genomische DNA mit Isopropanol gefällt und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C gelöst.

5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzymatische Vermehrung von DNA-Fragmenten mithilfe der PCR wurden in einem GeneAmp PCR System 2400 der Firma Perkin-Elmer (Weiterstadt) durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) im Auftrag hergestellt.

Ein Standard-Reaktionsansatz von 100 µl enthielt folgende Komponenten:

Komponente	Endkonzentration
Reaktionspuffer	1fach
Template	50-100 ng Plasmid/Cosmid oder 2,5-5 µg genomische DNA
Primer	je 20 pmol
dNTP-Mix	0,2 mM (je Nucleotid)
DMSO	5% (v/v)
Polymerase (<i>Taq</i> oder <i>Pfu</i>)	1-3 U

5.8.1 PCR zur Klonierung von *parY^R* zur heterologen Expression in *S. lividans* TK24

Um das Resistenzgen *parY^R* aus *S. rishiriensis* in den Expressionsvektor pUWL201 zur heterologen Expression in *S. lividans* TK24 zu klonieren, wurde am 3'-Ende des Gens ein Fragment von 285 bp per PCR amplifiziert. In Tabelle II-16 sind die eingesetzten Primer mit ihren Positionen in der Sequenz gemäß der angegebenen Accession-Nummer in GenBank angegeben. Durch Austausch einer Base in Primer *gyrB*1* (fett markiert) wurde vor dem Start-Codon von *parY^R* eine *XbaI*-Schnittstelle (unterstrichen) eingeführt. Als Template diente das Cosmid 4-2 H. Die PCR wurde mit *Taq* 2000 DNA-Polymerase (2,5 U, Stratagene) mit untenstehendem Temperaturprofil durchgeführt.

Tabelle II-16: Primer zur partiellen Amplifikation von *parY^R* aus *S. rishiriensis*

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position	Acc.-Nr.
<i>gyrB*1</i>	GCCCTCTAGACGCGTGACCCAAAG	2605-2629	AF205853
<i>gyrB*2</i>	GATGACCTCGATGTGGTCGCAGGCAC	2865-2890	AF205853

Temperaturprofil:

	Temperatur	Zeit	Cyclen
Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	2 min	30
Annealing und Elongation	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

5.8.2 PCR Amplifikation der Topoisomerase II Gene aus *Streptomyces*

Um die Funktion von *gyrB^R* und *parY^R* als Topoisomerase-II-Untereinheiten zu belegen, sollten diese als Hexahistidin-Fusionsproteine überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Aus *S. spheroides* wurde *gyrB^R*, aus *S. rishiriensis* wurden *gyrB^R* und *parY^R* kloniert. Zur funktionellen Charakterisierung in vitro wurden auch die entsprechenden A-Untereinheiten (*gyrA* und *parX*) benötigt. Da die Sequenzen der entsprechenden Gene der Aminocoumarin-Produzenten nicht bekannt waren, wurden diese Gene aus *S. coelicolor* amplifiziert.

In Tabelle II-17 sind alle eingesetzten Primer mit ihren Positionen in der Sequenz gemäß der jeweils angegebenen Accession-Nummer in GenBank angegeben.

Tabelle II-17: Primer zur Amplifikation der Gyrase- und Topoisomerase-IV-Gene aus *Streptomyces*. Eingeführte Schnittstellen sind unterstrichen, veränderte Basen sind fett markiert. Die Lage der Primer ist durch die Basen-Positionen der in GenBank gespeicherten Sequenz (Accession-Nummer, letzte Spalte) angegeben.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position	Acc.-Nr.
gyrB-4	AGCGCCGCC <u>AAGCTT</u> CAGATGTCGAG	2399-2424	AF205854
gyrB-5	CGAAAGAG <u>GGATCC</u> CGTGACTTCTTAC	362-388	AF205854
gyrBC-1	GCCCGAAAGAG <u>CTCGAG</u> TGTGACTAC	536-561	AF205853
gyrBC-2	CGGTGTCC <u>AAGCTT</u> AGATGTCGAGGA	2574-2599	AF205853
gyrBX-1	AGGAGAGCA <u>CTCGAG</u> GAGTACATTCC	2653-2678	AF205853
gyrBX-2	AGATCCGCGACAGA <u>AAGCTT</u> GCTCAGA	4770-4795	AF205853
gyrASc-1	GAGGAGCTGCGCATCACGACCATGGA	36576-36601	AL939118
gyrASc-2	CCTGGGATCCATGCGTTGAGGACGAG	33595-33620	AL939118

Fortsetzung Tabelle II-17

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position	Acc.-Nr.
gyrA-4	ACTCTCT <u>AAGCTT</u> GCTACTCGGCCGA	33777-33802	AL939118
gyrA-5	CAGGAA <u>AGATC</u> ITCACCAGCAATGAC	36381-36406	AL939118
parXSc-1	AGCCGGCAC <u>CATAT</u> GGCCCGCCGTAGT ACGAAGAC	99858-99891	AL939125
parXSc-2	GACAG <u>AAGCTT</u> GACCGGGCCCGCCAC CACCGAC	97415-97448	AL939125

Amplifikation von *gyrB^R* aus *S. spheroides* und *gyrB^R* und *parY^R* aus *S. rishiriensis*

Die drei Gene *gyrB^R* aus *S. spheroides* und *gyrB^R* und *parY^R* aus *S. rishiriensis* wurden mit demselben Temperaturprogramm (s. unten) per PCR amplifiziert.

Die Amplifikation von *gyrB^R* aus *S. spheroides* erfolgte mit dem Plasmid pGES11 (s. Tabelle II-14) als Template. Durch die Verwendung des Primers gyrB-5 wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle vor dem Start-Codon zur in-frame-Ligation mit der Sequenz für den N-terminalen (His)₆-tag des Vektors pRSET B eingeführt. Der Primer gyrB-4 enthält eine *Hind*III-Schnittstelle. Die PCR erfolgte mit *Pfu*-Polymerase (3 U, Promega).

Als Template für *gyrB^R* aus *S. rishiriensis* diente das Plasmid pGES21 (s. Tabelle II-14) und durch Einführung einer *Xho*I-Schnittstelle in Primer gyrBC-1 und einer *Hind*III-Schnittstelle in Primer gyrBC-2 wurde die Expression mit pRSET B mit N-terminalem (His)₆-tag möglich.

Zur Amplifikation von *parY^R* wurde das Plasmid pGES32 als Template verwendet und die PCR mit *Taq*-Polymerase (1 U, Promega) durchgeführt. Durch die Einführung einer *Xho*I-Schnittstelle in Primer gyrBX-1 wurde das Start-Codon entfernt. Hinter dem Stop-Codon wurde in Primer gyrBX-2 eine *Hind*III-Schnittstelle eingebaut.

	Temperatur	Zeit	Cyclen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	90 s	
Annealing	60 °C	90 s	30
Elongation	72 °C	5 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

Amplifikation von *gyrA* aus *S. coelicolor*

Die Amplifikation von *gyrA* aus *S. coelicolor* erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde mit den unveränderten Primern *gyrASc-1* und *gyrASc-2* ein ca. 3 kb großes Fragment, das *gyrA* vollständig enthielt, aus genomischer DNA amplifiziert. Das verwendete Temperaturprofil ist unten aufgeführt. Dieses Fragment diente als Template für eine weitere PCR, deren Programm dem für die Amplifikation von *gyrB^R* und *parY^R* (s. oben) entsprach. Mit dem Primer *gyrA-5* wurde eine *Bgl*III-Schnittstelle vor dem Start, mit dem Primer *gyrA-4* eine *Hind*III-Schnittstelle hinter dem Stop-Codon eingeführt. Dieses im zweiten Schritt erhaltene Fragment wurde über die genannten Schnittstellen in den Expressionsvektor pRSET B ligiert.

	Temperatur	Zeit	Cyclen
Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	2 min	
Annealing	62 °C	90 s	30
Elongation	72 °C	5 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

Amplifikation von *parX* aus *S. coelicolor*

Zur Amplifikation von *parX* wurde ebenfalls genomische DNA von *S. coelicolor* als Template verwendet. Vor dem Start-Codon wurde in Primer *parXSc-1* eine *Hind*III-Schnittstelle eingebaut. Durch die Einführung einer *Nde*I-Schnittstelle in Primer *parXSc-2* wurde das Stop-Codon entfernt zur in-frame-Ligation mit der Sequenz für einen C-terminalen (His)₆-tag in dem Expressionsvektor pET-24a(+). Die PCR erfolgte mit *Pfu*-Polymerase unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils.

	Temperatur	Zeit	Cyclen
Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	1
Denaturierung	96 °C	2 min	
Annealing und Elongation	72 °C	6 min	30
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

5.9 Southern Hybridisierung

Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Zur nichtradioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde der DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II verwendet, wobei die Markierung mithilfe von Klenow-Fragment und DNA-Hexameren nach dem Prinzip des Random-Prime-Labeling abläuft. Das zu markierende DNA-Fragment wurde nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel isoliert. Ca. 1 µg isolierte DNA wurde zur Markierung nach der Vorschrift des Herstellers bearbeitet. Nach beendeter Reaktion wurde zur Abtrennung von überschüssigen Nucleotiden eine Ethanolfällung mit 4 M LiCl als Salzkomponente (anstelle von 3 M Natriumacetat) durchgeführt. Die fertige Sonde wurde in TE-Puffer gelöst und eine Quantifizierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Southern Blot

Genomische DNA der zu untersuchenden *Streptomyces*-Stämme wurde mit ausgewählten Enzymen geschnitten und auf dem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde der DIG Marker Nr. VII eingesetzt. Das Agarosegel wurde nach erfolgter Elektrophorese 5 min in Depurinierungslösung und anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung unter Schütteln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten von je 15 min in Neutralisierungslösung wurde der DNA-Transfer durchgeführt. Unter Ausnutzung von Kapillarkräften fand der DNA-Transfer auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham Biosciences) über einen Zeitraum von ca. 16 h mit 20 x SSC-Puffer (s. Tabelle II-9) statt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese anschließend auf beiden Seiten 1 min mit UV-Licht bei 312 nm bestrahlt.

Hybridisierung und Detektion

Die zur Hybridisierung und Detektion verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle II-9 beschrieben. Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die fixierte Membran mit Prähybridisierungslösung 4 h bei 68 °C prähybridisiert. Die Sonde wurde vor Benutzung frisch durch Erhitzen auf 100 °C für 10 min denaturiert, anschließend schnell in flüssigem Stickstoff abgekühlt und mit 8-10 ml Hybridisierungslösung (ca. 25 ng Sonde/ml) gemischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16-20 h) bei 68 °C. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend zweimal 5 min mit 10 ml 2 x SSC-Waschpuffer bei Raumtemperatur und zweimal 15 min mit 10 ml 0,5 x SSC-Waschpuffer bei 68 °C behandelt. Die Membran wurde 1 min in Maleinsäurepuffer äquilibriert und 30 min in Blocking-Lösung inkubiert. Nach Zugabe von Antikörperlösung (1:10.000 verdünnt in Blocking-Lösung) wurde für weitere 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran in Tween-Waschpuffer und 5 min Äquilibrierung in Detektionspuffer wurde die Detektion durchgeführt. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz

und Auflegen eines Hyperfilm-ECL-Röntgenfilms (Amersham Biosciences). Die Expositionszeit bei 37 °C betrug zwischen 10 und 120 min.

Entfernung der Sonden

Durch Entfernen der Sonde konnte eine Membran mehrmals zur Hybridisierung verwendet werden. Die Membran wurde dreimal 30 min mit 0,2 M NaOH mit 0,1% SDS bei 37 °C gewaschen und anschließend gut mit 2 x SSC bei Raumtemperatur gespült. Die Lagerung erfolgte ohne Austrocknen der Membran bei 4 °C.

5.10 Sequenzanalysen

Computergestützte Sequenzanalyse erfolgte mithilfe des Programms DNASIS for Windows Version 2.1 (1995), Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA.

Homologievergleiche auf Nukleinsäure- und Aminosäure-Ebene wurden via Internet mit dem Blast-Programm (Version 2.0) in GenBank durchgeführt.

6. Methoden der Biochemie

6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Berechnung des Proteingehaltes von Lösungen wurde eine Kalibriergerade mit BSA erstellt. Hierfür wurden 3 bis 4 Messpunkte zwischen 1 und 10 µg BSA (durch Verdünnen einer Stammlösung mit 100 µg BSA/ml) ermittelt. Je 100 µl Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (s. 2.4.6) gemischt und nach 5 min (bei Raumtemperatur) wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Als Referenz (Nullabgleich) diente eine Probe mit 100 µl Wasser mit Bradford-Reagenz. Die Kalibriergerade wurde für jede Versuchsreihe neu erstellt. Die zu bestimmende Probe wurde so verdünnt, dass die Absorption im Bereich von 0,2-0,8 lag.

6.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese wurden genau nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mini-PROTEAN[®] 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad hergestellt. Als Sammelgel wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet, als Trenngel diente abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine ein 10%iges oder 12%iges Gel. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 150-200 V über 50 bis 90 min durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der

Elektrophorese im Verhältnis 1:1 bis 1:4 mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele 5-10 min in Fixierlösung (H₂O:MeOH:Essigsäure = 70:20:10 v/v) und anschließend 15 min in Coomassie-Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau 0,25% (m/v) in H₂O:MeOH:Essigsäure = 45:45:10 v/v) inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Behandlung mit Entfärbelösung (H₂O:MeOH:Essigsäure = 45:45:10 v/v) 60-90 min und Waschen mit Wasser entfärbt.

Es wurden die Größenstandards Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Biosciences) und Precision Protein Standards™ (Bio-Rad) verwendet, die die folgenden Protein-Banden aufwiesen:

Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis:	Precision Protein Standards™:
Phosphorylase b 94 kDa	250 kDa, 150 kDa, 100 kDa
Albumin 67 kDa	75 kDa, 50 kDa, 37 kDa
Ovalbumin 43 kDa	25 kDa, 15 kDa, 10 kDa
Carboanhydrase 30 kDa	
Trypsin-Inhibitor 20,1 kDa	
α-Lactalbumin 14,4 kDa	

6.3 Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC™)

Zur Säulenchromatographischen Trennung von Proteinen wurde eine FPLC™-Anlage der Firma Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Anlage wurde stets bei einer Temperatur von 4 °C betrieben. Die verwendeten Komponenten der Anlage sind nachfolgend aufgeführt.

Pumpen:

externe Pumpe für Probenauftrag: Pump P-1

Fließmittelpumpen: High Precision Pump P-500

Detektoren:

UV-Detektor: Monitor UV-M II

Leitfähigkeitsdetektor: Conductivity Monitor

Fraktionssammler: FRAC 200

Steuerung: Controller LCC-501 Plus

Aufzeichnung: Recorder REC 102

Es wurden wässrige Fließmittelsysteme mit Flussraten von 0,5–1 ml/min verwendet. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung filtriert (Filtermembran aus regenerierter Cellulose, Porengröße 0,2 µM).

6.4 Heterologe Expression von Proteinen

6.4.1 Expression in *E. coli*

100 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml) wurden mit je 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei 30 °C, 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 kultiviert. Induktion der Protein-Expression erfolgte mit 0,5 mM IPTG. 3 h nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.000 x g, 10 min, 4 °C) geerntet und bei -70 °C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell bei Raumtemperatur aufgetaut, in 1 ml Lysepuffer (1 mg/ml Lysozym; s. Tabelle II-11) pro Gramm Zellen resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall mit dem Branson Sonifier durch 2 min Beschallung (in Intervallen von je 10 s Beschallung und 10 s Pause) im Eisbad aufgeschlossen. Anschließend wurden 10 µg RNase/ml und 5 µg DNase/ml zugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Abtrennung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation (17.300 × g, 30 min, 4 °C) wurde der Rohextrakt erhalten.

6.4.2 Expression in *S. lividans* TK24

Die Anzucht der Zellen erfolgte in YEME-PEG oder CDM Medium (s. Tabelle II-4). Als Inokulum diente eine Vorkultur (3 Tage, 30 °C) in demselben Medium aus Glycerindauerkultur angezogen. Die Hauptkultur wurde in 200 ml Medium in 1000-ml-Kolben mit zwei Schikanen und Glasperlen bei 30 °C 3 Tage kultiviert. Nach der Ernte (2.500 x g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen mit Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) gewaschen und bei -70 °C eingefroren.

Zur Herstellung zellfreier Rohextrakte wurden die Zellen nach dem Auftauen in Aufschlusspuffer (s. Tabelle II-10) mit 3 mg Lysozym/ml resuspendiert und 30 bis 45 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Brij-Lösung als Detergens wurde weitere ca. 30 min auf Eis inkubiert. Die entstandene, sehr zähe Zellmasse wurde zur Klärung 16 h in der Ultrazentrifuge (100.000 x g, 4 °C, 16 h) zentrifugiert.

6.4.3 Expression in *S. lividans* T7

Kultivierungsbedingungen

Als Vorkultur wurden 50 ml YEME-Medium (s. Tabelle II-4) mit Kanamycin 10 µg/ml mit 250 µl bis 500 µl Glycerindauerkultur inokuliert. Nach 48 h Kultivierung bei 28 °C, 170 rpm wurde 1 ml Vorkultur pro 50 ml YEME-Medium mit Kanamycin 10 µg/ml und Thiostrepton 25 µg/ml überimpft. Thiostrepton diente dabei als Induktor der Expression. Die Hauptkultur mit 200 ml Medium in 1000-ml-Kolben (mit 2 Schikanen und Metallspirale) wurde nach 24 h bei 28 °C, 170 rpm durch Zentrifugation (2.500 x g, 4 °C, 10 min) geerntet und die Zellen bei -70 °C eingefroren.

Herstellung zellfreier Rohextrakte

Die eingefrorenen Zellen wurden schnell bei Raumtemperatur aufgetaut, in 1 ml Lysepuffer (8 mg/ml Lysozym; s. Tabelle II-11) pro Gramm Zellen resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels Ultraschall mit dem Branson Sonifier durch 10 min Beschallung (in Intervallen von je 2 min Beschallung und ca. 30 s Pause) im Eisbad aufgeschlossen. Nach Abtrennung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation ($17.300 \times g$, 60 min, 4 °C) wurde der Rohextrakt erhalten.

6.5 Reinigung der Gyrase aus *S. lividans* TK24-Transformanden

Zur in-vitro-Charakterisierung von GyrB^R und ParY^R sollten die Transformanden, für die bereits Resistenz gegen Aminocoumarinantibiotika in vivo gezeigt werden konnte, herangezogen werden. Die Transformanden wurden unter den unter 6.4.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert und aufgeschlossen. Aus dem gewonnenen zellfreien Rohextrakt sollte die Aminocoumarin-resistente Gyrase mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden.

6.5.1 Heparin-Affinitätschromatographie

Der Überstand der Ultrazentrifugation (Rohextrakt) wurde mit einer P1-Pumpe (Flussrate 20-25 ml/h) auf die Heparin-Agarose aufgetragen und mit Puffer B (s. Tabelle II-10) einige Stunden gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder den Basiswert erreicht hatte. Die Elution erfolgte anschließend mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,05 M bis 1 M über 150 ml in Puffer B (Flussrate 20–25 ml/h). Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Detektors bei 280 nm. Im Fraktionssammler wurden Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml aufgefangen.

6.5.2 Novobiocin-Affinitätschromatographie

Die gewünschten Fraktionen aus der Elution der Heparin-Säule wurden vereinigt und auf die Novobiocin-Sepharose mit einer P1-Pumpe aufgetragen (Flussrate 20-25 ml/h). Die Säule wurde mit Puffer B solange gewaschen bis die Absorption bei 280 nm wieder auf der Basislinie angelangt war (1-2 h). Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten unterschiedlicher KCl- und Harnstoff-Konzentrationen in Puffer B; das Elutionsvolumen betrug dabei pro Stufe 30 ml.

Dialyse

Proteinhaltige Fraktionen wurden zur Entfernung des Harnstoffes über Nacht gegen Aufbewahrungspuffer A (s. Tabelle II-10) dialysiert. Zur Dialyse wurden die Proben in einen Spectra/Por[®] 7 Membran-Schlauch (Roth) eingefüllt und in einem großen Gefäß mit mindestens dem 50fachen Probenvolumen des Dialyse-Puffers bei 4 °C

gerührt. Nach 12-16 h wurde der Puffer einmal erneuert und noch mindestens 2 h weitergerührt. Die dialysierten Proben wurden bei -20 °C gelagert.

6.6 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie

2-4 ml zellfreier Rohextrakt wurden mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (QIAGEN) gemischt und 1 Stunde bei 4 °C gerührt. Die Mischung wurde anschließend in eine leere Säulenhülse eingefüllt und der Durchlauf abgelassen. Die Säule wurde zweimal mit 4 ml Waschpuffer (s. Tabelle II-11) gewaschen. Dann wurde das (His)₆-Fusionsprotein mit zwei- bis dreimal 1 ml Elutionspuffer eluiert. Zur Entsalzung und zur Entfernung des Imidazols wurden die Eluate über Sephadex G25 NAP-10-Säulen in Aufbewahrungspuffer umgepuffert. Die Lagerung der Protein-Extrakte erfolgte bei -70 °C oder -20 °C.

6.7 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Für die Kalibrierung der HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule (Länge 60 cm, Ø 2,6 cm) zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von CouL-(His)₆ wurde eine Trennung der in Tabelle II-18 aufgeführten Proteine (Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit) durchgeführt. Das Ausschlussvolumen wurde mit Dextranblau 2000, das Bettvolumen mit Aceton bestimmt. Die Flussrate betrug 1 ml/min, als Fließmittel diente Puffer C (s. Tabelle II-11).

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde der Koeffizient K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. K_{av} berechnet sich als:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e =Elutionsvolumen des Proteins
 V_0 =Ausschlussvolumen
 V_t =Bettvolumen der Säule.

Für das Ausschlussvolumen wurde ein Wert von $V_{\text{Dextranblau}} = 109,5$ ml ermittelt; das Bettvolumen betrug $V_{\text{Aceton}} = 297$ ml.

Tabelle II-18: Kalibrierung der Superdex 200-Säule. MW: Molekulargewicht, V_e : Elutionsvolumen, K_{av} : Koeffizient zur Erstellung der Kalibriergeraden (Berechnung s. oben).

Protein	MW [Da]	V_e [ml]	K_{av}
Aldolase	158.000	175	0,3493
Albumin	67.000	197	0,4667
Ovalbumin	43.000	214	0,5573
Ribonuclease A	13.700	253,5	0,768

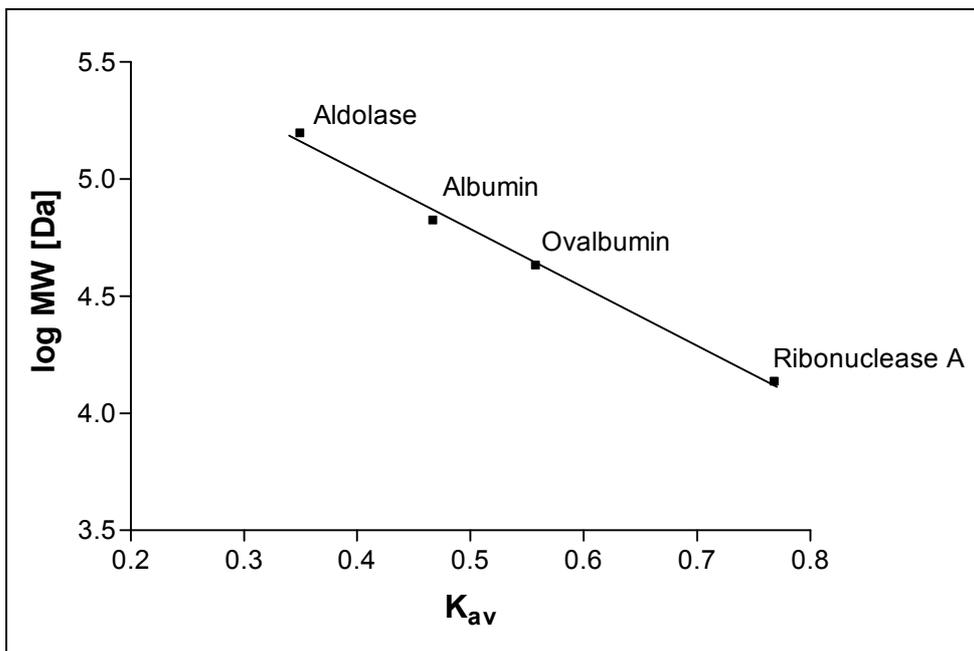


Abbildung II-1: Kalibriergerade für die Superdex 200-Gelfiltrationssäule.

6.8 Enzym-Assays

6.8.1 Enzym-Assays für Typ-II-Topoisomerasen

Die Holoenzyme der Gyrase und der Topoisomerase IV aus *Streptomyces* wurden durch Mischen äquimolarer Mengen der Untereinheiten im Reaktionspuffer rekonstituiert. Supercoiling, Decatenierung und Relaxation wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 20 μ l 25 mM Hepes-KOH, pH 8,0, 10 mM Magnesiumacetat, 56 mM KCl, 2 mM DTT, 10 mM Spermidin, 2 mM ATP und 50 μ g/ml BSA. Als Substrate dienten 100 ng relaxiertes Plasmid pBR322, 400 ng Kinetoplast DNA (kDNA) oder 100 ng supercoiled pBR322. Nach 60 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μ l eines Puffers gestoppt, der gleichzeitig als Ladepuffer für die Gel-Elektrophorese diente. Der Puffer enthielt 200 mM EDTA, 30% Glycerol and 0,25% Bromphenolblau.

6.8.2 Amidsynthetase-Assay

Der Amidsynthetase-Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l durchgeführt. Der Assay enthielt 1 mM 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure, 1 mM Ring B, 5 mM ATP, 5 mM $MnCl_2$ und 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Nach Mischen aller Komponenten außer Ring B mit dem Enzym, wurde die Mischung 1 min im Wasserbad bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von Ring B

gestartet. Nach 5 bis 7 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 1,5 M Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Zur Analyse der Reaktionsprodukte wurde der Reaktionsansatz zweimal mit 500 μ l Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten Ethylacetat-Phasen in der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Der Rückstand wurde in 105 μ l Methanol 50% aufgenommen und 80 μ l davon per HPLC analysiert.

7. Chemische Synthesen

7.1 Darstellung der 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Die freie 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure wurde durch alkalische Hydrolyse des kommerziell erhältlichen Diethylesters gewonnen. 4 g Substanz wurden in 100 ml 4 M NaOH suspendiert und 4 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde die freie Säure durch vorsichtige Zugabe von konzentrierter Salzsäure ausgefällt. Der gelblich-weiße Niederschlag wurde mit einem Büchner-Trichter abfiltriert, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Substanz verfärbte sich an der Luft schnell rötlich-braun. Der Nachweis der vollständigen Hydrolyse wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -Analyse der Substanz erbracht: δ_{ppm} (Methanol- d_4 , 400 MHz) 11,24 (1H, s, NH); 2,52 (3H, s, CH_3); 2,45 (3H, s, CH_3). Signale für die Protonen der Ester-Seitenketten konnten nicht mehr detektiert werden.

7.2 Darstellung des 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure-2-ethylesters

Wie in der Literatur beschrieben (Corwin und Quattlebaum, 1936; Fischer und Walach, 1925) kann die Esterbindung an Position 4 des 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäurediethylester selektiv durch saure Hydrolyse gespalten werden. Dazu wurden 50 mg des Diethylesters in 1,5 ml H_2SO_4 96% bei 30-35 $^\circ\text{C}$ 1,5 h lang geschüttelt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 150 ml Wasser verdünnt, was zu einer Trübung der Mischung führte. Nach Ausschütteln mit 4 x 50 ml Ethylacetat und Entfernen des organischen Lösungsmittels im Vakuum-Rotationsverdampfer konnte der 2-Ethylester als weißer Rückstand gewonnen werden. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde deutlich, dass nur eine der beiden Esterbindungen gespalten wurde δ_{ppm} (Methanol- d_4 , 250 MHz) 11,29 (s, NH, Signal sehr schwach); 4,29 (2H, q, $J=7,12$, CH_2); 2,52 (3H, s, Pyrrol- CH_3), 2,46 (3H, s, Pyrrol- CH_3); 1,35 (2H, t, $J=7,10$, CH_3 der Ester-Seitenkette). Im HPLC-Chromatogramm konnte die gewonnene Substanz durch Co-Chromatographie von dem käuflich erworbenen 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure-4-ethylester

unterschieden werden. Ebenso konnten die beiden Ester durch Dünnschichtchromatographie eindeutig unterschieden werden.

7.3 Darstellung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Die Synthese erfolgte in drei Schritten aus 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäurediethylester als Edukt modifiziert nach Corwin et al. (1942) und Woodward et al. (1990).

Schritt 1: Oxidation der Methylgruppe an Position 5 zur Carbonsäure

15 g des Edukts wurden in 71,25 ml Eisessig und 3,75 ml Acetanhydrid in einem 250-ml-Dreihalskolben (mit Rührer, Thermometer und Tropftrichter) suspendiert. Während der ganzen Zeit wurde der Reaktionsansatz mit einem KPG-Rührer (mit Rührmotor) (Fischer Scientific, Schwerte) gerührt. Diese Mischung wurde im Eisbad auf 14 °C gekühlt, und 3,2 ml Brom wurden langsam über einen Tropftrichter zugetropft. Danach wurden 15,3 ml Sulfurylchlorid sehr langsam, innerhalb ca. 2 h zugetropft. Die Temperatur blieb zunächst bei etwa 11 °C. Nachdem etwa die Hälfte des Sulfurylchlorids zugetropft worden war, wurde das Eisbad durch ein Eis-Kochsalz-Bad ersetzt und die Temperatur auf etwa 0 °C abgesenkt. Nach vollständiger Zugabe des Sulfurylchlorids entstand eine klare braune Lösung; diese wurde 6 h bei 0-2 °C weitergerührt. Anschließend wurde Wasser mit RT zunächst tropfenweise, bis die Heftigkeit der Reaktion nachließ, dann zügiger zugegeben, bis der Kolben nahezu voll war. Diese Mischung wurde auf 60 °C erwärmt und ca. 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Der Inhalt des Kolbens wurde in ein Becherglas mit 1 l kaltem Wasser gegossen und einige Zeit gerührt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Nach dem Lösen des Niederschlags in 200 ml Ethanol bei 60 °C erfolgte Zugabe von NaHCO₃ bis kein CO₂ mehr entwich, dabei entstand ein gelber Niederschlag. Diese Mischung wurde in ca. 1,2 l kaltes Wasser gegossen und der entstandene orangegelbe Niederschlag, der ein Nebenprodukt der Oxidationsreaktion (Aldehyd) darstellte, wurde abfiltriert. Die gewünschte Säure wurde aus dem Überstand durch Zugabe von Salzsäure (ca. 25 ml) ausgefällt. Der entstandene dicke weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Zur Umkristallisation wurde der Niederschlag in 200 ml Ethanol gelöst, die Lösung im 1-l-Rundkolben unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und nach und nach wurden ca. 600 ml Wasser zugegeben bis ein Niederschlag entstanden war, der sich auch in der Siedehitze nicht mehr auflöste. Zur vollständigen Kristallisation wurde die Mischung über Nacht stehen gelassen. Der kristalline Niederschlag wurde nach Abtrennung vom Überstand im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Schritt 2: Decarboxylierung der freien Carboxyl-Gruppe

Nach der oben beschriebenen Oxidation lagen ca. 11 g der Säure vor, diese wurden mit ca. 1 g Bronze-Pulver in einem 100-ml-Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler im Ölbad 1 h lang auf 230–240 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurde die Mischung in Ethylacetat gelöst und vom Bronze-Pulver abgetrennt. Nach Ausschütteln der braunen Lösung mit 5%iger NaHCO₃-Lösung und Abdampfen des Ethylacetats im Vakuum-Rotationsverdampfer entstand eine zähflüssige braune Masse, aus der sich keine kristalline Substanz gewinnen ließ.

Schritt 3: Alkalische Hydrolyse der Esterbindungen

Die in Schritt 2 gewonnene Masse wurde zur Hydrolyse mit 3 M NaOH 4 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde diese mit Salzsäure angesäuert (pH 2) und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Ethylacetats blieb ein brauner amorpher Rückstand, der nicht umkristallisiert werden konnte.

Weitere Reinigungsschritte der Reaktionsprodukte sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

8. Analytik niedermolekularer Substanzen

8.1 Säulenchromatographie zur Vorreinigung der chemischen Syntheseprodukte

Zur Herstellung einer Kieselgel-Trennsäule wurden 78 g Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) in n-Hexan suspendiert und anschließend eine Säule mit einem Volumen von 132,5 ml ($\varnothing=2,5$ cm, h=27 cm) gegossen.

Zur Reinigung der Syntheseprodukte wurde 1 g des hydrolysierten Produktgemisches (s. 7.3) in Methanol gelöst und auf die vorbereitete Kieselgelsäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus 90% n-Hexan:10% Aceton zu 100% Aceton (mit 1% Ameisensäure).

Es wurden 26 Fraktionen erhalten, die zunächst mit einem n-Hexan-Aceton-System (n-Hexan:Aceton:CH₃COOH 10:10:1) per DC analysiert wurden. Die Fraktionen wurden zu drei Pools vereinigt und weiter per HPLC (s. 8.2.2) analysiert und aufgereinigt.

8.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

8.2.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) eingesetzt. Zur Detektion diente ein UV-Durchflussdetektor. Die Steuerung des Gerätes und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten über die Millenium-Software. Die einzelnen Gerätekomponenten und verwendeten Trennsäulen sind nachfolgend aufgeführt:

Pumpen: Waters 510

Autosampler: Waters 717 Plus

UV-Detektor: Waters 486 Absorbance Detector

Software: Millenium V2.15.01

Analytische Säule:

Multospher RP-18 (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm)

Vorsäule: Multoprep RP-18 (30 mm x 4 mm, Partikelgröße 40 µm)

Präparative Säule:

Multospher RP-18 (250 mm x 10 mm, Partikelgröße 5 µm)

Vorsäule: Multoprep RP-18 (50 mm x 10 mm, Partikelgröße 40 µm)

Die Flussrate betrug für die analytische Säule 1 ml/min, für die präparative Säule 2-4 ml/min. Als organische Fließmittelkomponenten wurden Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität (Lichrosolv[®], Merck) eingesetzt. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung über ein Membranfilter aus regenerierter Cellulose (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und unter Vakuum entgast. Die folgenden Fließmittel wurden in dieser Arbeit verwendet:

Fließmittel A: H₂O_{bide}st:Methanol:Ameisensäure (79:20:1)

Fließmittel B: 1% Ameisensäure in Methanol

Fließmittel C: 0,1% Trifluoressigsäure in H₂O_{bide}st

Fließmittel D: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril

8.2.2 Analytik und Isolierung der chemischen Syntheseprodukte

Die vereinigten Fraktionen der Kieselgel-Säulenchromatographie (s. 8.1) wurden durch HPLC-Trennung weiter aufgereinigt und die drei Hauptkomponenten des Produktgemisches präparativ isoliert. Hierfür wurde die präparative RP-18-Säule bei einer Flussrate von 3 ml/min und einer Detektionswellenlänge von 259 nm mit einem Gradienten über 30 min unter folgenden Bedingungen verwendet:

Tabelle II-19: Gradient zur Aufreinigung der chemischen Syntheseprodukte

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	85	15
2,0	85	15
20,0	35	65
20,1	0	100
25,0	0	100
25,1	85	15
30,0	85	15

Die gewonnenen Substanzen wurden nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum-Rotationsverdampfer im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Eine Quantifizierung konnte durch Auswiegen erfolgen. Zur Strukturaufklärung wurden die Substanzen MS- und NMR-Analysen unterzogen (s. unter 8.3 und 8.4).

8.2.3 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte der Amidsynthetase-Reaktion

Amide der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Die Analyse der Amidsynthetase-Reaktionsprodukte der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure mit Ring B erfolgte mit einem Acetonitril-Wasser-Fließmittelsystem bei einer Detektionswellenlänge von 340 nm.

Tabelle II-20: Gradient zur qualitativen Analytik der Amide der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Zeit [min]	Fließmittel C [%]	Fließmittel D [%]
0	75	25
3	75	25
14	45	55
21	40	60
28	20	80
30	20	80
30,1	75	25
35	75	25

Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte ist unter 8.2.4 beschrieben.

Amide der 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, 4-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring A

Für die Analyse der Amidsynthetase-Reaktionsprodukte mit 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, 4-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring A als Substrate erwies sich das Fließmittelsystem mit Methanol als vorteilhafter.

Tabelle II-21: Gradient zur Analytik der Amidsynthetase-Reaktionsprodukte

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

Die Detektionswellenlänge betrug für die Pyrrolcarbonsäureamide 340 nm; die Detektion von Novobiocinsäure erfolgte bei 305 nm. Zur Quantifizierung von Novobiocinsäure wurde eine Kalibriergerade mit Standardsubstanz, gelöst in Methanol, erstellt.

8.2.4 Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Amidsynthetase-Reaktion

Da keine Vergleichssubstanzen für die Reaktionsprodukte der genuinen Acyl-Komponente 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure mit Ring B zur Verfügung standen und das Auswiegen der geringen Produktmengen nicht möglich war, wurde die Quantifizierung über die Abnahme des Substrats 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure im Amidsynthetase-Assay vorgenommen. Es wurden dazu zwei Assays durchgeführt, unter deren Bedingungen nur jeweils eines der beiden Reaktionsprodukte gebildet wurde. Zur Analyse wurde jeder Assay nach der Aufarbeitung in zwei gleiche Teile geteilt und zur Detektion des Substrates 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure bei 260 nm mit dem Gradienten aus Tabelle II-22 vermessen. Der andere Teil wurde zur Detektion der Reaktionsprodukte bei 340 nm mit dem Gradienten aus Tabelle II-20 analysiert. Auf die gleiche Weise wurde jeweils eine Negativkontrolle mit Hitze-denaturiertem Enzym behandelt. Aus der Differenz der Peakflächen der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure der Negativkontrolle und des Assays (bei 260 nm) wurde die Abnahme des Substrates berechnet, die der Menge des gebildeten Produktes entsprach. Über die ermittelte Peakfläche des Produktes in der Messung bei 340 nm konnte so ein molarer Absorptionskoeffizient für Produkt I (Monoamid) und Produkt II (Diamid) berechnet werden.

Tabelle II-22: Gradient zur Quantifizierung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure im Amidsynthetase-Assay

Zeit [min]	Fließmittel C [%]	Fließmittel D [%]
0	100	0
3	100	0
29	0	100
31	0	100
31,1	100	0
35	100	0

Zur Quantifizierung des Monoamids wurden die Assay-Bedingungen so ausgewählt, dass kein Diamid gebildet wurde. Der Assay enthielt in einem Volumen von 200 μ l, 50 μ M 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, 25 μ M Ring B, 5 mM ATP, 5 mM $MnCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 μ g gereinigtes Protein. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Nach der Aufarbeitung wurde der Assay wie beschrieben je zur Hälfte bei 260 nm und 340 nm analysiert. Für das Monoamid der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure mit Ring B wurde ein Absorptionskoeffizient von 200.000/nmol ermittelt.

Der Assay zur Bestimmung des Diamids enthielt in einem Reaktionsvolumen von 200 μ l 0,1 mM 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, 1 mM Ring B, 5 mM ATP, 5 mM $MnCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 550 μ g gereinigtes Protein. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Der aufgearbeitete Assay wurde ebenfalls wie beschrieben bei 260 nm und 340 nm analysiert. Für das Diamid mit zwei Ring-B-Einheiten wurde ein Wert von 130.000/nmol für die weiteren Berechnungen zugrunde gelegt.

8.3 Massenspektrometrie (MS)

EI-MS Messungen wurden an der Universität Tübingen mit einem TSQ70 Massenspektrometer (Finnigan, Bremen) durchgeführt. Die Ionisierungs-Energie betrug 70 eV.

Für die drei Hauptprodukte der chemischen Synthese der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure wurden folgende Ergebnisse erhalten:

4-Methylpyrrol-2,3,5-tricarbonsäure (Substanz 1): m/z (Intensität) 213 (6, M^+), 195 (30, $M-H_2O$), 177(40, $M-2xH_2O$).

3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (Substanz 2): m/z (Intensität) 169 (100, M^+), 151 (70, $M-H_2O$), 134 (25), 123 (30), 106 (15)

4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure (Substanz 3): m/z (Intensität) 169 (100, M^+), 151 (30, $M-H_2O$), 134 (20), 123 (35), 105 (30)

8.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR-Untersuchungen wurden mit einem AMX 400 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt.

Für das Monoamid der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring B wurden folgende Signale im ^1H -NMR gefunden: (CD_3OD) δ_{ppm} 7,68 (1H, d, $J=8,72$ Hz); 7,63 (1H, s); 6,84 (1H, d, $J=8,64$ Hz); 2,65 (3H, s); 2,26 (3H, s).

NMR-Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Dr. A. Porzel am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) wurden mit einem INOVA 500 Spektrometer der Firma Varian durchgeführt. ^1H -NMR-Spektren wurden bei 500 MHz mit internem TMS=0 ppm als Referenz erstellt. ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 125,7 MHz mit internem DMSO- $d_6=39,5$ ppm aufgenommen.

Tabelle II-23: NMR-Techniken, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pflanzenbiochemie in Halle angewendet wurden. Graphische Darstellung der Techniken nach (Claridge, 1999).

Technik	Korrelation	Beschreibung
^1H - ^1H COSY		Correlation Spectroscopy; Protonen-Kopplung meist über 2 oder 3 Bindungen
HSQC		Heteronuclear Single-Quantum Correlation; heteronucleare Kopplung über eine Bindung
HMBC		Heteronuclear Multiple Bond Correlation; Long-range heteronucleare Kopplung meist über 2 oder 3 Bindungen wenn $X=^{13}\text{C}$
^1H - ^1H NOE		Nuclear-Overhauser-Effect-Differenzspektroskopie; räumliche Korrelationen
DPFG-NOE		Double Pulsed Field Gradient Nuclear Overhauser Effect

8.5 LC-MS und Selected Reaction Monitoring (SRM)

LC-MS- und SRM-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Schmidt am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) durchgeführt.

Die positiven und negativen Electrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT TSQ 7000 Instrument (Electrospray-Spannung 4,5 kV; Kapillartemperatur 220 °C; Sheath- und Auxillary-Gas: Stickstoff) aufgenommen. Das Gerät war gekoppelt mit einem Micro-Tech Ultra-Plus MicroLC System mit einer RP18-Säule (5 μm , 1x100 mm, SepServ, Berlin). Die Elution erfolgte mit einem

linearen Gradienten von 20% Acetonitril in Wasser (mit 0,2% Essigsäure) zu 90% Acetonitril (mit 0,2% Essigsäure) über einen Zeitraum von 15 min, gefolgt von einer isokratischen Elution mit 90% Acetonitril (mit 0,2% Essigsäure) über 25 min. Die Flussrate betrug 70 $\mu\text{l}/\text{min}$. Multiple Reaction Monitoring (MRM) während eines HPLC-Laufes wurde für die in Tabelle II-24 aufgeführten Reaktionen mit den angegebenen Kollisionsenergien aufgenommen. Als Kollisionsgas diente Argon, der Kollisionsdruck betrug $1,8 \times 10^{-3}$ Torr.

Die hochaufgelösten ESI Massenspektren wurden mit einem Bruker Apex 70e Fouriertransformation-Ion-Cyclotron-Resonance-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Billerica, USA) aufgenommen. Das Gerät war mit einer InfinityTM-Zelle, einem 7,0 Tesla supraleitenden Magneten (Bruker, Karlsruhe), einem RF-only Hexapol Ion-Guide und einer externen Electrospray-Ionen-Quelle (Agilent, Off Axis Spray; Spannungen: Endplatte -3,7 V, Kapillare -4,2 V, Kapillarausgang 100 V; Skimmer 1 15 V; Skimmer 2 8 V) ausgestattet. Als Trockengas wurde Stickstoff (150 °C) verwendet. Die Probenlösungen wurden mithilfe einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 120 $\mu\text{l}/\text{h}$ kontinuierlich injiziert.

Tabelle II-24: Massenspektrometrische Daten der Produkte des Amidsynthetase-Assays mit der angegebenen Acyl-Komponente. CE = Ladungsaustausch (charge exchange)

Acyl-Komponente	Verbindung [MW]	RT [min]	MSMS-Daten (positive Ionen)	SRM (negative Ionen)	CE [eV]
3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	547	20,18		m/z 546 [M-H] ⁻ → m/z 206	40
	547		m/z 548 [M+H] ⁺ → m/z 341 (SRM)		-20
	358	15,71		m/z 357 [M-H] ⁻ → m/z 206	25
	358		m/z 359 ([M+H] ⁺ , 7), 341 (11), 152 (100), 134 (28)		-20
4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure	358	9,08		m/z 357 [M-H] ⁻ → m/z 206	25
			m/z 359 [M+H] ⁺ → m/z 152 (SRM)		-20
	547	13,93		m/z 546 [M-H] ⁻ → m/z 206	40
			m/z 548 [M+H] ⁺ → m/z 341 (SRM)		-20
3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	372	10,42		m/z 371 [M-H] ⁻ → m/z 206	25
			m/z 373 [M+H] ⁺ → m/z 166 (SRM)		-20
	561	14,65		m/z 560 [M-H] ⁻ → m/z 206	40
			m/z 562 [M+H] ⁺ → m/z 355 (SRM)		-20

III Ergebnisse

1. Resistenzgene der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten

1.1 DNA-Sequenzierung, computergestützte Sequenzanalyse und Hybridisierungsversuche

1.1.1 Identifizierung und Sequenzanalyse der putativen Resistenzgene *gyrB^R*, *parY^R*, *novA* und *couR5*

Aminocoumarinantibiotika sind Hemmstoffe der Gyrase B. Schon seit den 1980er Jahren war bekannt, dass der Novobiocin-Produzent *S. spheroides* zwei Gene für GyrB-Untereinheiten besitzt: Ein konstitutiv exprimiertes *gyrB^S*-Gen, das für eine Novobiocin-sensitive GyrB-Untereinheit codiert und ein zusätzliches Gen für eine Novobiocin-resistente GyrB-Untereinheit, deren Expression durch Novobiocin induziert wird (Thiara und Cundliffe, 1989). Da Resistenzgene von Antibiotika-Produzenten häufig mit den Biosynthesegenen geclustert vorliegen, wurde *gyrB^R* auch als Sonde zur Identifizierung des Novobiocin-Clusters herangezogen (Steffensky et al., 2000b). Die Sequenzierung des Novobiocin-Clusters ergab, dass *gyrB^R* den rechten Rand des Clusters markiert; stromabwärts von *gyrB^R* befinden sich ORFs mit Homologien zu Enzymen des Primärstoffwechsels, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, Peptid- und Zuckertransporter (Steffensky et al., 2000b).

Nahe dem linken Rand des Novobiocin-Clusters (Abbildung I-6, Seite 15) konnte *novA* als Gen für einen ABC-Transporter identifiziert werden. ABC-Transporter sind häufig an Resistenzmechanismen von Antibiotika-Produzenten beteiligt. Daher wurde *novA* ebenfalls als mögliches Resistenzgen untersucht. Innerhalb des Clusters wurden keine weiteren Gene mit einer möglichen Funktion als Resistenzgen gefunden.

Homologe von *gyrB^R* wurden an den entsprechenden Positionen am rechten Rand auch in den Clustern von Coumermycin A₁ und Clorobiocin gefunden (Wang et al., 2000; Pojer et al., 2002). Sequenzierung der Bereiche stromabwärts von *gyrB^R* resultierte in beiden Clustern in der Identifizierung eines ORFs, der ebenfalls Homologie zu *gyrB*-Genen aufweist (Mühlenweg, 1999; Eustáquio et al., 2003b). Dieses nachfolgend mit *parY^R* bezeichnete Gen sollte ebenfalls auf seine mögliche Funktion als Resistenzgen gegen Aminocoumarinantibiotika untersucht werden.

Für *novA* konnte kein homologes Gen in den Clustern von Coumermycin und Clorobiocin gefunden werden. Der homologe Bereich der drei Aminocoumarin-Cluster endet am linken Rand mit *nov/cou/cloE* (Abbildung I-6, Seite 15) (Eustáquio et al., 2003b). In dem sequenzierten Bereich vor *couE* bzw. *cloE* konnten auch keine anderen Gene mit einer möglichen Funktion als Resistenz-Gene identifiziert werden. Allerdings findet sich im Coumermycin-Cluster von *S. rishiriensis* ein Transporter-Gen eines anderen Typs. *couR5* fällt im Cluster durch seine den anderen Genen entgegengesetzte Orientierung auf. Es liegt in einem Bereich des Clusters, für den es in den Clustern von Novobiocin und Clorobiocin keine homologen Bereiche gibt (Pojer et al., 2002). Die Funktion der umliegenden Gene (*couR1* bis *couR4* und *couR6*) ist noch nicht abschließend geklärt.

Innerhalb des Clorobiocin-Clusters und in den angrenzenden, sequenzierten Bereichen konnten keine weiteren Kandidaten für Resistenzgene gefunden werden.

In den drei Clustern der Aminocoumarinantibiotika Novobiocin, Coumermycin A₁ und Clorobiocin konnten so vier Gene identifiziert werden, deren Funktion als putative Resistenzgene untersucht werden sollte.

Sequenzanalyse der putativen Resistenzgene

gyrB^R

Bereits 1988 wurde für den Novobiocin-Produzenten *S. spheroides gyrB^R* als Resistenzgen gegen Novobiocin beschrieben und die Funktion der resistenten GyrB-Untereinheit in vitro nachgewiesen (Thiara und Cundliffe, 1988). Im Rahmen der Dissertation von A. Mühlenweg (1999) wurden Sequenzierungsarbeiten zu den in den Biosynthesegenclustern von Novobiocin und Coumermycin A₁ gefundenen Gyrase-Resistenzgenen durchgeführt. Dabei war festgestellt worden, dass die von Thiara und Cundliffe (1993) beschriebene Sequenz von *gyrB^R* von *S. spheroides* nicht mit der bei der Sequenzierung des Novobiocin-Clusters gefundenen Sequenz übereinstimmt; die Identität auf Aminosäure-Ebene betrug nur 90%. Hingegen zeigte die publizierte Sequenz zu 99% Übereinstimmung mit *gyrB^R* von *S. rishiriensis*. Dieses Ergebnis konnte durch Hybridisierungs-Versuche mit neuen Vergleichs-Stämmen aus den Stammsammlungen bestätigt werden (Mühlenweg, 1999). Die plausibelste Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass die Sequenz, die Thiara und Cundliffe (1993) untersucht hatten von *S. rishiriensis* und nicht von *S. spheroides* stammte, da auch DNA von *S. rishiriensis* im betreffenden Zeitraum in deren Labor verfügbar gewesen war (E. Cundliffe, persönliche Mitteilung).

Die Sequenzierung der Biosynthesegencluster von Novobiocin, Coumermycin A₁ und Clorobiocin ergab, dass in allen drei Clustern ein *gyrB^R*-Gen vorhanden ist, das das rechte Ende des jeweiligen Clusters markiert. Im Novobiocin und im Coumermycin-

Cluster folgt *gyrB^R* auf die Gene (*nov/couSTUVW*) für die Biosynthese des Zuckers Noviose. Im Clorobiocin-Cluster liegt das Gen *cloZ*, dessen Funktion noch nicht geklärt ist, zwischen *cloW* und *gyrB^R*. Die Promotor-Regionen der *gyrB*-Gene in den drei Clustern zeigen etwa 75% Identität auf Nukleinsäure-Ebene. Es ist anzunehmen, dass die Expression in allen drei Stämmen auf ähnliche Weise reguliert wird, wie schon von Thiara und Cundliffe (1989) beschrieben, und im Zusammenhang mit der Antibiotika-Produktion steht. Alle drei Gene besitzen mit 2034 bp die gleiche Größe. Die aus 677 Aminosäuren bestehenden Proteine zeigen durchschnittlich 92% Identität zueinander und durchschnittlich 75% Identität zu GyrB von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Es besteht außerdem hohe Homologie zu *gyrB*-Genen anderer grampositiver Organismen, wie *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Clostridium* (Abbildung III-2A).

parY^R

In den Clustern von Coumermycin A₁ und Clorobiocin, nicht aber von Novobiocin, befindet sich stromabwärts von *gyrB^R* ein zweites Gen mit Homologie zu *gyrB*-Genen (Abbildung III-1). Dieses Gen wurde *parY^R* benannt. Der intergenische Bereich zwischen *gyrB^R* und *parY^R* ist bei *S. rishiriensis* 79 und bei *S. roseochromogenes* 80 bp groß. Beide Organismen besitzen eine konservierte Ribosomen-Bindungsstelle (AGGAG) 8 bp vor dem Start-Codon von *parY^R*. Hinweise auf einen Transkriptions-Terminator oder einen bekannten bakteriellen Promotor konnten in diesem Bereich nicht gefunden werden. Das weist darauf hin, dass *gyrB^R* und *parY^R* vermutlich als ein Operon transkribiert werden.

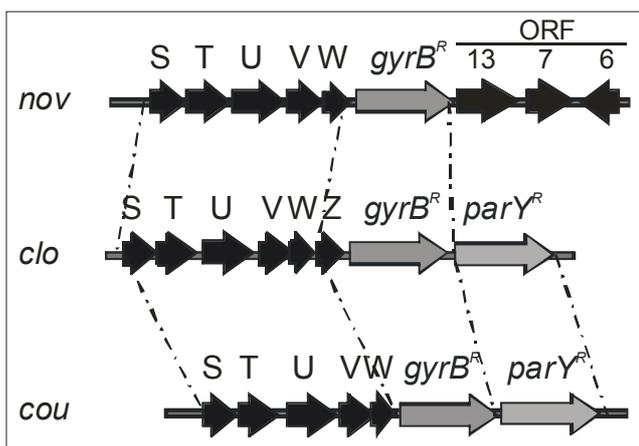


Abbildung III-1: Schematische Darstellung des rechten Randes der Biosyntheseengcluster von Novobiocin (oben), Clorobiocin (Mitte) und Coumermycin A₁ (unten)

Die beiden *parY^R*-Gene aus *S. rishiriensis* und *S. roseochromogenes* sind ebenfalls gleich groß, und die aus 702 Aminosäuren bestehenden Proteine zeigen 91% Identität. Sehr ähnliche Gene existieren auch in den Genomen von *S. coelicolor* (SCO5822; 87% Identität auf AS-Ebene) und von *Bifidobacterium longum* (BL1429; 42% AS-Ebene), die in der Datenbank als putative DNA Gyrase-B-Untereinheiten

annotiert wurden. Daneben existieren in diesen Organismen auch jeweils Gene, die entsprechend als putative Gyrase-A-Untereinheiten annotiert wurden (SCO5822 und BL1434). Diese Gene werden im Folgenden mit *parY* bzw. *parX* bezeichnet. Die Benennung mit *parX* und *parY* wurde in Anlehnung an die Bezeichnung der Topoisomerase-IV-Untereinheiten *parC* und *parE* gewählt. Für die Klasse der Actinomyceten wurde bisher noch keine Topoisomerase IV eindeutig identifiziert. ParX und ParY konnten aufgrund von Sequenz-Homologien zwar eindeutig als Untereinheiten einer Typ-II-Topoisomerase identifiziert werden, eine Einordnung als Gyrase- oder Topo-IV-Untereinheiten war jedoch nicht möglich. Abbildung III-2 zeigt, dass die ParX- und ParY-Proteine von *Streptomyces* und *Bifidobacterium* jeweils eine eigene Gruppe bilden.

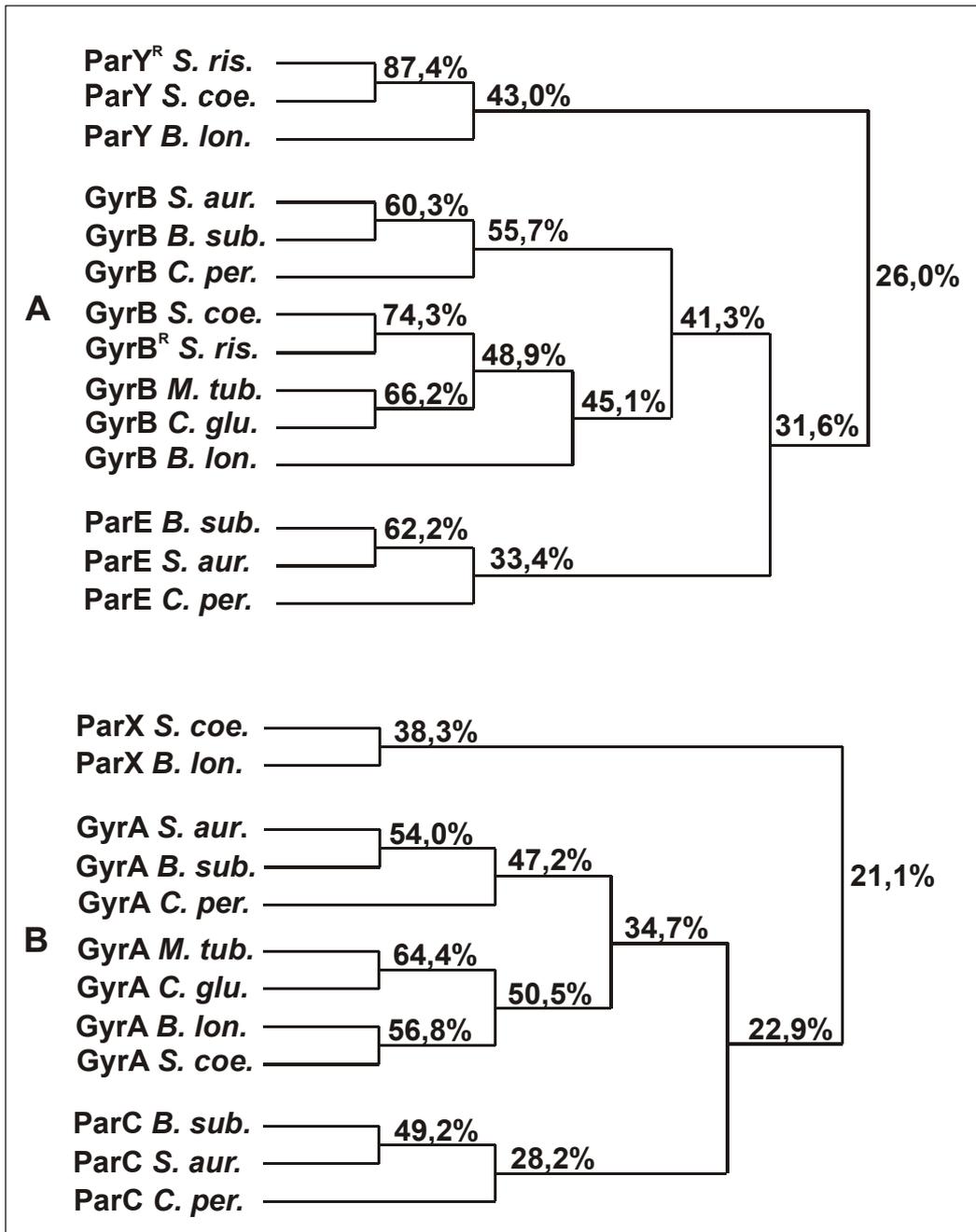


Abbildung III-2: Phylogenetischer Baum basierend auf Ähnlichkeiten der Aminosäure-Sequenzen der B- und A-Untereinheiten von Typ-II-Topoisomerasen grampositiver Bakterien. Die Erstellung des Baumes erfolgte mit dem Programm WINDNASIS, Version 2.1. Folgende Bakterien-Stämme wurden mit einbezogen: *S. ris.*: *Streptomyces rishiriensis*; *S. coe.*: *Streptomyces coelicolor*; *B. lon.*: *Bifidobacterium longum*; *S. aur.*: *Staphylococcus aureus*; *B. sub.*: *Bacillus subtilis*; *C. per.*: *Clostridium perfringens*; *M. tub.*: *Mycobacterium tuberculosis*; *C. glu.*: *Corynebacterium glutamicum*

novA

Das Gen *novA* liegt am rechten Rand des Novobiocin-Clusters (Abbildung I-6, Seite 15). Es zeigt Sequenz-Homologie zu ABC-Transportern vom Typ III, die aus einem Gen bestehen, das einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil des Proteins codiert (Méndez und Salas, 1998). Die charakteristischen Walker Motive A (P-Loop) und B sind im C-Terminus des Proteins konserviert (Abbildung III-3). NovA besitzt Homologie zu ComL aus dem Complestatin-Biosynthesegencluster von *Streptomyces lavandulae* (Chiu et al., 2001), zu Orf2 (CepM) aus dem Chloroeremomycin-Biosynthesegencluster von *Amycolatopsis orientalis* (van Wageningen et al., 1998) und StaU aus *Streptomyces toyocaensis* (Pootoolal et al., 2002). Méndez und Salas (2001) schlugen bereits *novA* als Gen vor, das eine Rolle beim Metaboliten-Transport oder bei der Novobiocin-Resistenz spielen könnte. Experimentelle Belege wurden dafür jedoch nicht erbracht.

	Motiv A		Motiv B
NovA	AVVGPTGSGKSTLSYLVPRLYD	YRFSGGGKQRLAIARTILRDPPVVLVLEATSALD
ComL	ALVGPSGAGKTTITHLVSRLYD	FRLFGGGKQRLAVARLLKAPAIIVVLEATAHL
CepM	ALVGPSGAGKSTITHLVSRLYD	YRMSGGGKQRLAIARLLLKEPRIVVLEATAHL
StaU	ALVGPSGAGKSTLTHLVSRLYD	YRLSGGGKQRLAIARLLLKAPSVVLEATAHL

Abbildung III-3: Alignment der Aminosäuresequenzen im Bereich der Walker-Motive A und B von NovA und der Homologen aus dem Complestatin-Cluster (ComL), dem Cloroeremomycin-Cluster (CepM) und StaU aus *S. toyocaensis*. (Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt.)

couR5

Statt eines ABC-Transporters wurde im Cluster von Coumermycin an anderer Stelle das Gen *couR5* als mögliches Resistenzgen identifiziert. Es ist das einzige Gen im Cluster, das eine entgegengesetzte Orientierung besitzt (Abbildung I-6, Seite 15). Der Bereich, der die Gene *couR1* bis *couR6* umfasst liegt nur im Coumermycin-Cluster vor. Bei *couR6* handelt es sich vermutlich um einen Regulator. Die Gene *couR1* bis *couR4* könnten an der Bildung der zentralen Pyrrolcarbonsäure-Einheit beteiligt sein. CouR5 zeigt Ähnlichkeit mit Transmembran-Efflux-Proteinen, die vermutlich am Antibiotika-Transport beteiligt sind, wie beispielsweise der putative Actinorhodin-Transporter aus *S. coelicolor* (Fernández-Moreno et al., 1991) und das putative Tetracenomycin-Resistenzprotein aus *S. glaucescens* (Guilfoile und Hutchinson, 1992). Im Kyte-Doolittle-Hydrophobizitäts-Plot (Abbildung III-4) ist eine Reihe von hydrophoben Bereichen erkennbar, die auf mögliche Transmembran-Domänen (TMS) hinweisen. CouR5 weist in der N-terminalen Region einige konservierte Motive (Abbildung III-5) für Antibiotika-Resistenzproteine auf (Sheldon

et al., 1999). Das Motiv (LDxTVxNVALP) findet sich am Ende der ersten Transmembran-Domäne in den Aminosäuren (AS) 30-40 wieder und ist typisch für Proteine der 14-TMS-Familie. Das so genannte β -turn-Motiv (VxGxLxDxxGRK/RxxxL) ist hochkonserviert in dem cytoplasmatischen Segment zwischen TMS 2 und 3 und umfasst in CouR5 die AS 69-86. In den Positionen 153-162 ist ein drittes Motiv (gxxxGPxGG) enthalten, das ein mögliches Export-Motiv darstellt und in verschiedenen Transportproteinen gefunden wurde.

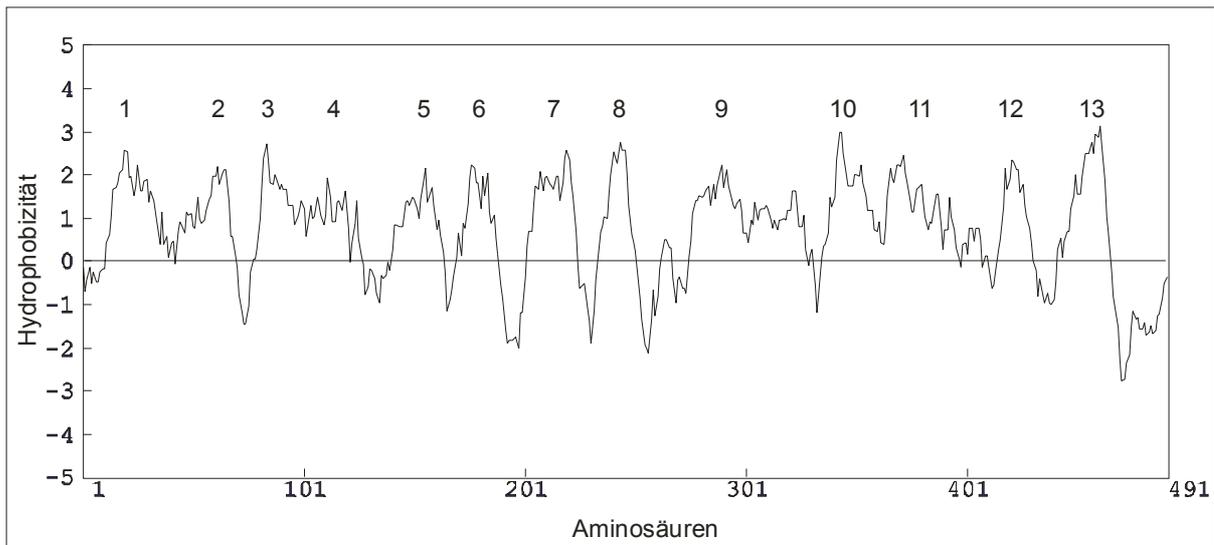


Abbildung III-4: Hydrophobizitäts-Plot nach Kyle-Doolittle von CouR5. Der Hydrophobizitäts-Plot wurde mithilfe des Programms WINDNASIS, Version 2.1 erstellt. Positive Werte stehen für hydrophobe, negative Werte für hydrophile Bereiche.

```

MTETDVAEPVQAGRWAAYSVCLLAGFVTI[LDVSVINVAVE]SMQAGLHLSAGQVLWAAFGY 60
TLTFGVVLVPAGALGDQLGRRRTLLVGLAFFAFGSLACGLAASGWVLVAARLVQGLAAGV 120
VTPQVVGLMRQLFARGPELGKAGGAYSGMIAATTAIGPLVGGLLIQAGGPADGWRWVFLV 180
NVPAAALSLPLGLRWLPRDRQQIRGVRLDLLGIALLGSGVATLILPLIAAEQRQPSVPH 240
LLGLSALLLACFIAWQQHCTRSRPRLVNLAMLRQDYAISAQVGMGYFVGFVGI PFMVS 300
LYFQLGLGYSALAAGAVGTP TALGAAISAPLAGRAVHRVGRRLV VIGLAAVALGSAGLIA 360
LIGHRAGGLVWLLVAGPLLLAGAGSGLVIGPNLTLALQTVPLTEGSAAGAVLQGTGQRIGS 420
TIGIAVIGALYFGSLTAHPGDHLRAATDGLLGSTVAITITLLITVIALLATRDRRPSTQH 480
GTPATDGDEPD*

```

Abbildung III-5: Aminosäuresequenz von CouR5. Ein konserviertes Motiv, das typisch ist für 14-TMS-Proteine ist schwarz umrandet; das β -turn-Motiv ist mit einem gepunkteten Kasten umrahmt. Das putative Export-Motiv ist grau umrahmt.

1.1.2 Detektion verschiedener Typ-II-Topoisomerase-Gene im Genom der Aminocoumarin-Produzenten mittels Southern Blotting

Thiara und Cundliffe (1989) hatten gezeigt, dass das von ihnen nachgewiesene *gyrB^R*-Gen in dem von ihnen untersuchten Aminocoumarin-Produzenten zusätzlich zu einem Novobiocin-sensitiven *gyrB*-Gen existiert. Wenn es sich bei *parY^R* wie vermutet ebenfalls um ein Resistenzgen handelte, war hier die gleiche Konstellation anzunehmen, da auch der Novobiocin-sensitive Stamm *S. coelicolor* ein *parY*-Gen besitzt. Um die Annahme zu belegen, dass alle drei Aminocoumarin-Produzenten zwei *gyrB*-Gene, eines für die Aminocoumarin-resistente und eines für die -sensitive Gyrase B, enthalten, und die gleiche Konstellation in den Produzenten von Coumermycin und Clorobiocin auch für *parY^R/parY^S* besteht, wurde ein Southern-Blot-Experiment mit genomischer DNA der drei Produzenten und als Vergleich von *S. coelicolor* durchgeführt. Als Sonden dienten Fragmente aus *gyrB^R* (912 bp *Bgl*II-Fragment) und *parY^R* (1330 bp *Bgl*II-*Pvu*II-Fragment) aus *S. rishiriensis* (Abbildung III-6). Sowohl die große Ähnlichkeit der Sequenzen der *gyrB*-Gene bzw. der *parY*-Gene untereinander als auch die Unterschiede der Sequenzen von *gyrB* und *parY* sollte eine selektive Hybridisierung beider Gruppen ermöglichen. Genomische DNA der vier ausgewählten Stämme wurde mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bam*HI, *Pst*I und *Pvu*II) geschnitten und die Hybridisierung nacheinander mit beiden Sonden durchgeführt. Die erhaltenen Blots sind in Abbildung III-6 dargestellt. Wie erwartet, hybridisierte die *gyrB^R*-Sonde mit dem *gyrB*-Gen von *S. coelicolor*, wodurch

in jedem der drei Verdauungen nur eine Bande sichtbar war. Die beobachteten Banden entsprachen auch den berechneten Größen aus den Sequenzdaten (*Bam*HI: 4.496 bp; *Pst*I: 11.668 bp; *Pvu*II: 3.453 bp). Im Gegensatz dazu, waren bei *S. spheroides* zwei Hybridisierungsbanden erkennbar. Auch in *S. rishiriensis* und *S. roseochromogenes* konnten zwei *gyrB^R*-Gene detektiert werden. *gyrB^R* von *S. rishiriensis* enthält eine *Pst*I-Schnittstelle, und *gyrB^R* von *S. roseochromogenes* enthält sowohl eine *Pst*I- als auch eine *Bam*HI-Schnittstelle, deshalb waren in den betreffenden Spuren jeweils drei Banden erkennbar.

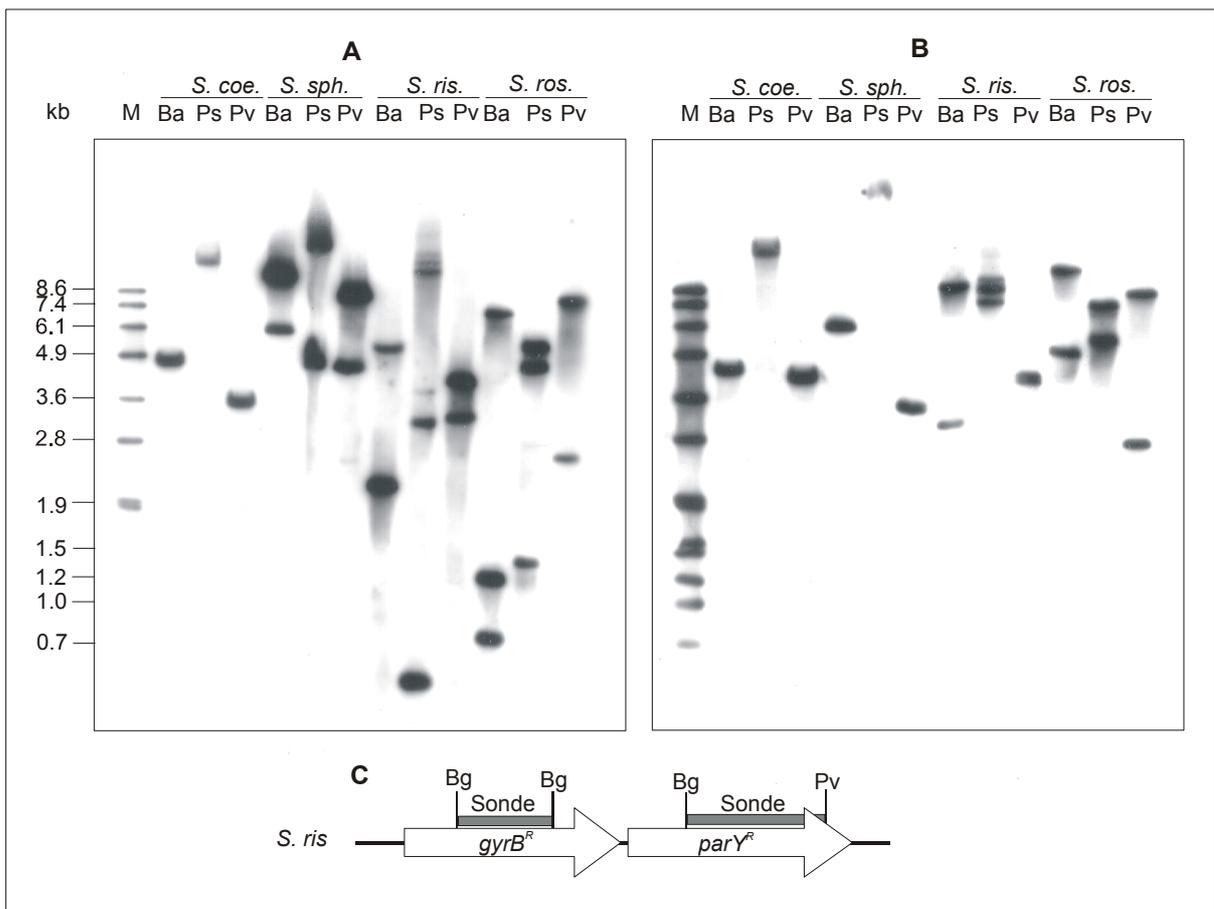


Abbildung III-6: Southern Blot mit Sonden von *gyrB^R* und *parY^R*. Genomische DNA von *S. coelicolor* (*S. coe.*), *S. spheroides* (*S. sph.*), *S. rishiriensis* (*S. ris.*) und *S. roseochromogenes* (*S. ros.*) wurde verdaut mit *Bam*HI (Ba), *Pst*I (Ps) und *Pvu*II (Pv). *gyrB^R* (A) und *parY^R* (B) von *S. rishiriensis* wurden als Hybridisierungssonden (C) verwendet. Bg: *Bgl*II

Mit *parY^R* als Sonde konnte ebenfalls das *parY*-Gen von *S. coelicolor* mit den korrekten Fragment-Größen aus der genomischen DNA-Sequenz (*Bam*HI: 4.183 bp; *Pst*I: 13.021 bp; *Pvu*II: 3.965 bp) detektiert werden. Auch in *S. spheroides* hybridisierte nur jeweils eine einzelne Bande. Da *S. spheroides* kein *parY^R*-

Resistenzgen im Novobiocin-Cluster besitzt, ist anzunehmen, dass es sich dabei um das sensitive *parY*-Gen handelt. Hingegen wurden in *S. rishiriensis* und *S. roseochromogenes* jeweils zwei mit *parY^R* hybridisierende Banden detektiert. Das weist daraufhin, dass beide Organismen neben den *parY^R*-Resistenzgenen im Cluster von Coumermycin bzw. Clorobiocin ein zusätzliches *parY*-Gen enthalten.

1.2 Funktionelle Untersuchungen in vivo

1.2.1 Heterologe Expression der Resistenzgene *gyrB^R*, *parY^R*, *novA* und *couR5* in *Streptomyces lividans* TK24 und Resistenztests in vivo

Um die Funktion von *gyrB^R*, *parY^R*, *novA* und *couR5* als Resistenzgene zu belegen, sollten diese in dem Aminocoumarin-sensitiven, keine Aminocoumarine produzierenden Stamm *Streptomyces lividans* TK24 heterolog exprimiert werden. Als Expressionsvektor wurde der *E.-coli-Streptomyces*-Shuttle-Vektor pUWL 201 (Doumith et al., 2000) verwendet. Dieser Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli* und ein Thiostrepton-Resistenzgen zur Selektion in *Streptomyces*, außerdem den konstitutiven Promotor ermEp* des Erythromycin-Resistenzgens aus *Saccharomyces erythraea* (Bibb et al., 1985). Die zu exprimierenden Gene wurden aus verschiedenen Plasmiden und Cosmiden, die Teile der genomischen DNA von *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891 bzw. *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489 enthielten, über ein bis zwei Zwischenschritte in Klonierungsvektoren in den Expressionsvektor pUWL201 inkloniert. Alle verwendeten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind in Tabelle II-14 beschrieben. Die Expressionskonstrukte wurden mithilfe von PEG-vermittelter Protoplastentransformation (s. II.5.5 und II.5.6) in *S. lividans* TK24 transformiert und Transformanten mit Thiostrepton (500 µg/Platte) selektiert. Es wurden pro Transformation zwischen 1000 und 3000 Transformanten erhalten. Nach einem zweiten Selektionsschritt auf Thiostrepton-haltigen Agarplatten (50 µg/ml) wurden jeweils 4 bis 6 Transformanten ausgewählt und auf Anwesenheit des intakten Expressionskonstruktes durch Plasmidisolierung (s. II.5.7.2) und geeignete Restriktionsverdau überprüft. Transformanten, für die auf diese Weise das jeweilige Plasmid nachgewiesen werden konnte, wurden zur Gewinnung von Sporen herangezogen.

Aus *S. spheroides* wurden die Gene *gyrB^R* und *novA* auf diese Weise exprimiert und untersucht. Aus *S. rishiriensis* wurden *gyrB^R*, *parY^R* und *couR5* jeweils einzeln auf die beschriebene Weise in *S. lividans* TK24 exprimiert. Um zu überprüfen, ob die gemeinsame Expression der beiden Topoisomerase-II-Gene *gyrB^R* und *parY^R* einen additiven Effekt besitzen, wurde ein Expressionskonstrukt (pGES4) hergestellt, das beide Gene mit der intergenischen Sequenz, wie im Genom von *S. rishiriensis*

vorliegend, enthält. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, ob damit tatsächlich beide Gene im heterologen Wirt exprimiert wurden, oder ob die Transkription nach *gyrB^R* unterbrochen wurde.

Resistenztests in vivo

Die Resistenztests mit den Transformanden von *S. lividans* TK24 mit den beschriebenen Resistenzgenen wurden durch Ausbringen von Sporen auf Minimal-Medium-Agarplatten mit steigenden Konzentrationen von Novobiocin (0 bis 750 µg/ml) bzw. Coumermycin A₁ (0 bis 500 µg/ml) durchgeführt (s. auch II.4.2.3). Als Kontrolle diente *S. lividans* TK24 transformiert mit dem unveränderten Vektor pUWL 201. Der Grad an Resistenz wurde durch Auszählen von Kolonien nach 6 Tagen Inkubation festgestellt. Das Ergebnis ist in Tabelle III-1 dargestellt.

Der Kontrollstamm mit dem leeren Vektor wurde durch Konzentrationen von 100 µg/ml Novobiocin und 50 µg/ml Coumermycin A₁ vollständig in seinem Wachstum gehemmt. Dass Coumermycin A₁ eine größere antibakterielle Wirksamkeit besitzt als Novobiocin wurde schon früher in der Literatur beschrieben (Hooper et al., 1982; Peng und Marians, 1993).

Die *gyrB^R*-Gene des Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* und des Coumermycin-A₁-Produzenten *S. rishiriensis* verliehen den Transformanden deutliche Resistenz. Vollständige Hemmung des Wachstums wurde erst mit Konzentrationen von mehr als 750 µg/ml Novobiocin und 500 µg/ml Coumermycin A₁ erreicht. Beide Gene verliehen gleichermaßen effektiven Schutz gegen Novobiocin und gegen Coumermycin, sodass anzunehmen ist, dass es sich um einen generellen Resistenzmechanismus gegen Aminocoumarinantibiotika und nicht um einen speziellen Schutz gegen eines der beiden strukturell unterschiedlichen Antibiotika handelt.

Das zweite Gyrase B-ähnliche Gen *parY^R* verlieh ebenfalls deutlich erkennbare Resistenz gegen beide getesteten Aminocoumarinantibiotika, jedoch war der Grad der Resistenz geringer als der durch die *gyrB^R*-Gene. Vollständige Hemmung des Wachstums der Transformanden wurde durch 500 µg/ml Novobiocin und 300 µg/ml Coumermycin A₁ erreicht.

Das Konstrukt, das *gyrB^R* und *parY^R* aus *S. rishiriensis* zusammen enthält, führte zu dem gleichen Ergebnis in den Resistenztests wie die alleinige Expression von *gyrB^R*. Da *gyrB^R* und *parY^R* vermutlich eine Transkriptionseinheit bilden, ist anzunehmen, dass die Effekte der Expression von *gyrB^R* und *parY^R* unter den Bedingungen dieser Versuchsreihe nicht additiv oder synergistisch sind.

Die Expression der Transporter-Gene *novA* aus *S. spheroides* und *couR5* aus *S. rishiriensis* führte ebenfalls zu Resistenz der Transformanden gegen Novobiocin und Coumermycin A₁. Der Grad der Resistenz, der durch diese Gene verliehen wurde, war aber deutlich geringer als durch die Topoisomerase-II-Gene. Es ist zu vermuten,

dass beide Gene am Transport und möglicherweise an der Sezernierung der Antibiotika in das Medium beteiligt sind. Der wichtigste Resistenzmechanismus der Aminocoumarin-Produzenten scheint, wie erwartet, die Bildung Aminocoumarin-resistenter Topoisomerasen und nicht die Nutzung von Efflux-Mechanismen zu sein.

Tabelle III-1: Wachstum der Transformanden von *S. lividans* TK24 mit den Resistenzgenen aus *S. sphaeroides* (*S. sph.*) und *S. rishiriensis* (*S. ris.*)

Gen(e)	Novobiocin-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]								Coumermycin-A ₁ -Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]						
	0	50	100	250	500	600	750	MIC	0	50	100	250	300	500	MIC
Kontrolle (pUWL201)	+++++	+	0	0	0	0	0	100	+++++	0	0	0	0	0	50
<i>gyrB^R S. sph.</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++	+	>750	+++++	+++++	++++	+++	++	0	500
<i>gyrB^R S. ris.</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++	+	>750	+++++	+++++	++++	+++	++	0	500
<i>parY^R S. ris.</i>	+++++	+++++	+++++	++++	0	0	0	500	+++++	+++++	+++	+	0	0	300
<i>yrB^R + parY^R S. ris.</i>	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++	+	>750	+++++	+++++	++++	+++	++	0	500
<i>novA S. sph.</i>	+++++	+++++	++	+	0	0	0	500	+++++	++++	+	0	0	0	250
<i>couR5 S. ris.</i>	+++++	++++	++	0	0	0	0	250	+++++	++++	+	0	0	0	250

+++++: mehr als 3000 Kolonien (K), +++++: 1000 bis 3000 K.; +++: 500 bis 1000 K., ++: 100 bis 500 K., +: 10 bis 100 K., 0: kein Wachstum; MIC: Minimale Konzentration, die zu vollständiger Hemmung des Wachstums führte.

1.2.2 Komplementierungsversuche mit *gyrB*^R- und *parE*-Mutanten von *E. coli*

Um die Funktionen von *gyrB*^R und *parY*^R als B-Untereinheiten der Topoisomerase II nachzuweisen, sollte ein Komplementierungsversuch mit Mutanten von *E. coli* durchgeführt werden, deren *gyrB*- bzw. *parE*-Gene temperaturabhängig ausgeschaltet werden. Die *E.-coli*-Stämme N4177 (Menzel und Gellert, 1983) und W3110parE10 (Kato et al., 1990) besitzen *gyrB* bzw. *parE* mit einer Mutation, die zu einer Unterdrückung der Expression dieser Gene bei erhöhter Temperatur (42 °C) führt, während das Wachstum bei 30 °C unbeeinflusst bleibt. Da sowohl DNA-Gyrase als auch Topoisomerase IV für das Überleben der Zellen essentiell ist, sterben die Zellen bei der repressiven Temperatur ab.

Frühere Untersuchungen (Simon et al., 1995) hatten darauf schließen lassen, dass die Gyrase-Untereinheiten GyrA und GyrB von *E. coli* und *Streptomyces* nicht kompatibel sind und zusammen keine funktionelle Gyrase bilden können. Daher sollten jeweils beide Untereinheiten, d.h. GyrA und GyrB^R bzw. ParX und ParY^R aus *Streptomyces* für die Komplementierung der *gyrB*^{ts}- und *parE*^{ts}-Mutanten von *E. coli* herangezogen werden. Da die Sequenzen von *gyrA* und *parX* der Aminocoumarin-Produzenten nicht bekannt waren, wurden diese von dem vollständig sequenzierten Organismus *S. coelicolor* A3(2) (Bentley et al., 2002) mittels PCR amplifiziert (s. II.5.8.2) und in pET-24a(+) (Kan^r) einkloniert (Konstrukte pGES20 und pGES9, s. Tabelle II-14). *gyrB*^R und *parY*^R von *S. rishiriensis* wurden ebenfalls wie unter II.5.8.2 beschrieben amplifiziert und in den Expressionsvektor pRSETB (Amp^r) einkloniert (Konstrukte pGES6 und pGES7, s. Tabelle II-14).

Zunächst wurden die pRSETB-Konstrukte mit *gyrB*^R und *parY*^R jeweils in beide Mutanten von *E. coli* transformiert. Wie erwartet war keines der beiden Gene in der Lage, Wachstum der Mutanten nach Induktion mit IPTG (0,5 mM) bei der repressiven Temperatur (42 °C) durch Komplementation von *gyrB*^{ts} oder *parE*^{ts} zu ermöglichen. Jedoch auch nach Transformation der jeweils entsprechenden A-Untereinheit *gyrA* bzw. *parX* konnte nach Induktion mit IPTG bei keiner der Mutanten Wachstum bei 42 °C beobachtet werden, während das Wachstum bei 30 °C nach wie vor unbeeinträchtigt geblieben war. Als Positivkontrolle wurde die Transformation des Plamids pAG111, das *gyrB* aus *E. coli* enthielt (Hallett et al., 1990), in den Stamm N4177 (*gyrB*^{ts}) vorgenommen. Die Transformanden zeigten sowohl bei 30 °C als auch bei 42 °C gutes Wachstum.

Dieses Experiment gab keinen Aufschluss über die Funktionen von GyrB^R und ParY^R. Aus den Ergebnissen konnte nicht geschlossen werden, ob möglicherweise das System mit den gewählten Vektoren für das Experiment ungeeignet war, oder ob eine aktive Expression von Topoisomerasen II aus *Streptomyces* in *E. coli* nicht möglich ist, z.B. aufgrund unvollständiger oder falscher Faltung der Proteine.

2. Überexpression und Reinigung von GyrB^R und ParY^R und funktionelle Charakterisierung in vitro

2.1 Reinigungsversuche mit Novobiocin-Sepharose

Die Ergebnisse der Resistenztests mit *S.-lividans*-Transformanden (s. 1.2.1, Seite 75) hatten bewiesen, dass GyrB^R und ParY^R aktiv aus den Konstrukten in pUWL 201 exprimiert wurden. Daher sollte versucht werden, GyrB^R, wie schon von Thiara und Cundliffe (1988) beschrieben, mittels Affinitätschromatographie an Novobiocin-Sepharose zu reinigen.

Für die Versuche zur Reinigung der Gyrase wurden Transformanden mit *gyrB^R*, für die bereits Resistenz gegen Aminocoumarine, wie unter 1.2.1 (S. 74) beschrieben, gezeigt worden war, herangezogen. Zellfreier Protein-Rohextrakt (s. II.6.4.2) wurde zur Vorreinigung auf eine Heparin-Säule aufgetragen und mit einem linearen KCl-Gradienten von 0,05 bis 1 M KCl, wie unter II.6.5.1 beschrieben, eluiert. Der Verlauf des Gradienten konnte mit einem Leitfähigkeitsdetektor verfolgt werden. Die Elution der Gyrase wurde in einem Bereich von 0,2 bis etwa 0,4 M KCl erwartet (Störl et al., 1994). Tatsächlich eluierte in diesem Bereich ein breiter Peak (UV-Detektion bei 280 nm). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und für den zweiten Reinigungsschritt auf die Novobiocin-Sepharose aufgetragen (s. II.6.5.2). Die Elution erfolgte in Stufen mit 0,2 und 0,5 M KCl, dann mit 1 M und 5 M Harnstoff. GyrA wurde schon in einer Fraktion mit KCl oder der niedrigeren Harnstoff-Konzentration erwartet. Die Elution der Novobiocin-sensitive Gyrase B sollte erst mit 5 M Harnstoff erfolgen. Für die Elution der Novobiocin-resistenten GyrB^R-Untereinheit konnte Elution bereits mit KCl evtl. zusammen mit GyrA erwartet werden. Durch Inkubation verschiedener Fraktionen im Supercoiling-Assay (s. II.6.8.1) konnten die enthaltenen Gyrase-Untereinheiten identifiziert werden. Folgendes Ergebnis wurde erhalten:

- GyrA eluierte mit der niedrigsten KCl-Konzentration (0,2 M) und die entsprechenden Fraktionen zeigten nur durch Mischen mit aktiven GyrB-Fraktionen Supercoiling-Aktivität.
- Fraktionen aus der Elution mit 0,5 M KCl und 1 M Harnstoff zeigten keine Gyrase-Aktivität.
- Fraktionen aus der Elution mit 5 M Harnstoff enthielten GyrB; Supercoiling-Aktivität konnte nach Mischen mit GyrA-haltigen Fraktionen detektiert werden.
- Die gereinigte Gyrase zeigte in vitro keine Resistenz gegen Novobiocin im Vergleich zu Wildtyp-Gyrase aus *S. lividans*.

Die beschriebenen Versuche wurden mit Transformanden mit *gyrB^R* sowohl aus *S. spheroides* als auch aus *S. rishiriensis* durchgeführt. Außerdem wurden für die Expression CDM- und YEME-Medium getestet. Alle Experimente führten zu den gleichen, beschriebenen Ergebnissen. Die Reinigung mittels Novobiocin-Affinitätschromatographie eignete sich offensichtlich nicht zur Reinigung der resistenten GyrB^R-Untereinheit aus *S. spheroides* und *S. rishiriensis*.

2.2 Reinigungsversuche als (His)₆-Fusionsproteine aus *E. coli*

Die Expression von Gyrase- und Topoisomerase-IV-Untereinheiten verschiedener Organismen als Polyhistidin-Fusionsproteine in *E. coli* und Rekonstitution der Holoenzyme ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Wu und Shahied, 1995; Pan und Fisher, 1999; Barnes et al., 2003). Diese Möglichkeit sollte auch für die Typ-II-Topoisomerasen aus *Streptomyces* genutzt werden.

Das Expressionssystem mit pRSETB als Expressionsvektor mit N-terminalem (His)₆-tag und dem *E.-coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS sollte zunächst mit *gyrB^R* aus *S. spheroides* und *gyrA* aus *S. coelicolor* etabliert werden.

Es wurden verschiedene Bedingungen zur löslichen Expression der Proteine getestet. Die Kultivierungstemperatur wurde zwischen 15 °C und 30 °C variiert und IPTG-Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 1 mM für die Induktion eingesetzt. Die Expression eines Proteins, das der Größe von GyrB^R mit (His)₆-tag entspricht (78,5 kDa) konnte per SDS-PAGE zwar detektiert werden, jedoch war die Bande im löslichen Proteinanteil nahezu nicht mehr detektierbar.

Expressionsversuche mit GyrA aus *S. coelicolor* führten zu keiner erkennbaren Expression in dem beschriebenen System und unter den getesteten Bedingungen.

2.3 Überexpression als (His)₆-Fusionsproteine in *Streptomyces lividans* und Reinigung durch Affinitätschromatographie

Da die Reinigung der Typ-II-Topoisomerasen mittels Novobiocin-Affinitätschromatographie nicht erfolgreich gewesen war, und auch eine funktionelle Expression der Topoisomerase-II-Untereinheiten aus *Streptomyces* in *E. coli* nicht gelungen war, wurde eine weitere Möglichkeit zur Expression und Reinigung der Proteine gesucht. Die Expression der Topoisomerase-II-Untereinheiten sollte als Hexahistidin-Fusionsproteine in *Streptomyces lividans* erfolgen. *S. lividans* T7 ist ein Derivat des Stammes *S. lividans* TK23 (Kieser et al., 2000) und besitzt chromosomal eine Thiostrepton-induzierbare Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase. Damit eignet sich dieser Stamm für die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, wie es in den Expressionsvektoren pRSETB und pET-24a(+) der Fall ist. Um die Replikation dieser *E.-coli*-Vektoren in *S. lividans* zu ermöglichen,

wurden diese mit dem Plasmid pGM9 fusioniert. pGM9 (Muth et al., 1989) besitzt neben Resistenzgenen für Kanamycin und Thiostrepton eine Replikationsstart-Sequenz (origin) für *Streptomyces*.

gyrB^R aus *S. spheroides*, *gyrB^R* und *parY^R* aus *S. rishiriensis* und *gyrA* aus *S. coelicolor* wurden nach PCR-Amplifikation (s. II.5.8.2) in pRSETB als Expressionsvektor mit N-terminalem (His)₆-tag inkloniert. Die erhaltenen Konstrukte wurden mit *Hind*III linearisiert und mit dem ebenfalls mit *Hind*III linearisierten Plasmid pGM9 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde mit Kanamycin (50 µg/ml) selektiert, wodurch nur Transformanten mit erfolgreich fusionierten Plasmiden erhalten wurden, da pGM9 alleine nicht von *E. coli* repliziert werden kann. Bei der Ligation der pRSETB-Expressionskonstrukte mit pGM9 sind jeweils zwei Orientierungen möglich. Abbildung III-7 zeigt als Beispiel schematisch die möglichen Plasmid-Konstrukte für *gyrB^R* aus *S. rishiriensis*. Durch geeignete Restriktionsverdau konnten die Orientierungen der erhaltenen rekombinanten Plasmide festgestellt werden. Für alle zu exprimierenden Gene wurden jeweils Fusions-Plasmide beider Orientierungen erhalten. Für die Expressionsversuche wurde jeweils das Plasmid ausgewählt, bei dem alle Gene dieselbe Transkriptionsrichtung besaßen entsprechend Abbildung III-7A.

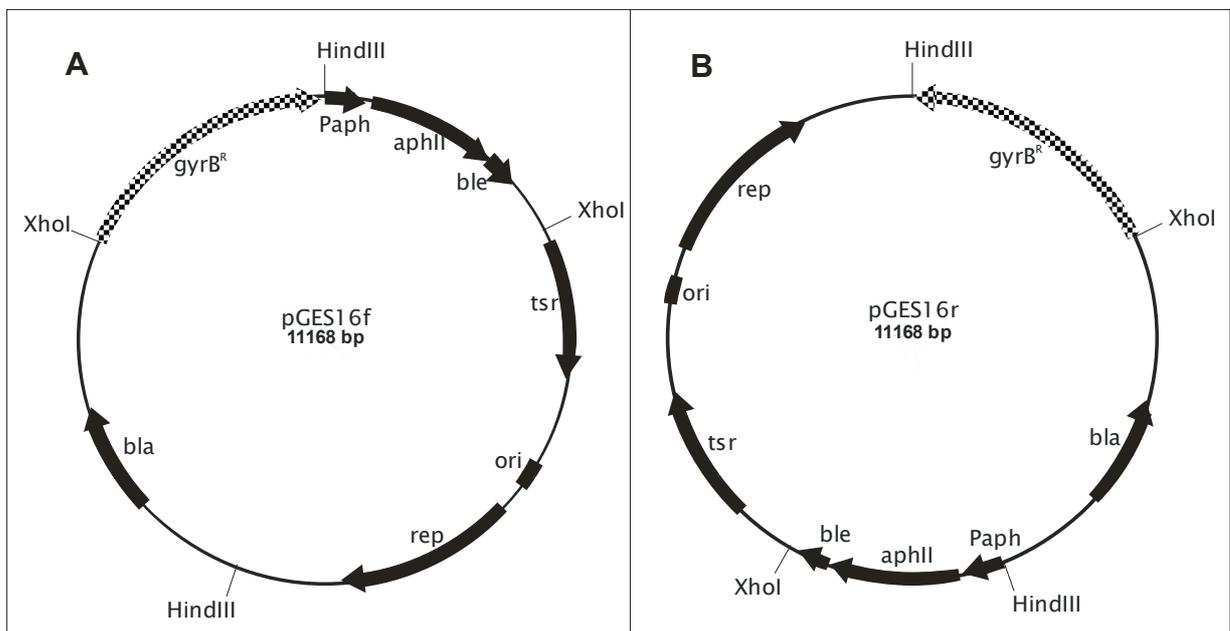


Abbildung III-7: Schematische Darstellung der Fusions-Plasmide aus dem *gyrB^R*-pRSETB-Konstrukt (pGES6) mit pGM9. A zeigt das Konstrukt, bei dem alle Gene dieselbe Transkriptionsrichtung besitzen. Bei B besitzt das zu exprimierende Gen (*gyrB^R*) die dem Replikon (rep) entgegengesetzte Orientierung.

parX aus *S. coelicolor* wurde ebenfalls per PCR amplifiziert und anschließend in pET-24a(+) als Expressionsvektor mit C-terminalem (His)₆-tag ligiert. Die Fusion dieses Konstruktes mit pGM9 erfolgte über die *Bgl*II-Schnittstelle beider Plasmide. Es entstanden ebenfalls Fusions-Plasmide mit unterschiedlichen Orientierungen. Für die Expression von ParX wurde das Konstrukt ausgewählt, in dem das zu exprimierende Gen in derselben Transkriptionsrichtung vorliegt wie die von pGM9 stammenden Gene.

Die ausgewählten Plasmide wurden durch PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation in *S. lividans* T7 transformiert und Transformanten mit Kanamycin (5 mg/Platte) selektiert. Die Expression der rekombinanten Topoisomerase-II-Untereinheiten in Flüssigkultur wurde durch Zugabe von Thiostrepton (25 µg/ml) induziert. In allen Fällen konnte die Expression eines Proteins der erwarteten Größe, wie in Tabelle III-2 aufgeführt, durch SDS-PAGE detektiert werden.

Tabelle III-2: Berechnete Größen der exprimierten Proteine mit und ohne (His)₆-tag

Protein	Herkunft	Molekulargewicht [kDa]	
		nativ	mit (His) ₆ -tag
GyrB ^R	<i>S. spheroides</i>	74,7	78,5
GyrB ^R	<i>S. rishiriensis</i>	74,6	78,6
ParY ^R	<i>S. rishiriensis</i>	76,8	80,8
GyrA	<i>S. coelicolor</i>	94,6	99,8
ParX	<i>S. coelicolor</i>	88,6	90,1

Nach der Herstellung zellfreier Protein-Rohextrakte und Durchführung der Nickel-Affinitätschromatographie unter Standardbedingungen lagen GyrA und ParX aus *S. coelicolor* bereits nahezu homogen gereinigt vor. ParY^R wies noch relativ starke Verunreinigungen auf, die durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration auf 50 mM im Waschpuffer weitgehend beseitigt werden konnten. GyrA aus *S. lividans* T7 bildete offensichtlich einen stabilen Komplex mit GyrB^R aus *S. rishiriensis* und coeluierte mit letzterem. Durch Zusatz von Harnstoff (2 M) zum Waschpuffer konnte GyrA von dem an das Säulenmaterial gebundene GyrB^R getrennt und ausgewaschen werden. Nach der anschließenden Elution mit Imidazol lag GyrB^R nahezu homogen, jedoch in denaturierter Form vor. Nach Entfernen des Imidazols konnte GyrB^R durch Inkubation bei 4 °C im glycerinhaltigen Aufbewahrungspuffer für 16 h renaturiert werden. Das Ergebnis der Reinigung ist in Abbildung III-8 dargestellt.

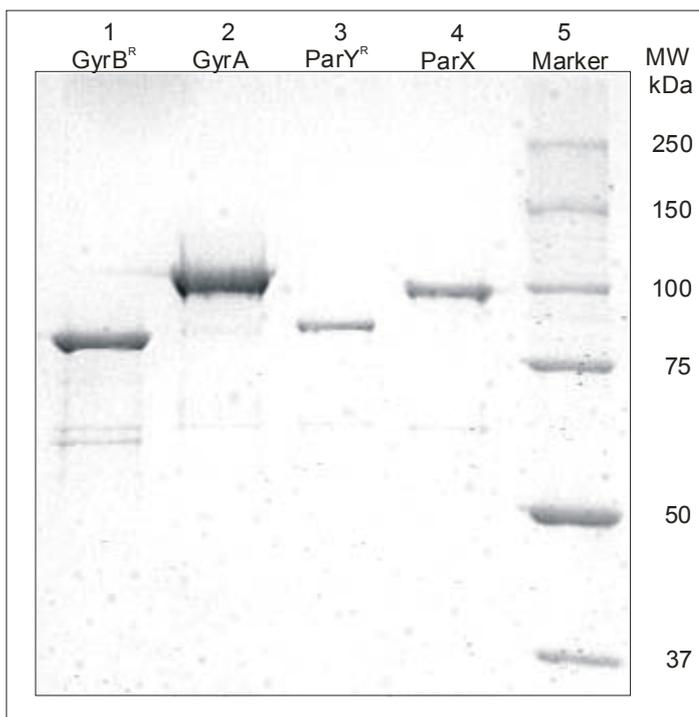


Abbildung III-8: Reinigung der Typ-II-Topoisomerase-Untereinheiten GyrB^R und ParY^R aus *S. rishiriensis* (Spuren 1 und 3) und GyrA und ParX aus *S. coelicolor* als (His)₆-Fusionsproteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie. 10%iges Polyacrylamidgel

2.4 Funktionelle Untersuchung von gereinigtem GyrB^R und ParY^R in vitro

Die bakterielle DNA Gyrase katalysiert die negative Überspiralisierung (Supercoiling) von DNA in Abhängigkeit von ATP. Die Topoisomerase IV katalysiert die Catenierung/Decatenierung von DNA-Molekülen und die Entspannung (Relaxation) überspiralisierter DNA; beide Reaktionen sind ebenfalls von der Bereitstellung von Energie durch ATP abhängig (Maxwell und Lawson, 2003).

Die Funktionen der gereinigten rekombinanten Enzyme wurden in drei Assays getestet. Im Supercoiling-Assay diente als Substrat das Plasmid pBR322, das durch Inkubation mit Topoisomerase I (s. II.5.3.4) in seine relaxierte Form überführt worden war. Plasmid-DNA liegt nach der Präparation aus Bakterienzellen mit den gängigen Methoden (s. II.5.7) in negativ überspiralisierter Form vor. Daher konnte mithilfe von Anionenaustauschersäulen (Nucleobond[®] AX) gereinigtes Plasmid pBR322 direkt im Relaxations-Assay eingesetzt werden. Als Substrat im Decatenierungs-Assay wurde catenierte DNA, die aus dem Kinetoplasten des Trypanosomen *Crithidia fasciculata* präpariert wurde, verwendet. Diese kDNA ist ein Aggregat aus kleinen (meist 2,5 kb), miteinander verketteten, ringförmigen DNA-Molekülen, so genannten Minicircles, die ein hochmolekulares Netzwerk bilden. Infolge des hohen Molekulargewichts kann dieses Netzwerk nicht ins Agarosegel eindringen, und die DNA bleibt bei der Elektrophorese in den Auftragetaschen hängen (Produktinformation von TopoGEN). Alle Assays wurden mit verschiedenen Kombinationen der vier Untereinheiten GyrB^R und ParY^R aus *S. rishiriensis* und GyrA und ParX aus *S. coelicolor*, durchgeführt. Die Untereinheiten wurden in etwa äquimolaren Mengen im Reaktionsansatz gemischt

und bei 30 °C 1 h inkubiert. Zur Detektion wurden die Assays auf ein Agarosegel (0,8%) aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Der Ladebuffer für die Elektrophorese diente durch den Zusatz von 200 mM EDTA gleichzeitig zum Abstoppen der Reaktion.

Die Kombination von GyrA und GyrB^R zeigte deutliche Supercoiling-Aktivität (Abbildung III-9A, Spur 2). ATP-abhängige Relaxation und Decatenierung konnte dagegen nicht beobachtet werden (Spuren 2 in Abbildung III-9B und C). Diese Ergebnisse bestätigen die Erwartung, dass (GyrA)₂(GyrB^R)₂ eine funktionsfähige Gyrase bilden. Die Gyrase sollte in der Lage sein, negativ überspiralisierte DNA in einer ATP-unabhängigen Reaktion zu entspannen. Dies ist allerdings eine untergeordnete Funktion der Gyrase, die wesentlich langsamer abläuft (Ullsperger und Cozzarelli, 1996). Im Relaxations-Assay ohne ATP war mit der gleichen Menge an Gyrase wie im Supercoiling-Assay und nach einer Inkubationszeit von 1 h noch keine Relaxation des Substrates erkennbar.

Die Kombination aus ParX und ParY^R katalysierte deutlich sowohl die Relaxation von pBR322 als auch die Decatenierung von kDNA (Abbildung III-9B und C, Spur 3), was beweist, dass es sich bei diesen Proteinen um Topoisomerase-IV-Untereinheiten handelt. Eine Verfolgung beider Reaktionen über die Zeit zeigte, dass die Decatenierungs-Reaktion effizienter abläuft als die Relaxation von DNA. Während bei der Decatenierung die Reaktion unter den gegebenen Bedingungen nach 30 min bereits abgeschlossen schien, konnte bei der Relaxations-Reaktion erst nach 30 min deutliche Aktivität detektiert werden, die nach 1-2 h in vollständiger Umsetzung des Substrates resultierte.

Die Untereinheiten der Gyrase und der Topo IV konnten nicht ausgetauscht werden, d.h. Kombinationen aus ParX mit GyrB^R und umgekehrt von GyrA mit ParY^R waren in keinem der drei Testsysteme enzymatisch aktiv (Abbildung III-9, je Spuren 3 und 4). Alle drei Reaktionen waren von der Anwesenheit von ATP und Mg²⁺ abhängig. Es bestand keine Abhängigkeit der Supercoiling-Reaktion von Spermidin, wie beispielsweise für die Gyrase von *Mycobacterium smegmatis* (Manjunatha et al., 2002) beschrieben oder von Kaliumglutamat, wie bei der Gyrase von *Staphylococcus aureus* (Blanche et al., 1996).

Die Inkubation von ParX und ParY^R mit relaxiertem Plasmid, wie in Abbildung III-9A (Spur 3) abgebildet, könnte eine leichte Supercoiling-Aktivität dieses Enzym-Komplexes vermuten lassen. Um festzustellen, ob es sich bei der detektierten Aktivität tatsächlich um Supercoiling oder um eine andere Konformationsänderung der DNA handelte, wurde das Experiment wiederholt und die Agarose-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Chloroquin im Gel und im Elektrophorese-Puffer (5 µg/ml) durchgeführt. Chloroquin interkaliert in die DNA-Helix unterschiedlich stark in Abhängigkeit von der Konformation und dem Grad der Überspiralisierung der DNA. Auf diese Weise kann auch positiv von negativ überspiralisierte DNA

unterschieden werden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung III-10 gezeigt, und es ist deutlich erkennbar, dass die Topoisomerase IV $(\text{ParX})_2(\text{ParY}^{\text{R}})_2$ keine Supercoiling-Aktivität besitzt.

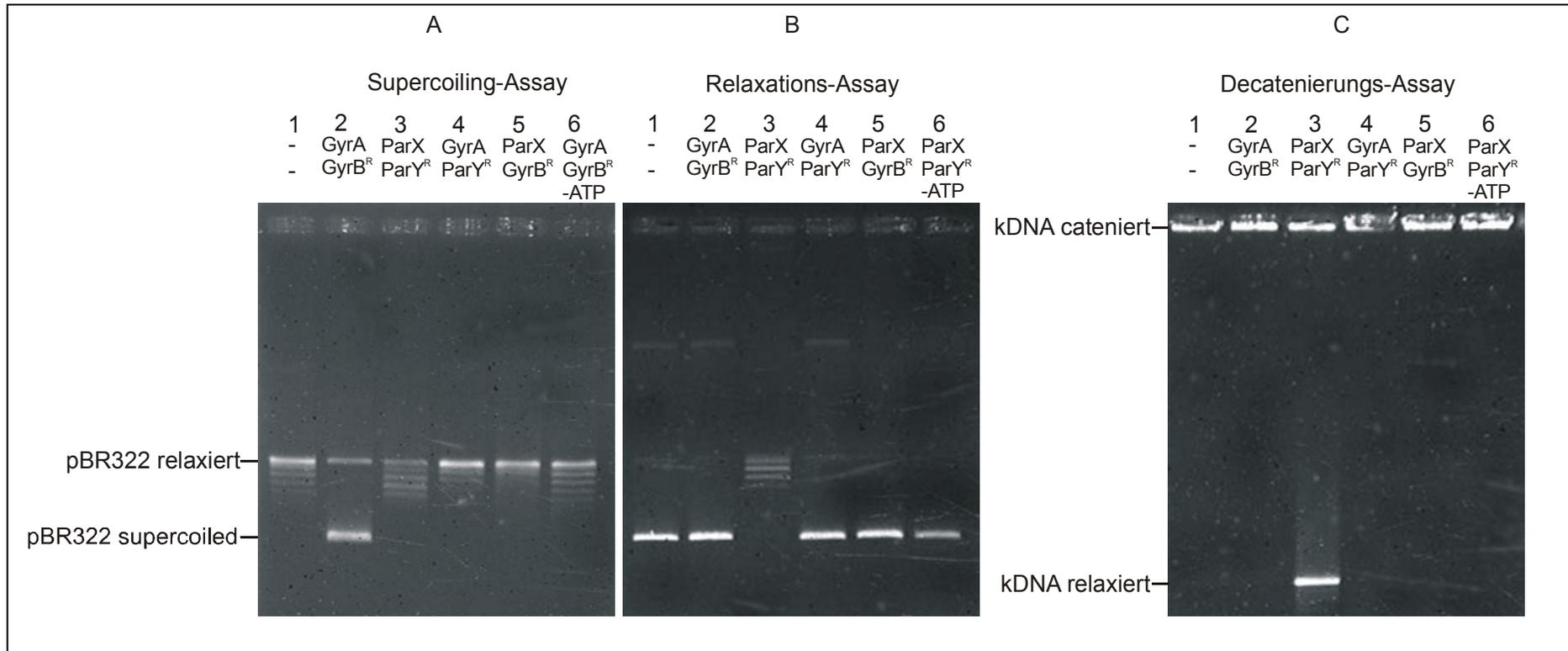


Abbildung III-9: DNA Gyrase- und Topoisomerase-IV-Assays. Die Assay-Bedingungen sind unter II.6.8.1 beschrieben. In allen Assays wurden gleiche Mengen der gereinigten Proteine eingesetzt. Die Assays wurden auf Agarosegele (0,8% in TAE-Puffer) aufgetragen und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

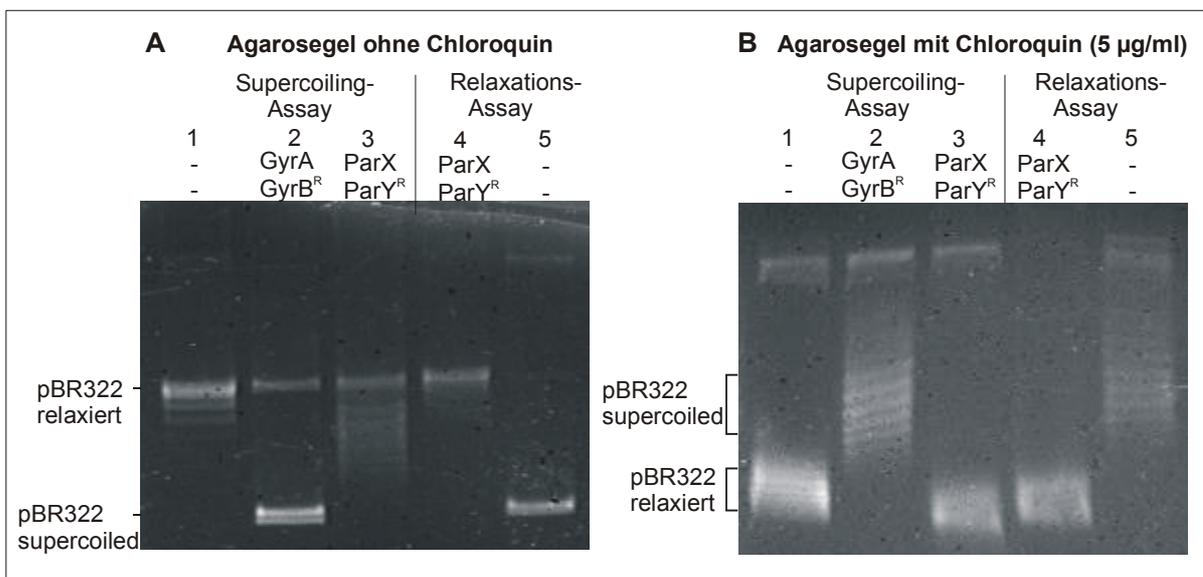


Abbildung III-10: Supercoiling- und Relaxations-Assay mit Gyrase und Topoisomerase IV. Jeder Assay wurde geteilt und gleiche Mengen auf ein 1%iges Agarosegel (A) und ein 1,6%iges Agarosegel mit 5 µg/ml Chloroquin (B) aufgetragen.

Aminocoumarin-Resistenz von GyrB^R und ParY^R

Die in-vivo-Resistenztests hatten gezeigt, dass *gyrB^R* und *parY^R* Resistenz gegen Novobiocin und Coumermycin A₁ verleihen, was bedeutet, diese Gene codieren für Aminocoumarin-resistente Topoisomerase-Untereinheiten. Dies sollte auch in vitro gezeigt werden. Die Gyrase von *Streptomyces lividans* ist sensitiv gegen Novobiocin mit einem IC₅₀-Wert von ca. 0,5 µg/ml (Thiara und Cundliffe, 1988). Ähnlich ist auch der IC₅₀-Wert für die Gyrase von *E. coli*, der von Peng und Marians (1993) mit ca. 0,6 µg/ml bestimmt wurde. Für die Gyrase aus GyrA und GyrB^R konnte ein IC₅₀-Wert von ca. 50 µg/ml bestimmt werden. Die bakterielle Topoisomerase IV ist ebenfalls sensitiv für Aminocoumarine (Hardy und Cozzarelli, 2003) mit einem IC₅₀-Wert von ca. 1,5 µg/ml für die Topoisomerase IV von *E. coli* (Peng und Marians, 1993). Die untersuchte Topoisomerase IV (ParX)₂(ParY^R)₂ zeigte einen IC₅₀-Wert von ca. 20 µg/ml im Decatenierungs-Assay.

3. Überexpression, Reinigung und Charakterisierung der Amidsynthetase CouL aus der Coumermycin-Biosynthese

3.1 Die Amidsynthetase-Reaktion in der Aminocoumarin-Biosynthese

Die Amidsynthetase NovL aus dem Novobiocin-Biosynthesegencluster wurde bereits gereinigt und charakterisiert (Steffensky et al., 2000a). Für NovL konnte gezeigt werden, dass es bei der Biosynthese der Novobiocinsäure zwei Schritte katalysiert. Erstens die Aktivierung der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) als Adenylat und zweitens den Transfer der Acylgruppe auf die Aminogruppe des Aminocoumarin-Ringes (Ring B) (Abbildung I-7, Seite 17).

Die Struktur des Coumermycin A₁ enthält zwei Amidbindungen zwischen der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und zwei Ring-B-Einheiten. Im Biosynthesegencluster von Coumermycin A₁ konnte jedoch nur ein Gen identifiziert werden, das sehr hohe Homologie zu *novL* besitzt. Die zentrale Frage, die sich dadurch stellte, war, ob das Gen *couL* für die Bildung beider Amidbindungen verantwortlich ist, oder ob weitere Enzyme daran beteiligt sind. CouL wurde in *E. coli* als Histidin-Fusionsprotein überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Das genuine Substrat der Amidsynthetase aus der Coumermycin-Biosynthese, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, konnte nicht kommerziell erworben werden. Daher wurde zunächst eine chemische Synthese dieser Substanz durchgeführt.

3.2 Synthese und Strukturaufklärung des genuinen Substrats 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Die Darstellung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure aus 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäurediethylester und die Reinigung der Syntheseprodukte sind in den Methoden unter II.7.3 und II.8 beschrieben. Abbildung III-11 zeigt ein Schema der drei Synthese-Schritte. Im ersten Schritt findet durch Behandlung der Ausgangssubstanz mit Br₂ und SO₂Cl₂ die Oxidation der Methylgruppe, die in Metastellung zum Ring-Stickstoff sitzt, statt. Die freie Säuregruppe konnte durch Erhitzen in Gegenwart von Kupfer in Form von Bronze-Pulver als Katalysator entfernt werden. Durch alkalische Hydrolyse der beiden Ester-Gruppierungen konnte anschließend die freie Säure erhalten werden. Das HPLC-Chromatogramm des Produktgemisches wies drei auffällige Peaks (Abbildung III-12) auf. Diese drei Substanzen wurden gereinigt und deren Struktur mithilfe verschiedener spektroskopischer Verfahren aufgeklärt.

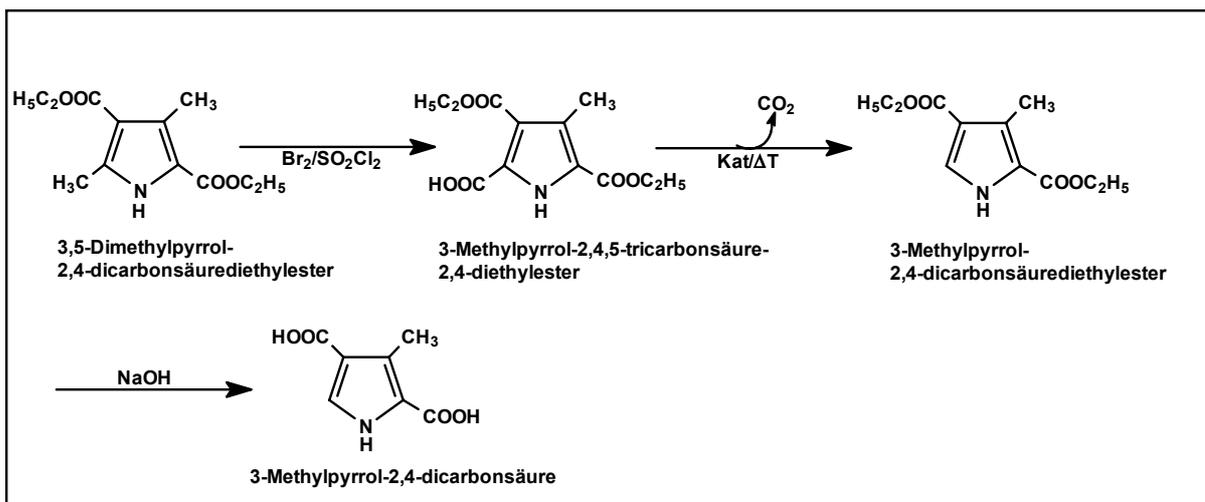


Abbildung III-11: Schema der Darstellung der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure aus 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäurediethylester

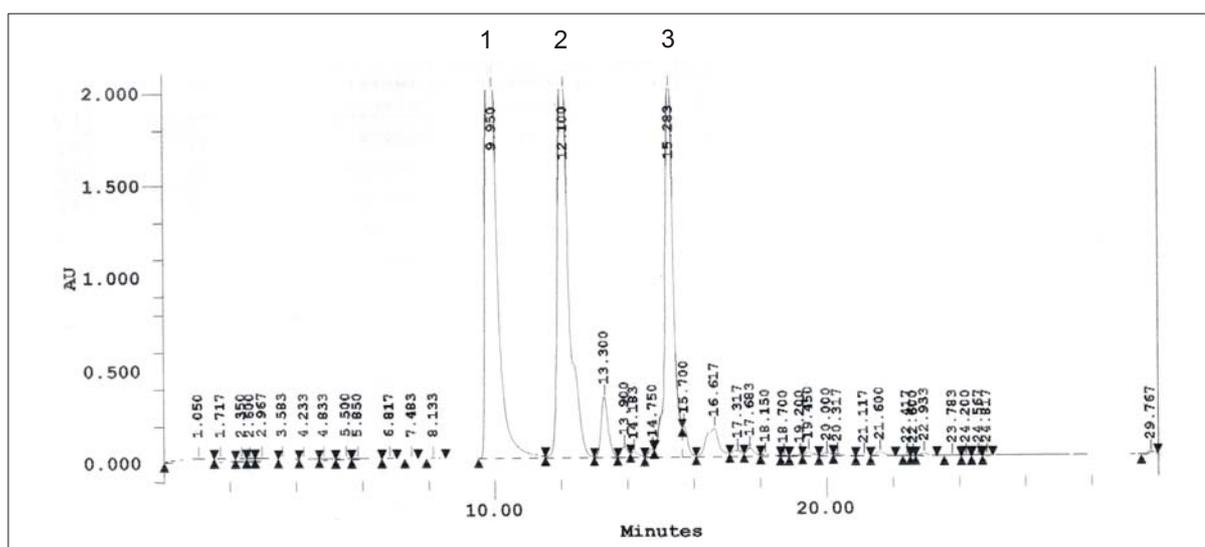


Abbildung III-12: HPLC-Chromatogramm des Produktgemisches der chemischen Synthese der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (Detektion 259 nm)

Strukturaufklärung von Substanz 1:

Die massenspektrometrische (EI-MS) Untersuchung der Substanz 1 ergab ein Molekulargewicht von 213, das dem einer Methylpyrroltricarbonsäure entspricht. Die Entstehung der 4-Methylpyrrol-2,3,5-tricarbonsäure während der Synthese könnte durch unvollständige Decarboxylierung erklärt werden, daher wurde diese Substanz als wahrscheinlich angenommen.

Die ^1H -NMR-Untersuchung (DMSO- d_6) ergab zwei Signale mit δ_{ppm} 2,43 (s, CH_3); 11,3 (s, NH), die von den Protonen der Methylgruppe und am Stickstoff herrühren. Die Ergebnisse der ^{13}C -NMR Analyse sind tabellarisch mit der möglichen Zuordnung der Signale zu den C-Atomen der vorgeschlagenen Struktur der 4-Methylpyrrol-2,3,5-tricarbonsäure (Abbildung III-13) aufgeführt.

Tabelle III-3: ^{13}C -NMR-Daten von Substanz 1 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

δ [ppm]	Zuordnung
11,41	C-8
118,28	C-2 und
122,42	C-4
127,76	C-5
128,73	C-3
161,14	Carboxyl-C
161,53	C-6, C-7
167,34	und C-9

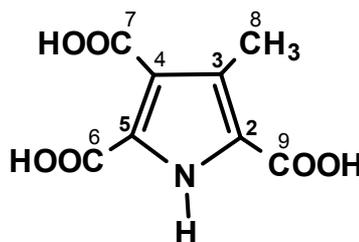


Abbildung III-13: Struktur der 3-Methylpyrrol-2,4,5-tricarbonsäure

Die Ergebnisse von Pulsed-Field-NOE- und HMBC-Experimenten ließen darauf schließen, dass die Methylgruppe nicht der NH-Funktion benachbart ist, was für die postulierte Struktur der 3-Methylpyrrol-2,4,5-tricarbonsäure (Abbildung III-13) sprach.

Strukturaufklärung der Substanzen 2 und 3:

EI-MS-Untersuchungen der Substanzen 2 und 3 ergaben für beide die gleiche Masse von 169 und nahezu identische Fragmentierungsmuster. Die Masse von 169 entspricht der einer Methylpyrroldicarbonsäure. Zur Aufklärung der Struktur wurden diverse NMR-Untersuchungen durchgeführt.

Substanz 2:

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz):

δ_{ppm} 2,46 (s, CH_3 -7); 7,33 (d, $J=3,5$, H-5); 11,90 (s, NH)

Tabelle III-4: ^{13}C -NMR-Daten von Substanz 2 (DMSO- d_6 , 125 MHz)

δ [ppm]	Zuordnung
10,94	C-7
115,78	C-4 (oder C-2)
120,81	C-2 (oder C-4)
127,08	C-5
128,11	C-3
162,14	C-8 (oder C-6)
165,42	C-6 (oder C-8)

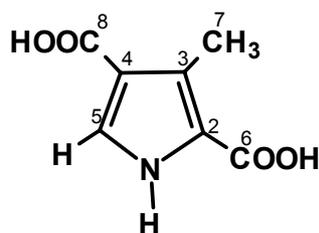


Abbildung III-14: Struktur der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Tabelle III-5: Weitere NMR-Untersuchungen zu Substanz 2

Experiment	Ergebnis	Folgerung
H-H COSY	COSY zwischen CH und NH	CH neben NH
NOESY	NOE zwischen CH und NH	CH neben NH
HMBC	Drei (starke) HMBC-Korrelationen von Methyl-H ausgehend Alle drei (starken) HMBC-Korrelationen von Methyl-H zu C _q	Methylgruppe nicht neben NH CH nicht neben Methylgruppe
HSQC	Korrelation zwischen CH und C-5	bestätigt Zuordnung von C-5
DPFG-NOE	NOE zwischen CH und NH	CH neben NH

Die NMR-Ergebnisse führen zu der oben stehenden Struktur der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (Abbildung III-14). Es handelt sich also bei Substanz 2 um das gewünschte genuine Substrat der Amidsynthetase der Coumermycin-Biosynthese.

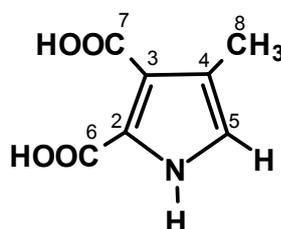
Substanz 3:

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz):

δ_{ppm} 2,23 (s, CH₃-7); 6,59 (d, J=2,5, H-5); 11,52 (s, NH)

Tabelle III-6: ¹³C-NMR-Daten (DMSO-d₆, 125 MHz) von Substanz 3

δ [ppm]	Zuordnung
12,37	C-8
116,64	C-5
123,35	C-4
125,19	C-2
126,35	C-3
161,10	C-6
161,81	C-7

**Abbildung III-15: Struktur der 4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure****Tabelle III-7: Weitere NMR-Untersuchungen zu Substanz 3**

Experiment	Ergebnis	Folgerung
H-H COSY	COSY zwischen CH und NH	CH neben NH
NOESY	NOE zwischen CH und NH	CH neben NH
HMBC	Drei (starke) HMBC-Korrelationen von Methyl-H ausgehend Zwei HMBC-Korrelationen von Methyl-H ausgehend zu C _q (C-3 und C-4), eine zu CH Korrelation von H an C-5 zu einem Carboxyl-C (C-6)	Methylgruppe nicht neben NH CH neben Methylgruppe Zuordnung von C-6 möglich
HSQC	Korrelation zwischen Aryl-H und C-5	bestätigt Zuordnung von C-5
DPFG-NOE	NOE zwischen Methyl-H und Aryl-H	Methylgruppe neben CH

Die Doublett-Aufspaltung des Signals des aromatischen Protons im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und die Ergebnisse der COSY- und NOESY-Experimente zeigen, dass die CH-Gruppierung neben dem Ring-Stickstoff sitzt. Außerdem konnte mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Methylgruppe neben der CH-Gruppierung, nicht aber neben der Stickstoff-Funktion sitzt. Damit wurde die vorgeschlagene Struktur der 4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure (Abbildung III-15) als nahezu gesichert angesehen.

3.3 Sequenzanalyse des Gens *couL* aus dem Coumermycin- A_1 -Biosynthesegencluster

Das Gen *couL*, das für die putative Amidsynthetase codiert, ist 1590 bp groß und liegt im Cluster zwischen den Genen für die Biosynthese des Aminocoumarin-Ringes (*couHIJK*) (Wang et al., 2000; Chen und Walsh, 2001) und dem Glycolyltransferase-Gen *couM* (Meyers et al., 2003). Die homologen Gene des Novobiocin- und des Clorobiocin-Biosynthesegenclusters, *novL* und *cloL*, nehmen jeweils die gleiche relative Position im jeweiligen Cluster ein. Die drei Proteine besitzen durchschnittlich 84% Identität. In der Aminosäuresequenz von CouL konnten ebenfalls die schon für NovL gefundenen charakteristischen Motive für Adenylat-bildende Enzyme (Box I, Box II, A8 und A10) (Abbildung III-16) zugeordnet werden. CouL enthält wie NovL nur eine Adenylierungsdomäne.

Das Sequenz-Alignment der drei Amidsynthetasen CouL, NovL und CloL zeigt einen Bereich zwischen Box I und Box II, der eine relativ hohe Variabilität im Vergleich zur restlichen Sequenz aufweist. Die Region zwischen den Aminosäuren 192 und 216 fällt hier besonders auf. Auch die beiden Aminosäuren, die CouL mehr besitzt als NovL und CloL, befinden sich in diesem Bereich. Möglicherweise spielt dieser Bereich eine Rolle in der Substratspezifität der Amidsynthetasen. NovL und CloL haben dieselbe Acyl-Komponente als genuines Substrat, sie sind aber in ihrer Substratspezifität bezüglich verschiedener Ring-A-Analoga nicht identisch (Galm et al., 2003). Weiterhin zeigt CouL Sequenzhomologien zu putativen Fettsäure-CoA-Ligasen von *S. coelicolor* (34% Identität), von *S. avermitilis* (30% Identität) und anderen Organismen.

	10	20	30	40	50
CouL	MANRDHGPEH	YVTRILDEAA	RDGARPVVRW	RDTVITGTTEL	HRSVRRVATA
NovL	MANKDHAPEH	YVTRILAEAT	LDGARPVVRW	RDTVITGTOL	DRSVRRVVTA
CloL	MANKDHGPEH	YVTRILAEAT	RDGAOPVVRW	RDTVITGTTEL	HRSVORVATA
	60	70	80	90	100
CouL	LREAGVARDH	AVAILTQVNS	PWMLVVRVYAA	HLLGASVVYI	TGANHGTVTH
NovL	LREAGVARDH	AVAVLTQVNS	PWMLIVRYAA	HLVGASVVYI	TGANHGIIVTH
CloL	LREAGVARDH	AVAILTQVNS	PWMLIVRYAA	HLLGASVVYI	TGANHGTVTH
	110	120	130	140	150
CouL	DLPVTTRVRM	MREAGASVLV	FDERNAQLAE	TIRETVDPDKL	VLCGLGHPAS
NovL	ELPVATRVRM	LREAGASVLV	FDESNAQLAE	TVDETVRDKL	VLCGLGHPAS
CloL	DLPVTTRVRM	LREAGASVLV	FDERNAQLAE	TVNETVDPDKL	VLCGLGHPAS
	160	170	180	Box I 190	200
CouL	GTVTADGRPV	EDVAVEEPAE	TPELAMVLYT	SGTTGQPKGVI	CKPFGAWNAT
NovL	GTVSVDGRPV	DDVSVDETPE	APELAMVLYT	SGTTGQPKGVI	CRSEFGSWNAA
CloL	GTVTVDGRPV	EDVSVEEAPQ	APELAMVLYT	SGTTGQPKGVI	CRLERSWNAS
	210	220	230	240	250
CouL	VVGLAGQPRP	RQTYLAMTAV	SHTVGMVVDI	ALAAGGSVLL	REKFDPTDFL
NovL	A--LRGAAYP	RPVFLIMTAV	SQTVAMIVDT	VLAAGGSVLL	RERFDPADFL
CloL	V--LGGAMHP	RPAYLAMTAV	SHTAGLIVDM	ALAAGGSVLL	REKFDPGDFL
	260	270	280	290	300
CouL	RDVVTTHRVTD	TFMGVPOLYA	ILNHPDVRTT	DLSSLQHLVY	VGCPASPERL
NovL	RDVGEHRVTE	TFMGVAQLYA	ILGHPDARTA	DLSSLRHVLY	LGCPASPERL
CloL	RDVAQHRITE	TFMGVAQLYA	ILNHPDVRTA	DLSSLRHLLY	LGCPASPERL
	310	320	330	340	350
CouL	REAVTVFPGV	LWQSYGSTET	GRIAMLREDD	HDHPELLATV	GRPMPGVTIA
NovL	REAAALPGV	LAQSYGSTEA	GRITVLRAD	HERPELLATV	GRAVPGVTIA
CloL	QEAAATVLPGV	LAQSYGSTEA	GRITVLRAD	HERPELLATV	GOAMPVTIA
	360	Box II	380	390	400
CouL	IRDPOTGRDL	PVNEIGEIVV	HSPNNMAGYI	GDPRATTTRVV	RDGWVHTGDM
NovL	IRDPETGHDL	PVGEIGEIVV	HCPPEVMAGYV	ADPEHTARVI	RDGWVHTGDF
CloL	IRDPETGRDL	PVNOIGEIVV	HSPEAMGGYV	ADPEHTARVV	RDGWVHTGDF
	410	420	A8 430	440	450
CouL	GSDVERGYVR	LFGRMHMVK	VQDTRVSPTE	VEKVLVGCPG	VVDACVYGHR
NovL	GSDVERGYVR	LFGRMREVVK	VQDTRVSPTE	VEKVLVGCPG	VVDACVYGHR
CloL	GSDVERGYVR	LFGRMHMVK	VQDTRVSPTE	VEKVLVGCPG	VVDACVYGHR
	460	470	480	490	500
CouL	RPDLIEELHA	AVVLSTEDAP	SFAALRDHVA	QTMTPTHAPV	RFVWRQFPI
NouL	GPDIEELHA	AVVLCTEGAP	SFDTLRDHVA	RAMTPTHAPI	RFVWRRFPI
CloL	RSDIEELHA	AVVLSTDGAP	SFAALRDHVA	QAMTPTHAPI	RFVWRQFPI
	A10 510	520	530		
CouL	NNTGKTDRLR	IREVSAEARG	EGPDVLVDR.		
NovL	NNTGKVNRLR	VREVSAEARG	DSPDVLVDR.		
CloL	NNTGKVDRLR	IREVSAEARG	ESPDVLVDR.		

Abbildung III-16: Sequenz-Alignment der Amidsynthetasen aus den Biosynthesegenclustern von Coumermycin A₁ (CouL), Novobiocin (NovL) und Clorobiocin (CloL). Die in Adenylat-bildenden Enzymen konservierten Motive sind grau unterlegt. Der im Text beschriebene variable Bereich ist durch einen gestrichelten Kasten gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit WINDNASIS, Version 2.1 erstellt.

3.4 Heterologe Expression von CouL in *E. coli* als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein

Die Überexpression der Novobiocinsäure-Synthetase NovL als C-terminales Histidin-Fusionsprotein mit pQE70 als Expressionsvektor hatte sich in den Arbeiten von M. Steffensky als sehr erfolgreich erwiesen (Steffensky et al., 2000a). Dieses Expressionssystem erlaubte eine effektive Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie, und der (His)₆-tag hatte keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde das gleiche Verfahren auch für die Expression und die Reinigung von CouL gewählt.

Zur Klonierung von *couL* in den Expressionsvektor pQE70 wurde das Gen per PCR amplifiziert. Durch Einführung einer *SphI*-Schnittstelle in den Primer couL-1 (5'-TAGTCACTGCATGCCGAACAGGGAC-3', Schnittstelle unterstrichen, veränderte Basen fett markiert) wurde das Start-Codon von GTG zu ATG verändert. Am C-Terminus wurde durch Verwendung von Primer couL-2 (5'-TGACTCAGATCTCCTGTCCACCAG-3', Schnittstelle unterstrichen, veränderte Basen fett markiert) eine *BglII*-Schnittstelle eingeführt und das Stop-Codon dadurch entfernt, was die in-frame-Ligation mit dem (His)₆-tag von pQE70 erlaubte. Das in Abbildung III-17 schematisch dargestellte Expressionskonstrukt pMS90 wurde von M. Steffensky hergestellt.

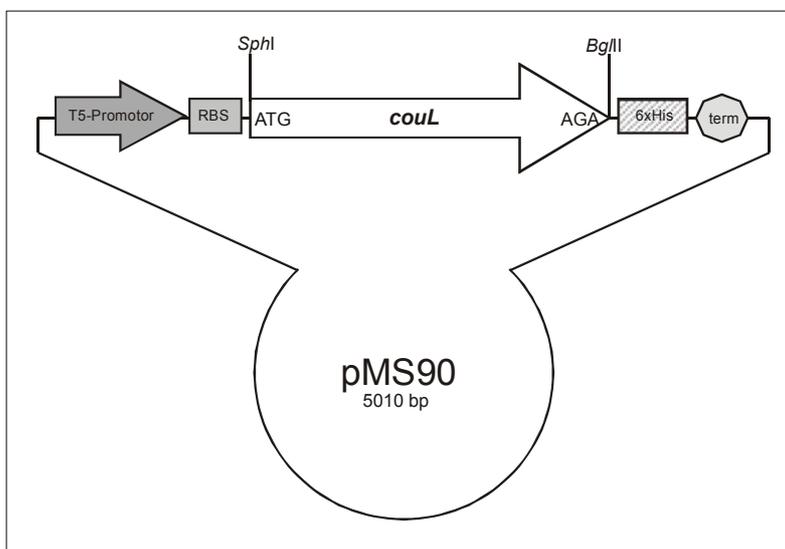


Abbildung III-17:
Expressionskonstrukt pMS90 zur Expression von CouL als C-terminales (His)₆-Fusionsprotein.

Für die Reinigung von CouL mittels Nickel-Affinitätschromatographie wurde das Expressionskonstrukt pMS90 in *E. coli* XL1 Blue MRF' transformiert und die Expression wie unter II.6.3.1 beschrieben durchgeführt. Im Rohextrakt konnte die zeit- und induktionsabhängige Bildung eines Proteins mit einer Größe von ca. 60 kDa (theoretisch 58,9 kDa) durch SDS-PAGE beobachtet werden. Durch Nickel-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (s. II.6.6) konnte CouL in einer Ein-

Schritt-Reinigung nahezu homogen gereinigt werden (Abbildung III-18). Pro Liter Bakterienkultur konnten ca. 21 mg gereinigtes Protein erhalten werden. Das entsprach ca. 10-11% des löslichen Gesamtproteins im zellfreien Rohextrakt. Die Lagerung des Proteins erfolgte in Aufbewahrungspuffer mit 10% Glycerin bei -70 °C.

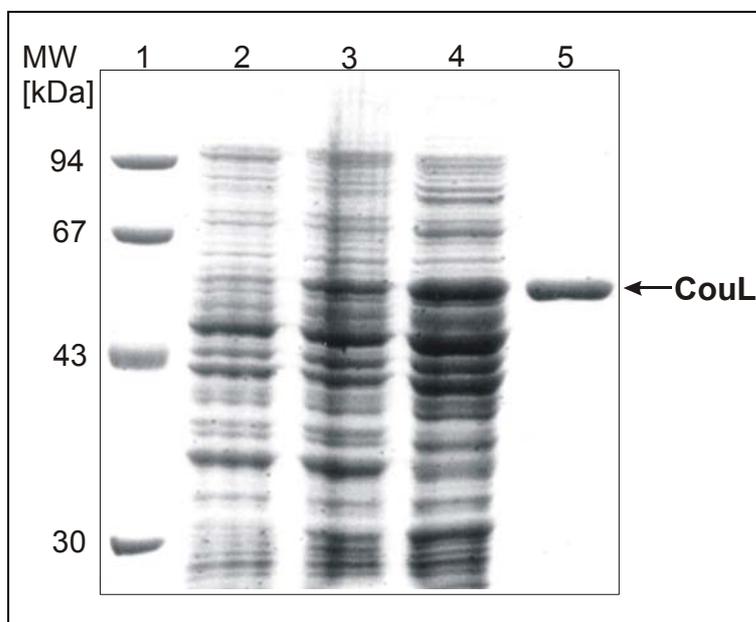


Abbildung III-18: SDS-PAGE des Verlaufs der Reinigung des CouL-(His)₆-Fusionsproteins nach Überexpression in *E. coli* XL1 Blue MRF'. Spur 1: Proteingrößenstandard; Spur 2: Gesamtzellprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtzellprotein 3 h nach IPTG-Induktion; Spur 4: zellfreier Proteinextrakt mit löslichem Proteinanteil; Spur 5: gereinigtes Enzym nach Nickel-Affinitätschromatographie

3.5 Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Amidsynthetase CouL aus *S. rishiriensis*

Der Amidsynthetase-Assay wurde unter den für NovL optimierten Bedingungen (Steffensky et al., 2000a) durchgeführt.

3.5.1 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Das gereinigte Enzym wurde mit 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring B (jeweils 1 mM) in Gegenwart von ATP und Mn²⁺ (jeweils 5 mM) unter den beschriebenen Bedingungen (II.6.8.2) inkubiert. Nach Aufarbeitung der Reaktionsprodukte konnten durch HPLC-Analyse zwei enzymatische Produkte detektiert werden (Abbildung III-19A). Massenspektrometrische Untersuchungen mittels Selected Reaction Monitoring (SRM) ergaben, dass es sich bei dem ersten Produkt mit einer Retentionszeit (R_T) von 15,1 min um das Monoamid der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring B handelte [(m/z 359 ([M+H]⁺) → m/z 152 und m/z 357 ([M-H]⁻) → m/z 206]. Das zweite Produkt (R_T=19,6 min) konnte als das Diamid der Pyrroldicarbonsäure und zwei Ring-B-Einheiten identifiziert werden [m/z 548 ([M+H]⁺) → m/z 341 und m/z 546 ([M-H]⁻) → m/z 206]. Das HPLC-Chromatogramm und die detektierten SRM-Reaktionen (s. auch II.8.5) sind in Abbildung III-19B abgebildet. Aus dem ¹H-NMR-Spektrum des Monoamids

(Abbildung III-20) wurde außerdem deutlich, dass nur eines der beiden möglichen Monoamide entstanden war. Aus den spektroskopischen Daten konnte aber nicht abgelesen werden, ob die Amidbindung zuerst an der Carboxyl-Gruppe an Position 2 oder an Position 4 geknüpft wurde. Die abgebildete Struktur war daher noch spekulativ.

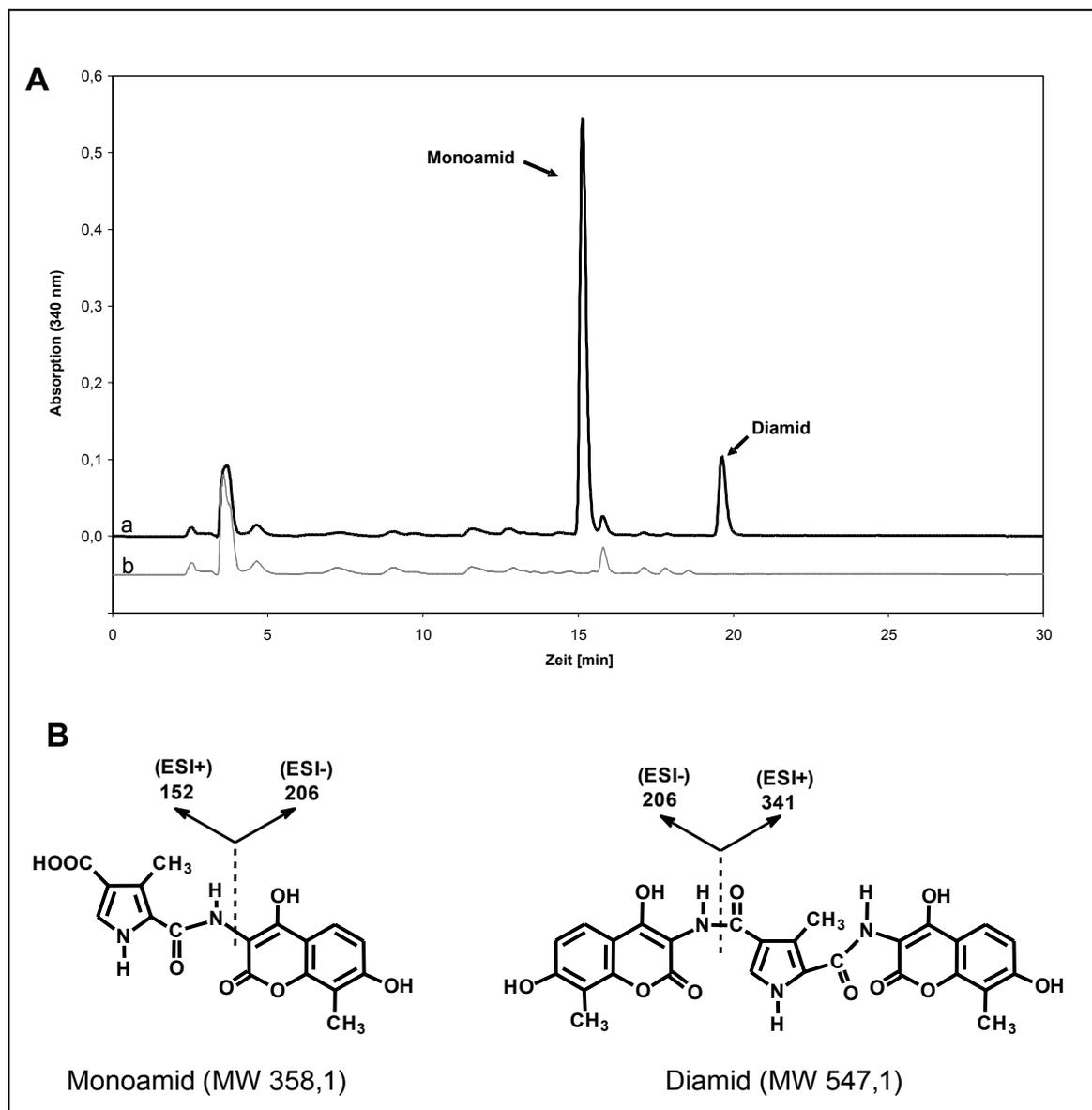


Abbildung III-19: HPLC-Chromatogramm und Fragmentierung der Amide der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure A: HPLC-Chromatogramm der Produkte der Amidsynthetase-Reaktion mit 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure als Acyl-Komponente, Kurve a zeigt das Resultat der Reaktion mit gereinigtem Enzym CouL; Kurve b zeigt als Negativkontrolle eine Inkubation mit Hitze-denaturiertem Enzym. Detektion erfolgte bei 340 nm.

B: Fragmentierungs-Schemata des Monoamids und des Diamids im SRM.

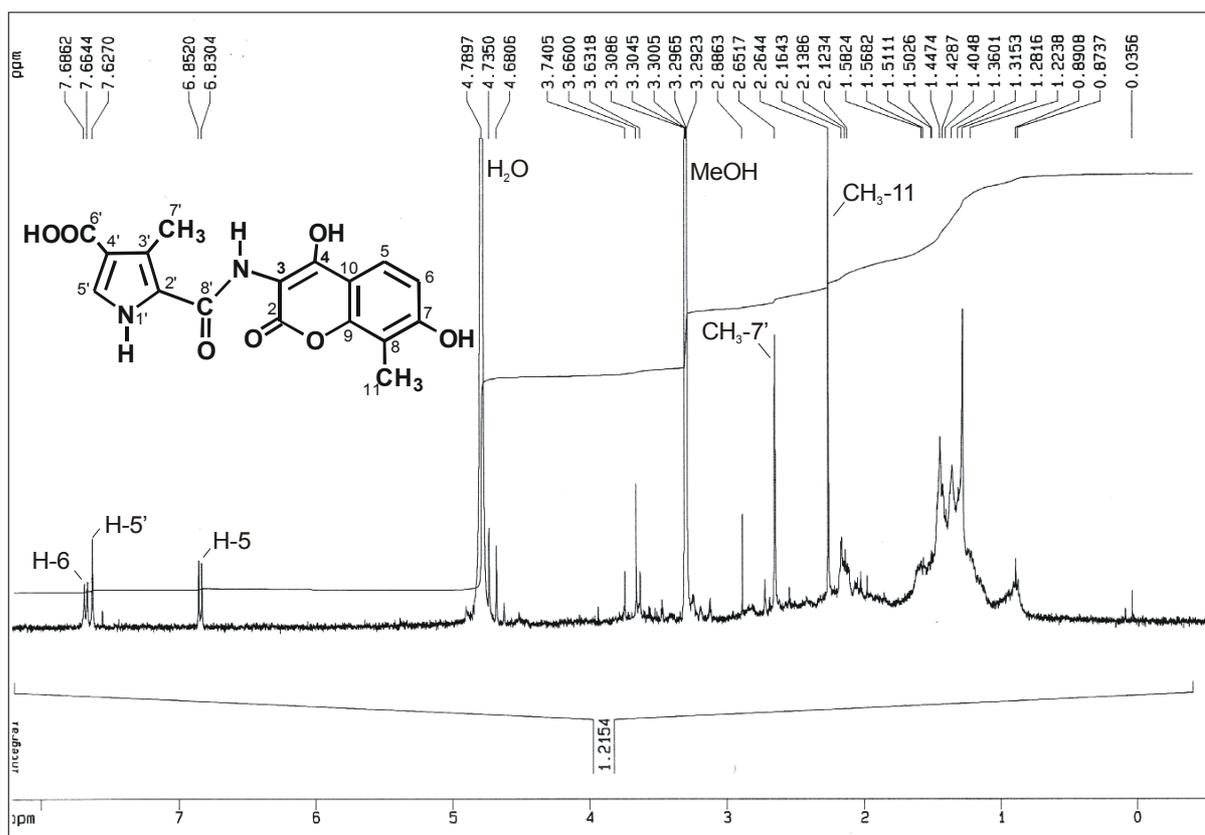


Abbildung III-20: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) des Monoamids in CD_3OD nach Reinigung per HPLC aus dem Amidsynthetase-Assay. Die gezeigte Strukturformel ist nicht gesichert. (Die Probe enthielt noch einige Verunreinigungen, vermutlich Kunststoffpolymere aus dem Reaktionsgefäß.)

Wurde das Enzym mit einem 10fachen Überschuss von Ring B (1 mM) gegenüber der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (0,1 mM) inkubiert und die Inkubationszeit auf 1 h verlängert, konnte die vollständige Umsetzung des Monoamids in das Diamid durch Verschwinden des Monoamid-Peaks im HPLC-Chromatogramm beobachtet werden. Darüberhinaus konnte das Monoamid per HPLC isoliert und im Assay als Substrat zusammen mit Ring B eingesetzt werden. Die Bildung des Diamids konnte anschließend per HPLC deutlich gezeigt werden. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion betrug ca. 43% der Geschwindigkeit der Monoamid-Bildung. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass CouL alleine für die Bildung beider Amidbindungen zwischen der zentralen Pyrroldicarbonsäure und zwei Ring-B-Einheiten, wie in Abbildung III-21 schematisch dargestellt, verantwortlich ist.

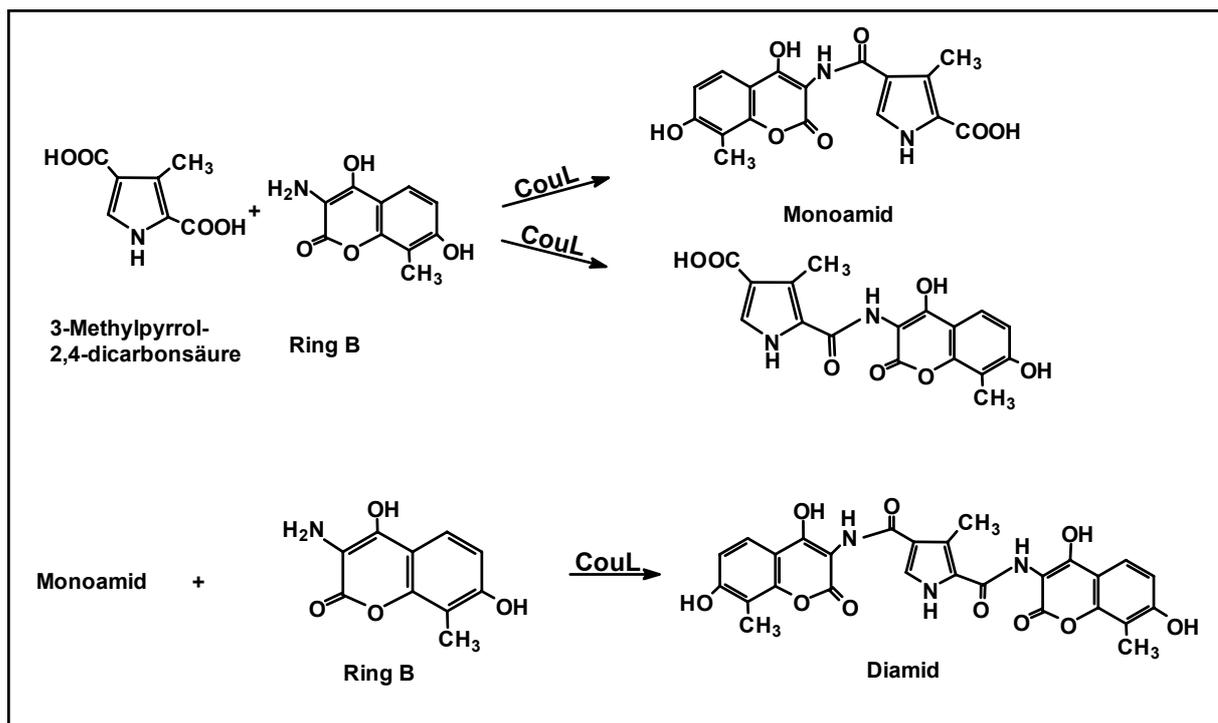


Abbildung III-21: Schematische Darstellung der Bildung des Monoamids und des Diamids durch CouL

3.5.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von CouL-(His)₆ wurde Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200-Säule (s. II.6.7) durchgeführt. Das aktive Enzym eluierte mit einem Volumen von 204 ml, was einem Molekulargewicht von 59-60 kDa entsprach. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der rekombinanten Amidsynthetase CouL mit C-terminalem (His)₆-tag beträgt 58,9 kDa. Somit liegt das Enzym in seiner aktiven Form als Monomer vor.

3.5.3 Abhängigkeit der Amidsynthetase-Aktivität von Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Amidsynthetase zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis ca. 50 µg Protein pro Assay. Eine lineare Abhängigkeit der Reaktion über die Zeit konnte bis ca. 10 min beobachtet werden (mit 4 µg Protein pro Assay).

Für die Enzymaktivität war die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Mg²⁺ oder Mn²⁺ essentiell. Durch Zugabe von EDTA (0,5 mM) wurde die Reaktion gehemmt. Ebenso bestand eine strenge Abhängigkeit der Aktivität von ATP. Die Spezifität für das Nucleotid-Triphosphat wurde mit ATP, GTP, CTP und TTP (jeweils 5 mM)

getestet. Produktbildung wurde nur mit ATP (100%) und zu einem sehr geringen Anteil auch mit GTP (ca. 5%) beobachtet. Der Zusatz von Coenzym A (0,5 mM) zur Inkubation erhöhte die Amidsynthetase-Aktivität nicht. Das ist in Übereinstimmung mit dem Aktivierungsmechanismus, der für NovL gezeigt werden konnte (Steffensky et al., 2000a). Die Aktivierung der Acyl-Komponente als Adenylat und der nachfolgende Acyltransfer auf die Aminogruppe erfolgen ohne die Beteiligung eines Coenzym-A-Esters.

3.5.4 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Amidsynthetase-Aktivität von CouL folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die K_m - und V_{max} -Werte wurden für die beiden natürlichen Substrate 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und Ring B mithilfe der graphischen Auswertung nach Lineweaver-Burk bestimmt. Die Konzentration von ATP und $MnCl_2$ betrug jeweils 5 mM, das jeweils konstant gehaltene Substrat wurde mit einer Konzentration von 1 mM im Amidsynthetase-Assay eingesetzt. Für die Bestimmung des K_m -Wertes der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure wurden 10 $\mu\text{g/ml}$ Protein eingesetzt, und die Inkubationszeit betrug 6 min. Zur Bestimmung des Wertes für Ring B musste die Proteinkonzentration auf 1 mg/ml reduziert werden, die Inkubationsdauer betrug 5 min. Für die Bestimmung beider Werte galt, dass unter den gegebenen Assay-Bedingungen kein Diamid in detektierbaren Mengen gebildet wurde, die angegebenen Werte gelten daher nur für die Bildung des Monoamids. Durch graphische Auswertung der Lineweaver-Burk-Diagramme konnte für die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure eine Michaelis-Menten-Konstante von etwa 26 μM und für Ring B von etwa 44 μM ermittelt werden (Abbildung III-22).

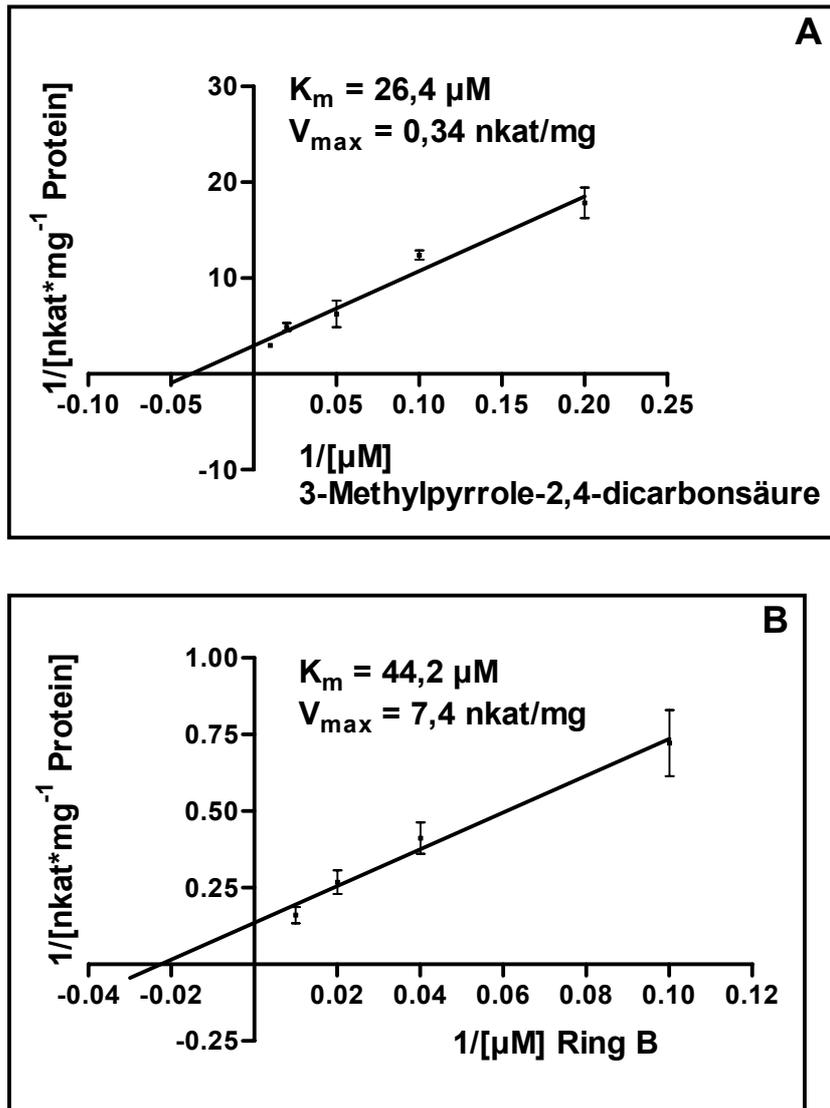


Abbildung III-22: Lineweaver-Burk-Diagramme zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (A) und Ring B (B).

3.5.5 Einfluss der Ring-B-Konzentration auf die Amidsynthetase-Aktivität von CouL

Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentration von Ring B einen Einfluss auf die Aktivität von CouL besitzt. Es tritt eine starke Hemmung der Enzymaktivität bei Ring-B-Konzentrationen $>100 \mu\text{M}$ auf. Bei einer Enzymkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ betrug die spezifische Aktivität bei einer Konzentration von 1 mM Ring B nur noch ca. 6% (Abbildung III-23) der maximalen Aktivität. Dies erklärt auch den geringen Wert für V_{max} , der nach der Lineweaver-Burk-Methode mit unterschiedlichen Konzentrationen von 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und einer konstanten Konzentration von 1 mM Ring B ermittelt wurde (Abbildung III-22A). Im Vergleich

dazu setzte bei NovL eine weniger ausgeprägte Hemmung der Enzymaktivität erst bei einer Ring-B-Konzentration >500 μM ein.

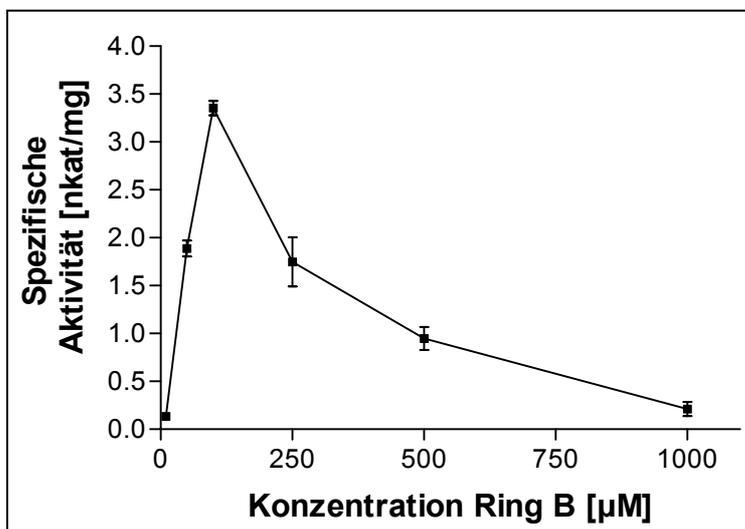


Abbildung III-23: Einfluss der Ring B-Konzentration auf die Amidsynthetase-Aktivität von CouL. Die Konzentration der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure betrug 1 mM, die Enzymkonzentration betrug 5 $\mu\text{g/ml}$ (Inkubationszeit 5 min).

3.5.6 Substratspezifität

Die Substratspezifität von CouL wurde mit verschiedenen Pyrrolcarbonsäuren, Pyridincarbonsäuren und Ring A untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III-8 zusammengefasst.

Eine zusätzliche Methyl-Funktion an Position 5 der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure beeinflusste die Reaktionsgeschwindigkeit der Monoamid-Bildung nicht negativ. Die Bildung des Diamids wurde jedoch deutlich reduziert; sie betrug noch ca. 17% der Geschwindigkeit gegenüber dem genuinen Substrat. Die Identität der Produkte konnte durch Selected Reaction Monitoring (Monoamid: m/z 373 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) \rightarrow m/z 166 und m/z 371 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) \rightarrow m/z 206; Diamid: m/z 562 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) \rightarrow m/z 355 und m/z 560 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) \rightarrow m/z 206; s. auch II.8.5) bestätigt werden. Die beiden Monoester der 3,5-Dimethylpyrroldicarbonsäure wurden ebenfalls als Substrate eingesetzt. Mit dem 2-Ethylester konnte keine Produktbildung im HPLC-Chromatogramm detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde mit dem 4-Ethylester die enzymabhängige Bildung eines Produktes, mit allerdings geringen Umsatzraten (7,7%), beobachtet. Die 4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure, deren Carboxylfunktionen am Pyrrolring benachbart sind, wurde ebenfalls gut als Substrat für die Bildung eines Monoamids akzeptiert. Zu einem sehr geringen Anteil konnte auch die Bildung des Diamids beobachtet werden, wie SRM-Untersuchungen (Monoamid: m/z 359 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) \rightarrow m/z

152 und m/z 357 ($[M-H]^-$) \rightarrow m/z 206; Diamid: m/z 548 ($[M+H]^+$) \rightarrow m/z 341 und m/z 546 ($[M-H]^-$) \rightarrow m/z 206; s. auch II.8.5) bestätigten.

Die zusätzliche Säurefunktion der 4-Methylpyrrol-2,3,5-tricarbonsäure führte zum Verlust der Amidsynthetase-Aktivität; ebenso wenig wurden die beiden Pyrrolmonocarbonsäuren als Substrate akzeptiert. Keine der getesteten Pyridincarbonsäuren (Tabelle III-8) führte zu einer Produktbildung im Amidsynthetase-Assay.

Inkubation von CouL mit 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A), der Acyl-Komponente des Novobiocins, führte zur Bildung von Novobiocinsäure. Obwohl sich die Struktur von Ring A deutlich von der des natürlichen Substrates von CouL unterscheidet, konnte eine Umsatzrate von etwa 36% gegenüber dem genuinen Substrat beobachtet werden. Die Identifizierung des enzymatischen Produktes als Novobiocinsäure erfolgte per HPLC im Vergleich mit der Referenzsubstanz.

Da CouL Ring A, das natürliche Substrat von NovL, akzeptierte, wurde die Amidsynthetase des Novobiocin-Produzenten mit den drei von CouL akzeptierten Pyrroldicarbonsäuren im Amidsynthetase-Assay inkubiert. Mit keiner der drei Substanzen konnte Produktbildung beobachtet werden.

Tabelle III-8: Substratspezifität der rekombinanten Amidsynthetase CouL. Das getestete Substrat wurde mit einer Konzentration von jeweils 1 mM eingesetzt.

*Die Angaben beziehen sich auf die Bildung des Monamids

Substrat	Relative Aktivität [%]
Pyrrolcarbonsäuren:	
3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	100*
4-Methylpyrrol-2,3-dicarbonsäure	94*
3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure	110*
3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure-2-ethylester	< 0,05
3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure-4-ethylester	7,7
3-Methylpyrrol-2,3,4-tricarbonsäure	< 0,05
Pyrrol-2-carbonsäure	< 0,05
Pyrrol-3-carbonsäure	< 0,05
Acetyl-3,5-dimethylpyrrol-2-carbonsäure	< 0,05
3-Carboxy-1,4-dimethylpyrrol-2-carbonsäure	< 0,05
Ring A:	
3-Dimethylallyl-4-hydroxy-benzoesäure	36
Pyridincarbonsäuren:	
Pyridin-2,6-dicarbonsäure	< 0,05
2,6-Dimethylpyridin-3,5-dicarbonsäure	< 0,05
6-Methylpyridin-2,3-dicarbonsäure	< 0,05
2,6-Dihydroxypyridin-4-carbonsäure	< 0,05

IV Diskussion

1. Typ-II-Topoisomerasen in der Gattung *Streptomyces*

Die beiden Enzyme DNA-Gyrase und Topoisomerase IV sind an der Kontrolle der DNA-Topologie in der Bakterienzelle beteiligt. Die meisten Mikroorganismen besitzen beide dieser Typ-II-Topoisomerasen. In einigen Bakterien jedoch konnten nur die für die Gyrase kodierenden Gene *gyrA* und *gyrB* und keine Homologen zu den Topo-IV-Untereinheiten *parC* und *parE* gefunden werden. Dies ist beispielsweise für die zur Klasse der Aktinobakterien gehörenden Corynebakterien und Mykobakterien der Fall. Für die Gyrase von *Mycobacterium smegmatis* konnte gezeigt werden, dass diese neben ihrer Supercoiling-Aktivität auch ausgeprägte Decatenierungs-Aktivität besitzt (Manjunatha et al., 2002). Die mykobakterielle Gyrase scheint somit in der Lage zu sein, die Aufgaben der Topo IV mit zu übernehmen.

Gyrase-B-Gene werden häufiger als evolutionäre und taxonomische Marker herangezogen (Yamamoto und Harayama, 1995; Fukushima et al., 2002). Die ICB-Datenbank (Identification and Classification of Bacteria; www.seasquirt.mbio.co.jp) (Watanabe et al., 2001) sammelt Sequenz-Daten von *gyrB*- und *parE*-Genen von Mikroorganismen. Für die Klasse der Aktinobakterien sind dort bisher 118 *gyrB*-Gene, jedoch keine *parE*-Gene verzeichnet. Die Existenz einer Topoisomerase IV konnte in der Klasse der Aktinobakterien bisher nicht nachgewiesen werden. Mittlerweile sind die Genome weiterer Mitglieder dieser Klasse vollständig sequenziert und in den Datenbanken zugänglich. So sind die Genome von *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al., 2002), *S. avermitilis* (Omura et al., 2001) und *Bifidobacterium longum* (Schell et al., 2002) in den letzten Jahren entschlüsselt worden. Diese Organismen enthalten Gene für die Gyrase-Untereinheiten *gyrA* und *gyrB* und zusätzlich zwei weitere Gene für eine Typ-II-Topoisomerase, die für *S. coelicolor* (SCO) und *B. longum* (BL) als „putative DNA-Gyrase-Untereinheiten“ bezeichnet wurden. Für diese Gene wurde hier die Bezeichnung *parX* (SCO5822 und BL1434) und *parY* (SCO5836 und BL1429) vorgeschlagen. Die Autoren der Sequenz von *S. avermitilis* (SAV) benannten die entsprechenden Gene schon mit *parC* (SAV2423) und *parE* (SAV2442) (Ikeda et al., 2003), experimentelle Belege für eine Topoisomerase IV wurden jedoch nicht erbracht. Aufgrund von Sequenz-Vergleichen mit bekannten Gyrase- und Topo-IV-Untereinheiten konnten ParX und ParY nicht eindeutig der einen oder anderen Gruppe zugeordnet werden (siehe Abbildung III-2, Seite 69). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals der Beweis für die Existenz einer Topoisomerase IV in Aktinobakterien erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass *Streptomyces* neben der schon früher beschriebenen Gyrase (Simon und Zimmer, 1998; Thiara und Cundliffe, 1993) mit Supercoiling-

Aktivität, eine Topoisomerase IV, bestehend aus den Untereinheiten ParX und ParY, besitzt, die ATP-abhängig die Decatenierung und Relaxation von DNA katalysiert.

Die Topoisomerase IV, die in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht wurde, setzte sich aus der ParX-Untereinheit von *Streptomyces coelicolor* und der ParY^R-Untereinheit aus dem Coumermycin-Biosynthesegencluster von *S. rishiriensis* zusammen. Dies zeigte somit die Kompatibilität der Topoisomerase-IV-Untereinheiten verschiedener *Streptomyces*-Stämme. In gleicher Weise konnte die Kompatibilität der Gyrase-Untereinheiten A und B verschiedener Stämme gezeigt werden. Der Versuch *gyrB*- und *parE*-Mutanten von *E. coli* mit *gyrB*^R und *parY*^R aus *Streptomyces* zu komplementieren scheiterte hingegen. Dies lässt vermuten, dass die Topoisomerase-Untereinheiten aus *Streptomyces* und *E. coli* keine funktionellen Topoisomerasen bilden können, was auch schon früher beobachtet worden war (Simon et al., 1995).

Im Genom der meisten grampositiven Bakterien, liegen *parE* und *parC* zusammen als direkt aufeinander folgende Gene mit gleicher Orientierung, die möglicherweise als ein Operon abgelesen werden (Huang, 1996). Für *gyrA* und *gyrB* ist die Situation ähnlich; die Transkription von *gyrA* und *gyrB* in *M. tuberculosis* als dicistronisches Operon konnte nachgewiesen werden (Unniraman und Nagaraja, 1999). Eine unabhängige Transkription der beiden im Genom benachbarten Gyrase-Untereinheiten ist hingegen für *Bacillus subtilis* gezeigt worden (Lampe und Bott, 1985). Im Gegensatz dazu besitzen in *S. coelicolor*, *S. avermitilis* und *Bifidobacterium longum* *parX* und *parY* entgegengesetzte Orientierungen und liegen zwischen 8 kb und 17 kb voneinander getrennt vor (Abbildung IV-1, Seite 106). Damit müssen *parX* und *parY* durch verschiedene Promotoren reguliert sein, wie es auch in vielen gramnegativen Organismen der Fall ist, wo meistens sowohl *gyrA* und *gyrB* als auch *parC* und *parE* mehr oder weniger weit voneinander entfernt im Genom liegen (Huang, 1996). Allerdings gibt es auch hier Ausnahmen, wie beispielsweise *Borrelia burgdorferi* (Knight und Samuels, 1999). In Abbildung IV-1 ist die genomische Organisation der Gyrase- und Topo-IV-Gene einiger grampositiver Bakterien schematisch dargestellt.

Nach diesen ersten Untersuchungen einer Topo IV aus Aktinobakterien scheinen trotz der Sequenz-Unterschiede und der unterschiedlichen genetischen Organisation keine wesentlichen funktionellen Unterschiede zu anderen Bakterien zu bestehen.

2. Resistenzmechanismen der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Resistenzgene der Aminocoumarinantibiotika-Produzenten zu identifizieren und deren Funktion in vivo nachzuweisen. Viele Antibiotika-Produzenten besitzen verschiedene Resistenz-Determinanten gegen ihr eigenes Antibiotikum. Beispielsweise einen spezifischen vom Wirkmechanismus des Antibiotikums abhängigen Mechanismus und einen eher unspezifischen Mechanismus wie z.B. Transporter. Dies ist auch für die Produzenten der Aminocoumarine der Fall, sodass zwei unterschiedliche Resistenzmechanismen Gegenstand dieser Untersuchungen waren.

2.1 Die Aminocoumarin-resistenten Topoisomerase-II-Untereinheiten $GyrB^R$ und $ParY^R$

Über die Expression einer Aminocoumarin-resistenten Gyrase-B-Untereinheit als Hauptresistenzmechanismus eines Aminocoumarin-Produzenten ist bereits von Thiara und Cundliffe (1988; 1989) berichtet worden. Bei der Sequenzierung der Biosynthesegencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ wurde das Gen $gyrB^R$ für diese resistente GyrB-Untereinheit bei allen drei Produzenten am 3'-Ende des Clusters gefunden. Unerwartet war die Entdeckung eines zweiten Gens direkt stromabwärts von $gyrB^R$ mit Homologie zu $gyrB$ -Genen. Dieses Gen wurde zunächst im Coumermycin-A₁-Cluster, später auch im Clorobiocin-Produzenten entdeckt, nicht aber im Novobiocin-Produzenten. Dieses $parY^R$ benannte Gen konnte in dieser Arbeit eindeutig als Gen für eine B-Untereinheit einer Topoisomerase IV charakterisiert werden.

Die Funktion dieser Gene $gyrB^R$ und $parY^R$ als Resistenzgene gegen Aminocoumarinantibiotika konnte durch heterologe Expression in dem nicht-Produzenten *S. lividans* nachgewiesen werden. Die Resistenz, die durch $gyrB^R$ verliehen wurde, war dabei deutlich höher als durch $parY^R$. Dies hängt vermutlich mit der höheren Affinität der Aminocoumarine zur Gyrase als zur Topo IV zusammen. Für die Topo IV von *E. coli* berichteten Peng und Mariani (1993) eine IC₅₀ von 2,7 µM (= 1,7 µg/ml) für Novobiocin und 34 nM für Coumermycin A₁. Coumermycin besäße damit eine fast 80fach höhere Affinität zur Topo IV als Novobiocin. Hardy und Cozzarelli (2003) finden eine IC₅₀ von ca. 0,8 µM (1 µg/ml) Novobiocin für die Topo IV von *E. coli*. Diese Werte entsprechen auch der von Blanche et al. (1996) berichteten IC₅₀ von 1,5 µg/ml Novobiocin ebenfalls für die Topo IV aus *E. coli*. Dagegen war die Topo IV von *S. aureus* etwa 20fach weniger sensitiv gegen Novobiocin (IC₅₀=30 µg/ml). Das macht deutlich, dass die Topo IV, neben der

Gyrase, ein wichtiges Zielmolekül für die Aminocoumarine darstellt, wobei jedoch möglicherweise wie bei den Chinolonen, die Affinität zum Enzym stark vom jeweiligen Organismus abhängig ist (Blanche et al., 1996). Novobiocin dürfte, wie es auch bei der Gyrase der Fall ist, die niedrigste Affinität der drei Aminocoumarine zum Enzym besitzen. Vermutlich sind in vivo für eine relevante Topo-IV-Hemmung Novobiocin-Konzentrationen erforderlich, die in der Natur nicht erreicht werden, sodass der Novobiocin-Produzent einen zusätzlichen Schutz seiner Topo IV nicht mehr benötigt. Hingegen sind die Produzenten von Clorobiocin und Coumermycin wegen der höheren Affinität dieser Substanzen zur Topo IV auf einen Schutz ihrer Topo IV angewiesen.

In dem von Hardy und Cozzarelli beschriebenen Experiment mit einer Novobiocin-resistenten ParE-Untereinheit aus *E. coli* ist diese nicht in der Lage, alleine Resistenz gegen Novobiocin zu verleihen. ParY^R, das Topo-IV-Resistenzgen aus *S. rishiriensis*, verlieh dagegen in vivo erhebliche Resistenz gegen Novobiocin und Coumermycin A₁. Die Topo IV aus ParY^R und ParX zeigte unter den getesteten Bedingungen in vitro keine Supercoiling-Aktivität, und die Untereinheiten der Gyrase und der Topo IV waren nicht untereinander austauschbar. Untersuchungen in *E. coli* zeigten, dass die Gyrase bis zu einem gewissen Grad die Funktion der Topo IV ersetzen kann, jedoch ist der umgekehrte Fall aufgrund der fehlenden Supercoiling-Aktivität der Topo IV nicht möglich (Kato et al., 1992). Warum ParY^R dennoch in der Lage ist so hohe Resistenz gegen Aminocoumarine zu verleihen, ist daher noch nicht abschließend geklärt.

Eine gemeinsame Expression von *gyrB^R* und *parY^R* erhöhte die Resistenz gegen Aminocoumarine nicht. Dieses Ergebnis entspricht dem von Hardy und Cozzarelli für die gemeinsame Expression Aminocoumarin-resistenter GyrB- und ParE-Untereinheiten in *E. coli*.

Im intergenischen Bereich von *gyrB^R* und *parY^R* von *S. rishiriensis* und *S. roseochromogenes* konnten keine Hinweise auf einen Transkriptions-Terminator oder eine Promotor-Sequenz gefunden werden. Es ist daher als sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass beide Gene als eine Transkriptionseinheit abgelesen werden. Die Regulation der resistenten Topoisomerase-II-Untereinheiten steht sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Biosynthese der Aminocoumarine. Der genaue Mechanismus ist aber nicht bekannt. Thiara und Cundliffe (1989) berichteten über die Induktion der *gyrB^R*-Transkription durch Änderungen in der DNA-Dichte durch Abnahme des Überspiralisierungsgrades der DNA. Hoggarth et al. (1994) postulierten für den Novobiocin-Produzenten *S. niveus* die Existenz eines Induktors, da der Anstieg der Novobiocin-Resistenz kurz vor dem Beginn der Novobiocin-Produktion beobachtet worden war.

Mittels Southern-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die *gyrB^R*- und *parY^R*-Gene der Aminocoumarin-Biosynthesegencluster zusätzlich zu einer zweiten,

sensitiven Variante des jeweiligen Gens im Organismus existieren, wie das bereits von Thiara und Cundliffe (1993) für *gyrB^R* von *S. rishiriensis* (irrtümlich dort für *S. spheroides* gehalten, s. III.1.1.1, Seite 66) gezeigt worden war. Dieses Experiment bestätigte auch die Abwesenheit von *parY^R* im Novobiocin-Produzenten.

Die Frage, warum *GyrB^R* und *ParY^R* resistent gegen Aminocoumarine sind, konnte aufgrund von Sequenzanalysen nicht beantwortet werden. Gyrase-B-Mutationen, die Resistenz gegen Aminocoumarine verleihen, betreffen meistens die Aminosäure Arg136 der *E.-coli*-Gyrase (del Castillo et al., 1991; Contreras und Maxwell, 1992) bzw. entsprechende Positionen in anderen Organismen wie *Staphylococcus aureus* (Stieger et al., 1996) oder *Borrelia burgdorferi* (Samuels et al., 1994). Für *ParE* von *E. coli* konnte eine entsprechende Bedeutung auch für Arg132 gezeigt werden (Hardy und Cozzarelli). Arg136, das eine wichtige Rolle bei der Bindung der Aminocoumarine an die Gyrase in *E. coli* spielt (s. Abbildung I-3, Seite 9), ist in den *GyrB*-Proteinen vieler untersuchter Organismen konserviert. Die bekannten *GyrB*-Proteine aus *Streptomyces* enthalten diese konservierte Position jedoch nicht, ebenso wenig die *ParY*-Proteine (Tabelle IV-1). Die Bindung von Novobiocin und Clorobiocin an die Gyrase B von *E. coli* ist durch Röntgenstrukturanalysen gut untersucht (Lewis et al., 1996; Tsai et al., 1997) (s. Abbildung I-3, Seite 9). Nahezu alle anderen Aminosäuren, für die eine Beteiligung an der Bindung dieser Aminocoumarine nachgewiesen wurde, sind in den *GyrB^R* und *ParY^R* unverändert. Dies gilt auch für die Aminosäuren, die in *E. coli* für die Bindung von ATP an die Gyrase B verantwortlich sind (Maxwell und Lawson, 2003). Weitere Mutationen in *GyrB*-Untereinheiten von *E. coli* (Contreras und Maxwell, 1992; Gross et al., 2003) und *Streptococcus pneumoniae* (Munoz et al., 1995), die zu Resistenzen gegen Aminocoumarine führen, waren in den *GyrB^R*- oder *ParY^R*-Proteinen ebenso wenig vorhanden (Tabelle IV-1).

Ein Sequenzvergleich der bekannten *GyrB^S*- und *GyrB^R*-Untereinheiten zeigte im N-Terminus die größten Unterschiede. Thiara und Cundliffe (Thiara und Cundliffe, 1993) konnten zeigen, dass der Austausch eines *BglII-PstI*-Fragmentes in *gyrB^S* von *S. rishiriensis* mit einem entsprechenden Fragment aus *gyrB^R* desselben Organismus' nach Transformation in *S. lividans* TK 24 zur Expression einer Aminocoumarin-resistenten, hybriden Gyrase führt. Durch diesen Austausch werden die Aminosäuren 154-295 von *GyrB^S* durch die entsprechenden 142 Aminosäuren aus *GyrB^R* ersetzt. Da jedoch zu wenig über die dreidimensionale Struktur und die Bindung der Aminocoumarine an die Gyrase grampositiver Organismen bekannt ist, können daraus keine genaueren Schlüsse über die Beteiligung einzelner Aminosäuren an der Resistenz gezogen werden. Für die Aufklärung der fehlenden Bindung der Aminocoumarine an diese Enzyme könnte ein Computer-Modell der dreidimensionalen Struktur dieser Proteine hilfreich sein.

Tabelle IV-1: Alignment von Aminosäuren, die an der Bindung von *E.-coli*-Gyrase beteiligt sind mit den entsprechenden Positionen der B-Untereinheiten von Typ-II-Topoisomerasen verschiedener Bakterien. Die Aminocoumarin-resistenten Proteine aus *S. rishiriensis* sind fett gedruckt, die GyrB^R- und ParY^R- Proteine der anderen Aminocoumarin-Produzenten sind an den entsprechenden Positionen identisch. Grau unterlegte Aminosäuren (AS) repräsentieren Positionen, deren Mutationen nachweislich Resistenz von *E. coli* (Gross et al., 2003), *S. aureus* (Stieger et al., 1996) oder *S. pneumoniae* (Munoz et al., 1995) gegen Aminocoumarine verleihen. Die Interaktionen der Gyrase von *E. coli* mit Aminocoumarinantibiotika ist ausführlich bei Maxwell und Lawson (2003) beschrieben.

	Protein	Größe (AS)	Position									
			Val43	Asn46	Glu50	Asp73	Gly77	Ile94	Val120	Arg136	Gly164	Thr165
<i>E. coli</i>	GyrB	804	Val43	Asn46	Glu50	Asp73	Gly77	Ile94	Val120	Arg136	Gly164	Thr165
Interaktion mit												
Novobiocin			+	+	+	+		-	-	+	-	-
Clorobiocin			-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
entsprechende AS												
in:												
<i>S. aureus</i>	GyrB	644	Ile51	Asn54	Glu58	Asp81	Gly85	Ile102	Ser128	Arg144	Gly172	Thr173
<i>S. pneumoniae</i>	GyrB	650	Ile50	Asn53	Glu57	Asp80	Gly84	Val101	Ser127	Lys143	Gly171	Thr172
<i>M. tuberculosis</i>	GyrB	685	Val88	Asn91	Glu95	Asp118	Gly122	Val138	Val164	Arg180	Gly207	Ser208
<i>C. glutamicum</i>	GyrB	684	Val72	Asn75	Glu79	Asp102	Gly106	Val122	Ile148	Leu164	Gly191	Thr192
<i>B. longum</i>	GyrB	697	Ile43	Asn46	Glu50	Asp73	Gly77	Val94	Ser120	Arg136	Gly190	Thr191
<i>S. coelicolor</i>	GyrB	686	Val70	Asn73	Glu77	Asp100	Gly104	Val121	Val147	Thr163	Gly191	Thr192
<i>S. rishiriensis</i>	GyrB^R	677	Leu63	Asn66	Glu70	Asp93	Gly97	Val114	Leu140	Thr156	Gly184	Thr185
<i>E. coli</i>	ParE	630	Val39	Asn42	Glu46	Asp69	Gly73	Ile90	Ile116	Arg132	Gly162	Thr163
<i>S. aureus</i>	ParE	665	Ile46	Asn49	Glu53	Asp76	Gly80	Ile96	Ala122	Arg138	Gly167	Thr168
<i>S. pneumoniae</i>	ParE	650	Ile48	Asn51	Glu55	Asp78	Gly82	Ile98	Ser124	Arg140	Gly172	Thr173
<i>B. longum</i>	ParY	772	Ile74	Asn77	Glu81	Asp86	Gly90	Val125	Ile151	Arg167	Gly198	Thr199
<i>S. coelicolor</i>	ParY	707	Ile60	Asn63	Glu67	Asp90	Gly94	Val111	Ala137	Leu153	Gly197	Thr198
<i>S. rishiriensis</i>	ParY^R	707	Ile56	Asn59	Glu63	Asp86	Gly90	Ala107	Ala132	Arg148	Gly192	Thr193

2.2 Die Transporter-Gene *novA* und *couR5*

Das Gen *novA* aus dem Novobiocin-Produzenten *S. spheroides* konnte durch Datenbank-Vergleiche und durch das Vorhandensein typischer Motive als Gen für einen ABC-Transporter identifiziert werden. Der homologe Bereich der Aminocoumarin-Biosynthesegencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ endet auf der 5'-Seite, upstream der Gene für die Ring-B-Biosynthese, mit *nov/clo/couE*, das möglicherweise für einen Regulator codiert (Abbildung I-6, Seite 15). Dies impliziert, dass *nov/clo/couE* das Ende des jeweiligen Clusters markiert (Eustáquio et al., 2003b). Damit würde *novA* nicht mehr direkt zum Biosynthesegencluster von Novobiocin gehören. Näheren Aufschluss über die Zugehörigkeit von *novA* zum Biosynthesegencluster von Novobiocin könnte die heterologe Expression des Clusters in einem Nicht-Produzenten geben. Zwischen *novA* und dem vorgeschlagenen Beginn des Biosynthesegenclusters liegen 3,55 kb mit 3 ORFs, die Funktionen im Primärstoffwechsel haben könnten. Aufgrund von Ähnlichkeiten von NovA zu Resistenzgenen anderer Antibiotika-Produzenten (Méndez und Salas, 2001) wurde es als mögliches Resistenzgen in Betracht gezogen.

Im Biosynthesegencluster von Coumermycin A₁ liegt *couR5* in dem nur in diesem Cluster vorhandenen Bereich *couR1* bis *couR6*. Es besitzt als einziges Gen die entgegengesetzte Orientierung zu allen anderen Genen im Cluster. Damit bildet es auch eine eigene Transkriptionseinheit. CouR5 zeigt Ähnlichkeit zu prokaryotischen Multidrug-Resistenz-Proteinen und weist typische Motive für Transmembran-Proteine auf.

Expression von *novA* und *couR5* in *S. lividans* führte zu einer deutlich niedrigeren Resistenz als durch Expression von *gyrB^R* oder *parY^R*. Möglicherweise ist die Aufgabe dieser Proteine in erster Linie ein Auswärtstransport der Antibiotika mit resistenzvermittelndem (Neben-)Effekt.

Die Klonierung resistenzverleihender DNA-Abschnitte aus genomischer DNA von Novobiocin-Produzenten wurde für *S. spheroides* (Murakami et al., 1983) und *S. niveus* (Mitchell et al., 1990) (inzwischen als *S. cerulaeus* als eine Art zusammengefasst) beschrieben. Eine nähere Charakterisierung der Resistenzmechanismen wurde jedoch nicht gegeben. Die angegebenen Restriktionskarten stimmen nicht mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Abschnitten aus *S. spheroides* überein. Die angegebenen Resistenzen gegen Novobiocin liegen im Konzentrationsbereich, wie er auch für *novA* festgestellt werden konnte. Es ist möglich, dass an anderer Stelle im Genom Proteine codiert sind, die ebenfalls am Transport oder an anderen Entgiftungsmechanismen von Novobiocin beteiligt sind.

Im Clorobiocin-Biosynthesegencluster von *S. roseochromogenes* wurden keine Transporter-Gene oder andere potentielle Resistenzgene gefunden. Der ca. 10 kb große sequenzierte Bereich upstream von *cloE* wies nur potentielle Primärstoffwechsel-Gene auf. Downstream von *parY^R* ist nur noch ein kleiner etwa 450 bp großer Sequenzabschnitt bekannt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in diesem Bereich oder an anderer Stelle im Genom Transporter codiert sind, die für den Transport von Clorobiocin spezifisch oder zumindest daran beteiligt sind.

3. CouL, eine ungewöhnliche Amidsynthetase aus der Coumermycin-Biosynthese

3.1 Identifizierung von *couL* als Gen für die Amidsynthetase

Die Struktur des Aminocoumarinantibiotikums Coumermycin A₁ enthält zwei Amidbindungen zwischen der zentralen Pyrroldicarbonsäure und zwei Ring-B-Einheiten. Im Unterschied dazu besitzen Novobiocin und Clorobiocin nur eine Amidbindung zwischen Ring B und der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) als Acyl-Komponente (Abbildung IV-3, Seite 116).

Die Amidsynthetase der Novobiocin-Biosynthese NovL wurde bereits kloniert, überexprimiert und in vitro charakterisiert (Steffensky et al., 2000a). Im Biosynthesegencluster von Coumermycin A₁ konnte an der gleichen relativen Position zwischen den Genen für Ring B (*couHIJK*) und der Glycosyltransferase (*couM*) das Gen *couL* identifiziert werden, dessen Protein-Produkt 80% Identität mit NovL zeigt. Weitere Gene mit Homologien zu *novL* bzw. *couL* konnten im Cluster nicht gefunden werden. Strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei klassischen Aminocoumarinantibiotika spiegeln sich in der Organisation der Biosynthesegencluster wider. Ein zweites Gen für ein amidbildendes Enzym sollte damit innerhalb des Coumermycin-Clusters in einem nur in diesem Cluster vorliegenden Bereich auffindbar sein. Aufgrund der Homologie-Vergleiche der drei Cluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ kommt dafür der Bereich der Gene *couR1* bis *couR6* in Frage. *couR5* zeigt Homologie zu Transporter-Genen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machten eine Beteiligung von CouR5 an Resistenzmechanismus und/oder Transportvorgängen sehr wahrscheinlich. *couR6* wurde aufgrund von Datenbank-Vergleichen als putativer Regulator eingestuft. Für die Gene R1 bis R4 ist eine Beteiligung an der Bildung der zentralen Pyrroldicarbonsäure sehr wahrscheinlich, die experimentellen Nachweise dafür müssen jedoch noch erbracht werden. Zu Beginn der Arbeit stellte sich somit die Frage, ob *couL* alleine für die Bildung beider Amidbindungen der Coumermycin-Struktur verantwortlich ist, oder ob weitere Enzyme daran beteiligt sind.

Die Amidsynthetasen der Aminocoumarinantibiotika-Biosynthese (CouL, NovL und CloL) weisen einige für Adenylat-bildende Enzyme typische Motive auf (Abbildung III-3, Seite 70). Die Motive Box I und Box II sind hoch konserviert für 4-Coumarat-CoA-Ligasen (Stuible et al., 2000) und ähnliche Motive sind auch als core-Motive A3 (core 2) und A6 (core 3) in NRPS (Marahiel et al., 1997) zu finden. Zwei weitere Motive, die eindeutig identifiziert werden konnten sind die Motive A8 und A10, die ebenfalls für die A-Domänen von NRPS typisch sind. Die Amidsynthetasen weisen damit Ähnlichkeiten zu beiden Subgruppen der Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme (Turgay et al., 1992) auf. NRPS gehören zur Gruppe I, die durch die Aktivierung ihrer (Amino)Säure-Substrate als Acyladenylate und anschließender Bindung als Thioester charakterisiert sind. Gruppe II umfasst Enzyme, die ihre Säure-Substrate ebenfalls als Adenylate aktivieren, es jedoch nicht zu einer kovalenten Bindung als Thioester kommt. Zu dieser zweiten Gruppe gehören neben den 4-Coumarat-CoA-Ligasen Luciferasen, Acetyl-CoA-Synthetasen und Fettsäure-CoA-Synthetasen der längerkettigen Fettsäure-Synthese. Aufgrund der fehlenden hochkonservierten 4'-Phosphopantethein-Bindungsstelle können die Amidsynthetasen der Aminocoumarin-Biosynthese in die zweite Gruppe eingeordnet werden. Mootz et al. (2002) diskutierten bereits die Zugehörigkeit von NovL zur Familie der NRPS, von deren Reaktionsmechanismus und modulären Aufbau (Stachelhaus und Marahiel, 1995) sich die Amidsynthetasen der Aminocoumarin-Biosynthese wesentlich unterscheiden, als eine Sache der Definition. Jedoch stellten die Autoren das Potential von Enzymen dieses Typs für die Nutzung zur Herstellung eines breiteren Spektrums an Amidbindungen/Peptidbindungen durch gezielte Mutagenese fest.

3.2 Bildung beider Amidbindungen durch CouL in vitro

Die Strategie, die zur Klonierung und Überexpression von CouL als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein in *E. coli* angewendet wurde, hatte sich bereits für die Amidsynthetase NovL der Novobiocin-Biosynthese als erfolgreich erwiesen (Steffensky et al., 2000a). Im Gegensatz zu der Reinigung von NovL war für CouL die Ein-Schritt-Reinigung mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie ausreichend, und das Enzym lag ohne zusätzliche Gelfiltrations-Chromatographie nahezu homogen gereinigt vor.

Die Inkubation von gereinigtem rekombinantem Enzym CouL mit den genuinen Substraten 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin (Ring B) führte zur Entstehung zweier Produkte, die durch HPLC detektiert werden konnten. Der unter Standardbedingungen dominant auftretende Peak im HPLC-Chromatogramm konnte durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Selected Reaction Monitoring eindeutig als Amid der Pyrroldicarbonsäure und Ring B

identifiziert werden. Das zweite Produkt zeigte die Masse und die erwarteten Reaktionen im SRM für das Diamid mit zwei Ring-B-Einheiten. Die Entstehung des Diamids konnte außerdem durch Inkubation von gereinigtem Monoamid mit Ring B und CouL im Amidsynthetase-Assay beobachtet werden. Durch Inkubation des Enzyms mit einem 10fachen Überschuss an Ring B gegenüber der Pyrroldicarbonsäure fand eine vollständige Umsetzung des intermediären Monoamids in das Diamid statt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die alleinige Beteiligung von CouL an der Bildung beider Amidbindungen in der Biosynthese von Coumermycin A₁ als gesichert angesehen. Eine nicht vollständig geklärte Frage bleibt die Reihenfolge der Amidierung der beiden Carbonsäure-Funktionen am Pyrrolring. Aus dem ¹H-NMR-Spektrum ist ersichtlich, dass es sich nur um eines der beiden in Abbildung IV-2 gezeigten möglichen Monoamide und nicht um ein Gemisch der beiden handelt. Da keine Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, konnte jedoch keine Zuordnung zu einer der beiden Monoamid-Strukturen erfolgen.

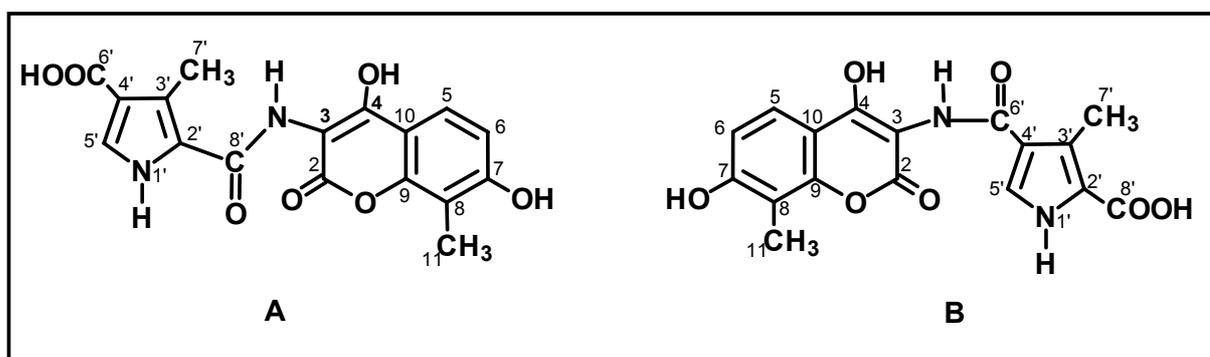


Abbildung IV-2: Mögliche Strukturen des Monoamids der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure mit Ring B

HMBC- und NOESY-Experimente konnten ebenfalls keinen weiteren Aufschluss über die Struktur der vorliegenden Verbindung geben. Im Falle von Struktur A wäre eine HMBC-Korrelation zwischen den Protonen am Pyrrol- und am Amid-Stickstoff (N) mit dem Carbonyl-Kohlenstoff (C) zu erwarten gewesen. Im Falle von Struktur B würde nur das Proton am Amid-N eine Korrelation mit dem Carbonyl-C ergeben, da HMBC-Signale über $^4J_{CH}$ nur sehr schwach zu erwarten sind. Leider waren die relevanten Signale der NH-Protonen im ¹H-NMR sowohl in DMSO-d₆ als auch in Pyridin-d₅ sehr breit. Zusammen mit der geringen Menge an gereinigter Substanz, die für die Experimente zur Verfügung stand, konnte somit die Struktur durch HMBC-Experimente nicht aufgeklärt werden. Die gleichen Probleme ergaben sich für die NOESY-Korrelation zwischen den Protonen am Pyrrol- und am Amid-Stickstoff im Falle von Struktur A. Die ¹³C-Signale des Carbonyl-C-Atoms im Aminocoumarin-Ring und der Carboxyl-C-Atome der Pyrroldicarbonsäure liegen sehr dicht zusammen (162

bis 166 ppm) und können nicht zweifelsfrei zugeordnet werden. Dies stellte ein zusätzliches Problem bei den HMBC-Korrelationen dar.

Mögliche Hinweise für die Reihenfolge der Bildung der Amidbindungen konnten aus Inkubationen von CouL im Amidsynthetase-Assay mit verschiedenen Substraten gefunden werden. Die 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure wurde mit nahezu gleichen Umsatzraten im Vergleich mit dem genuinen Substrat ohne Methylgruppe an Position 5 als Substrat für die Bildung eines Monoamids akzeptiert. Die Bildung des Diamids war jedoch gegenüber dem genuinen Substrat deutlich reduziert. Da die Carboxyl-Funktion an Position 2 der Dimethylpyrrol-dicarbonsäure die gleiche Umgebung besitzt wie Position 2 des genuinen Substrates, sich die Carboxyl-Gruppen in Position 4 der jeweiligen Säure-Komponente aber unterscheiden, könnte spekuliert werden, dass zunächst die Amidbindung an Position 2 und im zweiten Schritt an Position 4 geknüpft wird. Somit würde Struktur A in Abbildung IV-2 dem gefundenen Monoamid entsprechen. Einen weiteren Hinweis für diese Spekulation gab die Inkubation der beiden Monoethylester der 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure mit Ring B im Amidsynthetase-Assay. Während mit dem 2-Ethylester keine Produktbildung nach HPLC-Analyse detektiert werden konnte, war im HPLC-Chromatogramm der Inkubation mit dem 4-Ethylester ein enzymabhängig gebildetes Produkt detektierbar. Diese Hinweise führen zu der in Abb. IV-3 gezeigten möglichen Reaktionsfolge in der Bildung der beiden Amidbindungen in der Coumermycin-Struktur. CouL kommt damit die Katalyse von vier Reaktionsschritten zu, wobei sehr unterschiedliche Acyl-Substrate zur Aktivierung als Adenylate umgesetzt werden müssen. Im Vergleich dazu katalysiert NovL in der Biosynthese des Novobiocins nur die Folge einer Adenylierung mit anschließendem Acyl-Transfer.

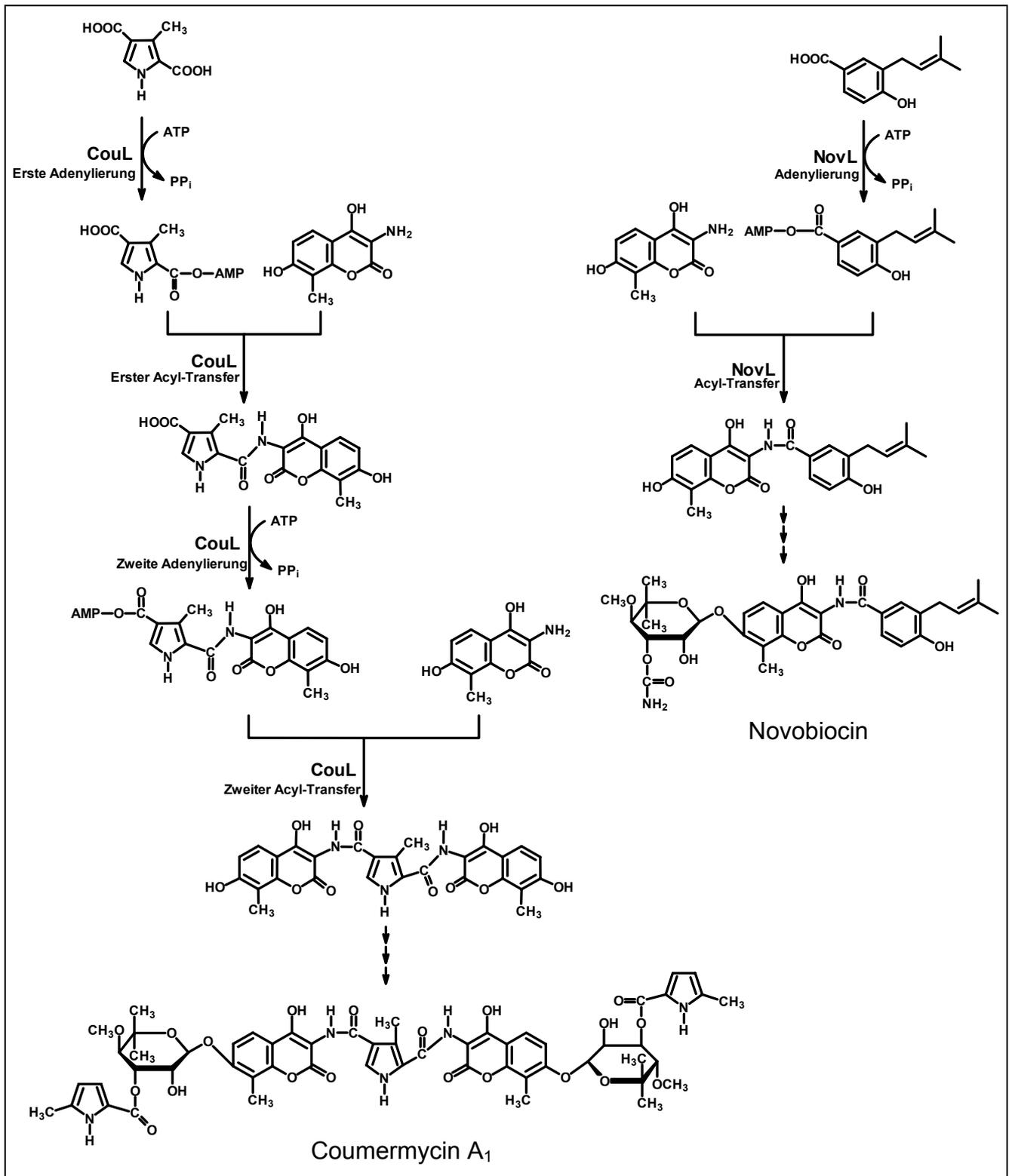


Abbildung IV-3: Vorgeschlagene Reaktionsfolge zur Bildung der Amidbindungen in Coumermycin A₁ und Novobiocin

3.3 Biochemische Eigenschaften von CouL

Wie erwartet war die Amidsynthetase-Aktivität von CouL abhängig von ATP und der Anwesenheit von Mg^{2+} oder Mn^{2+} . Der Nachweis der Aktivierung des Säure-Substrates als Acyl-Adenylat und der anschließende direkte Transfer auf die als Nucleophil agierende Amino-Gruppe des Coumarin-Ringes war für NovL im ATP-PP_i-Austausch-Assay bereits erbracht worden (Steffensky et al., 2000a). Dieser Reaktionsmechanismus wurde für CouL als ebenfalls sehr wahrscheinlich angenommen, weshalb auf eine Wiederholung dieses Versuches verzichtet wurde. Zumischen von Coenzym A im Amidsynthetase-Assay zeigte keinerlei Einfluss auf die Amidsynthetase-Aktivität von CouL. Damit konnte die Beteiligung eines Coenzym-A-Esters am Reaktionsmechanismus mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichts von rekombinantem CouL zeigte, dass CouL ebenso wie NovL als Monomer aktiv ist. Die K_m -Werte beider Enzyme bezüglich ihres genuinen Säure-Substrates liegen im selben Bereich und entsprechen dem in der Literatur für 4-Coumarat-CoA-Ligasen (Stuible et al., 2000) beschriebenen Werte. Die K_m -Werte für Ring B unterscheiden sich wesentlich stärker. Er liegt für CouL deutlich niedriger als für NovL. Im Gegensatz zu NovL ist für CouL auch die Hemmung der Aktivität durch Ring B stärker ausgeprägt.

3.4 Substratspezifität von CouL und seiner Homologe NovL und CloL

Die Substratspezifität von CouL ist breiter als die von NovL. CouL akzeptiert nicht nur verschiedene Pyrroldicarbonsäuren sondern auch 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A), das genuine Substrat von NovL. Im Gegensatz dazu akzeptiert NovL keine der Pyrroldicarbonsäuren. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass das Biosynthesecluster von Coumermycin sich aus einem Cluster ähnlich dem des Novobiocins oder Clorobiocins entwickelt haben könnte (Eustáquio et al., 2003b). Die Tatsache, dass CouL noch immer das genuine Substrat von NovL bzw. CloL, nicht aber umgekehrt, akzeptiert, ist ein weiterer Hinweis dafür. Für eine Zwischenstellung der Amidsynthetase CloL zwischen CouL und NovL spricht ein Vergleich der Identitäten der drei Proteine. CloL zeigt mit den beiden anderen Amidsynthetasen jeweils 86% Identität, während CouL und NovL im direkten Vergleich nur 80% Identität besitzen.

Das Alignment der drei Amidsynthetasen CouL, NovL und CloL (Abbildung III-16, Seite 93) zeigt in der Region zwischen Box I und Box II eine höhere Variabilität zwischen den Aminosäuresequenzen als die restlichen Bereiche. Innerhalb dieses Bereiches fällt besonders ein Sequenz-Abschnitt von ca. 25 Aminosäuren (Pos. 190–216) mit starken Unterschieden der drei Proteine auf. Der Bereich zwischen Box I

und Box II der 4-Coumarat-CoA-Ligasen (Stuible und Kombrink, 2001) bzw. der Motive A3 und A6 der A-Domänen von NRPS (Stachelhaus et al., 1999; Challis et al., 2000) weist ebenfalls innerhalb der jeweiligen Gruppen die größten Variabilitäten auf und wird in diesen Enzymen für die Substratspezifität als ausschlaggebend angesehen.

Das genuine Säure-Substrat von NovL und CloL ist identisch. Jedoch unterscheiden sich auch diese beiden Proteine in dem beschriebenen Bereich der Aminosäuresequenzen deutlich stärker als in der restlichen Sequenz. Ein Vergleich der drei Amidsynthetasen in in-vitro-Experimenten mit verschiedenen Ring-A-Analoga (Galm et al., 2003) zeigte jedoch, dass sich nicht nur CouL hinsichtlich seiner Substratspezifität von NovL und CloL unterscheidet, sondern dass zwischen beiden letzteren ebenfalls deutliche Unterschiede bestehen. CloL akzeptierte ebenso wenig wie NovL das natürliche Substrat (und dessen Derivate) von CouL, jedoch zeigte es hinsichtlich der getesteten Ring-A-Analoga die breiteste Substratspezifität (Galm et al., 2003).

Die gezielte Veränderung von Aminosäuren könnten weitere Informationen über die Beteiligung dieses Bereiches an der Substratspezifität dieser Amidsynthetasen liefern. Dies könnte eine Möglichkeit eröffnen, neue Aminocoumarinantibiotika durch kombinatorische Biosynthese und Mutasynthese-Experimente zu gewinnen.

V Zusammenfassung

Die Aminocoumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ werden von verschiedenen *Streptomyces*-Arten produziert. Novobiocin wurde in den USA als Reserveantibiotikum (Albamylin[®]) zur Behandlung schwerer Infektionen insbesondere mit multiresistenten Staphylokokken zugelassen. Aminocoumarine sind Hemmstoffe der bakteriellen DNA-Gyrase. Ihr Angriffspunkt ist die B-Untereinheit dieses aus zwei A- und zwei B-Untereinheiten tetramer aufgebauten Enzyms.

Im ersten Teil der Arbeit sollten mögliche Resistenzgene der Aminocoumarin-Produzenten identifiziert und ihre resistenzverleihende Eigenschaft gegen Aminocoumarine durch heterologe Expression belegt werden. Dazu wurden die Biosynthesegencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ untersucht. Alle drei Cluster enthielten ein Resistenzgen *gyrB^R*, das für eine Gyrase-B-Untereinheit codiert. In den Clustern von Clorobiocin und Coumermycin A₁ wurde zusätzlich ein zweites, ähnliches Gen gefunden, das *parY^R* benannt wurde. Sequenzanalysen ließen zwar darauf schließen, dass es sich dabei um ein Gen für eine B-Untereinheit einer Typ-II-Topoisomerase handelt, jedoch war eine eindeutige Zuordnung zur Gyrase oder Topoisomerase IV nicht möglich.

Die Expression von *gyrB^R* in *Streptomyces lividans* TK24 resultierte in hoher Resistenz der Transformanten gegen Novobiocin und Coumermycin A₁. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) für Transformanten mit *gyrB^R* lag bei über 750 µg/ml für Novobiocin (Wildtyp 50-100 µg/ml) und bei 500 µg/ml für Coumermycin A₁ (Wildtyp 50 µg/ml). Die durch *parY^R* verliehenen Resistenzen waren mit einer MIC von 500 µg/ml Novobiocin und 300 µg/ml Coumermycin A₁ etwas geringer.

Durch Southern-Blot-Experimente mit *gyrB^R* und *parY^R* als Sonden konnte gezeigt werden, dass die Produzenten der Aminocoumarinantibiotika jeweils zusätzlich eine weitere Kopie dieser Gene besitzen. Dabei handelt es sich vermutlich um die Gene für sensitive Varianten von GyrB und ParY. Auch im Genom von *Streptomyces coelicolor* konnte jeweils ein hybridisierendes Gen detektiert werden.

Im Novobiocin-Produzenten und im Coumermycin-A₁-Produzenten konnten die möglichen Transporter-Gene *novA* und *couR5* identifiziert werden. *novA* zeigt Ähnlichkeit zu ABC-Transportern und *couR5* zu Transmembran-Proteinen. Die Expression dieser Gene in *S. lividans* TK24 resultierte in moderater Resistenz gegen Novobiocin (MIC *novA*: 250-500 µg/ml; *couR5*: 250 µg/ml) und Coumermycin A₁ (MIC *novA*: 250 µg/ml; *couR5*: 250 µg/ml). Diese Proteine sind also möglicherweise am Auswärtstransport der Sekundärstoffe aus der Zelle beteiligt.

GyrB^R und ParY^R wurden als Hexahistidin-Fusionsproteine in *S. lividans* T7 überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Als A-Untereinheiten wurden GyrA und ParX aus *S. coelicolor* auf die gleiche Weise

exprimiert und gereinigt. In vitro konnten die Holoenzyme aus den Untereinheiten rekonstituiert werden. Der Komplex aus GyrA und GyrB^R zeigte deutlich die erwartete Supercoiling-Aktivität bakterieller DNA-Gyrasen. Relaxation und Decatenierung von DNA konnten nicht nachgewiesen werden. Der Komplex aus ParX und ParY^R zeigte in Abhängigkeit von ATP ausgeprägte Decatenierungs-Aktivität sowie Relaxations-Aktivität. Supercoiling-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Damit konnte erstmals der funktionelle Nachweis für eine Topoisomerase IV eines Organismus' aus der Klasse der Aktinobakterien erbracht werden. Dies ist auch die erste Demonstration der Bildung einer Topoisomerase IV als Resistenzmechanismus eines Antibiotika-Produzenten und unterstreicht die Rolle der Topo IV als Zielmolekül der Aminocoumarinantibiotika. Die Organisation der Gene für ParX und ParY in den Aktinobakterien, die eine Topo IV besitzen, unterscheidet sich von der Organisation von *parC* und *parE* in anderen grampositiven Bakterien.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Bildung der beiden Amidbindungen in der Biosynthese des Coumermycins aufgeklärt werden. Das Cluster von Coumermycin A₁ enthält ein putatives Amidsynthetase-Gen, *couL*, das für ein Protein aus 529 Aminosäuren codiert. CouL wurde als C-terminales Hexahistidin-Fusionsprotein in *E. coli* überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie nahezu homogen gereinigt. In vitro konnte der Nachweis erbracht werden, dass CouL beide Amidbindungen zwischen der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und zwei Aminocoumarin-Einheiten bildet. Durch Gelfiltrationschromatographie konnte ein Molekulargewicht von 59-60 kDa (theoretisch 58,9) für das rekombinante Protein ermittelt werden, was zeigt, dass CouL als Monomer aktiv ist. Die Amidsynthetase-Aktivität war abhängig von der Anwesenheit von ATP und Mn²⁺ oder Mg²⁺. Der Reaktionsverlauf zeigte die typische Michaelis-Menten-Kinetik, und es konnten K_m-Werte von 26 µM für die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und 44 µM für Ring B ermittelt werden. Einige Analoga der Methylpyrroldicarbonsäure wurden ebenfalls als Substrate akzeptiert. Pyridincarbonsäuren wurden dagegen nicht akzeptiert. 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure, die Acyl-Komponente des Novobiocins, wurde trotz der großen strukturellen Unterschiede zum natürlichen Substrat von CouL zu Novobiocinsäure umgesetzt.

VI Literatur

- Ali-Osman,F., Berger,M.S., Rajagopal,S., Spence,A., and Livingston,R.B. (1993) Topoisomerase II inhibition and altered kinetics of formation and repair of nitrosourea and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and cytotoxicity in human glioblastoma cells *Cancer Res.* **53**: 5663-5668.
- Andersson,M.I., MacGowan,A.P. (2003) Development of the quinolones *J.Antimicrob.Chemother.* **51 Suppl 1**: 1-11.
- Ball,P. (2003) Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones *J.Antimicrob.Chemother.* **51 Suppl 1**: 21-27.
- Barnes,M.H., LaMarr,W.A., and Foster,K.A. (2003) DNA gyrase and DNA topoisomerase of *Bacillus subtilis*: expression and characterization of recombinant enzymes encoded by the *gyrA*, *gyrB* and *parC*, *parE* genes *Protein Expr.Purif.* **29**: 259-264.
- Bentley,S.D., Chater,K.F., Cerdeno-Tarraga,A.M., Challis,G.L., Thomson,N.R., James,K.D., Harris,D.E., Quail,M.A., Kieser,H., Harper,D., Bateman,A., Brown,S., Chandra,G., Chen,C.W., Collins,M., Cronin,A., Fraser,A., Goble,A., Hidalgo,J., Hornsby,T., Howarth,S., Huang,C.H., Kieser,T., Larke,L., Murphy,L., Oliver,K., O'Neil,S., Rabinowitsch,E., Rajandream,M.A., Rutherford,K., Rutter,S., Seeger,K., Saunders,D., Sharp,S., Squares,R., Squares,S., Taylor,K., Warren,T., Wietzorrek,A., Woodward,J., Barrell,B.G., Parkhill,J., and Hopwood,D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Nature* **417**: 141-147.
- Berger,J., Batcho,A.D. (1978) Coumarin-glycoside antibiotics *J.Chromatogr.Libr.* **15**: 101-158.
- Bhuyan,B.K., Owen,S.P., and Dietz,A. (1965) Rubradirin, a new antibiotic. I. Fermentation and biological properties *Antimicrobial Agents Chemotherapy*: 91-96.
- Bibb,M.J., Janssen,G.R., and Ward,J.M. (1985) Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus* *Gene* **38**: 215-226.
- Blanche,F., Cameron,B., Bernard,F.X., Maton,L., Manse,B., Ferrero,L., Ratet,N., Lecoq,C., Goniot,A., Bisch,D., and Crouzet,J. (1996) Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**: 2714-2720.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal.Biochem.* **72**: 248-254.
- Buhler,C., Gadelle,D., Forterre,P., Wang,J.C., and Bergerat,A. (1998) Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli* *Nucleic Acids Res.* **26**: 5157-5162.
- Challis,G.L., Ravel,J., and Townsend,C.A. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains *Chem.Biol.* **7**: 211-224.

- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism *Annu.Rev.Biochem.* **70**: 369-413.
- Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M., and Drlica, K. (1996) DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage *J.Mol.Biol.* **258**: 627-637.
- Chen, H., Walsh, C.T. (2001) Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: β -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI *Chem.Biol.* **8**: 301-312.
- Chiu, H.-T., Hubbard, B.K., Shah, A.N., Eide, J., Fredenburg, R.A., Walsh, C.T., and Khosla, C. (2001) Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 8548-8553.
- Claridge, C.A., Elander, R.P., and Price, K.E. (1984) The coumermycins: properties, biosynthesis, and fermentation *Drugs Pharm.Sci.* **22**: 413-425.
- Claridge, T.D.W. (1999) *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* Oxford, UK: Elsevier Science Ltd.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., III, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G., and . (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence *Nature* **393**: 537-544.
- Contreras, A., Maxwell, A. (1992) gyrB mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase *Mol.Microbiol.* **6**: 1617-1624.
- Corwin, A.H., Bailey, W., and Viohl, P. (1942) Pyrrole series. VIII. Structural investigations upon a substituted dipyrrolymethane. An unusual melting point-symmetry relationship *J.Am.Chem.Soc.* **64**: 1267-1273.
- Corwin, A.H., Quattlebaum, W. (1936) Pyrrole series. I. Preparation of certain N-methylpyrroles *J.Am.Chem.Soc.* **58**: 1081-1085.
- Cundliffe, E. (1978) Mechanism of resistance to thiostrepton in the producing-organism *Streptomyces azureus* *Nature* **272**: 792-795.
- Cundliffe, E. (1989) How antibiotic-producing organisms avoid suicide *Annu.Rev.Microbiol.* **43**: 207-233.
- Cundliffe, E. (1992) Self-protection mechanisms in antibiotic producers *Ciba Found.Symp.* **171**: 199-208.
- del Castillo, I., Vizán, J.L., Rodríguez-Sainz, M.C., and Moreno, F. (1991) An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A₁ *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**: 8860-8864.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W., and Raynal, M.-C. (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea* *Mol.Gen.Genet.* **264**: 477-485.

- Drlica, K., Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **61**: 377-392.
- Eder, J.P., Wheeler, C.A., Teicher, B.A., and Schnipper, L.E. (1991) A phase I clinical trial of novobiocin, a modulator of alkylating agent cytotoxicity *Cancer Res.* **51**: 510-513.
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Luft, T., Li, S.-M., Chater, K.F., and Heide, L. (2003a) Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*. Identification of the halogenase and generation of structural analogs *Chem Biol* **10**: 279-288.
- Eustáquio, A.S., Luft, T., Wang, Z.-X., Gust, B., Chater, K.F., Li, S.-M., and 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.
- Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1991) The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *blaA* tRNA gene of *Streptomyces* *Cell* **66**: 769-780.
- Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneaux, D., Crouzet, J., Famechon, A., and Blanche, F. (1994) Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones *Mol.Microbiol.* **13**: 641-653.
- Fischer, H., Walach, B. (1925) Synthese des 2,4-Dimethyl-5-carbäthoxy-3-vinyl-pyrrols und seine Überführung in Krypto-pyrrol *Ber.Dtsch.Chem.Ges.* **58**: 2820-2824.
- French, P., Venuti, E., and Fraimow, H.S. (1993) In vitro activity of novobiocin against multiresistant strains of *Enterococcus faecium* *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**: 2736-2739.
- Fröhlich, K.U., Wiedmann, M., Lottspeich, F., and Mecke, D. (1989) Substitution of a pentalenolactone-sensitive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a genetically distinct resistant isoform accompanies pentalenolactone production in *Streptomyces arenae* *J.Bacteriol.* **171**: 6696-6702.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., and Kawaguchi, R. (2002) Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence *J.Clin.Microbiol.* **40**: 2779-2785.
- Galm, U., Dessoy, M.A., Schmidt, J., Li, S.-M., and Heide, L. (2003) In vitro and in vivo production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic and synthetic approach *Chem.Biol.* eingereicht
- Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H.P., Schmidt, J., Li, S.-M., and Heide, L. (2002) Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 *Arch.Microbiol.* **178**: 102-114.
- Gellert, M., Fisher, L.M., and O'Dea, M.H. (1979) DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**: 6289-6293.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T., and Tomizawa, J.I. (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 4772-4776.

- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976a) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**: 3872-3876.
- Gellert, M., O'Dea, M.H., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1976b) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**: 4474-4478.
- Godfrey, J.C., Price, K.E. (1972) Structure-activity relationships in coumermycins *Adv.Appl.Microbiol.* **15**: 231-296.
- Gormley, N.A., Orphanides, G., Meyer, A., Cullis, P.M., and Maxwell, A. (1996) The interaction of coumarin antibiotics with fragments of DNA gyrase B protein *Biochemistry* **35**: 5083-5092.
- Goto, T., Wang, J.C. (1984) Yeast DNA topoisomerase II is encoded by a single-copy, essential gene *Cell* **36**: 1073-1080.
- Gross, C.H., Parsons, J.D., Grossman, T.H., Charifson, P.S., Bellon, S., Jernee, J., Dwyer, M., Chambers, S.P., Markland, W., Botfield, M., and Raybuck, S.A. (2003) Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**: 1037-1046.
- Guilfoile, P.G., Hutchinson, C.R. (1992) Sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces glaucescens tcmAR* tetracenomycin C resistance and repressor gene loci *J.Bacteriol.* **174**: 3651-3658.
- Hallett, P., Grimshaw, A.J., Wigley, D.B., and Maxwell, A. (1990) Cloning of the DNA gyrase genes under tac promoter control: overproduction of the gyrase A and B proteins *Gene* **93**: 139-142.
- Hardy, C.D., Cozzarelli, N.R. (2003) Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance *Antimicrob.Agents Chemother.* **47**: 941-947.
- Hawkey, P.M. (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response *J.Antimicrob.Chemother.* **51 Suppl 1**: 29-35.
- Hedde, J., Maxwell, A. (2002) Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**: 1805-1815.
- Heinzelmann, E., Kienzlen, G., Kaspar, S., Recktenwald, J., Wohlleben, W., and 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.
- Hoggarth, J.H., Cushing, K.E., Mitchell, J.I., and Ritchie, D.A. (1994) Induction of resistance to novobiocin in the novobiocin-producing organism *Streptomyces niveus* *FEMS Microbiol.Lett.* **116**: 131-136.
- Holmes, M.L., Dyall-Smith, M.L. (1991) Mutations in DNA gyrase result in novobiocin resistance in halophilic archaeobacteria *J.Bacteriol.* **173**: 642-648.
- Hooper, D.C., Wolfson, J.S., McHugh, G.L., Winters, M.B., and Swartz, M.N. (1982) Effects of novobiocin, coumermycin A₁, clorobiocin, and their analogs on *Escherichia coli* DNA gyrase and bacterial growth *Antimicrob.Agents Chemother.* **22**: 662-671.

- Huang,W.M. (1996) Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes *Annu.Rev.Genet.* **30**: 79-107.
- Ikeda,H., Ishikawa,J., Hanamoto,A., Shinose,M., Kikuchi,H., Shiba,T., Sakaki,Y., Hattori,M., and Omura,S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* *Nat.Biotechnol.* **21**: 526-531.
- Ikeda,M., Nakagawa,S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **62**: 99-109.
- Kampranis,S.C., Bates,A.D., and Maxwell,A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 8414-8419.
- Kampranis,S.C., Maxwell,A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 14416-14421.
- Kato,J., Nishimura,Y., Imamura,R., Niki,H., Hiraga,S., and Suzuki,H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli* *Cell* **63**: 393-404.
- Kato,J., Suzuki,H., and Ikeda,H. (1992) Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli* *J.Biol.Chem.* **267**: 25676-25684.
- Keil,J.G., Godfrey,J.C., Cron,M.J., Hooper,I.R., Nettleton,D.E., Price,K.E., and Schmitz,H. (1971) Structure-activity relationships in chemically modified coumermycin *Pure Appl.Chem.* **28**: 571-601.
- Kieser,T., Bibb,M.J., Buttner,M.J., Chater,K.F., and Hopwood,D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics* Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Knight,S.W., Samuels,D.S. (1999) Natural synthesis of a DNA-binding protein from the C-terminal domain of DNA gyrase A in *Borrelia burgdorferi* *EMBO J.* **18**: 4875-4881.
- Kominek,L.A., Meyer,H.F. (1975) Novobiocin acid synthetase *Methods Enzymol.* **43**: 502-508.
- Lampe,M.F., Bott,K.F. (1985) Genetic and physical organization of the cloned gyrA and gyrB genes of *Bacillus subtilis* *J.Bacteriol.* **162**: 78-84.
- Lanoot,B., Vancanneyt,M., Cleenwerck,I., Wang,L., Li,W., Liu,Z., and 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.
- Laurin,P., Ferroud,D., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (1999a) Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **9**: 2079-2084.
- Laurin,P., Ferroud,D., Schio,L., Klich,M., Dupuis-Hamelin,C., Mauvais,P., Lassaigne,P., Bonnefoy,A., and Musicki,B. (1999b) Structure-activity relationship in two series of aminoalkyl substituted coumarin inhibitors of gyrase B *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **9**: 2875-2880.

- Lescher, G.Y., Froelich, E.D., Gruet, M.D., Bailey, J.H., and Brundage, R.P. (1962) 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents *J. Med. Pharmaceut. Chem.* **5**: 1063-1068.
- Lewis, R.J., Singh, O.M.P., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J., and 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.
- Manjunatha, U.H., Dalal, M., Chatterji, M., Radha, D.R., Visweswariah, S.S., and Nagaraja, V. (2002) Functional characterisation of mycobacterial DNA gyrase: an efficient decatenase *Nucleic Acids Res.* **30**: 2144-2153.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis *Chem Rev.* **97**: 2651-2674.
- Marcu, M.G., Schulte, T.W., and Neckers, L. (2000) Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 242-248.
- Maxwell, A. (1993) The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase *Mol. Microbiol.* **9**: 681-686.
- Maxwell, A. (1997) DNA gyrase as a drug target *Trends Microbiol.* **5**: 102-109.
- Maxwell, A., 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., Salas, J.A. (1998) ABC transporters in antibiotic-producing actinomycetes *FEMS Microbiol. Lett.* **158**: 1-8.
- Méndez, C., Salas, J.A. (2001) The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms *Res. Microbiol.* **152**: 341-350.
- Menzel, R., Gellert, M. (1983) Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling *Cell* **34**: 105-113.
- Meyers, C.L.F., Oberthur, M., Anderson, J.W., Kahne, D., and Walsh, C.T. (2003) Initial characterization of novobiocin acid noviosyl transferase activity of NovM in biosynthesis of the antibiotic novobiocin *Biochemistry* **42**: 4179-4189.
- Mitchell, J.I., Logan, P.G., Cushing, K.E., and Ritchie, D.A. (1990) Novobiocin-resistance sequences from the novobiocin-producing strain *Streptomyces niveus* *Mol. Microbiol.* **4**: 845-849.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases *ChemBiochem* **3**: 490-504.
- Mühlenweg, A. (1999) Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Shikonin in Zellkulturen von *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. und von Novobiocin in *Streptomyces spheroides* NCIB 11891 Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

- Munoz,R., Bustamante,M., and de la Campa,A.G. (1995) Ser-127-to-Leu substitution in the DNA gyrase B subunit of *Streptococcus pneumoniae* is implicated in novobiocin resistance *J.Bacteriol.* **177**: 4166-4170.
- Murakami,T., Nojiri,C., Toyama,H., Hayashi,E., Katumata,K., Anzai,H., Matsushashi,Y., Yamada,Y., and Nagaoka,K. (1983) Cloning of antibiotic-resistance genes in *Streptomyces* *J.Antibiot.(Tokyo)* **36**: 1305-1311.
- Musicki,B., Periers,A.M., Laurin,P., Ferroud,D., Benedetti,Y., Lachaud,S., Chatreaux,F., Haesslein,J.L., Iltis,A., Pierre,C., Khider,J., Tessot,N., Airault,M., Demassej,J., Dupuis-Hamelin,C., Lassaingne,P., Bonnefoy,A., Vicat,P., and Klich,M. (2000) Improved antibacterial activities of coumarin antibiotics bearing 5',5'-dialkylnoviose: biological activity of RU79115 *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **10**: 1695-1699.
- Muth,G., Nussbaumer,B., Wohlleben,W., and 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.
- Nakada,N., Gmunder,H., Hirata,T., and Arisawa,M. (1995) Characterization of the binding site for cyclothialidine on the B subunit of DNA gyrase *J.Biol.Chem.* **270**: 14286-14291.
- Nakada,N., Shimada,H., Hirata,T., Aoki,Y., Kamiyama,T., Watanabe,J., and Arisawa,M. (1993) Biological characterization of cyclothialidine, a new DNA gyrase inhibitor *Antimicrob.Agents Chemother.* **37**: 2656-2661.
- Omura,S., Ikeda,H., Ishikawa,J., Hanamoto,A., Takahashi,C., Shinose,M., Takahashi,Y., Horikawa,H., Nakazawa,H., Osonoe,T., Kikuchi,H., Shiba,T., Sakaki,Y., and Hattori,M. (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**: 12215-12220.
- Oram,M., Dosanjh,B., Gormley,N.A., Smith,C.V., Fisher,L.M., Maxwell,A., and Duncan,K. (1996) Mode of action of GR122222X, a novel inhibitor of bacterial DNA gyrase *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**: 473-476.
- Pan,X.S., Ambler,J., Mehtar,S., and Fisher,L.M. (1996) Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae* *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**: 2321-2326.
- Pan,X.S., Fisher,L.M. (1997) Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**: 471-474.
- Pan,X.S., Fisher,L.M. (1999) *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**: 1129-1136.
- Peng,H., Mariani,K.J. (1993) *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions *J.Biol.Chem.* **268**: 24481-24490.
- Pernodet,J.L., Gourmelen,A., Blondelet-Rouault,M.H., and Cundliffe,E. (1999) Dispensable ribosomal resistance to spiramycin conferred by srmA in the spiramycin producer *Streptomyces ambofaciens* *Microbiology* **145 (Pt 9)**: 2355-2364.

- Petersen,U. (2001) Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation *Pharm.Unserer Zeit* **30**: 376-381.
- Pocklington,M.J., Jenkins,J.R., and Orr,E. (1990) The effect of novobiocin on yeast topoisomerase type II *Mol.Gen.Genet.* **220**: 256-260.
- Pojer,F., Li,S.-M., and Heide,L. (2002) Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics *Microbiology* **148**: 3901-3911.
- Pootoolal,J., Thomas,M.G., Marshall,C.G., Neu,J.M., Hubbard,B.K., Walsh,C.T., and Wright,G.D. (2002) Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009 *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 8962-8967.
- Raad,I.I., Hachem,R.Y., Abi-Said,D., Rolston,K.V.T., Whimbey,E., Buzaid,A.C., and Legha,S. (1998) A prospective crossover randomized trial of novobiocin and rifampin prophylaxis for the prevention of intravascular catheter infections in cancer patients treated with interleukin-2 *Cancer* **82**: 403-411.
- Rádl,S. (1990) Structure-activity relationships in DNA gyrase inhibitors *Pharmacol.Ther.* **48**: 1-17.
- Rappa,G., Lorico,A., and Sartorelli,A.C. (1992) Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26) *Int.J Cancer* **51**: 780-787.
- Rappa,G., Murren,J.R., Johnson,L.M., Lorico,A., and 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.
- Reece,R.J., Maxwell,A. (1991) DNA gyrase: structure and function *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* **26**: 335-375.
- Reusser,F., Dolak,L.A. (1986) Novenaminate is the active moiety in novobiocin *J.Antibiot.(Tokyo)* **39**: 272-274.
- Sambrook,J., Russell,D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuels,D.S., Marconi,R.T., Huang,W.M., and Garon,C.F. (1994) gyrB mutations in coumermycin A₁-resistant *Borrelia burgdorferi* *J.Bacteriol.* **176**: 3072-3075.
- Schell,M.A., Karmirantzou,M., Snel,B., Vilanova,D., Berger,B., Pessi,G., Zwahlen,M.C., Desiere,F., Bork,P., Delley,M., Pridmore,R.D., and Arigoni,F. (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 14422-14427.
- Schimana,J., Fiedler,H.P., Groth,I., Süssmuth,R., Beil,W., Walker,M., and Zeeck,A. (2000) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities *J.Antibiot.(Tokyo)* **53**: 779-787.

- Schio, L., Chatreaux, F., Loyau, V., Murer, M., Ferreira, A., Mauvais, P., Bonnefoy, A., and Klich, M. (2001) Fine Tuning of physico-chemical parameters to optimise a new series of novobiocin analogues *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **11**: 1461-1464.
- Schwartz, G.N., Teicher, B.A., Eder, J.P., Jr., Korbut, T., Holden, S.A., Ara, G., and Herman, T.S. (1993) Modulation of antitumor alkylating agents by novobiocin, topotecan, and lonidamine *Cancer Chemother.Pharmacol.* **32**: 455-462.
- Sheldon, P.J., Mao, Y., He, M., and Sherman, D.H. (1999) Mitomycin resistance in *Streptomyces lavendulae* includes a novel drug-binding-protein-dependent export system *J.Bacteriol.* **181**: 2507-2512.
- Simon, H., Roth, M., and Zimmer, C. (1995) Biochemical complementation studies in vitro of gyrase subunits from different species *FEBS Lett.* **373**: 88-92.
- Simon, H., Zimmer, C. (1998) DNA gyrase from *Streptomyces noursei* and comparison with gyrases from other sources: GyrB subunit may affect the pH-dependence of the enzymatic activity *Biochemistry and Molecular Biology International* **44**: 915-924.
- Sohng, J.K., Oh, T.J., Lee, J.J., and Kim, C.G. (1997) Identification of a gene cluster of biosynthetic genes of rubradirin substructures in *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061 *Mol.Cells* **7**: 674-681.
- Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. (1995) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis *FEMS Microbiol.Lett.* **125**: 3-14.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases *Chem.Biol.* **6**: 493-505.
- Stahlmann, R., Riecke, K. (2001) Unerwünschte Wirkungen der Chinolone *Pharm.Unserer Zeit* **30**: 412-417.
- Staudenbauer, W.L., Orr, E. (1981) DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties *Nucleic Acids Res.* **9**: 3589-3603.
- Steffensky, M. (2000) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Novobiocin in *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891 Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Steffensky, M., Li, S.-M., and Heide, L. (2000a) Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891 *J.Biol.Chem.* **275**: 21754-21760.
- Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M., and Heide, L. (2000b) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891 *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**: 1214-1222.
- Stieger, M., Angehrn, P., Wohlgensinger, B., and Gmunder, H. (1996) GyrB mutations in *Staphylococcus aureus* strains resistant to cyclothialidine, coumermycin, and novobiocin *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**: 1060-1062.

- Störl,K., Storl,J., Roth,M., and Zimmer,C. (1994) DNA topoisomerases from *Streptomyces noursei*: influence of coumarins and quinolones on the enzymic activity *Biochim.Biophys.Acta* **1199**: 143-148.
- Stuible,H., Buttner,D., Ehling,J., Hahlbrock,K., and Kombrink,E. (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes *FEBS Lett.* **467**: 117-122.
- Stuible,H.P., Kombrink,E. (2001) Identification of the substrate specificity-conferring amino acid residues of 4-coumarate:coenzyme A ligase allows the rational design of mutant enzymes with new catalytic properties *J.Biol.Chem.* **276**: 26893-26897.
- Sugino,A., Peebles,C.L., Kreuzer,K.N., and Cozzarelli,N.R. (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 4767-4771.
- Tanaka,M., Onodera,Y., Uchida,Y., Sato,K., and Hayakawa,I. (1997) Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV purified from *Staphylococcus aureus* *Antimicrob.Agents Chemother.* **41**: 2362-2366.
- Thiara,A.S., 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., 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., 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., and Hauschildt,S. (2002) Novobiocin is a novel inducer of CD38 on cells of the myelomonocytic lineage *Biochim.Biophys.Acta* **1542**: 32-40.
- Thornsberry,C., Burton,P.J., Yee,Y.C., Watts,J.L., and Yancey,R.J., Jr. (1997) The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test *J.Dairy Sci.* **80**: 413-421.
- Trefzer,A., Pelzer,S., Schimana,J., Stöckert,S., Bihlmaier,C., Fiedler,H.P., Welzel,K., Vente,A., and Bechthold,A. (2002) Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**: 1174-1182.
- Tsai,F.T.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., and Wigley,D.B. (1997) The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin *Proteins* **28**: 41-52.
- Turgay,K., Krause,M., and Marahiel,M.A. (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes *Mol.Microbiol.* **6**: 529-546.
- Ullsperger,C., Cozzarelli,N.R. (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli* *J.Biol.Chem.* **271**: 31549-31555.

- Unniraman,S., Nagaraja,V. (1999) Regulation of DNA gyrase operon in *Mycobacterium smegmatis*: a distinct mechanism of relaxation stimulated transcription *Genes Cells* **4**: 697-706.
- van Wageningen,A.M., Kirkpatrick,P.N., Williams,D.H., Harris,B.R., Kershaw,J.K., Lennard,N.J., Jones,M., Jones,S.J., and Solenberg,P.J. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic *Chem.Biol.* **5**: 155-162.
- Walsh,T.J., Hansen,S.L., Tatem,B.A., Auger,F., and Standiford,H.C. (1985) Activity of novobiocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *J.Antimicrob.Chemother.* **15**: 435-440.
- Wang,J.C. (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine *Q.Rev.Biophys.* **31**: 107-144.
- Wang,Z.-X., Li,S.-M., and Heide,L. (2000) Identification of the coumermycin A₁ biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489 *Antimicrob.Agents Chemother.* **44**: 3040-3048.
- Watanabe,K., Nelson,J., Harayama,S., and Kasai,H. (2001) ICB database: the gyrB database for identification and classification of bacteria *Nucleic Acids Res.* **29**: 344-345.
- Weitnauer,G., Gaisser,S., Trefzer,A., Stockert,S., Westrich,L., Quiros,L.M., Mendez,C., Salas,J.A., and Bechthold,A. (2001) An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 *Antimicrob.Agents Chemother.* **45**: 690-695.
- Westrich,L., Heide,L., and Li,S.-M. (2003) CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin *ChemBiochem* **4**: 768-773.
- Woodward,R.B., Ayer,W.A., Beaton,J.M., Bickelhaupt,F., Bonnett,R., Buchschacher,P., Closs,G.L., Dutler,H., Hannah,J., Hauck,F., Ito,S., Langemann,A., Le Goff,E., Leimgruber,W., Lwowski,W., Sauer,J., Zdenek,V., and Volz,H. (1990) The total synthesis of chlorophyll a *Tetrahedron* **46**: 7599-7659.
- Wu,L.C., Shahied,S.I. (1995) Mycobacterial DNA gyrase: enzyme purification and characterization of supercoiling activity *Arch.Biochem.Biophys.* **324**: 123-129.
- Yamaji,K., Masubuchi,M., Kawahara,F., Nakamura,Y., Nishio,A., Matsukuma,S., Fujimori,M., Nakada,N., Watanabe,J., and Kamiyama,T. (1997) Cyclothialidine analogs, novel DNA gyrase inhibitors *J.Antibiot.(Tokyo)* **50**: 402-411.
- Yamamoto,S., Harayama,S. (1995) PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains *Appl.Enviro.Microbiol.* **61**: 1104-1109.
- Yoshida,H., Bogaki,M., Nakamura,M., and Nakamura,S. (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli* *Antimicrob.Agents Chemother.* **34**: 1271-1272.
- Zalacain,M., Cundliffe,E. (1989) Methylation of 23S rRNA caused by tlrA (ermSF), a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae* *J.Bacteriol.* **171**: 4254-4260.

Zhao,X., Xu,C., Domagala,J., and Drlica,K. (1997) DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 13991-13996.

Danksagung

Mein besonderer gilt Herrn Prof. Dr. L. Heide für die gute Betreuung und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Ruth danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Shu-Ming Li möchte ich mich für die gute Betreuung bedanken und dafür, dass seine Tür und sein Ohr immer offen waren für alle Probleme und Fragen, die einem im Laufe eines Doktorandenlebens begegnen können.

Frau Dr. Agnes Mühlenweg und Frau Dr. Marion Steffensky haben einige Vorarbeiten zu dieser Arbeit geleistet und mir beim Einstieg geholfen, dafür danke ich ihnen ganz herzlich.

Bei Frau Dr. Hannelore Simon möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme und die gute Betreuung während der zwei Wochen in ihrem Labor im Institut für Molekularbiologie an der Universität in Jena bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Andrea Porzel und Herrn Dr. Jürgen Schmidt vom Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) für die gute Zusammenarbeit und die sehr hilfreichen NMR-Untersuchungen und LC-MS-Analysen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau Susanne Hennig für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung bei der praktischen Durchführung eines Teils dieser Arbeit. Meinen beiden Laborpartnerinnen Florence und Yvonne danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Klima im Labor und die guten, nicht immer nur fachlichen Gespräche. Frau Lörcher möchte ich besonders danken für ihre immerwährende Freundlichkeit, ihren Rat in allen Lebenslagen und ihre Unterstützung in allen organisatorischen und verwaltungstechnischen Dingen. Frau Bauer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr stetes Bemühen um das leibliche Wohl der Doktoranden. Thomas Luft danke ich für seine Geduld und große Hilfsbereitschaft bei der Lösung aller erdenklichen Computerprobleme. Ich bedanke mich bei allen anderen Laborkolleginnen und -kollegen, die mich während meiner Zeit hier in Tübingen im und außerhalb des Labors begleitet haben: Agnes, Alessandra, Andreas, Anja, Anne, Axel, Christine, Claudia, Daniela, Dirk, Emmanuel, Florence, Gabriele, Hui, Inge, Irmela, Karin, Katja, Lucy, Manuel, Marion, Herrn Dr. Mechler, Robert, Shu-Ming, Susanne, Thomas, Herrn Trefzer, Ute, Yvonne und Zhao.

Ich möchte mich auch bei allen anderen Arbeitskreisen im Haus für die Hilfsbereitschaft bedanken.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern, die immer hinter stehen. Und vielleicht haben meine Brüder nun auch einen Grund, ein kleinwenig auf ihre kleine Schwester stolz zu sein.

Akademische Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrern an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg:

Prof. Dr. F.-C. Czygan
Prof. Dr. S. Ebel
Dr. M. Grünsfelder
Prof. Dr. C. Herdeis
Prof. Dr. M. J. Lohse
Prof. Dr. W. Lutz
Prof. Dr. C. Müller
Prof. Dr. P. Proksch
Prof. Dr. H. Rüdiger
Prof. Dr. H. Schmidt
Prof. Dr. S. Silbernagl
Prof. Dr. P. Suhrmann
PD Dr. M. Veit
Prof. Dr. H. Wätzig
Prof. Dr. I. Zimmermann