

# **Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Clorobiocin**

**DISSERTATION**

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**2007**

vorgelegt von

**Christine Anderle**

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S.-M. Li

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Wissenschaftliche Publikationen

**Anderle, C., Alt, S., Gulder, T., Bringmann, G., Kammerer, B., Gust, B. and Heide, L.** (2007). Biosynthesis of clorobiocin: Investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety. *Arch. Microbiol.* **2007**, Mar, 187(3):227-237.

**Anderle, C., Li, S.-M., Kammerer, B., Gust, B. and Heide, L.** (2007). New aminocoumarin antibiotics derived from 4-hydroxycinnamic acid are formed after heterologous expression of a modified clorobiocin biosynthetic gene cluster. **submitted.**

**Anderle, C., Hennig, S., Kammerer, B., Wessjohann, L., Gust, B., Li, S.-M. and Heide, L.** (2007). Improved mutasynthetic approaches for the production of modified aminocoumarin antibiotics. **submitted.**

**Heide, L., Gust, B., Anderle, C. and Li, S.-M.** (2007). Combinatorial biosynthesis, metabolic engineering and mutasynthesis for the generation of new aminocoumarin antibiotics. *Curr.Top.Med.Chem.* invited review; **submitted.**

**Anderle, C., Stieger, M., Burrell, M., Reinelt, S., Maxwell, A., Page, M. and Heide, L.** (2007). Novel aminocoumarin derivatives produced by mutasynthesis: biological activities and toxicity against eukaryotic cells. **In Vorbereitung.**

### Patentanmeldung:

Neue Aminocoumarin-Antibiotika, Verfahren zu deren Herstellung und ihre Verwendung. Anmelder: Universität Tübingen; Erfinder: **Anderle, C. und Heide, L.** (2007); Deutsches Patentamt, Aktenzeichen 10 2007 007 644.6 (vom 16. Februar 2007).

### Tagungsbeiträge

*Vorträge:*

**Anderle, C., Hennig, S., Wessjohann, L.A., Li, S.-M. and Heide, L.** Herstellung neuer Aminocoumarinantibiotika durch Zweistufen-Fütterung. Jahrestagung der DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft). Mainz, Deutschland (06.-08. Oktober 2005).

**Anderle, C., Hennig, S., Wessjohann, L.A., Li, S.-M. and Heide, L.** New aminocoumarin antibiotics produced by two-step precursor-directed biosynthesis. Meeting des "CombiGyrase Scientific Committee". Padova, Italien (20.-22. Oktober 2005).

**Anderle, C., Hennig, S., Stieger, M., Kammerer, B., Wessjohann, L., Page, M., Gust, B., Li, S.-M. and Heide, L.** Mutasynthesis Experiments: new approaches to generate modified aminocoumarin antibiotics. "International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds in conjunction with the European Symposium of Drug Research in Actinomycetes". Tübingen, Deutschland (19.-22. Oktober 2006).

*Poster:*

**Anderle, C., Hennig, S., Li, S.-M. and Heide, L.** Novobiocin Biosynthesis: Inactivation of the prenyltransferase gene *novQ* results in loss of function of the downstream genes. VAAM Workshop “International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds”. Jena, Deutschland (26.-28. September 2004).

**Anderle, C., Hennig, S., Wessjohann, L.A., Li, S.-M. and Heide, L.** Production of new aminocoumarin antibiotics by two-step precursor-directed biosynthesis. “10<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM)”. Prag, Tschechische Republik (24.-28. Juni 2006).

**Anderle, C., Alt, S., Gulder, T., Bringmann, G., Kammerer, B., Gust, B. and Heide, L.** Biosynthesis of clorobiocin: Investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety. “International Meeting on the Biology of Bacteria Producing Natural Compounds in conjunction with the European Symposium of Drug Research in Actinomycetes”. Tübingen, Deutschland (19.-22. Oktober 2006)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationen und Tagungsbeiträge .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VI</b>
<b>I Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Streptomyceten – Produzenten von Antibiotika .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Aminocoumarin-Antibiotika.....</b>	<b>2</b>
2.1 Struktur der Aminocoumarine .....	2
2.2 Biosynthese der Aminocoumarine .....	3
2.2.1 Resistenzgene.....	5
2.2.2 Regulatorgene .....	5
2.2.3 Gene der Biosynthese der Acylkomponente.....	5
2.2.4 Gene der Biosynthese des Aminocoumarin-Rings .....	6
2.2.5 Gene der Biosynthese des Desoxyzuckers.....	7
2.2.5.1 Gen zur 4''-O-Methylierung des Desoxyzuckers .....	7
2.2.5.2 Gene der 3''-O-Acylierung des Desoxyzuckers .....	7
2.2.6 Gene für die Verknüpfung .....	8
2.3 Wirkungsmechanismus der Aminocoumarine .....	10
2.4 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung .....	11
<b>3. Herstellung neuer Antibiotika .....</b>	<b>11</b>
3.1 Kombinatorische Biosynthese .....	12
3.2 Mutasyntese .....	13
<b>4. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>II Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Chemikalien.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Säulenmaterial.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Enzyme und Kits .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Nährmedien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>19</b>
4.1 Medien zur Bakterienkultivierung .....	19
4.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	20
4.1.2 Kultivierung und Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 .....	20
4.1.3 Kultivierung von Streptomyceten .....	21
4.1.4 Novobiocin-Produktionsmedium.....	22
4.1.5 Clorobiocin-Produktionsmedium.....	23
4.1.6 Protoplastentransformation und Konjugation von Streptomyceten.....	23
4.2 Antibiotikallösungen .....	24
4.3 Puffer und Lösungen.....	25
4.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung .....	25
4.3.2 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese .....	26
4.3.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten ...	26
4.3.4 Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung.....	27
4.3.5 Lösungen zur Transformation und Selektion von <i>E. coli</i> .....	27
4.3.6 Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-	
Färbung von Proteingelen .....	28
4.3.7 Puffer zur Enzymreinigung.....	29
<b>5. Plasmide, Primer und Bakterienstämme.....</b>	<b>30</b>
5.1 Vektoren, Plasmide und Cosmide.....	30

5.2	PCR-Primer .....	34
5.3	Stämme .....	36
<b>6.</b>	<b>Kulturbedingungen .....</b>	<b>39</b>
6.1	Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	39
6.2	Anzucht und Kultivierung von Streptomycceten .....	39
6.2.1	Generelle Kultivierung .....	39
6.2.2	Produktion von Sekundärmetaboliten .....	39
6.2.2.1	Produktion von Clorobiocin und seinen Derivaten .....	39
6.2.2.2	Produktion von Novobiocin und seinen Derivaten .....	40
6.2.3	Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerinkulturen .....	40
6.3	Anzucht und Kultivierung von <i>Saccharomyces</i> .....	40
<b>7.</b>	<b>Methoden der Molekularbiologie .....</b>	<b>41</b>
7.1	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA .....	41
7.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	41
7.1.2	Alkoholfällung .....	41
7.1.3	DNA-Quantifizierung .....	41
7.2	DNA-Isolierung .....	41
7.2.1	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	41
7.2.2	Isolierung von Plasmiden aus Streptomycceten .....	42
7.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten .....	42
7.2.4	DNA-Denaturierung für Transformation in Streptomycceten .....	43
7.3	Enzymatische DNA-Manipulation .....	43
7.3.1	Restriktionsspaltung der DNA .....	43
7.3.2	Dephosphorylierung .....	43
7.3.3	DNA-Ligation .....	43
7.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	44
7.4.1	Trennbedingungen .....	44
7.4.2	Auswertung von Agarose-Gelen .....	44
7.4.3	Isolierung von DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen .....	44
7.5	PCR-Methoden .....	44
7.5.1	Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette von pUG019 und Spectinomycin/Streptomycin-Kassette aus pIJ778 .....	45
7.5.2	Bedingungen zur Amplifikation der (His) <sub>6</sub> -Tag-Apramycin-Kassette mittels Double-joint-PCR .....	45
7.5.3	PCR-Amplifikation und Klonierung des Gens <i>clon6</i> .....	46
7.6	Southern Hybridisierung .....	48
7.6.1	Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde .....	48
7.6.2	Southern Blot .....	49
7.6.3	Hybridisierung, Detektion und Stripping .....	49
7.7	Transformation und Elektroporation von DNA in <i>E. coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 .....	50
7.7.1	CaCl <sub>2</sub> -vermittelte Transformation in <i>E. coli</i> .....	50
7.7.2	Elektroporation in <i>E. coli</i> .....	50
7.7.3	Elektroporation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 .....	51
7.8	Transformation und Konjugation von DNA in Streptomycceten .....	51
7.8.1	PEG-abhängige Protoplastentransformation .....	51
7.8.2	Konjugation von DNA in Streptomycceten .....	52
7.9	DNA-Sequenzierung und computerunterstützte Sequenzanalyse .....	53
<b>8.</b>	<b>Methoden der Biochemie und Biologie .....</b>	<b>53</b>

8.1	Heterologe Expression von Proteinen.....	54
8.1.1	Expression in <i>E. coli</i> XL1Blue MRF' und <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pLysS....	54
8.1.2	Expression in <i>Streptomyces lividans</i> T7 .....	54
8.1.3	Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 .....	55
8.2	Rohextraktherstellung .....	55
8.3	Reinigung von Fusionsproteinen .....	56
8.3.1	Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie .....	56
8.3.2	Reinigung von Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteinen .....	56
8.4	Bestimmung der Amidsynthetase-Aktivität.....	56
8.5	Bestimmung der antimikrobiellen, gyrasehemmenden und zytotoxischen Aktivitäten.....	57
8.5.1	Reporter-Gene-Assay.....	57
8.5.2	Supercoiling- und Triplex-Assay .....	57
8.5.3	ATPase-Assay.....	58
8.5.4	Bioassay mit <i>Bacillus subtilis</i> .....	58
8.5.5	MIC-Bestimmung .....	58
8.5.6	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität.....	59
8.5.7	Bestimmung der Bindungsenergien.....	59
<b>9.</b>	<b>Konstruktion der Deletionsmutanten .....</b>	<b>60</b>
9.1.1	Austausch der Ampicillin-Resistenzkassette in den Cosmiden 10-9c und clo-CA1 .....	60
9.1.2	Inaktivierung von <i>novQ</i> .....	61
9.1.2.1	Inaktivierung in <i>S. spheroides</i> .....	61
9.1.2.2	Inaktivierung von <i>novQ</i> im Cosmid nov-BG1 und heterologe Expression.....	61
9.1.3	Inaktivierung von <i>cloL</i> .....	62
9.1.4	Inaktivierung von <i>cloQ</i> im Cosmid clo-CA3 und heterologe Expression in <i>S. coelicolor</i> .....	63
9.2	Insertion eines (His) <sub>6</sub> -Tags vor das Gen <i>cloN6</i> im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression in <i>S. coelicolor</i> .....	63
<b>10.</b>	<b>Fütterungsexperimente mit synthetischen Ring A-Analoga .....</b>	<b>64</b>
10.1	Einstufige Fütterungen.....	64
10.2	Zweistufige Fütterungen .....	64
<b>11.</b>	<b>Chemische Synthese von Novenamin .....</b>	<b>65</b>
<b>12.</b>	<b>Analytik und Isolierung niedermolekularer Verbindungen .....</b>	<b>66</b>
12.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	66
12.2	Analytik von Clorobiocin und seinen Derivaten .....	66
12.3	Analytik von Novobiocin und seinen Derivaten.....	67
12.4	Analytik von Novobiocinsäure und seiner Derivate .....	67
12.5	Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika .....	68
12.5.1	Extraktion aus Zellkulturen.....	68
12.5.2	Säulenchromatographie.....	68
12.5.3	Präparative HPLC-Reinigung .....	68
12.6	Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.....	68
12.6.1	Massenspektrometrie (MS).....	68
12.6.2	LC-MS-Analyse.....	69
12.6.3	Kernresonanzspektroskopie (NMR) .....	69
<b>III</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>

<b>1. Biosynthese der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins – Versuche zur Expression der Methyltransferase CloN6 .....</b>	<b>70</b>
1.1 Einleitung .....	70
1.2 Versuche zur Überexpression von CloN6 .....	71
1.2.1 Klonierung der Expressionskonstrukte und Überexpressionsversuche in <i>Escherichia coli</i> .....	71
1.2.1.1 Klonierung in pQE70 und Durchführung von Überexpressionsversuchen .....	71
1.2.1.2 Klonierung in pRSET B und Durchführung von Überexpressionsversuchen .....	71
1.2.1.3 Klonierung in pQE31 und pHis8 und Durchführung von Überexpressionsversuchen .....	72
1.2.1.4 Durchführung von Überexpressionsversuchen mit GST- bzw. Trx- Tag .....	74
1.2.2 Überexpressionsversuche von CloN6 in <i>Streptomyces lividans</i> T7 und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	75
1.3 Insertion eines (His) <sub>6</sub> -Tags vor das Gen <i>cloN6</i> .....	76
1.3.1 Insertion des (His) <sub>6</sub> -Tags vor <i>cloN6</i> im Cosmid clo-BG1 .....	76
1.3.2 Analyse der Sekundärstoffproduktion .....	79
1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsversuche der Methyltransferase CloN6 .....	79
<b>2. Herstellung neuer Aminocoumarin-Antibiotika .....</b>	<b>80</b>
2.1 Einleitung .....	80
2.2 Herstellung neuer Novobiocin-Derivate .....	81
2.2.1 Enzymatische Synthese .....	81
2.2.1.1 Synthese und Strukturaufklärung von Novenamin .....	81
2.2.1.2 Amidsynthetase-Assays mit Novenamin .....	82
2.2.2 Herstellung neuer Novobiocin-Derivate durch Mutasynthese .....	83
2.2.2.1 Herstellung einer <i>novQ</i> -Defektmutante .....	83
2.3 Herstellung neuer Clorobiocin-Derivate durch Mutasynthese .....	88
2.3.1 Inaktivierung von <i>cloL</i> in <i>Streptomyces roseochromogenes</i> QDCO661 89	89
2.3.2 Inaktivierung von <i>cloQ</i> und <i>cloL</i> in clo-BG1 und heterologe Expression in <i>Streptomyces coelicolor</i> M512 .....	89
2.3.3 Fütterungskontrolle der Mutanten .....	90
2.3.4 Klonierung der Amidsynthetase-Gene <i>couL</i> und <i>simL</i> in pUWL201 und Transformation in <i>Streptomyces coelicolor</i> (clo-CA5) .....	92
2.3.5 Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums bei Mutasynthese Experimenten .....	92
2.3.6 Fütterung verschiedener Ring A-Analoga an die Mutanten <i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i> (clo-CA5)/pSH2 und <i>Streptomyces coelicolor</i> (clo-CA5)/pMS91 ...	94
2.3.7 Identifizierung der produzierten Clorobiocin-Derivate .....	95
2.3.8 Identifizierung neuer, „natürlicher“ Derivate .....	99
2.3.9 Erweiterung: Amidsynthetase-Assays und Fütterung von vorgeschlagenen Ring A-Analoga .....	102
2.4 Herstellung von Hybrid-Aminocoumarin-Antibiotika durch Mutasynthese .....	103
2.4.1 Einleitung .....	103
2.4.2 Herstellung der Novobiocin-Mutante: Inaktivierungen von <i>novQ</i> und heterologe Expression in <i>Streptomyces coelicolor</i> M512 .....	104
2.4.3 Durchführung von zweistufigen Fütterungen .....	106
2.4.4 Identifizierung neuer Hybrid-Aminocoumarine .....	107

2.4.4.1	Erweiterung der zweistufigen Fütterungen durch die Nutzung von fremden Amidsynthetasen .....	110
2.4.4.2	Zusammenfassung der resultierenden Produkte der zweistufigen Fütterungen .....	111
2.5	Untersuchung der Aktivitäten der neuen Aminocoumarin-Antibiotika....	112
2.5.1	Einleitung.....	112
2.5.2	Untersuchung des Wirkungsmechanismus der neuen Derivate durch Reporter-Gene-Assays .....	113
2.5.3	Untersuchung der gyraseinhibitorischen Aktivität der neuen Derivate	115
2.5.4	Vergleich der gyraseinhibitorischen Aktivität mit berechneten Bindungsenergien .....	116
2.5.5	Antibakterielle Aktivität der „natürlichen“ Derivate gegen <i>Bacillus subtilis</i> .....	118
2.5.6	Minimal inhibitorische Konzentration (MIC) der neuen Derivate gegenüber klinisch relevanten Mikroorganismen.....	118
2.5.7	Toxizität der neuen Derivate gegenüber eukaryontischen Zellen.....	121
<b>IV</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>123</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungen zur Methyltransferase CloN6 .....</b>	<b>123</b>
<b>2.</b>	<b>Herstellung neuer Aminocoumarine .....</b>	<b>125</b>
2.1	Herstellung von Novobiocin-Analoga .....	125
2.1.1	Herstellung neuer Novobiocin-Analoga durch eine biochemische Methode .....	125
2.1.2	Herstellung von neuen Novobiocin-Analoga durch Mutasyntese .....	126
2.2	Herstellung von Clorobiocin-Derivaten und Hybrid-Aminocoumarin-Antibiotika .....	127
2.2.1	Neue „natürliche“ Derivate auf Basis von 4-Hydroxyzimtsäure.....	129
<b>3.</b>	<b>Bioaktivitäten der neuen Derivate.....</b>	<b>130</b>
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>133</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>136</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>148</b>
<b>1.</b>	<b>Tryptischer Verdau und LC-MS-Analyse des exprimierten CloN6-Fragmentes .....</b>	<b>148</b>
<b>2.</b>	<b>Nomenklatur der Novclobiocine.....</b>	<b>149</b>
<b>3.</b>	<b><sup>1</sup>H NMR-Spektren sowie <sup>1</sup>H NMR-Daten der Produkte aus der Novenaminherstellung.....</b>	<b>151</b>
<b>4.</b>	<b>MS- und <sup>1</sup>H NMR-Spektren sowie <sup>1</sup>H NMR-Daten von Novobiocinsäure</b>	<b>153</b>
<b>5.</b>	<b>MS- und <sup>1</sup>H NMR-Spektren der neuen Novclobiocine aus einstufiger und zweistufiger Fütterung.....</b>	<b>155</b>
<b>6.</b>	<b><sup>1</sup>H NMR-Daten der Produkte der neuen Novclobiocine aus einstufiger und zweistufiger Fütterung.....</b>	<b>192</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>199</b>
<b>VIII</b>	<b>Akademische Lehrer.....</b>	<b>200</b>
<b>IX</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>201</b>

## Abkürzungen

<i>aac(3)IV</i>	Apramycin-Resistenz
Abb.	Abbildung
ACP	Acylcarrierprotein
Arg	Arginin
AMP	Ampicillin
Apra	Apramycin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CSPD	Chemilumineszenzsubstrat
bp	Basenpaare
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CoA	Coenzym A
comp.	compound
d	Durchmesser
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxynucleosiddiphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
FAB	Fast atom bombardment
FLP	FLP-Rekombinase
FRT	FLP Erkennungssite
g	Gramm
gef.	gefüttert
GC-Gehalt	Gehalt an Guanosin und Cytosin
GST	Glutathion-S-Transferase
GyrB	Gyrase B Untereinheit
h	Stunde
(His) <sub>6</sub>	Hexahistidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Herz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
k	Kilo
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
l	Liter

## Abkürzungen

---

LB	Luria-Bertani
<i>lacZ'</i> $\alpha$	$\beta$ -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
Lsg.	Lösung
m	milli
M	molar
Mb	Megabasenpaar
min	Minute(n)
$M_r$	Molekulargewicht
MS	Massenspektroskopie
MW	Molekulargewicht
n	nano
n.b.	nicht bestimmbar
n.d.	nicht detektierbar
Neo	Neomycin
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
p	pico
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
$R$	Resistenz
RNase	Ribonuklease
RP	reversed phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RAA	Ring A-Analagon
Ring A	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure
Ring B	3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin
Ring C	substituierte Noviose
R.st	Restriktionsschnittstelle
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
$s$	Sensitivität
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tertamethylethylendiamin
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
Tris-Maleat	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-maleat
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

## Abkürzungen

---

v	Volumen
w	Gewicht
WT	Wildtyp
g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
$\mu$	mikro
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

# I Einleitung

## 1. Streptomyceten – Produzenten von Antibiotika

Die Gattung *Streptomyces* ist durch ihre Produktion von Sekundärstoffen für die Arzneistoffforschung von großem Interesse. Streptomyceten und nahverwandte Gattungen produzieren mehr als 50% der 200 kommerziell verfügbaren Antibiotika (Perronne *et al.*, 1987). Daneben wurden weitere Sekundärstoffe aus dieser Gattung isoliert, die zytostatisch, antimykotisch, virustatisch oder herbizid wirken (Perronne *et al.*, 1987).

Streptomyceten sind ubiquitär vorkommende Gram-positive Bodenbakterien. Sie gehören der Klasse der Actinomyceten an. Durch ihre Fähigkeit zur morphologischen Differenzierung passen sie sich gut an die wechselnden Bedingungen ihres Lebensraumes an. Bei einem nährstoffreichen Boden bilden sie filamentöse Substratmycelien aus, aus denen sich bei schlechteren Bedingungen ein Luftmycel entwickelt. Durch Abgliederung entstehen anschließend Sporen, die wiederum bei verbesserten Bedingungen zum Substratmycel auskeimen können (Chater, 1998; Chater, 2006). Das Genom der Streptomyceten ist mit einer Größe von 8-10 Mb im Vergleich zu anderen gut untersuchten Mikroorganismen wie *Escherichia coli* außergewöhnlich groß und weist einen sehr hohen GC-Gehalt von >70% auf (Bentley *et al.*, 2002). Die Gene, die zur Biosynthese eines bestimmten Antibiotikums benötigt werden, liegen im Genom der Streptomyceten wie auch im Genom vieler weiterer Mikroorganismen geclustert vor, d.h. auf einem zusammenhängenden Abschnitt im Genom.

Fundierte Kenntnisse liegen über das Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2) vor. Das Genom dieses Stammes wurde vollständig sequenziert (Genomgröße: 8,7 Mb; GC-Gehalt: 72,1%) (Bentley *et al.*, 2002). Interessanterweise konnten innerhalb dieses Genoms 24 mögliche Biosynthesegencluster für Sekundärstoffe gefunden werden (Bentley *et al.*, 2002; Lautru *et al.*, 2005). Dies zeigt deutlich, dass Streptomyceten zur Produktion von mehreren unterschiedlichen Sekundärstoffen fähig sind, was auch durch die experimentellen Daten gestützt wird. Bei *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurde die Produktion von Prodigiosin, Actinorhodin, einem calciumabhängigen Antibiotikum (CDA) und von Methylenomycin experimentell nachgewiesen. Dies zeigt, dass unter typischen Laborbedingungen nicht alle möglichen Sekundärstoffe gebildet werden.

Die Tatsache, dass sehr viele klinisch angewendete Antibiotika aus Streptomyceten stammen, machen die Streptomyceten auch für die Entwicklung neuer Antibiotika zu einer der interessantesten Gattungen.

## 2. Aminocoumarin-Antibiotika

Die Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> sind strukturell eng verwandt. Novobiocin wurde unter dem Namen Streptonivicin Mitte der 1950er Jahre entdeckt (Hoeksema *et al.*, 1955; Smith *et al.*, 1956). Es wird von den Stämmen *Streptomyces niveus* (Smith *et al.*, 1956) und *Streptomyces spheroides* (Berger und Batcho, 1978) gebildet, wobei jedoch die Vermutung vorliegt, dass diese zwei Stämme unabhängige Isolate des gleichen Stamms sind (Lanoot *et al.*, 2002).

Clorobiocin wurden dagegen erst Anfang der 1970er Jahre entdeckt (Ninet *et al.*, 1972). Es wird von *Streptomyces roseochromogenes* var. *oscitans*, *S. albocinerescens* und *S. hygrosopicus* produziert (Mancy *et al.*, 1974; Ninet *et al.*, 1972). Mitte der 1960er Jahre wurde erstmals die Produktion von Coumermycin A<sub>1</sub> bei *Streptomyces rishiriensis* beschrieben (Kawaguchi *et al.*, 1965). Dieses Produkt wurde außerdem bei verschiedenen Stämmen, wie *S. hazeliensis* var. *hazeliensis*, *S. spinichromogenes* und *S. spinicoumarensis*, beobachtet (Berger und Batcho, 1978).

Außerdem wurden neben den „klassischen“ Aminocoumarinen zwei weitere Aminocoumarin-Antibiotika identifiziert. Simocyclinon D8 (Holzenkämpfer *et al.*, 2002; Schimana *et al.*, 2000) produziert durch *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 und Rubradirin (Bhuyan *et al.*, 1965; Sohng *et al.*, 1997) produziert durch *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061.

### 2.1 Struktur der Aminocoumarine

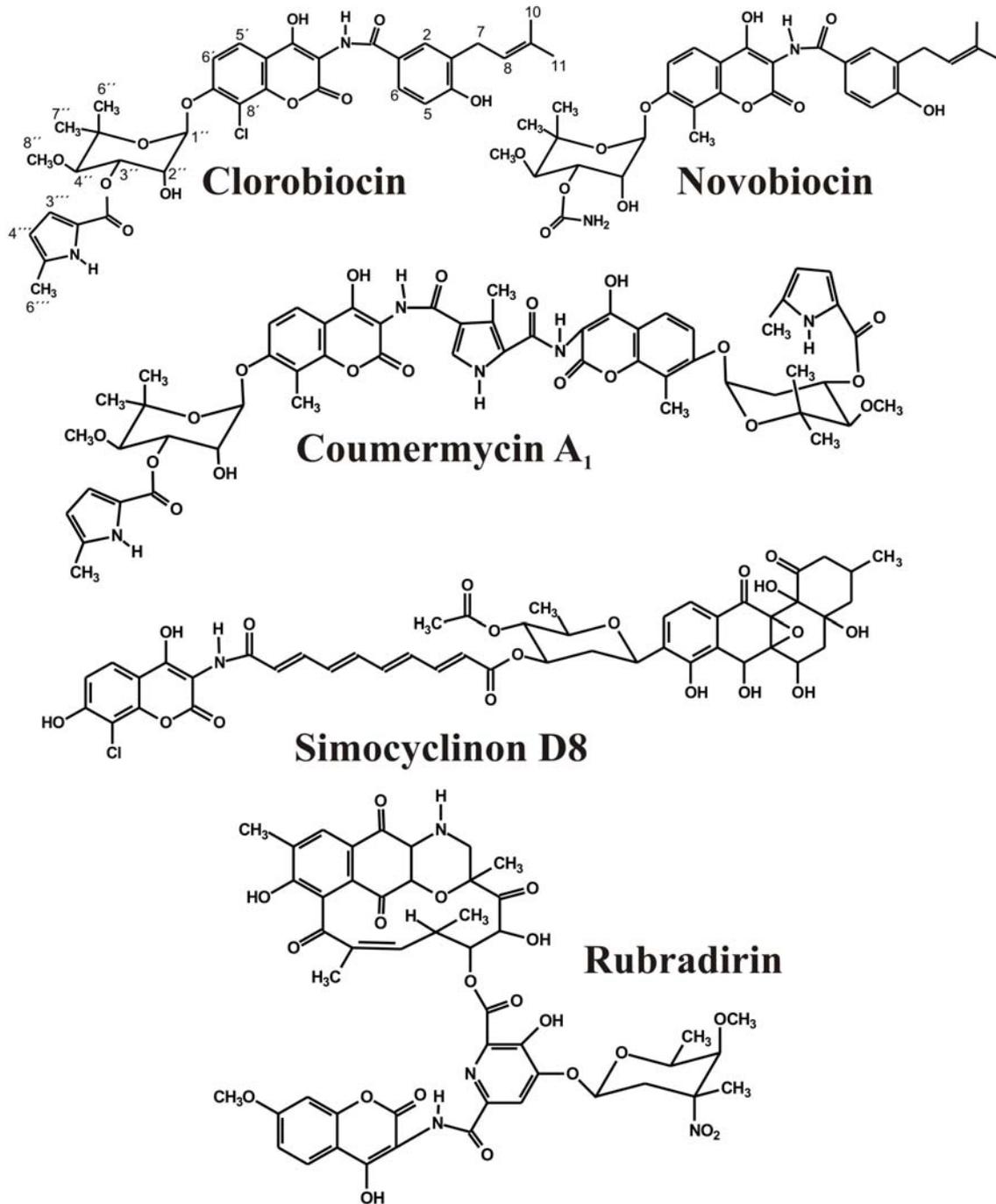
Die Strukturen der Aminocoumarine Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> sind charakterisiert durch einen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinteil (=Ring B), der an Position 7' O-glykosidisch mit einem substituierten Desoxyzucker (=Ring C) verknüpft ist (Abb. I.1). Die Position 8' des Aminocoumarin-Rings ist bei Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> chloriert, während Novobiocin an dieser Stelle eine Methylgruppe trägt.

Die Position 3' des Aminocoumarin-Rings ist mit einer Acylkomponente verknüpft. Novobiocin und Clorobiocin tragen als Acylkomponente eine 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (=Ring A), während Coumermycin A<sub>1</sub> eine 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure aufweist. Die Säuregruppen der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure sind mit zwei 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Gruppen verknüpft, die wiederum einen substituierten Desoxyzucker tragen.

Der Desoxyzucker trägt bei Novobiocin an Position 3'' eine Carbamoylgruppe. Im Fall von Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> ist der Desoxyzucker an dieser Position mit einer 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure verestert.

Die Strukturen der Aminocoumarine Simocyclinon D8 und Rubradirin weisen, wie die bereits beschriebenen Aminocoumarine, einen 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinteil auf (Abb. I.1). Die Position 8' ist im Fall von Simocyclinon chloriert während diese Position bei Rubradirin unsubstituiert ist. Die Acylkomponente an Position 3' des Aminocoumarin-Rings ist in beiden Molekülen deutlich größer und komplizierter als bei Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub>. In Rubradirin ist die Acylkomponente eine Dihydroxydipepecolinsäure, die mit einem 2,6-Didesoxynitrozucker und einem Ansamakrolidring verbunden ist. In Simocyclinon D8 besteht die Acylkomponente aus einem Angocyclinon-Ringsystem, das an C-9 C-glykosidisch mit dem an der 4-OH-Gruppe acetylierten Desoxyzucker  $\beta$ -D-Oliviose

verknüpft ist. Die Hydroxygruppe an Position 3' des Desoxyzuckers trägt außerdem noch eine Octatetraendicarbonsäure. Die Position 7' des Aminocoumarin-Rings weist bei beiden Substanzen, im Gegensatz zu den „klassischen“ Aminocoumarinen, einen Desoxyzucker auf.



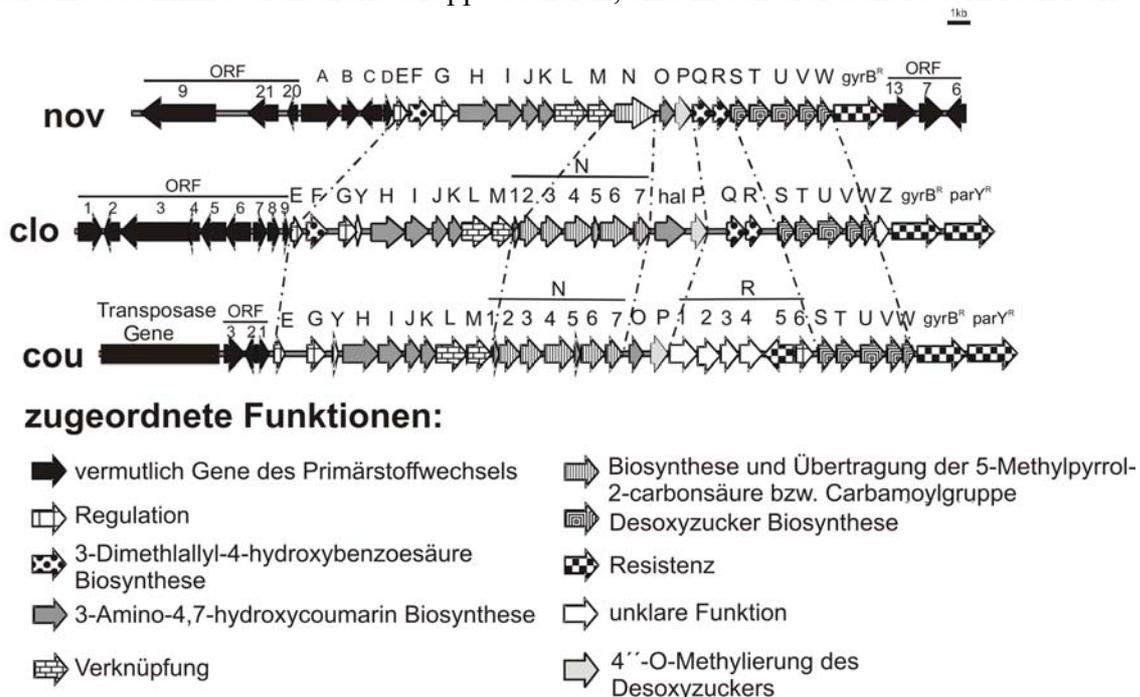
**Abbildung I.1:** Strukturen der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin, Coumermycin A<sub>1</sub>, Simocyclinon D8 und Rubradirin.

## 2.2 Biosynthese der Aminocoumarine

Die Untersuchung der Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika begann in den 1960er Jahren. Durch Fütterungsversuche mit isopenmarkierten Vorstufen wurden erste Erkenntnisse über die Biosynthese gewonnen. <sup>14</sup>C-Fütterungsversuche von Birch

*et al.* zeigten, dass der Desoxyzucker aus intakter Glucose entsteht (Birch *et al.*, 1962). Tyrosin wurde als Vorstufe des Aminocoumarin-Rings als auch der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure bestimmt (Bunton *et al.*, 1963). Fütterung mit  $^{18}\text{O}$ -markiertem Tyrosin wiesen darauf hin, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarin-Rings von der Carboxylgruppe des Tyrosins stammt (Bunton *et al.*, 1963). Jedoch wurde diese Zuordnung durch Untersuchungen von Holzenkämpfer *et al.* widerlegt (Holzenkämpfer und Zeeck, 2002). In diesen Experimenten konnte für die Simocyclinone der D-Reihe gezeigt werden, dass der Ringsauerstoff aus molekularem Sauerstoff stammt. Hinweise auf die Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure konnten mittels Fütterungsexperimenten mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose erhalten werden. Diese zeigten, dass die Dimethylallylseitenkette von Ring A vom Methylerythritol-Phosphat-Weg (= nicht-Mevalonat-Weg) stammt (Li *et al.*, 1998), was auch durch die Beobachtungen von Orihara *et al.* bestätigt wurde (Orihara *et al.*, 1998). Die Fütterung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem L-Prolin zu einem Coumermycin  $\text{A}_1$  Produzenten zeigte, dass sowohl die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure als auch die zentrale 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure Gruppe Radioaktivität aufwiesen (Scannell und Kong, 1969). Es konnte somit nicht zwischen diesen Einheiten unterschieden werden.

Die Biosynthese der Aminocoumarine wurde mit Hilfe von Mutanten weiter untersucht. Queener *et al.* zeigte, dass die Amidbindung von Ring A und Ring B vor der Verknüpfung auf Ring C erfolgt (Queener *et al.*, 1978). Eine genauere und gezielte Untersuchung der Biosynthese wurde jedoch erst durch die Klonierung und Sequenzierung der Biosynthesecluster von Novobiocin aus *S. spheroides* NCIMB 11981 (Steffensky *et al.*, 2000b), Clorobiocin aus *S. roseochromogenes* var. *oscitans* DS 12.976 (Pojer *et al.*, 2002) und Coumermycin  $\text{A}_1$  aus *S. rishiriensis* DSM 40489 (Wang *et al.*, 2000) ermöglicht. Der Vergleich der drei Cluster zeigte, dass bei allen drei Aminocoumarinen die strukturelle Ähnlichkeit auch zur Ähnlichkeit ihrer Biosynthesecluster führt (Abb. I.2). Die Organisation und Anordnung der Gene, die für eine bestimmte strukturelle Gruppe codieren, sind in den drei Genclustern identisch.



**Abbildung I.2:** Schematische Darstellung der Biosynthesecluster von Novobiocin (nov), Clorobiocin (clo) und Coumermycin  $\text{A}_1$  (cou) (Li und Heide, 2004).

### 2.2.1 Resistenzgene

Um sich vor dem produzierten Aminocoumarin zu schützen, weisen alle drei Gencluster Gene auf, die für Resistenz des *Streptomyces* Stammes sorgen. Für *S. spheroides* wurde berichtet, dass der Resistenzmechanismus gegen die Aminocoumarine auf der Synthese einer Coumarin-resistenten Gyrase B Untereinheit beruht (Thiara und Cundliffe, 1988; Thiara und Cundliffe, 1989; Thiara und Cundliffe, 1993).

*gyrB<sup>R</sup>*, ein Gen, das für eine resistente Gyrase B Untereinheit codiert, ist in allen drei Clustern zu finden. Ein zweites Gen, *parY<sup>R</sup>*, konnte in den Biosynthesegenclustern von Clorobiocin und Coumermycin nachgewiesen werden. ParY<sup>R</sup> zeigt Sequenzähnlichkeit mit der B-Untereinheit von Typ II Topoisomerasen. Durch Expression von GyrB<sup>R</sup> und ParY<sup>R</sup> in *S. lividans* konnte gezeigt werden, dass diese zwei Proteine Resistenz gegenüber Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> verleihen (Schmutz *et al.*, 2004). Durch zusätzliche Expression der korrespondierenden Einheiten GyrA und ParX und anschließende biochemischer Untersuchung zeigte sich, dass GyrA zusammen mit GyrB<sup>R</sup> die DNA-Überspiralisierung und ParY<sup>R</sup> im Komplex mit ParX die DNA-Entkettung und Relaxation katalysiert, was typisch für Topoisomerasen IV ist (Schmutz *et al.*, 2003a).

### 2.2.2 Regulatorgene

In den drei Biosynthesegenclustern sind jeweils die Gene *novE/cloE/couE* und *novG/cloG/couG* vorhanden, die Sequenzähnlichkeiten mit Regulatorgenen aufweisen. Durch Inaktivierung von *novE* konnte gezeigt werden, dass NovE keine katalytische Funktion in der Biosynthese von Novobiocin aufweist, aber eine positive Regulatorfunktion hat (Eustáquio *et al.*, 2003b). Inaktivierung von *novG* führte zu einer um 98% geringeren Novobiocinproduktion. Dagegen resultierte die Überexpression von NovG zu einer 3-fachen Produktionssteigerung (Eustáquio *et al.*, 2005b). NovG ist ebenso wie NovE ein positiver Regulator der Novobiocinproduktion.

### 2.2.3 Gene der Biosynthese der Acylkomponente

Die Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) wurde umfassend von Pojer *et al.* aufgeklärt (Pojer *et al.*, 2003b; Pojer *et al.*, 2003a). Im Cluster von Clorobiocin und Novobiocin kommen drei Gene vor, *novF/cloF*, *novQ/cloQ* und *novR/cloR*, die nicht im Coumermycin-Biosynthesegencluster enthalten sind. Inaktivierungsexperimente zeigten, dass *cloR* und *cloQ* essentiell für die Biosynthese von Ring A sind.

Die Vorstufe dieser Acylkomponente ist 4-Hydroxyphenylpyruvat (Pojer *et al.*, 2003b), nicht wie von Bunton *et al.* (Bunton *et al.*, 1963) vermutet L-Tyrosin. 4-Hydroxyphenylpyruvat wird in einem weiteren Biosyntheseschritt von CloQ, einer Prenyltransferase, zu 3-Dimethylallyl-4-hydroxyphenylpyruvat umgewandelt (Abb. I.3). CloR, eine bifunktionale non-heme Eisenoxxygenase, überführt dieses Zwischenprodukt in zwei aufeinander folgenden Schritten in 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure.

*cloF/novF* zeigen Sequenzähnlichkeit mit Prephenatdehydrogenasen, welche Prephenat in 4-Hydroxyphenylpyruvat umwandeln. Deshalb ist zu vermuten, dass auch dieses Gen an der Biosynthese der Acylkomponente beteiligt ist.

Im Coumermycin-Biosynthesegencluster befinden sich an der gleichen Stelle die Gene *couR1-R4*. Es wird vermutet, dass die Genprodukte dieser Gene an der Biosynthese der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure beteiligt sind. Jedoch wurde dafür noch kein Nachweis erbracht.

### 2.2.4 Gene der Biosynthese des Aminocoumarin-Rings

Die Gene *nov/clo/couHIJK* codieren für Proteine der Biosynthese des Aminocoumarin-Rings. Durch intensive biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tyrosin durch NovH mittels einer Thioesterbindung mit dem 4'-Phosphopantetheinyl-Cofaktor aktiviert wird (Chen und Walsh, 2001). Dieses aktivierte Tyrosin wird anschließend durch das Enzym NovI, einem Cytochrom P450 Enzym, an  $\beta$ -Position hydroxyliert (Chen und Walsh, 2001). Das Heterotetramer  $\text{NovJ}_2\text{K}_2$  katalysiert in einem weiteren Schritt die Oxidation dieses  $\beta$ -Hydroxytyrosin zu  $\beta$ -Ketotyrosin (Pacholec *et al.*, 2005b) (Abb. I.3). Diese Funktionen der Gene lassen sich auf die entsprechenden Gene aus dem Coumermycin- bzw. Clorobiocincluster auf Grund der hohen Homologie übertragen.

Von Holzenkämpfer und Zeeck (2002) wurde nachgewiesen, dass der Ringsauerstoff des Aminocoumarin-Rings von Simocyclinon, welcher identisch mit dem Aminocoumarin-Ring von Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> ist, von molekularem Sauerstoff stammt und durch eine Monooxygenase eingeführt wird. Von Chen und Walsh (2001) wurde spekuliert, dass das Gen *novC*, welches „upstream“ von *novHIJK* im Novobiocincluster liegt, für diese Monooxygenase codiert. Allerdings liegen Zweifel vor, da in den Clustern von Clorobiocin und Coumermycin keine Homologe vorliegen und auch weitere Untersuchungen eine Beteiligung von NovC unwahrscheinlich erscheinen lassen (Eustáquio *et al.*, 2003b; Pojer *et al.*, 2002).

Auch die strukturellen Unterschiede an Position 8' des Aminocoumarin-Rings der verschiedenen Aminocoumarine spiegeln sich in den Genclustern wieder. Clorobiocin weist an dieser Stelle ein Chloratom auf, während Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> eine Methylgruppe tragen. Im Cluster von Clorobiocin findet sich dementsprechend ein Gen *clo-hal*, das für eine Halogenase codiert (Eustáquio *et al.*, 2003a). Bisher ist allerdings ungeklärt, ob das Substrat dieser Halogenase der Aminocoumarin-Ring, eine Vorstufe davon oder das Produkt aus Aminocoumarin-Ring und 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure ist.

An der gleichen Stelle im Cluster befindet sich im Fall von Novobiocin und Coumermycin das Gen *novO* bzw. *couO*, das für eine Methyltransferase codiert (Li *et al.*, 2002). Untersuchungen zeigten, dass das Substrat dieser Methylierung nicht wie früher vermutet der Aminocoumarin-Ring bzw. eine Vorstufe davon ist, sondern das Produkt aus Aminocoumarin-Ring und 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure bzw. 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (Pacholec *et al.*, 2005c).

### 2.2.5 Gene der Biosynthese des Desoxyzuckers

Für die Biosynthese des Desoxyzuckers, der bei allen drei Aminocoumarinen ein gemeinsames Strukturelement ist, codieren die fünf Gene *nov/clo/couSTUVW*, die durch ihre Sequenzähnlichkeit zu bekannten Genen von Desoxyzuckern identifiziert werden konnten und in allen drei Clustern vorkommen (Pojer *et al.*, 2002; Steffensky *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 2000). Ein erster Funktionsnachweis wurde durch Inaktivierung von *novT* in *S. spheroides* durchgeführt. Die resultierende Mutante bildete nur noch das Aglykon Novobiocinsäure (Steffensky *et al.*, 2000b). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *cloU* für eine Methyltransferase codiert, die die axiale Methylgruppe an Position 5'' des Desoxyzuckers anbringt (Freitag *et al.*, 2006a). Auch erste biochemische Untersuchungen der Gene *novWUS* zeigen, dass diese Gene an der Biosynthese des Desoxyzuckers beteiligt sind (Thuy *et al.*, 2005).

#### 2.2.5.1 Gen zur 4''-O-Methylierung des Desoxyzuckers

Interessanterweise resultierte die Inaktivierung von *couP* in *S. rishiriensis* in der Bildung eines neuen Coumermycin-Derivates, bei dem die Methylgruppe an Position 4'' des Desoxyzuckers fehlte (Li *et al.*, 2002). Durch Überexpression wurde auch NovP als O-Methyltransferase identifiziert (Freel Meyers *et al.*, 2004). Auch die Inaktivierung von *cloP* führte zu 4''-Desmethylclorobiocin (Freitag *et al.*, 2005a). Bei dieser Inaktivierung trat jedoch ein weiteres interessantes Produkt auf. Dieses neue Aminocoumarin trug die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe, die normalerweise an Position 3'' bzw. an Position 2'' verknüpft ist, an Position 4''. Dies verdeutlicht, dass die 4''-O-Methylierung der 3''-O-Acylierung in der Biosynthese vorangeht.

#### 2.2.5.2 Gene der 3''-O-Acylierung des Desoxyzuckers

Ein charakteristisches strukturelles Merkmal des Clorobiocins und Coumermycins A<sub>1</sub> ist die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 3'' des Desoxyzuckers. An der gleichen Stelle besitzt Novobiocin eine Carbamoylgruppe. Durch biochemische Untersuchungen wurde das Gen *novN* als Carbamoyltransferase identifiziert, die diese Carbamoylgruppe mit dem Desoxyzucker des Novobiocins verknüpft (Freel Meyers *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004).

An der gleichen Position in den Genclustern von Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> befinden sich die Gene *clo/couN1-7*, welche für die Biosynthese der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe codieren. Erste Fütterungsexperimente von <sup>14</sup>C-markiertem L-Prolin zu einem Coumermycin A<sub>1</sub> Produzenten zeigten, dass die Biosynthese dieser Gruppe von L-Prolin ausgeht (Scannell und Kong, 1969). Durch Inaktivierungen konnte gezeigt werden, dass *couN3* und *couN4* in die Biosynthese involviert sind (Xu *et al.*, 2002). Jedoch ermöglichte erst die biochemische Untersuchung von CloN3, CloN4 und CloN5 eine genauere Aussage über die Biosynthese (Garneau *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen zeigten, dass L-Prolin durch CloN4 ATP-abhängig aktiviert wird (Abb. I.3). Das entstandene L-Prolyl-AMP wird auf das Acylcarrierprotein CloN5 übertragen. Beide Reaktionen werden durch CloN4 katalysiert. Durch anschließende Katalyse von CloN3 wird L-Prolyl-S-CloN5 zu L-Pyrrolyl-S-CloN5 oxidiert und zu Pyrrolyl-2-carboxyl-S-CloN5 umgewandelt (Garneau *et al.*, 2005). Durch biochemische

Untersuchung, Inaktivierungen und Fütterungsexperimente wurden kürzlich auch die Funktionen der Gene *cloN1*, *cloN2* und *cloN7* aufgeklärt (Anderle *et al.*, 2007; Freitag *et al.*, 2005c; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a; Xu *et al.*, 2003). CloN1 konnte als weiteres Acylcarrierprotein identifiziert werden (Anderle *et al.*, 2007; Freitag *et al.*, 2005c; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a). Die Inaktivierung von *cloN2* führte zu Aminocoumarinen, denen die Pyrrolgruppe an Position 3'' des Desoxyzuckers fehlte (Xu *et al.*, 2003). Zufütterung eines Analogons dieser Pyrrolgruppe zu der *cloN2*-Defektmutante zeigte jedoch, dass der Transfer auf den Desoxyzucker noch funktionierte, was bedeutet, dass CloN2 für die Acyltransferase codiert, die Pyrrolyl-2-carboxyl-*S*-CloN5 auf das Acylcarrierprotein CloN1 überträgt (Anderle *et al.*, 2007). CloN7 wurde als die Acyltransferase identifiziert, die die Pyrrolgruppe auf den Desoxyzucker überträgt (Anderle *et al.*, 2007; Freitag *et al.*, 2005c; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a).

Inaktivierung von *cloN6* im Wildtypstamm führte zu einem Produkt, das zwar eine Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe am Desoxyzucker aufwies, an der aber die charakteristische Methylgruppe an Position 5''' fehlte (Westrich *et al.*, 2003). Somit konnte durch die Inaktivierung gezeigt werden, dass *cloN6* für diese Methyltransferase codiert. Allerdings war bisher unklar, ob diese Methylierung vor oder nach der Übertragung auf den Desoxyzucker stattfindet.

Die Funktionen der Gene *cloN1-7* lassen sich auch auf die entsprechenden Gene *couN1-7* übertragen.

### 2.2.6 Gene für die Verknüpfung

Der erste Schritt zur Bildung eines Aminocoumarins ist die Verknüpfung der Acylkomponente mit dem Aminocoumarin-Ring. Das entstehende Produkt trägt im Fall von Novobiocin die Bezeichnung Novobiocinsäure, entsprechend bei Clorobiocin Clorobiocinsäure (Abb. I.3). Bei Coumermycin werden dagegen zwei Aminocoumarin-Ringe über zwei Amidbindungen mit der zentralen 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure verbunden. Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NovL, CloL bzw. CouL diese Reaktionen katalysieren (Galm *et al.*, 2004a; Schmutz *et al.*, 2003b; Steffensky *et al.*, 2000b).

Der Desoxyzucker wird anschließend durch die Glykosyltransferase NovM, auf die 7'-OH-Gruppe des Aminocoumarin-Rings übertragen (Albermann *et al.*, 2003; Freel Meyers *et al.*, 2003). Für CloM bzw. CouM wird dieselbe Reaktion vermutet.

Eine Übersicht der Biosynthese von Clorobiocin ist in Abbildung I.3 gezeigt.

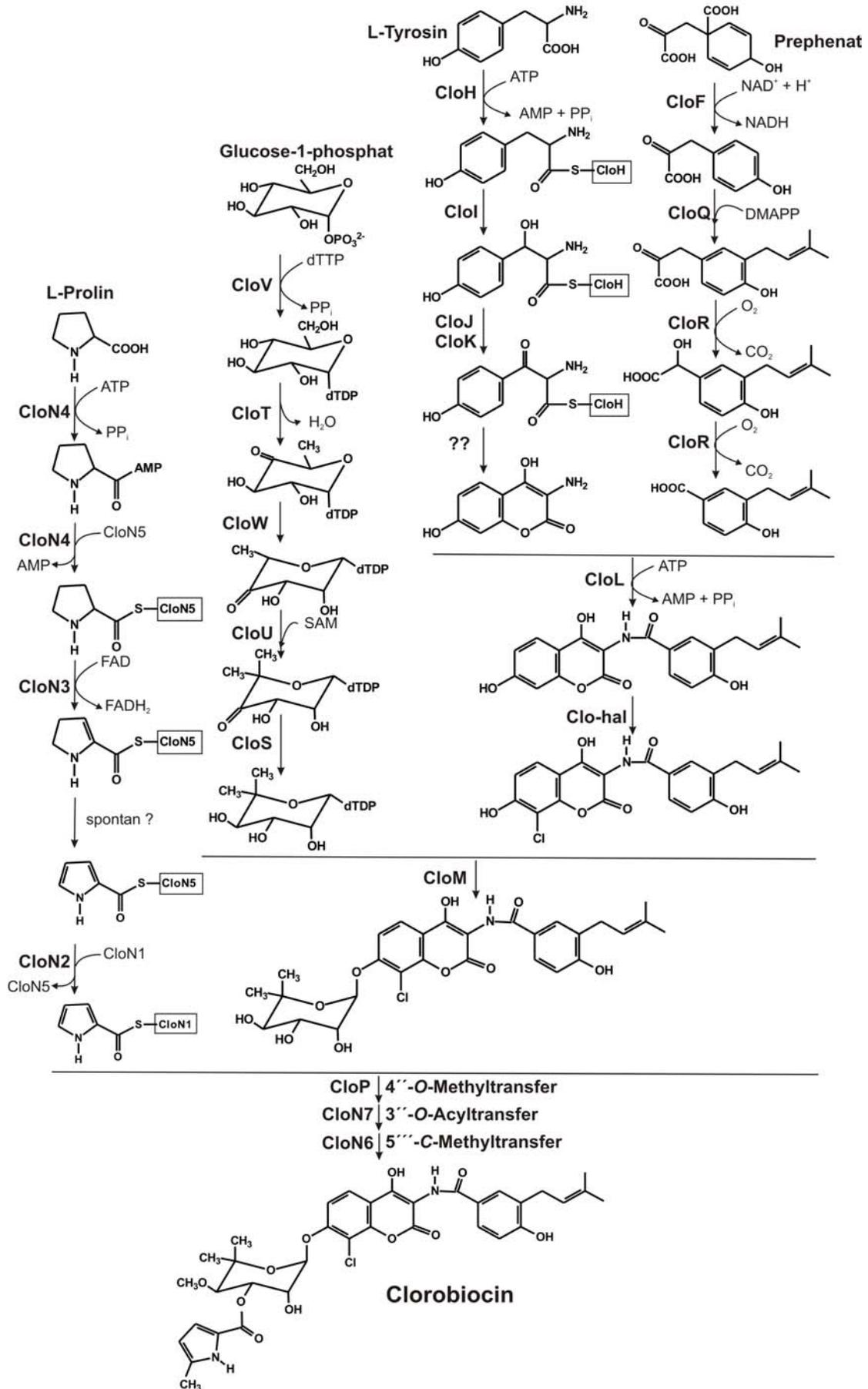


Abbildung I.3: Biosyntheseweg von Clorobiocin.

### 2.3 Wirkungsmechanismus der Aminocoumarine

Die Aminocoumarine sind potente Inhibitoren der bakteriellen Gyrase. Die DNA-Gyrase gehört zur Klasse der Typ II Topoisomerasen, die in allen Zellen vorkommt. Sie sind zuständig für die Transkription, Rekombination und Replikation der DNA. Da die DNA-Gyrase nur in prokaryontischen Zellen vorkommt, bildet sie ein ausgezeichnetes Ziel als Angriffspunkt für Antibiotika. Die DNA-Gyrase besteht aus zwei Untereinheiten GyrA und GyrB, die zur Bildung des aktiven Proteinkomplexes einen A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Komplex bilden. Die Aufgabe der Gyrase besteht darin, ATP-abhängig negative Supercoils in doppelsträngiger DNA einzuführen. Besonders gut untersucht ist die DNA-Gyrase von *Escherichia coli*. Die GyrA-Untereinheit von *E. coli* ist ein 97 kDa großes Protein. Die N-terminale Domäne dieser GyrA-Untereinheit ist am DNA-Strangbruch und an dessen Wiedervereinigung involviert, während die C-terminale Domäne an der Protein-DNA-Interaktion beteiligt ist. Die GyrB-Untereinheit weist ebenso eine N- und eine C-terminale Domäne auf. Die N-terminale Domäne trägt die ATPase Aktivität während die C-terminale Domäne an den Interaktionen mit dem A-Protein und der DNA beteiligt ist (Maxwell, 1997; Maxwell, 1999).

Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> greifen an der B-Untereinheit der bakteriellen Gyrase an, indem sie mit ATP um die Bindung an diese Untereinheit konkurrieren. Durch Röntgenstrukturanalysen konnte gezeigt werden, dass der Aminocoumarin-Ring und der substituierte Desoxyzucker essentiell für die Bindung an die B-Untereinheit der Gyrase ist (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997). Bei Novobiocin spielen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Asp73 und der Carbamoylgruppe des Desoxyzuckers und Asn46 und der 2''-OH-Gruppe des Desoxyzuckers eine wichtige Rolle (Lewis *et al.*, 1996a). Bei Clorobiocin verdrängt die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe zwei koordinierte Wassermoleküle aus der hydrophoben Tasche, was in einer höheren Affinität zur Gyrase B-Untereinheit resultiert. Der Aminocoumarin-Ring interagiert mit Arg 136 und trägt damit zur Affinität bei. Die Substitution an Position 8' des Aminocoumarin-Rings scheint auch zur Bindung an die B-Untereinheit beizutragen. Aminocoumarine mit einem Chloratom zeigten eine höhere biologische Aktivität wie die gleichen Produkte mit einer Methylgruppe an dieser Position (Eustáquio *et al.*, 2003a). Die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure Gruppe von Novobiocin und Clorobiocin trägt durch hydrophobe Wechselwirkungen nur wenig zur Aktivität bei (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a; Tsai *et al.*, 1997). Auch die durch Mutasynthese neu hergestellten Aminocoumarine, die modifizierte prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure Gruppen aufwiesen, waren schwächer aktiv als Clorobiocin (Galm *et al.*, 2004b). Jedoch scheint diese Gruppe wichtig für die Aufnahme in das Bakterium zu sein (Laurin *et al.*, 1999; Reusser und Dolak, 1986).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Novobiocin und Clorobiocin die Gyrase B-Untereinheit als Monomer (Tsai *et al.*, 1997), Coumermycin A<sub>1</sub> jedoch als Dimer stabilisiert (Maxwell, 1997).

Kürzlich wurde auch Topoisomerase IV als weiteres Target für Novobiocin identifiziert (Hardy und Cozzarelli, 2003). Topoisomerase IV ist verantwortlich für die ATP-abhängige Decatenierung von DNA-Molekülen nach der DNA-Replikation und gehört wie die DNA-Gyrase zu den Typ II Topoisomerasen. Es wird vermutet, dass die Hemmung der Topoisomerase IV dem gleichen Mechanismus folgt wie die Hemmung der DNA-Gyrase.

## 2.4 Wirkungsspektrum und therapeutische Anwendung

Aminocoumarine weisen eine hohe Wirksamkeit gegen viele Gram-positive Bakterien auf, insbesondere gegen Methicillin- und Vancomycin-resistente Staphylokokken. Jedoch ist bisher die Anwendung der Aminocoumarine beschränkt. Unter der Anwendung von Novobiocin, das unter dem Namen Albamycin<sup>®</sup> (Pharmacia&Upjohn) in den USA als Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen ausgelöst durch multiresistente grampositive Bakterien beim Menschen zugelassen wurde, traten starke Nebenwirkungen auf. Auf Grund dieser Nebenwirkungen, der schlechten Wasserlöslichkeit und der geringen Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien blieb die klinische Anwendung eingeschränkt (Maxwell, 1993). Außerdem wurde eine rasche Resistenzentwicklung bei Staphylokokken beobachtet (Kirby *et al.*, 1956; Perronne *et al.*, 1987). Die antibakterielle Aktivität der Aminocoumarine wurde sowohl in *in vitro* Untersuchungen als auch in klinischen Studien nachgewiesen (Raad *et al.*, 1995; Raad *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1993). Jedoch führten die starken Einschränkungen dazu, dass bisher kein weiteres Aminocoumarin zugelassen wurde und die Forschung innerhalb der pharmazeutischen Industrie sich auf andere Antibiotikaklassen konzentrierte. Durch die Zunahme an nosokomialen Pathogenen (Eady und Cove, 2003; Marcinak und Frank, 2003) sowie der Zunahme der Resistenzentwicklung resultiert nun wieder ein Interesse an bekannte Substanzklassen (Pitlik, 2003).

Novobiocin weist, neben der antibiotischen Anwendung, weitere Anwendungsbereiche auf. Es weist zum Beispiel synergistische Effekte mit Zytostatika auf, indem es die zytotoxische Wirkung der Topoisomerase II-Inhibitoren Etoposid bzw. Teniposid verstärkt (Rappa *et al.*, 1992). Es wurde beobachtet, dass diese Wirkung nicht durch die zusätzliche Hemmung der Topoisomerase II durch Novobiocin hervorgerufen wird, sondern durch die Hemmung des Transportes von Etoposid und Teniposid aus den Zellen (Lorico *et al.*, 1992; Rappa *et al.*, 1992).

Kürzlich wurde berichtet, dass Novobiocin auch mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 interagieren kann (Allan *et al.*, 2006; Marcu *et al.*, 2000b; Marcu *et al.*, 2000a). Hsp90 spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion und Stabilität von verschiedenen Zellsignalmolekülen sowie onkologischen Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen. Es wurde beobachtet, dass diese Interaktion, wie die Hemmung der bakteriellen Gyrase, auf die Konkurrenz des Novobiocins mit dem ATP um die Bindung an das Protein zurückzuführen ist (Marcu *et al.*, 2000b; Marcu *et al.*, 2000a), was in einer Reduktion an onkologischen Kinasen *in vitro* und *in vivo* führt.

## 3. Herstellung neuer Antibiotika

Durch die unvermeidliche Resistenzentwicklung in jeder klinisch eingesetzten Antibiotikaklasse gibt es einen kontinuierlichen Bedarf an neuen Verbindungen zur antibakteriellen Therapie. Besonders Verbindungen mit einem neuen Wirkmechanismus sind interessant. Zur Herstellung neuer Verbindungen werden verschiedene Verfahren angewendet. Neben dem großen Gebiet der chemischen Synthese, die jedoch im Bereich der komplexen, hochmolekularen natürlichen Produkte mit vielen reaktiven Gruppen limitiert ist (Wohlleben und Pelzer, 2002), ist das Screenen nach neuen Organismen, die antibakterielle Sekundärstoffe produzieren, eine weitere Möglichkeit neue Substanzen zu gewinnen. Dabei kann es sich um Bakterien, Pilze oder auch Pflanzen handeln. In der „goldenen Ära“ der Jahre 1940-1960 wurden viele bekannte

und immer noch angewendete Antibiotika wie die Penicilline, Vancomycin, Cephalosporine, Erythromycin usw. durch diese Methode entdeckt. Leider werden nach 50 Jahren des intensiven Screenings heute immer weniger neue natürliche Produkte durch diese Methode identifiziert, die ein nutzbares antibiotisches Potential aufweisen (Walsh, 2003). Deshalb gerät dieses Verfahren immer mehr in den Hintergrund. Allerdings werden nun die schon bekannten Organismen intensiver auf ihre Sekundärstoffproduktion hin untersucht. Die Sequenzierung von Genomen zeigte, dass viele Bakterienstämme oder Pilze in der Lage sind, mehrere Sekundärstoffe zu bilden (Bode *et al.*, 2002). Durch Untersuchungen und Optimierung von Kulturbedingungen könnten viele der noch nicht identifizierten Sekundärstoffe gewonnen werden (Bode *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass die Identifizierung von neuen, natürlichen Derivaten aus Bakterien, Pilzen oder Pflanzen noch lange nicht abgeschlossen ist.

Weitere Gründe für das reduzierte Screening nach neuen Organismen sind die Fortschritte in den Methoden der Strukturmodifizierung der ursprünglichen Naturstoffe auf chemische Weise. Eine Grenze dieser Strukturmodifizierung stellen allerdings sehr komplexe Naturstoffe dar, für die dieses Verfahren nur schwer oder gar nicht anwendbar ist (Floss, 2006). Für alle weiteren Naturstoffe bietet sich jedoch durch dieses Verfahren die Möglichkeit, große Bibliotheken von modifizierten Derivaten zu generieren, die wiederum als Basis für die Optimierung von neuen, semisynthetischen Antibiotika dienen können.

Die Grundlage der Herstellung von neuen modifizierten Substanzen auf Basis von bekannten natürlichen Sekundärstoffen sind Kenntnisse über die Sekundärstoff-Biosynthese. Durch die Entwicklung von neuen molekularen Techniken zur genetischen Manipulation und durch die Sequenzierung von Sekundärstoffbiosyntheseclustern wurde die Basis für diese Herstellung geschaffen. Herstellungsverfahren, die sich daraus entwickelt haben, sind vor allem die kombinatorische Biosynthese, das metabolische Engineering, die Vorstufen-gerichtete Biosynthese und die Mutasynthese.

### 3.1 Kombinatorische Biosynthese

Bisher gibt es in der Literatur keine verbindliche Definition der kombinatorischen Biosynthese und des metabolischen Engineerings. Hutchinson allerdings definiert die kombinatorische Biosynthese als den Austausch von Biosynthesegenen zwischen naturstoffproduzierenden Mikroorganismen mit dem Ziel neue, modifizierte Naturstoffe herzustellen (Hutchinson, 1999).

1985 wurde die kombinatorische Biosynthese erstmals für die Herstellung neuer Substanzen von Hopwood *et al.* entwickelt (Hopwood *et al.*, 1985). Dabei wurden die Biosynthesegene des Actinorhodinclusters von *Streptomyces coelicolor* in *Streptomyces* sp AM-7161 eingebracht. *S.* sp AM-7161 produzierte ursprünglich Medermycin. Nach dem Einbringen der Gene des Actinorhodinclusters produzierte diese Mutante neben Medermycin große Mengen einer weiteren Verbindung, die identifiziert wurde als Mederrhodin A (Hopwood *et al.*, 1985). Seither wurde diese Methode für die Herstellung vieler verschiedener neuer Derivate, darunter Polyketide und nicht-ribosomale Peptide, verwendet (Cane *et al.*, 1998; Khosla, 1998; Rohr, 1995). Auch zur Herstellung neuer Aminocoumarine konnte diese Methode erfolgreich angewendet werden (Eustáquio *et al.*, 2003a; Freitag *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2002).

Die kombinatorische Biosynthese ist damit eine gute Basis zur Substanzentwicklung, -optimierung und -produktion. Jedoch weist auch diese Methode sowie das metabolische Engineering eine viel Zahl von Problemen auf. Vor allem sind dies Probleme mit der Substratspezifität der Biosynthese-Enzyme. Auch die teilweise geringen Ausbeuten und die Bildung von inaktiven Substanzen stellen Probleme des Verfahrens dar (Floss, 2006).

### 3.2 Mutasynthese

Weitere Methoden zur Gewinnung neuer Substanzen sind die Vorstufen-gerichtete Biosynthese und die Mutasynthese. Bei der Vorstufen-gerichteten Biosynthese wird das Kulturmedium des unveränderten Sekundärstoffproduzenten mit Substanzen versetzt, die als Konkurrenten zum eigentlichen Substrat auftreten, das normalerweise in der Biosynthese des Antibiotikums verwendet wird (Weist und Süßmuth, 2005). Ein Problem dieser Vorstufen-gerichteten Biosynthese stellt oft die geringe Ausbeute der neuen Substanz dar (Wohlleben und Pelzer, 2002). Um diese Ausbeuten zu verbessern, kann die Mutasynthese benutzt werden. Die Mutasynthese basiert auf der Zufütterung von synthetischen Analoga von Vorstufen des Sekundärstoffes zu Mutanten, in denen ein wichtiger Schritt der Antibiotikabiosynthese blockiert ist (Weist und Süßmuth, 2005).

Für beide Methoden gilt, dass zur Produktbildung eine Aufnahme der zugefütterten Substanzen notwendig ist. Weitere Limitierungen sind (Weissman, 2007): 1) Die strukturelle Diversität der Analoga der Vorstufen, welche in die endgültige Substanz eingebaut werden können, ist limitiert durch die Substratspezifität der beteiligten Biosynthese-Enzyme. 2) Nur strukturelle Gruppen, die in die ersten Schritten der Biosynthese involviert sind, können modifiziert werden. Ein Vorteil der Mutasynthese ist, dass durch die Verwendung einer einzigen Mutante, der viele verschiedene Substanzen gefüttert werden, viele neue Sekundärstoffe hergestellt werden können.

Die Mutasynthese wurde schon erfolgreich eingesetzt, um neue Aminocoumarine zu gewinnen (Galm *et al.*, 2004a). Dafür wurde eine Mutante des Clorobiocin-Produzenten benutzt, in der die Biosynthese der 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (=Ring A) defekt war. Nach Zufütterung von unterschiedlichen Ring A-Analoga wurden verschiedene neue Aminocoumarine isoliert und identifiziert, die die Grundstruktur von Clorobiocin aufwiesen, aber unterschiedliche Ring A-Analoga trugen. Somit konnten durch diese Methode eine Reihe von unterschiedlichen neuen Aminocoumarinen hergestellt werden. Allerdings zeigte sich auch in diesen Experimenten die Limitierung dieser Methode. Einzelne zugefütterte Ring A-Analoga wurden nicht von der Amidsynthetase CloL akzeptiert und somit entstanden aus diesen Fütterungen keine neuen Produkte.

#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zu der Methyltransferase CloN6. Das Strukturgen *cloN6* befindet sich in der Gruppe der Gene *cloN1-7*, die in die Bildung und den Transfer der Pyrrol-2-carbonsäure-Einheit von Clorobiocin involviert sind. Durch Inaktivierung von *cloN6* war gezeigt worden, dass dieses Gen für eine Methyltransferase codiert, die für die Methylierung an Position 5'' der Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe von Clorobiocin verantwortlich ist (Westrich *et al.*, 2003). Durch Sequenzanalyse konnte eine putative Cobalamin-Bindungsstelle und ein putatives Eisen-Schwefel-Cluster gefunden werden, was diese Methyltransferase sehr ungewöhnlich macht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

- Klonierung von *cloN6* in verschiedene Expressionsvektoren für *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Streptomyces lividans* T7.
- Überexpression der Methyltransferase mit anschließender Aufreinigung.
- Biochemische Charakterisierung der Reaktion.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Herstellung neuer Aminocoumarine. Dabei sollten neue Novobiocin- und Clorobiocin-Derivate sowie Hybrid-Aminocoumarine hergestellt werden, die eine modifizierte Acylkomponente (Ring A) aufweisen. Die neue Novobiocin-Derivate sollten dabei durch einen biochemischen Ansatz bzw. durch Mutasynthese gewonnen werden. Zur Herstellung der Clorobiocin-Derivate sollte eine neue Methode entwickelt werden, die die Grenzen der bisher von Galm *et al.* (2004a) genutzten mutasynthetischen Methode erweitert. Auch zur Herstellung der Hybrid-Aminocoumarine sollte eine neue zweistufige Methode entwickelt werden.

Alle erhaltenen neuen Derivate sollten anschließend auf ihre Bioaktivität und Toxizität hin getestet werden.

Folgende Punkte sollten im Hinblick auf diese Zielsetzung bearbeitet werden:

Herstellung von Novobiocin-Derivaten:

- Herstellung von Novenammin und Testung im Amidsynthetase-Assay zur Herstellung neuer Novobiocin-Derivate.
- Bei Bedarf Herstellung einer *novQ*-Defektmutante des Novobiocin-Produzenten. Anschließend Fütterung von verschiedenen Ring A-Analoga, Isolierung und Identifizierung der gebildeten Derivate.

Herstellung von Clorobiocin-Derivaten:

- Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von Clorobiocin-Analoga. Dabei:
  - Herstellung einer *cloQcloL*-Defektmutante des Clorobiocin-Produzenten.
  - Klonierung der Amidsynthetase-Gene *couL* (aus dem Coumermycin-Cluster) und *simL* (aus dem Simocyclinon-Cluster) in den Expressionsvektor pUWL201 und Einbringen der resultierenden Plasmide in die *cloQcloL*-Defektmutante des Clorobiocin-Produzenten.
  - Fütterung der in früheren *in vitro* Untersuchungen von SimL bzw. CouL akzeptierten, synthetischen Ring A-Analoga an die geeignete Mutante. Anschließend Isolierung und Identifizierung der gebildeten Derivate.

Herstellung von Hybrid-Aminocoumarinen:

- Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von Hybrid-Aminocoumarinen (zweistufige Fütterungen).

Dabei:

- Herstellung einer Mutante mit defektem *novQ* Gen und defekten Genen der Desoxyzucker-Biosynthese des Novobiocin-Produzenten.
  - Fütterung von NovL akzeptierten, synthetischen Ring A-Analoga an diese Mutante. Anschließend Extraktion der Kulturen.
  - Herstellung einer *cloQcloL*-Defektmutante des Clorobiocin-Produzenten (s. Herstellung von Clorobiocin-Derivaten).
  - Fütterung der Extrakte der Novobiocin-Mutante zur Clorobiocin-Mutante. Anschließend Isolierung und Identifizierung der gebildeten Derivate.
  - Erweiterung des Substratspektrums innerhalb dieser Methode durch das Einbringen der Amidsynthetase-Gene *simL* und *couL* in die Novobiocin-Mutante mit anschließender Fütterung von Ring A-Analoga, die nur von diesen Amidsynthetasen akzeptiert werden. Fütterung dieser Extrakte an die Clorobiocin-Mutante mit Isolierung und Identifizierung der gebildeten Derivate.
- 
- Untersuchung aller neuen Derivate auf DNA-Gyrase-Hemmung und ATPase-Hemmung.
  
  - MIC-Bestimmungen der Substanzen gegenüber klinisch relevanten humanpathogenen Mikroorganismen.
  
  - Untersuchung der neuen Substanzen auf ihre Toxizität gegen eukaryontische Zellen.

## II Material und Methoden

### 1. Chemikalien

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

Tab. II.1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Aventis, Bad Soden a.Ts.	Clorobiocin
Becton-Dickinson, Heidelberg	Casaminoacids Corn Starch Hefeextrakt Nutrient Agar Pepton Peptose Nr.3 Tryptic Soy Broth (Soytone) Trypton
Biozyme Scientific GmbH, Oldendorf	Agarose
Flourochem, Old Glossop, UK	2,3-Dihydrobenzofuran-5-carboxylsäure
Fluka, Neu-Ulm	Apramycin 4-Hydroxybenzoesäure 4-Methylthiobenzoessäure Novobiocin Thiostrepton TEMED
FMC BioProducts, Rockland, USA	NuSieve® GTG® Agarose
Interchim, Montlucon, Frankreich	4-Methoxy-3-pyrazol-1-ylmethylbenzoessäure
Lancaster, Mühlheim a.M	3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoessäure
Merck, Darmstadt	Adenosintriphosphat (ATP) Fleischextrakt Malzextrakt β-Mercaptoethanol Phosphorpentoxid Polyvinylalkohol Uvasol-DMSO-d6 Uvasol-Methanol-d4
Pharmacia&Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA	Ring B Novobiocinsäure
Roth, Karlsruhe	Agar Ammoniumpersulfat X-Gal Carbenicillin 1,4-Dithiothreitol (DTT) Glucose

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Roth, Karlsruhe	Glycin IPTG L-Prolin 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) PEG 1000 Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) Sodiumdodecylsulfat (SDS) Tris-maleat N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2- aminoethanolsulfonsäure (TES)
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blue R250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	Ammoniummolybdat Benzoessäure Bromphenolblau 3-(Carboxymethylaminomethyl)-4-hydroxy -benzoessäure Chloramphenicol p-Coumarsäure 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoessäure Dimethylformamid (DMF) DMSO Distillers grains and solubles EDTA Ferulasäure 4-Hydroxy-3-(morpholinomethyl)benzoe- säure Imidazol Malachitgrün 3-Methyl-4-aminobenzoessäure Natriumcitrat Kaffeensäure Kanamycin Maleinsäure Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Tris Base Vanillinsäure Zimtsäure
Specs, Delft, Niederlande	3[(4-Chloro-3-methylphenoxy)methyl]-4- methoxybenzoessäure 3[(2,5-Dimethylphenoxy)methyl]-4- methoxybenzoessäure
Südzucker, Mannheim	Saccharose

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

**Tab. II.2: Chemisch synthetisierte Chemikalien**

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Hennig, S. (Hergestellt nach Kominek und Meyer, 1975)	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A) Oxazol-Vorstufe von Novenamin
Schmutz, E. (Schmutz <i>et al.</i> , 2003b)	3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure
Desso, M.-A. (Desso, 2003)	3-Brom-4-hydroxybenzoesäure 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure 3-Propenyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Propyl-4-hydroxybenzoesäure 3-Isobutylamino-4-hydroxybenzoesäure 3-Ter-valerylamino-4-hydroxybenzoesäure

## 2. Säulenmaterial

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

**Tab. II.3: Säulenmaterialien**

<b>Hersteller</b>	<b>Säulenmaterial</b>
Agilent Technologies, Böblingen	Eclipse XDB-C 18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)
Amersham Biosciences, Freiburg	Sephadex <sup>®</sup> LH-20 (Trockensubstanzen) Sephadex <sup>®</sup> G25 NAP-10 (kommerzielle Säule) Glutathionsepharose (Suspension)
C+S Chromatographie Service, Düren	Multosphere <sup>®</sup> RP 18-5 (5µm, 250 x 4 mm) (kommerzielle Säule) Multosphere <sup>®</sup> RP 18-5 (5µm, 250 x 8 mm) (kommerzielle Säule) Multosphere <sup>®</sup> RP 18-5 (5µm, 250 x 10 mm) (kommerzielle Säule)
Macherey-Nagel, Düren	Nucleosil <sup>®</sup> 120 RP ODS (8 µm, 2 x 250 mm)
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

### 3. Enzyme und Kits

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

Die in Tabelle II.4 aufgeführten Proteine wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Heide exprimiert und gereinigt.

**Tab. II.4: exprimierte Proteine**

<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
Metzger, U. (persönl. Mitteilung)	NovL, SimL
Schmutz, E. (Schmutz <i>et al.</i> , 2003b)	CouL
Galm, U. (Galm <i>et al.</i> , 2004a)	CloL

### 4. Nährmedien, Puffer und Lösungen

#### 4.1 Medien zur Bakterienkultivierung

Die Angaben für die nachfolgend aufgeführten Nährmedien beziehen sich jeweils auf 1 Liter Medium. Alle Medien wurden im Autoklaven mit Wasserdampf bei 21°C, 20 min sterilisiert. Im Falle von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Agar hinzugegeben. Die Zugabe von getrennt sterilisierten Lösungen und hitzelabilen Substanzen wie Antibiotika erfolgte erst nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen. Die Medien wurden bei RT oder bei 4°C gelagert.

#### 4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

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

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

Alle Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

##### TB-Medium

Trypton	12,0 g
Hefeextrakt	20,0 g
Glycerol	4,0 ml

Alle Bestandteile wurden in 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und autoklaviert. Anschließend werden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> zugegeben.

##### SOB-Medium

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

Die Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml einer sterilen 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugefügt.

#### 4.1.2 Kultivierung und Expression in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1

##### YPD-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) (Ausubel *et al.*, 1996)

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Dextrose	20 g

Die Bestandteile wurden in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und autoklaviert (Anmerkung zur Herstellung von Platten: Dextrose nicht mit Agar zusammen autoklavieren; 20 % Dextroselösung wurde separat autoklaviert (100 ml)).

##### SC-minimal Medium (nach Herstellervorschrift von pYES2/NT (Invitrogen))

Yeast nitrogen Base	6,7 g	Asparaginsäure	0,05 g
Adenin	0,1 g	Isoleucin	0,05 g
Argenin	0,1 g	Methionin	0,05 g
Cystein	0,1 g	Phenylalanin	0,05 g
Leucin	0,1 g	Prolin	0,05 g
Threonin	0,1 g	Serin	0,05 g
Tryptophan	0,1 g	Tyrosin	0,05 g
Histidin	0,05 g	Valin	0,05 g

Die Bestandteile wurden in 900 ml bzw. im Fall des Induktionsmedium in 800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst, autoklaviert und anschließend mit folgender Lösung bzw. Lösungen steril versetzt:

Glucose 20% in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (autoklaviert)

bzw. im Fall des Induktionsmediums:

Raffinose 10% in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Galaktose 20% in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (autoklaviert)

Die zehnfach konzentrierte Raffinoselösung wurde nicht autoklaviert sondern sterilfiltriert.

Nach Transformation eines pYES-Vektors in den Uracil-defizienten Hefestamm wurde zur Selektion das Uracil im Medium weggelassen (SC-U-Medium).

### 4.1.3 Kultivierung von Streptomyceten

#### YMG (Yeast-Malt-Glucose)-Medium

Malzextrakt 10,0 g

Hefeextrakt 4,0 g

Glucose 4,0 g

Alle Bestandteile wurden in 800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

#### HA-Medium

YMG-Medium 1 l

Nach dem Autoklavieren wurde steril 1,0 ml 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung hinzugefügt.

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

Tryptone Soya Broth 30,0 g

Die Bestandteile wurden in 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und autoklaviert.

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

Saccharose 340,0 g

Hefeextrakt 3,0 g

Pepton 5,0 g

Malzextrakt 3,0 g

Glucose 10,0 g

Alle Bestandteile wurden in 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 2 ml steriler 2,5 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung.

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

Mannitol 20,0 g

Sojamehl 20,0 g

Agar 20,0 g

Mannitol wurde in 1 l Leitungswasser gelöst und in 100 ml Fraktionen in 300 ml Erlenmeyerkolben mit 2 g Agar und 2 g Sojamehl gefüllt. Sterilisation erfolgte durch zweimaliges autoklavieren (115°C, 15 min) mit vorsichtigem Schütteln zwischen den beiden Autoklaviervorgängen.

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

Saccharose	103,0 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,1 g
Glucose	10,0 g
Casaminoacids	0,1 g
Spurenelementelösung	2,0 ml
Hefeextrakt	5,0 g
TES	5,7 g

Alle Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, der pH wird auf 7,2 eingestellt und dann auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

(Anmerkung: Für die Herstellung von Weichagar wurden nur 6,0 g Agar zugesetzt.)

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von folgenden sterilen Lösungen:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	10 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (1M)	20 ml
L-Prolin (20 %)	15 ml

### Spurenelementelösung:

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

Die Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

### 4.1.4 Novobiocin-Produktionsmedium

#### CDM-Medium (Kominek, 1972)

tri-Natrium-Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	6 g
L-Prolin	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g
NaCl	5 g

Die Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und der pH auf 7,2 mit HCl eingestellt.

MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,05 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g

Die Bestandteile wurden gelöst und auf 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt. Der pH wurde auf 7,2 mit NaOH eingestellt und die Lösung dann autoklaviert.

Glucose	30,0 g
---------	--------

Die Glucose wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf 100 ml aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde die Glucose steril dazugegeben.

#### 4.1.5 Clorobiocin-Produktionsmedium

Corn Starch-Medium (Vorkulturmedium) (Mancy *et al.*, 1974)

Corn Starch	10 g
Pepton	10 g
Fleischextrakt	5 g

Alle Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

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

*Lösung A:*

Distillers grains and solubles	48 g
Glucose	12 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg

Die Bestandteile wurden in 700 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf pH 7,8 eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von:

CaCO <sub>3</sub>	6 g
-------------------	-----

Diese Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 887 ml aufgefüllt und autoklaviert.

*Lösung B:*

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	32 g
---	------

Dieser Bestandteil wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf 200 ml aufgefüllt und autoklaviert.

*Lösung C:*

Glucose	75 g
---------	------

Dieser Bestandteil wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf 300 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Lösung A wurde nach dem Autoklavieren mit 13 ml Lösung B und 100 ml Lösung C ergänzt.

#### 4.1.6 Protoplastentransformation und Konjugation von Streptomyceten

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

Für die Präparation von Protoplasten von *S. coelicolor* M512, *S. coelicolor* (clo-CA5) und *S. lividans* T7 wurden 25 ml Glycin 20% (w/v) zu 1 Liter YEME-Medium hinzugegeben (Endkonzentration 0,5%).

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

Für die Präparation von Protoplasten von *S. coelicolor* (nov-CA7) wurden 1 ml Glycin 20% (w/v) zu 50 ml TSB-Medium hinzugegeben (Endkonzentration 0,4%).

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

Nutrient Broth	8,0 g
Agar	5,0 g

Alle Bestandteile wurden in einem Endvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und autoklaviert

### R2YE-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Saccharose	103,0 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,1 g
Glucose	10,0 g
Casaminoacids	0,1 g
Spurenelementelösung	2,0 ml
Hefeextrakt	5,0 g
TES	5,7 g

Alle Bestandteile wurden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von folgenden sterilen Lösungen:

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

### R3-Weichagar

Saccharose	171,0 g
Glucose	10,0 g
Peptone	4,0 g
KCl	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,2 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	8,1 g
Agar	8,0 g

Alle Bestandteile wurden in einem Endvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und autoklaviert.

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von folgenden sterilen Lösungen:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 %)	40,0 ml
TES (250 mM, pH 7,2)	100,0 ml

### 2xYT (Kieser *et al.*, 2000)

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g

Alle Bestandteile wurden in einem Endvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und autoklaviert.

## 4.2 Antibiotikallösungen

Die Antibiotikallösungen wurden in Stammlösungen mit den angegebenen Konzentrationen angefertigt und bei -20°C gelagert. Wässrige Lösungen wurden mit einem speziellen Filter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Lösungen in Ethanol und DMSO sind autosteril. Die Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C steril zugesetzt (Tab. II.5).

Tab. II.5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration in		Lösungsmittel
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [µg/ml]	
Apramycin	100	12,5-50	Wasser
Carbenicillin	50	50	Wasser
Chloramphenicol	50	25-50	Ethanol
Kanamycin	100	12,5-50	Wasser
Nalidixinsäure	25	25	0,3 M NaOH
Tetracyclin	25	12	Ethanol
Thiostrepton	50	6-50	DMSO

### 4.3 Puffer und Lösungen

#### 4.3.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tab. II.6: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*.

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt und mit Ausnahme von L2-Puffer autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
L1-Puffer	Tris-Base	50 mM	mit HCl auf pH 8,0 einstellen; RNase A vor Gebrauch zugeben
	EDTA	10 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
L2-Puffer	NaOH	0,2 M	
	SDS	1,0% (w/v)	
L3-Puffer	NaAc x 2 H <sub>2</sub> O	3 M	pH 5,2 einstellen
TE	Tris-Base	10 mM	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
	EDTA	1 mM	

Tab. II.7: Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden und genomischer DNA aus *Streptomyces*.

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt und mit Ausnahme von Lösung B autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Endkonz.	Herstellung
Lösung A	Glucose	50 mM	mit HCl auf pH 8,0 einstellen; RNase A und Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben
	Tris-Base	25 mM	
	EDTA	10 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
	Lysozym	4-6 mg	
Lösung B	NaOH	0,2 M	
	SDS	1,0% (w/v)	
Lösung C	NaAc x 2 H <sub>2</sub> O	3 M	pH auf 5,2 einstellen
2xKirby Mix (Kieser <i>et al.</i> , 2000)	SDS	2 g	in 89 ml lösen und Tris-HCl und Phenol dazugeben; nicht autoklavieren; vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahren
	Na-4-ammonium salicylat	12 g	
	2 M Tris-HCl, pH 8,0	5 ml	
	Phenollösung, pH 8,0	6 ml	

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Endkonz.</b>	<b>Herstellung</b>
TSE-Puffer	Tris-Base EDTA Saccharose	25 mM 25 mM 10,3% (w/v)	mit HCl auf pH 8,0 einstellen
TSE-Aufschluß- Puffer	TSE-Puffer mit: RNase A Lysozym	100 µg/ml 3,0 mg/ml	RNase und Lysozym kurz vor Gebrauch zugeben

#### 4.3.2 Puffer zur DNA-Gelelektrophorese

**Tab. II.8: Puffer zur DNA-Gelelektrophorese.**

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt, mit Ausnahme des Ladepuffers autoklaviert und bei RT gelagert.

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

#### 4.3.3 Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt, getrennt autoklaviert und unter sterilen Bedingungen gemischt. Die Puffer wurden nach Aliquotierung bei -20°C gelagert.

**Tab. II.9: Puffer zur Protoplastierung und Transformation von Streptomyceten.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
Protoplastierungspuffer (P-Puffer) (Kieser <i>et al.</i> , 2000)	Saccharoselösung (12% (w/v))	85,5 ml
	Spurenelementelösung (s. 4.1.3)	0,2 ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140 mM)	0,2 ml
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (1 M)	1,0 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40 mM)	1,0 ml
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (250 mM)	1,0 ml
	TES (250 mM, pH 7,2)	10,0 ml
Transformationspuffer (T-Puffer) (Kieser <i>et al.</i> , 2000)	Saccharoselösung (25% (w/v))	1,0 ml
	PEG 1000 (50% (m/v))	5,0 ml
	Spurenelementelösung (s. 4.1.3)	0,03 ml
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (140 mM)	0,1 ml
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (1 M)	0,1 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (40 mM)	0,1 ml
	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (250 mM)	1,0 ml
	Tris-maleat (0,5 M, pH 8,0)	1,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,0 ml	

#### 4.3.4 Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung

**Tab. II.10: Puffer und Lösungen für Southern Blot Hybridisierung.**

Alle Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt und bei RT gelagert.

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Endkonz.</b>	<b>Herstellung</b>
Depurinierungs- lösung	HCl	250 mM	
Denaturierungs- lösung	NaOH NaCl	0,5 M 1,5 M	
Neutralisierungs- lösung	Tris-Base NaCl	0,5 M 3,0 M	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
20x SSC	Tri-Natrium-Citrat NaCl	0,3 M 3,0 M	mit HCl auf pH 7,0 einstellen
Prähybridisierungs- lösung	Magermilchpulver SDS (als 10%ige (w/v) Lsg.) N-Laurylsarkosin (35%ige (w/v) Lösung)	3,0% 0,02% 0,1%	frisch ansetzen in 5x SSC-Puffer
Hybridisierungs- lösung	Magermilchpulver SDS (als 10%ige (w/v) Lsg.) N-Laurylsarkosin (35%ige (w/v) Lösung)	1,5% 0,02% 0,1%	frisch ansetzen in 5x SSC-Puffer
2x Waschpuffer	SDS (als 10%ige (w/v) Lsg.)	0,1%	2x SSC-Puffer
0,5x Waschpuffer	SDS (als 10%ige (w/v) Lsg.)	0,1%	0,5x SSC-Puffer
Maleinsäure- Puffer	Meleinsäure NaCl	0,1 M 0,15 M	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Tween- Waschpuffer	Tween 20	0,3%	frisch ansetzen in Maleinsäurepuffer
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	3,0%	frisch ansetzen in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	Tris-Base NaCl	0,1 M 0,1 M	mit HCl auf pH 9,5 einstellen
Antikörper-Lösung	Blocking-Lösung Maleinsäurepuffer Anti-DIG-AP-Konjugat	20,0 ml 20,0 ml 0,4 µl	frisch ansetzen
Stripping-Lösung	NaOH SDS (als 2%ige (w/v) Lsg.)	0,2 M 0,1%	

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

**Tab. II.11: Stammlösungen zur Blau-Weiß-Selektion.**

Die Lagerung der Lösungen erfolgte bei -20°C.

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>pro Platte eingesetzt</b>
IPTG	47 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , sterilfiltriert	20 µl
X-Gal	20 mg/ml in DMF, autosteril	20 µl

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

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

**Tab. II.12: Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>	<b>Herstellung</b>
Trenngel (12%)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,4 ml	APS und TEMED werden erst kurz vor dem Gießen zugesetzt
	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	
	10% (w/v) SDS	0,1 ml	
	Rotiphorese® Gel 30	4,0 ml	
	10% (w/v) APS	0,05 ml	
	TEMED	0,005 ml	
Sammelgel (4%)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6,1 ml	APS und TEMED werden erst kurz vor dem Gießen zugesetzt
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 ml	
	10% (w/v) SDS	0,1 ml	
	Rotiphorese® Gel 30	1,3 ml	
	10% (w/v) APS	0,05 ml	
	TEMED	0,01 ml	
Probenpuffer (1x)	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,55 ml	5 µl β-Mercaptoethanol werden zu 95 µl Puffer kurz vor Gebrauch zugegeben
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml	
	Glycerin	2,5 ml	
	10% (w/v) SDS	2 ml	
	0,5% (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml	
10x Laufpuffer	Tris Base	30,3 g	Die Bestandteile werden in einem Endvolumen von 1 l gelöst und pH 8,3 eingestellt. Lagerung bei 4°C.
	Glycin	144 mg	
	SDS	10,0 g	
Fixierlösung	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	70% (v/v)	Lagerung bei RT.
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	20% (v/v)	
Coomassie Brilliant Blau G 250-Lösung	Coomassie Brilliant Blau	0,25 % (w/v)	Lagerung bei RT.
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	45% (v/v)	
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	45% (v/v)	
Entfärber	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	45% (v/v)	Lagerung bei RT.
	Essigsäure	10% (v/v)	
	Methanol	45% (v/v)	

### 4.3.7 Puffer zur Enzymreinigung

Tab. II.13: Puffer zur Enzymreinigung

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Endkonz.</b>	<b>Herstellung</b>
Lysepuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	Imidazol und Lysozym werden erst kurz vor Gebrauch zugegeben; pH 8,0
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	10 mM	
	Lysozym	2 mg/ml	
Waschpuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	pH 8,0
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	20 mM	
Elutionspuffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	pH 8,0 durch Phosphatpuffer einstellen
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	250 mM	
Lysepuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM	pH 8,0  frisch zugeben
	NaCl	300 mM	
	Glycerol	10% (v/v)	
	Imidazol	20 mM	
	Tween 20	1 %	
	β-Mercaptoethanol	10 mM	
Waschpuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM	pH 8,0  frisch zugeben
	NaCl	500 mM	
	Glycerol	10% (v/v)	
	Imidazol	20 mM	
	β-Mercaptoethanol	10 mM	
Elutionspuffer (Kristallisation)	Tris-HCl	50 mM	pH 8,0  frisch zugeben
	NaCl	500 mM	
	Glycerol	10% (v/v)	
	Imidazol	250 mM	
	β-Mercaptoethanol	10 mM	
PBS (Phosphate buffered saline)	NaCl	140 mM	pH 7,3 durch Phosphatpuffer einstellen
	KCl	2,7 mM	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM	
Elutionspuffer bei GST-Tag	Tris-HCl	50 mM	pH 8,0 einstellen
	Reduziertes Glutathion	10 mM	
Breaking-Puffer zum Hefeauflchluss	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	pH 7,4 durch Phosphatpuffer einstellen
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	
	Glycerol	5% (v/v)	
	PMSF	1 mM	

## 5. Plasmide, Primer und Bakterienstämme

### 5.1 Vektoren, Plasmide und Cosmide

Tab.II.14: Vektoren, Plasmide und Cosmide

Name	Beschreibung	Hersteller/ Referenz
<b>Vektoren</b>		
pBlueskript SK(-)	Amp <sup>R</sup> , lacZ'α, f1(-)-origin, ColE1-origin	Stratagene
pcDNA2.1	Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup> , lacZ'α, f1(-)-origin, ColE1-origin	Invitrogen
pGEM-T	linearisierter Vektor mit T-Überhang; Amp <sup>R</sup> , lacZ'α, f1(-)-origin	Promega
pGEX-4T-1	<i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, N-terminaler GST-Tag, Amp <sup>R</sup> , Tac-Promotor, ColE1-origin	Amersham Biosciences
pGM9	Streptomyceten Vektor, Amp <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , pSG5-origin	(Muth <i>et al.</i> , 1989)
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan <sup>R</sup> , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) <sub>8</sub> -Tag und C-terminalen (His) <sub>6</sub> -Tag	(Jez <i>et al.</i> , 2000)
pLitmus 28	Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup> , M13-origin, ColE1-origin, lacZ'α	New England Biolabs
pQE31	<i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, N-terminaler (His) <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>R</sup> , T5-Promotor, ColE1-origin	Qiagen
pQE70	<i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, C-terminaler (His) <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>R</sup> , T5-Promotor, ColE1-origin	Qiagen
pRSET B	<i>E. coli</i> -Überexpressionsvektor, N-terminaler (His) <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>R</sup> , T7-Promotor, f1-origin, ColE1-origin	Invitrogen
SuperCos 1	Cosmidvektor, Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , S40-origin	Stratagene
pUWL201	<i>Streptomyces-E. coli</i> -Shuttle Vektor, Amp <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup> , konstitutiver <i>ermE*</i> -Promotor, pIJ101-origin, ColE1-origin	(Doumith <i>et al.</i> , 2000)
pYES2/NT-C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1 - Überexpressionsvektor, N- und C-terminaler (His) <sub>6</sub> -Tag, Amp <sup>R</sup> , T7-Promotor, f1-origin, pUC1-origin	Invitrogen
pZW10	12748 kb <i>BglII</i> -Fragment (Position 15530 (T7)-28278 (T3) von AF235050 in die <i>BamHI</i> -Schnittstelle von pBlueskript SK(-), Amp <sup>R</sup>	(Wang <i>et al.</i> , 2000)

<b>Plasmide</b>		
pACYCisc	pACYC184 basierendes Plasmid; enthält das <i>isc</i> -Operons von <i>E.coli</i>	(Gräwert <i>et al.</i> , 2004)
pIJ778	pBlueskript SK(+)-Derivat; enthält in der <i>EcoRV</i> -Schnittstelle die Spectinomycin/Streptomycin- <i>oriT</i> Kassette	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pMS91	pUWL201-Derivat; enthält 1,6 kb <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment aus dem Coumermycin-Cluster (aus pZW10), trägt das Gen <i>couL</i>	M. Steffensky persönliche Mitteilung
pTLsimLfori	pcDNA2.1-Derivat; enthält 1705 kb <i>NotI/NotI</i> -Fragment (Position 17588-19293 in AF322256) aus dem Simocyclinon-Cluster, trägt das Gen <i>simL</i>	T. Luft persönliche Mitteilung
pUG019	pBlueskript SK(-)-Derivat; enthält eine Apramycin-Resistenzkassette ( <i>aac(3)IV</i> ) flankiert durch <i>XbaI</i> und <i>SpeI</i> Restriktionsschnittstellen, Amp <sup>R</sup>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
<b>Cosmide</b>		
Cosmid VII-8g	SuperCos 1 basierendes Cosmid enthält das Simocyclinon-Cluster, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Galm <i>et al.</i> , 2002)
Cosmid 4-2H	SuperCos 1 basierendes Cosmide enthält einen Teil des Coumermycin-Clusters, Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Wang <i>et al.</i> , 2000)
Cosmid 10-9C	SuperCos 1 basierendes Cosmid enthält das Novobiocin-Cluster mit Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Steffensky <i>et al.</i> , 2000b)
Cosmid D1A8	SuperCos 1 basierendes Cosmid enthält das Clorobiocin-Cluster mit <i>gyr<sup>B</sup></i> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Pojer <i>et al.</i> , 2002)
Cosmid clo-BG1	vom Cosmid D1A8, <i>bla</i> -Gen durch Kassette vom pIJ787 ( <i>oriT</i> , <i>tet</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31) ersetzt, Kan <sup>R</sup>	Bertolt Gust (Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
Cosmid nov-BG1	vom Cosmid 10-9C, <i>bla</i> -Gen durch Kassette vom pIJ787 ( <i>oriT</i> , <i>tet</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31) ersetzt, Kan <sup>R</sup>	Bertolt Gust (Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)

**Tab. II.15: Eigene Plasmid-Konstrukte.**

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Name	Größe [kb]	Beschreibung
<i>Plasmide</i>		
pCA1	4,7	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment (Pos. 25278-26992 AF329398) aus D1A8 (per PCR amplifiziert) in pGEM-T
pCA2	10,8	Fusion aus pSH1 und pGM9 über <i>Hind</i> III Schnittstelle, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA3	4,7	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II Fragment (Pos. 25277-26987 AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pGEM-T; trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA4	6,6	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Fragment (Pos. 25277-26989 AF329398) aus pCA3 (per PCR amplifiziert) in pGEX-4T-1, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA5	5,1	1,7 kb <i>Sph</i> I/ <i>Bgl</i> II Fragment (Pos. 25283-26987 AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pQE70; trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA5/1	4,0	1,1 kb <i>Sph</i> I/ <i>Bgl</i> II Fragment (Pos. 25283-26391 AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pQE70; trägt den C-terminalen Teil des Gens <i>cloN6</i>
pCA6	3,6	0,6 kb <i>Sph</i> I/ <i>Sph</i> I Fragment (Pos. 26391-26987 AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pcDNA2.1; trägt den N-terminalen Teil des Gens <i>cloN6</i>
pCA7	5,1	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment aus pSH1 in pQE31 kloniert, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA8	7,7	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I Fragment aus pCA4 in pYES2/NT-C kloniert, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pCA9	4,7	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment (Pos. 25277-26992 AF329398) aus clo-BG1 (per PCR amplifiziert) in pGEM-T; Basis für die Klonierung in pHis8
pCA11	7,0	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment aus pCA9 in pHis8 kloniert, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pSH1	4,5	1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III Fragment aus pCA1 in pRSET B kloniert, trägt das Gen <i>cloN6</i>
pSH2	8,3	1,6 kb <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus pTLsimLfori in pUWL201 kloniert, trägt das Gen <i>simL</i>

**Tab. II.16: Cosmid-Konstrukte**

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und relevanten Konstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

<i>Cosmide</i>	
clo-CA1	von D1A8 abgeleitet, Gen <i>cloL</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt
clo-CA2	von clo-BG1 abgeleitet, Gen <i>cloL</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt
clo-CA3	von clo-CA2 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta cloL$ -Cosmid
clo-CA4	von clo-CA3 abgeleitet, Gen <i>cloQ</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt; $\Delta cloQ\Delta cloL$ +apra-Cosmid
clo-CA5	von clo-CA4 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta cloQ\Delta cloL$ -Cosmid
clo-CA6	von clo-CA1 abgeleitet; Ampicillin-Resistenz wurde durch Spectinomycin/Streptomycin ( <i>aadA</i> ) mit <i>oriT</i> aus pIJ778 ersetzt (ohne FRT-Sites); $\Delta cloL$ +spec/strep-Cosmid
clo-CA7	von clo-BG1 abgeleitet; vor <i>cloN6</i> wurde Apramycin-Resistenzkassette mit (His) <sub>6</sub> -Tag eingebracht
nov-CA1	von 10-9c abgeleitet; Ampicillin-Resistenz wurde durch Spectinomycin/Streptomycin+ <i>oriT</i> ( <i>aadA</i> ) aus pIJ778 ersetzt (ohne FRT-Sites)
nov-CA2	von nov-CA1 abgeleitet, Gen <i>novQ</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt; $\Delta novQ$ +apra-Cosmid
nov-CA3	von nov-CA2 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch FLP-Rekombinase entfernt (Scar-Sequenz :81 bp); $\Delta novQ$ -Cosmid
nov-CA4	von nov-CA2 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta novQ$ +spec/strep-Cosmid
nov-CA5	von nov-BG1 abgeleitet, Gen <i>novQ</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt; <i>novQ</i> wurde bis auf einem Rest von 3 Basen durch die Apramycinkassette ausgetauscht; $\Delta novQ$ +apra-Cosmid
nov-CA6	von nov-BG1 abgeleitet, Base Pos. 19059 (AF170880) durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt; <i>novQ</i> wurde durch Frameshift (Entfernung von einer Base) durch die Apramycinkassette inaktiviert; $\Delta novQ$ +apra-Cosmid
nov-CA7	von nov-CA5 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta novQ$ -Cosmid
nov-CA8	von nov-CA6 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta novQ$ -Cosmid
nov-CA12	von nov-BG1 abgeleitet, Gen <i>novQ</i> durch Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 ersetzt; $\Delta novQ$ +apra-Cosmid
nov-CA14	von nov-CA12 abgeleitet, Apramycin-Resistenzkassette durch <i>XbaI/SpeI</i> Restriktionsverdau und Religation entfernt; $\Delta novQ$ -Cosmid

## 5.2 PCR-Primer

**Tab. II.17: PCR-Primer zur Inaktivierung und Austausch der Ampicillinresistenz mittels PCR-Targeting.**

Sequenzbereiche vor und nach dem entsprechenden Gen sind fett dargestellt, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Grau hinterlegt sind die Basen des (His)<sub>6</sub>-Tags.

Name	Sequenz	R.-St.	Position	Accession-No.	Amplifiziertes Gen
<b>Primer für den Austausch des <i>bla</i> Gens</b>					
Amp_for	5'-CCAATGCTTAATCAG TGAGGCACCTATCTCAG CGATCTGCTATTTGCCGA CTACCTTGG-3'	-	6878-6914  798-817	SuperCos- Stratagene AX657067	Ampicillin- Resistenz Spec/Strep+ <i>oriT</i>
Amp_rev	5'-ATGAGTATTCAACAT TTCCGTGTCGCCCTTAT TCCCTTTCGCCAGCCTCG CAGAGCAG-3'	-	7697-7735  2021-2039	SuperCos- Stratagene AX657067	Ampicillin- Resistenz Spec/Strep+ <i>oriT</i>
<b>Primer für die Inaktivierung des Gens <i>novQ</i></b>					
NovQ_P01f	5'-CCGGTAATCACTGT GAGTTGATCACGGAGG AATTCATGATTCCGGGG ATCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	19005-19044 2069-2049	AF170880 AX657066	vor <i>novQ</i> FRT site
NovQ_P01r	5'-AGTAGTCGTCTCCGG GCATGTTCCGCCAGAGCC TCGCTCAACTAGTCTGG AGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	20009-20048 699-719	AF170880 AX657066	nach <i>novQ</i> FRT site
NovQ_P02rev	5'-AGTCGTCTCCGGGCA TGTTCCGCCAGAGCCTCG CTCATCGACTAGTCTGG AGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	20006-20046  699-719	AF170880 AX657066	ein Codon vor dem Stop-Codon FRT-site
NovQ_FSfor	5'-GAGTTGATCACGGAG GAATTCATGCCCGCACT CCCGATGATTCCGGGGA TCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	19020-19058  2069-2049	AF170880 AX657066	kurz nach Start <i>novQ</i> FRT site
NovQ_FSrev	5'-GTAATCGACGCGAA AGCGTTCGCGGTCGAA TCTTGATACTAGTCTGGA GCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	19060-19098  699-719	AF170880 AX657066	kurz nach Start <i>novQ</i> (1 Base deletiert) FRT site
<b>Primer für die Inaktivierung des Gens <i>cloL</i></b>					
cloL_for	5'-AGCGGAAGTACCTCT ACTTCGCGAAAGGTAGT CACTGGTGATTCCGGGG ATCTCTAGATC-3'	<i>XbaI</i>	18053-18093 2069-2049	AF329398 AX657066	vor <i>cloL</i> FRT site
cloL_rev	5'-CATCGAATGACTCAC CTCACCTGTCCACCAGC ACGTCCGGACTAGTCTG GAGCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	19650-19689  699-719	AF329398 AX657066	innerhalb <i>cloL</i> FRT site
<b>Primer für die Inaktivierung des Gens <i>cloQ</i></b>					
cloQ_for	5'-GGCGCGCCCATTTGCT CACCGTCTTACCGACAC CGTCCTTATTCCGGGGA TCTCTAGATC-3')	<i>XbaI</i>	31910-31948  2069-2049	AF329398 AX657066	innerhalb <i>cloQ</i> FRT site
cloQ_rev	5'-CCCATGGTTCGATTCC GTGTGTTGGTGAAGTGC GCGCAGACTAGTCTGGA GCTGCTTC-3'	<i>SpeI</i>	32756-32793  699-719	AF329398 AX657066	innerhalb <i>cloQ</i> FRT site

Name	Sequenz	R.-St.	Position	Accession-No.	Amplifiziertes Gen
<b>Primer für das Einbringen eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor <i>cloN6</i></b>					
cloN6insN_for	5'-CAACAAATAGTTTGG ATGTCCCAGTCAAATTG AACGCGGAGGTCTAGAG CAGTACCAGCGTACGGCC C-3'	<i>XbaI</i>	25251-25286  1709-1740	AF329398  AX657066	zwischen <i>cloN5</i> und <i>cloN6</i> innerhalb Aprakassette
cloN6insN_zw	5'-TCGATTGGCTGAGCTC ATAAACTAGTATGCGGG GTTCTCATCATCATC ATCATTTC-3'	<i>SpeI</i>	766-786	AX657066	innerhalb Aprakassette (His) <sub>6</sub> -Tag
cloN6NW_rev	5'-GTCCCGGAAGTCGTA CACGCTGGGCGCATGT AGCAGGAAATGATGATG ATGATGATGAGA-3'	-	25295-25333	AF329398	nach Start von <i>cloN6</i> (His) <sub>6</sub> -Tag

**Tab. II.18: Für die Klonierung eingesetzte PCR-Primer.**

Die hervorgehobenen Buchstaben stellen die in der Originalsequenz eingeführten Mutationen dar, um die gewünschte Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) zu gewinnen.

Name	Sequenz	R.-St.	Position	Accession-No.	Plasmid
cloN6_f	5'-AATTGAACCGGATCC GTTCTGCTA-3'	<i>BamHI</i>	25278- 25304	AF329398	pCA1
cloN6_r	5'-CCGTCTCCGAAGCTTC ACGGGGTCA-3'	<i>HindIII</i>	26967- 26992	AF329398	
cloN6Q_f	5'-AAATTGAACGGATCCA TGTTCC-3'	<i>BamHI</i>	25277- 25298	AF329398	pCA3
cloN6Q_r	5'-CTCCGTGAGATCTCGG GGTCA-3'	<i>BglII</i>	26976- 26987	AF329398	
cloN6Q_f	5'-AAATTGAACGGATCCA TGTTCC-3'	<i>BamHI</i>	25277- 25298	AF329398	pCA4
cloN6G_r	5'-TCTCCGTGCGGCCGCG GGGTCAT-3'	<i>NotI</i>	26966- 26989	AF329398	
cloN6SQ_f	5'-AACGCGGGCATGCTCC TGCTA-3'	<i>SphI</i>	25283- 25303	AF329398	pCA5/1 und pCA6
cloN6Q_r	5'-CTCCGTGAGATCTCGG GGTCA-3'	<i>BglII</i>	26976- 26987	AF329398	
cloN6Q_f	5'-AAATTGAACGGATCCA TGTTCC-3'	<i>BamHI</i>	25277- 25298	AF329398	pCA9
cloN6_r	5'-CCGTCTCCGAAGCTTC ACGGGGTCA-3'	<i>HindIII</i>	26967- 26992	AF329398	

### 5.3 Stämme

Tab. II.19: Bakterienstämme von *E. coli* und Streptomyceten, sowie *Saccharomyces*

Stamm	Beschreibung	Hersteller/Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
XL1Blue MRF <sup>c</sup>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>c</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)</i> ]	Stratagene
ET12567	DNA-Methylase negativer Stamm Tet <sup>R</sup> ( <i>dam<sup>-</sup>, dcm<sup>-</sup>, nsdM<sup>-</sup></i> )	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
BL21(DE3)/pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Invitrogen
BW25113	K12-Derivat, Δ <i>araBAD</i> , Δ <i>rhaBAD</i>	(Datsenko und Wanner, 2000)
DH5α/BT340	<i>supE44, lacU169 (Φ80 lacZ, M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> ; enthält temperatursensitives Plasmid BT340 mit FLP-Synthesegene	(Datsenko und Wanner, 2000)
<b><i>Streptomyceten</i></b>		
<i>S. coelicolor</i> M512	Δ <i>redD ΔactII-ORF4 SCP1<sup>-</sup> SCP2<sup>-</sup></i> keine Produktion von Actinorhodin, Undecylprodigiosin und Methylenomycin	(Floriano und Bibb, 1996)
<i>S. coelicolor</i> (clo-BG1)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das Biosynthesegencluster von Clorobiocin, Kan <sup>R</sup>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
<i>S. coelicolor</i> (clo-CA5)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>cloQcloL</i> -defekte Clorobiocin-Cluster, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-CA7)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das Clorobiocin-Cluster mit (His) <sub>6</sub> -Tag vor <i>cloN6</i> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-CA5)/pMS91	Kan <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-CA5)/pSH2	Kan <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (clo-CA5)/pUWL201	Kan <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (nov-BG1)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das Biosynthesegencluster von Novobiocin, Kan <sup>R</sup>	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005a)
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA7)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>novQ</i> -defekte Novobiocin-Cluster, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA7)/pMS91	Kan <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA7)/pSH2	Kan <sup>R</sup> , Thio <sup>R</sup>	diese Arbeit

Stamm	Beschreibung	Hersteller/Referenz
<b>Streptomyces</b>		
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA8)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>novQ</i> -defekte Novobiocin-Cluster, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA12)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>novQ</i> -defekte Novobiocin-Cluster, Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> (nov-CA14)	<i>S. coelicolor</i> M512 enthält das <i>novQ</i> -defekte Novobiocin-Cluster, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. roseochromogenes</i> varietas <i>oscitans</i> DS 12.976	Wildtypstamm, Clorobiocin-Produzent	Aventis
<i>S. roseochromogenes</i> QDCO661	<i>cloQ</i> -Defektmutante von <i>S. roseochromogenes</i>	(Pojer <i>et al.</i> , 2003b)
<i>S. roseochromogenes</i> ( $\Delta$ <i>cloN6-67</i> )	<i>cloN6</i> -Defektmutante von <i>S. roseochromogenes</i>	(Westrich <i>et al.</i> , 2003)
<i>S. roseochromogenes</i> CA-L-Q (+ <i>apra</i> )	<i>cloQcloL</i> -Defektmutante von <i>S. roseochromogenes</i> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. spheroides</i> NCIMB 11891	Wildtypstamm, Novobiocin-Produzent	The National Collections of Industrial, Food & Marine Bacteria, Ltd, Aberdeen, Schottland, Großbritannien
<i>S. spheroides</i> ( $\Delta$ <i>novQ+apra</i> )	<i>novQ</i> -Defektmutante von <i>S. spheroides</i> , Kan <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
<i>S. lividans</i> T7	<i>S. lividans</i> TK23, Thio <sup>R</sup> , <i>ble</i> , T7-RNA-Polymerase	(Heinzelmann <i>et al.</i> , 2001)
<b>Saccharomyces</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	<i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2/leu2</i> , <i>trp1-289/trp1-289</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i>	Invitrogen

**Tab. II.20: Bakterienstämme für die Testung der biologischen Aktivität**

Alle Stämme stammen aus der Stammsammlung der Firma Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz.

Stamm	Phänotyp bzw. Beschreibung	Quelle/Referenz
<b>Staphylococcus aureus</b>		
ATCC 29213		(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003)
ATCCC 43300	Meth <sup>R</sup>	Stammsammlung der Firma Basilea
80CR5	Pen <sup>R</sup> , Nov <sup>R</sup> , Rif <sup>R</sup>	(Engel <i>et al.</i> , 1980)

Stamm	Phänotyp bzw. Beschreibung	Quelle/Referenz
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>		
ATCC49619		(National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2003)
Tupelo	Van <sup>R</sup>	(McCullers <i>et al.</i> , 2000)
SL336-T	Ery <sup>R</sup> , Azi <sup>R</sup> ,	Stammsammlung der Firma Basilea
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>		
ATCC 29212	Pen <sup>S</sup> , Tmp <sup>S</sup> , Van <sup>S</sup>	(National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2003)
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>		
ATCC 19434		Stammsammlung der Firma Basilea
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
ATCC 25922		(National Committee for Clinical Laboratory Standards., 2003)
UB1005	Amp <sup>S</sup> , Azi <sup>S</sup> , Caz <sup>S</sup> , Cip <sup>S</sup> , Lev <sup>S</sup>	(el Falaha <i>et al.</i> , 1983)
DC2	Amp <sup>S</sup> , Azi <sup>S</sup> , Caz <sup>S</sup> , Cip <sup>S</sup> , Lev <sup>S</sup> (hyperpermeables Derivat von <i>E. coli</i> UB1005)	(el Falaha <i>et al.</i> , 1983)
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		
ATCC 27736	Azi <sup>R</sup> , Caz <sup>R</sup> , Imi <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	Stammsammlung der Firma Basilea
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
ATCC 27853		(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003)
K799/WT	Amp <sup>R</sup> , Azi <sup>R</sup> , Caz <sup>S</sup> , Cip <sup>S</sup> , Cro <sup>S</sup> , Ctx <sup>S</sup> , Imi <sup>S</sup> , Lev <sup>S</sup> , Tet <sup>R</sup>	(el Falaha <i>et al.</i> , 1983)
K799/61	Amp <sup>S</sup> , Azi <sup>S</sup> , Caz <sup>S</sup> , Cip <sup>S</sup> , Cro <sup>S</sup> , Ctx <sup>S</sup> , Imi <sup>S</sup> , Lev <sup>S</sup> , Tet <sup>S</sup> (hyperpermeables Derivat von <i>P. aeruginosa</i> K799/wt)	(el Falaha <i>et al.</i> , 1983)

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

**Tab. II.21: Bakterienstamm zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität.** Die im Rahmen dieser Arbeit benutzte Zelllinie stammt aus der American Type Culture Collection (www.atcc.org) und ist Teil der Stammsammlung der Firma Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz.

Zelllinie	Ursprung	Morphologie	ATCC-Nr.
Namalwa	Burkitt-Lymphom; B-Lymphozyt	Lymphoblastoid	CRL-1432

## **6. Kulturbedingungen**

### **6.1 Anzucht und Kultivierung von *E. coli***

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

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

Für die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden 800 µl Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen mit 400 µl 80%ige (v/v) Glycerinlösung versetzt und bei -70°C gelagert.

### **6.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten**

#### **6.2.1 Generelle Kultivierung**

Zur Kultivierung von Streptomyceten wurden verschiedene Fest- und Flüssigmedien, die unter Punkt 4.1.3 beschrieben sind, verwendet. Als Standardmedium wurde generell YMG-Medium und TSB-Medium eingesetzt. Die Flüssigkulturen wurden bei 30°C in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane und einer Metallspirale unter Schütteln bei 170-200 rpm für 2-3 Tage kultiviert. Für die Präparation von Protoplasten wurden die Stämme *S. coelicolor* und *S. lividans* T7 in YEME-Medium mit 0,5% Glycin und *S. coelicolor* (nov-CA7) in TSB-Medium mit 0,4% Glycin kultiviert. Die Regeneration der Protoplasten erfolgte auf R2YE-Platten und R5-Platten. Für die Isolierung genomischer DNA wurden *S. coelicolor*, *S. spheroides* und *S. roseochromogenes* in YEME-Medium oder TSB-Medium kultiviert. Entsprechende Selektionsantibiotika wurden den Medien zugesetzt.

#### **6.2.2 Produktion von Sekundärmetaboliten**

##### **6.2.2.1 Produktion von Clorobiocin und seinen Derivaten**

50 ml YMG-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) wurden mit 300 µl Glycerinkultur des Clorobiocin-Produzenten bzw. der verschiedenen Clorobiocin-Mutante beimpft. Nach 2 Tagen bei 30°C, 180 rpm wurde 50 ml Corn starch-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) angeimpft und 2-3 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert. 5 ml dieser zweiten Vorkultur wurden dann in 80 ml Distillers solubles-Produktionsmedium in 500 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) überführt und insgesamt 7-10 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert.

### 6.2.2.2 Produktion von Novobiocin und seinen Derivaten

50 ml TSB-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) wurden mit 300 µl der Glycerinkultur des Novobiocin-Produzenten bzw. der entsprechenden Mutante beimpft und bei 30°C für 2-3 Tage bei 180 rpm kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 50 ml CDM-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) umgeimpft. Nach 4 Tage bei 30°C bei 180 rpm wurden 5 ml dieser zweiten Vorkultur in 50 ml CDM-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) überführt und bei 30°C und 180 rpm für weitere 7 bis 10 Tage kultiviert.

### 6.2.3 Herstellung von Sporensuspensionen und Glycerinkulturen

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

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

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

## 6.3 Anzucht und Kultivierung von *Saccharomyces*

Die Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte in YPD-Medium bzw. SC-Minimal-Medium. Dazu wurde *Saccharomyces cerevisiae* über Nacht bei 30°C in YPD-Flüssigmedium (125 ml YPD in 500 ml Kolben mit zwei Schikanen) oder auf einer YPD-Platte (bzw. SC-Minimal-Medium) angezogen. Die Flüssigkulturen wurden zusätzlich unter leichtem Schütteln mit 170 rpm kultiviert.

Glycerinkulturen wurden durch Mischen einer Übernachtskultur mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 15% v/v) hergestellt und bei -70°C gelagert.

## **7. Methoden der Molekularbiologie**

### **7.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von DNA**

#### **7.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese mit dem gleichen Volumen einer fertigen Mischung aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Rotiphenol<sup>®</sup>, Roth, Karlsruhe) versetzt, durch Vortexen intensiv gemischt und zur Trennung der Phasen zentrifugiert (5-10 min, 21000 x g, 4°C). Die obere, wässrige, DNA-haltige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Der Vorgang wurde gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Verbleibende Phenolreste wurden durch eine anschließende Ethanol-fällung (s. 7.1.2) entfernt.

#### **7.1.2 Alkoholfällung**

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

#### **7.1.3 DNA-Quantifizierung**

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch nach einer geeigneten Verdünnung mit einem GeneQuant Photometer (Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1,0 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

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

### **7.2 DNA-Isolierung**

#### **7.2.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli***

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

Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 21000 x g, 4°C), die zur Abtrennung denaturierter Proteine und genomischer DNA dient, wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Zentrifugation für 20 min bei 21000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst.

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

### 7.2.2 Isolierung von Plasmiden aus Streptomycceten

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

### 7.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Streptomycceten

Die Isolierung genomischer DNA aus Streptomycceten erfolgte durch Lysozym-Behandlung und Phenol-Chloroform-Extraktion (Kieser *et al.*, 2000) bzw. durch die Nutzung von Kirby-Mix-Reagenz (Kieser *et al.*, 2000).

Das Zellmaterial von 50 ml einer 2-3 Tagen alten in YEME-Medium bei 30°C gewachsenen Kultur wurde geerntet (10 min, 3000 x g, 4°C) und anschließend mit 15 ml TSE-Puffer gewaschen.

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

Für die Kirby-Mix-Methode wurden ca. 100 mg Zellen in 500 µl TSE-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min bei 37°C im Wasserbad unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Anschließend erfolgte die

Zugabe von 400 µl Kirby-Mix-Reagenz. Diese Mischung wurde eine Minute stark gevortext. 800 µl Rotiphenol<sup>®</sup> wurden dazugegeben, nochmals 15 s stark gevortext und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 70 µl „ungepuffertem“ 3 M Natriumacetat-Puffer und 300 µl Rotiphenol<sup>®</sup> versetzt und 1 min gevortext. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die genomische DNA wurde durch Zugabe von 0,8-fachem Volumen an Isopropanol gefällt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde, wie oben beschrieben, gewaschen und gelöst.

### 7.2.4 DNA-Denaturierung für Transformation in Streptomycceten

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

## 7.3 Enzymatische DNA-Manipulation

### 7.3.1 Restriktionsspaltung der DNA

Analytische oder präparative Restriktionsverdau erfolgten gemäß bei der vom Hersteller angegeben, enzymespezifischen Inkubationstemperatur unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer und einer Inkubationsdauer von 1-3 h. Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 10 µl und präparative Verdau in einem größeren Volumen bis zu 100 µl durchgeführt. Erfolgte direkt nach dem Verdau keine Gelelektrophorese wurden die Restriktionsendonucleasen durch Ethanol-fällung abgetrennt oder durch Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert.

### 7.3.2 Dephosphorylierung

Um intramolekulare Ligation der DNA zu vermeiden, wurde an deren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierfür wurde die DNA-Probe mit 1x One-for-all-buffer und 0,2 U alkalischer Phosphatase (Amersham Biosciences, Freiburg) 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Erhitzen auf 85°C über 20 min und anschließender Alkoholfällung.

### 7.3.3 DNA-Ligation

Für die Ligation wurde T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH-Ende und den 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA katalysiert, eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten 1 U T4-DNA-Ligase, 1x Ligationspuffer und eine 1:1 molare Mischung aus Insert und Vektor in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl. Die Ansätze wurden entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

### 7.4 Agarose-Gelelektrophorese

#### 7.4.1 Trennbedingungen

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Molekülgröße durch die Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Verwendung von 0,4-1,5%igen Agarose- Konzentrationen führte zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,5 bis 50 kb. Zur Trennung kleinerer Fragmente im Größenbereich von 0,1 bis 0,5 kb wurde 2% (w/v) NuSieve<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> Agarose eingesetzt. 1x TAE-Puffer diente als Elektrophoresepuffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit DNA-Ladepuffer in einem Verhältnis von 3:1 versetzt. Die Elektrophorese wurde bei analytischen Gelen mit einer konstanten Spannung von 70-80 V bei RT und bei präparativen Gelen bei 20-30 V bei RT durchgeführt.

Als Standardmarker zur Größenbestimmung diente hierbei der 1 kb DNA-Leiter von Invitrogen.

#### 7.4.2 Auswertung von Agarose-Gelen

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

#### 7.4.3 Isolierung von DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen nach gelelektrophoretischer Trennung erfolgte mit Hilfe des GFT<sup>®</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers.

### 7.5 PCR-Methoden

Für die Durchführung der PCR-Reaktionen wurde eine der drei folgenden PCR-Geräte verwendet: GeneAmp<sup>®</sup> PCR-System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt), GeneAmp<sup>®</sup> PCR-System 9700 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) oder iCycler<sup>®</sup> PCR-System (Bio-Rad, München). Die verwendeten Oligonucleotid-Primer sind in Tabelle II.17 und II.18 aufgelistet und wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Alle PCRs wurden unter der Verwendung des Expand High Fidelity PCR System (Roche Biochemicals, Mannheim) durchgeführt.

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

### 7.5.1 Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette von pUG019 und Spectinomycin/Streptomycin-Kassette aus pIJ778

Für die Amplifikation der Apramycin-Resistenzkassette von pUG019 und pIJ778 (REDIRECT<sup>®</sup> technology kit for PCR targeting (Gust *et al.*, 2003)) wurden folgende PCR-Bedingung verwendet.

Ansatz 50µl:

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Reaktionsbuffer (10x)	1 x
Template-DNA	100 ng
Primer	50 pmol (je Primer)
dNTPs	0,25 mM (je Nucleotid)
DMSO	5% (v/v)
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U

Temperaturprofil:

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	<b>50°C*</b>	45 s	10
Elongation	72°C	90 s	
Denaturierung	94°C	45 s	
Annealing	<b>55°C*</b>	45 s	20
Elongation	72°C	90 s	
Terminale Elongation	72°C	5 min	1
Kühlung	4°C	∞	

\* Bei der Amplifikation der Spectinomycin/Streptomycin-Kassette wurden Annealingtemperaturen von 45°C bzw. 48°C verwendet.

Die Template-DNA wurde durch Verdau von 10 µg pIJ778 bzw. 20 µg pUG019 mit *EcoRI*, *HindIII* und *DraI* vorbereitet. *DraI* schneidet dreimal im Vektor-Backbone und wird verwendet, um die Aufreinigung der Kassette durch Gelelektrophorese zu vermeiden. Nach Verdau wurde der Ansatz durch Isopropanolfällung aufkonzentriert.

### 7.5.2 Bedingungen zur Amplifikation der (His)<sub>6</sub>-Tag-Apramycin-Kassette mittels Double-joint-PCR

Für die Insertion des (His)<sub>6</sub>-Tag vor das Gen *cloN6* wurde eine Double-joint-PCR (zweistufige PCR) durchgeführt. Bei der ersten PCR wurde ein Annealing des cloN6insN\_zw und des cloN6NW\_rev Primers bei 57°C (15 Zyklen) durchgeführt. Das entstandene Produkt bildet bei der zweiten PCR den Reverseprimer. Für diese zweite PCR wurde aus dem Ansatz der ersten PCR direkt ein Aliquot entnommen und für die zweite PCR mit der Aprakassette benutzt, bei der zusätzlich cloN6insN\_for und nochmals cloN6NW\_rev eingesetzt wurde.

1. Annealing der Primer cloN6ins\_zw und cloN6NW\_rev:

Ansatz 50µl:

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Reaktionsbuffer (10x)	1 x
Primer	70 pmol (je Primer)
dNTPs	0,25 mM (je Nucleotid)
DMSO	5% (v/v)
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U

Temperaturprofil:

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Hotstart	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	40 s	
Annealing	57 °C	40 s	15
Elongation	72 °C	15 s	
Kühlung	4 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde direkt aus diesem Ansatz für die zweite PCR verwendet.

2. Amplifikation der Apramycin-Kassette

Verwendete Primer: cloN6N\_for, Aliquot der ersten PCR und cloN6NW\_rev

Ansatz 50µl:

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>
Reaktionsbuffer (10x)	1 x
Template-DNA	100 ng
Mix von 1. PCR	5 µl
Primer	50 pmol (je Primer)
dNTPs	0,25 mM (je Nucleotid)
DMSO	5% (v/v)
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U

Temperaturprofil:

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Hotstart	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	40 s	
Annealing	57°C	40 s	28
Elongation	72°C	90 s	
Kühlung	4°C	∞	

### 7.5.3 PCR-Amplifikation und Klonierung des Gens *cloN6*

Für die Amplifikation des Gens *cloN6* aus *S. roseochromogenes* wurden die Cosmide clo-BG1 und D1A8 sowie das Plasmid pCA3 verwendet.

Für die Klonierung und Überexpression wurde jeweils ein 1,7 kb großes DNA-Fragment per PCR amplifiziert.

Um das PCR-Produkt zur Klonierung in pQE70 zur Expression mit C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag herzustellen, wurden die Primer cloN6SQ\_f und cloN6Q\_r verwendet, welche eine *SphI*-Schnittstelle bzw. eine in *BglII*-Schnittstelle enthalten. Die Einführung der *BglII*-Schnittstelle bewirkte die Entfernung des natürlichen Stopcodons und führte zu einer In-Frame Ligation des C-Terminus an den (His)<sub>6</sub>-Tag. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit *SphI* und *BglII* verdaut. Das 0,6 kb große *SphI/SphI*-Fragment wurde in pcDNA2.1 einkloniert (pCA6); das 1,1 kb *SphI/BglII*-Fragment wurde direkt in pQE70 einkloniert (pCA5/1). Nach weiterem *SphI*-Verdau des Plasmides pCA6 wurde das 0,6 kb *SphI/SphI*-Fragment in pCA5/1 einkloniert, resultierend im Expressionskonstrukt pCA5.

In einem weiteren Ansatz wurde *cloN6* mit den Primern cloN6Q\_f und cloN6Q\_r amplifiziert, um eine mögliche weitere Klonierung in pQE60 zur Expression mit C-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag vorzubereiten. Auch hier ermöglicht die Entfernung des natürlichen Stopcodons eine „in-frame“ Ligation des C-Terminus an den (His)<sub>6</sub>-Tag. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor kloniert (pCA3). Eine weitere Klonierung in pQE60 erfolgte aufgrund der erfolgreichen Klonierung in den Vektor pQE70 nicht mehr.

Zur Klonierung in pGEX-4T-1 zur Expression mit einem N-terminalem GST-Tag wurde ein PCR-Produkt mit den Primern cloN6Q\_f (*BamHI*-Schnittstelle) und cloN6G\_r (*NotI*-Schnittstelle) hergestellt. Als Template diente hier das Konstrukt pCA3. Die anschließende Klonierung in pGEX-4T-1, nach Verdau mit *NotI* und *BamHI*, führte zum Konstrukt pCA4.

Die Amplifikation von *cloN6* mit den Primern cloN6QE\_f und cloN6\_r, die eine *BamHI*-Schnittstelle bzw. eine *HindIII*-Schnittstelle enthalten, ermöglichte eine Klonierung in den Expressionsvektor pHis8, der eine Expression des Proteins mit einem N-terminalem (His)<sub>8</sub>-Tag ermöglicht. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pCA9 erhalten wurde. Eine anschließende Umklonierung des *BamHI/HindIII*-Fragmentes in den Expressionsvektor pHis8 führte zu dem Konstrukt pCA11.

Bei der Benutzung des Primerpaares cloN6\_f und cloN6\_r werden eine *BamHI*-Schnittstelle und eine *HindIII*-Schnittstelle eingeführt, die eine Klonierung in den Expressionsvektor pRSET B mit N-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag gestatten. Das erhaltene PCR-Produkt wurde aufgereinigt, in den pGEM-T-Vektor kloniert (pCA1) und anschließend in den Expressionsvektor pRSET B einkloniert (resultierendes Konstrukt pSH1).

Die verschiedenen PCR-Amplifikationen wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt, wobei die Annealingtemperaturen und -dauer jeweils angepasst wurden:

Ansatz 50µl:

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration</u>
Reaktionsbuffer (10x)	1 x
Template-DNA	100 ng
Primer	50 pmol (je Primer)
dNTPs	0,25 mM (je Nucleotid)
DMSO	5% (v/v)
DNA-Polymerase-Mix	2,5 U

Temperaturprofil:

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Hotstart	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	40 s	
Annealing	A*°C	B* s	30
Elongation	72°C	90 s	
Kühlung	4°C	∞	

\* Annealingtemperaturen und Annealingdauer:

<b>Zielvektor</b>	<b>Temperatur</b>		<b>Dauer</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	
pQE60	50°C		90s
pQE70	65°C		90s
pGEX	55,5°C		90s
pHis8	46°C		90s
pRSET B	50°C		45s

Die Klonierung in den Vektor pGM9 erfolgte durch eine Fusion mit dem Plasmid pSH1. Dazu wurde pSH1 und pGM9 mit *HindIII* geschnitten und miteinander ligiert. Die Orientierung wurde überprüft. Das erhaltene Konstrukt trägt die Bezeichnung pCA2.

Für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* wurde *cloN6* in pYES2/NT-C kloniert. Dazu wurde *cloN6* aus dem Plasmid pCA4 mit *BamHI* und *NotI* Verdau isoliert und anschließend pYES2/NT-C über die gleichen Schnittstellen inkloniert. Das resultierende Expressionskonstrukt trägt die Bezeichnung pCA8.

## 7.6 Southern Hybridisierung

Alle verwendeten Lösungen und Puffer für die Southern Hybridisierung sind in Tabelle II.10 aufgelistet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach den Angaben der jeweils benutzten Kits durchgeführt. Für die Durchführung aller Arbeitsschritte wurden puderfreie Handschuhe getragen und alle benutzten Glas- und Plastikartikel wurden vor Benutzung mit Wasser gewaschen.

### 7.6.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Um DNA-Fragmente als Sonden für die Southern Hybridisierung nicht radioaktiv zu markieren, wurde das DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim, Mannheim) eingesetzt. Die zu markierende DNA (300 ng – 1 µg) wurde nach Restriktionsverdau gefällt und in 16 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA für 10 min bei 100°C und Abkühlen in flüssigem Stickstoff wurde der Ansatz mit 4 µl DIG High Prime-Lösung versetzt und 20 h bei 37°C inkubiert. Dabei kommt es zum zufälligen Einbau von DIG-gekoppeltem dUTP während der DNA-Synthese mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Nach beendeter Reaktion wurde überschüssiges DIG-dUTP durch eine Lithiumchlorid-Ethanol-Fällung entfernt. Die Quantifizierung der Sonde bzw. die Überprüfung der Labeling-Effizienz wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 7.6.2 Southern Blot

Genomische DNA der zu untersuchenden Streptomycceten-Stämme wurde mit dem ausgewählten Restriktionsenzym über Nacht bei 37°C verdaut, anschließend alkoholisch gefällt, in 10 µl TE-Puffer aufgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurden der 1 kb Marker und der DIG Marker Nr. VII aufgetragen. Nach Überprüfung der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 2 min bei RT mit Depurinierungslösung behandelt, dann mit Wasser kurz gewaschen und anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Depurinierungslösung bewirkt bei größeren DNA-Fragmenten (> 10 kb) Strangbrüche, die den Transfer dieser DNA-Stücke beim Blotten erleichtert. Nach zweimaligem Waschen des Gels von je 15 min in Neutralisierungslösung wurde der Transfer der einzelsträngigen DNA über einen Zeitraum von 16 h auf eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) mittels Kapillartransfer mit 20x SSC-Puffer durchgeführt. Durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm für 60 s auf der Vorder- und 30 s auf der Rückseite wurde die transferierte DNA fixiert.

### 7.6.3 Hybridisierung, Detektion und Stripping

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

Die Detektion erfolgte unter Anwendung der Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran zunächst 1 min mit Maleinsäure-Puffer äquilibriert, dann 30 min mit Blocking-Lösung und 30 min mit Antikörperlösung inkubiert. Für die Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran zweimal 15 min in Tween-Waschpuffer geschwenkt und anschließend 5 min mit Detektions-Puffer behandelt. Danach wurde die Membran mit einigen Tropfen CSPD-Lösung benetzt, in eine Fotokassette eingelegt und 30-60 min bei 37°C mit einem Hyperfilm ECL- Röntgenfilm (Amersham Biosciences, Freiburg) inkubiert. Der Film wurde anschließend 3 min entwickelt, 3 min fixiert und gut getrocknet.

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

## 7.7 Transformation und Elektroporation von DNA in *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1

### 7.7.1 CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation in *E. coli*

#### **Herstellung kompetenter Zellen:**

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

#### **Transformation:**

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

#### **Blau-Weiß-Selektion:**

Bei Verwendung von Klonierungsvektoren mit *lacZ'*-Gen wurde zur Detektion rekombinanter Plasmide eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurden 20 µl der IPTG-Lösung (47 mg/ml) mit 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gemischt, auf die Agarplatte pipettiert und ausplattiert. Nach kurzem Antrocknen wurden 20 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) mit 80 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gemischt und ebenfalls auf die Platte ausplattiert. Zum Verdampfen des toxischen DMF wurden die Platte 30 min lang unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden die Transformationsansätze wie zuvor beschrieben ausplattiert und inkubiert.

### 7.7.2 Elektroporation in *E. coli*

#### **Herstellung elektro-kompetenter Zellen:**

50 ml SOB- oder LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* inokuliert und bei 30°C oder 37°C\* und 170 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 weiterkultiviert (3-6 h). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4°C) geerntet und zweimal mit 5 und 25 ml eiskalter 10%iger (w/v) Glycerinlösung vorsichtig gewaschen. Das Zellpellet wurde in dem

verbleibenden Tropfen des Waschüberstandes resuspendiert, in Aliquots zu je 50 µl geteilt und bei -70°C eingefroren.

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

### **Elektroporation:**

Die DNA (ca. 100 ng in 1-2 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) wurde mit 50 µl kompetenten Zellen gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm) überführt und luftblasenfrei verschlossen. Die Elektroporation wurde mit einem BioRad Elektroporator bei einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt. Die ideale Zeit-Konstante liegt dabei zwischen 4,5–5,0 ms. Anschließend wurden 1 ml LB-Medium in die Küvette pipettiert, die erhaltene Suspension in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 37°C und 170 rpm für 60 min inkubiert. Diese Zellsuspension wurde dann auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert (maximal 200 µl pro Platte) und die Platten bei 30-37°C über Nacht inkubiert.

### **7.7.3 Elektroporation in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1**

Eine Einzelkolonie *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 wurde durch Ausstreichen auf eine YPD-Platte und Kultivierung bei 30°C erhalten. Diese Kolonie wurde in 10 ml YPD-Flüssigmedium im 100 ml Kolben bei 30°C über Nacht kultiviert. Zur Transformation wurde 1 ml dieser Vorkultur in 125 ml YPD in 500 ml Kolben mit zwei Schikanen umgeimpft. Nach 21 h bei 30°C, 180 rpm und einer OD<sub>600</sub> von 0,9 wurde die Kultur bei 5000 rpm, 4°C, 5 min zentrifugiert, mit 250 ml sterilem Wasser gewaschen und wieder abzentrifugiert. Nach Waschen mit 125 ml Wasser und 15 ml 1 M Sorbitol wurde das erhaltene Pellet in 0,25 ml 1 M Sorbitol resuspendiert und 40 µl Zellen mit 100 ng DNA elektroporiert (1,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Danach wurde sofort 1 ml kaltes 1 M Sorbitol dazugegeben und auf SC-U-Platten ausplattiert und die Platten bei 30°C über Nacht inkubiert.

## **7.8 Transformation und Konjugation von DNA in Streptomyceten**

### **7.8.1 PEG-abhängige Protoplastentransformation (modifiziert, nach Kieser *et al.*, 2000)**

#### **Herstellung von Protoplasten:**

Von *S. coelicolor* M512, *S. coelicolor* (clo-CA5) und *S. lividans* T7:

50 ml YEME-Medium mit 0,5% Glycin wurden mit 1 ml HA-Vorkultur (2 Tage, bei 30°C und 170 rpm) des entsprechenden Stamms beimpft und 48 h bei 30°C und 170 rpm kultiviert. Nach Abtrennung des Mediums (10 min, 3000 x g, 4°C) wurden die Zellen zweimal mit 15 ml 10,3%ige (w/v) Saccharoselösung gewaschen, in lysozymhaltigen Protoplastierungspuffer (3-4 ml P-Puffer/g Zellen; 4 mg Lysozym/ml P-Puffer) resuspendiert und bei 30°C für 15-60 min unter leichtem Schütteln inkubiert.

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

### Von *S. coelicolor* (nov-CA7):

Die Protoplastierung von *S. coelicolor* (nov-CA7) wurde, wie zuvor beschrieben, mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Zellanzucht erfolgte in TSB-Medium mit 0,4% Glycin.

Die Protoplasteneffizienz wurde überprüft. Dazu wurden 10 µl der Protoplastensuspension mit 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und auf eine R2YE-Platte ausplattiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die gleiche Menge Protoplastensuspension mit 200 µl P-Puffer ausplattiert wurde. Durch das Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen der Protoplastensuspension mit P-Puffer konnte die Anzahl der regenerierungsfähigen Protoplasten bestimmt werden. Die Ausplattierung wurde durch Überschichtung mit 3 ml R3-Weichagar durchgeführt, um mechanischen Stress und Lyse zu vermeiden. Die Platten wurden bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

### **Transformation:**

Die Transformation wurde durch die modifizierte Polyethylenglykol-vermittelte Transformation nach Kieser *et al.* (2000) durchgeführt. Für die Transformation wurden zu 200 µl Protoplastensuspension, die etwa 10<sup>8</sup> Protoplasten pro ml enthielt, 10-20 µg unmethylierte DNA (isoliert aus *E. coli* ET12567) zugegeben, mit 500 µl Transformations-Puffer (T-Puffer) versetzt, durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und 1 min bei RT inkubiert. *S. lividans* T7 trägt im Gegensatz zu den anderen transformierten Stämmen kein methyl-sensibles Restriktionssystem. Hier kann deshalb auch DNA aus den üblichen *E. coli*-Stämmen wie XL1Blue MRF' verwendet werden. Verschiedene Volumina des Transformationsansatzes wurden mit Hilfe von 40-50°C warmen R3-Weichagar (3 ml/Platte) auf R2YE-Platten bzw. R5-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 16-18 h inkubiert. Für die Selektion der Mutanten wurden die Platten mit 3 ml Nutrient-Weichagar mit entsprechendem Antibiotikum überschichtet. Nach weiterer Inkubation von 5-10 Tage bei 30°C wurden die erhaltenen Transformanten mit sterilen Zahnstochern gepickt und quadratförmig auf MS-Agarplatten bzw. R5-Platten mit dem Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

### **7.8.2 Konjugation von DNA in Streptomyceten**

Das Einbringen von DNA durch Konjugation von *E. coli* mit *Streptomyces* wurde mit kleinen Modifikationen durchgeführt (Kieser *et al.*, 2000). Es wurde der Donor-Stamm *E. coli* ET12567 verwendet, der das Plasmid pUZ8002 trägt (pUZ8002 trägt die Transferfunktionen).

Das zu konjugierende Plasmid oder Cosmid (mit *oriT*) wurde durch Elektroporation in *E. coli* ET12567/pUZ8002 eingebracht und auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml),

Thiostrepton (25 µg/ml) und dem entsprechenden Antibiotikum des Plasmides selektiert. 5 ml LB-Medium wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 170 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:1000 in LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthält, verdünnt und bei 37°C und 170 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 weiterkultiviert (3-6 h). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4000 x g, 4°C) geerntet und zweimal mit dem gleichen Volumen LB (ohne Antibiotika) vorsichtig gewaschen und in 100 µl LB-Medium resuspendiert.

### Konjugation in *Streptomyces spheroides*:

Ein Aliquot einer Sporensuspension von *S. spheroides*, welches ca. 10<sup>8</sup> Sporen enthält, wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 0,5 ml der *E. coli* Suspension, die oben beschrieben wurde, gemischt.

### Konjugation in *Streptomyces roseochromogenes* QDCO661:

Frisches Mycel von einer 50 ml TSB/YEME 1:1 Kultur wurde anstatt der Sporen benutzt. Nach Zentrifugation wurde das Mycel mit 10,3%iger Sucrose-Lösung gewaschen und in 15 ml 2xYT Medium resuspendiert. 0,5 ml dieser Suspension wurde vorsichtig mit 0,5 ml der oben beschriebenen *E. coli* Suspension gemischt.

Die Konjugationsansätze wurden jeweils auf zwei MS-Platten mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. im Fall der Konjugation mit *S. roseochromogenes* QDCO661 ohne 10 mM MgCl<sub>2</sub>, ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 18 h bzw. im Fall der Konjugation mit *S. spheroides* 24 h inkubiert und anschließend mit 1 ml sterilem Wasser, das 0,5 mg Nalidixinsäure und die entsprechenden Menge des entsprechenden Antibiotikums enthält, überschichtet. Nach weiterer Inkubation von 5-10 Tage bei 30°C wurden die erhaltenen Exkonjuganten mit sterilen Zahnstochern gepickt und quadratförmig auf MS-Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum und 25 µg/ml Nalidixinsäure ausgestrichen.

## 7.9 DNA-Sequenzierung und computerunterstützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von rekombinanten Plasmiden wurde mit Hilfe der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt.

Das Programm DNASIS für Windows Version 2.1 (Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA) ermöglichte die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen. Homologievergleiche auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene wurden unter Verwendung des BLAST-Programmes (Version 2.0) über die Internetseite "[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)" erzielt.

## 8. Methoden der Biochemie und Biologie

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Sammelgel (4% Polyacrylamid) und Trenngel (12% Polyacrylamid) wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde die Mini-Protean 3 Apparatur von BIORAD, München verwendet. Die verwendeten Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers, wie unter 4.3.6 beschrieben, angefertigt. Die zu analysierenden Proteinproben (10 µl) wurden unmittelbar vor dem Auftrag auf das Gel mit zweifach

konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und durch 10 min Kochen im Wasserbad bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 200 V über 30-50 min durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele 5 min in Fixierlösung und anschließend 20 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Behandlung mit Entfärbelösung für 60-90 min und anschließendem Waschen mit Wasser entfärbt.

Als Markerproteinlösung wurde ein Protein Molekulargewichtsmarker (Amersham Biosciences, Freiburg) mit Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet.

### 8.1 Heterologe Expression von Proteinen

#### 8.1.1 Expression in *E. coli* XL1Blue MRF' und *E. coli* BL21(DE3)/pLysS

100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei 16°C, 30°C oder 37°C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,7 kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG (Endkonzentrationen: 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM und 2,0 mM). 6 bzw. 20 Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet (10 min, 4000 x g, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

Zusätzlich erfolgte bei Expressionen des Konstruktes pSH1 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS eine Supplementierung des LB-Mediums mit 1  $\mu$ M Kobaltchlorid und/oder 1  $\mu$ M Methylcobalamin und/oder 100  $\mu$ l/100 ml LB-Medium Spurenelementelösung.

Alternativ wurde eine Expression mit den Konstrukten pCA7 und pCA11 unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Liter TB-Medium mit Carbenicillin (50  $\mu$ g/ml) bzw. bei Verwendung von *E. coli* BL21(DE3)/pLysS und dem pHis8-Konstrukt pCA11 1 Liter TB-Medium mit Kanamycin (50 $\mu$ g/ml) und Chloramphenicol (35  $\mu$ g/ml) wurden mit 35 ml einer LB-Übernachtskultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Abkühlung auf 20°C mit 0,5 mM IPTG. 6 Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet (10 min, 4000 x g, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

#### 8.1.2 Expression in *Streptomyces lividans* T7

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

### 8.1.3 Expression in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 (Ausubel *et al.*, 1996)

Eine Einzelkolonie wurde in 15 ml SC-U Flüssigmedium (100 ml Kolben) bei 30°C über Nacht angezogen. Die OD<sub>600</sub> der Vorkultur wurde gemessen und die Menge Vorkultur mit der folgenden Formel bestimmt, die umgeimpft werden muss, damit in der Expressionskultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erzielt wird:

$$\frac{(0,4 \text{ OD}_{600}/\text{ml}) * 50 \text{ ml}}{\text{bestimmte OD}_{600}} = x \text{ ml Vorkultur}$$

Die bestimmte Menge wurde abzentrifugiert und im Induktionsmedium resuspendiert. Das Medium wurde auf 50 ml ergänzt und im 300 ml Kolben mit 2 Schikanen bei 30°C 24 h kultiviert. 5 ml der Kultur wurden sofort als Nullprobe bzw. nach 24 h als „Nach“-Probe entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert (1500 x g, 4°C, 5 min), mit 500 µl Wasser gewaschen (14000 rpm, 4°C, 30 sec) und bei -70°C gelagert.

## 8.2 Rohextraktherstellung

### **Aufschluss der *E. coli*- und Streptomyceten-Zellen:**

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

Alternativ wurden Zellen aus der Expression in TB-Medium mit 0,5 mg/ml Lysozym versetzt und bei 4°C unter Rühren aufgetaut. Für 10 g Zellen wurden ca. 25 ml Lysepuffer verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte anschließend mittels Ultraschall (flache Spitze) so lange, bis eine viskose homogene Mischung vorlag (ca. 30 min). Durch Zentrifugation (45 min, 55000 x g, 4°C) erfolgte eine Abtrennung der zellulären Bestandteile.

Bei Verwendung des Konstruktes pCA4, das eine Expression des Proteins mit einem GST-Tag ermöglicht, erfolgte ein modifizierter Zellaufschluss nach Herstellerangabe (Amersham Biosciences, Freiburg). Dazu wurde das Zellpellet in 20 ml PBS resuspendiert und mit Ultraschall 5x30 sec mit jeweils 30 sec Pause behandelt. 1052 µl 20%ig Triton X-100 wurden dazugegeben und 30 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (10 min, 15.000 rpm) und anschließend gereinigt.

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

### **Glass beads Aufschluss der *Saccharomyces cerevisiae* Zellen:**

Die Zellen *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 wurden mit 500 µl Breaking-Puffer gewaschen und in so viel Breaking-Puffer resuspendiert, dass die OD<sub>600</sub> bei 50-100 lag (Formel zur Berechnung bei 8.1.3). Ein gleich großes Volumen säuregewaschener Glaskügelchen (Ø 0,4-0,6mm) wurde dazugegeben und die Zellen mit 4 x 30 sec gevortext mit jeweils 30 sec Pause auf Eis. Nach 10 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und mit SDS-Page analysiert.

### **8.3 Reinigung von Fusionsproteinen**

#### **8.3.1 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie**

Die Metallaffinitätschromatographie wurde für die Reinigung der Histidin-Fusionsproteine vom löslichen Zellextrakt verwendet. Dabei wurde Nickel-Nitriloacetat (Ni-NTA)-Agarose (Qiagen, Hilden) verwendet und die Reinigung unter Anwendung der Anleitung des Herstellers in „The QIAexpressionist“ durchgeführt. Es wurden 2-4 ml zellfreier Rohextrakt mit 0,5-1 ml Ni-NTA-Suspension (50% (w/v) Ni-NTA-Agarose in 30% (v/v) Ethanol: Bindungskapazität: 5-10 mg 6xHis-Fusionsprotein pro ml Material), je nach Proteingehalt, gemischt und 1 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine leere Säulenhülse überführt, die Säule zweimal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen und die Säule mit je 1 ml Elutionspuffer gespült, um die (His)<sub>6</sub>- Fusionsproteine zu eluieren.

Zur Reinigung der Histidin-Fusionsproteine vom löslichen Zellextrakt der Expressionen in TB-Medium wurden die Ni-NTA-Säulen mit 1,4 ml Ni-NTA-Suspension befüllt und eine Fritte knapp über der Ni-Agarose angebracht. Die Säulen wurden mit 20 ml Lysepuffer (Kristallisation) äquilibriert und anschließend der Rohextrakt aufgetragen. Nach Waschen mit 3 mal 15 ml Waschpuffer (Kristallisation) wurde 5 mal mit 0,5 ml und 4 mal 1 ml Elutionspuffer (Kristallisation) eluiert.

#### **8.3.2 Reinigung von Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteinen**

Die Reinigung wurde nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Dazu wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss zu 400 µl 50 % Glutathionsepharose gegeben und bei 4°C 1 h gerührt. Nun wurde die Suspension in eine leere Säule gefüllt, 3 mal mit 4 ml PBS gewaschen und 5 mal nach 10 min Inkubation mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

### **8.4 Bestimmung der Amidsynthetase-Aktivität**

Der Amidsynthetase-Assay enthielt in einem Reaktionsvolumen von 100 µl 1 mM Ring A oder Ring A-Analogon, 1 mM Ring B von Novobiocin (methyliert an C-8') bzw. 1 mM Novenamin, 5 mM ATP, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 10 µg der entsprechenden Amidsynthetase (NovL, CloL, CouL oder SimL). Die Reaktionsansätze wurden 30 min bzw. 1,5 h bei 30°C inkubiert und dann mit 5 µl 1,5 M Trichloressigsäure-Lösung abgestoppt. Für die Analyse der Assayprodukte wurden die Ansätze wie unter 12.4 beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert.

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

## 8.5 Bestimmung der antimikrobiellen, gyrasehemmenden und zytotoxischen Aktivitäten

### 8.5.1 Reporter-Gene-Assay

Für das Reporter-Gene-Assay wurden Übernachtskulturen von *E. coli* DC2 mit den entsprechenden Konstrukten (Basilea Pharmaceutica, Basel, Schweiz) mit 10 µg/ml Tetracyclin in LB-Medium bei 37°C angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen 1:100 mit LB (ohne Tetracyclin) verdünnt und nochmals für 1,5 h inkubiert.

Folgende Konzentrationen der Derivate wurden für die Bestimmung benutzt:

100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,563; 0,78 µM.

Als Kontrollen wurden Assays mit Novobiocin, Clorobiocin und eine Negativkontrolle ohne Compound durchgeführt.

Pro Assay (Mikrotiterplatten) wurde 100 µl Kultur verwendet und 5 h bei 37°C auf einem Vibrationsschüttler inkubiert. Danach wurde sowohl die OD der Kultur bei 595 nm als auch die Bioluminescence gemessen. Zur Normalisierung der Lichtausbeute RLU (Relative Light Units) mit dem bakteriellen Wachstum wurde die Lichtausbeute durch die OD der Kultur geteilt. Um den Induktionsfaktor zu bestimmen, wurde dieser normalisierte Wert in Anwesenheit eines Compounds durch den normalisierten Wert in Abwesenheit eines Compounds (Negativkontrolle) dividiert.

### 8.5.2 Supercoiling- und Triplex-Assay

Für die Testung der Novclobiocine auf DNA-Gyrase-hemmende Aktivität wurde der DNA Gyrase Assay Kit (John Innes Enterprises Ltd., Norwich, UK) eingesetzt. Der Supercoiling-Assay enthielt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 35 mM Tris-HCl (pH 7,5), 24 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1.8 mM Spermidin, 1 mM ATP, 6,5% (w/v) Glycerol, 2 µg BSA, 10 nM GyrA und 9,3 nM GyrB (von *E. coli*), 500 ng relaxierte pBR322-DNA sowie unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanzen.

Die Testsubstanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,01 und 100 µM mit einer Endkonzentration von DMSO von 1% (v/v) zu den Ansätzen gegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Abkühlen auf Eis sowie durch den Zusatz von 30 µl STEB Puffer und 15 µL Chloroform-Isoamylalkohol-Puffer gestoppt und mittels DNA Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel analysiert.

Der inhibitorische Effekt der verschiedenen Novclobiocine wurde als IC<sub>50</sub> ausgedrückt, d.h. als diejenige Konzentration des eingesetzten Aminocoumarins, die eine Hemmung der Supercoiling Aktivität der Gyrase um 50% bewirkte.

Der Triplex-Formation-Assay basiert auf eine bereits publizierte Methode (Maxwell *et al.*, 2006) und wurde in schwarzen streptavidin-überzogenen 96-Well Mikrotiterplatten (Pierce) mit einem Endvolumen von 30 µl und den gleichen Bestandteilen, wie schon bei der Durchführung des Supercoiling-Assays beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurde statt dem pBR322 der relaxierte pNO1 verwendet. Die SigmaPlot Version 10 Software wurde zur Auswertung benutzt.

### 8.5.3 ATPase-Assay

Der ATPase-Assay basiert auf einer publizierten Methode (Rowlands *et al.*, 2004), die modifiziert wurde. Der Assay wurde in 96 Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Anstatt des beschriebenen Hsp90 wurde die Untereinheit B der *E. coli* Gyrase eingesetzt und der Reaktionspuffer angepasst. Er beinhaltete 50 mM Tris-HCl, (pH 7,6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM EDTA und 1 mM ATP. 25 µl einer Mischung von 625 µl kaltem Reaktionspuffer und 2,5 µl *E. coli* Gyrase Untereinheit B mit einer Endkonzentration von 100 nM pro Assayansatz wurden eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in Konzentrationen zwischen 0,008 und 10 µM mit einer Endkonzentration von DMSO von 4% (v/v) zu dem Assayansatz gegeben. Anschließend wurden die Platten eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Zwei Stunden vor Gebrauch wurde das Malachitgrün-Reagenz hergestellt. Es bestand aus Malachitgrün (0,0812%, w/v), Polyvinylalkohol (2,32%, w/v), Ammoniummolybdat (5,72%, w/v, in 6 M HCl), und tridest. Wasser, gemischt in einem Verhältnis von 2:1:1:2. Das Reagenz wechselt im Laufe von 2 h Inkubation bei Raumtemperatur die Farbe von Dunkelbraun nach Goldgelb.

Um die ATPase-Reaktion zu stoppen, wurden jedem Well 80 µl des Malachitgrün-Reagenzes, gefolgt von 10 µl einer 34%igen Natriumcitrat-Lösung zugegeben (Lanzetta *et al.*, 1979). Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 620 nm gemessen und der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt.

### 8.5.4 Bioassay mit *Bacillus subtilis*

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

4,6 g Nutrient Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) wurden in 200 ml Wasser suspendiert und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 45°C wurden ca.  $2 \times 10^5$  *Bacillus subtilis*-Sporen/ml Medium zugesetzt. Unterschiedliche Mengen der zu testenden Substanzen wurden als methanolische Lösung in einem Volumen von 1-10 µl auf Filterplättchen (d=6 mm; Macherey-Nagel, Düren), die bereits auf die Agarplatten aufgebracht worden waren, aufgetragen und 30 min an der Luft getrocknet. Als Negativkontrolle dienten 10 µl reines Methanol. Die Bioassay-Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Maß für die antibiotische Aktivität diente der resultierende Hemmhofdurchmesser im Vergleich zu Clorobiocin als Standard.

### 8.5.5 MIC-Bestimmung

Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen der aktivsten Novclobiocine sowie von Novobiocin und Clorobiocin als Standard wurden mit Hilfe einer Medien-Verdünnungsmethode im µl-Maßstab nach den Angaben des National Committee for Clinical Laboratory Standards durchgeführt (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003). Dazu wurden Mikrotiterplatten (96 Wells/Platte; Endvolumen der Assays: 100 µl pro Well) zunächst mit 50 µl eines geeigneten Wachstumsmediums für den jeweiligen Teststamm befüllt. In diesem Medium wurden

Verdünnungsreihen der Testsubstanzen (0,06-32 µg/ml) angelegt. Die Platten wurden mit  $5 \times 10^5$  Zellen einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase pro ml Assayansatz inokuliert und über Nacht bei 35°C als Standkultur inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgte durch optische Inspektion mit Hilfe eines beleuchteten Mikrotiterplatten-Lesegerätes mit Vergrößerungsspiegel (MIC-2000, Cooke Laboratory Products, Alexandria, Virginia).

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

### 8.5.6 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität

Die Proben wurden in DMSO zum 200-fachen ihrer gewünschten Endkonzentration verdünnt. Anschließend wurden die Proben 1:40 mit dem Kulturmedium (serumfreies HL-Medium (Schumpp und Schlaeger, 1990), dem  $\text{Ca}^{2+}$  fehlte, mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) verdünnt. 5 µl Aliquots dieser Kultur wurden vervierfacht, in sterile 384-Well Platten überführt und mit 20 µl einer Namalwa Zellsuspension ergänzt (75000 Zellen/ml Medium). Medium ohne Zellen wurde als Kontrolle benutzt. Die Endkonzentration von DMSO betrug 0,5% pro Well. Die Platten wurden bei 37°C/5%  $\text{CO}_2$  für 48 h inkubiert. Dann wurde 2,5 µl WST-1 (Roche) zugegeben und weitere 2 h inkubiert, bevor die Absorption bei 440 nm mit einem Analyst Lesegerät bestimmt wurde. Relative Viabilitäten (korrigiert mit %-Leerwert der Kontrolle) wurden durch die Analyse der Rohdaten mit Excel berechnet.  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen wurden mittels GraphPad Prism bestimmt.

### 8.5.7 Bestimmung der Bindungsenergien

Im ersten Schritt zur Berechnung der Bindungsenergien wurden die neuen Derivate manuell gedockt, in dem die Struktur der *E.coli* GyrB 24 kDa Domäne im Komplex mit Clorobiocin genutzt wurde (pdb code 1kzn). Der Bindungsmodus des Clorobiocins wurde als Startpunkt angenommen. Für die Isonovoclobiocine, die die 5-Methylpyrrol-2-carbonyl Gruppe an Position 2'' des Desoxyzuckers tragen, wurde kein passender Bindungsmodus gefunden. Sie wurden von der Berechnung der Bindungsenergien ausgenommen. Anschließend wurde das Docking der Derivate optimiert, in dem die Moloc Software mit standardisiertem Kraftfeld und Optimierungsparametern genutzt wurde. Die errechneten Bindungsenergien  $E_{(\text{uncorr})}$  wurden mit dem Energiewert  $E_{(\text{strain})}$  korrigiert. Dieser Energiewert  $E_{(\text{strain})}$  wurde erhalten durch die Differenz zwischen den angepassten Energien  $E_{0(\text{vac})}$  der Derivate im gewählten Bindungsmodus im Vakuum und der Energien  $E_{\text{opt}(\text{vac})}$  der Derivate nach Optimierung im Vakuum.

## 9. Konstruktion der Deletionsmutanten

Für die Inaktivierung der Gene *cloQ*, *cloL* und *novQ* in den Cosmiden clo-BG1, clo-CA1, nov-BG1 bzw. in 10-9c sowie zum Austausch der Ampicillin-Resistenzkassette im Cosmid D1A8 und 10-9c wurde das PCR-Targeting angewendet (Gust *et al.*, 2003). Für die Inaktivierungen wurde die Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV*) verwendet, die durch *EcoRI* und *HindIII* Verdau aus dem Plasmid pUG019 gewonnen wurde. Außerdem wurde die Spectinomycin/Streptomycin+*oriT*-Kassette (*aadA*) aus dem Plasmid pIJ778 zum Austausch der Ampicillinresistenz verwendet. Die Amplifizierung der Kassetten erfolgte mittels des Expand High Fidelity PCR System wie unter 7.5.1 beschrieben. Das erhaltene PCR-Produkt wurde für die Gendeletion im Cosmid durch  $\lambda$  RED vermittelte Rekombination nach Angaben des Herstellers REDIRECT<sup>®</sup> Technology Kit (Gust *et al.*, 2003) verwendet.

Für die Entfernung der Apramycin-Resistenzkassette wurde die Cosmid-DNA zunächst in *E. coli* ET12567 transformiert, die DNA isoliert, mit *XbaI* und *SpeI* geschnitten und über Nacht bei 4°C religiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz durch CaCl<sub>2</sub>-vermittelte Transformation in *E. coli* XL1Blue MRF' eingebracht und die Apramycin-sensitiven und Kanamycin-resistenten Klone durch Restriktionsverdau analysiert. Eine vollständige Entfernung der Kassette war durch Abwesenheit der Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* charakterisiert.

Eine weitere Methode, die zur Entfernung der Resistenzkassette diente, war die Nutzung der FLP-sites. Dazu wurde das modifizierte Cosmid in den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$ /BT340 (Datsenko und Wanner, 2000) eingebracht, anschließend bei 42°C kultiviert und über Restriktionsverdau analysiert.

### 9.1.1 Austausch der Ampicillin-Resistenzkassette in den Cosmiden 10-9c und clo-CA1

Um die Möglichkeit einer Konjugation in *S. spheroides* bzw. *S. roseochromogenes* zu erhalten, wurde in den Cosmiden clo-CA1 und 10-9c die Ampicillinresistenz gegen eine Spectinomycin/Streptomycin+*oriT*-Resistenzkassette ausgetauscht.

Durch Verdau mit *EcoRI* und *HindIII* wurde diese Spectinomycin/Streptomycin+*oriT*-Resistenzkassette (*aadA*) aus dem Plasmid pIJ778 gewonnen und per PCR unter Verwendung der Primer Amp\_for (5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC TCAGCGATCTGCTATTTGCCGACTACCTTGG-3') und Amp\_rev (5'-ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCTTATCCCTTTCGCCAGCCTCGCAGAGCA G-3') amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben repräsentieren jeweils die 39 nt des Homologiebereiches nach dem Start und vor dem Stop der Ampicillin-Resistenz. Die amplifizierte Kassette wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790 eingebracht, der zusätzlich das Cosmid 10-9c bzw. clo-CA1 enthielt. Cosmide, welche die Resistenzkassette integriert hatten, wurden isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert.

Das resultierende Cosmid nov-CA1 wurde für die weitere Inaktivierung von *novQ* eingesetzt.

Das resultierende Cosmid clo-CA6, in dem schon *cloL* durch die Apramycin-Kassette inaktiviert wurde, wurde durch Konjugation in *S. roseochromogenes* QDCO661 eingebracht. Homologe Rekombination führte zu Apramycin-resistenten Transformanden, die durch Southern Blot Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft wurden.

## 9.1.2 Inaktivierung von *novQ*

### 9.1.2.1 Inaktivierung in *S. spheroides*

Als Basis der Inaktivierung in *S. spheroides* diente das Cosmid nov-CA1. Zur Deletion von *novQ* wurde per PCR unter Verwendung des Primerpaares NovQ\_P01f (5'-**CCGGTAATTC**ACTGTGAGTTGATCACGGAGGAATTCATGATTCCGGGGA TCTCTAGATC-3') und NovQ\_P01r (5'-AGTAGTCGTCTCCGGGCATGTTCCG**CAGAGCCTCGCTCA**ACTAGTCTGGAGCTGCTTC-3') die Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben repräsentieren die Homologiebereiche inklusive dem Startcodon und dem Stopcodon von *novQ*. Die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* sind durch die unterstrichenen Buchstaben markiert. Die amplifizierte Kassette wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790 eingebracht, der zusätzlich das Cosmid nov-CA1 enthielt. Cosmide, welche die Resistenzkassette integriert hatten, wurden isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert. Eine Entfernung der Resistenzkassette wurde nicht durchgeführt, da sie weiterhin als Selektionsmarker benutzt werden sollte. Durch Konjugation wurde das resultierende Cosmid nov-CA2 in *S. spheroides* eingebracht. Homologe Rekombination führte zu Apramycin-resistenten Transformanten, die durch Southern Blot Analyse auf ihre Richtigkeit überprüft wurden.

### 9.1.2.2 Inaktivierung von *novQ* im Cosmid nov-BG1 und heterologe Expression

#### „normale“ Inaktivierung:

Die beschriebene Inaktivierung von 9.1.2.1 wurde ebenso im Cosmid nov-BG1 durchgeführt. Im resultierenden Cosmid nov-CA12 wurde die Apramycin-Resistenzkassette durch *XbaI* und *SpeI* Verdau entfernt (nov-CA14). Die beiden Cosmide nov-CA12 und nov-CA14 wurden mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht und die Kanamycin-resistenten Klone mittels Southern Blot auf die spezifische Integration in die  $\Phi$ C31 Attachment Site des Genoms untersucht.

#### Inaktivierung mit einem Codon-Rest des Gens *novQ*:

Die Resistenzkassette zur Inaktivierung von *novQ*, bei der N-terminal ein Codon des Gens zusätzlich zum Stopcodon erhalten wurde, wurde per PCR unter Verwendung des Primerpaares NovQ\_P01f (5'-**CCGGTAATTC**ACTGTGAGTTGATCACGGAGGAATTCATGATTCCGGGGA TCTCTAGATC-3') und NovQ\_P02r (5'-AGTCGTCTCCGGGCATGTTCCGCC**GAGCCTCGCTCATCG**ACTAGTCTGGAGCTGCTTC-3') amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben präsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *novQ* einschließlich dem putativen Start- und Stopcodon sowie einem zusätzlichen Codon „upstream“ des Stopcodons, während die unterstrichenen Buchstaben die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* aufzeigen. Nach Entfernung der Resistenzkassette wurde das  $\Delta$ *novQ* Cosmid nov-CA7, welches das Kanamycin-Resistenzgen *aphII* besitzt, durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Kanamycin-resistenten Klone wurden durch Southern Blot Analyse auf die spezifische Integration des Cosmids in die  $\Phi$ C31 Attachment Site des Genoms von *S. coelicolor* M512 untersucht.

**Inaktivierung durch Frameshift:**

Zur Deletion von *novQ* mittels Frameshift wurde die Resistenzkassette unter Verwendung der Primer NovQ\_FSfor (5'-**GAGTTGATCACGGAGGAATTCATGCCGCACTCCCGATGATTCCGGGGATCTCTAGATC**-3') und NovQ\_FSrev (5'-**GAAATCGACGCGAAAGCGTTCGCGGTCGAATTCTTGATACTAGTCTGGAGCTGCTTC**-3') amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben repräsentieren die Homologiebereiche inklusive dem Startcodon von *novQ*. Die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* sind durch die unterstrichenen Buchstaben markiert. Bei dieser Inaktivierung wurde nur eine Base (Position 19059 in AF170880) entfernt, was ein Abbruch der Translation (Position 19484 in AF170880) zur Folge hat. Es wurde hier eine Regenerationszeit nach Einbringen der Apramycinkassette in *E. coli* BW25113/pIJ790, der zusätzlich das Cosmid nov-BG1 enthielt, von 24 h bei RT eingehalten, bevor die Zellen auf LB-Platten mit 50 µg/ml Apramycin selektiert wurden.

Auch hier wurde wie oben beschrieben die Kassette durch Verdau wieder entfernt und das Cosmid nov-CA8 in *S. coelicolor* M512 heterolog exprimiert und die Kanamycin-resistenten Klone mittels Southern Blot analysiert.

**9.1.3 Inaktivierung von *cloL***

Das Gen *cloL* wurde sowohl im Cosmid D1A8 als auch im Cosmid clo-BG1 inaktiviert. Dazu wurden die Primer cloL\_for (5'-**AGCGGAAGTACCTCTACTTCGCGAAAGGTAGTCACTGGTGATTCCGGGGATCTCTAGATC**-3') und cloL\_rev (5'-**CATCGAATGACTCACCTCACCTGTCCACCAGCACGTCCGGACTAGTCTGGAGCTGCTTC**-3') verwendet. Die hervorgehobenen Buchstaben zeigen den Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor *cloL* inklusive dem putativen Startcodon und zu der Region, die 7 Codons vor dem Stopcodon von *cloL* beginnt, um die putative Ribosomenbindungsstelle des nachfolgenden Gens *cloM* nicht zu beeinträchtigen. Die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* sind durch die unterstrichenen Buchstaben markiert. Die amplifizierte Kassette wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790 eingebracht, der zusätzlich das Cosmid clo-BG1 bzw. D1A8 enthielt. Cosmide, welche die Resistenzkassette integriert hatten, wurden isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert.

Nach der Deletion von *cloL* im Cosmid D1A8 wurde das Cosmid clo-CA1 erhalten, in dem in einem weiteren Schritt die Ampicillin-Resistenzkassette durch die Spectinomycin/Streptomycin+*oriT*-Kassette ausgetauscht wurde (s. 9.1.1).

Die Inaktivierung im Cosmid clo-BG1 führte zum Cosmid clo-CA2. Das  $\Delta cloL$  Cosmid clo-CA3, das nach Entfernung der Resistenzkassette erhalten wurde, wurde für die weitere Inaktivierung von *cloQ* eingesetzt.

#### 9.1.4 Inaktivierung von *cloQ* im Cosmid clo-CA3 und heterologe Expression in *S. coelicolor*

Für die Deletion von *cloQ* wurde die Resistenzkassette unter Verwendung des Primerpaares cloQ\_for (5'-GGCGCGCCATTGCTCACCGTCTTACCGACA CCGTCCTTATTCCGGGGATCTCTAGATC-3') and cloQ-rev (5'-CCCATGG TCGATTCCGTGTGTTGGTGAAGTGC GCGCAGACTAGTCTGGAGCTGCTTC -3') per PCR amplifiziert. Die hervorgehobenen Buchstaben präsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region innerhalb von *cloQ*, um eine Beeinflussung durch translational coupling zu vermeiden. Die unterstrichenen Buchstaben präsentieren die Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI*.

Das  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Cosmid clo-CA5, das nach Entfernung der Resistenzkassette erhalten wurde, wurde durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Kanamycin-resistenten Klone wurden durch Southern Blot auf die spezifische Integration des Cosmids in das Genom von *S. coelicolor* M512 kontrolliert.

#### 9.2 Insertion eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor das Gen *cloN6* im Cosmid clo-BG1 und heterologe Expression in *S. coelicolor*

Um eine Insertion eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor das Gen *cloN6* im Cosmid clo-BG1 zu ermöglichen, wurde der (His)<sub>6</sub>-Tags an die Apramycin-Resistenzkassette aus pUG019 gekoppelt, bei der die FRT-Sites und der *oriT* fehlen. Dazu wurden die Primer cloN6insN\_for (5'-CAACAAATAGTTTGGATGTCCAGTGAAATTGAAGCGG AGGTCTAGAGCAGTACCAGCGTACGGCCC-3'), cloN6insN\_zw (5'-TCGATTGG CTGAGCTCATAAACTAGTATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATTC-3') und cloN6NW\_rev (5'-GTCCCGGAAGTCGTACACGCTGGGCGCATGTAG CAGGAAATGATGATGATGATGATGAGA-3') benutzt. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die jeweiligen Schnittstellen. Hervorgehoben sind die Basen, die von *cloN6* stammen und grau hinterlegt sind die Basen des (His)<sub>6</sub>-Tags.

Die Amplifikation erfolgte mittels Double-joint-PCR (s. 7.5.2). Das erhaltene PCR-Produkt wurde durch  $\lambda$  RED vermittelte Rekombination nach Angaben des Herstellers REDIRECT<sup>®</sup> Technology Kit (Gust *et al.*, 2003) in das Cosmid clo-BG1 eingebracht, allerdings erfolgte hier eine Regeneration von 24 h bei RT. Die Entfernung der Apramycin-Kassette wurde nicht durchgeführt, um sie weiterhin als Selektionsmarker nutzen zu können. Das resultierende Cosmid clo-CA7 wurde durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* eingebracht und die erhaltenen Klone mittels Southern Blot untersucht.

## 10. Fütterungsexperimente mit synthetischen Ring A-Analoga

### 10.1 Einstufige Fütterungen

Zur Herstellung neuer Aminocoumarine auf der strukturellen Grundlage von Clorobiocin wurde die  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Mutant *S. coelicolor* (clo-CA5) benutzt, in die das Plasmid pSH2, das das Amidsynthetase-Gen *simL* enthält, bzw. das Plasmid pMS91 mit dem Amidsynthetase-Gen *couL* eingebracht wurde.

50 ml YMG-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) wurden mit 300  $\mu$ l Glycerinkultur der  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Mutante mit pSH2 oder pMS91 beimpft und 2 Tage bei 30°C, 180 rpm kultiviert. Im Fall von *S. coelicolor* (clo-BG1) enthält das Medium 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin; bei der  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Mutante mit pSH2 oder pMS91 ist im Medium 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin und 12,5  $\mu$ g/ml Thiostrepton enthalten. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden anschließend 50 ml Corn starch-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) inokuliert und 2-3 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert. 5 ml dieser zweiten Vorkultur wurden dann in 80 ml Distillers solubles-Produktionsmediums mit 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin in 500 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) überführt und insgesamt 7-10 Tage bei 33°C, 210 rpm kultiviert. Die zu fütternden Kulturen wurden am Tag der Inokulation in das Produktionsmedium mit 1 mg der betreffenden Substanz, gelöst in 200  $\mu$ l Ethanol, versetzt und dann weiterkultiviert. Nach weiteren 7-10 Tagen Kultivierung wurden die gebildeten Sekundärstoffe wie unter 12.5 beschrieben extrahiert und über HPLC analysiert.

Als Kontrollen wurden parallel *S. coelicolor* (clo-BG1) bzw. *S. roseochromogenes* Wildtyp sowie die  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Mutante mit pSH2 bzw. pMS91 ohne Fütterung kultiviert und ebenfalls extrahiert und analysiert.

### 10.2 Zweistufige Fütterungen

Zur Herstellung neuer Hybrid-Aminocoumarine auf der strukturellen Grundlage von Clorobiocin und Novobiocin wurden zweistufige Fütterungen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die  $\Delta novQ$  Mutante *S. coelicolor* (nov-CA7) verwendet, in der in weiteren Versuchen die Plasmide pSH2 bzw. pMS91 enthalten waren. Im zweiten Schritt der Fütterungen wurde die  $\Delta cloL\Delta cloQ$ -Mutante *S. coelicolor* (clo-CA5) verwendet.

#### Erster Schritt:

#### Fütterung von *S. coelicolor* (nov-CA7) bzw. *S. coelicolor* (nov-CA7)/pSH2 oder *S. coelicolor* (nov-CA7)/pMS91

Um die entsprechenden Aglyka zu gewinnen, wurde 50 ml TSB-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) mit 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin bzw. 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin und 12,5  $\mu$ g/ml Thiostrepton mit 300  $\mu$ l der Glycerinkultur der entsprechenden Mutante beimpft und bei 30°C für 2-3 Tage bei 180 rpm kultiviert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 50 ml CDM-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) mit den entsprechenden Antibiotika umgeimpft und 4 Tage bei 30°C und 180 rpm kultiviert. 5 ml dieser zweiten Vorkultur wurde in 50 ml CDM-Medium in 300 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) mit den entsprechenden Antibiotika überführt und mit 1 mg des Ring A-Analogons, gelöst in 200  $\mu$ l Ethanol, gefüttert. Die weitere Kultivierung wurde bei 30°C und 180 rpm für weitere 7 bis 10 Tage durchgeführt.

Die gebildeten Sekundärstoffe wurden wie unter 12.5 beschrieben extrahiert und über HPLC analysiert.

Als Kontrollen wurden parallel *S. coelicolor* (nov-BG1) bzw. *S. spheroides* Wildtyp sowie die  $\Delta$ novQ-Mutante mit bzw. ohne pSH2 oder pMS91 ohne Fütterung kultiviert, extrahiert und analysiert

### **Zweiter Schritt:**

#### **Fütterung von *S. coelicolor* (clo-CA5)**

Der zweite Fütterungsschritt wurde, wie unter 10.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurde Extrakt gefüttert, der durch die Kultivierung, Fütterung und Extraktion im ersten Schritt gewonnen wurde. Der Extrakt wurde zur weiteren Fütterung in einer geeigneten Menge Ethanol gelöst, um eine Konzentration von etwa 1 mg Aglykon pro 200  $\mu$ l Ethanol zu erhalten. 1 mg (200  $\mu$ l) des entstandenen Aglykons wurde anschließend zu 80 ml Distillers solubles-Produktionsmediums mit *S. coelicolor* (clo-CA5) und 12,5  $\mu$ g/ml Kanamycin in 500 ml Schikanekolben (mit Edelstahlfeder) gefüttert und insgesamt 7-10 Tage bei 33°C und 210 rpm kultiviert (maximale Ethanolmenge pro Kolben: 200  $\mu$ l).

Die gebildeten Sekundärstoffe wurden wie unter 12.5 beschrieben extrahiert und über HPLC analysiert.

## **11. Chemische Synthese von Novenamin**

Novenamin wurde durch Spaltung der Oxazol-Vorstufe des Novenamins gewonnen (Ueda *et al.*, 1988). Dafür wurden 1,72 mmol der Vorstufe eingewogen und in 83 ml absolutem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 1,72 mmol Acetylchlorid in 10 ml absolutem Ethanol wurde die Lösung unter Rückfluss und Stickstoffatmosphäre bei 60°C für 20 h erhitzt. Nach Ende der Reaktion wurde der Ansatz bis zur Trockene einrotiert und anschließend in 100 ml Methanol gelöst und wieder einrotiert. Die anschließende Reinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 125 g (0,04-0,06 mm<sup>3</sup>; Merck) in Dichlormethan (250 ml) mit 2% Ammoniak). Dazu wurde ein Gradient aus einem Dichlormethan-Methanol-Ammoniak-Gemisch benutzt:

1. Stufe: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:NH <sub>3</sub>	90: 8:2	Volumen:300 ml
2. Stufe: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:NH <sub>3</sub>	80:18:2	Volumen:300 ml
3. Stufe: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH:NH <sub>3</sub>	70:27:3	Volumen:300 ml
gefolgt von Elutionsphase:	MeOH	Volumen:300 ml

Es wurden jeweils Fraktionen von 50 ml Volumen aufgefangen. Die Reinigung wurde über Dünnschichtchromatographie mit UV-Detektion überwacht (Fließmittel: Dichlormethan:Methanol 95:5).

Aufgrund noch starker Verunreinigungen wurde Fraktion Nr. 20, die das gesuchte Produkt beinhaltetete, weiter mittels einer Sephadex-LH20 (Amersham Biosciences, Freiburg) Säule (87 cm, Durchmesser 2,6 cm) aufgereinigt (Fließmittel: Methanol; Fraktionsgröße: 20 ml). Auch diese Reinigung wurde über Dünnschichtchromatographie mit UV-Detektion überwacht (Fließmittel: Dichlormethan:Methanol 95:5). Fraktionen Nr. 51-55, Nr. 60-64 und Nr. 65-70 wurden gepoolt, einrotiert, im Exsikkator getrocknet und mit <sup>1</sup>H NMR bei 250 MHz in deuteriertem Methanol untersucht.

In den Fraktionen Nr. 51-55 konnte als Produkt Ring A identifiziert werden. Fraktionen Nr. 60-64 beinhalteten Novenamin mit einer acetylierten Position 2'' des Desoxyzuckers und Fraktionen Nr. 65-70 beinhalteten das gesuchte Novenamin.

## 12. Analytik und Isolierung niedermolekularer Verbindungen

### 12.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Waters (Eschborn) verwendet. Die Anlage setzte sich aus zwei Pumpen (Waters 510), einem Autosampler (Waters 717 plus) und einem UV-Detektor (Waters 486 Absorbance Detektor) zusammen. Die Steuerung der HPLC-Komponenten und die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die Millennium-Software. Analytische Auftrennungen erfolgten bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multisphere® RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren), der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (40 µm, 30 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war. Für präparative Isolierungen wurden Trennsäulen mit größerem Durchmesser (s. 12.5.3) eingesetzt. Die verwendeten Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (0,45 µm, Millipore) von Partikeln befreit.

Außerdem wurde eine HPLC-Anlage der Firma Agilent (Böblingen) zur analytischen Untersuchung verwendet. Die Steuerung und Auswertung erfolgte über die ChemStation Software. Die Auftrennung erfolgte über eine Eclipse XDB-C 18 Säule (5 µm, 150 x 4,6 mm) mit einer Flussrate von 1 ml/min.

### 12.2 Analytik von Clorobiocin und seinen Derivaten

Der Wildtyp und die Mutanten von *S. roseochromogenes* sowie der *S. coelicolor* Stamm mit Clorobiocin-Cluster und seine abgeleiteten Mutanten wurden in Produktionsmedium, wie unter 6.2.2.1 beschrieben, kultiviert. 1 ml Bakterienkultur wurden mit 1 M HCl auf einen pH von 4 angesäuert und zweimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurde der Extrakt in 100-300 µl Methanol resuspendiert. Anschließend wurden nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) 50-100 µl des klaren Überstandes unter den folgenden Bedingungen per HPLC analysiert.

Clorobiocin (Aventis, Bad Soden a.Ts. bzw. von A. Maxwell, Norwich, John Innes Centre, UK) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen:

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>OH : HCOOH (49:50:1)

Fließmittel B: CH<sub>3</sub>OH : HCOOH (99:1)

Detektionswellenlänge: 340 nm

HPLC-Gradient:

<b>Zeit [min]</b>	<b>Fließmittel A [%]</b>	<b>Fließmittel B [%]</b>
0,0	60	40
2,0	60	40
27,0	0	100
32,0	0	100
32,1	60	40
37,0	60	40

### 12.3 Analytik von Novobiocin und seinen Derivaten

Der Wildtyp und die Mutanten von *S. spheroides* sowie der *S. coelicolor* Stamm mit Novobiocin-Cluster und seine abgeleiteten Mutanten wurden in Produktionsmedium, wie unter 6.2.2.2 beschrieben, kultiviert. 1 ml Bakterienkultur wurden abgenommen und zentrifugiert (10 min, 21000 x g, 4°C). 50-100 µl des klaren Überstandes wurden unter den folgenden Bedingungen per HPLC analysiert.

Novobiocin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen:

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O : HCOOH (99:1)

Fließmittel B: CH<sub>3</sub>OH : HCOOH (99:1)

Detektionswellenlänge: 305 nm

HPLC-Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	40	60
2,0	40	60
37,0	0	100
42,0	0	100
42,1	40	60
47,0	40	60

### 12.4 Analytik von Novobiocinsäure und seiner Derivate

Die Ansätze der Amidsynthetase-Assays wurden zweimal mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurde der Extrakt in 100-110 µl Methanol resuspendiert. Nach Zentrifugation (10 min, 21000 x g, 4°C) wurden 50-80 µl des klaren Überstandes unter den folgenden Bedingungen per HPLC analysiert.

Novobiocinsäure (Pharmacia&Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA) wurde als Standard verwendet.

Chromatographie-Bedingungen:

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O : HCOOH (99:1)

Fließmittel B: CH<sub>3</sub>OH : HCOOH (99:1)

Detektionswellenlänge: 305 nm

HPLC-Gradient:

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

## 12.5 Präparative Isolierung neuer Aminocoumarin-Antibiotika

### 12.5.1 Extraktion aus Zellkulturen

Zur präparativen Isolierung neuer Aminocoumarine wurden 200-2000 ml einer Zellkultur mit 1 N HCl auf eine pH von 4 angesäuert. Nach Entfernung lipophiler Kulturbestandteile des Distillers solubles-Mediums durch Ausschütteln mit Petrolether wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Bei der Isolierung aus CDM-Medium (*S. spheroides* sowie der *S. coelicolor* Stamm mit Novobiocin-Cluster und seine abgeleiteten Mutanten) entfällt das Ausschütteln mit Petrolether. Anschließend wurde das Extraktionsmittel entfernt und der Rückstand in 3-5 ml Methanol aufgenommen.

### 12.5.2 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung von Kulturextrakten wurde die Gelfiltration angewendet. Ein Probenvolumen von 3-5 ml Kulturextrakt wurde auf eine Glassäule (2,6 x 65 cm), die mit Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Freiburg) befüllt war, aufgetragen und mit entgastem Methanol bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Unter Verwendung eines Fraktionssammlers wurden 15 ml Fraktionen gesammelt, die auf die Anwesenheit der Aminocoumarine per HPLC analysiert wurden. Die Fraktionen, die die neuen Aminocoumarine enthielten, wurden gepoolt, einrotiert und für die weitere HPLC-Reinigung in Methanol aufgenommen.

### 12.5.3 Präparative HPLC-Reinigung

Die präparative HPLC-Reinigung wurde entweder mit einer Multosphere<sup>®</sup> RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 8 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren) mit einer Multoprep<sup>®</sup> RP-18 gefüllten Vorsäule (40 µm, 30 x 4 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren) oder einer Multosphere<sup>®</sup> RP 18-5 Säule (5 µm, 250 x 10 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren) mit einer Multoprep<sup>®</sup> RP-18 gefüllten Vorsäule (40 µm, 50 x 10 mm) (C&S Chromatographie Service, Düren) durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Fließmittel und Gradienten, wie zuvor unter 12.1 und 12.2 beschrieben, aber mit einer Flussrate von 2-3 ml/min verwendet.

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

## 12.6 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung

### 12.6.1 Massenspektrometrie (MS)

Die negative und positive Fast-Atom-Bombardment (FAB)-Massenspektrometrie wurde an einem TSQ70 Spektrometer (Finnigan, Bremen) durchgeführt. Diethanolamin diente dabei als Matrix.

### 12.6.2 LC-MS-Analyse

Positive-Elektrospray-Ionisation (ESI) Massenspektren wurden zur Charakterisierung der Derivate aufgenommen. Dazu wurde ein Flüssigchromatograph mit einer Nucleosil 120 RP ODS-Säule (250 x 2 mm, 8  $\mu$ m) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min verwendet, der an ein Finnigan TSQ Quantum Massenspektrometer angeschlossen war. Die Elektrospray-Spannung betrug 3.8 kV, die Kapillartemperatur betrug 320°C. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet (sheath gas flow rate: 30.1 AU; aux gas flow rate: 12.0 AU). Die kollisions-induzierte Dissoziationspektren innerhalb des HPLC-Laufs wurden mit einer Kollisionsenergie von +25 eV, Kollisionsgas Argon, und einem Kollisionsdruck von  $1,0 \times 10^{-3}$  torr (133 mPa) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Xcalibur 1.3 Software.

Chromatographie-Bedingungen:

Zur Trennung wurde ein Acetonitril-Wasser-Gradient mit einer Flussrate von 0,2 ml/min benutzt.

Fließmittel A: H<sub>2</sub>O:HCOOH (99,9:0,1)

Fließmittel B: CH<sub>3</sub>CN: HCOOH (99,9:0,1)

HPLC-Gradient:

<b>Zeit [min]</b>	<b>Fließmittel A [%]</b>	<b>Fließmittel B [%]</b>
0,0	100	0
20,0	50	50
21,0	0	100
26,0	0	100
27,0	100	0
30,0	100	0

### 12.6.3 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung isolierter Substanzen wurden <sup>1</sup>H NMR-spektroskopische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Proben über Nacht im Exsikkator mit Phosphorpentoxid (Merck, Darmstadt) getrocknet und in deuteriertem Methanol (Merck, Darmstadt) aufgenommen. Die <sup>1</sup>H NMR Spektren wurden mit einem AC-250 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) oder einem Avance 400 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen und mittels MestRe-C2.3a ausgewertet.

## III Ergebnisse

### 1. Biosynthese der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins – Versuche zur Expression der Methyltransferase CloN6

#### 1.1 Einleitung

Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> tragen eine 5-Methylpyrrolgruppe an Position 3'' des Desoxyzuckers. Parallel zu diesem Strukturmerkmal weist das Gencluster von Clorobiocin die Gene *cloN1-6* auf. Homologe dieser Gene konnten auch im Gencluster von Coumermycin gefunden werden (*couN1-6*). Durch Inaktivierungen bzw. durch biochemische Untersuchungen der Genprodukte konnte nachgewiesen werden, dass diese Gene an der Biosynthese dieser strukturellen Gruppe beteiligt sind (Freitag *et al.*, 2005b; Garneau *et al.*, 2005; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006b; Xu *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Insbesondere konnte durch Inaktivierung nachgewiesen werden, dass das Gen *cloN6* für die Methyltransferase codiert, die die Position 5''' der Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe methyliert (Westrich *et al.*, 2003). Jedoch konnte durch diese Inaktivierung der genaue Zeitpunkt der Methylierung nicht geklärt werden. Es wurde allerdings vermutet, dass die Methylierung als letzter Schritt in der Biosynthese von Clorobiocin vollzogen wird.

Das Protein CloN6 besteht aus 560 Aminosäuren. Es weist eine Identität von 94% zu CouL aus dem Coumermycin A<sub>1</sub> Cluster auf. Durch weitere Sequenzanalyse konnte N-terminal eine Cobalamin-Bindungsstelle und in der Mitte des Proteins ein Cystein-Motiv CxxxCxxC (AS 219-226), das Teil eines Eisen-Schwefel-Clusters sein könnte, gefunden werden (Sofia *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft ordnet CloN6 wie auch CouN6 in die „BchE-ähnlichen/Methyltransferasen-Untergruppe“ nach Sofia *et al.* (2001) ein. In der selben Untergruppe befinden sich auch die putativen Methyltransferasen der Biosynthesegencluster von Fortimicin, Fosfomycin und Bialaphos, für die eine Funktion als Cobalamin-abhängige Methyltransferasen wahrscheinlich gemacht wurde (Kamigiri *et al.*, 1992; Kuzuyama *et al.*, 1992; Okumura *et al.*, 1981). Allerdings wurden keine genaueren biochemischen Untersuchungen über diese ungewöhnlichen Methylierungsreaktionen durchgeführt.

Die biochemische Untersuchung der Methyltransferase CloN6 sollte nun nähere Erkenntnisse über diese ungewöhnliche C-Methylierungsreaktion der Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe geben. Außerdem sollte der Methylierungszeitpunkt geklärt werden.

Dazu wurde *cloN6* in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und anschließend umfassende Expressionsversuche durchgeführt.

## 1.2 Versuche zur Überexpression von CloN6

### 1.2.1 Klonierung der Expressionskonstrukte und Überexpressionsversuche in *Escherichia coli*

Für die Herstellung der Expressionskonstrukte wurden verschiedene Vektoren mit verschiedenen Tags bzw. mit C- oder N-terminalem His-Tag verwendet. *cloN6* wurde, wie unter Kapitel II/7.5.3 beschrieben, mittels PCR aus dem Cosmid clo-BG1 bzw. D1A8 amplifiziert und in die entsprechenden Vektoren inkloniert. Die PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung bestätigt.

In allen verwendeten Vektoren standen *cloN6* unter der Kontrolle von IPTG induzierbaren Promotoren. Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurde mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen, unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen und verschiedenen Medien gearbeitet (Kapitel II/8.1.1).

#### 1.2.1.1 Klonierung in pQE70 und Durchführung von Überexpressionsversuchen

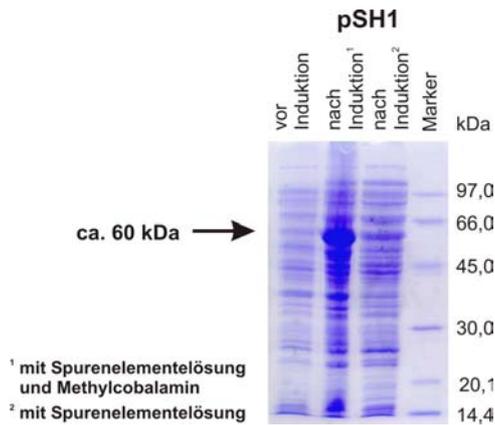
Zur Klonierung in pQE70, der eine Expression mit C-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tag unter Kontrolle des T5 Promotors ermöglicht, wurde *cloN6* mittels PCR amplifiziert, mit *SphI* und *BglII* verdaut, über zwei Schritte in pQE70 inkloniert und in *E. coli* XL1Blue MRF' und *E. coli* BL21(3DE)/pLysS transformiert. Das resultierende Konstrukt trägt die Bezeichnung pCA5.

Eine Überexpression eines Proteins konnte mit Hilfe des Konstruktes pCA5 unter den getesteten Bedingungen (Kapitel II/8.1.1) nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Auch eine Reinigung blieb erfolglos.

#### 1.2.1.2 Klonierung in pRSET B und Durchführung von Überexpressionsversuchen

Die Klonierung in den Expressionsvektor pRSET B gestattet eine Expression des Proteins mit N-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag. Dazu wurde *cloN6* per PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pRSET B hinter den T7 Promotor inkloniert. Das fertige Konstrukt erhielt die Bezeichnung pSH1. Es folgte eine Transformation in *E. coli* XL1Blue MRF' und *E. coli* BL21(3DE)/pLysS.

Bei Expressionsversuchen mit dem Konstrukt pSH1 konnte das erwartete Protein mit einer Größe von 67,9 kDa unter den gewählten Bedingungen nicht erhalten werden. Allerdings wurde in beiden *E. coli* Stämmen eine Expression eines zu kleinen Proteins der Größe ca. 60 kDa beobachtet. Um ein eventuelles Fehlen eines Cofaktors, etwa des Cobalamins, auszuschließen, wurden Expressionen mit einer Supplementierung in LB-Medium mit Kobalt und/oder Spurenelementelösung und/oder Methylcobalamin durchgeführt. Leider führten auch diese Versuche nicht zum gewünschten Protein. Es wurde, wie schon in den vorhergehenden Versuchen, das zu kleine Protein der Größe ca. 60 kDa exprimiert (Abb. III.1). Eine Aufreinigung des exprimierten Proteins war nicht möglich.



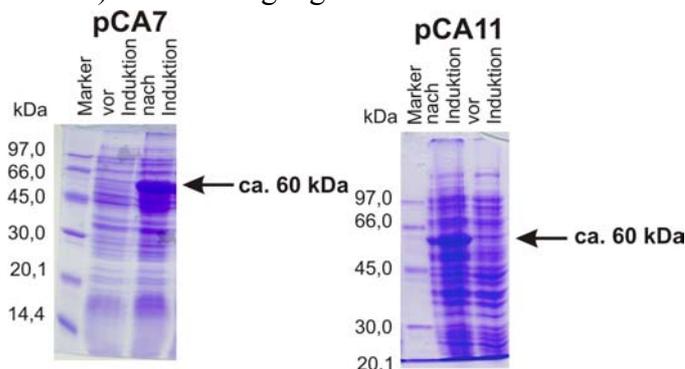
**Abbildung III.1:** Versuch der Überexpression von CloN6 mit Hilfe des Expressionskonstruktes pSH1 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mit 2 mM IPTG.

### 1.2.1.3 Klonierung in pQE31 und pHis8 und Durchführung von Überexpressionsversuchen

*cloN6* wurde auch in den Expressionsvektor pQE31 kloniert, der ebenfalls eine Expression mit N-terminalem (His)<sub>6</sub>-Tag gestattet. Allerdings erfolgt hier die Expression unter Kontrolle des T5 Promotors. Dazu wurde das Plasmid pSH1 mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut und das erhaltene *cloN6*-Fragment in pQE31 einkloniert, was zum Konstrukt pCA7 führte. Zur Überexpression von CloN6 wurde pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' und *E. coli* BL21(3DE)/pLysS transformiert.

Für eine weitere Expression mit N-terminalem (His)<sub>8</sub>-Tag wurde *cloN6* hinter den T7 Promotor in den Expressionsvektor pHis8 einkloniert. Dafür wurde *cloN6* mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pHis8 einkloniert (erhaltenes Konstrukt: pCA11). pCA11 wurde zur Durchführung von Expressionsversuchen in *E. coli* BL21(3DE)/pLysS transformiert.

Bei den Expressionsversuchen mit den Konstrukten pCA7 und pCA11 wurde ebenfalls nicht das erwartete Protein CloN6 mit der Größe 65,7 kDa bzw. 66,7 kDa unter den gewählten Bedingungen erhalten. Bei den Expressionsversuchen in LB-Medium mit den Konstrukten pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' und pCA11 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS konnte jedoch eine Expression eines etwa 60 kDa großen Proteins beobachtet werden (Abb. III.2). Eine Reinigung dieser Proteine war nicht möglich.



**Abbildung III.2:** Versuch der Überexpression von CloN6 mit Hilfe der Expressionskonstrukte pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' induziert mit 1 mM IPTG bei 37°C und pCA11 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS induziert mit 0,5 mM IPTG bei 20°C.

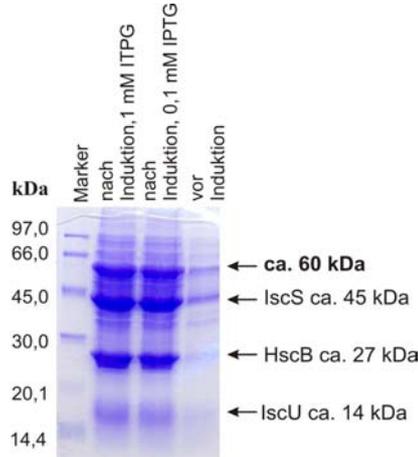
Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass CloN6 zwar exprimiert wird, jedoch danach gleich wieder (enzymatisch) degeneriert wird. Da dies mit der Faltung des Proteins zusammenhängen könnte, wurden Expressionsversuche des Konstruktes pCA7 zusammen mit dem Plasmid pACYCisc, das die Gene des *isc*-Operons von *E. coli* beinhaltet (Gräwert *et al.*, 2004), in *E. coli* XL1Blue unter verschiedenen Bedingungen

durchgeführt (s. Kapitel II.8.1.1) (Abb. III.3a). Gräwert *et al.* konnten zeigen, dass durch die zusätzliche Expression des *isc*-Operons die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern unterstützt und die Aktivität des resultierenden Proteins erhöht wird (Gräwert *et al.*, 2004).

Gene des *isc*-Operons aus *E. coli*:



**Abbildung III.3a:** Gene des *isc*-Operons, die in pACYCisc enthalten sind; Zeichnung nicht maßstabsgetreu.

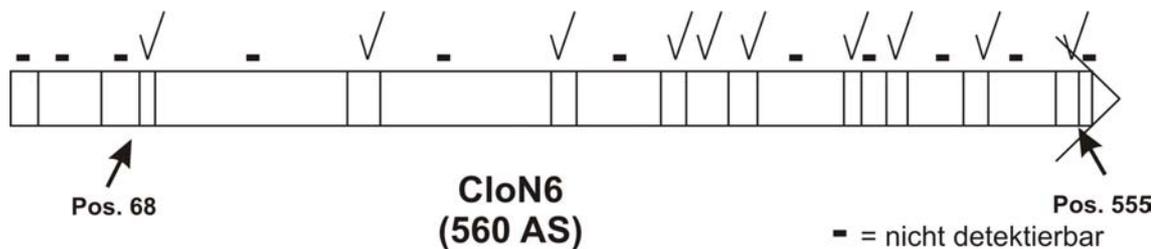


**Abbildung III.3b:** Versuch der Überexpression von CloN6 mit Hilfe der Expressionskonstrukte pCA7 und pACYCisc in *E. coli* XL1Blue induziert mit 1 mM und 0,1 mM IPTG bei 30°C.

Wie bei Gräwert *et al.* (2004) beschrieben, wurden IscS, IscU und HscB des *isc*-Operons stark exprimiert (Abb. III.3b). Allerdings wurde außer dem ca. 60 kDa großen Protein, das schon bei früheren Expressionsversuchen des Konstruktes pCA7 beobachtet wurde, kein Protein in der gesuchten Größe von 65,7 kDa überexprimiert. Anschließende Reinigungsversuche blieben erfolglos. Auch durch diese Expressionsversuche wurde CloN6 nicht erhalten.

Um zu klären, welches Protein der Größe ~60 kDa bei den Expressionversuchen des Konstruktes pCA7 exprimiert wurde, wurde das Protein aus dem SDS-Gel isoliert, mit Trypsin verdaut und mittels MS-Analyse untersucht.

Mit dieser Analyse konnten zehn Fragmente zwischen Pos. 68 und 555 der Aminosäuresequenz von CloN6 nachgewiesen werden (Abb. III.4a und Anhang VII.1). Ab fünf übereinstimmenden Fragmenten kann von einer Identifikation des Proteins ausgegangen werden (S. Stevanovic, persönliche Mitteilung). Zum vollständigen CloN6 Protein fehlen N-terminal jedoch bis zu 67 Aminosäuren. Diese Fragmente konnten auch mit gezielter Suche im MS-Spektrum nicht gefunden werden.

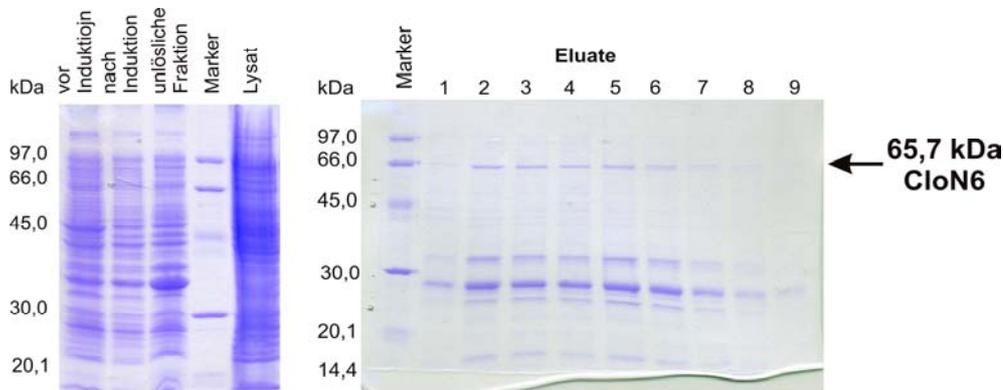


**Abbildung III.4a:** Schematische Darstellung der nachgewiesene Fragmente des Trypsin verdauten Proteins der Expression von pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' mittels MS-Analyse. Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu.

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass CloN6 zwar exprimiert wird, jedoch sofort wieder in ein kleineres Protein degeneriert wird.

Das mit MS detektierte Protein (Aminosäure 68-555) hat ein berechnetes Gewicht von 56,5 kDa (vollständig inklusive (His)<sub>6</sub>-Tag: 65,7 kDa), was sich ungefähr mit dem exprimierten Protein der abgeschätzten Größe von ca. 60 kDa deckt. Die Differenz kommt durch Fehler in der Abschätzung der Größe in SDS-PAGE zustande, sowie durch bis zu 19 zusätzliche Aminosäuren des angrenzenden Trypsin-Fragmentes, da die Abbruchstelle des Proteins nicht eindeutig durch diese MS-Analyse geklärt werden kann.

Um vollständiges, noch nicht degeneriertes Protein zu erhalten, wurden Expressionsversuche von pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' und pCA11 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS in einem Volumen von je 1 Liter TB Medium mit anschließender Reinigung durchgeführt. Bei beiden Versuchen konnte nach der Induktion keine Überexpression eines Proteins beobachtet werden. Jedoch konnte nach der durchgeführten Reinigung beim Konstrukt pCA7 eine dünne Bande bei der gesuchten Größe von CloN6 von 65,7 kDa erhalten werden (Abb. III.4b).



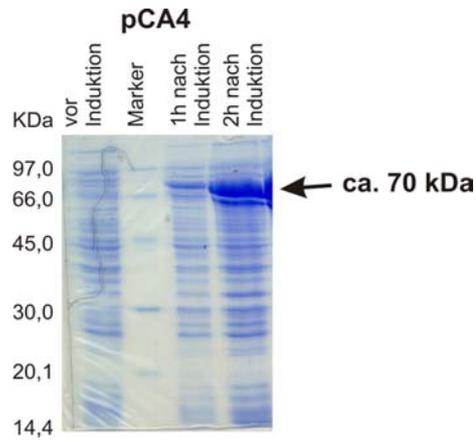
**Abbildung III.4b:** Reinigung der Expression mittels des Konstruktes pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF' in TB-Medium bei 20 °C, induziert mit 0,5 mM IPTG.

Eine weitere Optimierung der Expression und Reinigung könnte hier zu besseren Ausbeuten führen. Eine anschließende Reinigung mittels Gelchromatographie könnte zur Abtrennung der unspezifisch gebundenen Proteine benutzt werden, um reines CloN6 Protein zu erhalten.

#### 1.2.1.4 Durchführung von Überexpressionsversuchen mit GST- bzw. Trx-Tag

Um auszuschließen, dass die Expressionsprobleme durch den verwendeten (His)<sub>6</sub>-Tag verursacht werden, wurde *cloN6* in einem weiteren Versuch in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert, um eine Expression mit einem N-terminalem GST-Tag unter Kontrolle des Tac-Promotors zu ermöglichen. Das resultierende Konstrukt trägt die Bezeichnung pCA4. Zur Durchführung von Expressionsversuchen wurde pCA4 in *E. coli* BL21(3DE)/pLysS transformiert.

Auch hier konnte unter den gewählten Bedingungen das erwartete Protein mit einer Größe 91,2 kDa nicht exprimiert werden. Jedoch wurde auch hier ein zu kleines Protein der Größe ~70 kDa exprimiert (Abb. III.5). Eine Reinigung des erhaltenen Proteins war nicht möglich.



**Abbildung III.5:** Versuch der Überexpression von CloN6 mit Hilfe des Expressionskonstruktes pCA4 in *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mit 1 mM IPTG.

Zusätzlich wurde *cloN6* in den Expressionsvektor pET32a kloniert, welcher eine Expression mit einem N-terminalem Thioredoxin(Trx)-Tag gefolgt von einem (His)<sub>6</sub>-Tag ermöglicht (S. Keller, D. Lawson, John Innes Center, Norwich; persönliche Mitteilung). Es wurden daraufhin Expressionsversuche in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Leider führten auch diese Expressionsversuche nicht zum gewünschten, vollständigen CloN6 Protein, sondern wieder zu einem degenerierten Produkt (nicht gezeigt).

### 1.2.2 Überexpressionsversuche von CloN6 in *Streptomyces lividans* T7 und *Saccharomyces cerevisiae*

Um Expressionen in anderen Wirtstämmen durchzuführen, wurde *cloN6* in den Expressionsvektor pGM9 und in pYES2/NT-C kloniert.

Die Klonierung in den Vektor pGM9 erfolgte durch eine Fusion über die *HindIII*-Schnittstelle mit dem Plasmid pSH1 (resultierendes Konstrukt: pCA2).

Zur Klonierung in pYES2/NT-C wurde *cloN6* aus dem Plasmid pCA4 mit *BamHI* und *NotI* Verdau isoliert und anschließend pYES2/NT-C über die gleichen Schnittstellen einkloniert. Das erhaltene Konstrukt trägt die Bezeichnung pCA8.

Nach Transformation von pCA2 in *Streptomyces lividans* T7 und Elektroporation von pCA8 in *Saccharomyces cerevisiae* wurden Expressionsversuche durchgeführt (Kapitel II/8.1.2 und 8.1.3).

Es konnte keine Überexpression eines Proteins mit Hilfe des Konstruktes pCA2 in *S. lividans* T7 unter den getesteten Bedingungen erzielt werden (nicht gezeigt).

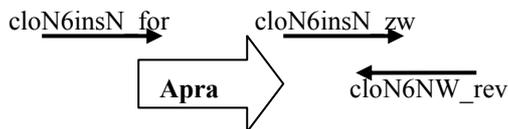
Auch die Überexpression des erwarteten 71,8 kDa großen Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* konnte mit Hilfe des Konstruktes pCA8 unter den getesteten Bedingungen (Kapitel II/8.1.3) nicht erzielt werden (nicht gezeigt). Es wurde auch kein weiteres Protein überexprimiert.

### 1.3 Insertion eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor das Gen *cloN6*

#### 1.3.1 Insertion des (His)<sub>6</sub>-Tags vor *cloN6* im Cosmid clo-BG1

Als Alternative zur konventionellen Expression wurde eine Insertion eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor *cloN6* im Cosmid clo-BG1 durchgeführt. Diese Insertion wird nach heterologer Expression in *Streptomyces coelicolor* M512 zwar nicht in einer Überexpression des Proteins resultieren, aber das Protein kann mit Hilfe des (His)<sub>6</sub>-Tags aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Außerdem bestätigt der Nachweis von Chlorobiocin im Kulturüberstand auch die Anwesenheit eines vollständigen CloN6 Proteins.

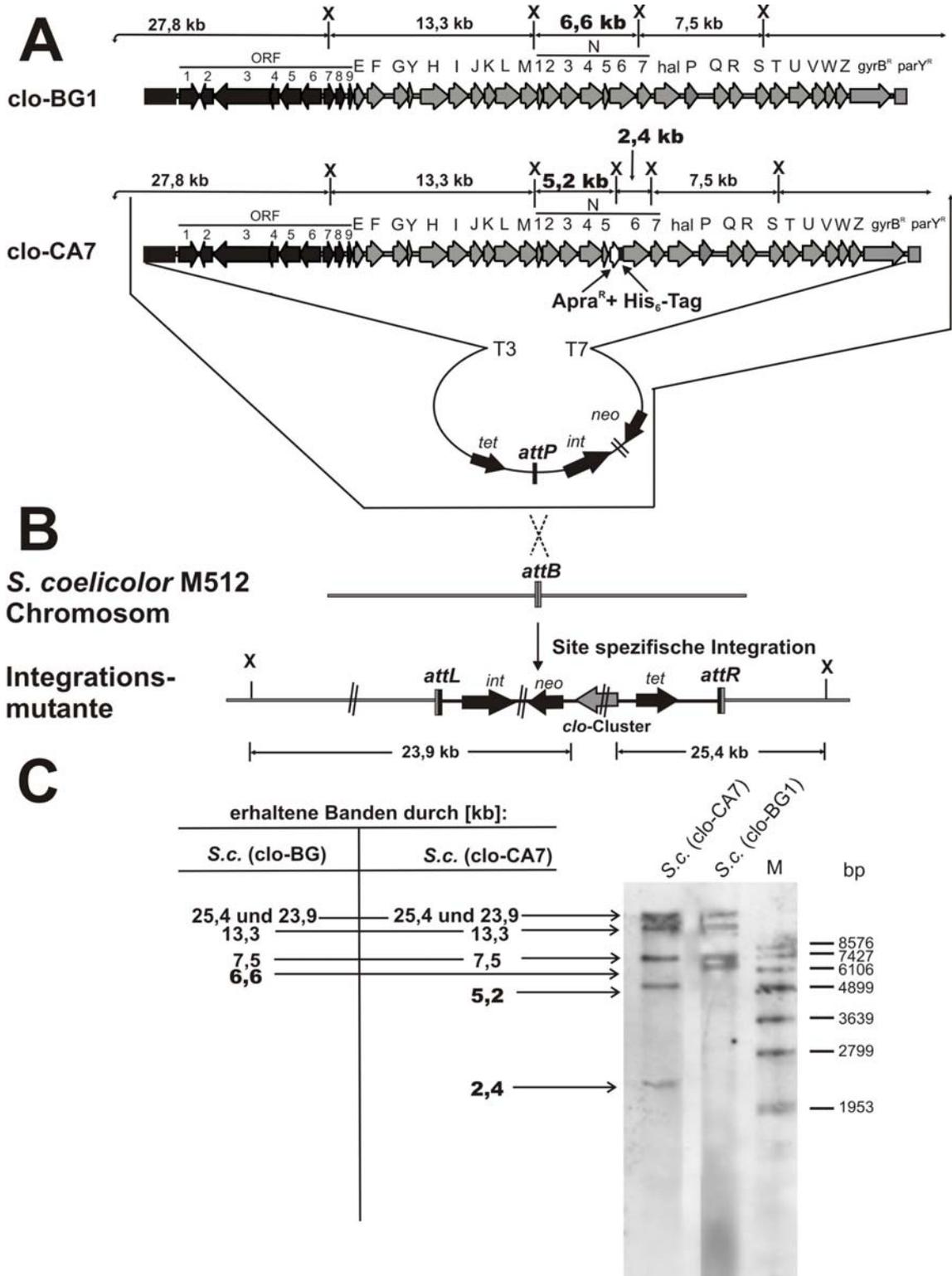
Dazu wurde die Apramycin-Resistenzkassette *aac(3)IV* mit einem (His)<sub>6</sub>-Tag mittels Double-joint-PCR amplifiziert (Kapitel II/7.5.2). Die PCR wurde mit 3 verschiedenen Primern durchgeführt (Abb. III.6-1). Der erste Primer (*cloN6insN\_for*) beinhaltet 35 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor *cloN6* sowie 21 Basenpaare der Apramycinkassette. Der zweite Primer (*cloN6insN\_zw*) bestand aus Basen der Apramycinkassette und des (His)<sub>6</sub>-Tags und bildete nach dem Annealing mit dem dritten Primer (*cloN6NW\_rev*), der Basen des (His)<sub>6</sub>-Tags und 39 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor *cloN6* beinhaltet, den reversen Primer.



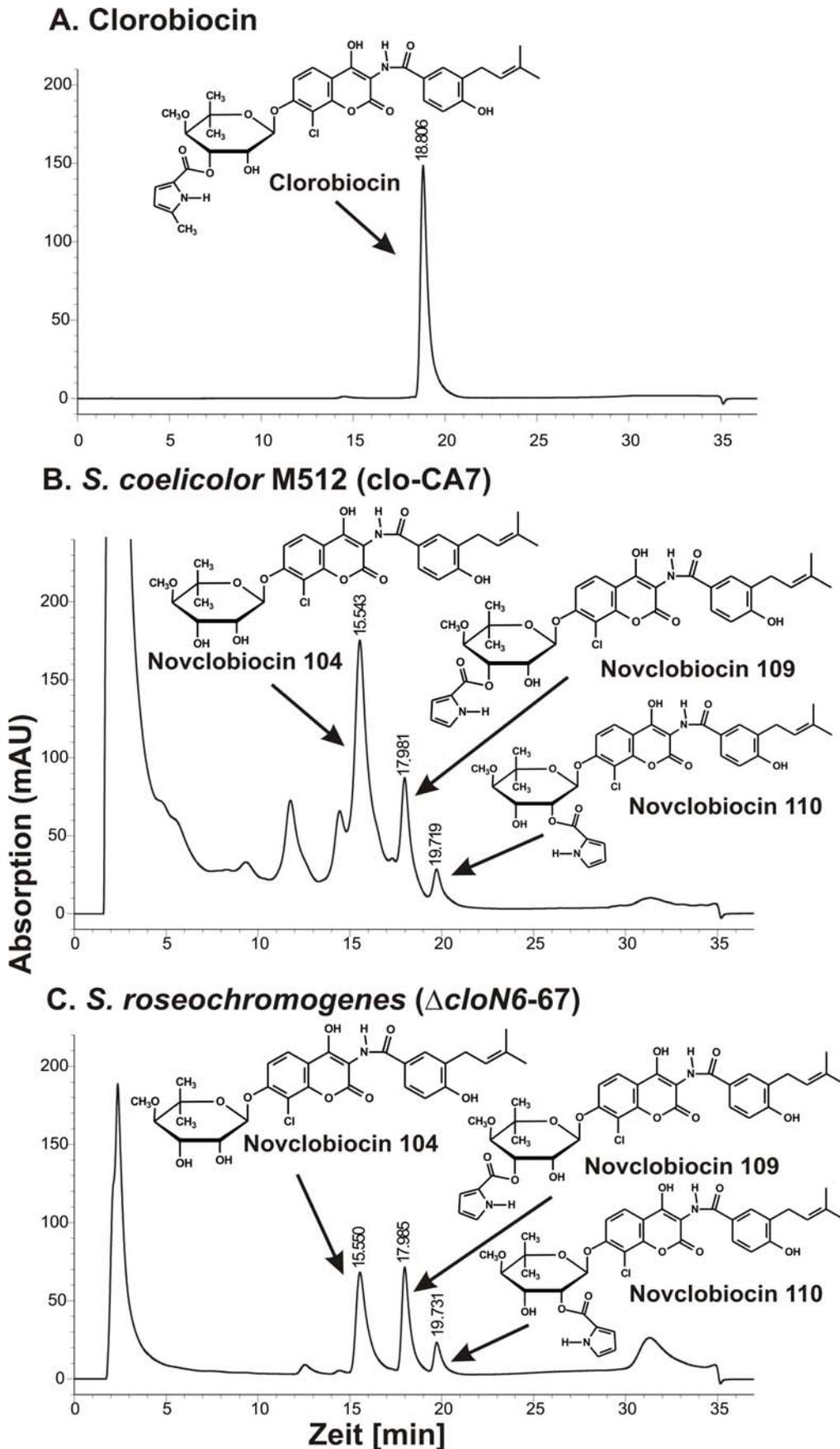
**Abbildung III.6-1:** Schematische Darstellung der verwendeten Primer zur Insertion eines (His)<sub>6</sub>-Tags vor *cloN6* im Cosmid clo-BG1. Apra = Apramycin-Resistenzkassette.

Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels PCR-Targeting in das Cosmid clo-BG1 inseriert, wie in Kapitel II/9.2 beschrieben, so dass durch diese Insertion der (His)<sub>6</sub>-Tag direkt N-terminal vor *cloN6* eingebracht wurde. Die Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung clo-CA7.

Anschließend wurde, wie in Kapitel II/7.8.1 beschrieben, das modifizierte Cosmid clo-CA7 in *S. coelicolor* M512 durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation eingebracht. Die Mutanten, die durch Integration des Cosmides in das Wirtsgenom entstanden, wurden durch ihre Apramycin- und Kanamycinresistenz selektiert. Die schematische Darstellung der Integration ist in Abbildung III.6-2B wiedergegeben. Die Mutanten wurden mit Southern Blot Analyse auf ihren Genotyp untersucht (Abb. III.6-2C).



**Abbildung III.6-2:** A) Cosmid-Konstrukte clo-BG1 und clo-CA7, die das Clorobiocincluster und die  $\Phi$ C31 Integrationsfunktion enthalten. B) Schematische Darstellung der Site spezifischen Integration von clo-CA7 in das Genom von *Streptomyces coelicolor* M512. X= *XhoI* Schnittstelle, T3, T7= T3, T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegebene Fragment Größen resultieren aus dem *XhoI* Verdau. C) Southern Blot Analyse der clo-CA7 Integrationsmutante. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Als Sonde wurde gelabeltes clo-BG1 Cosmid verwendet. Die genomische DNA wurde mit *XhoI* verdaut.



**Abbildung III.7:** HPLC-Analyse von A) Clorobiocin und den Clorobiocin-Derivate der Produktionsstämme: B) *Streptomyces coelicolor* M512 mit dem Cosmid clo-CA7, das den (His)<sub>6</sub>-Tag vor dem Gen *cloN6* trägt. C) *Streptomyces roseochromogenes* ( $\Delta$ cloN6-67), in der *cloN6* inaktiviert wurde.

### 1.3.2 Analyse der Sekundärstoffproduktion

Für die Analyse der Sekundärstoffproduktion wurden eine Mutante von *Streptomyces roseochromogenes* ( $\Delta cloN6-67$ ) mit dem inaktivierten Gen *cloN6* und vier Integrationsmutanten von *Streptomyces coelicolor* M512 mit dem Cosmid clo-CA7 in Produktionsmedium (s. Kapitel II/6.2.2.1) kultiviert. Anschließend wurden die Ethylacetatextrakte der Kulturen mittels HPLC analysiert. Als Standard wurde Clorobiocin verwendet. Die Mutante von *S. roseochromogenes* ( $\Delta cloN6-67$ ) mit dem inaktivierten Gen *cloN6* produzierte Novclobiocin 104 (61,2  $\mu\text{g/ml}$ ), Novclobiocin 109 (11,1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Novclobiocin 110 (3,45  $\mu\text{g/ml}$ ). Interessanterweise konnte in den Extrakten der Integrationsmutanten von *S. coelicolor* M512 mit dem Cosmid clo-CA7 die erwartete Clorobiocin-Produktion nicht nachgewiesen werden. Dafür produzierten die Mutanten Novclobiocin 104 (24,2  $\mu\text{g/ml}$ ), Novclobiocin 109 (3,9  $\mu\text{g/ml}$ ) und Novclobiocin 110 (0,86  $\mu\text{g/ml}$ ) in etwa dem gleichen Verhältnis wie die *cloN6*-Defektmutante (Abb. III.7). Die Insertion des (His)<sub>6</sub>-Tags verhinderte die Bildung des aktiven CloN6 Proteins. Wie schon bei der Inaktivierung von *cloN6* durch Westrich *et al.* (2003) beobachtet, wurde auch hier durch die fehlende Anwesenheit eines aktiven CloN6 Proteins der Acyltransfer durch CloN7 stark eingeschränkt, was in der hohen Produktion von Novclobiocin 104 resultiert.

### 1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsversuche der Methyltransferase CloN6

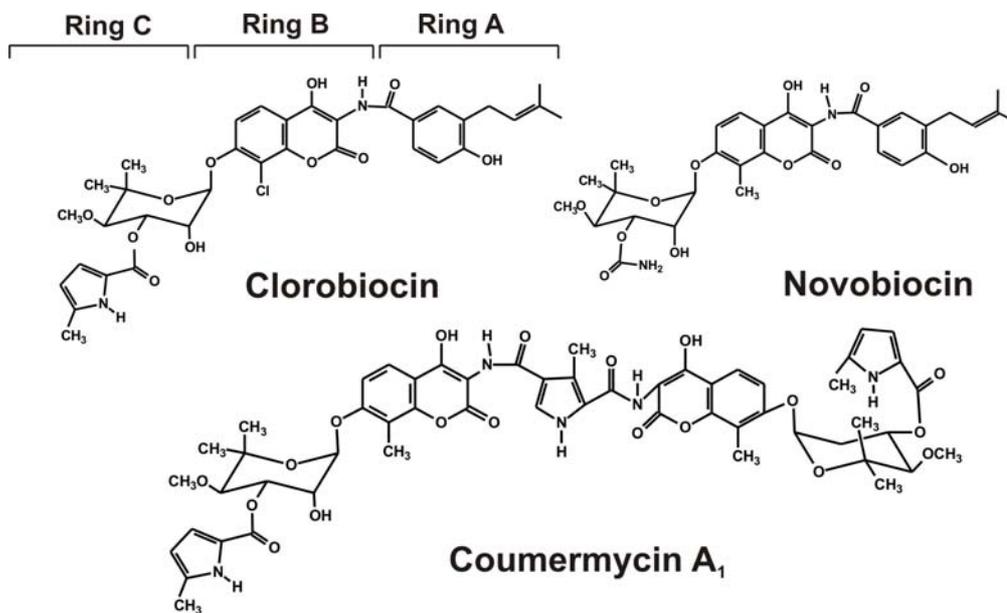
Um die Methyltransferase CloN6 biochemisch zu untersuchen, wurde *cloN6* zunächst in acht verschiedene Expressionsvektoren kloniert und anschließend versucht, das Protein in *E. coli*, *Streptomyces lividans* T7 und *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren und zu reinigen. Alternativ wurde versucht, das Protein durch einen N-terminal eingebrachten (His)<sub>6</sub>-Tag aus einer Integrationsmutante zu gewinnen. Jedoch blieben die Experimente erfolglos. Einzig der Versuch CloN6 mit Hilfe des Konstruktes pCA7 in einem Volumen von 1 Liter überzuexprimieren könnte erfolgreich sein. Hier zeigte sich nach der Reinigung eine schwache Bande der gesuchten Größe in der SDS-PAGE. Für eine biochemische Untersuchung des Proteins müsste zusätzlich noch die Expression und Reinigung optimiert werden, sowie die Identität des erhaltenen Proteins durch MS-Analyse bestätigt werden.

Nach neueren Erkenntnissen (Anderle *et al.*, 2007) ist für die Methylierung der Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe ein Proteinkomplex der Proteine CloN1, CloN6 und CloN7 wahrscheinlich. Das Substrat der Reaktion wurde als Pyrrolyl-2-carboxyl-S-CloN1 identifiziert. Da dieses Substrat zur Untersuchung der Methyltransferasereaktion nicht zur Verfügung steht, wurde das Projekt an dieser Stelle beendet.

## 2. Herstellung neuer Aminocoumarin-Antibiotika

### 2.1 Einleitung

Das charakteristische Strukturmerkmal der Aminocoumarine ist der 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Ring (= Ring B), der mit dem substituierten Desoxyzucker (= Ring C) verknüpft ist (Abb. III.8). Im Fall von Clorobiocin und Novobiocin ist dieser Aminocoumarin-Ring mit einer prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (= Ring A) verknüpft. Im Gegensatz dazu sind im Coumermycin zwei Aminocoumarin-Ringe mit einer 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass der Aminocoumarin-Ring zusammen mit dem substituierten Desoxyzucker essentiell für die Bindung an die B-Untereinheit der bakteriellen Gyrase ist (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997). Für die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure von Clorobiocin und Novobiocin konnte nur eine schwache Bindung an die Gyrase nachgewiesen werden (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a; Tsai *et al.*, 1997). Jedoch konnte beobachtet werden, dass diese Gruppe einen großen Einfluss auf die Aufnahme der Aminocoumarine in die Bakterien ausübt (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a).



**Abbildung III.8:** Strukturformeln der Aminocoumarin-Antibiotika Clorobiocin, Novobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub>.

Novobiocin ist das einzige Aminocoumarin-Antibiotikum, das bisher eine Zulassung als Arzneimittel erhalten hat. Es zeigte jedoch neben seiner Toxizität gegen eukaryontische Zellen nur eine geringe Aktivität gegen Gram-negativen Bakterien (Kirby *et al.*, 1956). Auch die Tendenz von Staphylokokken zur schnellen Resistenzentwicklung trägt zur Limitierung der Anwendung bei (Perronne *et al.*, 1987). Dies macht es notwendig, neue Aminocoumarine herzustellen.

## 2.2 Herstellung neuer Novobiocin-Derivate

Da bisher vor allem neue Clorobiocin-Derivate hergestellt wurden (Galm *et al.*, 2004a; Li und Heide, 2004), sollte nun eine Serie von neuen Novobiocin-Derivaten hergestellt werden, die verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu Novobiocin aufweisen. Die Grundstruktur der neuen Derivate sollte dabei der Struktur des Novobiocins entsprechen. Nur die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) sollte durch verschiedene Ring A-Analoga (RAA) ersetzt werden.

### 2.2.1 Enzymatische Synthese

Eine Möglichkeit zur Herstellung neuer Novobiocin-Derivate ist die enzymatische Synthese *in vitro*. Dafür wurden modifizierte Amidsynthetase-Assays mit den Amidsynthetasen CloL, CouL und NovL durchgeführt (s. Kapitel II/8.4). Diese Amidsynthetasen wurden bereits in früheren Arbeiten charakterisiert (Galm *et al.*, 2004a; Schmutz *et al.*, 2003b; Steffensky *et al.*, 2000a). Es konnte gezeigt werden, dass die Amidsynthetasen den Transfer der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) auf die Aminogruppe des Aminocoumarin-Rings (Ring B) bzw. im Fall von CouL den Transfer der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure auf die Aminogruppen der zwei Aminocoumarin-Ringe (Ring B) katalysiert. Durch weitere Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass diese Amidsynthetasen auch eine sehr unterschiedliche Substratspezifität im Bezug auf unterschiedliche Ring A-Analoga zeigen (Galm *et al.*, 2004a). Zur Herstellung neuer Novobiocin-Derivate sollte nun diese unterschiedliche Substratspezifität genutzt werden. Um in einem Schritt ein neues Novobiocin-Derivat herstellen zu können, musste der Amidsynthetase-Assay modifiziert werden. Statt dem Aminocoumarin-Ring, der das natürliche Substrat der Amidsynthetasen darstellt, wurde Novenamin eingesetzt, das aus dem Aminocoumarin-Ring mit der freien Aminogruppe und dem carbamoylierten Desoxyzucker besteht (Abb. III.9). Durch diese Modifikation könnte Novenamin direkt mit Ring A bzw. einem Ring A-Analogen umgesetzt werden und das entsprechende Novobiocin-Derivat erhalten werden.

Da Novenamin kommerziell nicht erhältlich ist, wurde zunächst eine chemische Synthese dieser Substanz durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Synthese und Strukturaufklärung von Novenamin

Die Synthese von Novenamin und dessen Reinigung sind unter Kapitel II/11. im Methodenteil ausführlich beschrieben. Als Basis der Synthese diente eine Oxazol-Vorstufe (Oxazolcoumarin), die zuvor durch die Behandlung von Novobiocin mit Acetanhydrid und Pyridin bei der Synthese von Ring A gewonnen wurde. Durch die Behandlung der Oxazol-Vorstufe mit Acetylchlorid in wasserfreiem Ethanol wurde das Oxazol gespalten und es entstand die freie Aminogruppe an Position 3' und die Hydroxygruppe an Position 4' des Aminocoumarin-Rings (Abb. III.9). Durch das anschließende Lösen des erhaltenen Rückstandes in Methanol erfolgte eine teilweise Deacetylierung des Produktes an der Position 2''. Die Aufreinigung und Isolierung der entstandenen Produkte erfolgte über eine Kieselsäule mit anschließender Reinigung über eine Sephadexsäule. Mittels  $^1\text{H}$  NMR wurde sowohl das gesuchte Novenamin in einer Ausbeute von 3%, bezogen auf die eingesetzte Menge der Vorstufe, als auch eine

acetylierte Form davon, welche eine Acetylgruppe an Position 2'' des Desoxyzuckers trägt, in einer Ausbeute von 4,5% identifiziert. Als ein weiteres Produkt wurde Ring A in einer Ausbeute von 18%, bezogen auf die eingesetzte Menge der Vorstufe, identifiziert (Spektren im Anhang VII.3). Dies deutet darauf hin, dass die verwendete Ausgangssubstanz nicht rein war, sondern noch Ring A als Verunreinigung aus dem ersten Syntheseschritt enthalten war. Des Weiteren kann durch diese starke Verunreinigung auch die geringe Ausbeute von Novenamin erklärt werden.

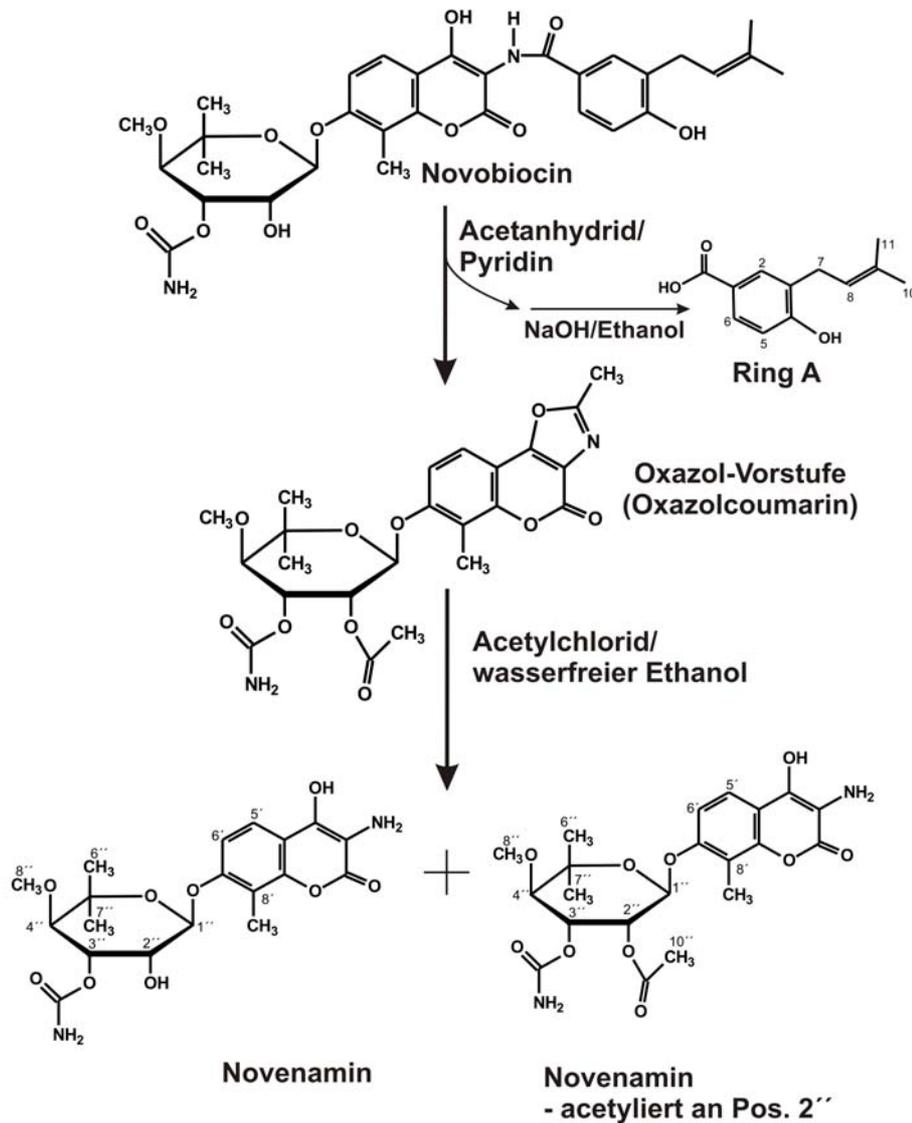


Abbildung III.9: Synthese von Novenamin ausgehend von Novobiocin.

### 2.2.1.2 Amidsynthetase-Assays mit Novenamin

Um zu testen, ob Novenamin bzw. acetyliertes Novenamin als Substrat der Amidsynthetasen CloL, NovL oder CouL akzeptiert wird, wurden Amidsynthetase-Assays mit Novenamin und der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) durchgeführt. Die Bildung des resultierenden Novobiocin im Assay wurde mittels HPLC kontrolliert (s. Kapitel II/12.3).

Es konnte jedoch bei keinem Assay eine Produktbildung nach Inkubation mit Novenamin oder acetyliertem Novenamin und Ring A beobachtet werden. Um eine Hemmung der Produktbildung durch Novenamin bzw. acetyliertem Novenamin in der verwendeten Konzentration von 1 mM auszuschließen, wurden Assays mit Ring A und Ring B in Anwesenheit von Novenamin bzw. acetyliertem Novenamin durchgeführt. Jedoch trat eine Hemmung der Produktbildung erst ab einer Konzentration von 5 mM auf. Somit resultierte aus dieser Untersuchung, dass Novenamin bzw. acetyliertes Novenamin nicht von den Amidsynthetasen NovL, CloL und CouL akzeptiert wird. Auf diese Weise können somit keine neuen Novobiocin-Derivate gewonnen werden.

## 2.2.2 Herstellung neuer Novobiocin-Derivate durch Mutasynthese

Da eine *in vitro* Herstellung neuer Novobiocin-Derivate nicht möglich war, sollten neue Derivate durch Mutasynthese *in vivo* gewonnen werden. Durch Fütterung synthetischer Ring A-Analoga an eine in der Biosynthese von Ring A-defekte Mutante des Novobiocin-Produzenten sollen neue Derivate generiert werden. Diese Methode wurde schon erfolgreich von Galm *et al.* (2003) bei der Herstellung neuer Clorobiocin-Derivate mit dem Clorobiocin-Produzenten durchgeführt.

### 2.2.2.1 Herstellung einer *novQ*-Defektmutante

#### 2.2.2.1.1 Inaktivierung von *novQ* in *Streptomyces spheroides*

Zur Herstellung von Novobiocin-Derivaten wurde eine Inaktivierung des Prenyltransferase-Gens *novQ* in *Streptomyces spheroides*, dem natürlichen Produzenten von Novobiocin, durchgeführt (s. Kapitel II/9.1.2.1). *novQ* codiert für eine Prenyltransferase, die zur Biosynthese von Ring A notwendig ist.

Dafür wurde das Cosmid 10-9c, das das komplette Biosynthesegencluster von Novobiocin enthält, benutzt. Auf Grund eines fehlenden *oriT* im Cosmid 10-9c, der zur Konjugation des Cosmides in *S. spheroides* notwendig ist, wurde das Ampicillinresistenz-Gen *bla* im Cosmid 10-9c durch die Spectinomycin/Streptomycin+*oriT* (*aadA*) Kasette aus pIJ778 ersetzt (s. Kapitel II/9.1.1). Die Spectinomycin/Streptomycin+*oriT* (*aadA*) Kasette aus pIJ778 wurde dafür mit den entsprechenden Primern, die 39 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor und nach dem Ampicillinresistenz-Gen *bla* waren, per PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Ersetzung der Resistenz im Cosmid 10-9c verwendet. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA1.

Um das Gen *novQ* durch die Apramycinkasette *aac(3)IV* im Cosmid nov-CA1 zu ersetzen, wurde die Apramycinkasette aus dem Plasmid pUG019 mit den entsprechenden Primern, die 39 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor und nach *novQ* waren, per PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Ersetzung von *novQ* im Cosmid nov-CA1 verwendet. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA2. Das modifizierte Cosmid wurde anschließend durch Konjugation in *S. spheroides* eingebracht (s. Kapitel II/7.8.2). Die Mutanten, die durch homologe Rekombination entstanden sind, wurden anhand der Apramycinresistenz selektiert und durch Southern Blot bestätigt (nicht gezeigt). Für die Analyse der Sekundärstoffe wurden drei unabhängige Mutanten, wie unter Kapitel II/6.2.2.2 beschrieben, kultiviert. Um die Bildung der Aminocoumarin-Gruppe und des Desoxyzuckers in den Mutanten

zu kontrollieren, wurden die Mutanten mit der prenylierter 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) gefüttert. Als Kontrolle wurden ebenfalls ungefütterte Mutanten angezogen. Anschließend wurden die Kulturen mittels HPLC analysiert.

Bei den ungefütterten Mutanten konnte wie erwartet keine Produktion von Novobiocin beobachtet werden. Nach Zufütterung konnte überraschenderweise auch keine Novobiocinproduktion detektiert werden. Allerdings konnte ein Peak beobachtet werden, der die gleiche Retentionszeit aufweist, wie das Aglykon von Novobiocin (Novobiocinsäure; durchschnittliche produzierte Menge: 24,33 µg/ml) (nicht gezeigt). Es wurde angenommen, dass durch einen polaren Effekt der Apramycinkassette die Translation der „downstream“ von *novQ* liegenden Gene der Zuckerbiosynthese *novSTUVW* beeinträchtigt wird. Um dieses Problem zu lösen, wurden neue Inaktivierungsmutanten hergestellt.

Dazu wurde die Apramycinkassette im Cosmid nov-CA2, die von den Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI* flankiert wurde, durch Verdau mit *XbaI* und *SpeI* und anschließender Religation der kompatiblen Enden entfernt. Dabei wurde eine 18 bp „in-frame Scar“-Sequenz statt des Genes *novQ* hinterlassen. Das resultierende Cosmid wurde als nov-CA4 ( $\Delta novQ$ , *apra<sup>S</sup>*) bezeichnet. Daraufhin sollte das Cosmid nov-CA4 in *S. spheroides* ( $\Delta novQ/+apra$ ) konjugiert werden. Jedoch wurden trotz mehrfacher Konjugationsversuche keine Kanamycin-resistenten single-crossover Mutanten erhalten werden.

Um eine *novQ*-Defekmutante zu erhalten, die einfacher zu manipulieren ist, wurden neue Integrationsmutanten hergestellt.

#### **2.2.2.1.2 Inaktivierung von *novQ* in nov-BG1 und heterologe Expression in *Streptomyces coelicolor* M512**

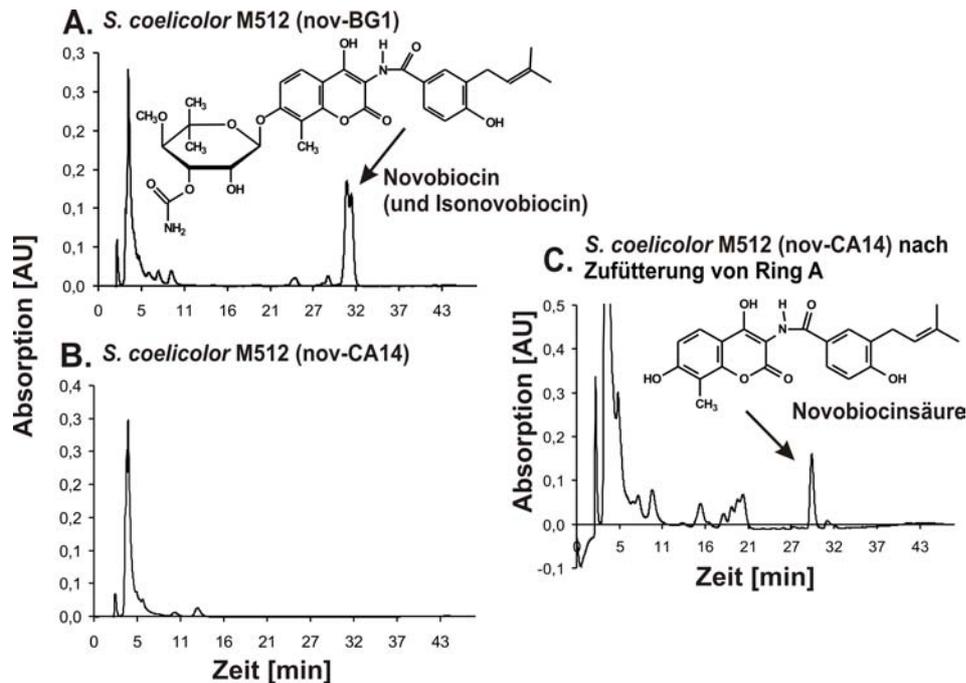
Um die Apramycinkassette einfacher entfernen zu können, wurde das Gen *novQ* durch die Apramycinkassette *aac(3)IV* im Cosmid nov-BG1, das das komplette Biosynthesegencluster von Novobiocin enthält, wie oben beschrieben, ersetzt (s. auch Kapitel II/9.1.2.2). Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA12.

Die Resistenzkassette *aac(3)IV* befand sich in diesem Konstrukt zwischen den Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI*. Um einen polaren Effekt bei dieser Inaktivierung auszuschließen, wurde die Resistenzkassette durch Verdau mit *XbaI* und *SpeI* und anschließender Religation der kompatiblen Enden entfernt. Dabei wurde eine 18 bp „in-frame Scar“-Sequenz statt des Genes *novQ* hinterlassen. Das resultierende Cosmid wurde als nov-CA14 ( $\Delta novQ$ , *apra<sup>S</sup>*) bezeichnet.

Die Cosmide nov-CA12 und nov-CA14 wurden, wie unter Kapitel II/7.8.1 beschrieben, durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht und die erhaltenen Mutanten mittels Southern Blot auf ihren Genotyp hin untersucht (nicht gezeigt). Für die Analyse der Sekundärstoffe wurden die Mutanten in Produktionsmedium kultiviert und mit Ring A gefüttert. Als Kontrolle wurde *S. coelicolor* M512 (nov-BG1) sowie ungefütterte *S. coelicolor* M512 (nov-CA12) und *S. coelicolor* M512 (nov-CA14) Mutanten angezogen.

Die HPLC-Analyse der Integrationsmutante von *S. coelicolor* M512 mit dem unmodifizierten Cosmid nov-BG1 zeigte Novobiocin als dominantes Produkt (27,88 µg/ml). Dagegen konnte im Medium der ungefütterten *S. coelicolor* M512 (nov-CA12) und *S. coelicolor* M512 (nov-CA14) Mutanten, wie erwartet, weder Novobiocin noch anderen Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden. Nach Zufütterung von Ring A zu

den Mutanten *S. coelicolor* M512 (nov-CA12) und *S. coelicolor* M512 (nov-CA14) wurde jedoch wieder ein dominanter Produktpeak in den HPLC-Chromatogrammen der beiden Mutanten beobachtet, der die gleiche Retentionszeit wie Novobiocinsäure aufweist (Abb. III.10). Dieser Produktpeak der *S. coelicolor* M512 (nov-CA14) Mutante wurde daraufhin isoliert und mittels  $^1\text{H}$  NMR und MS untersucht. Die Substanz konnte eindeutig als Novobiocinsäure identifiziert werden (Spektrum im Anhang VII.4). Das erwartete Novobiocin konnte nicht nachgewiesen werden. Ein polarer Effekt der benutzten Apramycin-Resistenzkassette kann somit als Grund für das Ausbleiben der Novobiocin-Produktion ausgeschlossen werden.

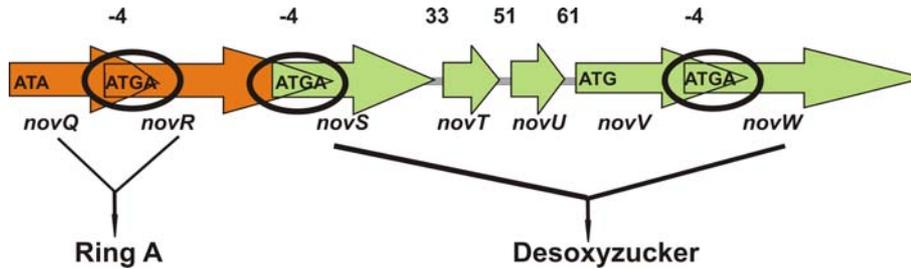


**Abbildung III.10:** HPLC-Analyse der Sekundärstoffproduktion von A) *S. coelicolor* M512 mit intaktem Novobiocin-Cluster (nov-BG1). Isonovobiocin trägt die Carbamoylgruppe an Position 2'' statt an Position 3'' des Desoxyzuckers und weist eine etwas längere Retentionszeit als Novobiocin auf. B) *S. coelicolor* M512 mit dem *novQ*-Defektcluster (nov-CA14) ohne Apramycinkassette. C) *S. coelicolor* M512 mit dem *novQ*-Defektcluster (nov-CA14) nach Zufütterung von Ring A.

Da der substituierte Zucker essentiell für die Hemmung der bakteriellen Gyrase ist (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996a; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997) und somit zur Gewinnung neuer und aktiver Novobiocin-Derivate unbedingt erforderlich ist, wurde versucht das Problem des fehlenden Zuckers mittels weiterer Inaktivierungsexperimente aufzuklären.

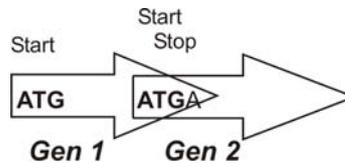
#### 2.2.2.1.3 Inaktivierung von *novQ* in nov-BG1 zum Nachweis des „translational coupling“ und heterologe Expression in *Streptomyces coelicolor* M512

Es folgte eine genaue Analyse der betroffenen Bereiche im Gencluster von Novobiocin. Die *novQ* nachfolgenden Gene *novR* sowie die Gene *novSTUVW*, die an der Zuckerbiosynthese beteiligt sind, liegen sehr nah beieinander und überlappen sich im Fall von *novQ/novR*, *novR/novS* und *novV/novW* sogar (Abb. III.11a). Dies deutet auf ein „translational coupling“ während der Translation dieser Gene hin.



**Abbildung III.11a:** Schematische Abbildung von *novQ* und den „downstream“ liegenden Gene der Zuckerbiosynthese *novSTUVW* im Novobiocincluster. Die Größe der intergenischen Bereiche ist angegeben [bp]. Schema nicht maßstabsgetreu.

Beim „translational coupling“ liest das Ribosom das Gen 1 bis zum Stopcodon ab und gleitet dann zum Startcodon des Gens 2, das innerhalb von Gen 1 liegt (Abb. III.11b) (Herr *et al.*, 2000).



**Abbildung III.11b:** Schematische Darstellung der Überlappung von Gen 1 und Gen 2 beim „translational coupling“.

Bei den bisher durchgeführten Inaktivierungen von *novQ* wurde das Gen komplett gegen die Apramycinkassette ausgetauscht. Durch die Entfernung des Codons vor dem Stopcodon von *novQ*, das einen Teil des Startcodons von *novR* enthält, könnte jedoch dieses „translational coupling“ gestört werden. Es könnte somit zum Ausfall der Translation der Zuckerbiosynthese-Gene *novSTUVW* kommen, was die bisherigen Ergebnisse der Sekundärstoffanalyse erklären könnte.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde eine weitere Inaktivierung von *novQ* im Cosmid nov-BG1 durchgeführt, wobei diesmal das Stopcodon und das angrenzende, „upstream“ liegende Codon von *novQ* erhalten blieben.

Dafür wurde die Apramycinkassette (*aac(3)IV*) aus dem Plasmid pUG019 mit den entsprechenden Primern mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt zur Ersetzung von *novQ* im Cosmid nov-BG01 verwendet. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA5. Auch hier wurde durch Verdau mit *XbaI* und *SpeI* und anschließender Religation der kompatiblen Enden die Resistenzkassette wieder entfernt. Das resultierende Cosmid wurde als nov-CA7 ( $\Delta novQ$ , *apra<sup>S</sup>*) bezeichnet und mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Kanamycin-resistente Klone wurden mittels Southern Blot auf ihren Genotyp untersucht (Blot s. Kapitel III/2.4.2).

Für die Analyse der Sekundärstoffe wurden sieben unabhängige Mutanten in Produktionsmedium kultiviert und mit Ring A gefüttert. Als Kontrolle wurden ungefütterte Mutanten kultiviert.

Die HPLC-Analyse der ungefütterten Integrationsmutanten zeigte, wie erwartet, keine Produktion von Novobiocin. Nach Zufütterung von Ring A zu den Mutanten *S. coelicolor* M512 (nov-CA7) zeigte sich, wie schon in den vorangegangenen Versuchen, Novobiocinsäure als Produktpeak (nicht gezeigt).

Somit scheint das Fehlen des Desoxyzuckers nicht mit dem „translational coupling“ in Zusammenhang zu stehen.

#### 2.2.2.1.4 Inaktivierung von *novQ* in nov-BG1 mittels Frameshift und heterologe Expression in *Streptomyces coelicolor* M512

Eine weitere Hypothese, die das Fehlen des Desoxyzuckers erklären kann, besagt, dass innerhalb des Genes *novQ* der Promotor für die Gene der Zuckerbiosynthese *novSTUVW* liegen könnte. Durch die Inaktivierung von *novQ*, die bisher durch den Austausch von *novQ* gegen die Apramycin-Resistenzkassette durchgeführt wurde, würde auch dieser Promotor entfernt werden. Die Gene der Zuckerbiosynthese *novSTUVW* würden nicht mehr abgelesen werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine weitere Inaktivierung von *novQ* mittels Frameshift im Cosmid nov-BG1 durchgeführt. Durch die Entfernung einer Base „downstream“ des Startcodons von *novQ* kommt es zu einem Frameshift, der bewirkt, dass die Transkription nach 443 Basenpaaren abbricht. Der mögliche Promotor würde so erhalten bleiben.

Dafür wurde die Apramycinkassette (*aac(3)IV*) aus dem Plasmid pUG019 mit den entsprechenden Primern per PCR amplifiziert und anschließend zur Entfernung einer Base von *novQ* im Cosmid nov-BG01 verwendet. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA6. Durch einen Verdau mit *XbaI* und *SpeI* wurde die Resistenzkassette *aac(3)IV* wieder entfernt. Das resultierende Cosmid trägt die Bezeichnung nov-CA8. Mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation wurde nov-CA8 in *S. coelicolor* M512 eingebracht, auf Kanamycinresistenz selektiert und die erhaltenen Mutanten mittels Southern Blot auf den Genotyp untersucht (nicht gezeigt).

Für die Analyse der Sekundärstoffe wurden sechs unabhängige Mutanten in Produktionsmedium kultiviert und mit Ring A gefüttert. Als Kontrolle wurden auch ungefütterte Mutanten kultiviert.

Die HPLC-Analyse der ungefütterten Integrationsmutanten zeigte, wie erwartet, keine Produktion von Novobiocin. Wie schon in den voran gegangenen Versuchen, wurde Novobiocinsäure nach Zufütterung von Ring A zu den Mutanten *S. coelicolor* M512 (nov-CA8) als Produkt erhalten (nicht gezeigt). Eine Produktion von Novobiocin konnte nicht beobachtet werden.

Auch mit dieser Inaktivierung konnte das Phänomen des fehlenden Desoxyzuckers nicht geklärt werden.

Um eine genauere Aussage treffen zu können, ob die Gene der Zuckerbiosynthese nicht transkribiert werden oder ob ein Problem bei der Translation vorliegt, müsste die RNA-Bildung der Gene *novSTUVW* untersucht werden.

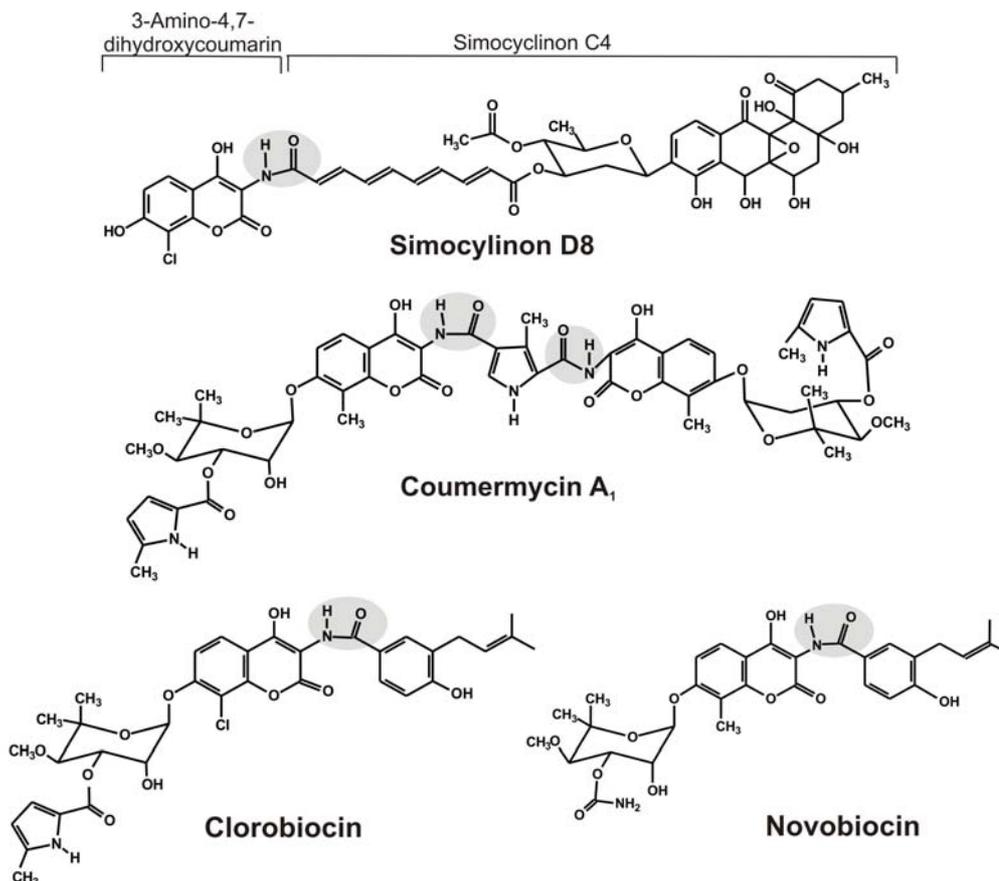
#### 2.2.2.1.5 Fazit der Inaktivierung von *novQ*

Das Ziel der Herstellung der *novQ*-Defektmutanten war die Produktion von neuen Novobiocin-Derivate durch Zufütterung von verschiedenen Ring A-Analoga. Jedoch wurde die Novobiocinproduktion nach Zufütterung des natürlichen Substrates, der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A), an die verschiedenen *novQ*-Inaktivierungsmutanten nicht wieder hergestellt. Es konnte trotz der Herstellung von verschiedenen Inaktivierungsmutanten nicht geklärt werden, warum der Desoxyzucker nicht synthetisiert wird. Das Problem der Biosynthese könnte sowohl im Bereich der Transkription oder als auch im Bereich der Translation liegen.

Deshalb wurde der Versuch der Herstellung von neuen Novobiocin-Derivaten mit den *novQ*-Defektmutanten an diesem Punkt eingestellt.

### 2.3 Herstellung neuer Clorobiocin-Derivate durch Mutasynthese

Bisher wurden durch Geninaktivierungen, chemoenzymatischer Synthese und kombinatorischer Biosynthese neue Clorobiocin-Derivate hergestellt (Li und Heide, 2004). Um Clorobiocin-Derivate herzustellen, die unterschiedliche Ring A-Analoga (RAA) tragen, wurden umfangreiche Untersuchungen zur Substratspezifität der Amidsynthetasen CloL, NovL und CouL durchgeführt (Galm *et al.*, 2004a; Luft *et al.*, 2005; Pacholec *et al.*, 2005a; Schmutz *et al.*, 2003b). Nachdem sich durch diese Untersuchungen gezeigt hatte, dass CloL die größte Anzahl der angebotenen Ring A-Analoga akzeptierte, wurde anschließend der Clorobiocin-Produzent *Streptomyces roseochromogenes* für weitere Mutasynthese-Experimente ausgewählt, in welchem die Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) durch Inaktivierung des Prenyltransferase-Gens *cloQ* blockiert war (*S. roseochromogenes* QDCO661) (Pojer *et al.*, 2003b). Durch Fütterungsexperimente mit verschiedenen Ring A-Analoga zu *S. roseochromogenes* QDCO661 konnten neue Clorobiocin-Derivate isoliert und identifiziert werden, die die Struktur von Clorobiocin aufwiesen, aber unterschiedliche Substituenten (Ring A-Analoga) an der Aminocoumarin-Gruppe trugen (Galm *et al.*, 2004a). Jedoch war diese Methode zur Herstellung neuer Clorobiocin-Derivate limitiert durch die Substratspezifität der Amidsynthetase CloL, die die extern zugegebenen Ring A-Analoga an die 3-Aminogruppe des Aminocoumarin-Rings knüpft.



**Abbildung III.12:** Strukturen von Clorobiocin, Novobiocin, Simocyclinon D8 und Coumermycin A<sub>1</sub>; die Amidbindungen sind grau hinterlegt.

Um diese Limitierung aufzuheben, wurde ein neues Verfahren zur Herstellung von Clorobiocin-Derivaten mittels Mutasynthese und metabolischem Engineering entwickelt. Dazu wurden die Amidsynthetasen CouL und SimL, die in der Biosynthese

von Coumermycin A<sub>1</sub> und Simocyclinon D8 involviert sind, in eine speziell hergestellte Mutante des Clorobiocin-Produzenten eingebracht. Beide Enzyme nutzen, wie die genuine Amidsynthetase CloL, 3-Amino-4,7-dihydroxybenzoesäure als Substrat, jedoch verwenden sie komplett andere Acylkomponenten wie CloL (Abb. III.12). Wie man schon durch Strukturen von Clorobiocin und Novobiocin vermuten kann, sind die Substratspezifitäten von CloL und NovL sehr ähnlich (Galm *et al.*, 2004a), deshalb wurde NovL für diese Versuche nicht ausgewählt.

Um die Amidsynthetasen leicht in eine *cloQ*-Defektmutante einbringen zu können und um eine eventuelle Integration des eingebrachten Amidsynthetase-Gens ins Genom zu vermeiden, wurden neue Mutanten des Clorobiocin-Produzenten hergestellt, in denen sowohl die Prenyltransferase *cloQ* als auch die Amidsynthetase *cloL* inaktiviert wurden. Dazu wurde in *Streptomyces roseochromogenes* QDCO661 (Pojer *et al.*, 2003b) *cloL* und im Cosmid clo-BG1 *cloL* und *cloQ* inaktiviert.

### 2.3.1 Inaktivierung von *cloL* in *Streptomyces roseochromogenes* QDCO661

In der bisher für Fütterungen genutzten Mutante *S. roseochromogenes* QDCO661 ist das Gen *cloQ* durch eine Deletion inaktiviert worden (Pojer *et al.*, 2003b). Um diese Mutante für die weiteren Versuche mit verschiedenen Amidsynthetasen nutzbar zu machen, wurde das Amidsynthetase-Gen *cloL* durch PCR-Targeting inaktiviert.

Dazu wurde *cloL* mittels PCR-Targeting im Cosmid D1A8 inaktiviert. Unter Verwendung von Primern mit 39 bp Homologie zu den Bereichen unmittelbar vor und nach *cloL* wurde die Apramycinkassette *aac(3)IV* aus dem Plasmid pUG019 amplifiziert und anschließend zur Ersetzung des Gens *cloL* verwendet. Das resultierende Cosmid trägt die Bezeichnung clo-CA1.

Um das Cosmid clo-CA1 mittels Konjugation in die Mutante einzubringen, wurde die Ampicillinresistenz im Cosmid clo-CA1 durch die Spectinomycin/Streptomycin+*oriT* (*aadA*) Kassette aus pIJ778 ersetzt (s. Kapitel II/9.1.1). Diese Resistenzkassette (*aadA*) wurde dafür mit den entsprechenden Primern, die 39 Basenpaare homolog zu dem Bereich vor und nach der Ampicillinresistenz waren, per PCR amplifiziert und anschließend zur Ersetzung der Resistenz im Cosmid clo-CA1 verwendet. Das erhaltene Cosmid trägt die Bezeichnung clo-CA6.

Das Cosmid clo-CA6 wurde anschließend durch Konjugation in *S. roseochromogenes* QDCO661 eingebracht. Die resultierenden Mutanten *S. roseochromogenes* CA-L-Q ( $\Delta cloL \Delta cloQ$  +*apra*), die durch Integration der Apramycinkassette in das Wirtsgenom entstanden sind, wurden durch ihre Apramycinresistenz selektiert und mittels Southern Blot auf ihren Genotyp untersucht (nicht gezeigt).

### 2.3.2 Inaktivierung von *cloQ* und *cloL* in clo-BG1 und heterologe Expression in *Streptomyces coelicolor* M512

Zusätzlich wurde das Amidsynthetase-Gen *cloL* mittels PCR-Targeting im Cosmid clo-BG1 inaktiviert. Die Apramycinkassette *aac(3)IV* aus dem Plasmid pUG019, die flankiert wird von den Restriktionsschnittstellen für *XbaI* und *SpeI*, wurde per PCR mit den entsprechenden Primern amplifiziert und anschließend zur Ersetzung des Gens *cloL* verwendet. Das resultierende Cosmid trägt die Bezeichnung clo-CA2. Da diese Resistenzkassette auch zur Ersetzung von *cloQ* im selben Cosmid verwendet werden

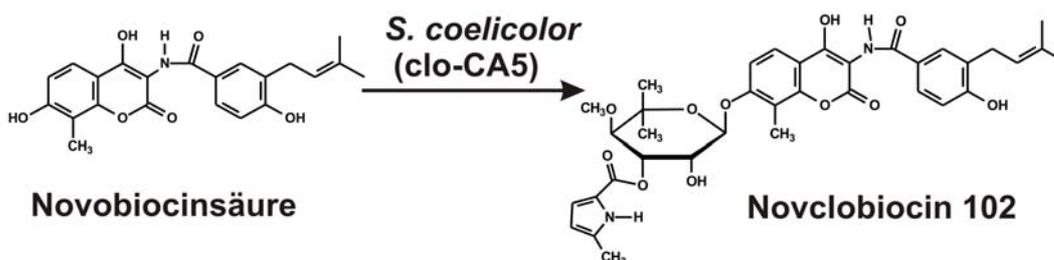
sollte, wurde sie mittels Verdau mit *XbaI* und *SpeI* und anschließender Religation der kompatiblen Enden wieder entfernt. Anstatt des Gens *cloL* wurde eine 18 bp „in-frame Scar“-Sequenz hinterlassen. Das resultierende Cosmid wurde als clo-CA3 ( $\Delta cloL$ , *apra<sup>S</sup>*) bezeichnet.

Anschließend wurde im Cosmid clo-CA3 das Gen *cloQ* gegen die Apramycinkassette *aac(3)IV*, wie für *cloL* beschrieben, ausgetauscht. Um einen polaren Effekt auf die nachfolgenden Gene der Zuckerbiosynthese auszuschließen, wurde die Inaktivierungskassette wieder entfernt. Das resultierende Cosmid trägt die Bezeichnung clo-CA5 ( $\Delta cloL\Delta cloQ$ , *apra<sup>S</sup>*).

Das modifizierte Cosmid clo-CA5 wurde durch PEG-vermittelte Protoplastentransformation in *S. coelicolor* M512 eingebracht. Die Mutanten, die durch Integration des Cosmides in das Wirtsgenom entstanden, wurden durch ihre Kanamycinresistenz selektiert. Die schematische Darstellung der Integration ist in Abb. III.13B wiedergegeben. Die erhaltenen Mutanten wurden mittels Southern Blot Analyse auf ihren Genotyp untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung III.13E präsentiert. Das Fehlen des Gens *cloL* ist dabei durch die 16,3 kb Bande anstelle der 17,9 kb Bande, das Fehlen von *cloQ* durch die Anwesenheit der 7,6 kb Bande anstatt der 8,4 kb Bande charakterisiert (Abb. III.13C und D).

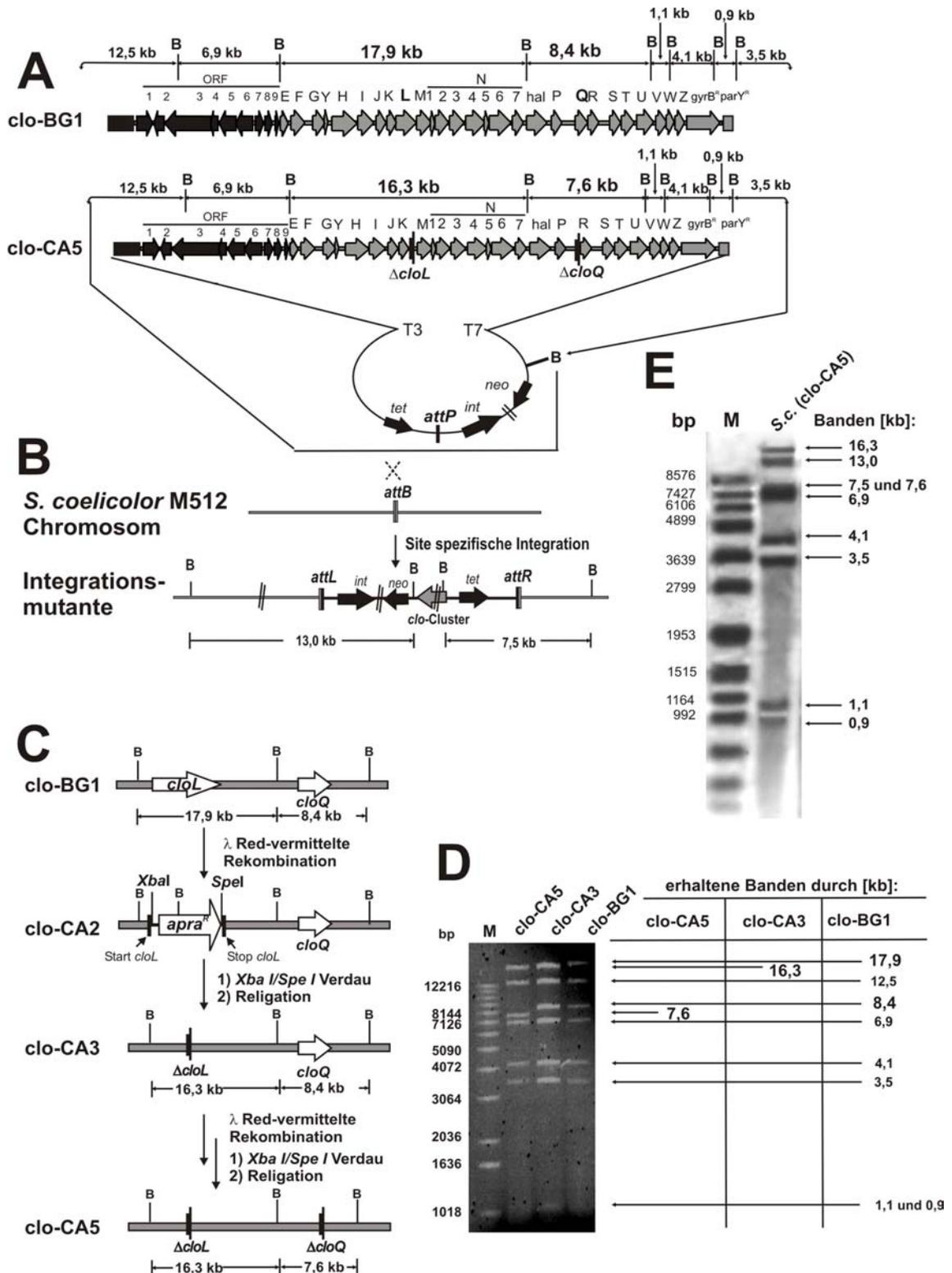
### 2.3.3 Fütterungskontrolle der Mutanten

Um zu testen, ob die Gene der Zuckerbiosynthese noch intakt sind, wurden die erhaltenen Mutanten der Stämme *S. coelicolor* (clo-CA5) und *S. roseochromogenes* CA-L-Q angezogen und mit Novobiocinsäure gefüttert, wie in Kapitel II/10.1 beschrieben. Als Kontrolle wurden ungefütterte Mutanten beider Stämme angezogen. Eine Fütterung mit Ring A war nicht möglich, da die Mutanten durch die Abwesenheit der Amidsynthetase CloL Ring A nicht mit dem Aminocoumarin-Ring verknüpfen können. Als Kontrolle wurden Mutanten angezogen, die nicht gefüttert wurden.



**Abbildung III.14:** Produktion von Novclobiocin 102 nach Zufütterung von Novobiocinsäure zu *S. coelicolor* (clo-CA5).

Wie erwartet, konnte im Extrakt der ungefütterten Mutanten keine Clorobiocin-Produktion mehr beobachtet werden. Dagegen wurde im Extrakt der gefütterten Mutanten beider Stämme das erwartete Novclobiocin 102 (Abb. III.14) nachgewiesen, was eindeutig die Funktionsfähigkeit der Gene der Zuckerbiosynthese nachweist (nicht gezeigt). Jedoch unterschieden sich die produzierten Mengen. *S. roseochromogenes* CA-L-Q Mutanten produzierten durchschnittlich 5,1 mg/ml Novclobiocin 102. Die Produktion der *S. coelicolor* (clo-CA5) Mutanten lag mit durchschnittlich 7,55 mg/ml Novclobiocin deutlich höher. Da dieser Stamm zusätzlich leichter zu manipulieren ist als der Stamm *S. roseochromogenes* CA-L-Q (Eustáquio *et al.*, 2005a), wurde *S. coelicolor* (clo-CA5) für die weiteren Fütterungsexperimente verwendet.



**Abbildung III.13:** A) Cosmide clo-BG1 und clo-CA5 ( $\Delta cloL\Delta cloQ$ , *apra*<sup>S</sup>), die das Clorobiocin Biosynthesegencluster und die  $\Phi$ C31 Integrationsfunktion enthalten. B) schematische Darstellung der Site spezifischen Integration von clo-CA5 in das Genom von *S. coelicolor* M512. B= *Bgl*III Schnittstelle, T3, T7= T3, T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegebene Fragment Größen resultieren aus dem *Bgl*III Verdau. C) detaillierte Ansicht der Ersetzung der Gene *cloL* und *cloQ* durch die Apramycin-Resistenzkassette, sowie deren Entfernung; D) Gelelektrophorese der resultierenden Cosmide clo-CA3 und clo-CA5 im Vergleich zu clo-BG1. M= 1 kb DNA Marker (Invitrogen). DNA von clo-BG1, clo-CA3 und clo-CA5 wurde mit *Bgl*III verdaut. E) Southern Blot Analyse der clo-CA5 Integrationsmutante. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Als Sonde wurde gelabertes clo-BG1 Cosmid verwendet. Die genomische DNA wurde mit *Bgl*III verdaut.

### 2.3.4 Klonierung der Amidsynthetase-Gene *couL* und *simL* in pUWL201 und Transformation in *Streptomyces coelicolor* (clo-CA5)

Um die fremden Amidsynthetase-Gene *simL* bzw. *couL* in *S. coelicolor* (clo-CA5) einzubringen, wurden sie in den Vektor pUWL201 inkloniert, der eine Expression unter Kontrolle des konstitutiven *ermE*\* Promotors ermöglicht. Die resultierenden Plasmide pSH2, das das Gen *simL* enthält, und pMS91, das das Gen *couL* enthält, sowie der leere Expressionsvektor pUWL201 wurden mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation in *S. coelicolor* (clo-CA5) eingebracht.

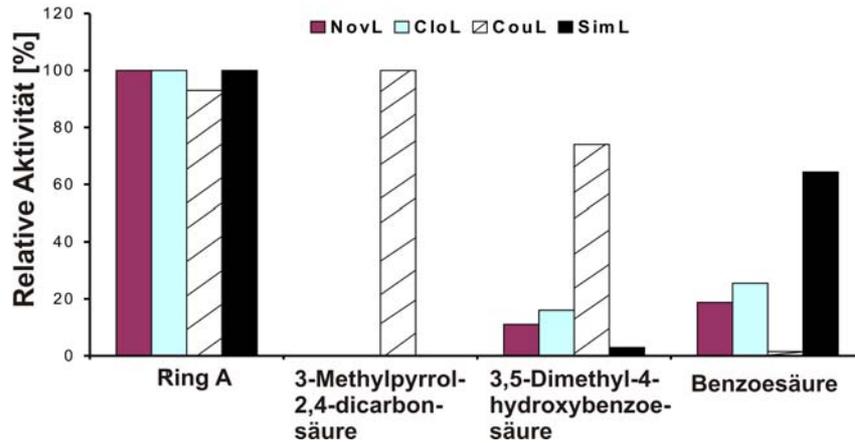
Es wurden Fütterungsexperimente mit Ring A durchgeführt, wie in Kapitel II/10.1 beschrieben, um die Funktion der eingebrachten Amidsynthetase zu testen. Wie schon bei früheren Untersuchungen beobachtet, wird prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) von den Amidsynthetasen CouL und SimL akzeptiert (Galm *et al.*, 2004a; Luft *et al.*, 2005; Schmutz *et al.*, 2003b). Als Kontrolle wurden Mutanten angezogen, die nicht gefüttert wurden, sowie *S. coelicolor* (clo-CA5) mit leerem Expressionsvektor pUWL201.

Wie erwartet, wurde im Extrakt der ungefütterten Mutanten und im Extrakt von *S. coelicolor* (clo-CA5)/pUWL201 keine Clorobiocin-Produktion nachgewiesen. Im Extrakt der mit Ring A gefütterten Mutanten von *S. coelicolor* (clo-CA5) mit *simL* oder *couL* wurde, wie erwartet, Clorobiocin als Produkt detektiert (nicht gezeigt).

### 2.3.5 Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums bei Mutasyntese Experimenten

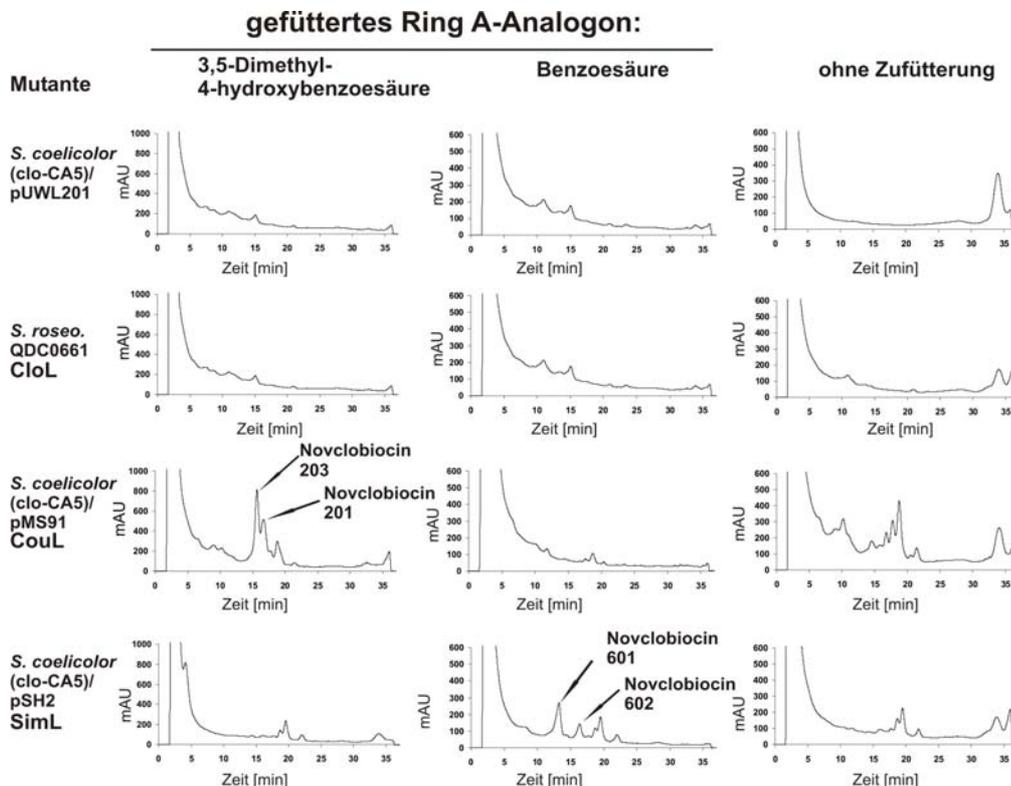
Die Substratspezifität der Amidsynthetasen CloL, NovL, CouL und SimL wurde schon in früheren Arbeiten untersucht (Galm *et al.*, 2004a; Luft *et al.*, 2005; Pacholec *et al.*, 2005a; Schmutz *et al.*, 2003b). Galm *et al.* (2004a) konnte zeigen, dass gereinigtes CloL verschiedene Ring A-Analoga mit unterschiedlicher Effizienz akzeptiert. Die Produktausbeuten in diesen Amidsynthetase-Assays *in vitro* korrelierten mit den Ausbeuten der neue Aminocoumarine *in vivo*, welche durch die durchgeführten Mutasyntese Experimente gewonnen wurden (Galm *et al.*, 2004a). Ring A-Analoga, welche nur sehr schlecht in diesen Assays akzeptiert wurden, wie zum Beispiel 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure, führten in den durchgeführten Fütterungen nicht zur Produktbildung.

Um zu testen, ob das Einbringen der Amidsynthetasen CouL und SimL wirklich das Substratspektrum für die Mutasyntese erweitert, wurden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Amidsynthetase-Assays mit 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure (RAA 200) (Galm *et al.*, 2004a), Benzoesäure (RAA 600) und den Amidsynthetasen NovL, CloL, CouL und SimL durchgeführt. Es zeigte sich, dass 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure hauptsächlich von CouL akzeptiert wurde und nur schwach von NovL, CloL und SimL. Benzoesäure dagegen wurde hauptsächlich von SimL akzeptiert (Abb.III.14).



**Abbildung III.14:** Relative Aktivitäten der Amidsynthetasen NovL, CloL, CouL und SimL mit Benzoessäure und 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure (Galm *et al.*, 2004a). Die spezifischen Aktivitäten mit den natürlichen Substraten der Enzyme wurden gleich 100% gesetzt. Im Fall von SimL wurde die Aktivität mit Ring A gleich 100% gesetzt.

Anschließend wurde 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure und Benzoessäure an vier verschiedene Mutanten gefüttert. Drei davon wurden durch die Transformation des Stammes *S. coelicolor* (clo-CA5) mit dem leeren Expressionsvektor pUWL201, mit dem *couL* Expressionsplasmid pMS91, oder mit dem *simL* Expressionsplasmid pSH2 erhalten. Der vierte Stamm war die *cloQ*-Defektmutante *S. roseochromogenes* QDCO661 (Pojer *et al.*, 2003b), die das genuine Amidsynthetase-Gen *cloL* beinhaltet. Die Extrakte der Mutanten wurden mittels HPLC und LC-MS auf Produktbildung untersucht (Abb. III.15).



**Abbildung III.15:** HPLC-Analyse der Kulturextrakte von verschiedenen *S. coelicolor* (clo-CA5) Mutanten sowie von *S. roseochromogenes* QDCO661 mit bzw. ohne Zufütterung von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure bzw. Benzoessäure. Die Produktpeaks wurden markiert. Weitere Peaks in den Chromatogrammen zeigten im LC-MS nicht die gesuchte Masse der neuen Aminocoumarine. Strukturformeln der neuen Derivate: s. Tabelle III.3.

Im Extrakt von *S. coelicolor* (clo-CA5) mit dem leeren Expressionsvektor pUWL201 konnten keine neuen Aminocoumarine detektiert werden. Auch *S. roseochromogenes* QDCO661 mit intaktem *cloL* war nicht fähig, aus den gefütterten Substanzen neue Aminocoumarine zu bilden. Jedoch konnte das erwartete Novclorobiocin 201, welches 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure als Ring A-Analogon trägt, im Extrakt der Mutante *S. coelicolor* (clo-CA5) mit dem Expressionsplasmid pMS91 gefunden werden, welches *couL* enthält. Im Gegensatz dazu wurde das neue Aminocoumarin, das Benzoesäure als Ring A-Analog trägt, nur im Extrakt der Mutante *S. coelicolor* (clo-CA5) mit pSH2 detektiert.

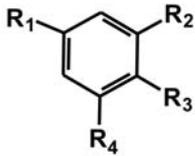
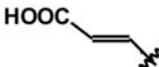
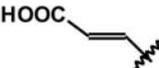
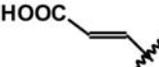
Diese Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse der Amidsynthetase-Assays wieder und zeigen, dass durch die Expression von fremden Amidsynthetasen tatsächlich das Spektrum der verwendbaren Substrate für Mutasynthese Experimente erweitert werden kann.

### **2.3.6 Fütterung verschiedener Ring A-Analoga an die Mutanten *Streptomyces coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 und *Streptomyces coelicolor* (clo-CA5)/pMS91**

Zur Produktion neuer Aminocoumarine mit modifiziertem Ring A wurden die Mutanten *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 und *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91 verwendet, die die Amidsynthetase-Gene *simL* bzw. *couL* enthalten. Die Fütterungen wurden mit Ring A-Analoga durchgeführt, die in Amidsynthetase-Assays eine gute Akzeptanz mit SimL bzw. CouL gezeigt hatten (Galm *et al.*, 2004a; Luft *et al.*, 2005; Schmutz *et al.*, 2003b). Insgesamt wurden acht verschiedene Ring A-Analoga gefüttert, wobei sechs verschiedene Ring A-Analoga zu *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 und zwei zu *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91 gefüttert wurden (s. Tab. III.1). In den Fütterungsexperimenten wurden gewöhnlich 10 mg des entsprechenden Ring A-Analogons bei Inokulation in 800 ml Kulturmedium der entsprechenden Mutante zugesetzt. Parallel wurden ungefüttete Mutanten von *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 und *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91 kultiviert. Sieben bis zehn Tage später wurden die Kulturen extrahiert und die Extrakte mittels HPLC analysiert.

Wie erwartet produzierten die ungefütteten Mutanten von *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 und *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91 kein Clorobiocin. Auch führten Fütterungsexperimente mit 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure (RAA 290), 4-Hydroxybenzoesäure (RAA 500) und 4-Hydroxyzimtsäure (RAA 710) nicht zur Bildung neuer Clorobiocin-Derivate. In 5 weiteren Experimenten konnten neue Derivate detektiert werden, die nach Extraktion unter Verwendung einer Sephadex LH-20 Säule vorgereinigt und mittels HPLC präparativ isoliert wurden (s. Kapitel II/12.5). Die Strukturen der isolierten Substanzen wurde durch ESI-MS Analyse und <sup>1</sup>H NMR aufgeklärt.

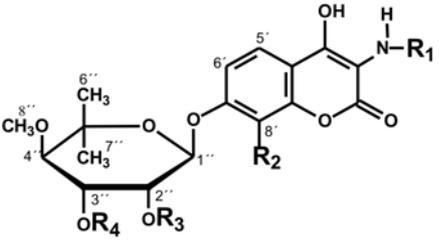
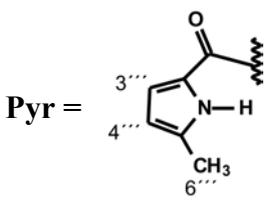
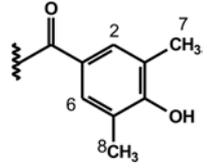
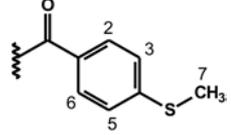
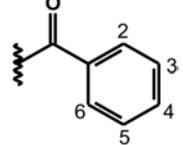
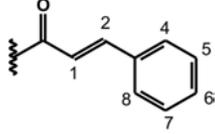
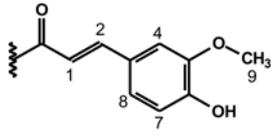
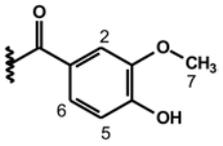
**Tabelle III.1:** Strukturformeln der eingesetzten Ring A-Analoga (RAA).

gefüttert an <i>S. coelicolor</i> (clo-CA5) mit		Bezeichnung				
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
pMS91 ( <i>couL</i> )	RAA 200	COOH	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	
	RAA 290	COOH	Br	OH	Br	
	RAA 370	COOH	H	SCH <sub>3</sub>	H	
	RAA 500	COOH	H	OH	H	
pSH2 ( <i>simL</i> )	RAA 600	COOH	H	H	H	
	RAA 700		H	H	H	
	RAA 710		H	OH	H	
	RAA 730		OCH <sub>3</sub>	OH	H	

### 2.3.7 Identifizierung der produzierten Clorobiocin-Derivate

In Anlehnung an frühere Untersuchungen unseres Arbeitskreises (Eustáquio *et al.*, 2003a; Galm *et al.*, 2004a; Westrich *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003) wurden alle neu identifizierten Aminocoumarine als Novclobiocine bezeichnet. Sie wurden in Anlehnung an das zum Produkt geführten Ring A-Analogon nummeriert (Tab. III.2). Die Ergebnisse der ESI-MS Analyse sind in Tabelle III.3 dargestellt. Die <sup>1</sup>H NMR und MS-Spektren und ihre Auswertung befindet sich im Anhang VII.5 und VII.6.

**Tabelle III.2:** Chemische Strukturen der isolierten Clorobiocin-Derivate.

Bezeichnung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
				
				
Novclobiocin 201		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 202		Cl	Pyr	OH
Novclobiocin 203		H	OH	Pyr
Novclobiocin 371		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 372		Cl	Pyr	OH
Novclobiocin 601		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 602		Cl	Pyr	OH
Novclobiocin 603		H	OH	Pyr
Novclobiocin 701		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 702		Cl	Pyr	OH
Novclobiocin 731		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 311 <sup>a</sup>		Cl	OH	Pyr
Novclobiocin 312 <sup>a</sup>		Cl	Pyr	OH
Novclobiocin 313 <sup>a</sup>		H	OH	Pyr

<sup>a</sup> Produkt wurde schon von Freitag *et al.* (2004) identifiziert.

**Tabelle III.3:** ESI-MS Daten der isolierten Clorobiocin-Derivate, aufgenommen im positiven Modus.

**R<sub>1</sub>:**     **Ring A-Analogon**

**R<sub>2</sub>:**     **Cl oder H**

Bezeichnung	MW	[M+H] <sup>+</sup>	[M-Ring C] <sup>+</sup>	[Ring A] <sup>+</sup>	[Ring C] <sup>+</sup>	[Pyrrol-Gruppe] <sup>+</sup>
<b>Clorobiocin</b>	696,2	697,3/699,0	416,1	189,1	282,2	108,0
<b>Novclobiocin 201</b>	656,2	657,3/659,3	n.d.	149,0	282,1	108,0
<b>Novclobiocin 202</b>	656,2	657,3/659,1	n.d.	149,0	282,0	108,0
<b>Novclobiocin 203</b>	622,2	623,3	n.d.	149,0	282,1	108,0
<b>Novclobiocin 371</b>	658,1	659,3/661,3	n.d.	151,0	282,1	108,0
<b>Novclobiocin 372</b>	658,1	659,5	n.d.	n.d.	281,8	n.d.
<b>Novclobiocin 311</b>	658,2	659,2/661,6	378,3	151,0	282,0	108,0
<b>Novclobiocin 312</b>	658,2	659,2/601,3	n.d.	151,0	n.d.	108,0
<b>Novclobiocin 313</b>	624,2	625,3	n.d.	151,0	282,2	108,0
<b>Novclobiocin 601</b>	612,2	613,2/615,3	332,1	105,0	282,1	108,0
<b>Novclobiocin 602</b>	612,2	613,2/615,4	n.d.	104,9	282,2	108,0
<b>Novclobiocin 603</b>	578,2	579,2	n.d.	105,0	282,1	108,0
<b>Novclobiocin 701</b>	638,2	639,5/641,6	357,9	131,0	282,0	108,0
<b>Novclobiocin 702</b>	638,2	639,2/642,2	n.d.	131,0	282,2	108,0
<b>Novclobiocin 731</b>	684,2	685,3/687,1	404,1	177,0	282,1	108,0

x/y     zwei Signale, die aus Anwesenheit von Chlor-Isotopen im Molekül resultieren.

n.d.     nicht detektierbar.

Die Amidsynthetase SimL ist für diesen Ansatz von besonderem Interesse, da sie viele Substrate akzeptiert, welche NovL, CloL oder CouL nicht akzeptieren (Galm *et al.*, 2004a; Luft *et al.*, 2005; Pacholec *et al.*, 2005a; Schmutz *et al.*, 2003b; Steffensky *et al.*, 2000a). Wie zum Beispiel Benzoesäure, 4-Methylthiobenzoessäure, Zimtsäure oder Ferulasäure. Bei allen dieser vier durchgeführten Fütterungen zu *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 wurde das erwartete Clorobiocin-Analogon identifiziert, welches das zugefütterte Ring A-Analogon enthielt, sonst aber der strukturell identisch mit Clorobiocin war (Tabelle III.2). Auch bei der Fütterung von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoessäure wurde das erwartete Clorobiocin-Analogon identifiziert. Des Weiteren wurde bei allen fünf erfolgreich durchgeführten Fütterungsexperimenten jeweils ein zweites Produkt in geringerer Menge isoliert. Diese Produkte wiesen die gleichen Massen auf wie ihr entsprechendes Clorobiocin-Analogon, allerdings zeigten die <sup>1</sup>H NMR Spektren Shifts der Signale der Protonen am C-2'' und am C-3''. Ein Vergleich mit Literaturdaten zeigte, dass es sich hierbei um Isomere der Clorobiocin-Analoga handelte, die die charakteristische 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins an Position 2'' anstatt an Position 3'' des Desoxyzuckers aufweisen (Galm *et al.*, 2004a; Westrich *et al.*, 2003).

In zwei weiteren Fütterungsexperimenten mit Benzoesäure und 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure wurden Substanzen isoliert, die eine kürzere Retentionszeit als das entsprechende Clorobiocin-Analogon aufwiesen. Diese wurden als „Dechlorovclobiocine“ identifiziert. Das ESI-MS zeigte eine um 34 Da geringere Masse im Vergleich zum entsprechenden Clorobiocin-Analogon, was auf den Verlust eines Chlor-Atoms hindeutet. Außerdem zeigte sich hier nicht das typische Isotopenmuster der Chlor-Isotope  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$ , was den Verlust des Chlor-Atoms bestätigt. In den  $^1\text{H}$  NMR Spektren fehlte das Signal, das zum H-6' gehört. Dafür wurde ein breites Singulett Signal für zwei Protonen detektiert. Ein Zusammenfall der Signale H-6' und H-8' wurde für diese Art von Derivaten schon früher berichtet (Eustáquio *et al.*, 2003a; Galm *et al.*, 2004a). Diese Beobachtungen zeigten, dass diese neuen Produkte Novclobiocin 203 und 603 ein Proton anstelle des Chlor-Atoms an Position 8' der Aminocoumarin-Gruppe tragen.

**Tabelle III.4:** Relative Ausbeuten der neuen Clorobiocin-Analoga

Produkte produziert von Mutante mit	gef. RAA	gef. Menge [mg]	gef. Menge [mmol]	Nov-clobiocin	erhaltene Produktmengen [ $\mu\text{g}$ ]	erhaltene Produktmengen [ $\mu\text{mol}$ ]	relative Ausbeute [%]
pMS91 ( <i>couL</i> )	200	10	0,060	201	3864,8	5,890	9,78
				202	3132,4	4,774	7,93
				203	2999,5	4,821	8,01
pSH2 ( <i>simL</i> )	370	10	0,060	371	807,4	1,227	2,06
				372	47,1	0,072	0,12
	600	10	0,055	601	356,6	0,583	0,71
				602	1067,2	1,743	2,13
				603	737,7	1,276	1,56
	700	10	0,068	701	4045,0	6,338	9,38
				702	669,9	1,050	1,55
731	10	0,052	731	1085,9	1,587	3,08	

gef. gefüttert

Bei der Fütterung von 4-Hydroxybenzoesäure zu *S. coelicolor* (clo-CA5) mit dem Expressionsplasmid pSH2 mit *simL* wurden keine neuen Aminocoumarine identifiziert. Allerdings wurden die Derivate Novclobiocin 311 (Vanillobiocin), 312 (Isovanillobiocin) und 313 (Declorovanillobiocin) als Produkte beobachtet, was darauf hindeutet, dass die gefütterte Vorstufe hydroxyliert und anschließend methyliert wurde. Diese Vanillobiocine wurden schon in früheren Experimenten beobachtet und identifiziert (Freitag *et al.*, 2004). Geringe Mengen von ihnen werden auch ohne Zufütterung von 4-Hydroxybenzoesäure erhalten, was zeigt, dass der Stamm Vanillinsäure selbst bilden kann.

Aus den fünf erfolgreich durchgeführten Fütterungsexperimenten konnten die elf neuen Clorobiocin-Derivate in Mengen zwischen 47  $\mu\text{g}$  und 4 mg, bezogen auf 10 mg gefüttertes Ring A-Analogon, isoliert werden (Tab. III.4). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Nutzung von fremden Amidsynthetasen effektiv neue Aminocoumarine hergestellt werden können, ohne auf die Akzeptanz der Ring A-Analoga durch CloL angewiesen zu sein. Dies demonstriert die Nützlichkeit der Kombination aus Mutasynthese und metabolischem Engineering.

### 2.3.8 Identifizierung neuer, „natürlicher“ Derivate

Neben den erwarteten neuen Produkten wurden weitere drei neue Aminocoumarin-Antibiotika, die die Namen Ferulobiocin, 3-Chlorocoumarobiocin und 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin tragen, isoliert und identifiziert. Diese Substanzen wurden mittels LC-MS auch in den ungefütterten Mutanten von *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91 mit *couL* und *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 mit *simL* nachgewiesen. Die <sup>1</sup>H NMR und MS-Spektren befindet sich im Anhang VII.6.

#### Identifizierung von Ferulobiocin

Das ESI-MS Spektrum der ersten Substanz wies eine Masse von  $[M+H]^+$  von  $m/z=685$  auf (s. Tab. III.5). Wie bei Clorobiocin konnten die charakteristischen Fragmente der Desoxyzucker-Gruppe ( $m/z=282$ ) und der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe ( $m/z=108$ ) detektiert werden. Jedoch zeigte sich im MS-Spektrum statt des bei Clorobiocin vorkommenden Fragmentes bei  $m/z=189$ , das die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) repräsentiert, und dem Fragment bei  $m/z=416$ , das die Aminocoumarin und die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure repräsentiert, Fragment bei  $m/z=177$  und  $m/z=404$ . Diese Fragmente wiesen auf ein Clorobiocin-Analogon hin, das aber ein anderes Ring A-Analogon trägt.

Das <sup>1</sup>H NMR Spektrum von dieser Substanz bestätigte diese Hypothese. Es zeigte dieselben Signale wie Clorobiocin für die Aminocoumarin-Gruppe, den substituierten Desoxyzucker und die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe. Jedoch wurden anstatt der Signale des natürlichen Ring A, Signale für ein strukturell unterschiedliches Ring A-Analogons detektiert. Zwei Dupletts bei  $\delta=7,57$  ppm (1 H; 15,8 Hz) und  $\delta=6,75$  ppm (1 H; 15,8 Hz) wiesen auf zwei vinyliche Protonen hin, die an Kohlenstoffatome einer Doppelbindung angebracht sind, und das Singulett bei  $\delta=3,90$  ppm (3 H) wies auf eine Methoxygruppe hin. Die Signale bei  $\delta=7,19$  (br s, 1 H), 6,80 (d, 1 H) und 7,07 (d, 1 H) zeigten die Protonen eines 1, 3, 4-trisubstituierten aromatischen Ring. Der Vergleich mit Literaturdaten (Delazar *et al.*, 2004; Ee *et al.*, 2005; Grote *et al.*, 1988) und Daten, die von kommerziell erhältlicher Ferulasäure erhalten wurden, zeigten, dass die NMR Signale perfekt mit denen von Ferulasäure-Derivaten übereinstimmen (=3-Methoxy-4-hydroxymzimtsäure). Auch die Ergebnisse der MS-Analyse stimmten mit diesem Ergebnis überein. Dieses Produkt wurde als Ferulobiocin bzw. Novclorobiocin 731 bezeichnet und wurde auch durch die Zufütterung von Ferulasäure zu *S. coelicolor* (clo-CA5)/pSH2 erhalten (s. Tab. III.6).

#### Identifizierung von 3-Chlorocoumarobiocin

Das ESI-MS Spektrum der zweiten neuen Substanz zeigte eine Masse von  $[M+H]^+$   $m/z=689$ , in Kontrast zu Ferulobiocin ( $m/z=685$ ). Auch das Fragment der Acylgruppe bei  $m/z=181$  stimmte nicht mit dem Fragment  $m/z=177$  von Ferulobiocin überein. Andererseits zeigte das Spektrum die charakteristischen Peaks des Desoxyzuckers und der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe bei  $m/z=282$  und 108 (Tab. III.5).

Das <sup>1</sup>H NMR Spektrum dieser Substanz zeigte dieselben Signale des substituierten Desoxyzuckers und der Aminocoumarin-Gruppe wie Clorobiocin und Ferulobiocin. Vergleichbar mit dem <sup>1</sup>H NMR Spektrum von Ferulobiocin, wiesen zwei Dupletts bei  $\delta=7,49$  ppm (1 H; 15,6 Hz) und  $\delta=6,71$  ppm (1 H; 15,6 Hz) auf die Anwesenheit von zwei vinylichen Protonen hin und die Signale bei  $\delta=7,56$  (br s, 1 H), 7,36 (d, 1 H) und 6,92 ppm (1 H) zeigten wieder die Anwesenheit eines 1, 3, 4-trisubstituierten aromatischen Ringes. Jedoch fehlte im Vergleich zu Ferulobiocin das Singulett der Methoxygruppe bei  $\delta=3,90$  ppm (3 H). Es konnte auch kein weiteres Signal dafür

detektiert werden. Dies wies darauf hin, dass die Methoxygruppe an Position 3 (31 Da) durch ein Chloratom (35 Da) ersetzt wurde. Dieses neue Derivat wurde als Clorobiocin-Derivat identifiziert, welches 3-Chloro-4-hydroxyzimtsäure trägt. Es wurde als 3-Chloro-Coumarobiocin bzw. Novclobiocin 741 bezeichnet (Tab. III.6).

#### Identifizierung von 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin

Die dritte neue Substanz, die isoliert wurde, wies eine Masse von  $[M+H]^+$   $m/z=655$  auf, also 34 Dalton weniger als 3-Chlorocoumarobiocin, was auf einen Verlust eines Chloratoms hindeutete (Tab. III.5). Das  $^1H$  NMR Spektrum als auch das MS Spektrum zeigten dieselben Signale, die der 3-Chloro-4-hydroxyzimtsäure zugeordnet wurden. Allerdings wurden im  $^1H$  NMR Spektrum signifikante Unterschiede der Protonen der Aminocoumarin-Gruppe beobachtet, welche die Anwesenheit von drei anstatt von zwei Protonen beweisen ( $\delta=7,03$  ppm, 2 H;  $\delta=7,92$  ppm, 1 H). Die selben Signale wurden schon früher bei Aminocoumarinen beobachtet, denen das Chloratom an Position 8' des Aminocoumarins fehlt (Eustáquio *et al.*, 2003a). Dieses neue Derivat unterscheidet sich von 3-Chlorocoumarobiocin durch das fehlende Chloratom an Position 8' des Aminocoumarin-Rings. Es wurde als 8'-Dechlor-3-chlorocoumarobiocin bzw. Novclobiocin 742 bezeichnet (s. Tab. III.6).

**Tabelle III.5:** ESI-MS Daten der natürlich vorkommenden Derivate aus *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91.

Bezeichnung	MW	$[M+H]^+$	$[M\text{-Ring C}]^+$	$[\text{Ring A}]^+$	$[\text{Ring C}]^+$	$[\text{Pyrrol-Gruppe}]^+$
<b>Clorobiocin</b>	696,2	697,3/699,3	416,1	189,1	282,2	108,0
<b>Ferulobiocin</b>	684,2	685,3/687,3	404,1	177,0	282,1	108,0
<b>3-Chloro-coumarobiocin</b>	688,2	689,3/691,2	n.d.	181,0	282,0	108,0
<b>8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin</b>	654,2	655,2/657,4	n.d.	181,0	282,2	108,0

x/y zwei Signale, die aus Anwesenheit von Chlor-Isotopen im Molekül resultieren.

n.d. nicht detektierbar.

**Tabelle III.6:**  $^1\text{H}$  NMR Daten der natürlich vorkommenden Derivate aus *S. coelicolor* (clo-CA5)/pMS91.

		$R_1$	$R_2$	$R_3$	Bezeichnung
<p>Pyrrrol-Gruppe</p> <p>Ring C</p> <p>Ring B</p>			Cl	-	Clorobiocin
			Cl	OCH <sub>3</sub>	Ferulobiocin
			Cl	Cl	3-Chloro-coumarobiocin
			H	Cl	8'-Dechloro-3-chloro-coumarobiocin

	Clorobiocin	Ferulobiocin	3-Chloro-coumarobiocin	8'-Dechloro-3-chloro-coumarobiocin
		Novclobiocin 731	Novclobiocin 741	Novclobiocin 742
Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)			
1-H	-	6,75 d (15,8)	6,71 d (15,6)	6,80 d (14,4)
2-H	7,76 d (2,5)	7,57 d (15,8)	7,49 d (15,6)	7,54 d (14,4)
4-H	-	7,19 br <sup>a</sup> s	7,56 br <sup>a</sup> s	7,61 br <sup>a</sup> s
5-H	6,84 d (8,4)	-	-	-
6-H	7,72 dd (8,4; 2,5)	-	-	-
7-H	-	6,80 d (8,2)	6,92 d (8,8)	6,91 d (8,2)
7-H2	3,34 d (7,1)	-	-	-
8-H	5,35 br <sup>a</sup> t (7,1)	7,07 d (8,2)	7,36 d (8,8)	7,41 d (8,2)
9-OCH3	-	3,90 s	-	-
10-H3	1,74 s	-	-	-
11-H3	1,75 s	-	-	-
5'-H	7,90 d (9,2)	7,90 d (8,8)	7,89 d (8,6)	7,92 d (8,0)
6'-H	7,33 d (9,2)	7,23 d (8,8)	7,19 d (8,6)	7,03 <sup>b</sup>
8'-H	-	-	-	7,03 <sup>b</sup>
1''-H	5,73 d (1,8)	5,69 br <sup>a</sup> s	5,68 br <sup>a</sup> s	5,61 d (1,6)
2''-H	4,34 t (2,8)	4,33 br <sup>a</sup> s	4,33 br <sup>a</sup> s	4,23 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,71 dd (10,3; 2,8)	5,71 dd (11,6; 2,0)	5,71 dd (11,0; 4,8)	5,59 dd (10,0; 2,8)
4''-H	3,72 d (10,3)	3,71 d (11,6)	3,71 d (11,0)	3,68 d (10,0)
6''-H3	1,18 s	1,19 s	1,19 s	1,20 s
7''-H3	1,35 s	1,35 s	1,34 s	1,37 s
8''-	3,52 s	3,51 s	3,51 s	3,51 s
OCH3				
3'''-H	6,90 d (3,6)	6,90 d (3,6)	6,90 d (3,4)	6,90 d (3,4)
4'''-H	5,94 d (3,6)	5,94 d (3,6)	5,94 d (3,4)	5,94 d (3,4)
6'''-H3	2,29 s	2,29 s	2,29 s	2,29 s

$\delta$  ist in ppm angegeben. Spektren wurden bei 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD aufgenommen.

<sup>a</sup>br = breites Signal.

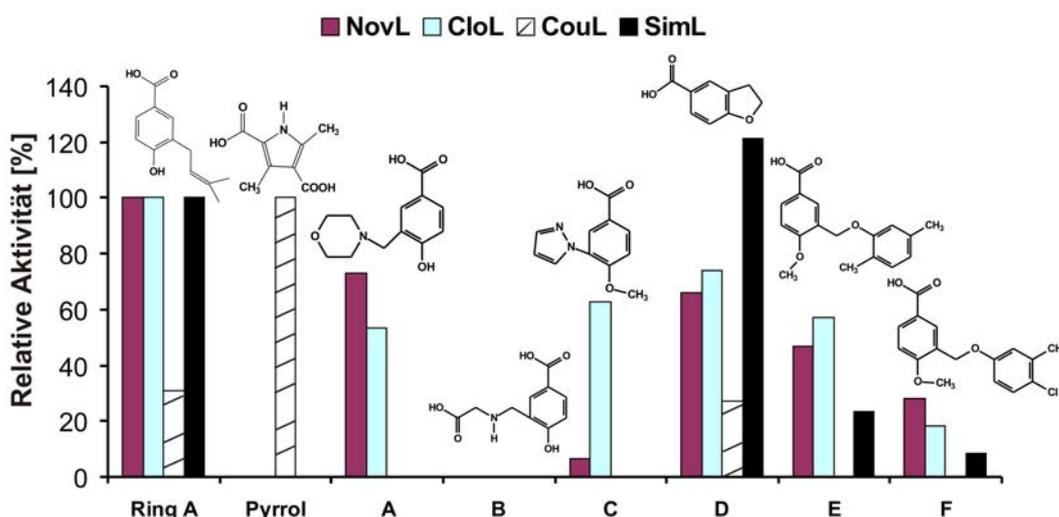
### 2.3.9 Erweiterung: Amidsynthetase-Assays und Fütterung von vorgeschlagenen Ring A-Analoga

Da durch die bisher durchgeführten Fütterungsexperimente sehr effektiv neue Aminocoumarine gewonnen werden konnten, sollten nun gezielt Fütterungen mit Ring A-Analoga durchgeführt werden, die eine höhere Aktivität des Endproduktes wahrscheinlich machen. Deshalb wurden bei der Firma Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz, durch Molecular Modelling sechs Ring A-Analoga ermittelt, die das aktive Zentrum der bakteriellen Gyrase besser ausnutzen. Sie sollen durch Wasserverdrängung bzw. einer weiteren Bindung im aktiven Zentrum eine stärkere Gyrasehemmung verursachen.

Folgende Substanzen wurden vorgeschlagen:

- A 4-Hydroxy-3-(morpholinomethyl)-benzoesäure
- B 3-(Carboxymethylaminomethyl)-4-hydroxybenzoesäure
- C 4-Methoxy-3-pyrazol-1-ylmethyl-benzoesäure
- D 2,3-Dihydrobenzofuran-5-carbonsäure
- E 3-[(2,5-Dimethylphenoxy)-methyl]-4-methoxybenzoesäure
- F 3-[(4-Chloro-3-methylphenoxy)-methyl]-4-methoxybenzoesäure

Um zu ermitteln, zu welcher Mutante die Derivate gefüttert werden sollten, wurden Amidsynthetase-Assays mit NovL, CloL, CouL und SimL durchgeführt (Abb. III.16).



**Abbildung III.16:** Relative Aktivitäten der Amidsynthetasen NovL, CloL, CouL und SimL mit den vorgeschlagenen Ring A-Analoga. Die spezifischen Aktivitäten mit den natürlichen Substraten der Enzyme NovL und CloL wurde gleich 100% gesetzt. Im Fall von SimL wurde die Aktivität mit Ring A, im Fall von CouL die Aktivität mit 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure gleich 100% gesetzt. Pyrrol = 3,5-Dimethylpyrrol-2,4-dicarbonsäure.

Substanz B wurden von keiner der Amidsynthetasen akzeptiert. Die Substanzen A, C, D, E und F dagegen wurden vor allem von CloL und NovL akzeptiert. Substanz D zeigte zusätzlich eine hohe Akzeptanz durch SimL.

Alle Ring A-Analoga, außer Substanz B, wurden daraufhin an die Mutante *S. roseochromogenes* QDCO661 (Pojer *et al.*, 2003b) gefüttert. Diese Mutante sollte die gefütterten Analoga durch die Amidsynthetase CloL zu neuen Aminocoumarinen umsetzen. Substanz D wurde zusätzlich an die Mutante *S. coelicolor* M512 (cloCA5) mit pSH2 gefüttert, welches das Amidsynthetase-Gen *simL* beinhaltet.

Bei keiner der Fütterungen wurde eine Produktbildung beobachtet. Auch eine Wiederholung der Fütterungen und eine Optimierung der Extraktionsmethode brachten keinen Erfolg.

Ein Grund für die fehlgeschlagenen Fütterungsversuche könnte sein, dass diese vorgeschlagenen Ring A-Analoga sich strukturell deutlich von den bisher gefütterten Ring A-Analoga unterscheiden und ein deutlich größeres Volumen aufweisen. Dies könnte ein Problem bei der Aufnahme in das Bakterium darstellen.

## 2.4 Herstellung von Hybrid-Aminocoumarin-Antibiotika durch Mutasythese

### 2.4.1 Einleitung

Durch die bisherigen Methoden wurden erfolgreich neue Clorobiocin-Derivate hergestellt. Zusätzlich sollten nun auch so genannte Hybrid-Aminocoumarine hergestellt werden. Diese neuen Aminocoumarine weisen strukturelle Merkmale des Clorobiocins und des Novobiocins auf, d.h. dass entweder die Position 8' des Aminocoumarin-Rings bei der Grundstruktur von Clorobiocin statt eines Chloratoms eine Methylgruppe aufweist bzw. dass die Position 3'' des Desoxyzuckers bei der Grundstruktur von Novobiocin mit der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe statt der Carbamoylgruppe verknüpft ist.

Kürzlich wurden umfangreiche Untersuchungen zur Struktur-Gyrasehemmung und Struktur-Topoisomerase IV Hemmung durchgeführt (Flatman *et al.*, 2006). Dabei wurden Clorobiocin, Novobiocin und ihre abgeleiteten Hybrid-Aminocoumarine getestet. Clorobiocin zeigte eine 10-fach höhere Gyrasehemmung und eine 70-fach höhere Topoisomerase IV Hemmung als Novobiocin. Das Hybrid-Aminocoumarin, das an Position 8' des Aminocoumarins chloriert war und an Position 3'' des Desoxyzuckers die Carbamoylgruppe des Novobiocin trug, zeigte eine 11-fach schwächere Gyrasehemmung und eine 70-fach geringere Topoisomerase IV Hemmung als Clorobiocin. Im Gegensatz dazu zeigte aber das Hybrid-Aminocoumarin, welches an Position 8' des Aminocoumarin-Rings die Methylgruppe des Novobiocins aufwies und gleichzeitig an Position 3'' des Desoxyzuckers die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins beinhalten, im Vergleich zu Clorobiocin eine nur 2,5-fach geringere Gyrasehemmung und eine 6-fach geringere Topoisomerase IV Hemmung. Dies zeigt, dass solche Derivate zwar schwächer aktiv sind als Clorobiocin, dennoch eine höhere Aktivität aufweisen als Novobiocin.

Beruhend auf diese Ergebnisse sollten Derivate generiert werden, die an Position 8' des Aminocoumarin-Rings die für Novobiocin charakteristische Methylgruppe tragen, aber an Position 3'' des Desoxyzuckers die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins aufweisen. Außerdem sollte auch hier die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) durch andere Analoga ersetzt werden.

Um diese Hybrid-Aminocoumarine herstellen zu können, wurde eine neue, zweistufige Fütterungsmethode entwickelt (Abb. III.17). In einer ersten Stufe der Fütterung wurden Novobiocinsäure Analoga, die Aglyka der gesuchten Verbindungen, in einer Mutante des Novobiocin-Produzenten hergestellt, die die charakteristische Methylgruppe des Novobiocins an Position 8' des Aminocoumarin-Rings trugen und gleichzeitig einen modifizierten Ring A aufwiesen. Dafür wurde eine *novQ*-Defektmutante des Novobiocin-Produzenten benutzt, bei der außerdem die Gene der Zuckerbiosynthese durch Downstream-Effekte inaktiv waren. In einem zweiten Fütterungsschritt wurde ein

Extrakt der Novobiocin-Mutante, der die Aglyka der neuen Derivate beinhaltet, an die *cloQcloL*-Defektmutante *S. coelicolor* (*clo*-CA5) (s. Kapitel III/2.3.1) des Clorobiocin-Produzenten gefüttert, die das Aglykon mit dem substituierten Desoxyzuckers verknüpft.

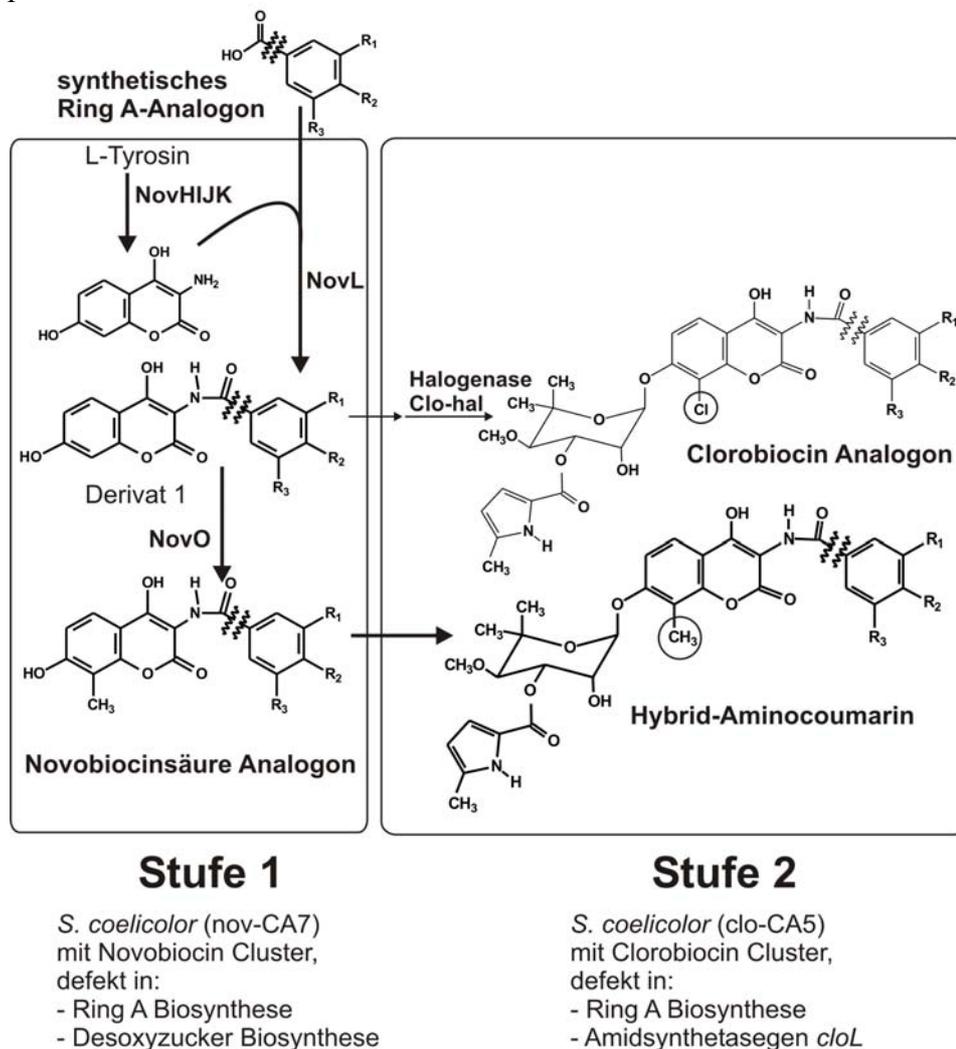
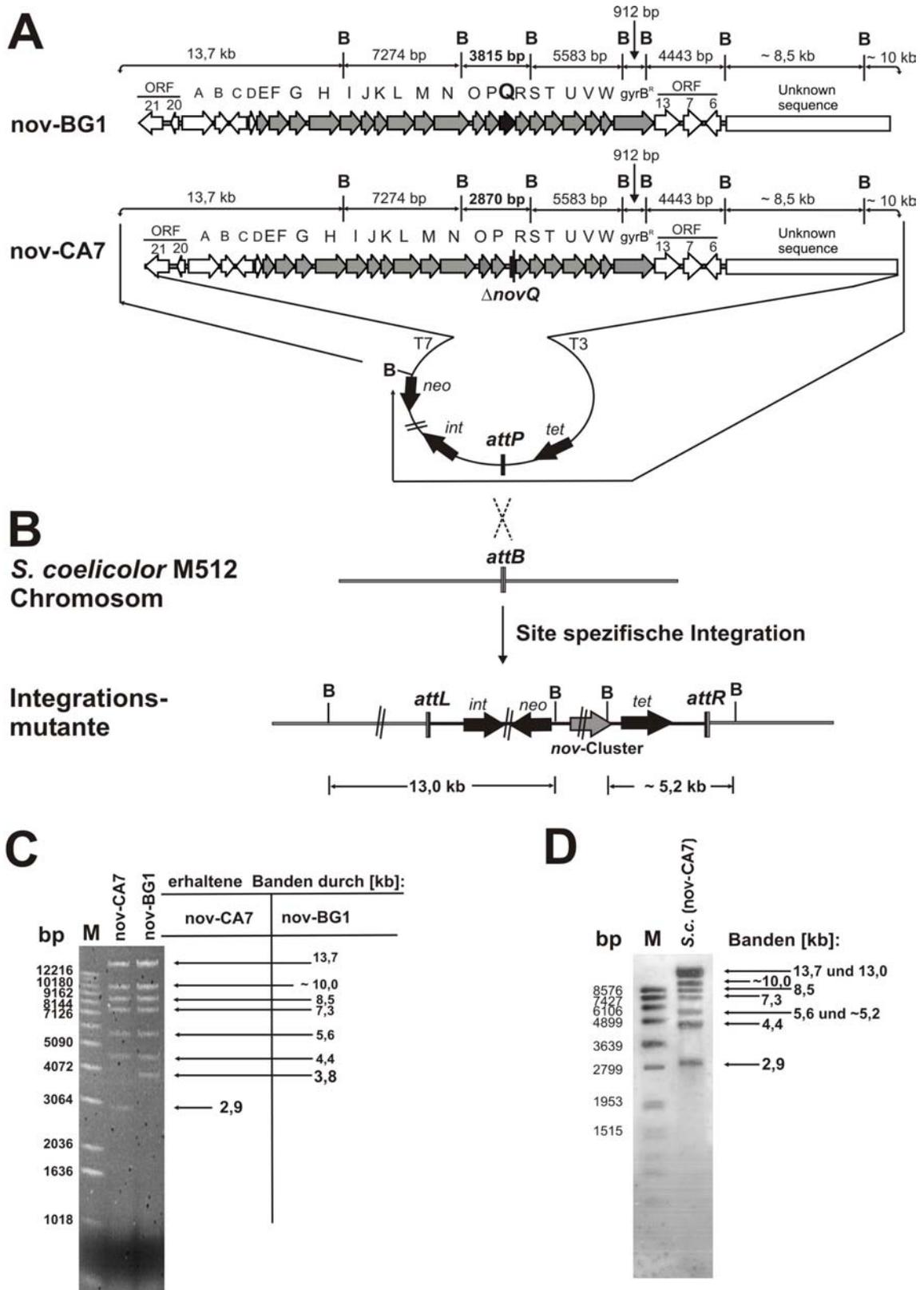


Abbildung III.17: Schematische Darstellung der Fütterung in zwei Stufen.

## 2.4.2 Herstellung der Novobiocin-Mutante: Inaktivierungen von *novQ* und heterologe Expression in *Streptomyces coelicolor* M512

Um die erste Stufe der Fütterung durchzuführen, wurde eine Mutante des Novobiocin-Produzenten verwendet, in der das Gen *novQ*, das für die Prenyltransferase codiert, inaktiviert wurde. Durch Downstream-Effekte waren ebenfalls die Gene der Zuckerbiosynthese inaktiv.

Für diese Fütterungen wurde die *novQ*-Defektmutante *S. coelicolor* (*nov*-CA7) verwendet, die schon in Kapitel III.2.2.1.3 beschrieben wurde. Die erhaltenen Kanamycin-resistente Klone wurden mittels Southern Blot auf ihren Genotyp untersucht (Abb. III.18). Die Deletion des Gens *novQ* war durch das Verschwinden der 3,8 kb *BglII*-Bande im Vergleich zum Cosmid *nov*-BG1 und dem Entstehen einer 2,9 kb *BglII*-Bande ersichtlich.

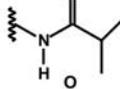
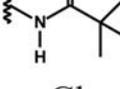


**Abbildung III.18:** A) Cosmide nov-BG1 und nov-CA7 ( $\Delta novQ$ , *apra<sup>S</sup>*), die das Novobiocin Biosynthesegencluster und die  $\Phi$ C31 Integrationsfunktion enthalten. B) schematische Darstellung der Site spezifischen Integration von nov-CA7 in das Genom von *S. coelicolor* M512. B= *Bgl*III Schnittstelle, T3, T7= T3, T7 Promotoren des SuperCos1-Vektors. Angegebene Fragment Größen resultieren aus dem *Bgl*III Verdau. C) Gelelektrophorese des resultierenden Cosmids nov-CA7 im Vergleich zu nov-BG1. M= 1 kb DNA Marker (Invitrogen). DNA von nov-BG1 und nov-CA7 wurde mit *Bgl*III verdaut. D) Southern Blot Analyse der nov-CA7 Integrationsmutante. M= DIG gelabelter DNA Molecular Weight Marker VII (Roche). Als Sonde wurde gelabeltes clo-BG1 Cosmid verwendet. Die genomische DNA wurde mit *Bgl*III verdaut.

### 2.4.3 Durchführung von zweistufigen Fütterungen

Zur Herstellung von Hybrid-Aminocoumarinen wurden zweistufige Fütterungen durchgeführt (Abb. III.17). Im ersten Schritt der Fütterung wurden sieben verschiedene Ring A-Analoga (s. Tab. III.7) an die Mutante *S. coelicolor* (nov-CA7) gefüttert. Diese Mutante verwendet das im Novobiocincluster enthaltene, genuine NovL, um die neuen Novobiocinsäure Analoga herzustellen. Von den gefütterten Ring A-Analoga war bekannt, dass sie von NovL akzeptiert werden (Galm *et al.*, 2004a; Steffensky *et al.*, 2000a).

**Tabelle III.7:** Strukturformeln der gefütterten Ring A-Analoga (RAA).

Bezeichnung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
RAA 210		OH	H
RAA 220		OH	H
RAA 240		OH	H
RAA 250		OH	H
RAA 270	Cl	OH	H
RAA 280	Br	OH	H
RAA 380	CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H

In den Fütterungsexperimenten wurden gewöhnlich 10 mg des entsprechenden Ring A-Analogons bei Inokulation in 500 ml Kulturmedium der entsprechenden Mutante zugesetzt. Als Kontrolle wurde die ungefütterte Mutante von *S. coelicolor* (nov-CA7) kultiviert. Sieben bis zehn Tage später wurden die Kulturen extrahiert und die Extrakte mittels HPLC analysiert.

Wie erwartet produzierte die ungefütterte Mutante keine Novobiocinsäure. Auch die Fütterung von 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure (RAA 270) zu *S. coelicolor* (nov-CA7) führte nicht zur Bildung neuer Derivate. In den sechs weiteren Experimenten konnten, wie erwartet, neue Novobiocinsäure Analoga detektiert werden.

Die entsprechenden Extrakte der Kulturen wurden in einem weiteren Fütterungsschritt an die Clorobiocin-Mutante *S. coelicolor* (clo-CA5) gefüttert. Durch die Verwendung der *cloQcloL*-Defektmutante *S. coelicolor* (clo-CA5) war es möglich, Extrakte des

ersten Fütterungsschrittes zufüttern. Diese Mutante kann noch eventuell vorkommende Reste des Ring A-Analogons im Extrakt nicht zu neuen Produkten umsetzen, da keine Amidsynthetase zur Verknüpfung des Ring A-Analogons und Ring B zur Verfügung steht. Gewöhnlicherweise wurde Extrakt mit etwa 1 mg des entsprechenden Novobiocinsäure Analogons in 200 µl Ethanol zu 80 ml Kulturmedium von *S. coelicolor* (clo-CA5) zum Zeitpunkt der Inokulation ins Produktionsmedium zugefüttert. Nach weiteren sieben bis zehn Tage wurden die Kulturen extrahiert und die Extrakte mittels HPLC analysiert.

Die Fütterung des Novobiocinsäure Analogons mit 3-Ter-valerylamino-4-hydroxybenzoesäure (RAA 250) an *S. coelicolor* (clo-CA5) führte nicht zur Bildung neuer Derivate. Alle weiteren fünf durchgeführten Fütterungen zu *S. coelicolor* (clo-CA5) führten zur Produktbildung. Die neuen Derivate wurden mittels HPLC präparativ isoliert (s. Kapitel II/13.5) und die Strukturen durch ESI-MS Analyse und <sup>1</sup>H NMR aufgeklärt.

#### **2.4.4 Identifizierung neuer Hybrid-Aminocoumarine**

Alle neuen Substanzen wurden auch hier als Novclobiocine bezeichnet. Die Ergebnisse der ESI-MS Analyse sind in Tabelle III.9 dargestellt. Die <sup>1</sup>H NMR und MS-Spektren befinden sich im Anhang VII.5 und VII.6.

**Tabelle III.8:** Chemische Strukturen der isolierten Derivate.

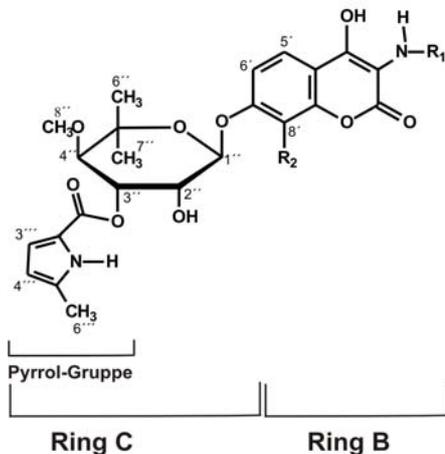
Bezeichnung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
Novclobiocin 217		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr	
Novclobiocin 218		CH <sub>3</sub>	Pyr	OH	
Novclobiocin 219		CH <sub>3</sub>	OH	OH	
Novclobiocinsäure 219A*		CH <sub>3</sub>	-	-	
Novclobiocin 225		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr	
Novclobiocin 226		CH <sub>3</sub>	Pyr	OH	
Novclobiocin 227		CH <sub>3</sub>	OH	OH	
Novclobiocinsäure 228*		CH <sub>3</sub>	-	-	
A	Novclobiocin 241 <sup>a</sup>		Cl	OH	Pyr
	Novclobiocin 281 <sup>a</sup>		Cl	OH	Pyr
	Novclobiocin 386		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr
	Novclobiocin 387		CH <sub>3</sub>	Pyr	OH
	Novclobiocin 204		CH <sub>3</sub>	OH	OH
B	Novclobiocin 314		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr
	Novclobiocin 315		CH <sub>3</sub>	OH	OH
	Novclobiocin 604		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr
	Novclobiocin 606		CH <sub>3</sub>	OH	OH
	Novclobiocinsäure 607*		CH <sub>3</sub>	-	-
	Novclobiocin 701 <sup>b</sup>		Cl	OH	Pyr
	Novclobiocin 703		CH <sub>3</sub>	OH	Pyr
	Novclobiocin 704		CH <sub>3</sub>	OH	OH
Novclobiocinsäure 705*	H		-	-	

<sup>a</sup> Produkt wurde schon von Galm *et al.* (2004a) identifiziert.

<sup>b</sup> Produkt wurde schon im Rahmen der Herstellung der Clorobiocin-Derivate identifiziert.

\* Novclobiocinsäuren fehlt der Desoxyzucker.

**Tabelle III.9:** ESI-MS Daten der isolierten Derivate, aufgenommen im positiven Modus.



**R<sub>1</sub>:** Ring A-  
Analogon

**R<sub>2</sub>:** Cl, H oder  
CH<sub>3</sub>

Bezeichnung	MW	[M+H] <sup>+</sup>	[M-Ring C] <sup>+</sup>	[Ring A] <sup>+</sup>	[Ring C] <sup>+</sup>	[Pyrrol-Gruppe] <sup>+</sup>
Clorobiocin	696,2	697,3/699,0	416,4	189,1	282,2	108,0
Novclobiocin 204	529,2	530,2	356,1	149,0	-	-
Novclobiocin 217	650,2	651,4	370,1	163,0	282,1	108,0
Novclobiocin 218	650,3	651,4	370,2	163,0	282,1	n.d.
Novclobiocin 219	543,2	544,3	370,2	163,0	-	-
Novclobiocinsäure 219A	369,1	370,1	-	163,0	-	-
Novclobiocin 225	648,2	649,3	368,1	161,0	282,1	108,0
Novclobiocin 226	648,2	649,3	368,2	161,0	282,4	108,0
Novclobiocin 227	541,2	542,3	368,2	161,0	-	-
Novclobiocinsäure 228	367,1	368,1	-	161,0	-	-
Novclobiocin 241	713,2	714,3/716,5	n.d.	n.d.	282,0	107,9
Novclobiocin 281	706,1	707,2/709,3	n.d.	n.d.	282,2	108,2
Novclobiocin 314	638,2	639,3	358,1	151,0	282,1	108,0
Novclobiocin 315	531,2	532,2	358,1	151,0	-	-
Novclobiocin 386	621,2	622,3	341,2	134,0	282,1	108,0
Novclobiocin 387	621,2	622,3	341,1	134,0	282,2	108,0
Novclobiocin 604	592,2	593,2	312,1	105,0	282,1	108,0
Novclobiocin 606	485,2	486,2	312,1	105,0	-	-
Novclobiocinsäure 607	311,1	312,0	-	105,0	-	-
Novclobiocin 701	638,2	639,3/641,4	358,0	131,0	282,2	108,0
Novclobiocin 703	618,2	619,3	338,2	131,0	282,2	108,0
Novclobiocin 704	511,2	512,6	338,1	131,0	-	-
Novclobiocinsäure 705	323,1	324,0	-	131,0	-	-

x/y zwei Signale, die aus Anwesenheit von Chlor-Isotopen im Molekül resultieren.  
n.d. nicht detektierbar.

In drei erfolgreichen Fütterungen konnte das erwartete direkte Hybrid-Aminocoumarin isoliert werden (Tab. III.8A). Diese Derivate beinhalten die Methylgruppe des Novobiocins an Position 8' des Aminocoumarin-Rings und die 5-Methylpyrrol-2-dicarbonsäure Gruppe des Clorobiocins an Position 3'' des Desoxyzuckers sowie die gefütterten Ring A-Analoga.

Die Fütterung von Ring A-Analoga mit polaren Seitenketten bzw. mit einem Bromatom führte jedoch zu Aminocoumarin-Antibiotika, welchen die Methylgruppe an Position 8' fehlt. Diese neuen Produkte wiesen stattdessen ein Chloratom an dieser Position auf. Die Strukturen konnten eindeutig durch ein fehlendes Signal eines Protons der Aminocoumarin-Gruppe im  $^1\text{H}$  NMR und durch die Massenanalyse nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Novobiocinsäure Analoga schlechte Substrate der Methyltransferase NovO sind, welche normalerweise das nicht-polare Derivat 1 als natürliches Substrat benutzt (s. Abb. III.17). Die resultierenden Novobiocinsäure Analoga scheinen außerdem gute Substrate für die Halogenase Clo-hal (Eustáquio *et al.*, 2003a) des Clorobiocin-Produzenten *S. coelicolor* (clo-CA5) zu sein. Jedoch ist diese Annahme spekulativ, da bisher keine biochemische Untersuchung dieser Halogenase durchgeführt wurde.

Daneben wurden auch die korrespondierende „Isonovclobiocin“ identifiziert. Diese Substanzen tragen die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 2'' anstatt an 3'' des Desoxyzuckers. Im  $^1\text{H}$  NMR zeigte sich diese Verschiebung durch eine Signalverschiebung des Protons an C-2'' von 4,28 ppm im direkten Hybrid-Aminocoumarin zu 5,37 ppm im Isonovclobiocin und des Protons an C-3'' von 5,67 ppm zu 4,41 ppm im Isonovclobiocin-Derivat, welche schon in früheren Arbeiten beobachtet wurde (Galm *et al.*, 2004a; Westrich *et al.*, 2003). Die Analyse der Massen der Derivate bestätigte diese Ergebnisse.

Aus zwei Fütterungsexperimenten wurden Substanzen isoliert, denen die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe vollständig fehlte. In den  $^1\text{H}$  NMR Spektren fehlten die Signale für diese Gruppe. Außerdem war die Masse der Derivate um 107 Da niedriger als das entsprechende Derivat mit der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe.

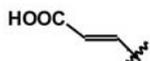
Bei einigen Fütterungsexperimenten wurde das Aglykon identifiziert, das aus dem ersten Fütterungsschritt stammt. Es wurde nicht vollständig in das jeweilige Hybrid-Aminocoumarin umgewandelt. In den  $^1\text{H}$  NMR Spektren fehlten die Signale des substituierten Desoxyzucker. Diese Ergebnisse wurden auch durch die Detektion der entsprechenden Massen bestätigt.

#### **2.4.4.1 Erweiterung der zweistufigen Fütterungen durch die Nutzung von fremden Amidsynthetasen**

Die bisher dargestellten Experimente zeigen, dass sowohl durch die Expression einer fremden Amidsynthetase als auch durch die Strategie einer zweistufigen Fütterung neue Aminocoumarin-Antibiotika hergestellt werden können. Als weitere sinnvolle Erweiterung wurden nun diese beiden Strategien miteinander verknüpft. Dazu wurden die Plasmide pMS91, welches das Amidsynthetase-Gen *couL* beinhaltet, und pSH2, welches das Amidsynthetase-Gen *simL* beinhaltet, mittels PEG-vermittelter Protoplastentransformation in *S. coelicolor* (nov-CA7) eingebracht. Anschließend wurden, wie bei Kapitel III.2.4.3 beschrieben, drei Ring A-Analoga zur Mutante mit

dem Plasmid pSH2 mit *simL* gefüttert (Tab. III.10), von denen bekannt war, dass sie als Substrat von SimL aber nicht von NovL akzeptiert werden (Luft *et al.*, 2005). Zu *S. coelicolor* (nov-CA7) mit pMS91 wurde 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure gefüttert. Die resultierenden Novobiocinsäure Analoga wurden extrahiert und ohne weitere Aufreinigung an *S. coelicolor* (clo-CA5) gefüttert.

**Tabelle III.10:** Strukturformeln der gefütterten Ring A-Analoga (RAA).

gefüttert an <i>S. coelicolor</i> (nov-CA7) mit	Bezeichnung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
pMS91 ( <i>couL</i> )	RAA 200	COOH	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
pSH2 ( <i>simL</i> )	RAA 310	COOH	OCH <sub>3</sub>	OH	H
	RAA 600	COOH	H	H	H
	RAA 700		H	H	H

In allen drei Fütterungsexperimenten an die Mutante, die das Plasmid pSH2 mit dem Amidsynthetase-Gen *simL* enthält, wurden die erwarteten Aminocoumarin-Antibiotika erhalten (Tab. III.8B und Tab. III.9). Die Fütterung mit Zimtsäure resultierte zusätzlich in einem weiteren Produkt, welches als ein Derivat identifiziert werden konnte, das statt der erwarteten Methylgruppe an Position 8' des Aminocoumarin-Rings ein Chloratom enthielt. Nach der Fütterung von Benzoesäure und Vanillinsäure (3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure) konnte das erwartete 8'-methylierte Produkt detektiert werden, sowie ein Derivat, dem die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe fehlte. Nach der Fütterung der Benzoesäure wurde zusätzlich das Aglykon isoliert.

Des Weiteren wurde nach Zufütterung von Zimtsäure ein Novobiocinsäure Analogon isoliert, das an Position 8' des Aminocoumarin-Rings nicht die Methylgruppe des Novobiocins aufwies.

Die Fütterung von 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure zur Mutante mit CouL führte zu einem Produkt, dem die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe vollständig fehlte.

#### 2.4.4.2 Zusammenfassung der resultierenden Produkte der zweistufigen Fütterungen

Die neue Fütterungsmethode in Kombination mit der Nutzung von fremden Amidsynthetasen führte nach Zufütterung von 11 Ring A-Analoga zur Bildung von 19 neuen Hybrid-Aminocoumarinen, die die gefütterten Substrate enthielten. Die Ausbeuten variierten dabei von 10 µg bis 1,1 mg, je nach gefüttertem Ring A-Analogen. Die relativen Ausbeuten liegen zwischen 0,04 % bis 5,6 % bezogen auf die gefütterte Menge Ring A-Analogen im ersten Fütterungsschritt (Tab. III.11). Je ähnlicher das Ring A-Analogen dem genuinen Ring A war, desto mehr Produkt wurde erhalten. Ein Problem dieser Fütterungen könnte die Aufnahme der gefütterten Novobiocinsäure Analoga in den Clorobiocin-Produzenten darstellen.

Tabelle III.11: Relative Ausbeuten der neuen Derivate.

	gef. RAA	gef. Menge [mg]	gef. Menge [mmol]	Nov-clobiocin	erhaltene Produktmengen [ $\mu$ g]	erhaltene Produktmengen [ $\mu$ mol]	relative Ausbeute [%]
A	210	12	0,067	217	988,17	1,520	5,59
				218	274,99	0,423	1,55
				219	99,07	0,182	0,67
				219A	15,81	0,043	0,16
	220	12	0,067	225	798,01	1,231	4,40
				226	304,78	0,470	1,68
				227	14,52	0,027	0,10
				228	119,05	0,324	1,16
	240	10	0,045	241	770,88	1,081	2,01
	280	12	0,056	281	10,10	0,014	0,04
	380	10	0,066	386	484,80	0,780	1,18
				387	240,38	0,387	0,58
B	200	20	0,120	204	40,87	0,077	0,06
	310	10	0,060	314	524,31	0,822	1,38
				315	555,38	1,046	1,76
	600	10	0,082	604	72,28	0,122	0,15
				606	441,92	0,911	1,11
				607	90,78	0,292	0,36
	700	10	0,068	701	177,05	0,277	0,41
				703	154,48	0,250	0,37
				704	1197,92	2,343	3,47
				705	62,35	0,421	0,62

gef. gefüttert

## 2.5 Untersuchung der Aktivitäten der neuen Aminocoumarin-Antibiotika

### 2.5.1 Einleitung

Die Aminocoumarine Novobiocin und Clorobiocin bestehen aus einer 3-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure (Ring A), die mit einer 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Gruppe (Ring B) verknüpft ist. Die Hydroxygruppe an Position 7' wird wiederum mit einem substituierten Desoxyzucker verknüpft. Novobiocin trägt an diesem Desoxyzucker eine Carbamoylgruppe während Clorobiocin eine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure an dieser Position aufweist. Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung (Hooper *et al.*, 1982; Reusser und Dolak, 1986) zeigten, dass Ring B und der substituierte Desoxyzucker essentiell für die antibakterielle Aktivität sind. Auch die Substituenten an Position 3'' des Desoxyzuckers verändern signifikant die Bioaktivität der Substanzen. Im Gegensatz zur Carbamoylgruppe des Novobiocins besetzt die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure des Clorobiocins eine zusätzliche hydrophobe Tasche im aktiven Zentrum der bakteriellen Gyrase und verdrängt dabei zwei Wassermoleküle (Lewis *et al.*, 1996b), was zu einer stärkeren antibakteriellen Aktivität führt. Ring A trägt im Kontrast zu Ring B und dem substituierten Desoxyzucker nur schwach zur antibakteriellen Aktivität bei (Lafitte *et al.*, 2002). Er interagiert durch hydrophobe Bindungen mit der

bakteriellen Gyrase. Jedoch beeinflusst Ring A die Aufnahme der Substanzen in die Bakterienzelle positiv (Laurin *et al.*, 1999; Reusser und Dolak, 1986).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Aminocoumarine ist die Verwendung im onkologischen Bereich. Novobiocin wurde in Kombination mit alkylierenden Substanzen in Phase I/II Studien erfolgreich getestet (Eder *et al.*, 1991; Ellis *et al.*, 1991). Auch konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Novobiocin in Kombination mit Etoposid oder Teniposid die intrazellulären Konzentrationen dieser zwei Topoisomerase II-Hemmer durch die Hemmung von ATP-abhängigen Transportern erhöhen kann. Zusätzlich konnten kürzlich durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass Novobiocin an die ATP-Bindungsstelle am C-Terminus von Hsp90 bindet. Bei Hsp90 handelt es sich um ein Hitzeschockprotein, das für die Stabilisierung von verschiedenen onkogenen Proteinkinasen verantwortlich ist (Marcu *et al.*, 2000b; Marcu *et al.*, 2000a).

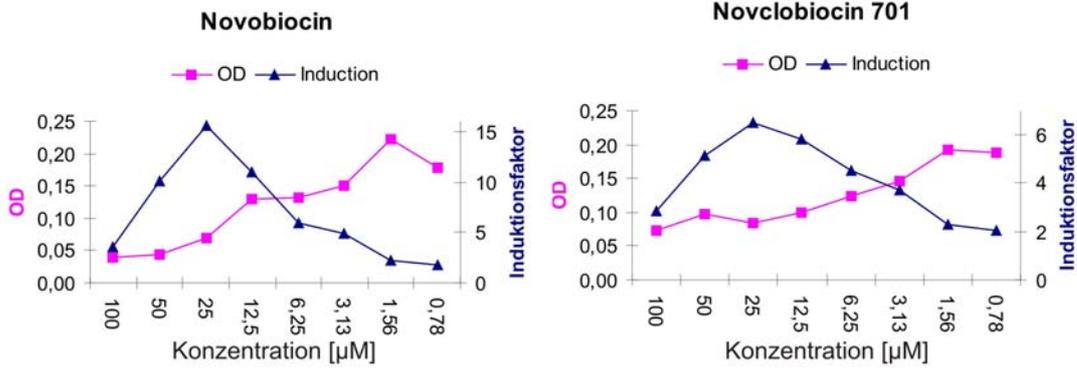
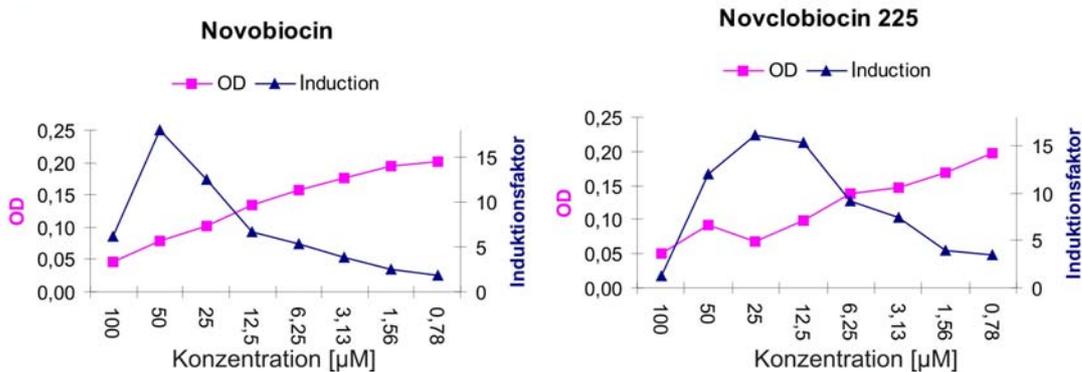
Durch die Durchführung der einstufigen und zweistufigen Fütterungen wurde eine Reihe von neuen Aminocoumarinen erhalten. Um neue Antibiotika oder Zytostatika zu identifizieren, wurde nun in einem ersten Schritt der Wirkungsmechanismus der neuen Derivate mittels Reporter-Gene-Assay untersucht. Des Weiteren wurden die antimikrobiellen und DNA-gyraseinhibitorischen Aktivitäten bestimmt und die toxischen Eigenschaften untersucht. Um Voraussagen über die einzelnen Aktivitäten neuer Derivate treffen zu können, wurde die Möglichkeit untersucht, die Aktivitäten mittels berechenbaren Bindungsenergien zu bestimmen. Dazu wurden die experimentell erhaltenen Werte der Gyrasehemmung mit berechneten Werten verglichen, die durch Docking Studien erhalten wurden.

### **2.5.2 Untersuchung des Wirkungsmechanismus der neuen Derivate durch Reporter-Gene-Assays**

33 Aminocoumarine, einschließlich Clorobiocin und Novobiocin sowie der drei bekannten Vanillobiocine (Novclobiocin 311, 312 und 313) (Freitag *et al.*, 2004) und dem bekannten Novclobiocin 241 (Galm *et al.*, 2004b; Galm *et al.*, 2004a), wurden auf ihren Wirkungsmechanismus in Reporter-Gene-Assays untersucht.

Dazu wurde der *gyrA* Promotor sowie der *sulA* Promotor von *E. coli* benutzt, welcher „upstream“ eines Luciferase-Operons von *Photobacterium luminescens* in pACYC184 kloniert wurde (M. Stieger; Basilea Pharmaceutica, Basel, Schweiz; persönl. Mitteilung).

Nach Exposition von verschiedenen Konzentrationen der Aminocoumarine wurden die Lumineszenz und die Absorption der Kulturen bestimmt. In Abb. III.19A sind als Beispiel die Ergebnisse des Experiments mit dem *gyrA* Promotor und der Exposition von Novobiocin bzw. Novclobiocin 701 dargestellt. Ein Beispiel des Experiments mit *sulA* Promotor und der Exposition von Novobiocin bzw. Novclobiocin 225 ist in Abb. III.18B dargestellt.

A *gyrA* PromotorB *sulA* Promotor

**Abbildung III.18:** Ergebnisse der Reporter-Gene-Assays mit A) dem *gyrA* Promotor nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Novobiocin bzw. Novclobiocin 701, einem neuen direkten Clorobiocin-Derivat. B) Ergebnisse mit dem *sulA* Promotor nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Novobiocin bzw. Novclobiocin 225, einem neuen direkten Hybrid-Aminocoumarin.

Beide Versuche zeigten ähnliche Ergebnisse. Niedrige Konzentrationen von Novobiocin bzw. dem neuen Aminocoumarin zeigten keinen Effekt auf das bakterielle Wachstum und nur einen geringen Effekt auf die Lichtemission. Die höchste Konzentration von Novobiocin sowie der neuen Aminocoumarine hemmte sowohl das Wachstum als auch die Lichtemission. Aber interessanterweise wurde bei Konzentrationen, welche das Wachstum verlangsamen aber nicht vollständig unterdrücken, bei beiden Promotoren ein Anstieg der Lichtemission beobachtet. Die gleichen Resultate wurden mit Clorobiocin, den direkten Clorobiocin-Derivaten und den direkten Hybrid-Aminocoumarinen sowie mit den Dechlornovclobiocinen, die an Position 8' der Aminocoumarin-Gruppe unsubstituiert sind, und Isonovclobiocinen, die die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 2'' anstatt an Position 3'' des Desoxyzuckers tragen, der erhaltenen Substanzen erzielt (nicht gezeigt). Substanzen, die keine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe am Desoxyzucker aufweisen, zeigten keine Wachstumshemmung oder Lichtemission (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass, mit Ausnahme der Derivate ohne 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe am Desoxyzucker, alle getesteten Derivate den gleichen Effekt auf die verwendeten Promotoren und damit den Wirkungsmechanismus aufweisen, wie die natürlichen Produkte Clorobiocin und Novobiocin.

### 2.5.3 Untersuchung der gyraseinhibitorischen Aktivität der neuen Derivate

Um die Aktivitäten genauer zu untersuchen, wurden die Aminocoumarine auf ihre gyrasehemmende Effekten *in vitro* untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: der ATPase-Assay und der Triplex-Assay.

Mittels ATPase-Assay wurden 33 Aminocoumarine untersucht, einschließlich Clorobiocin und Novobiocin sowie der drei bekannten Vanillobiocine (Novclobiocin 311, 312 und 313) (Freitag *et al.*, 2004) und dem bekannten Novclobiocin 241 (Galm *et al.*, 2004b; Galm *et al.*, 2004a). Der ATPase-Assay beruht auf der ATPase-Aktivität der Untereinheit B der bakteriellen Gyrase und deren Hemmung durch Aminocoumarin-Antibiotika. Der Assay-Puffer enthielt ATP, welches durch die B-Untereinheit der bakteriellen Gyrase in anorganisches Phosphat umgewandelt wurde, sowie verschiedene Konzentrationen der zu testeten Derivate. Durch Zugabe der Gyrase B-Untereinheit wurde der Assay gestartet. Nach der Inkubation wurde Malachitgrün Reagenz dazugegeben und die nicht-enzymatische Hydrolyse von ATP durch Zugabe von Natriumcitrat unterbunden. Das freie Phosphat wurde in einem Phosphomolybdat-Malachitgrün-Komplex gebunden, die Absorption bestimmt und der  $IC_{50}$ -Wert berechnet (Tab. III.12).

Von 23 Aminocoumarinen, die in einer ausreichenden Menge vorhanden waren, wurden anschließend mittels Triplex-Assay weitere  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Der Triplex-Assay ist ein „high-throughput“ Assay, welcher auf der Hemmung der Supercoiling-Aktivität der bakteriellen Gyrase beruht. Es wurde dafür eine Mischung aus Gyrase A und Gyrase B-Untereinheit von *E. coli* benutzt.

Erste Ergebnisse dieser Testungen zeigten, dass die Ergebnisse beider Assays ähnlich sind. Dies beruht darauf, dass auch beim Triplex-Assay die ATPase-Aktivität der Gyrase B-Untereinheit gehemmt wird. Clorobiocin zeigte in beiden Assays, wie erwartet, eine deutlich höhere Aktivität als Novobiocin. Bei den neuen getesteten Aminocoumarinen zeigte besonders Novclobiocin 201, das 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure als Ring A-Analogen trägt, und Novclobiocin 601 eine hohe Aktivität im Bereich von Clorobiocin. Novclobiocin 601 trägt als Ring A-Analogen Benzoesäure. Interessanterweise zeigte auch das Derivate 701, das als Ring A-Analogen Zimtsäure trägt, eine hohe Aktivität. Dies demonstriert, dass das verwendete Ring A-Analogen sehr variable gewählt werden kann ohne das große Verluste in der Gyrasehemmung zu befürchten sind. Wichtiger ist die Substitution an Position 8' des Aminocoumarin-Rings. Derivate, die ein Proton an dieser Stelle tragen, zeigten eine deutlich verminderte Aktivität in diesen Assays. Dagegen war kein signifikanter Unterschied bei Derivaten zu erkennen, die entweder ein Chloratom oder eine Methylgruppe an dieser Position aufwiesen. Novclobiocin 311, das ein Chloratom aufweist, und Novclobiocin 314, das eine Methylgruppe an dieser Stelle trägt, zeigten kaum Unterschiede in den  $IC_{50}$ -Werten (122 nM versus 86 nM im ATPase-Assay bzw. 22 nM versus 25 nM im Triplex-Assay).

Auch die Substitution an Position 3'' bzw. 2'' des Desoxyzuckers spielt eine große Rolle für die gyrasehemmende Aktivität eines Aminocoumarins. Derivate, die an Position 3'' eine Pyrrolgruppe tragen, waren deutlich aktiver als Derivate, die diese Gruppe an Position 2'' aufweisen (Isoformen). Derivate ohne einen Substituenten an Position 3'' bzw. 2'' zeigten im ATPase-Assay eine vernachlässigbare Aktivität ( $IC_{50} > 10000$  nM)

**Tabelle III.12:** Effekte verschiedener Aminocoumarine auf die *E. coli* DNA-Gyrase *in vitro* ermittelt mittels ATPase-Assay bzw. Triplex-Assay.

Bezeichnung	ATPase Assay	Triplex-Assay
	IC <sub>50</sub> [nM]	IC <sub>50</sub> [nM]
Clorobiocin	73	<5
Novobiocin	154	200
Novlobiocin 201	65	17
Novclobiocin 202	376	320
Novclobiocin 203	229	120
Novclobiocin 204	>10000	n.d.
Novclobiocin 217	84	19
Novclobiocin 218	758	140
Novclobiocin 219	>10000	n.d.
Novclobiocin 225	116	34
Novclobiocin 226	2787	460
Novclobiocin 241	73	41
Novclobiocin 311	122	22
Novclobiocin 312	891	460
Novclobiocin 313	185	75
Novclobiocin 314	86	25
Novclobiocin 315	>10000	n.d.
Novclobiocin 371	84	20
Novclobiocin 372	280	n.d.
Novclobiocin 386	152	44
Novclobiocin 387	784	190
Novclobiocin 601	72	<5
Novclobiocin 602	297	110
Novclobiocin 603	219	50
Novclobiocin 604	131	n.d.
Novclobiocin 606	>10000	n.d.
Novclobiocin 701	90	34
Novclobiocin 702	598	1200
Novclobiocin 703	106	n.d.
Novclobiocin 704	>10000	n.d.
Novclobiocin 731	263	43
Novclobiocin 741	137	32
Novclobiocin 742	276	280

n.d. Testung nicht durchgeführt

#### 2.5.4 Vergleich der gyraseinhibitorischen Aktivität mit berechneten Bindungsenergien

Die vorläufigen IC<sub>50</sub>-Werte aus den ATPase- und Triplex-Assays wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz, mit berechneten Bindungsenergien der Moleküle zur Untereinheit B der bakteriellen Gyrase verglichen, um eine weitere Möglichkeit der Voraussage der Aktivitäten zu überprüfen. Dazu wurde ein Modell der *E. coli* GyrB 24 kDa Domäne benutzt. In einem ersten Schritt wurde Clorobiocin in diese Domäne gedockt. Anschließend wurden 16

verschiedene Strukturen der zuvor getesteten Derivate in gleicher Weise in diese Domäne gedockt und die Energien mit Hilfe der Moloc-Software ermittelt.

Für Derivate, die die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 3'' des Desoxyzuckers tragen, konnte das Dockingmodell von Clorobiocin genutzt werden. Dagegen wurde für Derivate, die die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 2'' anstatt an Position 3'' des Desoxyzuckers tragen, kein passender Bindungsmodus gefunden. Diese Derivate wurden von der Berechnung ausgeschlossen.

**Tabelle III.13:** Berechnete Bindungsenergien

Bezeichnung	vdW H <sub>2</sub> O	vdW prot.	H-bond H <sub>2</sub> O	H-bond prot.	rep -H <sub>2</sub> O	rep prot.	E0 (vac)	Eopt (vac)	E (strain)	E (uncorr)	E (corr)
<b>Clorobiocin</b>	-4,2	-39,1	-12,7	-19,6	0,1	7,0	75,0	59,0	16,0	-68,5	<b>-52,5</b>
<b>Novclobiocin 201</b>	-4,2	-36,2	-12,2	-19,4	0,2	6,9	83,0	63,0	20,0	-64,9	<b>-44,9</b>
<b>Novclobiocin 203</b>	-4,3	-33,7	-12,2	-19,3	0,2	6,5	81,0	64,0	17,0	-62,8	<b>-45,8</b>
<b>Novclobiocin 217</b>	-4,1	-37,3	-12,5	-19,6	0,1	7,0	76,0	61,0	15,0	-66,4	<b>-51,4</b>
<b>Novclobiocin 219</b>	-3,9	-24,3	-10,5	-16,4	0,6	3,8	48,0	34,0	14,0	-50,7	<b>-36,7</b>
<b>Novclobiocin 225</b>	-4,2	-37,4	-12,7	-19,6	0,1	7,1	76,0	60,0	16,0	-66,7	<b>-50,7</b>
<b>Novclobiocin 311</b>	-4,1	-36,5	-12,7	-19,7	0,1	6,7	77,0	65,0	12,0	-66,2	<b>-54,2</b>
<b>Novclobiocin 313</b>	-4,2	-34,0	-12,7	-19,7	0,1	6,4	76,0	65,0	11,0	-64,1	<b>-53,1</b>
<b>Novclobiocin 314</b>	-4,1	-36,7	-12,7	-19,6	0,1	7,0	79,0	65,0	14,0	-66,0	<b>-52,0</b>
<b>Novclobiocin 371</b>	-4,5	-36,6	-10,7	-19,8	0,01	6,9	83,0	63,0	20,0	-64,7	<b>-44,7</b>
<b>Novclobiocin 386</b>	-4,2	-36,6	-12,7	-19,6	0,1	7,0	78,0	64,0	14,0	-66,0	<b>-52,0</b>
<b>Novclobiocin 601</b>	-4,2	-35,5	-9,3	-19,6	0,00	6,7	72,0	63,0	9,0	-61,9	<b>-52,9</b>
<b>Novclobiocin 603</b>	-4,3	-33,0	-9,3	-19,6	0,01	6,3	71,0	64,0	7,0	-59,9	<b>-52,9</b>
<b>Novclobiocin 604</b>	-4,2	-35,7	-9,3	-19,5	0,1	7,0	78,6	63,9	14,7	-61,6	<b>-46,9</b>
<b>Novclobiocin 701</b>	-4,6	-34,8	-9,6	-19,4	0,3	6,9	67,0	61,0	6,0	-61,2	<b>-55,2</b>
<b>Novclobiocin 731</b>	-4,7	-35,8	-15,4	-19,2	0,5	7,5	74,8	64,0	10,8	-67,1	<b>-56,3</b>
<b>Novclobiocin 741</b>	-4,7	-35,4	-13,0	-18,9	0,9	7,6	72,9	61,9	11,0	-63,5	<b>-52,5</b>

vdWH<sub>2</sub>O: favorisierte vdW Interaktionsenergie zu Wassermolekülen.

vdW Prot: favorisierte vdW Interaktionsenergie zu Protein.

H-bond: Wasserstoffbindungsenergie zu Wassermolekülen (H-bond H<sub>2</sub>O) und Protein (H-bond prot.).

rep-H<sub>2</sub>O, rep prot: repulsive Energie zu H<sub>2</sub>O bzw. Protein.

E(vac): Konformationsenergie vor und nach Optimierung des Derivates in Vakuum.

E(strain): Differenz zwischen E0(vac) und Eopt(vac).

E(corr): Ligand/Protein-Interaktionsenergie E(uncorr) korrigiert für anpassungsfähigen Stamm.

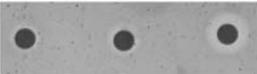
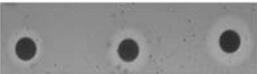
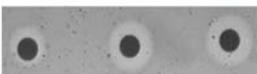
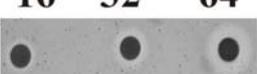
Energien sind in Moloc-Energie-Einheiten angegeben.

Die berechneten Bindungsenergien E(corr) der einzelnen Derivate bewegten sich alle im selben Bereich (Tab. III.13), was durch den geringen Effekt der modifizierten 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure zur Bindung an die Gyrase zu erklären ist (Lafitte *et al.*, 2002). Nur die Bindungsenergie von Novclobiocin 219 fiel mit -36,7 Moloc-Energie-Einheiten höher aus. Das bedeutet, dass dieses Derivat nur eine schwache Gyrasehemmung zeigt. Dieses Derivat trägt keine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe am Desoxyzucker und zeigte auch im ATPase-Assay nur eine vernachlässigbare Aktivität (IC<sub>50</sub> > 10000 nM). Novclobiocin 371 zeigte sowohl im ATPase-Assay als auch im Triplex-Assay eine hohe Aktivität. Allerdings wies dieses Derivat in der Berechnung nur eine Bindungsenergie im unteren Bereich auf.

Dies zeigt, dass die errechneten Werte nur einen Anhaltspunkt für die mögliche Aktivität eines neuen Derivats geben können. Eine genaue Voraussage ist nicht möglich.

**2.5.5 Antibakterielle Aktivität der „natürlichen“ Derivate gegen *Bacillus subtilis***

Die drei isolierten „natürlichen“ Derivate Ferulobiocin (Novclobiocin 731), 3-Chlorocoumarobiocin (Novclobiocin 741) und 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin wurden auf ihre wachstumshemmende Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis* ATTC 14893 im Vergleich zu Clorobiocin im Agar-Diffusionsassay untersucht. Die antibakteriellen Aktivitäten wurden durch Auswertung der erzielten Hemmhofdurchmesser quantifiziert.

Bezeichnung	Menge [nmol]	relative Aktivität [%]
Clorobiocin		100
	0.5 1 2	
Ferulobiocin		3.3
	16 32 64	
3-Chloro-coumarobiocin		5.0
	16 32 64	
8'-Dechloro-3-chloro-coumarobiocin		1.4
	32 64 128	

**Abbildung III.20:** Antibakterielle Aktivität von Clorobiocin, Ferulobiocin, 3-Chlorocoumarobiocin und 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin. Der Bioassay wurde mit *Bacillus subtilis* ATTC 14893 durchgeführt. Für Strukturen siehe Tabelle III.7. Die relative Aktivität von Clorobiocin wurde 100% gesetzt.

Alle drei Derivate zeigten antibakterielle Aktivität, jedoch deutlich schwächer als das sehr aktive Clorobiocin (Abb. III.20). 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin zeigte eine schwächere Aktivität als die zwei anderen Derivate. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, welche einen 80-90% Aktivitätsverlust von Substanzen beschreiben, denen das Chloratom an Position 8' des Aminocoumarin-Rings entfernt wurde (Eustáquio *et al.*, 2003a; Galm *et al.*, 2004b).

**2.5.6 Minimal inhibitorische Konzentration (MIC) der neuen Derivate gegenüber klinisch relevanten Mikroorganismen**

Für 13 Aminocoumarine, einschließlich Novobiocin, Clorobiocin, Novclobiocin 241 (Galm *et al.*, 2004b) und Vanillobiocin (Novclobiocin 311) (Freitag *et al.*, 2004; Galm *et al.*, 2004b), wurden MIC-Werte gegenüber acht klinisch relevante Gram-positiven und sieben Gram-negativen Bakterien bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.14 zusammengefasst.

Besonders niedrige MIC-Werte waren bei den Staphylokokken zu beobachten, was auch die hohe Aktivität der Aminocoumarine gegenüber Gram-positiven Bakterien

widerspiegelt. Unter allen getesteten Derivaten war Clorobiocin gegenüber dieser Auswahl der Teststämme das aktivste Derivat. Von den neuen Aminocoumarinen wiesen die Novclobiocine 217 und 225, beides Hybrid-Aminocoumarine, die eine 3-Propyl-4-hydroxybenzoesäure bzw. eine 3-Propenyl-4-hydroxybenzoesäure Gruppe trugen, die niedrigsten MIC-Werte auf.

Novclobiocin 203, ein Clorobiocin-Analogon, das eine 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure Gruppe trug und statt einem Chloratom an Position 8' des Aminocoumarin-Rings ein Proton aufwies, zeigte im Vergleich zum chlorierten Derivat 201 höhere MIC-Werte.

Auch gegen *Staphylococcus aureus* ATCC43300, einen Methicillin-resistenten Stamm, und *Staphylococcus aureus* ATCC29213 waren die getesteten Derivate aktiv. Einer der weiteren untersuchten Staphylokokken Stämme war resistent gegen Novobiocin (*Staphylococcus aureus* 80CR5). Dieser Stamm zeigte gegen die getesteten neuen Aminocoumarine ebenso wie gegen Novobiocin keine Sensitivität. Nur gegen Clorobiocin wurde ein niedrigerer MIC-Wert (4 µg/ml) erhalten.

Alle drei getesteten *Streptococcus pneumoniae* Stämme waren Novobiocin und Clorobiocin sensitiv. Sie reagierten auch sensitiv gegenüber den neuen getesteten Derivaten. Die zwei getesteten Enterokokken-Stämme, *E. faecalis* und *E. faecium*, waren resistent gegen Novobiocin und die neuen Aminocoumarine. *E. faecalis* reagierte jedoch gegenüber Clorobiocin sensitiv.

Von den sieben untersuchten Gram-negativen Mikroorganismen waren *E. coli* DC2 und *Pseudomonas aeruginosa* K799/61, beides hyperpermeable Stämme, die einzigen, die sensitiv gegenüber Clorobiocin, Novobiocin und den neuen Aminocoumarinen reagierten. Ihre entsprechenden Wildtyp-Stämme (*E. coli* UB1005 und *Pseudomonas aeruginosa* K799/WT) wiesen keine Sensitivität auf, was darauf hindeutet, dass die Aufnahme der Aminocoumarine der limitierende Faktor bei dieser Gruppe von Mikroorganismen ist.

Allgemein konnte beobachtet werden, dass die getesteten Stämme immer sensitiver gegenüber Clorobiocin reagierten als gegen Novobiocin.

**Tabelle III.14:** Effekte verschiedener Aminocoumarine auf das Wachstum ausgewählter Mikroorganismen.

Bezeichnung	Wachstumshemmung (MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]) von:																
	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Streptococcus pneumoniae</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	ATCC29212	ATCC19434	80CR5	ATCC 29213	ATCC 43300	ATCC 49619	SL336-T	TUPELO	ATCC 25922	UB1005	DC2	ATCC27736	ATCC 27853	K799/WT	K799/61		
<b>Clorobiocin</b>	4	>32	4	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	0,25	1	1	32	>32	2	16	8	16	$\leq 0,06$		
<b>Novobiocin</b>	>32	>32	>32	0,25	0,25	1	2	2	>32	>32	4	>32	>32	>32	1		
<b>Novclobiocin 201</b>	16	>32	32	0,125	0,25	4	8	8	>32	>32	16	>32	>32	>32	1		
<b>Novclobiocin 203</b>	16	>32	>32	4	4	8	16	16	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8		
<b>Novclobiocin 217</b>	16	>32	32	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	2	2	4	>32	>32	8	>32	>32	>32	0,5		
<b>Novclobiocin 225</b>	8	>32	16	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	1	2	2	>32	>32	8	>32	>32	>32	0,5		
<b>Novclobiocin 241*</b>	32	>32	>32	2	4	4	8	16	>32	>32	16	>32	>32	>32	1		
<b>Novclobiocin 311*</b>	16	>32	32	1	1	2	4	8	>32	>32	32	>32	>32	>32	1		
<b>Novclobiocin 314</b>	8	>32	>32	$\leq 0,06$	0,25	1	2	4	>32	>32	16	>32	>32	>32	2		
<b>Novclobiocin 371</b>	32	>32	32	0,125	0,25	2	4	16	>32	>32	8	>32	>32	>32	2		
<b>Novclobiocin 386</b>	8	>32	>32	1	1	4	4	4	>32	>32	$\geq 32$	>32	>32	>32	4		
<b>Novclobiocin 701</b>	16	>32	>32	0,25	1	8	16	16	>32	>32	32	>32	>32	>32	4		
<b>Novclobiocin 731</b>	32	>32	$\geq 32$	0,5	0,5	8	8	16	>32	>32	16	>32	>32	>32	2		

\* Derivate wurden schon von Galm *et al.* (2004b) bzw. Freitag *et al.* (2004) untersucht.

Mikrobiologischer Empfindlichkeits-Breakpoint  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  (G.E. Zurenko, persönliche Mitteilung), darüber gelten die Stämme als resistent.

### 2.5.7 Toxizität der neuen Derivate gegenüber eukaryontischen Zellen

Für 26 Derivate, inklusive Clorobiocin und Novobiocin, wurden toxikologische Untersuchungen durchgeführt, um das Profil der Substanzen abzurufen. Dazu wurden Untersuchungen mit Namalwa Zellen durchgeführt. Diese Zellen stammen aus einem menschlichen Burkitt-Lymphom, das durch das Epstein-Barr-Virus ausgelöst wurde. Nach Anzucht und Inkubation in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der Aminocoumarine wurde der EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt (Tab. III.15 und Abb. III.21).

**Tabelle III.15:** EC<sub>50</sub>-Werte aller getesteter Derivate.

<b>Bezeichnung</b>	<b>EC<sub>50</sub> [µM]</b>
Clorobiocin	14
Novobiocin	>50
Novclobiocin 201	45
Novclobiocin 202	38
Novclobiocin 203	45
Novclobiocin 217	27
Novclobiocin 218	27
Novclobiocin 225	26
Novclobiocin 226	23
Novclobiocin 241	20
Novclobiocin 311	0,5
Novclobiocin 312	16
Novclobiocin 313	8
Novclobiocin 314	37
Novclobiocin 315	46
Novclobiocin 371	19
Novclobiocin 386	26
Novclobiocin 387	25
Novclobiocin 601	55
Novclobiocin 602	48
Novclobiocin 603	1
Novclobiocin 606	23
Novclobiocin 701	61
Novclobiocin 702	23
Novclobiocin 703	2
Novclobiocin 731	46
Novclobiocin 741	46
Novclobiocin 742	17

Novobiocin war in diesen Untersuchungen die untoxischste Substanz (EC<sub>50</sub> >50 µM). Clorobiocin zeigte im Vergleich dazu eine relativ hohe Toxizität gegen diese Zellen (EC<sub>50</sub> 14 µM).

Für die getesteten Derivate mit einer 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe an Position 3'' bzw. an Position 2'' des Desoxyzuckers konnte interessanterweise kein Unterschied in der Toxizität festgestellt werden. Allerdings scheint ein ausschlaggebendes Strukturmerkmal für die Toxizität das verwendete Ring A-Analogon zu sein. Polare Gruppen in der Seitenkette der 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit führten zu Produkten mit einer Toxizität im Bereich von Clorobiocin (Novclobiocin 241, 311, 371, 386). Auch Novclobiocin 217 und 225, die beide Alkyl-Seitenketten am Ring A-Analogon besitzen, zeigten EC<sub>50</sub>-Werte in diesem Bereich.

Interessanterweise zeigten Derivate mit Benzoesäure oder Zimtsäure als Ring A-Analogon (z.B. Novclobiocin 601, 602 und 701), sowie Derivate mit 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzoesäure als Ring A-Analogon (Novlobiocin 201, 202 und 203) eine deutlich geringere Toxizität gegen diese Zellen. Auch Derivate, die als Ring A-Analogon Zimtsäure-Derivate tragen (Novclobiocin 731, 741 und 742), zeigten eine geringe Toxizität. Innerhalb dieser Zimtsäure-Derivate konnte man jedoch wieder die Tendenz erkennen, dass Derivate, die eine Seitenkette an der Zimtsäure tragen, toxischer waren als Derivate mit Zimtsäure ohne Seitenkette.

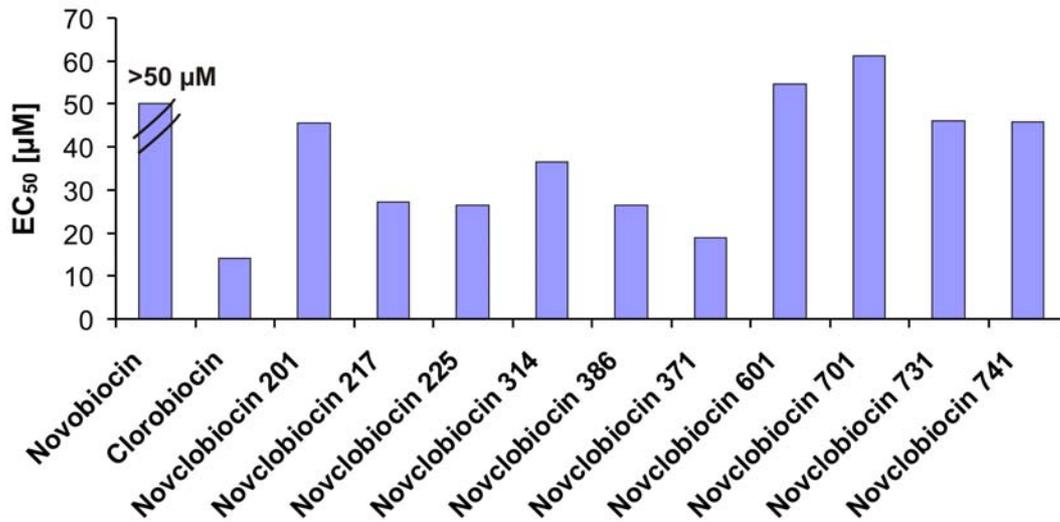


Abbildung III.21: Vergleichsdiagramm von EC<sub>50</sub>-Werten ausgewählter Derivate.

## IV Diskussion

### 1. Untersuchungen zur Methyltransferase CloN6

Gene, die hohe Ähnlichkeit zur Gruppe der sieben Gene *cloN1-7* im Clorobiocincluster aufweisen, wurden nicht nur im Coumermycin-Cluster (Wang *et al.*, 2000) sondern auch im kürzlich publizierten Phenalinolacton-Cluster gefunden (Dürr *et al.*, 2006). Beide Substanzen beinhalten wie Clorobiocin eine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe. Für die Gene *cloN1-7* des Clorobiocinclusters bzw. die Homologen *couN1-7* des Coumermycin-Clusters konnte gezeigt werden, dass sie für die Biosynthese und Übertragung der 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure benötigt werden (Freitag *et al.*, 2005c; Garneau *et al.*, 2005; Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a; Westrich *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003).

Inaktivierungsexperimente im Clorobiocincluster zeigten, dass das Gen *cloN6* in der Biosynthese von Clorobiocin für die Methylierung der Pyrrol-2-carbonsäure an Position 5 verantwortlich ist (Westrich *et al.*, 2003). Bisher wurde vermutet, dass CloN6 diese Methylierung durchführt nachdem an den Desoxyzucker die Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe im letzten Schritt der Biosynthese von Clorobiocin übertragen wurde (Westrich *et al.*, 2003). Allerdings konnte durch diese Inaktivierung nicht geklärt werden, ob diese Methylierung tatsächlich zu diesem Zeitpunkt stattfindet. Um diese Unklarheit zu beseitigen, sollte *cloN6* exprimiert und biochemisch untersucht werden.

*cloN6* wurde in acht verschiedene Expressionsvektoren kloniert und Expressionsversuche in *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Streptomyces lividans* T7 durchgeführt. Es wurde schon in früheren Arbeiten darüber berichtet, dass die Überexpression eines Proteins aus Streptomyceten mit Eisen-Schwefel-Cluster, wie es CloN6 ist, schwierig sein kann und oft einen Wechsel des Expressionsvektors oder eine Optimierung von Expressionsbedingungen erfordert (Heinzelmann *et al.*, 2001). Bei fünf Konstrukten wurde eine Überexpression eines zu kleinen Proteins beobachtet, das im Falle des Konstruktes pCA7 (*cloN6* in pQE31) mittels massenspektrometrischer Analyse als das degenerierte CloN6 Protein identifiziert wurde, bei dem bis zu 67 Aminosäuren N-terminal abgespalten wurden. Durch weitere Optimierung der Expression mit dem Konstrukt pCA7 und anschließender Reinigung konnte eine geringe Menge eines Proteins detektiert werden, das die erwartete Größe von CloN6 aufwies. Um wirklich sicher zu sein, dass es sich um das erwartete, vollständige Protein CloN6 handelt, müsste in einem weiteren Schritt eine massenspektrometrische Analyse erfolgen.

Diese großen Schwierigkeiten bei der Überexpression deuten darauf hin, dass es außer dem Eisen-Schwefel-Cluster noch ein weiteres, elementares Problem bei der Expression der Methyltransferase CloN6 geben muss, das bisher ungeklärt ist.

In der Zwischenzeit wurden Ergebnisse zur biochemischen Untersuchung der Acyltransferase CloN7 publiziert (Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a). CloN7 zeigte dabei keine klare Präferenz zum methylierten oder unmethylierten Substrat (Garneau-Tsodikova *et al.*, 2006a). Auch durch diese Untersuchungen konnte somit der Methylierungszeitpunkt nicht geklärt werden.

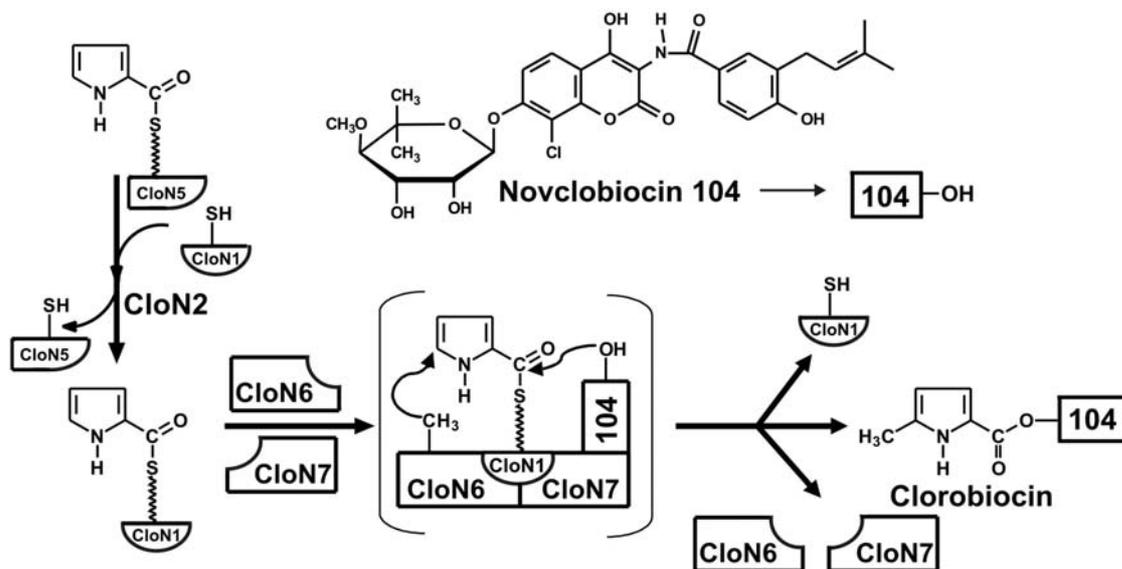
Ein weiterer Versuch zur Expression von CloN6 war die Klonierung eine (His)<sub>6</sub>-Tags N-terminal vor das *cloN6* Gen im Cosmid clo-BG1 mit anschließender heterologen Expression in *S. coelicolor* M512. Erstaunlicherweise resultierte dies in der

Inaktivierung von *cloN6*. Ebenfalls war eine starke Beeinträchtigung des von CloN7 katalysierten Acyltransfers zu beobachten. Dieses Phänomen wurde auch bei der Inaktivierung von *cloN6* von Westrich *et al.* (2003) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass CloN7 die Anwesenheit von CloN6 zur vollen Aktivitätsentfaltung benötigt.

Diese Beobachtung konnte durch Fütterungen mit Pyrrol-2-carboxyl-SNAC (Pyrrol-2-carboxyl-*N*-acetylcysteaminthioester) an die *cloN1*-, *cloN2*- bzw. *cloN7*-Defektmutante bestätigt werden, die in der Zwischenzeit durchgeführt wurden (Anderle *et al.*, 2007). Diese Fütterungen resultierten im Fall der *cloN2*- und *cloN1*-Defektmutante in der Bildung von Novclobiocin 109, das strukturell auf Clorobiocin beruht, jedoch durch die Abwesenheit der Methylgruppe an der Pyrrol-2-carbonsäure charakterisiert ist. Dies deutet stark darauf hin, dass die Methylierung durch CloN6 nicht nach dem Acyltransfer auf Novclobiocin 104 stattfindet (Abb. IV.1). Eine weitere Bestätigung dieser Theorie erfolgte bei diesen Untersuchungen durch den Nachweis von 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure, die nur im Extrakt von *S. coelicolor* (clo-BG1) nachgewiesen werden konnte (Anderle *et al.*, 2007).

Somit deutet alles darauf hin, dass die Methylierung durch CloN6 wahrscheinlich bei der Übertragung auf den Desoxyzucker stattfindet und damit ein Komplex der Enzyme CloN1/CloN6/CloN7 notwendig ist (Abb. IV.1).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden keine weiteren Versuche zur Überexpression und Identifizierung von CloN6 durchgeführt, da bei einer biochemischen Charakterisierung der Methylierungsreaktion sowohl die Proteine CloN6 und CloN7, als auch das Substrat, Pyrrol-2-carboxyl-*S*-CloN1, vorhanden sein müssen (Abb. IV.1).



**Abbildung IV.1:** Hypothetisches Schema zur Übertragung und Methylierung der Pyrrol-2-carbonsäure in der Biosynthese von Clorobiocin.

## 2. Herstellung neuer Aminocoumarine

### 2.1 Herstellung von Novobiocin-Analoga

#### 2.1.1 Herstellung neuer Novobiocin-Analoga durch eine biochemische Methode

Von Galm *et al.* (2004a) wurden unterschiedliche Clorobiocin-Analoga hergestellt. In weiteren Versuchen sollte nun eine Reihe von Novobiocin-Analoga hergestellt werden, die ähnlich wie die Clorobiocin-Analoga, unterschiedliche Ring A-Analoga aufweisen. Um diese Novobiocin-Analoga schnell und sauber herzustellen, wurde ein biochemischer Ansatz gewählt. Dieser Ansatz vermeidet eine zeitintensive Kultivierung, die Extraktion aus dem Medium und die aufwändige Reinigung, wie es bei der Herstellung neuer Derivate mittels Mutasyntese der Fall ist (Galm *et al.*, 2004a). Dabei sollten verschiedene Ring A-Analoga mit Novenamin unter Einsatz von verschiedenen Amidsynthetasen verknüpft werden und somit neue Novobiocin-Analoga hergestellt werden. Die Amidsynthetasen NovL und CloL verknüpfen die 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin Gruppe (Ring B) mit der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A), während CouL zwei 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin Gruppen mit der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure verknüpft (Galm *et al.*, 2004a; Schmutz *et al.*, 2003b; Steffensky *et al.*, 2000a). NovL, CloL und CouL weisen eine Homologie von 80-86% auf Aminosäureebene auf, dennoch sind sie in ihrer Substratspezifität sehr unterschiedlich (Galm *et al.*, 2004a). Dieser Unterschied in der Substratspezifität sollte zur Produktion neuer Novobiocin-Analoga genutzt werden.

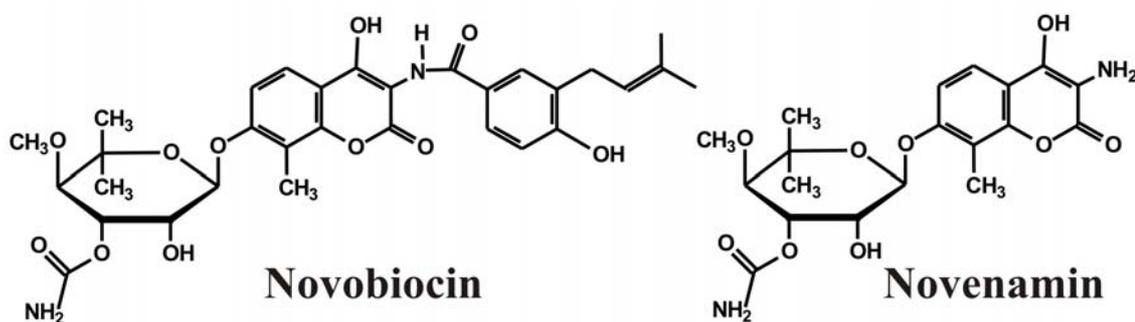


Abbildung IV.2: Strukturen von Novobiocin und Novenamin.

Um direkt das entsprechende Novobiocin-Analogon zu gewinnen, wurde Novenamin statt 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin (Ring B) als Substrat in der Reaktion eingesetzt (Abb. IV.2). Allerdings wurde in den Versuchen mit den verschiedenen Amidsynthetasen, dem natürlichen Substrat (Ring A) und Novenamin keine Novobiocin-Bildung beobachtet. Dies kann man dadurch erklären, dass das verwendete Novenamin durch den substituierten Desoxyzucker deutlich größer ist als das natürliche Substrat 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin. Auf Grund dieses Größenunterschieds zum natürlichen Substrat ist die Amidsynthetase nicht fähig, die Aminogruppe des Novenamins mit der Carboxylgruppe der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure zu verknüpfen.

### 2.1.2 Herstellung von neuen Novobiocin-Analoga durch Mutasythese

Da durch den biochemischen Ansatz keine neuen Novobiocin-Analoga produziert werden konnten, sollten durch Mutasythese Experimente in Anlehnung an die von Galm *et al.* (2004a) hergestellten Clorobiocin-Analoga neue Novobiocin-Derivate hergestellt werden. In der von Galm *et al.* (2004a) für die Herstellung von Clorobiocin-Analoga erfolgreich genutzten Mutante des Clorobiocin-Produzenten war das Gen *cloQ*, das für die Prenyltransferase codiert, durch Deletion inaktiviert worden.

In Anlehnung daran wurde im Novobiocin-Produzenten *Streptomyces spheroides* das Gen *novQ* inaktiviert. Wie erwartet produzierte diese Mutante anschließend kein Novobiocin mehr. Allerdings führte die durchgeführte Kontrollfütterung mit dem natürlichen Substrat, der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure, nicht zur Wiederherstellung der Produktion von Novobiocin, sondern zur Produktion des Aglykons, der Novobiocinsäure (Abb. IV.3).

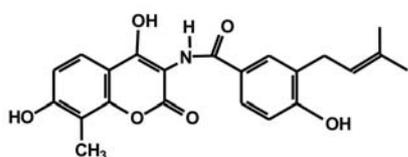


Abbildung IV.3: Struktur von Novobiocinsäure.

**Novobiocinsäure**

Ein Problem dieser Inaktivierung könnte ein polarer Effekt der verwendeten Apramycinkassette sein, der die Ablesung der nachfolgenden Gene der Zuckerbiosynthese behindern. Deshalb wurde *novQ* im Cosmid nov-BG1 inaktiviert, die verwendete Apramycinkassette wieder entfernt und heterolog in *Streptomyces coelicolor* M512 exprimiert. Produktionsuntersuchen von *Streptomyces coelicolor* M512 mit komplettem heterolog exprimiertem Novobiocin-Biosynthesegencluster zeigten ähnliche Mengen an produziertem Novobiocin wie im natürlichen Produzenten *Streptomyces spheroides* (Eustáquio *et al.*, 2005a). Jedoch führte auch hier die Fütterung von Ring A nicht zur Wiederherstellung der Produktion von Novobiocin, sondern zur Produktion von Novobiocinsäure.

Damit konnte ein polarer Effekt der Apramycinkassette als Problem ausgeschlossen werden. Eine genaue Analyse der betroffenen Bereiche in den Genclustern von Novobiocin und Clorobiocin zeigte zwei Auffälligkeiten. Im Gencluster von Clorobiocin befindet sich vor *cloQ*, das mit *cloR* überlappt, ein intergenetischer Bereich von 1000 bp und nach *cloR* von 829 bp. Im Gegensatz dazu befindet sich im Gencluster von Novobiocin nur ein intergenetischer Bereich von 29 bp vor *novQ*. Nach *novR* befindet sich kein intergenetischer Bereich. Die Gene *novQ* und *novR*, sowie *novR/novS* und *novV/novW* überlappen sich. Die Überlappung deutet auf ein „translational coupling“ hin, das durch die Entfernung des Startcodons von *novR* nicht mehr stattfinden kann. Oppenheim *et al.* berichtet über zwei verschiedene Modelle, die das durch die Inaktivierung von *novQ* entstandene Problem beim „translational coupling“ beschrieben (Oppenheim und Yanofsky, 1980). Beide setzten voraus, dass Gen 1, hier *novQ*, mit Gen 2, hier *novR*, überlappt und dass der Translationstartpunkt des zweiten Gens in Abwesenheit der mRNA des ersten Gens nur ein schwacher Bindungs- und Startpunkt für Ribosomen ist. Das erste Modell geht davon aus, dass durch das Fehlen der mRNA des ersten Gens die restliche mRNA der folgenden Gene in einer Konformation vorliegt, die eine effiziente Bindung des Ribosoms nicht erlaubt, da die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur verändert ist. Beim zweiten Modell wird das zweite Gen vom gleichen Ribosom bzw. einer Komponente des gleichen Ribosoms (z.B. 30S

Untereinheit) translatiert wie das erste Gen. Nur wenn mRNA von diesem Gen vorliegt, wird die mRNA des zweiten Gens und den folgenden Genen effizient translatiert.

Auch ein Problem während der Transkription könnte ein Grund für das Fehlen des Desoxyzuckers sein. Wenn innerhalb von *novQ* ein uns unbekannter Promotor liegt und dieser durch die Inaktivierung von *novQ* entfernt wird, würden die folgenden Gene der Zuckerbiosynthese nicht mehr transkribiert werden.

Sowohl Probleme während des „translational couplings“ als auch ein Problem während der Transkription würden den Ausfall der Gene der Zuckerbiosynthese erklären. Um diese Theorien zu prüfen, wurden zwei weitere Inaktivierungen von *novQ* durchgeführt. Dabei wurde *novQ* mittels eines Frameshifts inaktiviert, welche einen eventuell vorhandenen Promotor nicht beeinträchtigen sollte. Bei der zweiten Inaktivierung wurde *novQ* wieder entfernt, ähnlich wie es schon bei der vorangegangenen Inaktivierung gemacht wurde, jedoch wurden zwei Codons am Ende von *novQ* erhalten, um ein eventuell vorliegendes „translational coupling“ zu ermöglichen. Nach Kultivierung, Fütterung mit dem natürlichen Substrat und Analyse der Sekundärstoffe zeigte sich jedoch, dass beide Mutanten nicht fähig waren, Novobiocin zu produzieren. Bei beiden Fütterungen wurde wieder das Aglykon Novobiocinsäure gebildet. Es konnte somit keine Aussage getroffen werden, ob bei der Inaktivierung von *novQ* ein Problem der Transkription oder der Translation hervorgerufen wurde. Weitere Untersuchungen zur Bildung der RNA und der Proteine der Gene der Zuckerbiosynthese könnte hier nähere Informationen bringen.

Somit konnte trotz umfangreicher Experimente die Wiederherstellung der Novobiocinproduktion nach Zufütterung von Ring A nicht erreicht werden. Damit ist auch die Herstellung von neuen Novobiocin-Derivaten gescheitert.

## 2.2 Herstellung von Clorobiocin-Derivaten und Hybrid-Aminocoumarin-Antibiotika

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mutasynthese ein wichtiges Instrument zur Herstellung neuer Aminocoumarin-Antibiotika ist (Galm *et al.*, 2004a). Diese Methode war jedoch limitiert durch die Substratspezifität der Amidsynthetase CloL, welche die gefütterten Ring A-Analoga mit der Aminocoumarin-Gruppe verknüpft. Deshalb konnte nur eine begrenzte Auswahl an Ring A-Analoga erfolgreich für diese mutasynthetische Herstellung neuer Aminocoumarine benutzt werden.

Durch die Expression der Amidsynthetasen SimL und CouL, welche andere Substrate in ihrem natürlichen Biosyntheseweg nutzen, konnten eine Reihe von neuen Aminocoumarin-Antibiotika hergestellt werden, die nicht durch den bisher genutzten Stamm gewonnen werden konnten. Somit konnte die Limitierung durch die Nutzung der natürlichen Vielfalt der Biosynthesegene und Enzyme von unterschiedlichen Stämmen, die strukturell verwandte Antibiotika produzieren, aufgehoben werden.

In den früheren Fütterungsexperimente wurde eine Mutante des Clorobiocin-Produzenten *Streptomyces roseochromogenes* DS 12.976 verwendet (Galm *et al.*, 2004a). Zur Produktion der neuen Clorobiocin-Derivate wurde jedoch ein heterologer Produzentenstamm mittels stabiler Integration eines modifizierten Novobiocin- bzw. Clorobiocin-Clusters in das Genom von *Streptomyces coelicolor* M512 hergestellt. Die genetische Manipulation von Biosynthesegenclustern mittel  $\lambda$  RED-vermittelter Rekombination (Gust *et al.*, 2003) und der anschließenden heterologen Expression von diesen Clustern in z.B. dem vollsequenzierten Genom von *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) vergrößert die Möglichkeiten, Cluster und Stämme für

mutasynthetische Experimente zu konstruieren. Es ist spekulativ, ob durch Mutagenese oder direkte Evolution der Amidsynthetasen nochmals der Bereich der durch Mutasynthese hergestellten Aminocoumarin-Antibiotika erweitert werden kann.

Wie in den in Kapitel III.2.3 und III.2.4 beschrieben wurde, konnte die Struktur der substituierten Benzoesäure Gruppe durch das gefütterte Ring A-Analogon gewählt werden, außerdem wurde die Struktur der substituierten Aminocoumarin-Gruppe und des substituierten Desoxyzuckers durch die Wahl des passenden konstruierten Produzentenstamm bestimmt.

Zweifelsfrei ist es verlockend, die Anzahl der Strukturen der Antibiotika, die durch eine begrenzte Anzahl von mutasynthetischen Fütterungsexperimente bisher zugänglich sind, zu erhöhen. Eine Möglichkeit die Vielfalt an Produkten zu erhöhen, ist zuerst eine größere Charge eines gewählten substituierten Aminocoumarin, das mit einem extern zugefütterten Ring A-Analogon verknüpft wurde, herzustellen und dann weitere Aliquots dieser ersten Charge zu einer Reihe anderer gentechnisch veränderte Stämme zu füttern, die verschiedene substituierte Desoxyzucker an diese Gruppe anbringen. Durch die zweistufigen Fütterungen konnte bewiesen werden, dass eine solche Strategie tatsächlich erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Verwendung von zwei heterologen Expressionsstämmen mit passend veränderten Novobiocin- bzw. Clorobiocin-Cluster führte zu „hybrid“ Antibiotika, welche das Substitutionsmuster von Novobiocin in der Aminocoumarin-Gruppe und das Substitutionsmuster von Clorobiocin im Desoxyzucker aufwiesen, während die Struktur des Ring A-Analogons durch die Fütterung des entsprechenden Derivates gewählt werden konnte. Diese zweistufige Strategie konnte einfach mit der Expression einer anderen Amidsynthetase in der ersten Stufe kombiniert werden, wodurch wiederum der Bereich der zugänglichen Strukturen erweitert wurde. Da keine Reinigung zwischen der ersten und zweiten Stufe notwendig ist, ist diese Methode sehr bequem. Jedoch sind die Gesamtausbeuten dieser Methode geringer als die Ausbeuten der einstufigen Fütterungen. Nach der Fütterung von 10 mg eines Ring A-Analogons konnten mittels der einstufigen Methode etwa 4 mg eines Aminocoumarin-Antibiotikums gewonnen werden. Bei der zweistufigen Methode waren es nur 1,2 mg.

Durch die Expression einer anderen Amidsynthetase konnte die Limitierung durch die Substratspezifitäten von CloL oder NovL aufgehoben werden. Jedoch wurde eine weitere Limitierung innerhalb der zweistufigen Fütterungen beobachtet, welche durch die Substratspezifität der 8'-C-Methyltransferase NovO resultiert (Pacholec *et al.*, 2005c). Besonders wenn Ring A-Analoga mit polaren Seitenketten gefüttert wurden, war die Methylierung der produzierten Aminocoumarine ineffizient. Es bleibt abzuwarten, ob dieses Problem gelöst werden kann, z.B. durch die Expression einer anderen Methyltransferase, wie CouO aus der Coumermycinbiosynthese (Li *et al.*, 2002).

Wenn 8'-unsubstituierte Novobiocinsäure Analoga an den zweiten Stamm gefüttert wurden, welcher die aktive Halogenase Clo-hal der Clorobiocinbiosynthese enthielt, wurden an Position 8' halogenierte Produkte beobachtet. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese von Pacholec *et al.* (Pacholec *et al.*, 2005c), welche besagt, dass 8'-Desmethylnovobiocinsäure das natürliche Substrat von Clo-hal sein könnte, obwohl bisher eine biochemische Untersuchung von Clo-hal noch fehlt. 8' halogenierte Produkte werden nicht vom Stamm *S. coelicolor* (nov-CA7) gebildet, der für die erste Stufe der zweistufigen mutasynthetischen Experimenten benutzt wurde, noch produziert *S. coelicolor* (clo-CA5) nach Zufütterung von Ring A oder Ring A-Analoga halogenierte Produkte.

Diese Experimente zeigen, dass die Effizienz und Vielseitigkeit von Mutasynthese Experimenten durch die Nutzung von Ergebnissen aus dem Bereich der funktionellen

Genomanalyse, speziell im Bereich der Antibiotikabiosynthese, und durch die Herstellung von passend modifizierten bakteriellen Produzentenstämmen signifikant gesteigert werden kann

### 2.2.1 Neue „natürliche“ Derivate auf Basis von 4-Hydroxymzimtsäure

Bei der Herstellung von neuen Clorobiocin-Derivaten wurden, neben den erwarteten Produkten, weitere drei neue Aminocoumarinantibiotika beobachtet, die erstaunlicherweise auch ohne Zufütterung von Ring A-Analoga gebildet wurden. Nach Isolierung und anschließender Strukturaufklärung zeigte sich, dass es sich hierbei um Clorobiocin-Analoga handelte, die substituierte Coumarsäure Derivate anstatt der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure trugen, die in der Anwesenheit von aktivem CloQ gebildet wird. Diese drei neuen Aminocoumarin-Antibiotika wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Die neuen Derivate wurden in Extrakten der *cloQ*-Defektmutante *S. coelicolor* (clo-CA5) mit dem Plasmid pMS91 bzw. mit dem Plasmid pSH2, das das Amidsynthetase-Gen *couL* bzw. *simL* enthält, beobachtet, jedoch nicht im Extrakt der bisher verwendeten *cloQ*-Defektmutante *S. roseochromogenes* QDCO661. Das ist in Übereinstimmung mit den Substratspezifitäten von CloL, CouL und SimL, die zeigten, dass substituierte p-Coumarsäuren von CouL und SimL akzeptiert werden können, jedoch nicht von CloL. Die Tatsache, dass solche substituierte p-Coumarsäure-Derivate von *S. coelicolor* (clo-CA5) gebildet wurde, war eine Überraschung, da die Biosynthese von Clorobiocin detailliert untersucht wurde (Li und Heide, 2006), und sie keine p-Coumarsäure-Derivate als Vorstufen aufweist. Auch wurden solche Derivate noch nicht als Produkte von *Streptomyces coelicolor* beschrieben.

Coumarsäure-Derivate gehören zu den am meisten vorkommenden Biomolekülen der Erde, denn sie bilden das Lignin der Pflanzen. In Actinomyceten jedoch sind diese Derivate sehr selten. Vor kurzem wurde berichtet, dass auch einige Actinomyceten Phenylalanin-Ammonium-Lyasen (PAL) und Tyrosin-Ammonium-Lyasen (TAL) für die Biosynthese von Zimtsäure- und Coumarsäure-Derivate beinhalten (Berner *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2002). Jedoch wurden bisher weder im Biosynthesegencluster von Clorobiocin noch im komplett sequenzierten Genom von *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) PAL oder TAL Gene beschrieben. Durch eine Blast-Analyse konnte jedoch ein Gen, SCO4932, im Genom von *S. coelicolor* gefunden werden, das 32% Identität zur Tyrosin-Ammonium-Lyase Sam8 von *Saccharothrix espanaensis* (Berner *et al.*, 2006) aufweist. SCO4932 ist im Moment annotiert als Histidin-ammonium-Lyase. Es besteht die Möglichkeit, dass SCO4932 in der Bildung der beobachteten Coumarsäure-Derivaten beteiligt ist.

Interessanterweise wurden auch halogenierte Derivate detektiert, die durch Halogenierung an Position 3 von p-Coumarsäure bzw. Tyrosin resultieren. Die Halogenase Clo-hal des Clorobiocinclusters kann in diese Halogenierung involviert sein. Bisher ist unklar, welches Substrat Clo-hal bevorzugt. Jedoch ist auch im Genom von *S. coelicolor* die Halogenase SCO1275 enthalten, die hohe Ähnlichkeit mit FAD-abhängigen Halogenasen zeigt (van Pée, 2001).

Die gebildeten Produkte wurden in geringen Mengen auch im Extrakt von ungefütterten Mutanten beobachtet. Jedoch sind die Ausbeuten höher, wenn Ring A-Analoga zugefüttert wurden, was auf eine Induktion von Enzymen der Clorobiocinbiosynthese hindeutet.

Die Identifizierung von drei neuen Aminocoumarinantibiotika zeigt, dass bei Mutasyntese Experimenten auch die Bildung von nicht erwarteten Derivaten auftreten kann. Deshalb sollten Produktionskontrollen von solchen Mutasyntese Experimenten nicht nur auf Basis von Bioassays durchgeführt werden, sondern zusätzlich eine chemische Analyse der Produkte erfolgen.

### 3. Bioaktivitäten der neuen Derivate

27 neue und 4 schon bekannte Aminocoumarin-Antibiotika, die durch Mutasyntese Experimente erhalten wurden, wurden auf ihre Bioaktivitäten untersucht. Dabei wurde die DNA-gyraseinhibitorische Aktivität und ATPase Hemmung bestimmt und diese Werte mit errechneten Werten verglichen wurden. Des Weiteren wurden von den aktivsten Substanzen MIC-Werte gegen eine Auswahl von klinisch relevanten bakteriellen Teststämmen bestimmt. Um ein vollständiges Profil der Substanzen zu erhalten, wurden auch die toxischen Eigenschaften gegen eukaryontische Zellen untersucht.

Als erstes wurde jedoch der Wirkungsmechanismus der neuen Substanzen mittels Reporter-Gene-Assay bestimmt. Reporter-Gene-Fusionen wurden schon in verschiedenen Bereichen erfolgreich benutzt, um Expressionen von Genen in Mikroorganismen zu untersuchen (Silhavy, 2000). Als Reportergene für die Untersuchung in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen werden vor allem die Luciferasegene benutzt, da dies ein einfacher Ansatz für die Detektion darstellt (Hakkila *et al.*, 2002). Kürzlich wurden die Gene *luxCDABE* von *Photobacterium luminescens* als Reportergene für *E. coli* beschrieben (Van Dyk *et al.*, 2001), welche es ermöglichen, die Lichtemission ohne Zellyse und Substratzugabe zu messen (Meighen, 1991). Zur Bestimmung der Wirkmechanismen der neuen Derivate wurde der *sulA*- und der *gyrA*-Promotor benutzt. Es konnte beobachtet werden, dass diese Promotoren durch alle aktiven neuen Substanzen als auch von Novobiocin und Clorobiocin induziert wurden. Interessanterweise wurde auch der *gyrA*-Promotor durch die Anwesenheit eines aktiven Aminocoumarin-Antibiotikums induziert, obwohl nachgewiesen wurde, dass die Aminocoumarine an der B-Untereinheit der bakteriellen Gyrase angreifen (Maxwell, 1999), was auf einen komplexeren Wirkmechanismus hindeutet.

In einem weiteren Schritt in Richtung Charakterisierung der Derivate wurden die inhibitorischen Eigenschaften im Bezug auf die Hemmung der ATPase-Aktivität bzw. der Hemmung der bakteriellen Gyrase untersucht.

Der ATPase-Assay beruht auf einer bereits publizierten Methode (Rowlands *et al.*, 2004). Allerdings wurde anstatt dem beschriebenen Hsp90 Protein GyrB benutzt und auch der Reaktionspuffer dementsprechend angeglichen. Die Hemmung der bakteriellen Gyrase wurde mittels Triplex-Assay bestimmt (Maxwell *et al.*, 2006).

Bei beiden Testverfahren war Clorobiocin deutlich aktiver als Novobiocin. In Übereinstimmung mit Hooper *et al.* (1982) und Galm *et al.* (2004b) zeigten Derivate ohne 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe keine nennenswerte Hemmung der bakteriellen Gyrase. Interessanterweise zeigten Derivate mit Benzoesäure bzw. Zimtsäure auch hohe Aktivitäten im Bereich von Clorobiocin, was deutlich macht, dass die Struktur von Ring A deutlich verändert werden kann, ohne größere Verluste im Bereich der gyrasehemmenden Aktivität in Kauf nehmen zu müssen.

In einem weiteren Ansatz wurden die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte aus dem ATPase- bzw. Triplex-Assay mit errechneten Bindungsenergien zur *E. coli* Gyrase B-Untereinheit verglichen. Durch ein zuverlässiges Modell könnte schon vor der Synthese bzw. vor dem Mutasyntese Experiment eine Voraussage über die Aktivität des Produktes gegeben werden. Unglücklicherweise zeigte der Vergleich der experimentell erhaltenen Werte mit den errechneten Werten nur eine geringe Korrelation. Ein Problem stellte die geringe Differenz der experimentell bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte dar. Solche kleinen Differenzen sind typischerweise sehr schwer mit computergestützten Methoden zu lösen.

Ein weiterer Schritt zur Vervollständigung der Profile der identifizierten Derivate war die Bestimmung der MIC-Werte. Derivate, die nur minimale strukturelle Veränderungen zum natürlichen Ring A aufwiesen, zeigten die höchsten Aktivitäten gegen Staphylokokken. Interessanterweise zeigten die Produkte Novclobiocin 217 und 225, die an Position 8' des Aminocoumarin-Rings eine Methylgruppe tragen, die gleichen antibakteriellen Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 wie die von Galm *et al.* hergestellten, fast identischen Derivate Novclobiocin 211 und 221, die an dieser Position ein Chloratom tragen (Galm *et al.*, 2004b). Diese Position scheint also nicht ausschlaggebend für antibakterielle Aktivität zu sein.

Es zeigte sich, dass keines der getesteten Derivate eine ausreichende Aktivität gegen Gram-negative Bakterien besitzt. Die Ursache dafür liegt wohl in der Aufnahme der Derivate in die bakterielle Zelle (el Falaha *et al.*, 1983). Die Ausnahme bilden die Stämme *E. coli* DC2, der sensitiv gegen Clorobiocin und Novobiocin sowie, in geringerem Umfang, auch gegen Novclobiocin 217, 225 und 371 reagierte, und *P. aeruginosa* K799/61, der sensitiv gegen Clorobiocin, Novobiocin, Novclobiocin 217 und 225 reagierte. Diese Sensitivität resultiert bei diesen Stämmen aus einer hyperpermeablen Membran (Angus *et al.*, 1987; Rocque *et al.*, 1988). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Galm *et al.* (2004a).

Interessanterweise zeigte Novclobiocin 701, das als Ring A-Analog Zimtsäure trägt und sowohl im ATPase- als auch im Triplex-Assay eine gute gyrasehemmende Aktivität zeigte, bei der Bestimmung der MIC-Werte keine besondere Aktivität. Dies deutet auf ein Problem bei der Aufnahme des Derivats hin.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung von neuen Substanzen zur Anwendung am Menschen ist ihre Toxizität gegen eukaryontische Zellen. Einerseits sollten neue Aminocoumarine, die als Antibiotika eingesetzt werden sollen, eine geringe Toxizität aufweisen. Andererseits wird in neuerer Zeit immer mehr der Einsatz der Aminocoumarine als Zytostatika untersucht, was eine höhere Toxizität der Derivate gegen eukaryontische Zellen erfordert. Aufgrund dieser gespaltenen Sichtweise spielt die Toxizität gegen eukaryontische Zellen eine zentrale Rolle bei der Charakterisierung von neuen Aminocoumarinen. Denn auch Aminocoumarine mit schwacher Hemmung der bakteriellen Gyrase und schwacher antibakterieller Aktivität könnten als Zytostatikum interessant sein.

Novobiocin war bei diesen Untersuchungen das untoxischste Derivat. Clorobiocin war im Vergleich dazu mindestens 4-mal toxischer. Dies könnte ein Grund sein, dass Novobiocin aber nicht Clorobiocin als Antibiotikum eine Zulassung besitzt, obwohl Clorobiocin eine deutlich bessere antibakterielle Aktivität besitzt. Für neue Derivate, die ein Zimtsäure-Derivat bzw. Benzoessäure als Ring A-Analogon aufwiesen, wurde im Allgemeinen eine niedrigere Toxizität beobachtet als für Derivate mit Alkyl-Seitenkette am Ring A Analogon, welche EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von Clorobiocin aufwiesen. Die

Ergebnisse der neuen Aminocoumarine zeigen, dass das Ring A-Analogon einen großen Effekt auf die Toxizität gegen eukaryontische Zellen ausübt.

Durch die umfassende Testung der Derivate konnte gezeigt werden, dass der Ring A eine wichtige Rolle im Bezug auf die Gyrasehemmung, antibakterielle Aktivität und der Toxizität gegen eukaryontische Zellen spielt. Des Weiteren wurde demonstriert, wie wichtig es ist, nicht nur eine Eigenschaft eines neuen Derivates zu testen, sondern dass es notwendig ist, Profile anzufertigen, die ein besseres Verständnis der Eigenschaften eines neuen Derivates ermöglichen. Nur durch solche Profile wird es möglich sein, neue Derivate für eine Weiterentwicklung auszuwählen, um eine Anwendung am Menschen zu ermöglichen.

## V Zusammenfassung

Die Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A<sub>1</sub> sind potente Hemmer der bakteriellen Gyrase. Bisher blieb allerdings die klinische Anwendung auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit, ihrer geringen Aktivität gegen Gram-negative Bakterien sowie ihrer relativ hohen Toxizität gegenüber eukaryontischen Zellen eingeschränkt. Auch ihr potentieller Einsatz als Zytostatika wird diskutiert und untersucht. Um die bisherigen Einschränkungen der Anwendung als Antibiotikum zu überwinden und die Anwendung als Zytostatika zu untersuchen, ist es notwendig, neue, strukturell modifizierte Aminocoumarine herzustellen und deren Eigenschaften zu untersuchen.

Clorobiocin trägt am Desoxyzucker eine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe, die essentiell für die Hemmung der bakteriellen Gyrase ist. Die Biosynthese dieser wichtigen Einheit des Moleküls wurde in früheren Arbeiten durch Inaktivierungen und biochemischen Untersuchungen der Gene *cloN1-N7* (bzw. *couN1-N7*) aufgeklärt. Das Gen *cloN6* codiert für die Methyltransferase, welche die Methylgruppe auf die Position 5 der Pyrrol-2-carbonsäure überträgt. Seine Sequenz wies unter anderem ein putatives Eisen-Schwefel-Cluster und eine putative Cobalamin-Bindungstelle auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die Methyltransferase CloN6 biochemisch zu untersuchen. Dazu wurde das Gen *cloN6* in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und es wurden Expressionsversuche durchgeführt. Bei fünf dieser Expressionskonstrukte konnte nach Expression eine überexprimierte Proteinbande beobachtet werden, die allerdings eine geringere als die erwartete Größe aufwies. Durch tryptischen Verdau und LC-MS-Analyse wurde das exprimierte Protein als das gesuchte CloN6 Protein identifiziert, dem allerdings bis zu 67 Aminosäuren N-terminal fehlten. Auch durch das Einbringen eines N-terminalen (His)<sub>6</sub>-Tags vor das Gen *cloN6* konnte das vollständige Protein nicht gewonnen werden.

Da nach neueren Erkenntnissen für die Methylierung der Pyrrol-2-carbonsäure-Gruppe ein Proteinkomplex der Proteine CloN1, CloN6 und CloN7 notwendig ist und das Substrat der Reaktion, Pyrrolyl-2-carboxyl-S-CloN1, nicht zu Verfügung steht, wurde das Projekt an dieser Stelle beendet.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung neuer Aminocoumarine. Die Aminocoumarine Novobiocin und Clorobiocin enthalten eine prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A), die durch die Amidsynthetasen NovL bzw. CloL mit dem 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin verknüpft werden. Diese Amidsynthetasen sowie die Amidsynthetase CouL aus dem Coumermycin-Cluster und SimL aus dem Simocyclinon-Cluster wurden schon in früheren Arbeiten überexprimiert und charakterisiert. Auf Grund dieser Untersuchungen sollten nun neue Novobiocin- und Clorobiocin-Derivate hergestellt werden, die statt der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) ein Analogon dieser Einheit tragen. Außerdem sollten Hybrid-Aminocoumarine hergestellt werden, die Strukturmerkmale von Clorobiocin und Novobiocin aufweisen und ebenfalls Analoga der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure tragen.

Bei der Herstellung von Novobiocin-Analoga wurde zunächst eine enzymatische Herstellung angestrebt. Dazu wurde Novenamin synthetisiert, das aus dem substituierten Desoxyzucker und dem 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Ring besteht. Um die Akzeptanz des Novenamins in Amidsynthetase-Assays zu testen, wurde es

zusammen mit der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (=Ring A) in Amidsynthetase-Assays eingesetzt. Jedoch konnte bei keiner der eingesetzten Amidsynthetasen eine Produktbildung beobachtet werden. Novenamin wurde im Assay nicht als Substrat akzeptiert.

Um durch Mutasyntese neue Novobiocin-Derivate herzustellen, wurden auch verschiedene *novQ*-Defektmutanten hergestellt, die keine prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure mehr herstellen konnten. *novQ* wurde dabei sowohl in *Streptomyces spheroides* als auch in einem Cosmid, das das gesamte Biosynthesegencluster von Novobiocin enthielt, auf verschiedene Weisen inaktiviert. Anschließend wurden die modifizierten Cosmide in *Streptomyces coelicolor* M512 heterolog exprimiert. Jedoch trat bei allen diesen Inaktivierungen eine Beeinträchtigung der Zuckerbiosynthese auf, wodurch nach Zufütterung von Ring A nur Produkte ohne Desoxyzucker resultierten. Somit wurden durch diese Methode keinen neuen Novobiocin-Derivate gewonnen.

Erfolgreiche Mutasyntese-Versuche gelangen schließlich mit neuartigen, genetisch modifizierten Stämmen mit *cloQ*-defektem Clorobiocincluster.

Zur Herstellung neuer Clorobiocin-Derivate wurde bisher eine Mutante von *Streptomyces roseochromogenes* benutzt, die die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure (= Ring A) nicht synthetisieren kann. Durch Fütterung von Ring A-Analoga zu dieser Mutante konnten von Galm *et al.* neue Clorobiocin-Derivate gewonnen werden (Galm *et al.*, 2004a). Diese Methode war allerdings limitiert durch die Substratspezifität der Amidsynthetase CloL. Durch das Herstellen eines heterologen Clorobiocin-Produzenten, in dem die Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure blockiert war und zusätzlich das Gen für die Amidsynthetase *cloL* inaktiviert wurde, war es möglich die fremde Amidsynthetase *couL* aus dem Coumerymycin-Cluster bzw. *simL* aus dem Simocyclinon-Cluster einzubringen. Anschließend wurden 8 Ring A-Analoga gefüttert, die nicht von der natürlichen Amidsynthetase CloL akzeptiert wurden. Durch diese Methode war es möglich, 11 neue Clorobiocin-Derivate präparativ zu isolieren, die mittels <sup>1</sup>H NMR und ESI-MS identifiziert wurden. Des Weiteren wurden drei Substanzen präparativ isoliert, die nicht durch die Zufütterung entstanden waren. Diese Derivate wurden als Clorobiocin-Derivate identifiziert, die statt der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure eine Ferulasäure im Fall von Ferulobiocin bzw. eine 3-Chloro-4-hydroxyzimtsäure bei 3-Chlorocoumarobiocin und 8'-Dechloro-3-chlorocoumarobiocin trugen.

Um Hybrid-Aminocoumarine herzustellen, wurde eine weitere, neue Methode entwickelt. Hybrid-Aminocoumarine beinhalten strukturelle Merkmale des Novobiocins und Clorobiocins. Diese Derivate sollten ebenfalls einen modifizierten Ring A aufweisen. Dazu wurde eine Mutante des Novobiocin-Produzenten, die nur die 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin-Gruppe produzierte, mit verschiedenen Ring A-Analoga gefüttert, von denen bekannt war, dass sie von NovL akzeptiert werden. Die resultierenden Aglyka wurden anschließend an eine Mutante des Clorobiocin-Produzenten gefüttert, die ebenfalls inaktiv in der Biosynthese der prenylierten 4-Hydroxybenzoesäure (Ring A) sowie im Amidsynthetase-Gen *cloL* war und die die Aglyka mit dem Desoxyzucker verknüpfte.

Diese Methode wurde anschließend durch das Einbringen der Amidsynthetase-Gene *couL* bzw. *simL* in die Novobiocin-Mutante erweitert. Dadurch war es möglich, zusätzlich zu den von NovL akzeptierten Ring A-Analoga, Ring A-Analoga zu füttern, die von CouL oder SimL akzeptiert werden. Auch diese resultierenden Aglyka wurden in einem zweiten Schritt an die Mutante des Clorobiocin-Produzenten gefüttert.

Die neu entstanden Hybrid-Aminocoumarine, die am Aminocoumarin-Ring eine Methylgruppe des Novobiocins und am Desoxyzucker die 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe des Clorobiocins aufwiesen, wurden präparativ isoliert und mittels  $^1\text{H}$  NMR und ESI-MS identifiziert. Durch die Fütterung von 11 Ring A-Analoga wurden 19 neue Aminocoumarine gewonnen.

Die neuen Derivate wurden auf ihre gyrasehemmende Aktivität, ihre antimikrobielle Aktivität gegenüber verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen und auf ihre Toxizität gegen eukaryontische Zellen untersucht. Außerdem wurde der Wirkungsmechanismus analysiert. Dieser wurde durch Reporter-Gene-Assays untersucht. Alle getesteten Derivate wiesen dabei, wie erwartet, den gleichen Effekt auf die Lichtemission und das Zellwachstum auf. Nur Derivate, die keine 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure-Gruppe am Desoxyzucker trugen, zeigten keinen Einfluss auf die Lichtemission und das Wachstum der Bakterien.

Die gyrasehemmende Aktivität wurde sowohl mittels ATPase-Assay als auch mittels Triplex-Assay untersucht. Interessanterweise zeigten erste Untersuchungen, dass auch Derivate, die keine Seitenkette am Ring A-Analogen aufweisen, eine gute Hemmung der bakteriellen Gyrase verursachen. Dies demonstriert, dass das verwendete Ring A-Analogen sehr variable gewählt werden kann ohne das große Verluste in der Gyrasehemmung zu befürchten sind.

Im Gegensatz dazu war bei der Bestimmung der minimal inhibitorischen Konzentration (MIC) der Derivate, die keine Seitenkette am Ring A-Analog aufwiesen, keine besonders hohe Aktivität gegen einer der getesteten Stämme zu beobachten. Dagegen zeigten Derivate, die an der 4-Hydroxybenzoesäure eine Alkylgruppe tragen und damit der natürlichen Struktur des genuinen Ring A sehr ähnlich sind, Aktivitäten im Bereich zwischen Novobiocin und Clorobiocin.

In einem weiteren Schritt wurde die Toxizität der Derivate gegen eukaryontische Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass Novobiocin von allen getesteten Derivaten, die untoxischste Substanz war. Clorobiocin war dagegen deutlich toxischer. Bei den neuen Derivaten zeigten Derivate, die keine Seitenkette am Ring A aufwiesen, und Derivate, die Zimtsäure-Derivate als Ring A trugen, eine geringe Toxizität.

Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist Derivate auf verschiedene Weisen zu testen. Aminocoumarine mit geringer Toxizität und einer guten Gyrasehemmung ermöglichen eine Anwendung als Antibiotika. Dagegen könnten Aminocoumarine mit hoher Toxizität und geringer Gyrasehemmung potentielle Zytostatika darstellen.

## VI Literaturverzeichnis

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

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

**Anderle, C., Alt, S., Gulder, T., Bringmann, G., Kammerer, B., Gust, B. und Heide, L.** (2007) Biosynthesis of clorobiocin: investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety. *Arch. Microbiol.*, **187**, 227-237.

**Angus, B.L., Fyfe, J.A. und Hancock, R.E.** (1987) Mapping and characterization of two mutations to antibiotic supersusceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2905-2914.

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1996) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc, New York.

**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., Rabbinowitsch, 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. und Hopwood, D.A.** (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**, 141-147.

**Berger, J. und Batcho, A.D.** (1978) Coumarin-glycoside antibiotics. In Weinstein, M.J. and Wagman, G.H. (Eds.), Antibiotics. Isolation, Separation and Purification. Amsterdam, Oxford, New York, pp. 101-158.

**Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R. und Bechthold, A.** (2006) Genes and enzymes involved in caffeic acid biosynthesis in the actinomycete *Saccharothrix espanaensis*. *J. Bacteriol.*, **188**, 2666-2673.

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

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

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

- Bunton, C.A., Kenner, G.W., Robinson, M.J.T. und Webster, B.R.** (1963) Experiments related to the biosynthesis of novobiocin and other coumarins. *Tetrahedron*, **19**, 1001-1010.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. und Khosla, C.** (1998) Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, **282**, 63-68.
- Chater, K.** (1998) Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology*, **144**, 1465-1478.
- Chater, K.F.** (2006) Review. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **361**, 761-768.
- Chen, H. und Walsh, C.T.** (2001) Coumarin formation in novobiocin biosynthesis:  $\beta$ -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem. Biol.*, **8**, 301-312.
- Datsenko, K.A. und Wanner, B.L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6640-6645.
- Delazar, A., Shoeb, M., Kumarasamy, Y., Byres, M., Nahar, L., Modarresi, M. und Sarker, S.D.** (2004) Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. *DARU*, **12**, 49-53.
- Dessoy, M.A.** (2003) Synthesis and enzymatic coupling of prenyldiphosphates and benzoates. *PhD Thesis, Univ. Halle (Saale), Germany*.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W. und Raynal, M.-C.** (2000) Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 477-485.
- Dürr, C., Schnell, H.J., Luzhetskyy, A., Murillo, R., Weber, M., Welzel, K., Vente, A. und Bechthold, A.** (2006) Biosynthesis of the terpene phenalinolactone in *Streptomyces* sp. Tü6071: analysis of the gene cluster and generation of derivatives. *Chem. Biol.*, **13**, 365-377.
- Eady, E.A. und Cove, J.H.** (2003) Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*--an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**, 103-124.
- Eder, J.P., Wheeler, C.A., Teicher, B.A. und Schnipper, L.E.** (1991) A phase I clinical trial of novobiocin, a modulator of alkylating agent cytotoxicity. *Cancer Res.*, **51**, 510-513.
- Ee, G.C.L., Lim, C.K., Taufiq-Yap, Y.H. und Go, R.** (2005) Ferulic acid ester from *Jatropha podagrica* (Euphorbiaceae). *Malaysian Journal of Chemistry*, **7**, 45-48.
- el Falaha, B.M., Russell, A.D. und Furr, J.R.** (1983) Sensitivities of wild-type and envelope-defective strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Microbios*, **38**, 99-105.

- Ellis, G.K., Crowley, J., Livingston, R.B., Goodwin, J.W., Hutchins, L. und Allen, A.** (1991) Cisplatin and novobiocin in the treatment of non-small cell lung cancer. A Southwest Oncology Group study. *Cancer*, **67**, 2969-2973.
- Engel, H.W., Soedirman, N., Rost, J.A., van Leeuwen, W.J. und van Embden, J.D.** (1980) Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistances between group A, B, and D *streptococci*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **142**, 407-413.
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Galm, U., Li, S.-M., Chater, K.F. und Heide, L.** (2005a) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2452-2459.
- Eustáquio, A.S., Gust, B., Luft, T., Li, S.-M., Chater, K.F. und Heide, L.** (2003a) Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*. Identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chem. Biol.*, **10**, 279-288.
- Eustáquio, A.S., Li, S.-M. und Heide, L.** (2005b) NovG, a DNA-binding protein acting as a positive regulator of novobiocin biosynthesis. *Microbiology*, **151**, 1949-1961.
- Eustáquio, A.S., Luft, T., Wang, Z.-X., Gust, B., Chater, K.F., Li, S.-M. und Heide, L.** (2003b) Novobiocin biosynthesis: inactivation of the putative regulatory gene *novE* and heterologous expression of genes involved in aminocoumarin ring formation. *Arch. Microbiol.*, **180**, 25-32.
- Flatman, R.H., Eustaquio, A., Li, S.M., Heide, L. und Maxwell, A.** (2006) Structure-activity relationships of aminocoumarin-type gyrase and topoisomerase IV inhibitors obtained by combinatorial biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 1136-1142.
- Floriano, B. und Bibb, M.** (1996) *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*, **21**, 385-396.
- Floss, H.G.** (2006) Combinatorial biosynthesis-Potential and problems. *J. Biotechnol.*, **124**, 242-257.
- Freel Meyers, C.L., Oberthuer, M., Xu, H., Heide, L., Kahne, D. und Walsh, C.T.** (2004) Characterization of NovP and NovN: Completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 67-70.
- Freel Meyers, C.L., Oberthur, M., Anderson, J.W., Kahne, D. und Walsh, C.T.** (2003) Initial characterization of novobiocin acid noviosyl transferase activity of NovM in biosynthesis of the antibiotic novobiocin. *Biochemistry*, **42**, 4179-4189.
- Freitag, A., Galm, U., Li, S.-M. und Heide, L.** (2004) New aminocoumarin antibiotics from a *cloQ*-defective mutant of the clorobiocin producer *Streptomyces roseochromogenes* DS12.976. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **57**, 205-209.
- Freitag, A., Li, S.-M. und Heide, L.** (2006a) Biosynthesis of the unusual 5,5-gem-dimethyl-deoxysugar noviose: investigation of the C-methyltransferase gene *cloU*. *Microbiology*, **152**, 2433-2442.

**Freitag, A., Mendez, C., Salas, J.A., Kammerer, B., Li, S.M. und Heide, L.** (2006b) Metabolic engineering of the heterologous production of clorobiocin derivatives and elloramycin in *Streptomyces coelicolor* M512. *Metab Eng*, **8**, 653-661.

**Freitag, A., Rapp, H., Heide, L. und Li, S.-M.** (2005a) Metabolic engineering of aminocoumarins: Inactivation of the methyltransferase gene *cloP* and generation of new clorobiocin derivatives in a heterologous host. *Chembiochem*, **6**, 1411-1418.

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

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

**Galm, U., Dessoy, M.A., Schmidt, J., Wessjohann, L.A. und Heide, L.** (2004a) *In vitro* and *in vivo* production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic and synthetic approach. *Chem. Biol.*, **11**, 173-183.

**Galm, U., Heller, S., Shapiro, S., Page, M., Li, S.M. und Heide, L.** (2004b) Antimicrobial and DNA gyrase-inhibitory activities of novel clorobiocin derivatives produced by mutasynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1307-1312.

**Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H.P., Schmidt, J., Li, S.-M. und Heide, L.** (2002) Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Arch. Microbiol.*, **178**, 102-114.

**Garneau, S., Dorrestein, P.C., Kelleher, N.L. und Walsh, C.T.** (2005) Characterization of the formation of the pyrrole moiety during clorobiocin and coumermycin A<sub>1</sub> biosynthesis. *Biochemistry*, **44**, 2770-2780.

**Garneau-Tsodikova, S., Stapon, A., Kahne, D. und Walsh, C.T.** (2006b) Installation of the Pyrrolyl-2-carboxyl Pharmacophore by CouN1 and CouN7 in the Late Biosynthetic Steps of the Aminocoumarin Antibiotics Clorobiocin and Coumermycin A(1). *Biochemistry*, **45**, 8568-8578.

**Garneau-Tsodikova, S., Stapon, A., Kahne, D. und Walsh, C.T.** (2006a) Installation of the Pyrrolyl-2-carboxyl Pharmacophore by CouN1 and CouN7 in the Late Biosynthetic Steps of the Aminocoumarin Antibiotics Clorobiocin and Coumermycin A(1). *Biochemistry*, **45**, 8568-8578.

**Gräwert, T., Kaiser, J., Zepeck, F., Laupitz, R., Hecht, S., Amslinger, S., Schramek, N., Schleicher, E., Weber, S., Haslbeck, M., Buchner, J., Rieder, C., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. und Rohdich, F.** (2004) IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12847-12855.

**Grote, R., Zeeck, A., Drautz, H. und Zahner, H.** (1988) Metabolic products of microorganisms. 246. 2880-II, a metabolite related to ferulic acid from *Streptomyces griseoflavus*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **41**, 1275-1276.

- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T. und Chater, K.F.** (2003) PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1541-1546.
- Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M. und Virta, M.** (2002) Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal. Biochem.*, **301**, 235-242.
- Hardy, C.D. und Cozzarelli, N.R.** (2003) Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 941-947.
- Heinzelmann, E., Kienzlen, G., Kaspar, S., Recktenwald, J., Wohlleben, W. und Schwartz, D.** (2001) The phosphinomethylmalate isomerase gene *pmi*, encoding an aconitase-like enzyme, is involved in the synthesis of phosphinothricin tripeptide in *Streptomyces viridochromogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3603-3609.
- Herr, A.J., Atkins, J.F. und Gesteland, R.F.** (2000) Coupling of open reading frames by translational bypassing. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 343-372.
- Hoeksema, H., Johnson, J.L. und Hinman, J.W.** (1955) Structural studies on streptonivicin, a new antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6710-6711.
- Holzenkämpfer, M., Walker, M., Zeeck, A., Schimana, J. und Fiedler, H.P.** (2002) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 - II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**, 301-307.
- Holzenkämpfer, M. und Zeeck, A.** (2002) Biosynthesis of simocyclinone D8 in an 18O<sub>2</sub>-rich atmosphere. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**, 341-342.
- Hooper, D.C., Wolfson, J.S., McHugh, G.L., Winters, M.B. und 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.
- Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A., Floss, H.G. und Omura, S.** (1985) Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*, **314**, 642-644.
- Hutchinson, C.R.** (1999) Combinatorial biosynthesis of antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 233-254.
- Jez, J.M., Ferrer, J.L., Bowman, M.E., Dixon, R.A. und Noel, J.P.** (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry*, **39**, 890-902.
- Kamigiri, K., Hidaka, T., Imai, S., Murakami, T. und Seto, H.** (1992) Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) 12. C-P bond formation mechanism of bialaphos: discovery of a P-methylation enzyme. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **45**, 781-787.
- Kawaguchi, H., Tsukiura, H., Okanishi, M., Miyaki, T., Ohmori, T., Fujisawa, K. und Koshiyama, H.** (1965) Coumermycin, a new antibiotic. I. Production, isolation, and characterization of coumermycin A1. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **18**, 1-10.

- Khosla, C.** (1998) Combinatorial biosynthesis of "unnatural" natural products. In Gordon, E.M. and Kerwin Jr., J.F. (Eds.), *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, New York, pp. 401-417.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. und Hopwood, D.A.** (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kirby, W.M., Hudson, D.G. und Noyers, W.D.** (1956) Clinical and laboratory studies of novobiocin, a new antibiotic. *AMA. Arch. Intern. Med.*, **98**, 1-7.
- Kominek, L.A.** (1972) Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1**, 123-134.
- Kominek, L.A. und Meyer, H.F.** (1975) Novobiocic acid synthetase. *Meth. Enzymol.*, **43**, 502-508.
- Kuzuyama, T., Hidaka, T., Kamigiri, K., Imai, S. und Seto, H.** (1992) Studies on the biosynthesis of fosfomycin. 4. The biosynthetic origin of the methyl group of fosfomycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **45**, 1812-1814.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafitte, D., Lamour, V., Tsvetkov, P.O., Makarov, A.A., Klich, M., Deprez, P., Moras, D., Briand, C. und Gilli, R.** (2002) DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry*, **41**, 7217-7223.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z. und Swings, J.** (2002) The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 823-829.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. und Candia, O.A.** (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.*, **100**, 95-97.
- Laurin, P., Ferroud, D., Klich, M., Dupuis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaigne, P., Bonnefoy, A. und Musicki, B.** (1999) Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 2079-2084.
- Lautru, S., Deeth, R.J., Bailey, L.M. und Challis, G.L.** (2005) Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 265-269.
- Lewis, R.J., Singh, O.M.P., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J. und Wigley, D.B.** (1996a) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.*, **15**, 1412-1420.
- Lewis, R.J., Tsai, F.T.F. und Wigley, D.B.** (1996b) Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays*, **18**, 661-671.

**Li, S.M. und Heide, L.** (2006) The biosynthetic gene clusters of aminocoumarin antibiotics. *Planta Med.*, **72**, 1093-1099.

**Li, S.-M. und Heide, L.** (2004) Functional analysis of biosynthetic genes of aminocoumarins and production of hybrid antibiotics. *Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents*, **3**, 279-295.

**Li, S.-M., Hennig, S. und Heide, L.** (1998) Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin via a non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2717-2720.

**Li, S.-M., Westrich, L., Schmidt, J., Kuhnt, C. und Heide, L.** (2002) Methyltransferase genes in *Streptomyces rishiriensis*: new coumermycin derivatives from gene-inactivation experiments. *Microbiology*, **148**, 3317-3326.

**Lorico, A., Rappa, G. und Sartorelli, A.C.** (1992) Novobiocin-induced accumulation of etoposide (VP-16) in WEHI-3B D+ leukemia cells. *Int. J. Cancer*, **52**, 903-909.

**Luft, T., Li, S.M., Scheible, H., Kammerer, B. und Heide, L.** (2005) Overexpression, purification and characterization of SimL, an amide synthetase involved in simocyclinone biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, **183**, 277-285.

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

**Marcinak, J.F. und Frank, A.L.** (2003) Treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **16**, 265-269.

**Marcu, M.G., Chadli, A., Bouhouche, I., Catelli, M. und Neckers, L.M.** (2000a) The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37181-37186.

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

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

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

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

**Maxwell, A., Burton, N.P. und O'Hagan, N.** (2006) High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e104.

**McCullers, J.A., English, B.K. und Novak, R.** (2000) Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescing meningitis. *J. Infect. Dis.*, **181**, 369-373.

**Meighen, E.A.** (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, **55**, 123-142.

**Moore, B.S., Hertweck, C., Hopke, J.N., Izumikawa, M., Kalaitzis, J.A., Nilsen, G., O'Hare, T., Piel, J., Shipley, P.R., Xiang, L., Austin, M.B. und Noel, J.P.** (2002) Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: From benzoic acid to chalcone. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1956-1962.

**Muth, G., Nussbaumer, B., Wohlleben, W. und Puehler, A.** (1989) A vector system with temperature-sensitive replication for gene disruption and mutational cloning in streptomycetes. *Mol. Gen. Genet.*, **219**, 341-348.

**National Committee for Clinical Laboratory Standards** (2003) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Seventh Edition & Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., Sixteenth Informational Supplement.*

**Ninet, L., Benazet, F., Charpentie, Y., Dubost, M., Florent, J., Mancy, D., Preud'Homme, J., Threlfall, T.L. und Vuillemin, B.** (1972) Clorobiocin (18.631 R.P.), a new chlorinated antibiotic produced by several *Streptomyces species*. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Serie C: Sciences Chimiques*, **275**, 455-458.

**Oh, S.H. und Chater, K.F.** (1997) Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J. Bacteriol.*, **179**, 122-127.

**Okumura, S., Deguchi, T. und Marumo, H.** (1981) Biosynthetic incorporation of methyl groups into fortimicins. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **34**, 1360-1362.

**Oppenheim, D.S. und Yanofsky, C.** (1980) Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics*, **95**, 785-795.

**Orihara, N., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Furihata, K. und Seto, H.** (1998) Studies on the biosynthesis of terpenoid compounds produced by actinomycetes - 3. Biosynthesis of the isoprenoid side chain of novobiocin via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces niveus*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **51**, 676-678.

**Pacholec, M., Freel Meyers, C.L., Oberthur, M., Kahne, D. und Walsh, C.T.** (2005a) Characterization of the aminocoumarin ligase SimL from the simocyclinone pathway and tandem incubation with NovM,P,N from the novobiocin pathway. *Biochemistry*, **44**, 4949-4956.

**Pacholec, M., Hillson, N.J. und Walsh, C.T.** (2005b) NovJ/NovK catalyze benzylic oxidation of a  $\beta$ -hydroxyl tyrosyl-S-pantetheinyl enzyme during aminocoumarin ring formation in novobiocin biosynthesis. *Biochemistry*, **44**, 12819-12826.

**Pacholec, M., Tao, J. und Walsh, C.T.** (2005c) CouO and NovO: C-Methyltransferases for tailoring the aminocoumarin scaffold in coumermycin and novobiocin antibiotic biosynthesis. *Biochemistry*, **44**, 14969-14976.

**Perronne, C.M., Malinverni, R. und Glauser, M.P.** (1987) Treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats with coumermycin A1 and ciprofloxacin, alone or in combination. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 539-543.

- Pitlik, S.** (2003) Old drugs for new bugs. *BMJ*, **326**, 235-236.
- Pojer, F., Kahlich, R., Kammerer, B., Li, S.-M. und Heide, L.** (2003a) CloR, a bifunctional non-heme iron oxygenase involved in clorobiocin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 30661-30668.
- Pojer, F., Li, S.-M. und Heide, L.** (2002) Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology*, **148**, 3901-3911.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C.T., Li, S.-M. und Heide, L.** (2003b) CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2316-2321.
- Queener, S.W., Sebek, O.K. und Vezina, C.** (1978) Mutants blocked in antibiotic synthesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **32**, 593-636.
- Raad, I., Darouiche, R., Hachem, R., Sacilowski, M. und Bodey, G.P.** (1995) Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2397-2400.
- Raad, I.I., Hachem, R.Y., Abi-Said, D., Rolston, K.V.I., Whimbey, E., Buzaid, A.C. und Legha, S.** (1998) A prospective crossover randomized trial of novobiocin and rifampin prophylaxis for the prevention of intravascular catheter infections in cancer patients treated with interleukin-2. *Cancer*, **82**, 403-411.
- Rappa, G., Lorico, A. und Sartorelli, A.C.** (1992) Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Int. J. Cancer*, **51**, 780-787.
- Reusser, F. und Dolak, L.A.** (1986) Novenaminate is the active moiety in novobiocin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **39**, 272-274.
- Rocque, W.J., Fesik, S.W., Haug, A. und McGroarty, E.J.** (1988) Polycation binding to isolated lipopolysaccharide from antibiotic-hypersusceptible mutant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 308-313.
- Rohr, J.** (1995) Combinatorial biosynthesis - an approach in the near future? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 881-885.
- Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Workman, P. und Aherne, W.** (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal. Biochem.*, **327**, 176-183.
- Sambrook, J. und Russell, D.W.** (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scannell, J. und Kong, Y.L.** (1969) Biosynthesis of coumermycin A1: incorporation of L-proline into the pyrrole groups. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 139-143.

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

**Schmutz, E., Hennig, S., Li, S.-M. und Heide, L.** (2004) Identification of a topoisomerase IV in actinobacteria: purification and characterization of ParY<sup>R</sup> and GyrB<sup>R</sup> from the coumermycin A1 producer *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Microbiology*, **150**, 641-647.

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

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

**Schumpp, B. und Schlaeger, E.J.** (1990) Optimization of culture conditions for high cell density proliferation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J. Cell Sci.*, **97** (Pt 4), 639-647.

**Silhavy, T.J.** (2000) Gene fusions. *J. Bacteriol.*, **182**, 5935-5938.

**Smith, C.G., Dietz, A., Sokolski, W.T. und Savage, G.M.** (1956) Streptonivicin, a new antibiotic. I. Discovery and biologic studies. *Antibiot. Chemother.*, **6**, 135-142.

**Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. und Miller, N.E.** (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1097-1106.

**Sohng, J.K., Oh, T.J., Lee, J.J. und 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.

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

**Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M. und Heide, L.** (2000b) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 1214-1222.

**Thiara, A.S. und Cundliffe, E.** (1988) Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.*, **7**, 2255-2259.

**Thiara, A.S. und Cundliffe, E.** (1989) Interplay of novobiocin-resistant and -sensitive DNA gyrase activities in self-protection of the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Gene*, **81**, 65-72.

**Thiara, A.S. und Cundliffe, E.** (1993) Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol. Microbiol.*, **8**, 495-506.

**Thuy, T.T.T., Lee, H.C., Kim, C.G., Heide, L. und Sohng, J.K.** (2005) Functional characterizations of *novWUS* involved in novobiocin biosynthesis from *Streptomyces sphaeroides*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **436**, 161-167.

**Tsai, F.T.F., Singh, O.M., Skarzynski, T., Wonacott, A.J., Weston, S., Tucker, A., Pauptit, R.A., Breeze, A.L., Poyser, J.P., O'Brien, R., Ladbury, J.E. und Wigley, D.B.** (1997) The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins*, **28**, 41-52.

**Ueda, Y., Chuang, J.M., Crast, L.B. und Partyka, R.A.** (1988) A selective cleavage of the oxazole moiety in noviosylcoumarin antibiotics. A new process to key intermediates for coumermycin analog synthesis. *J. Org. Chem.*, **53**, 5107-5113.

**Van Dyk, T.K., Wei, Y., Hanafey, M.K., Dolan, M., Reeve, M.J.G., Rafalski, J.A., Rothman-Denes, L.B. und LaRossa, R.A.** (2001) A genomic approach to gene fusion technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 2555-2560.

**van Pée, K.-H.** (2001) Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.*, **175**, 250-258.

**Walsh, C.T.** (2002) Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem*, **3**, 124-134.

**Walsh, C.T.** (2003) Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 65-70.

**Walsh, T.J., Standiford, H.C., Reboli, A.C., John, J.F., Mulligan, M.E., Ribner, B.S., Montgomerie, J.Z., Goetz, M.B., Mayhall, C.G., Rimland, D., Stevens, D.A., Hansen, S.L., Gerard, G.C. und Ragual, R.J.** (1993) Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 1334-1342.

**Wang, Z.-X., Li, S.-M. und Heide, L.** (2000) Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DMS 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3040-3048.

**Weissman, K.J.** (2007) Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.*, **25**, 139-142.

**Weist, S. und Süßmuth, R.D.** (2005) Mutational biosynthesis--a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 141-150.

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

**Wohlleben, W. und Pelzer, S.** (2002) New compounds by combining "modern" genomics and "old-fashioned" mutasynthesis. *Chem. Biol.*, **9**, 1163-1164.

**Xu, H., Heide, L. und Li, S.-M.** (2004) New aminocoumarin antibiotics formed by a combined mutational and chemoenzymatic approach utilizing the carbamoyltransferase NovN. *Chem. Biol.*, **11**, 655-662.

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

**Xu, H., Wang, Z.X., Schmidt, J., Heide, L. und Li, S.M.** (2002) Genetic analysis of the biosynthesis of the pyrrole and carbamoyl moieties of coumermycin A1 and novobiocin. *Mol Genet. Genomics*, **268**, 387-396.

## VII Anhang

### 1. Tryptischer Verdau und LC-MS-Analyse des exprimierten CloN6-Fragmentes

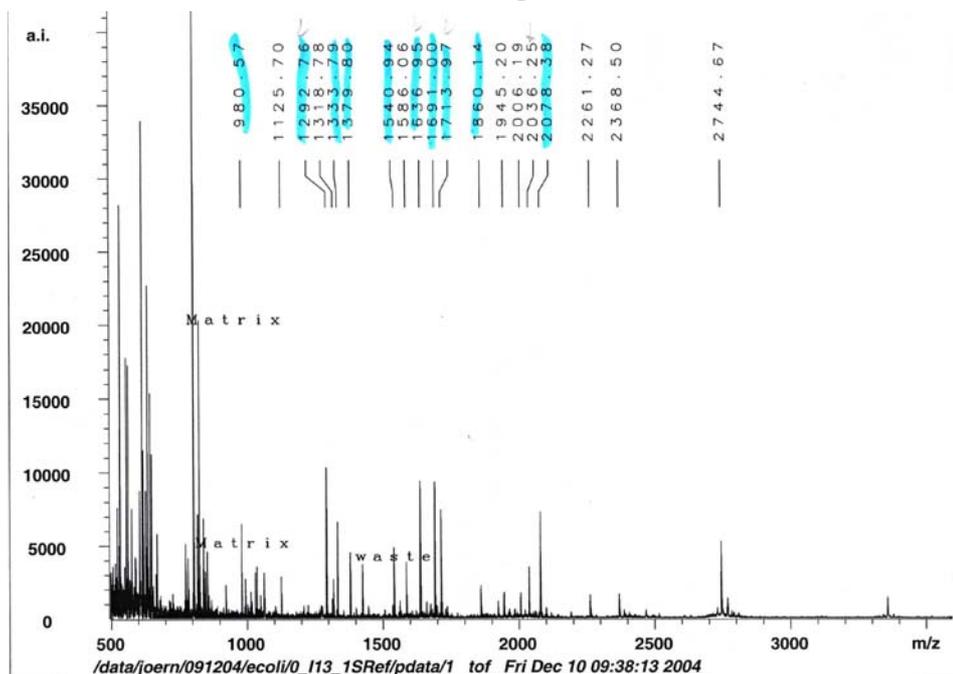
**Tabelle VII.1:** Ergebnisse der MS-Analyse des mit Trypsin verdauten Proteins der Größe ~60 kDa der Expression von pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF'.

detektierte Masse	M <sub>r</sub> (berechnet)	Position Start-Ende	Peptide
980,57	979,56	68-75	HPDLLDVER
2036,25	2035,24	175-192	VETTGFSHKPATDYNNVR
1691,00	1690,00	281-294	MHTYLDAVHDLGYR
1713,97	1712,97	338-351	GTYTMAEMEEWIPR
1860,14	1859,13	359-373	GVMIWFFIGMPYQDR
1333,79	1332,79	378-388	DTVTYSEHLIR
1292,76	1291,75	433-442	QAMVEPLWYR
1379,8	1378,8	455-466	GIQDVSYEAIER
1540,94	1539,93	495-508	LLAEMDHALSLDGR
1636,95	1635,94	543-555	WFDDVTVPPEMIR

**Tabelle VII.2:** N-terminal fehlende Fragmente in der MS-Analyse des exprimierten Proteins der Größe ~60 kDa der Expression von pCA7 in *E. coli* XL1Blue MRF'.

M <sub>r</sub> (berechnet)	Position Start-Ende	Peptide
1595,80	1-13	MFL LHAPS VYDFR
3574,70	16-46	DDILFAYLSDSDSVNVT SVYEMYP IGWFSIK
2402,18	47-67	QQLADHDFDCQIVNIASLMLK

ESI-MS Spektrum



## 2. Nomenklatur der Novclobiocine

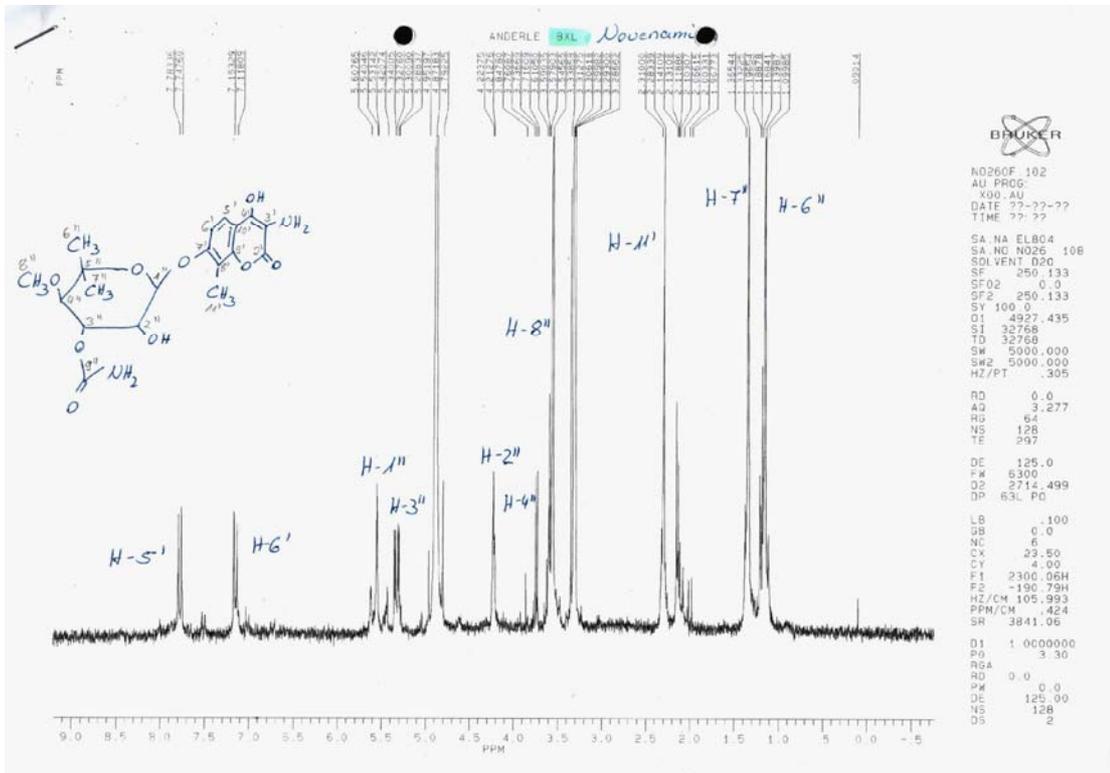
Wessjohann bzw. Abkürzung	Ring A Analoga		NC/NCA <sup>a</sup>	
	Chemische Bezeichnung	Publikation/ Dissertation	Publikation/ Dissertation	Testung (interne Bezeichnung)
3,5-Dimethyl-PHB	3,5-Dimethyl-4- hydroxybenzoesäure	200	201 202 203 204	22 23 24 25
XSG 079	3-Propyl-4- hydroxybenzoesäure	210	217 218 219 219A	16 17 18 -
MAD 610	3-Propenyl-4- hydroxybenzoesäure	220	225 226 227 228	19 20 - -
MAD 166	3-Isobutyrylamino-4- hydroxybenzoesäure	240	241	21
MAD 167b	3-Ter-valerylamino-4- hydroxybenzoesäure	250		-
3-Chlor-PHB	3-Chlor-4- hydroxybenzoesäure	270		
MAD 379	3-Bromo-4- hydroxybenzoesäure	280	281	-
3,5-Dibrom-PHB	3,5-Dibromo-4- hydroxybenzoesäure	290		
Vanillinsäure	3-Methoxy-4- hydroxybenzoesäure	310	311 312 313 314 315	11 12 13 14 15
4-Methylthiobenzoe- säure	4-Methylthiobenzoe- säure	370	371 372	9 10
3-Methyl-4- aminobenzoesäure	3-Methyl-4- aminobenzoesäure	380	386 387	7 8
4- Dimethylaminobenzoe- säure	4- Dimethylaminobenzoe- säure	390		
3-Methylpyrrol-2,4- dicarbonsäure	3-Methylpyrrol-2,4- dicarbonsäure	400		
3,5-Dimethylpyrrol-2,4- dicarbonsäure	3,5-Dimethylpyrrol-2,4- dicarbonsäure	410		
4-Methylpyrrol-2,3- dicarbonsäure	4-Methylpyrrol-2,3- dicarbonsäure	420		
3,5-Dimethylpyrrol-2,4- dicarbonsäure-4-ethylester	3,5-Dimethylpyrrol-2,4- dicarbonsäure-4- ethylester	430		

Wessjohann bzw. Abkürzung	Ring A Analoga		NC/NCA <sup>a</sup>	
	Chemische Bezeichnung	Publikation/ Dissertation	Publikation/ Dissertation	Testung (interne Bezeichnung)
PHB	4- Hydroxybenzoesäure	500		
Benzoessäure	Benzoessäure	600	601 602 603 604 606	1 2 4 5 6
2,3-Dihydroxybenzoe- säure	2,3-Dihydroxybenzoe- säure	610		
3,4-Dihydroxybenzoe- säure	3,4-Dihydroxybenzoe- säure	620		
3,4- Dihydroxyphenylessig- säure	3,4- Dihydroxyphenylessig- säure	630		
3-(3,4- Dihydroxyphenyl)- propionsäure	3-(3,4- Dihydroxyphenyl)- propionsäure	640		
Zimtsäure	Zimtsäure	700	701 702 703 704 705	26 27 28 29 -
p-Coumarsäure	p-Coumarsäure	710		
Kaffeesäure	Kaffeesäure	720		
Ferulasäure	Ferulasäure	730	731	34
3-Chlor-4- hydroxyzimtsäure	3-Chlor-4- hydroxyzimtsäure	740	741 742	32 33

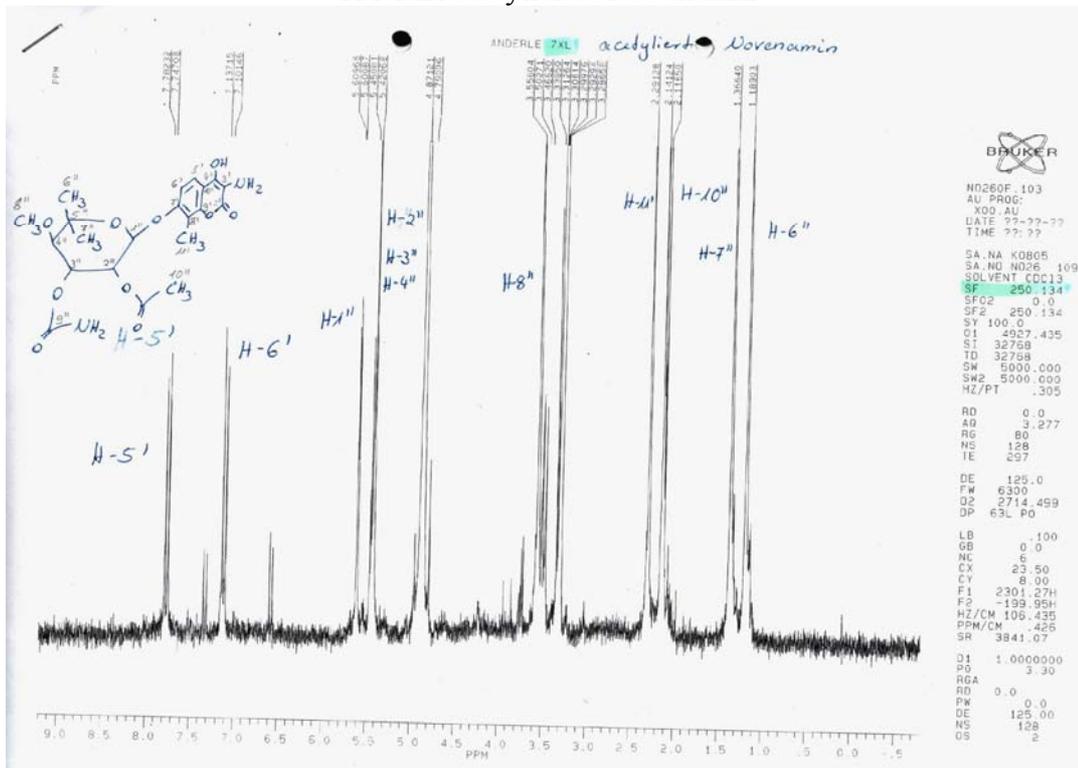
<sup>a</sup> NC bzw. NCA: Novclobiocine bzw. Novclobiocinsäuren

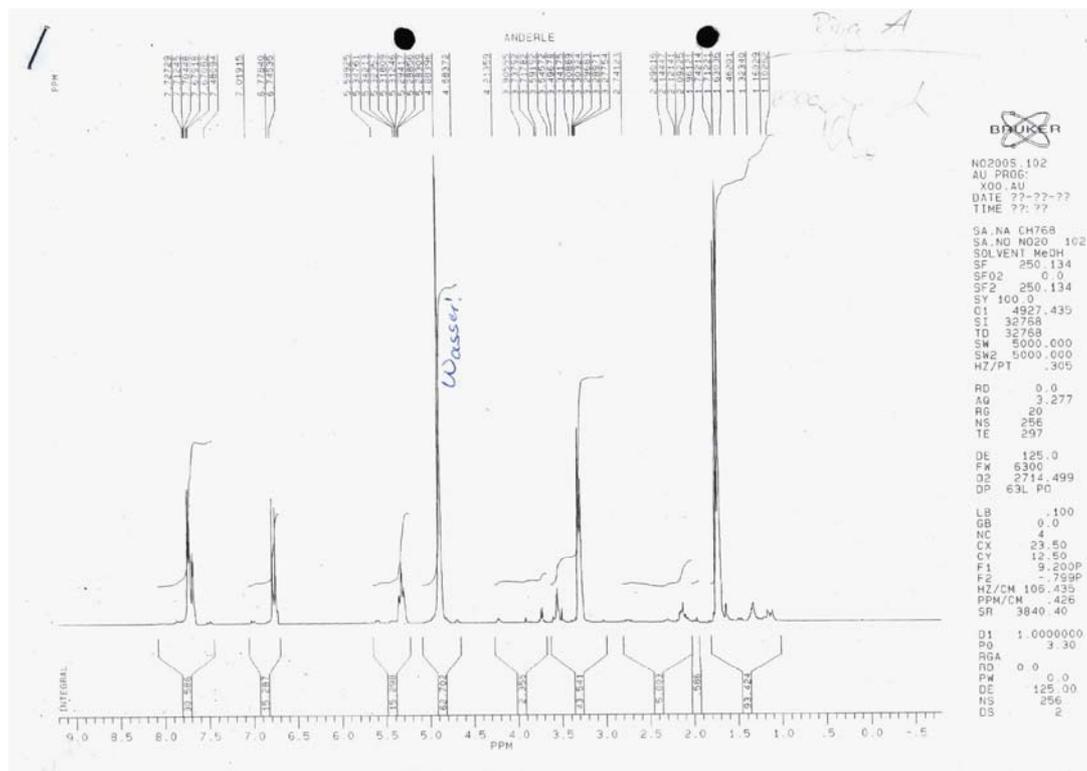
### 3. $^1\text{H}$ NMR-Spektren sowie $^1\text{H}$ NMR-Daten der Produkte aus der Novenaminherstellung

#### $^1\text{H}$ NMR Novenamin



#### $^1\text{H}$ NMR acetyliertes Novenamin



<sup>1</sup>H NMR Ring A

Die in der Tabelle aufgeführten <sup>1</sup>H NMR-Daten wurden in *d*4-Methanol bei 250 MHz aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal von Methanol (3,30 ppm) wurde als Referenz verwendet.

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)		
	Novenamin	acet. Novenamin	Ring A
2-H	-	-	7,72 d (3,7)
5-H	-	-	6,76 d (8,3)
6-H	-	-	7,69 dd (2,5; 7,5)
7-H2	-	-	3,30 d (7,5)
8-H	-	-	5,32 br <sup>a</sup> t (7,4)
10-H3	-	-	1,71 s
11-H3	-	-	1,74 s
5'-H	7,77 d (8,8)	7,76 d (8,8)	-
6'-H	7,14 d (8,8)	7,12 d (8,8)	-
8'-H3	2,28 s	2,29 s	-
1''-H	5,54 d (2,5)	5,61 d (2,5)	-
2''-H	4,21 t (2,7)	5,42 <sup>b</sup>	-
3''-H	5,32 dd (2,5; 7,5)	5,42 <sup>b</sup>	-
4''-H	3,75 d (5,0)	5,42 <sup>b</sup>	-
6''-H3	1,14 s	1,19 s	-
7''-H3	1,33 s	1,37 s	-
8''-OCH3	3,55 s	3,51 s	-
10''-H3	-	2,14 s	-

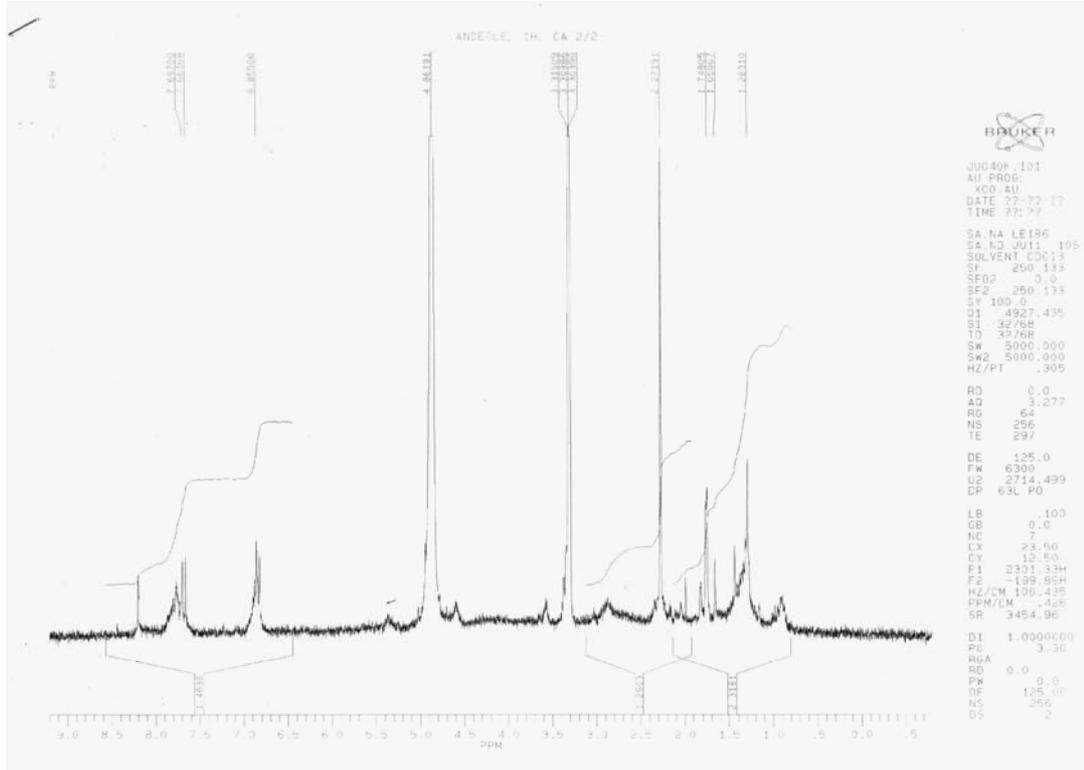
<sup>a</sup>br = breites Signal

<sup>b</sup>Komplexe, überlappende Signale, J nicht bestimmbar.

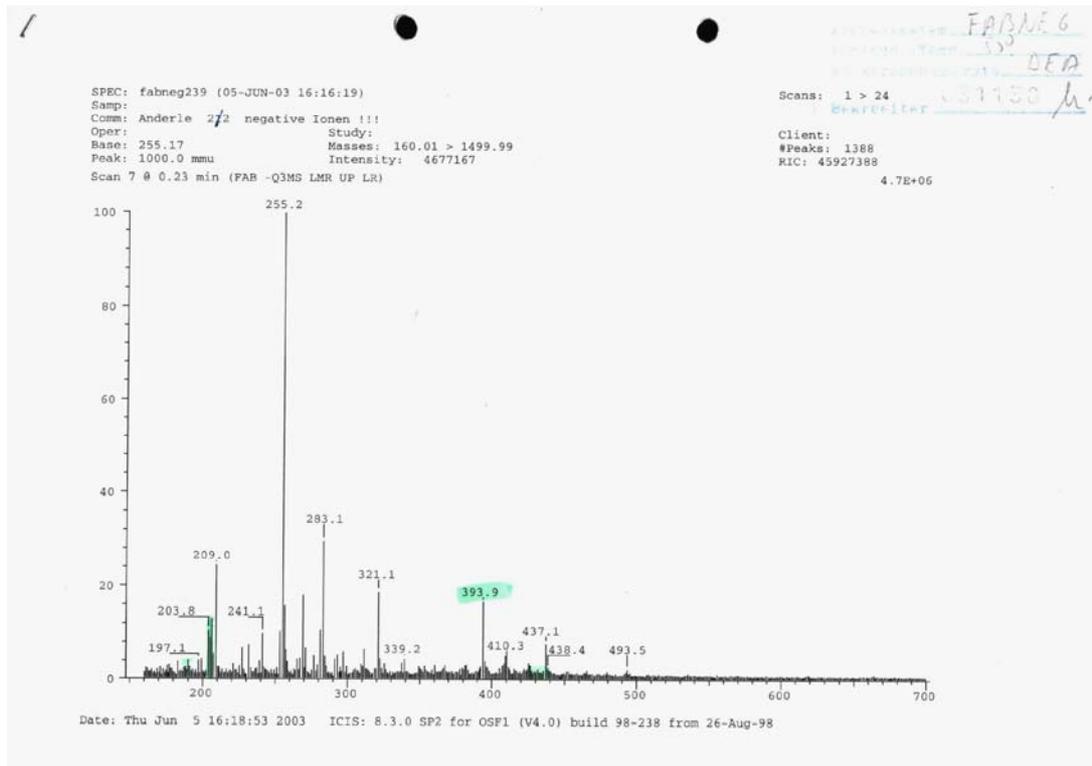
## 4. MS- und <sup>1</sup>H NMR-Spektren sowie <sup>1</sup>H NMR-Daten von Novobiocinsäure

Die MS-Daten wurden mittels FAB-negativer Analyse gewonnen

<sup>1</sup>H NMR Novobiocinsäure



MS-Spektrum



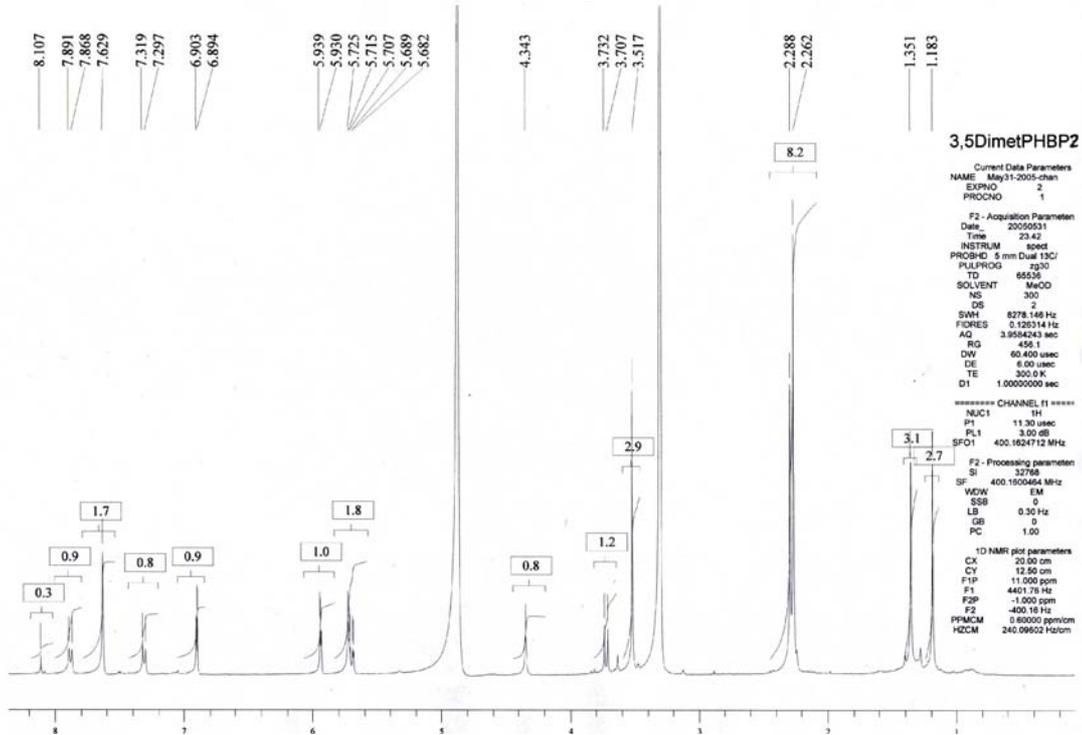
Die in der Tabelle aufgeführten  $^1\text{H}$  NMR-Daten wurden in *d*<sub>4</sub>-Methanol bei 250 MHz aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal von Methanol (3,30 ppm) wurde als Referenz verwendet.

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)
	Novobiocinsäure
2-H	7,80 d (2,5)
5-H	6,86 d (7,5)
6-H	7,79 dd (3,75; 6,25)
7-H <sub>2</sub>	3,36 d (7,5)
8-H	5,40 br s
10-H <sub>3</sub>	1,75 s
11-H <sub>3</sub>	1,75 s
5'-H	7,68 d (8,83)
6'-H	6,82 d (8,77)
8'-H	2,27 s

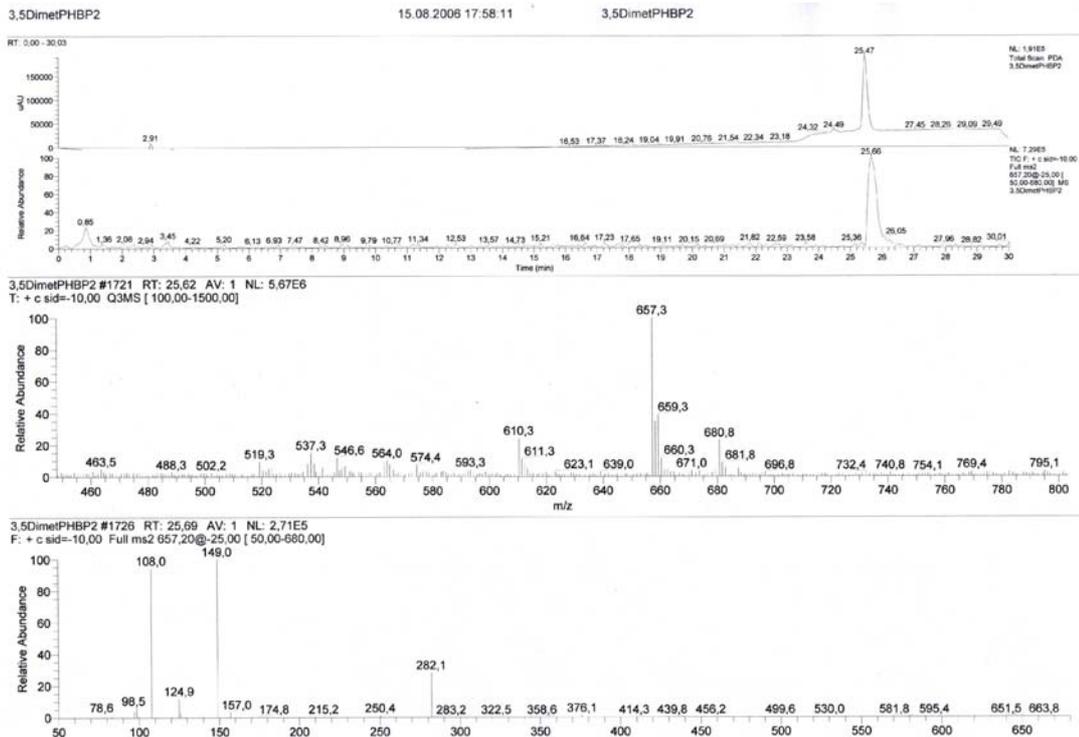
5. MS- und <sup>1</sup>H NMR-Spektren der neuen Novclobiocine aus einstufiger und zweistufiger Fütterung

Novclobiocin 201

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

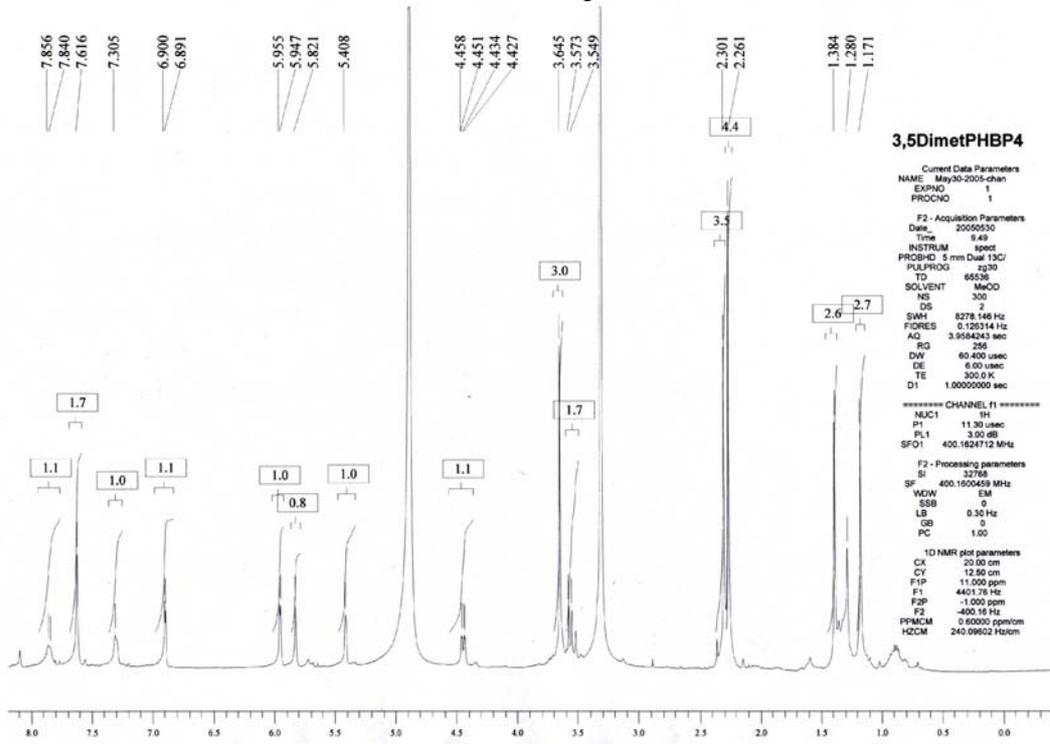


LC-MS/MS-Analyse

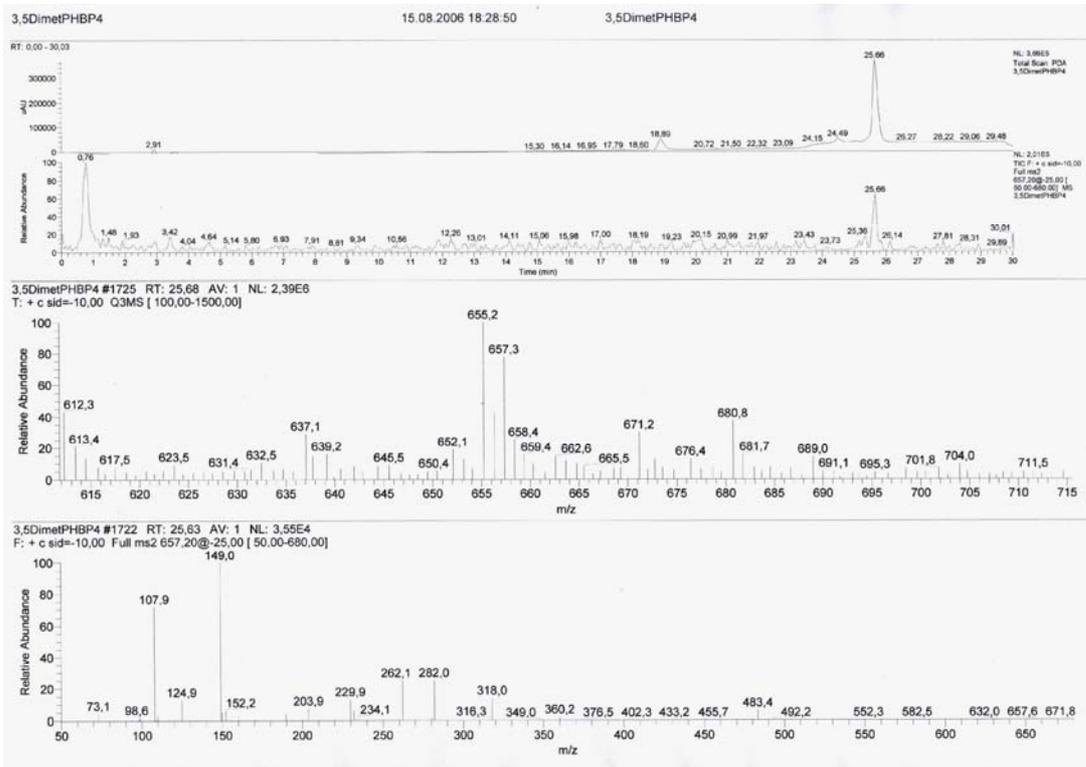


Novclobiocin 202

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

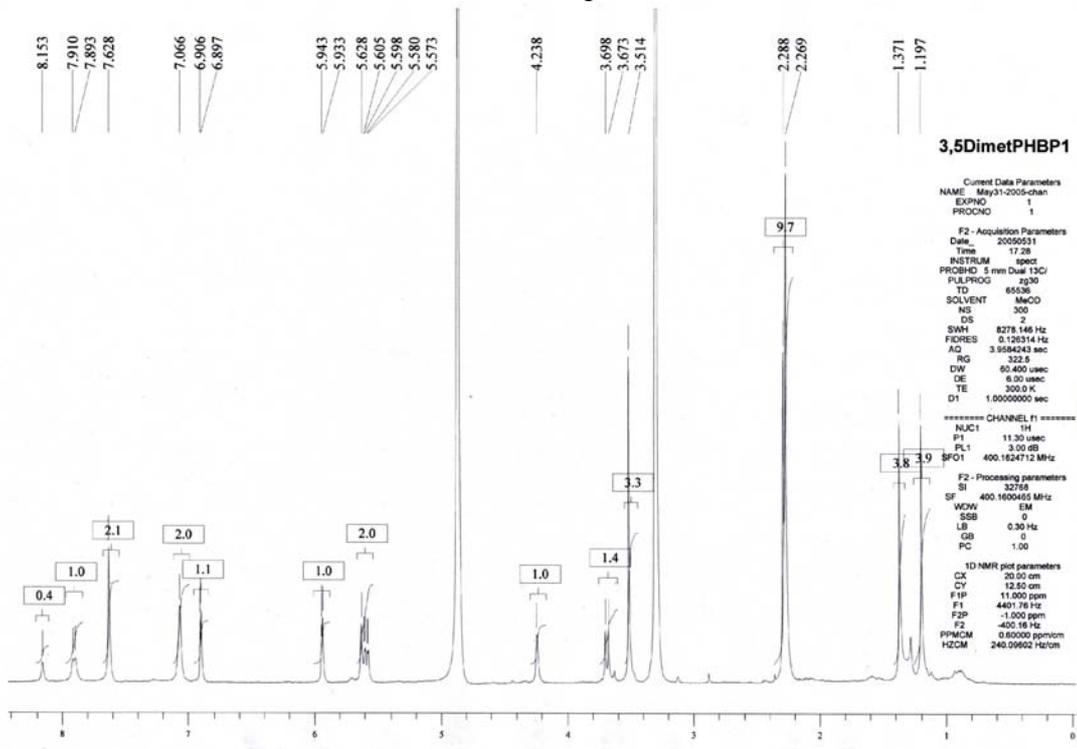


LC-MS/MS-Analyse

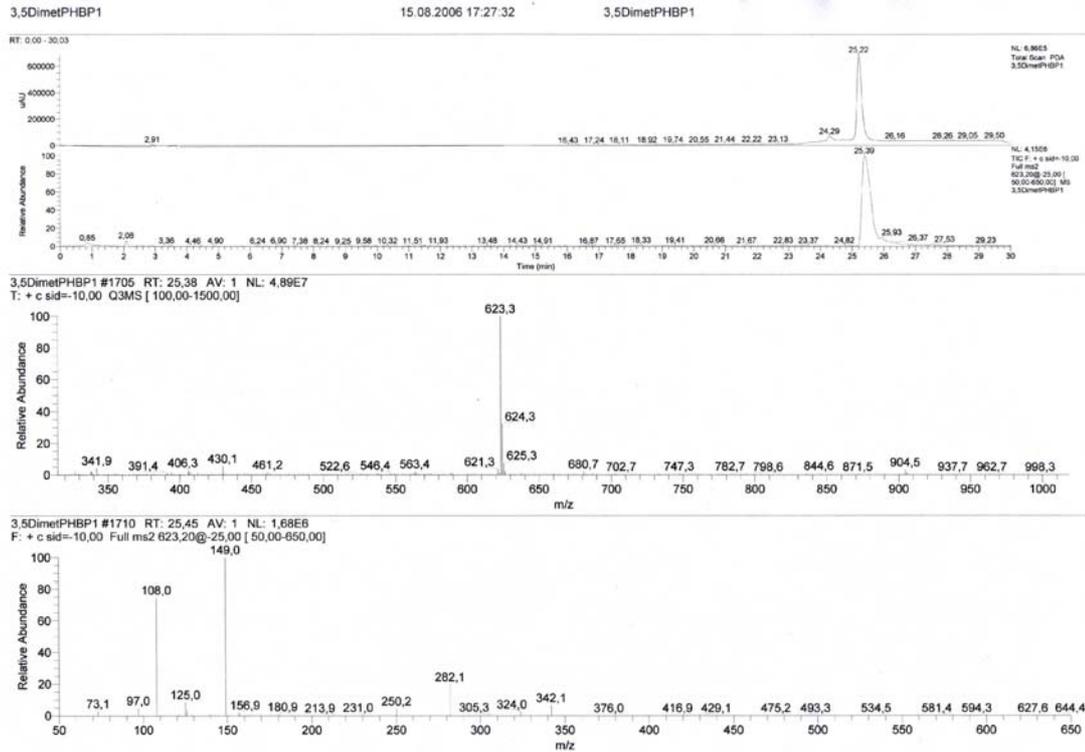


Novclobiocin 203

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

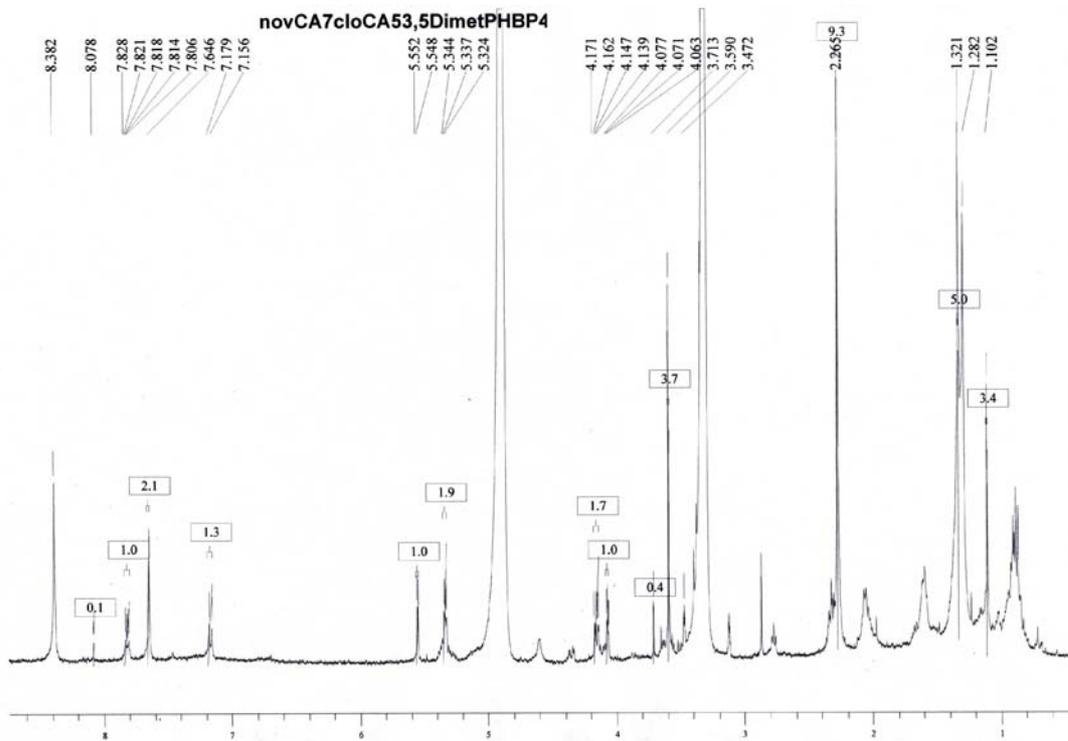


LC-MS/MS-Analyse

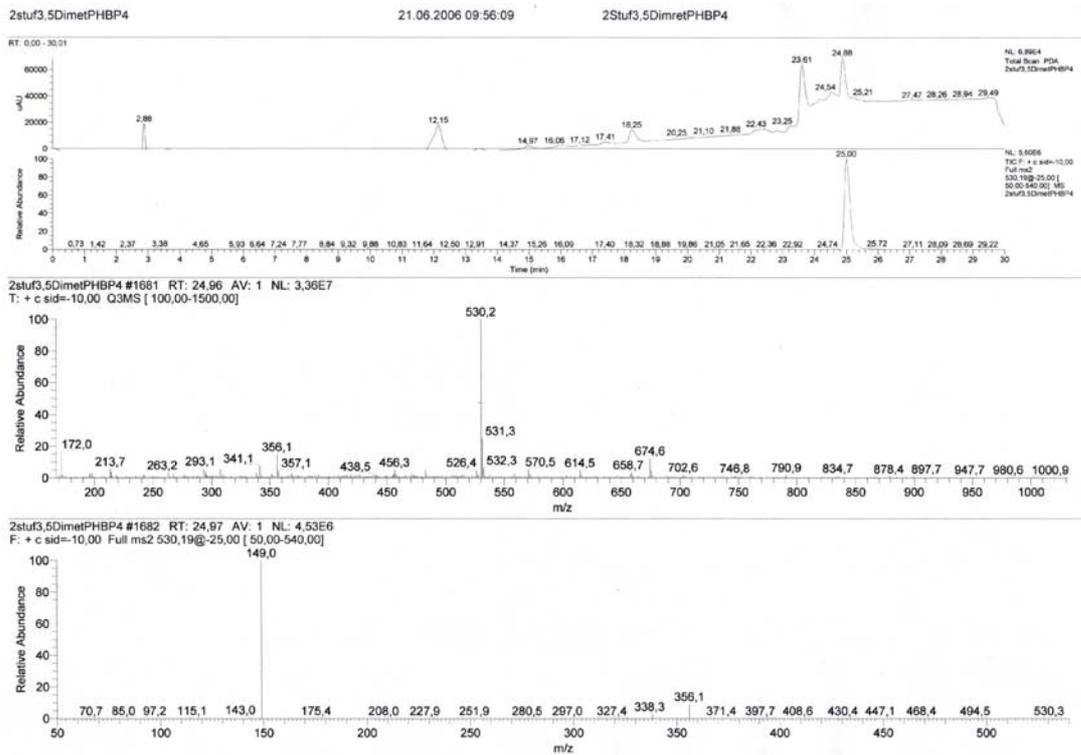


Novclobiocin 204

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

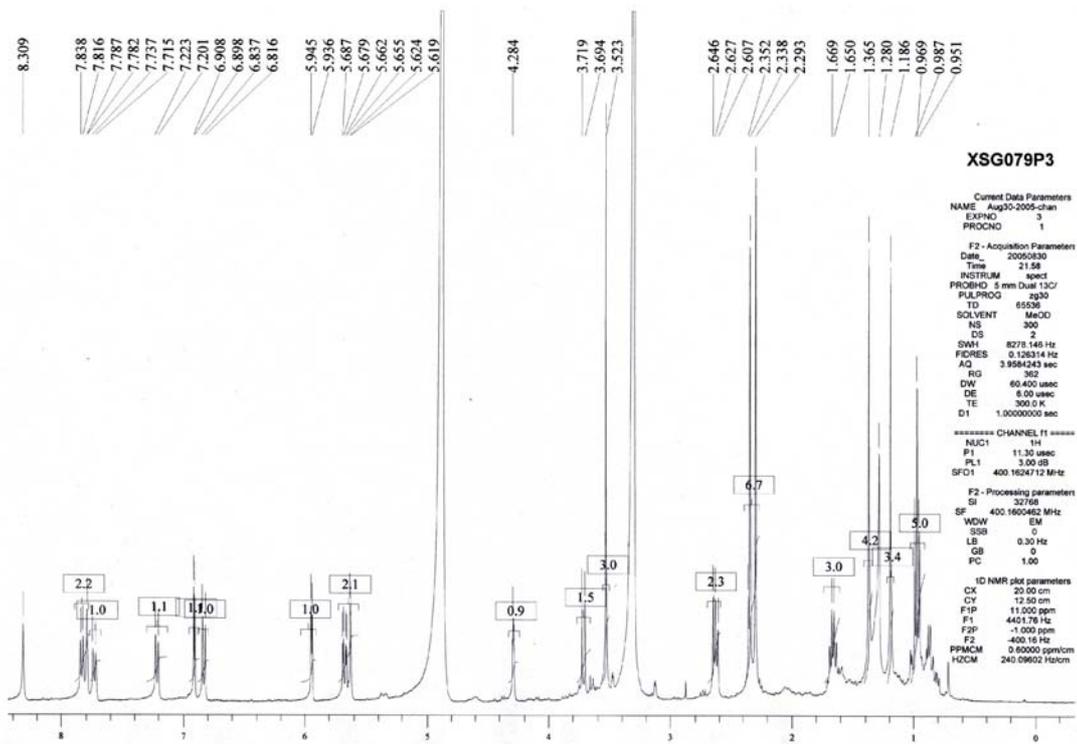


LC-MS/MS-Analyse

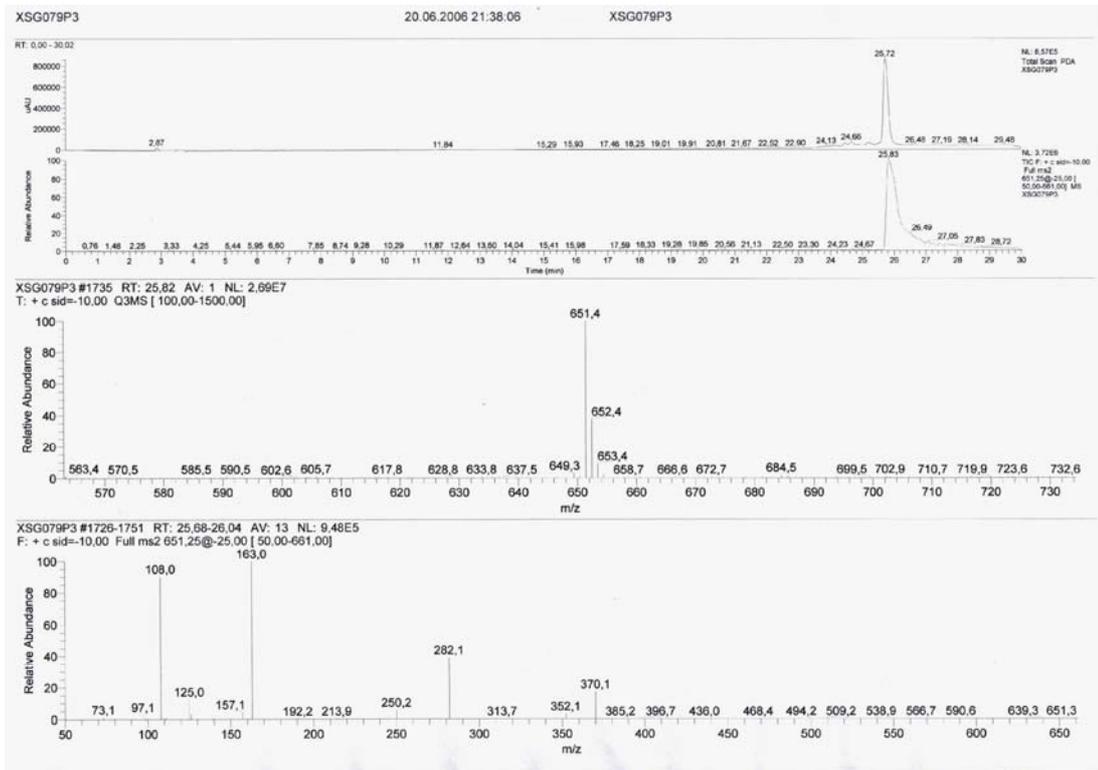


Novclobiocin 217

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

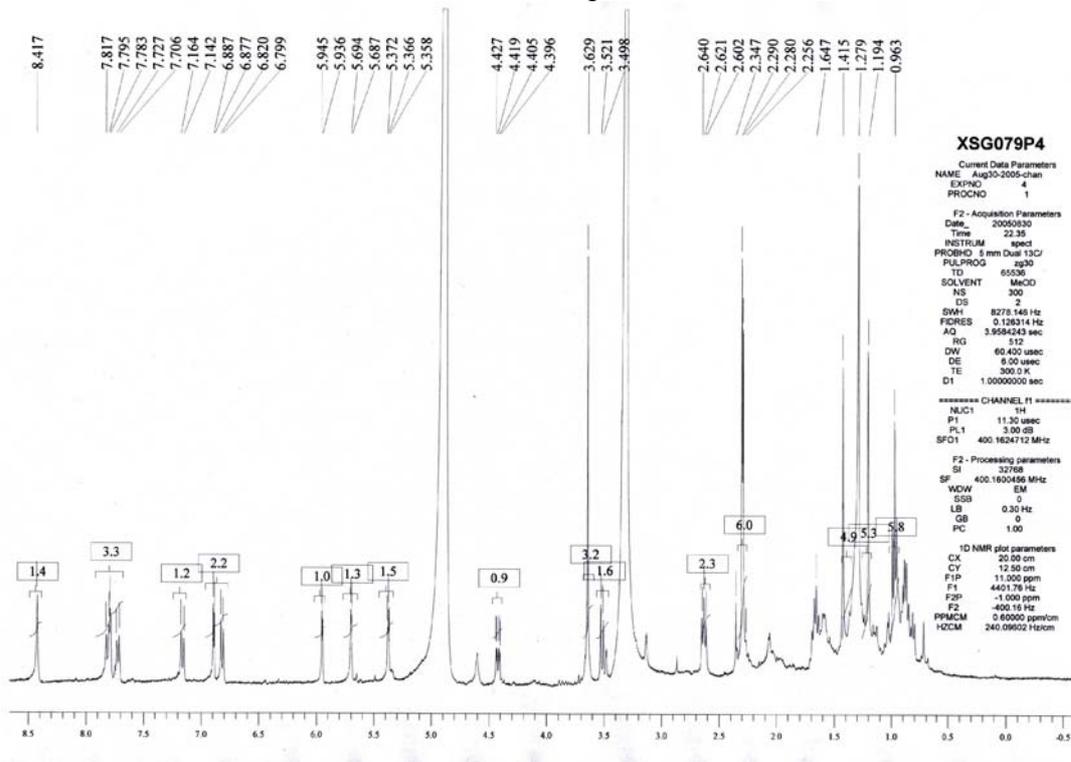


LC-MS/MS-Analyse

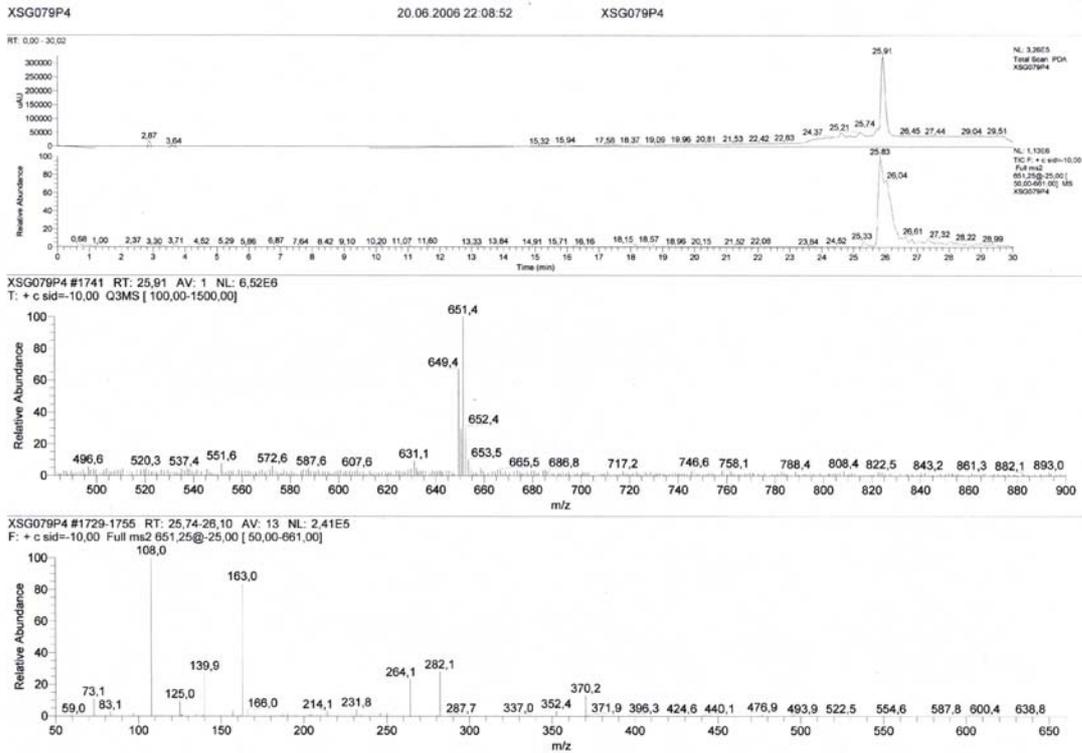


Novclobiocin 218

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

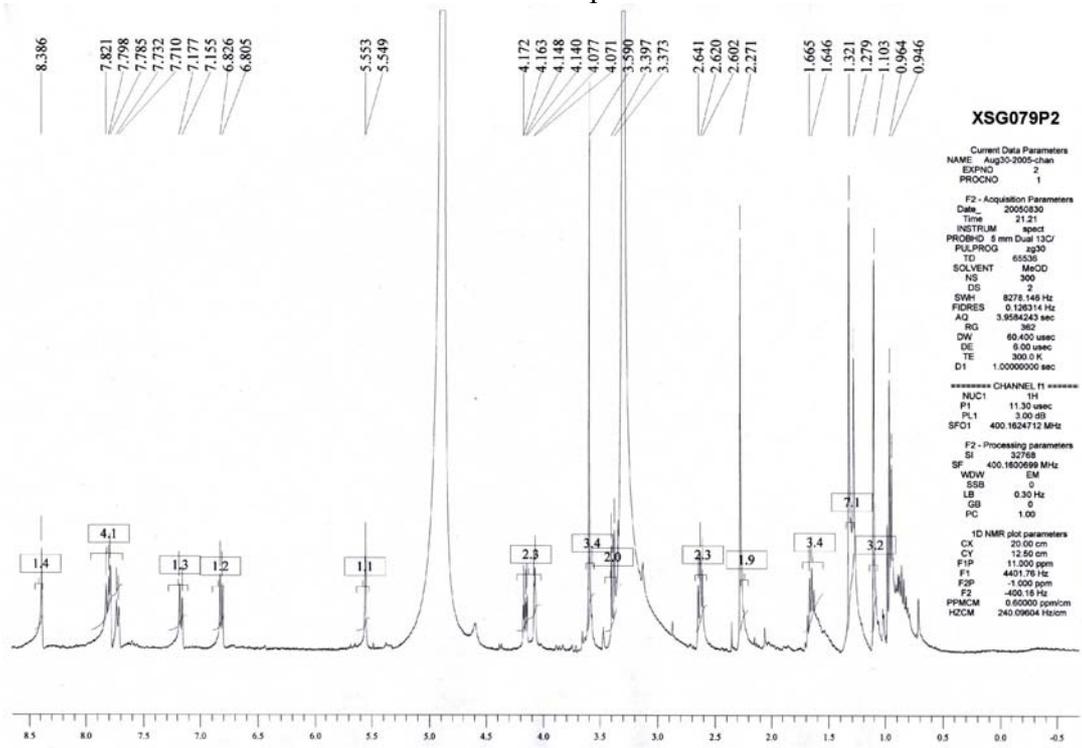


LC-MS/MS-Analyse

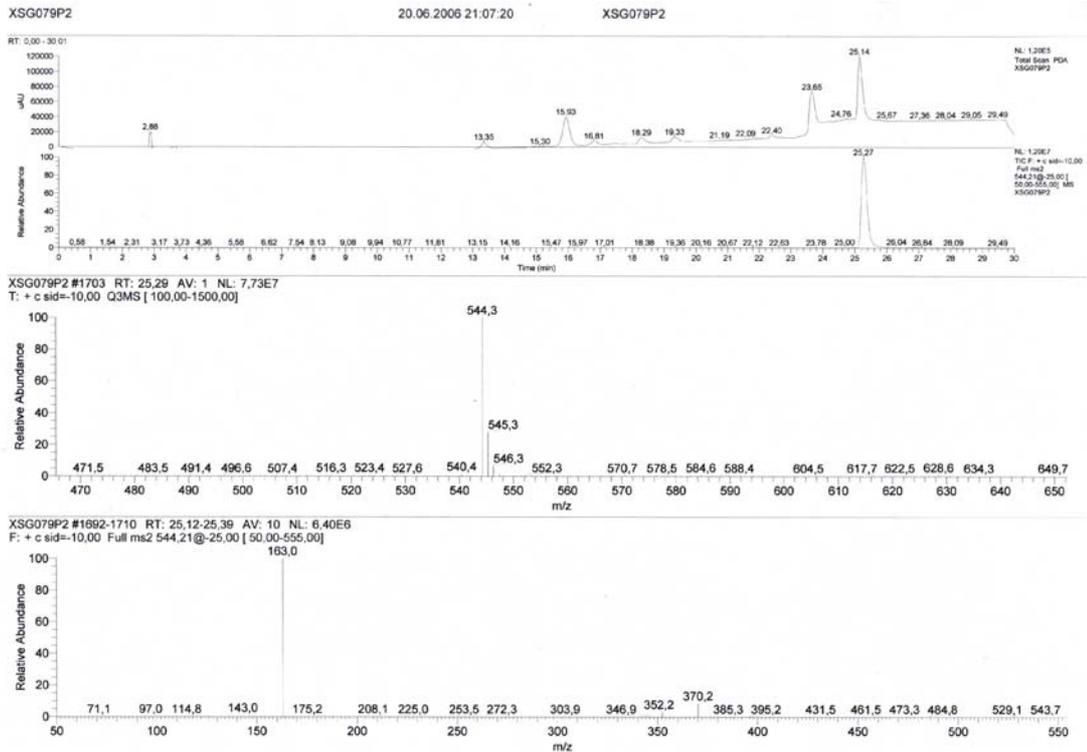


Novclobiocin 219

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

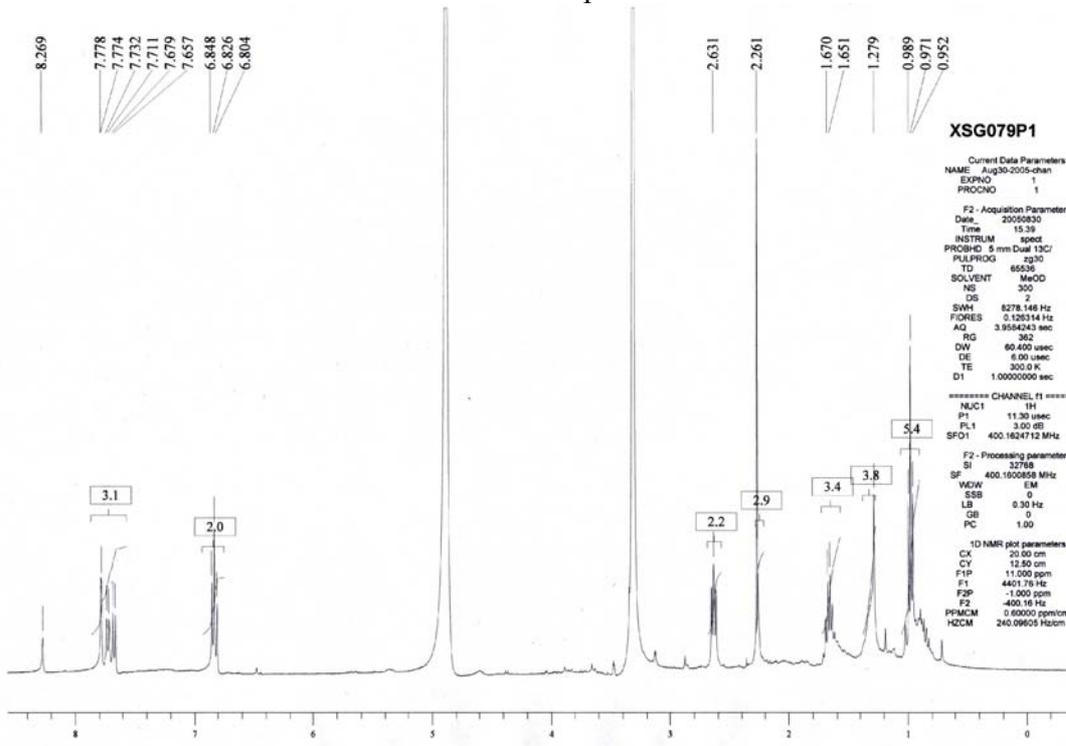


LC-MS/MS-Analyse

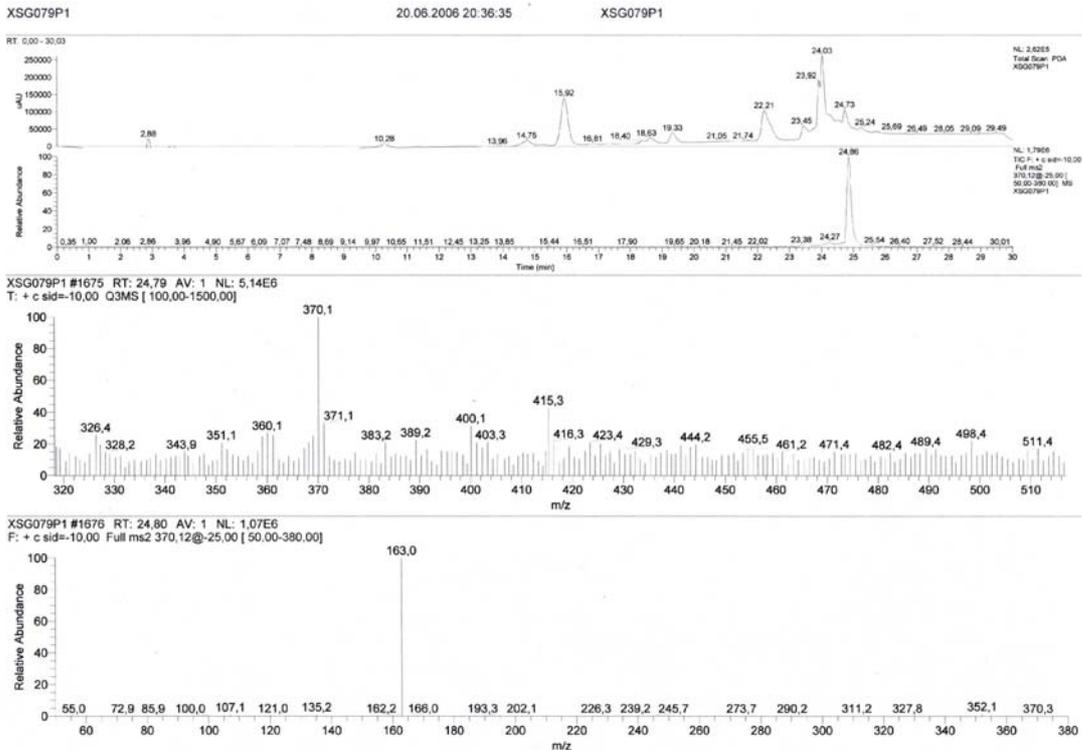


Novclobiocinsäure 219A

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

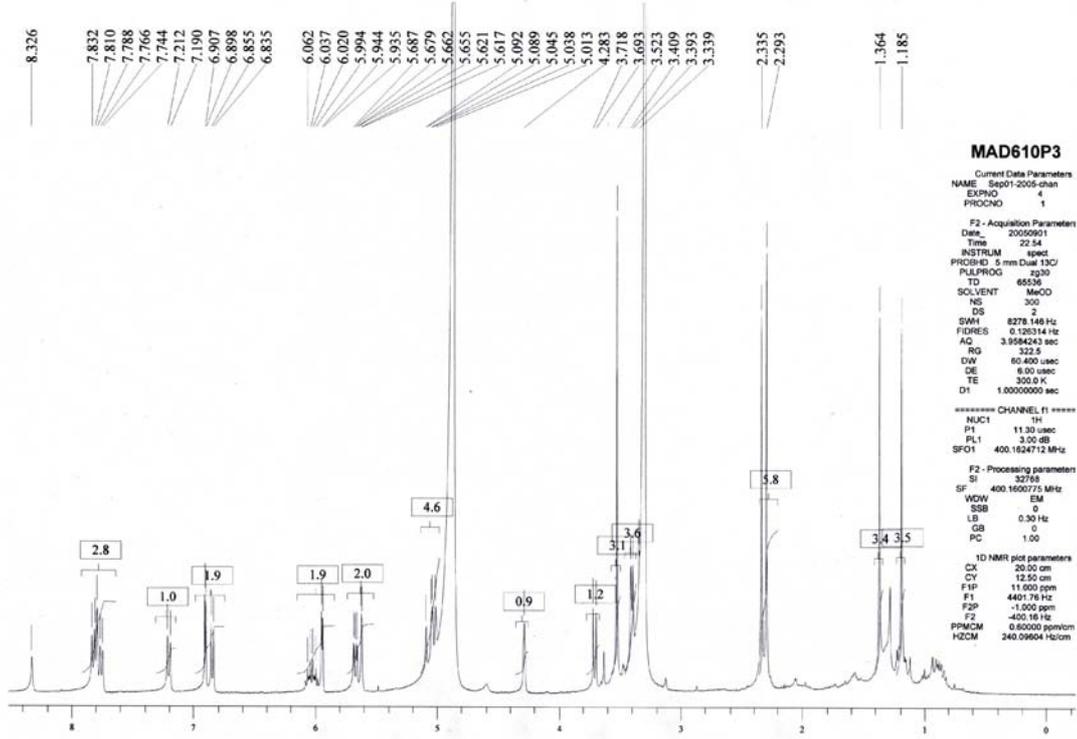


LC-MS/MS-Analyse

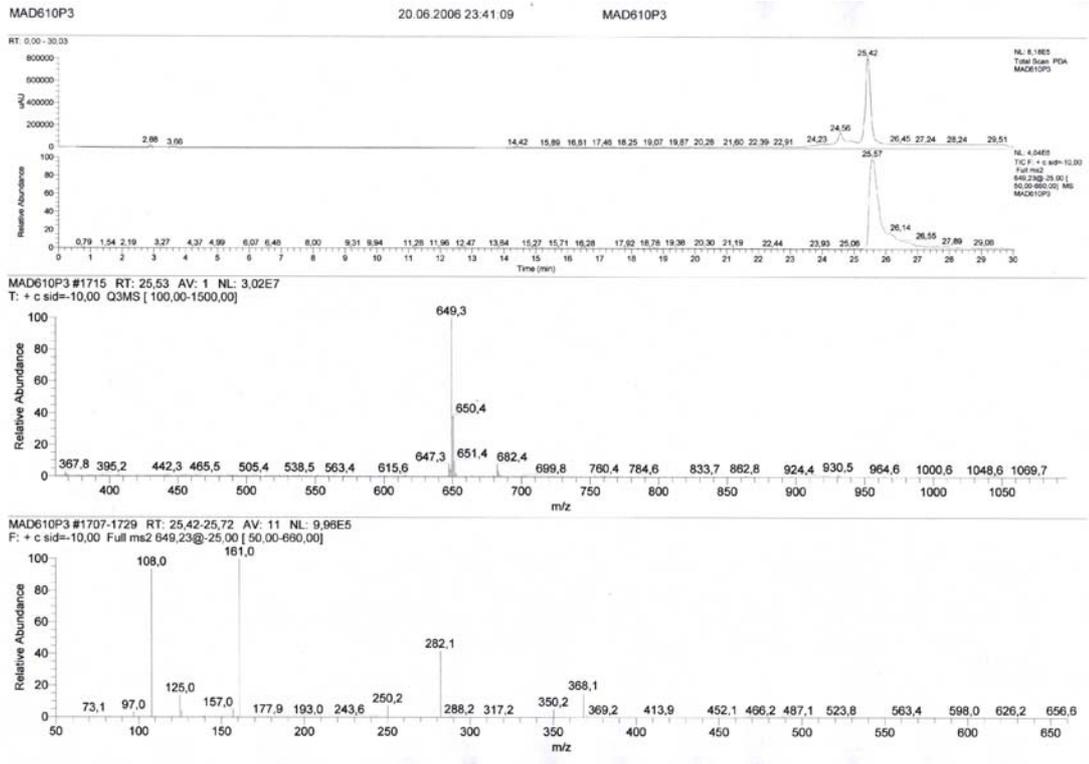


Novclobiocin 225

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

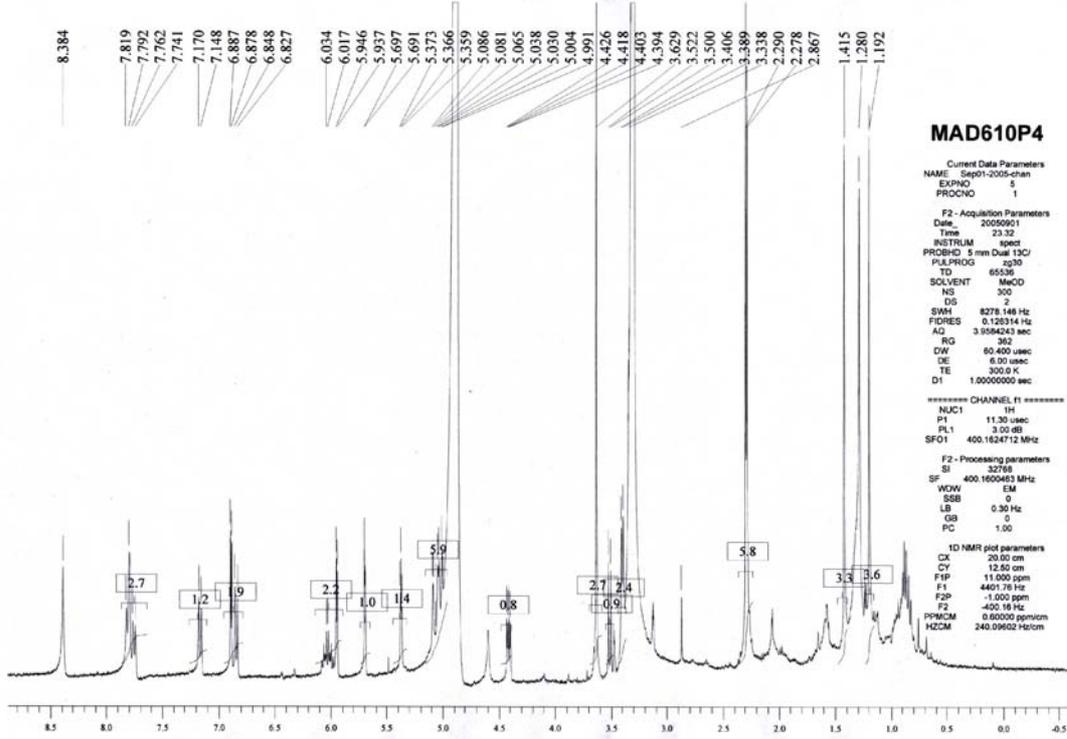


LC-MS/MS-Analyse

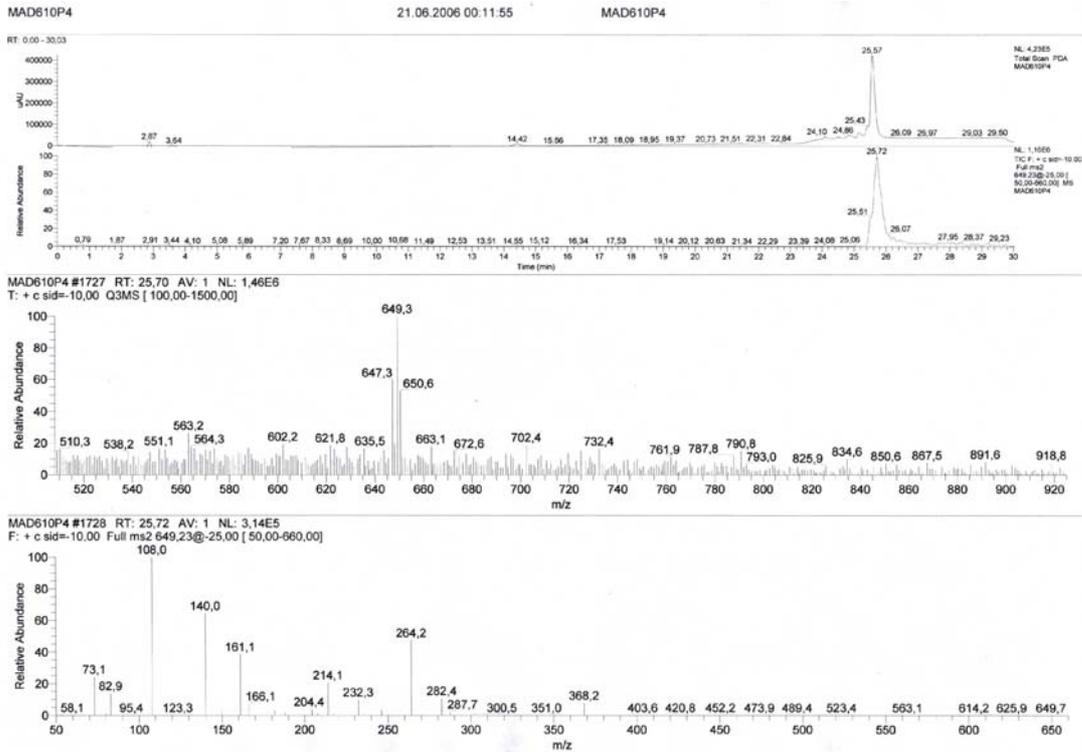


Novclobiocin 226

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

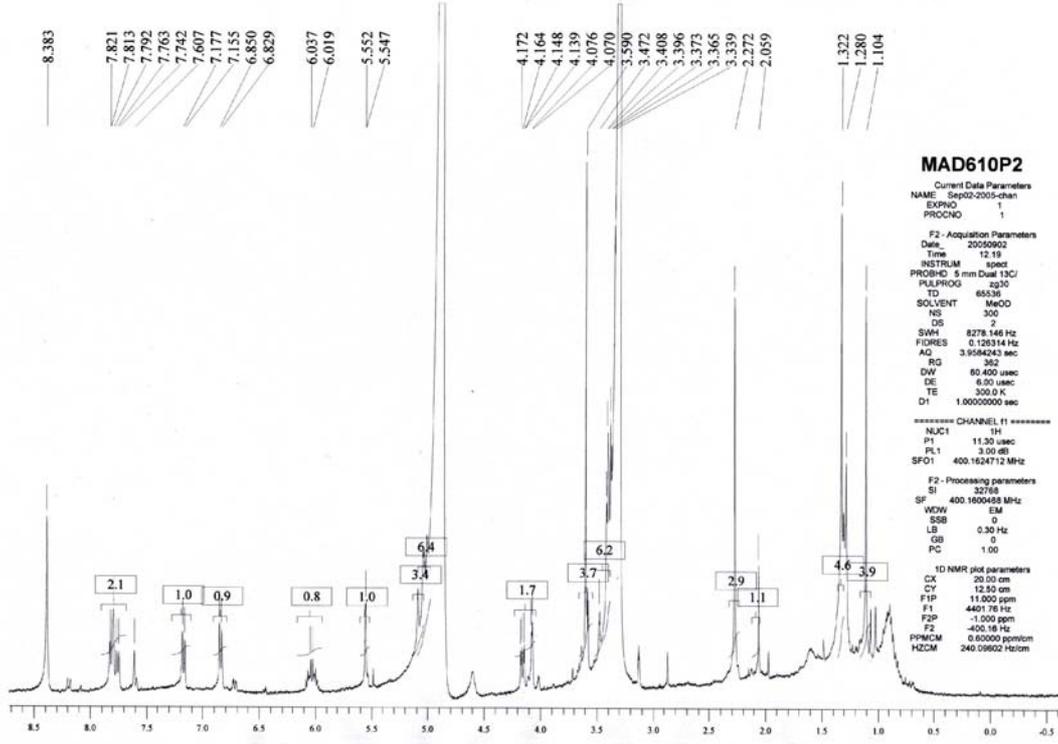


LC-MS/MS-Analyse

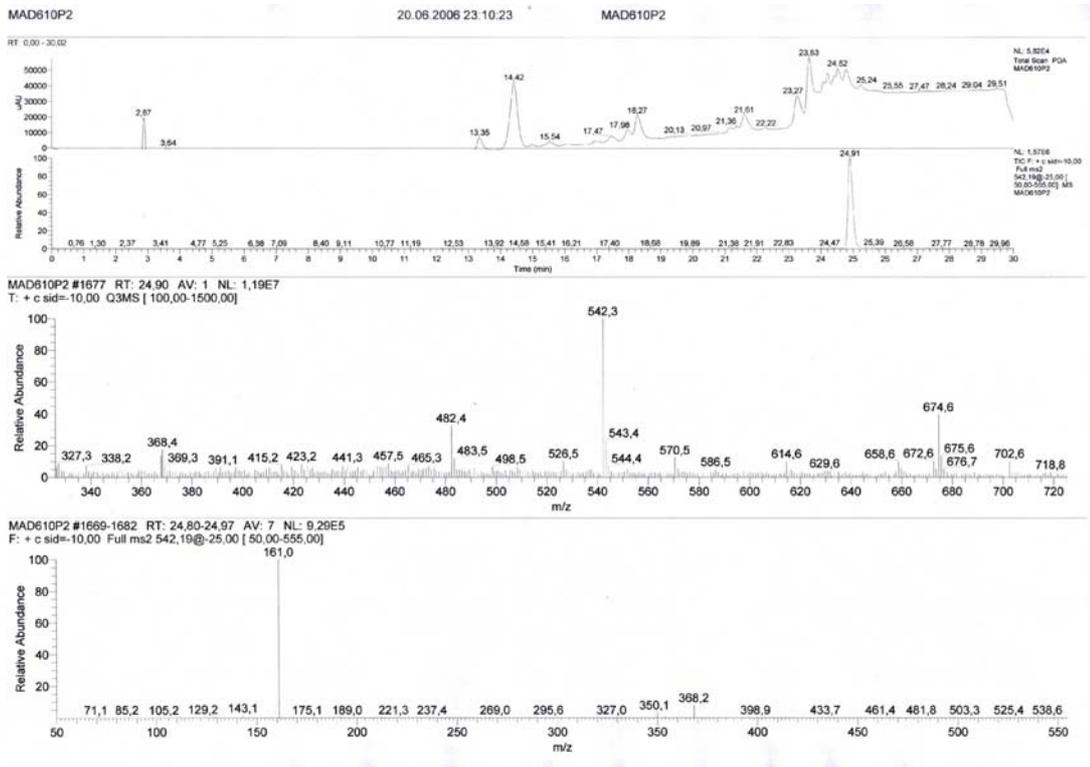


Novclobiocin 227

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

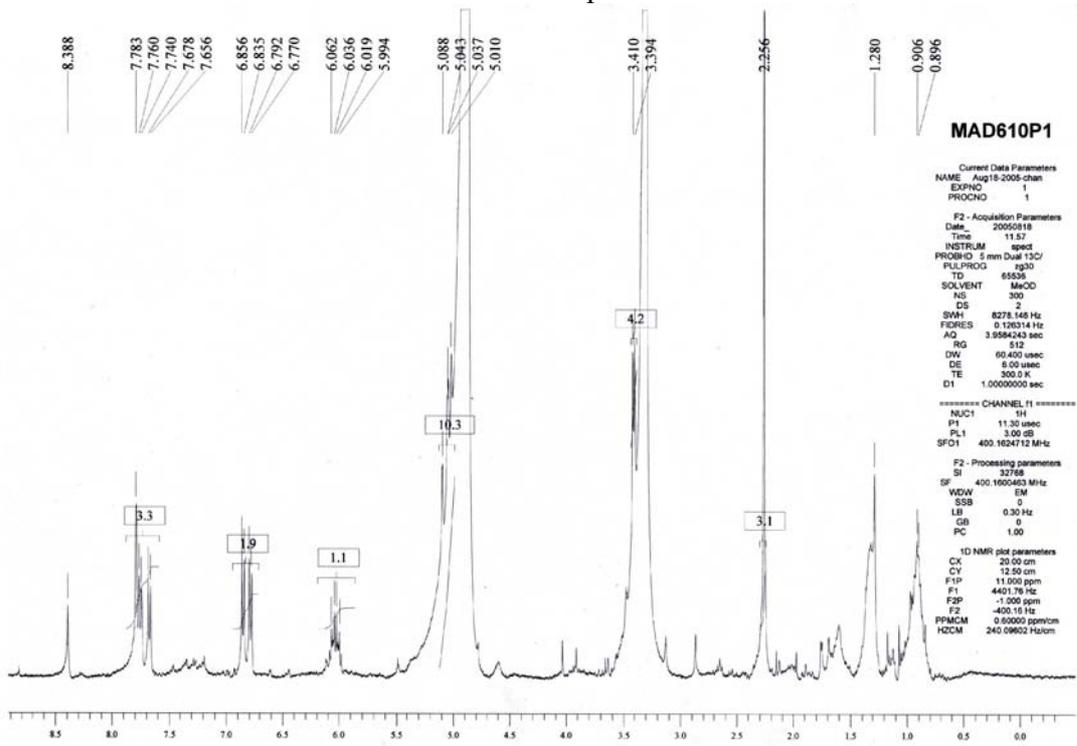


LC-MS/MS-Analyse

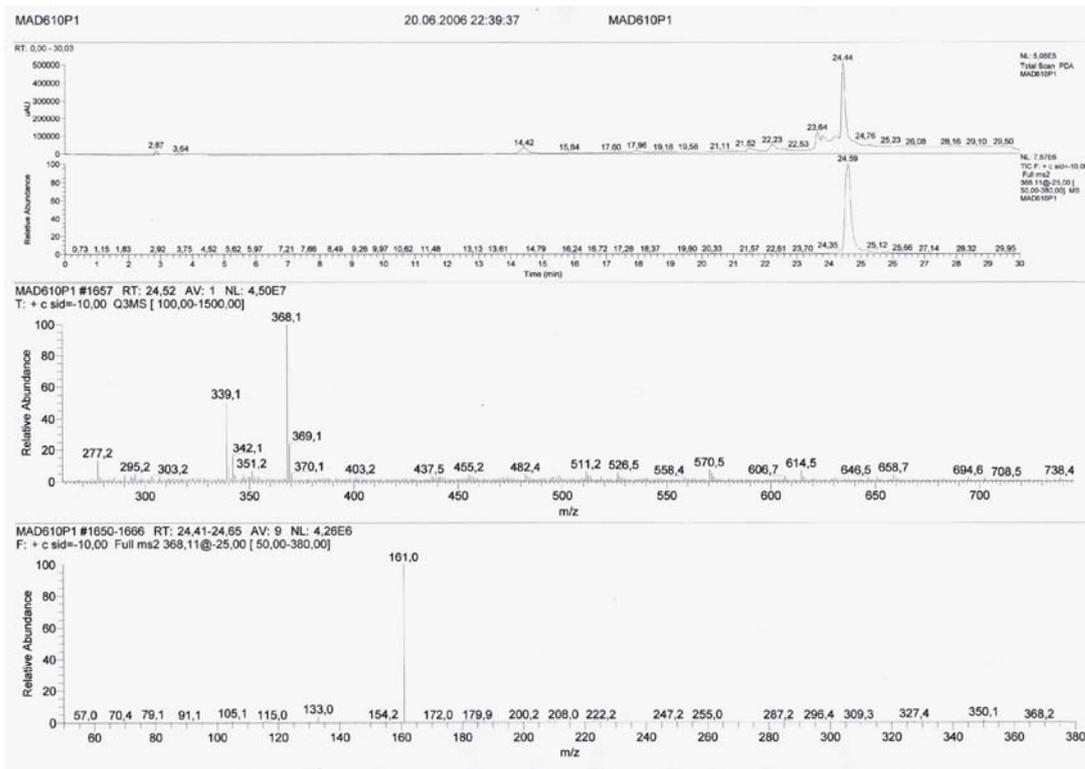


Novclobiocin 228

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

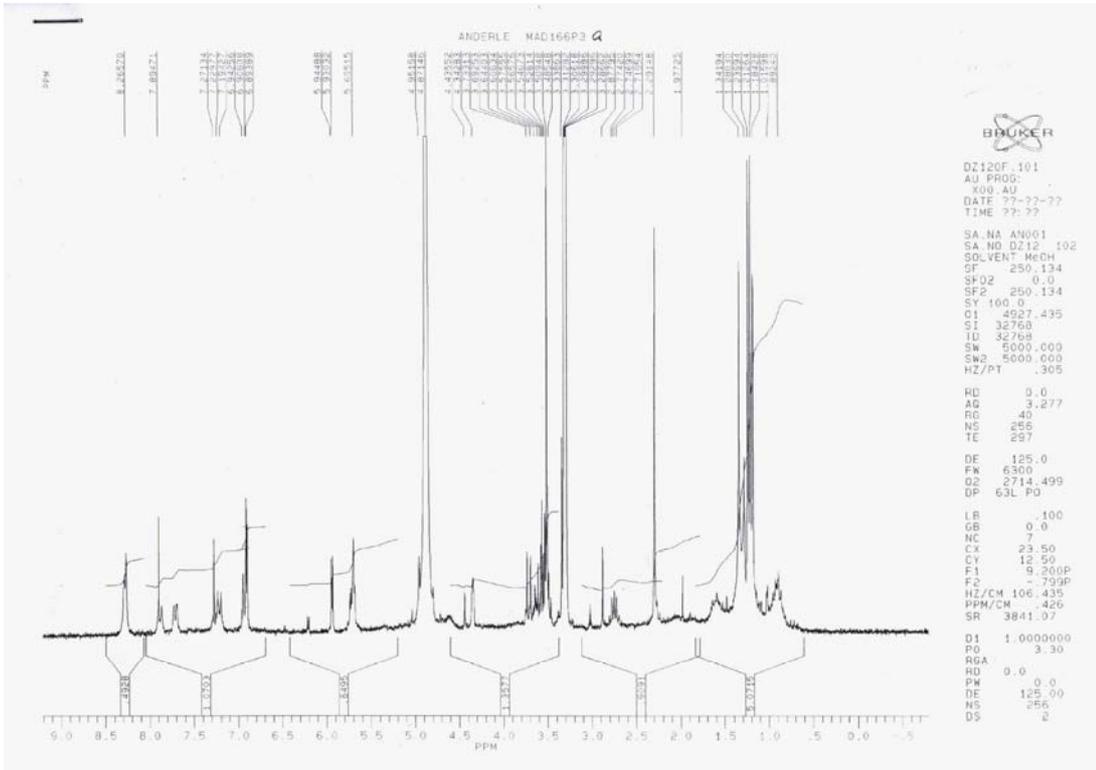


LC-MS/MS-Analyse

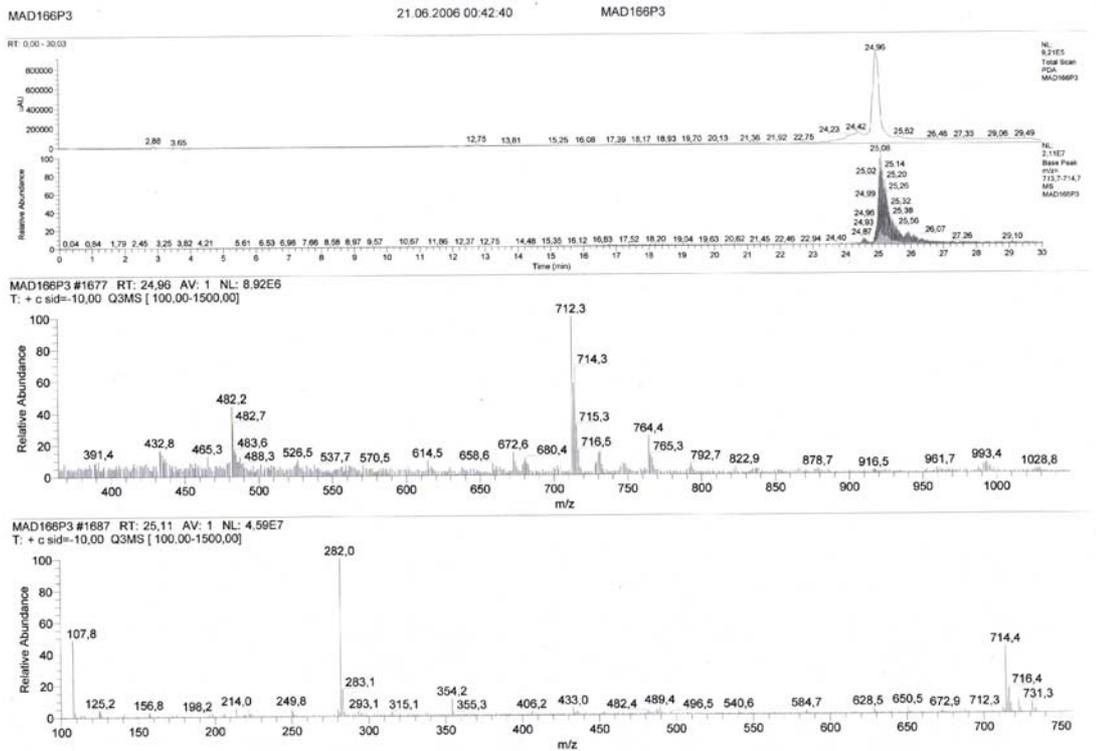


Novclobiocin 241

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

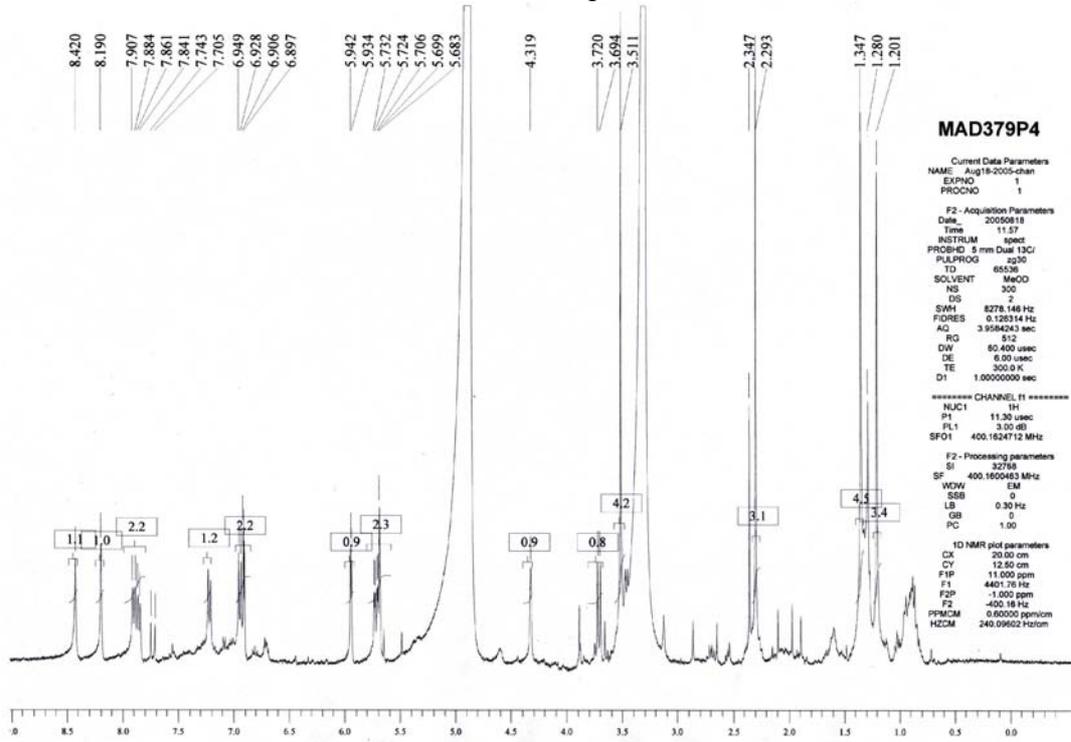


LC-MS/MS-Analyse

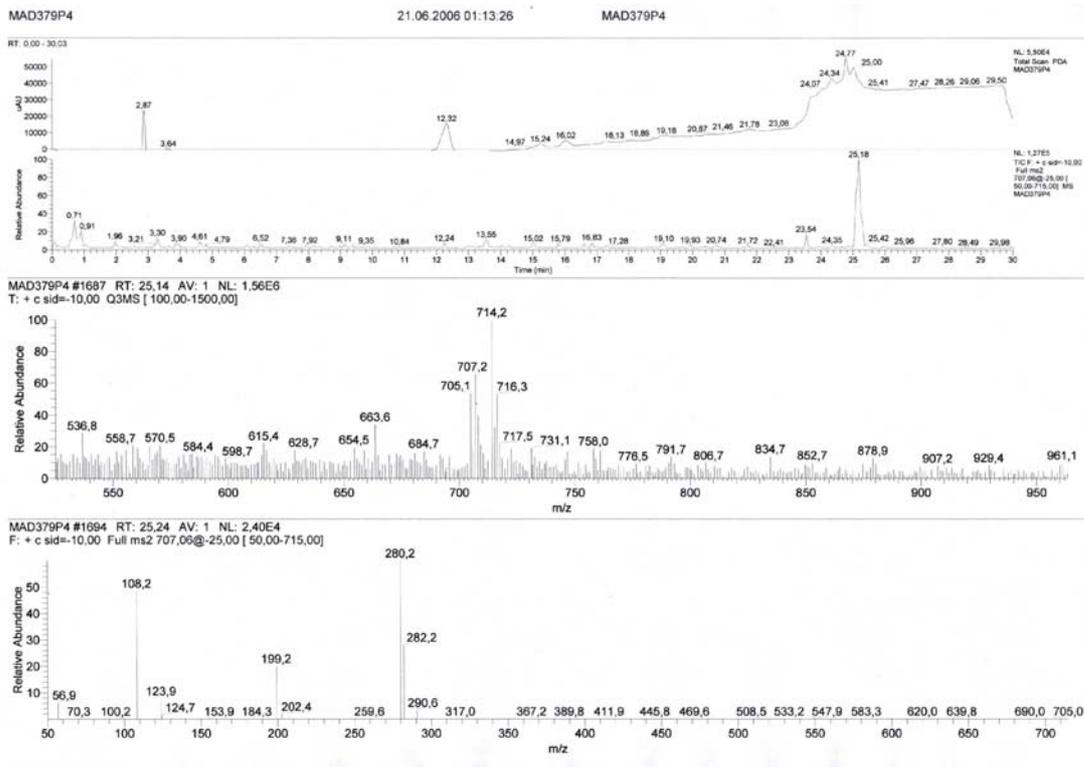


Novclobiocin 281

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

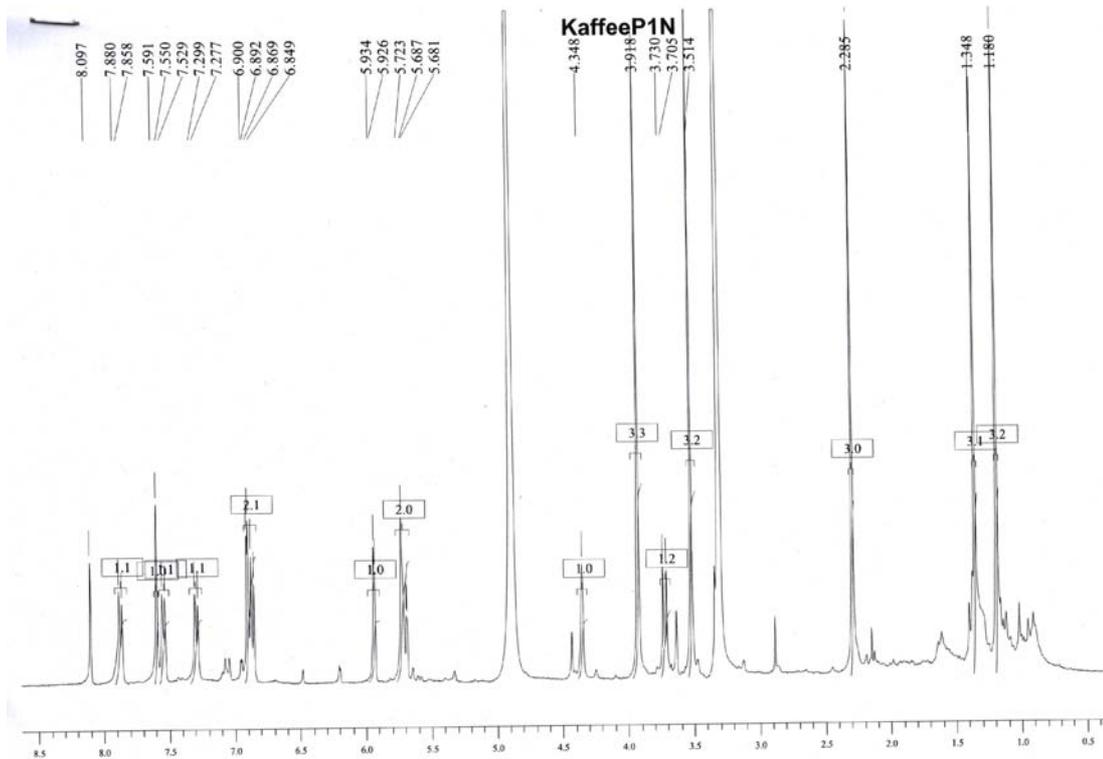


LC-MS/MS-Analyse

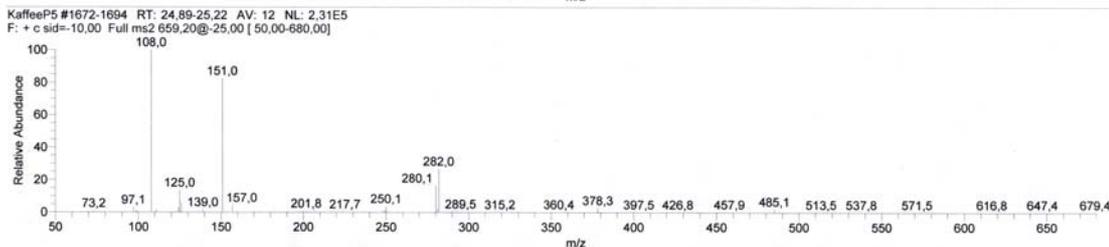
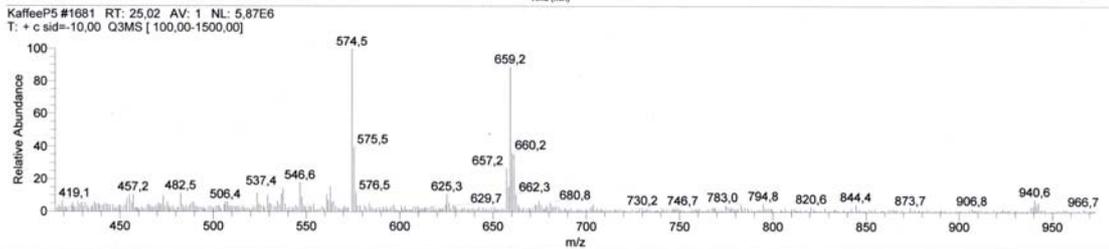
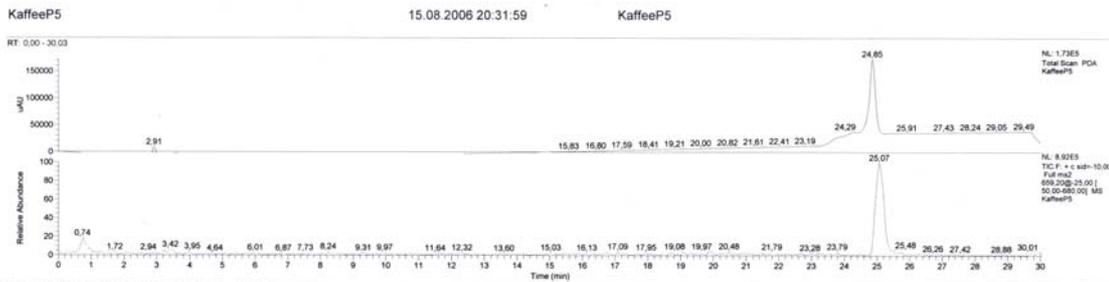


Novclobiocin 311

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

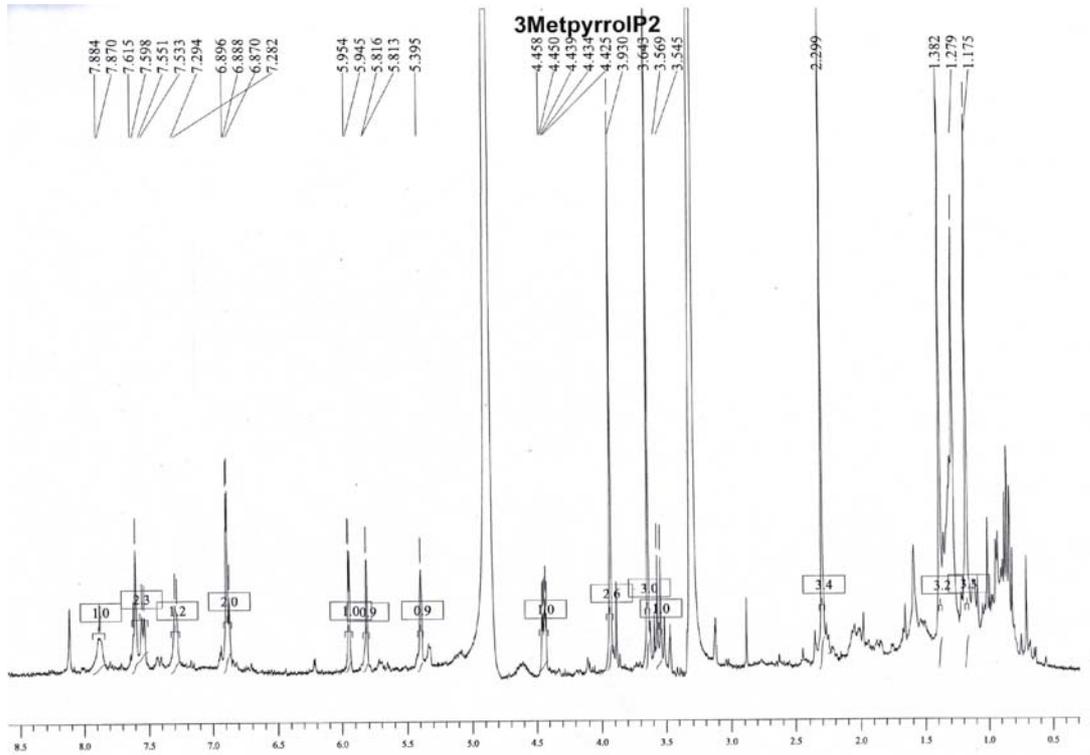


LC-MS/MS-Analyse

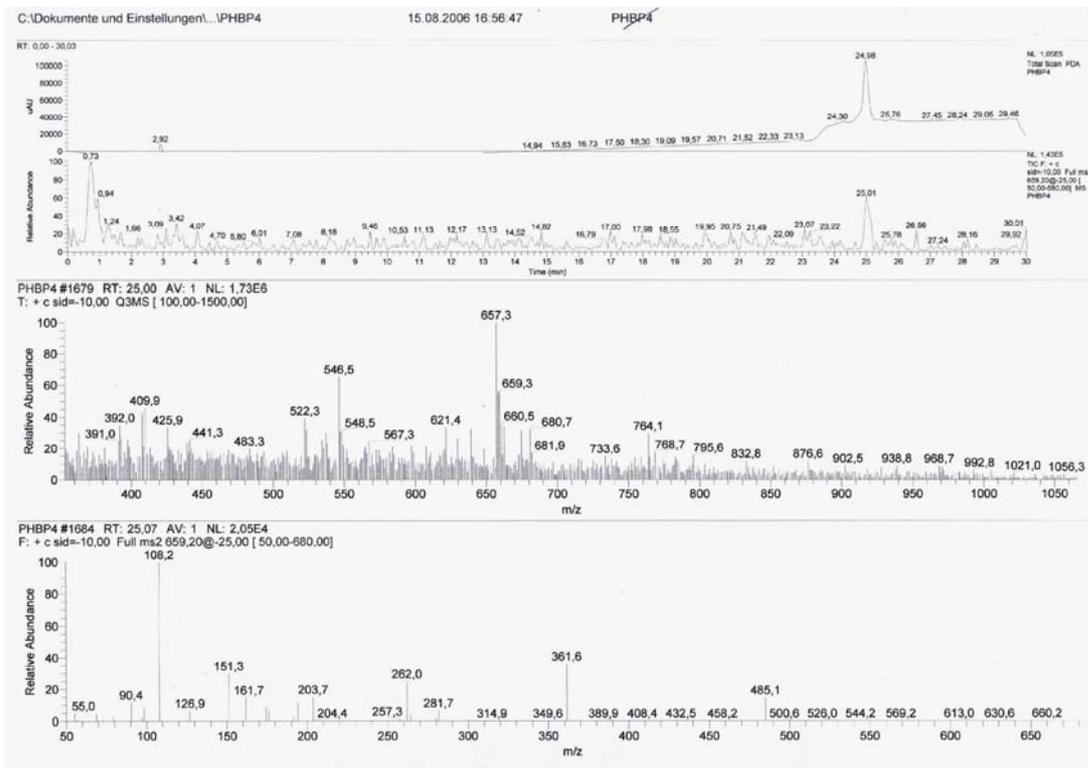


Novclobiocin 312

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

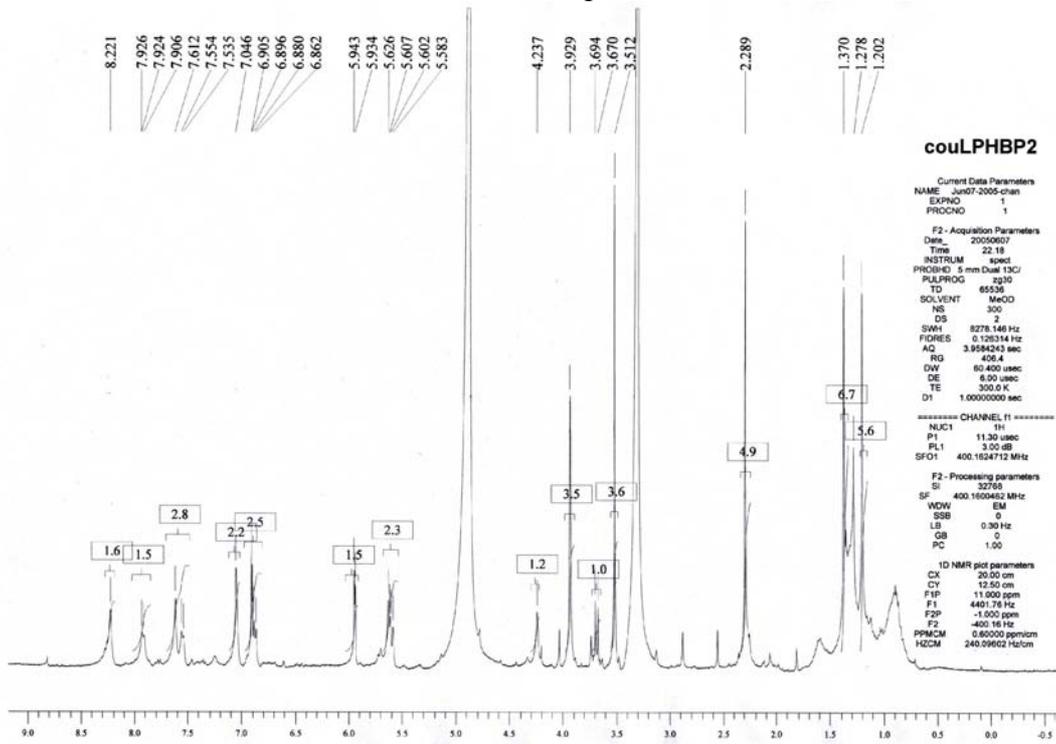


LC-MS/MS-Analyse

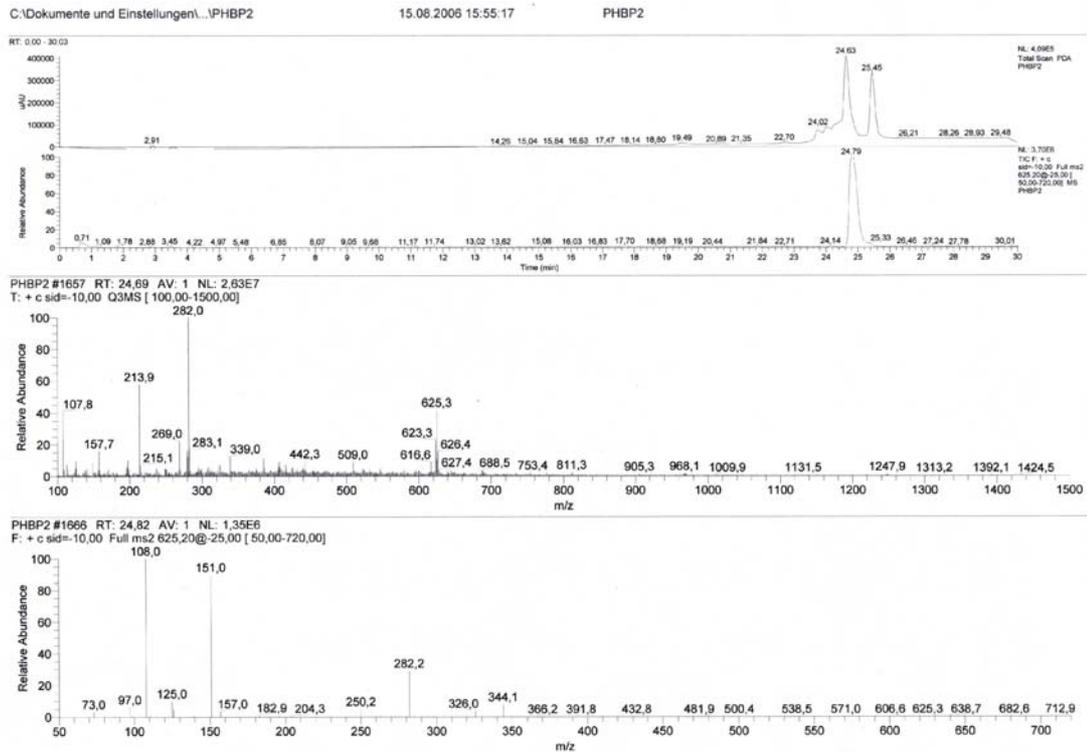


Novclobiocin 313

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

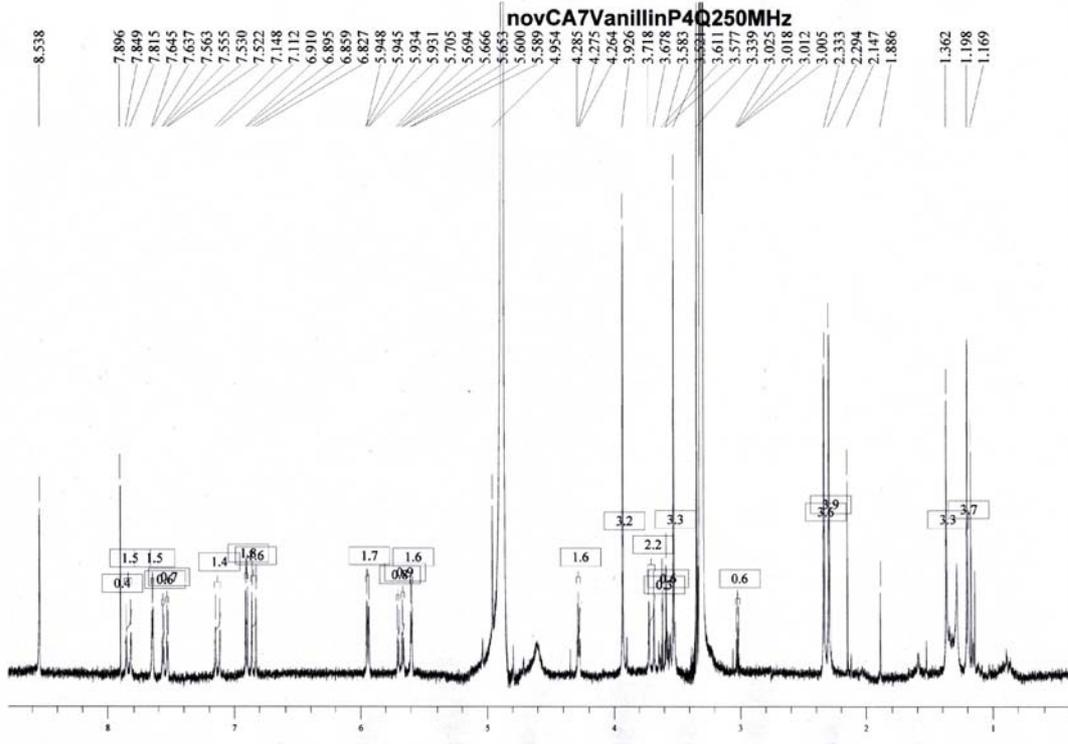


LC-MS/MS-Analyse

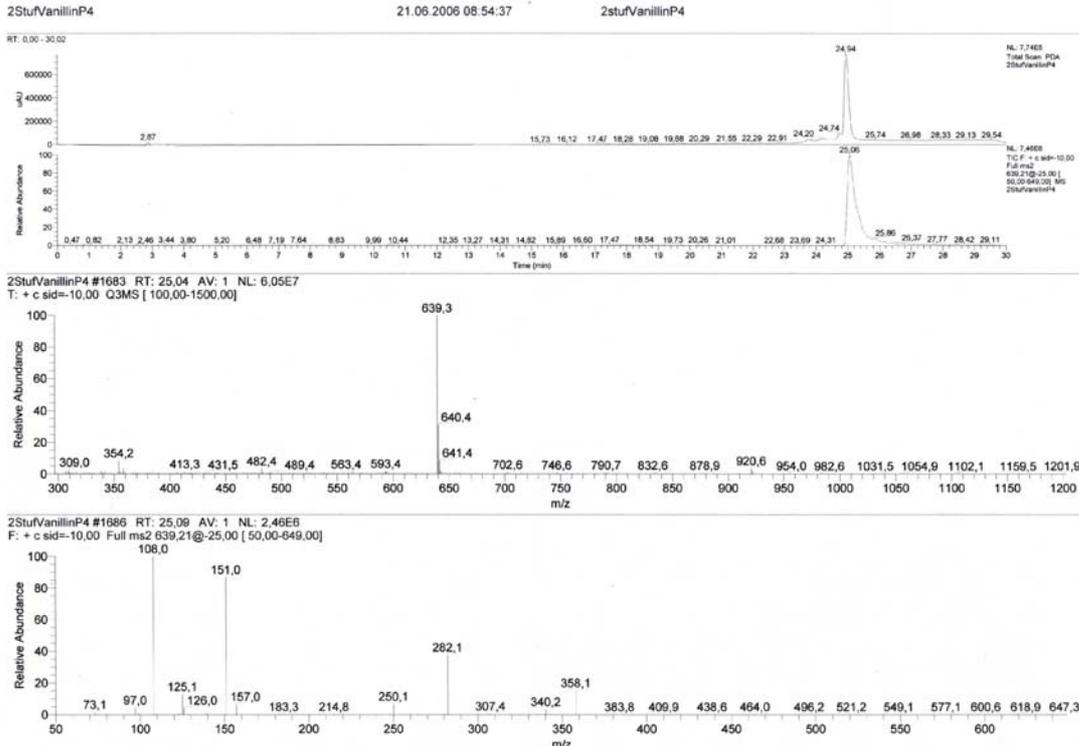


Novclobiocin 314

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

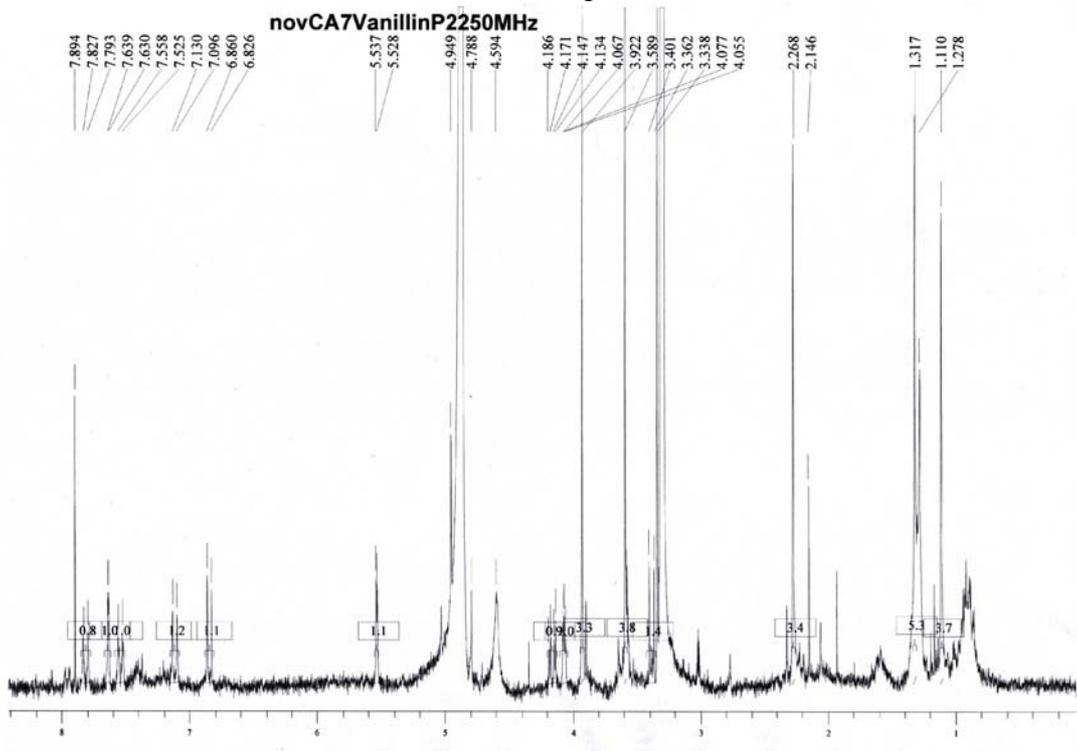


LC-MS/MS-Analyse

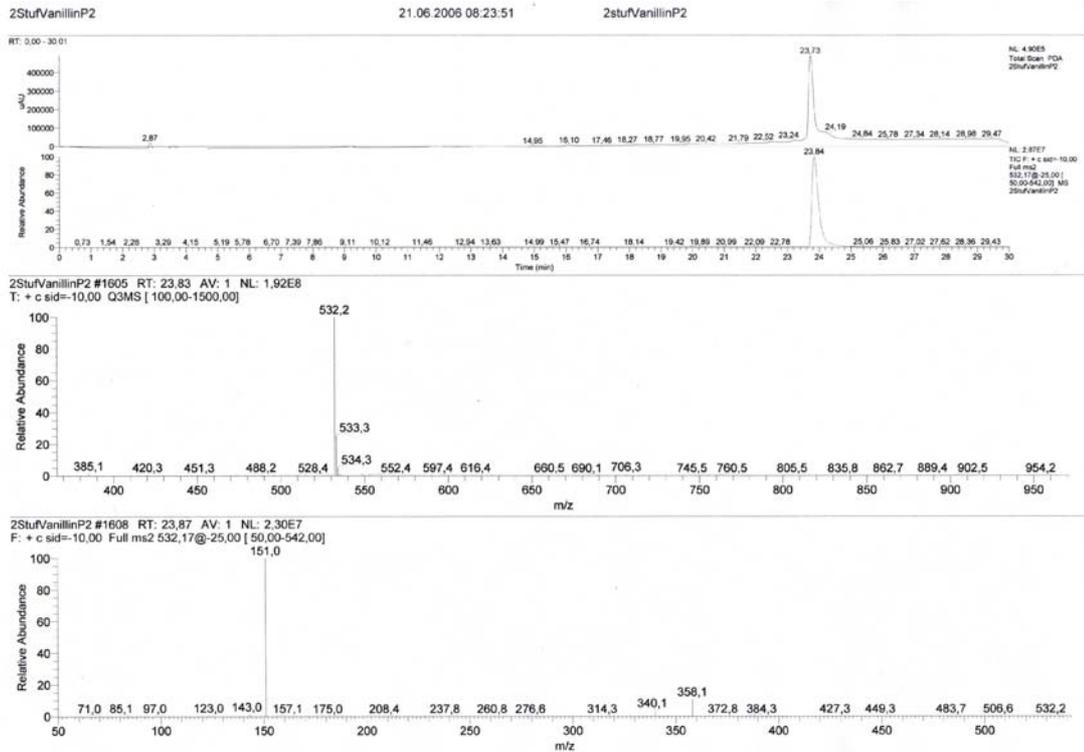


Novclobiocin 315

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

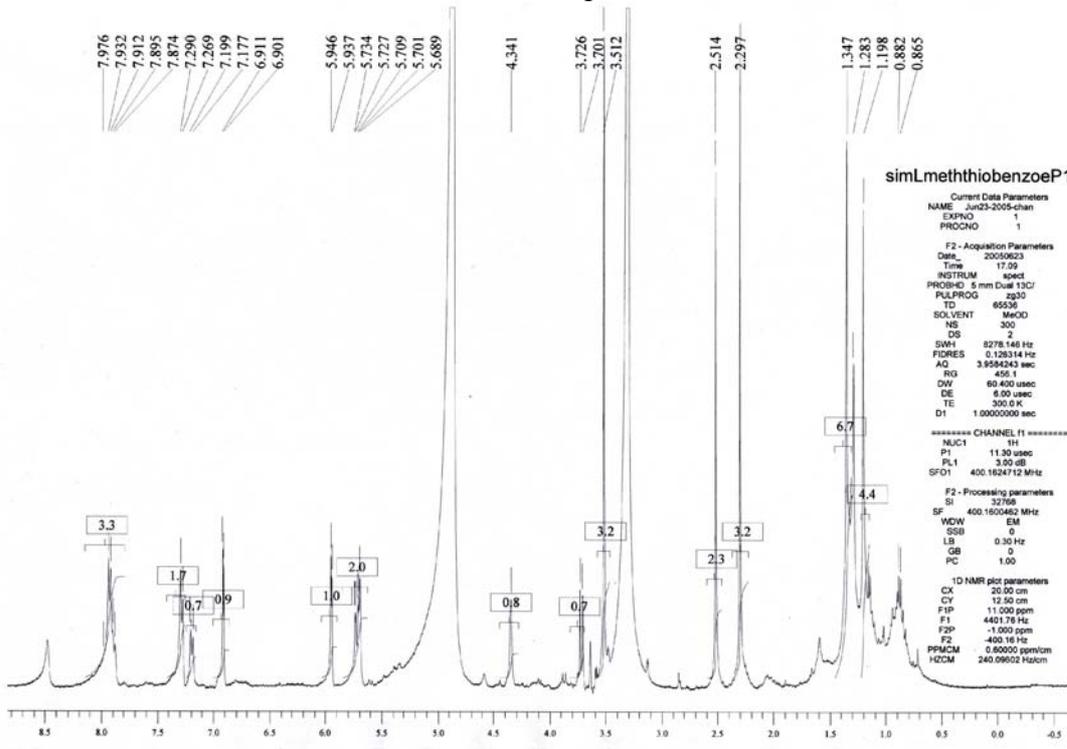


LC-MS/MS-Analyse

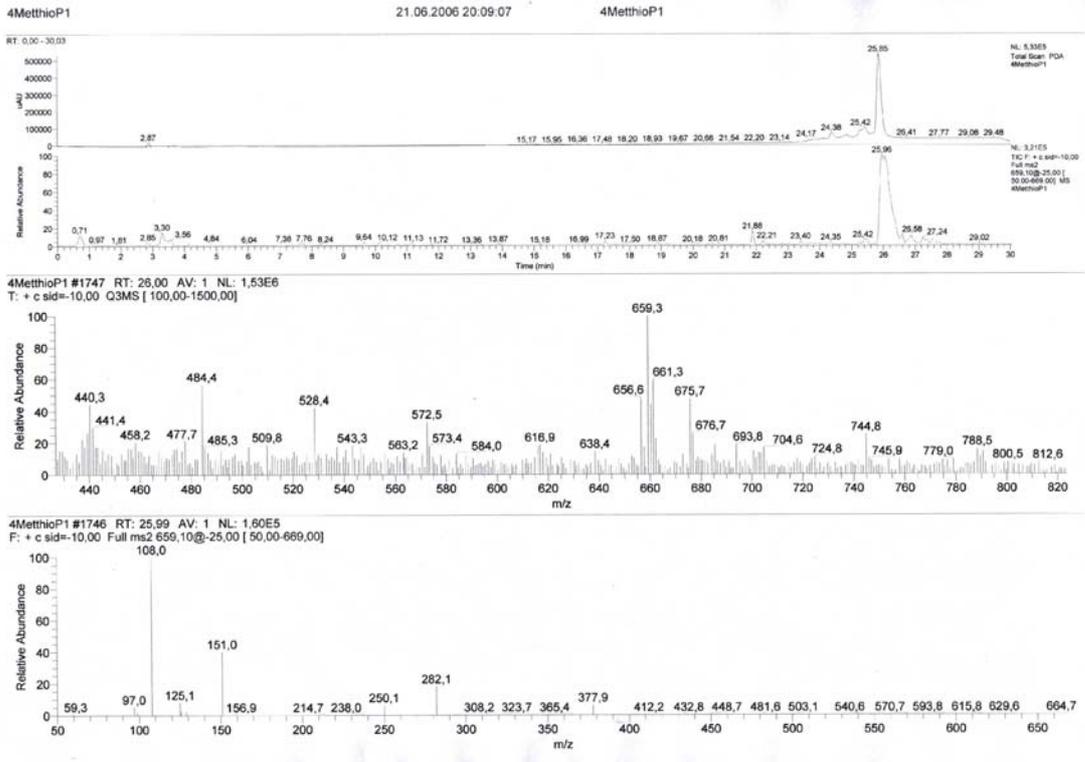


Novclobiocin 371

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

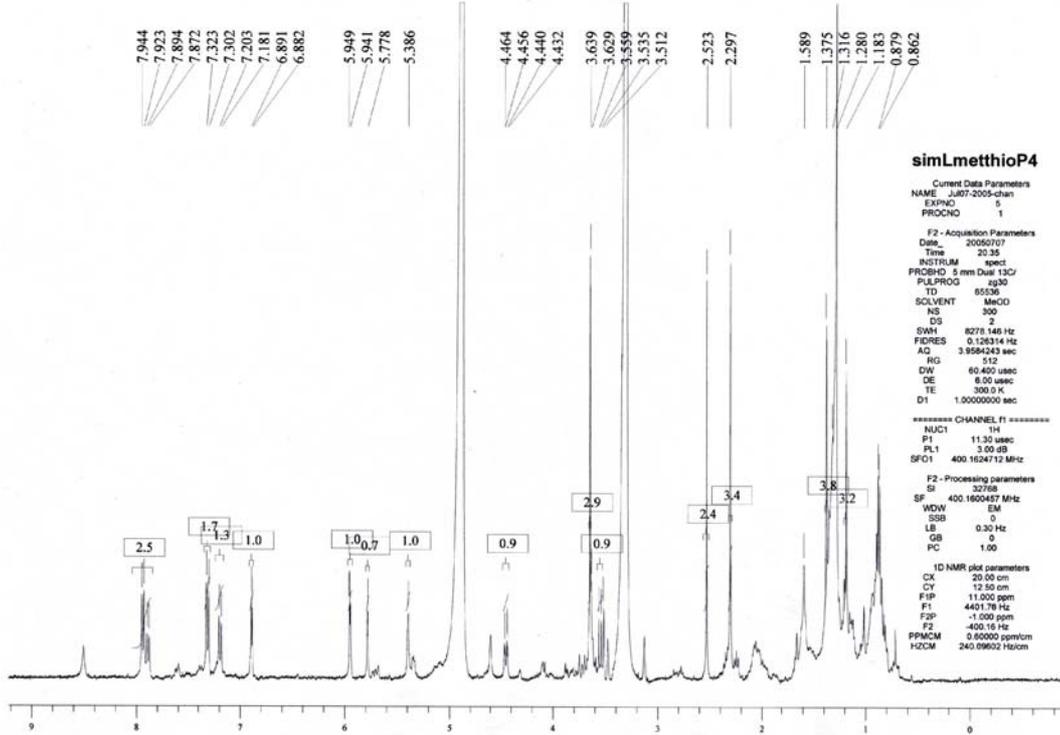


LC-MS/MS-Analyse

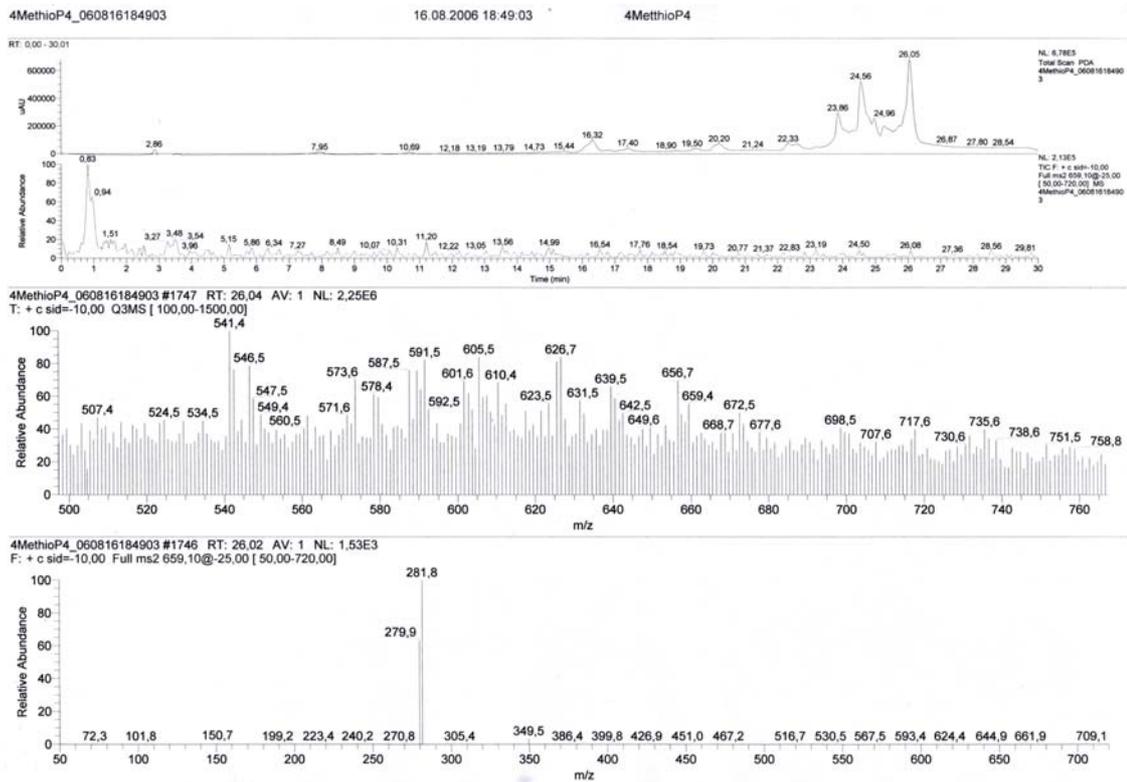


Novclobiocin 372

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

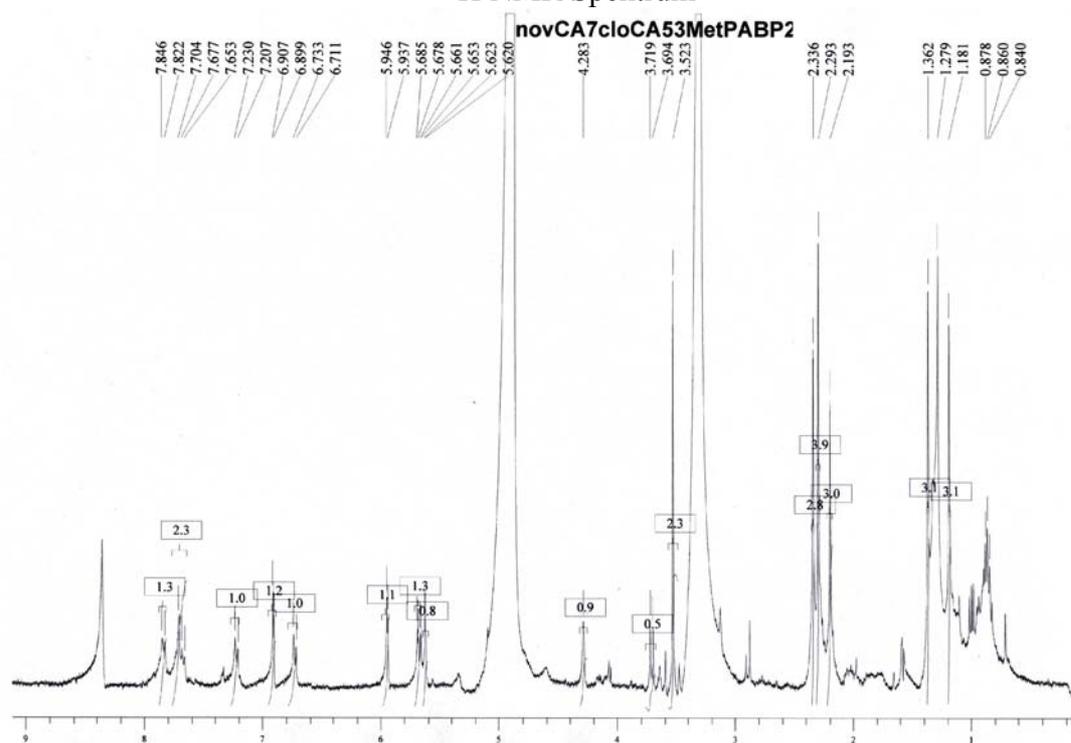


LC-MS/MS-Analyse

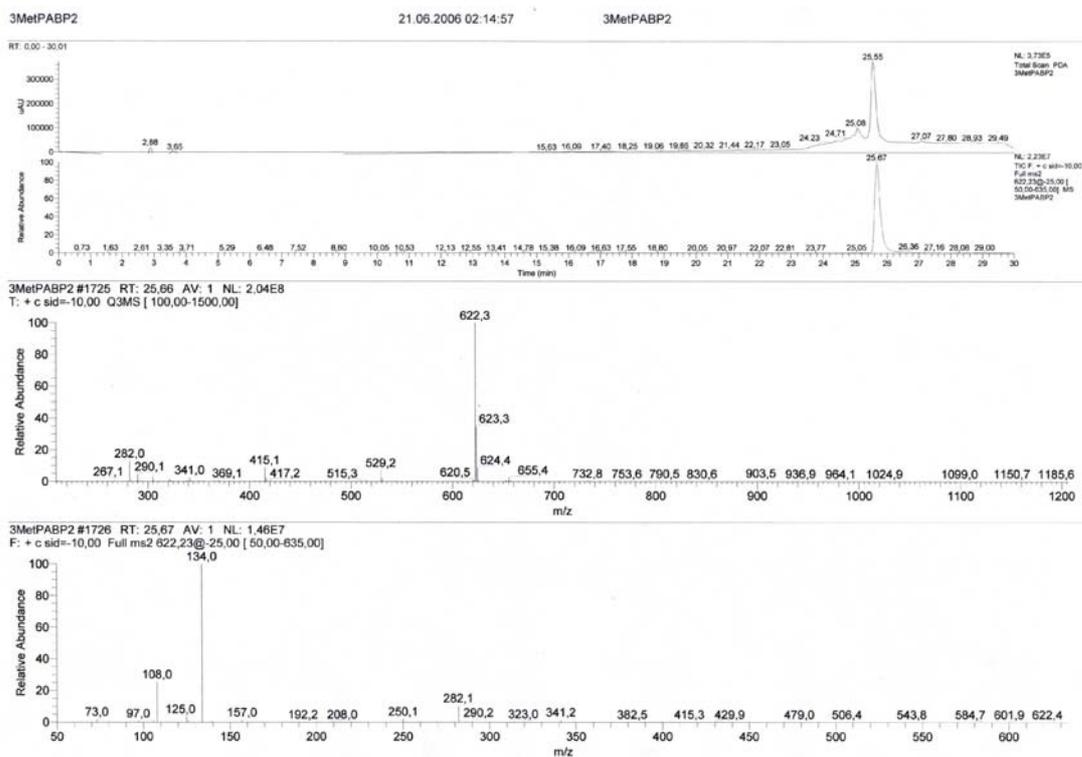


Novclobiocin 386

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

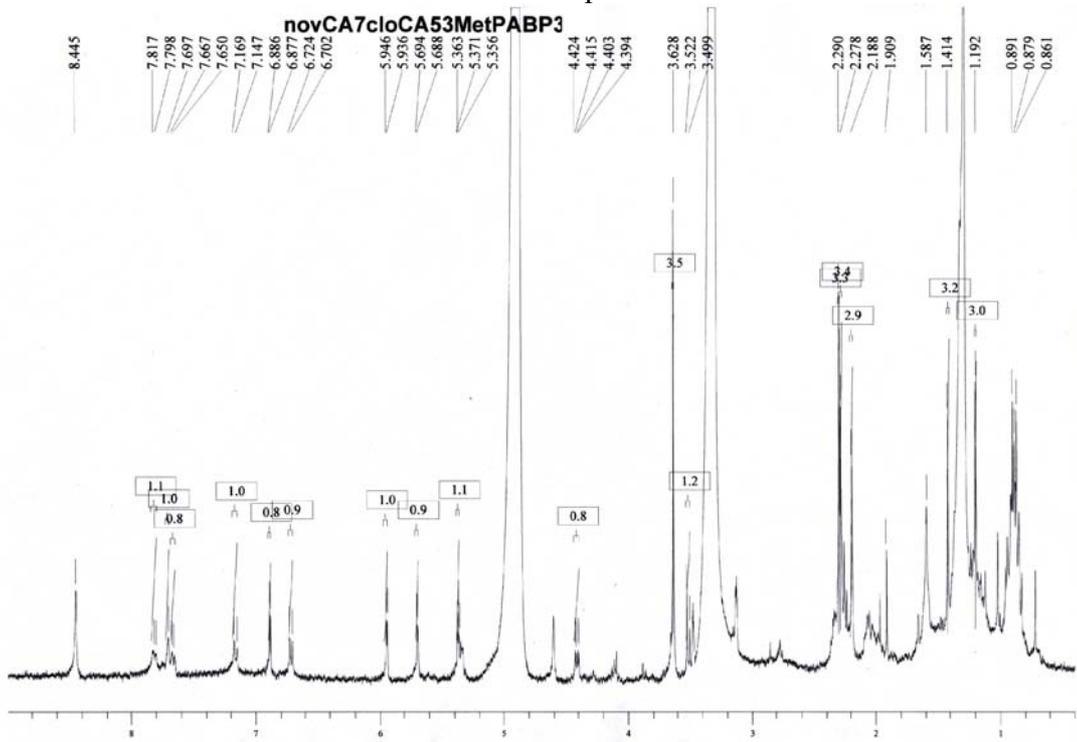


LC-MS/MS-Analyse

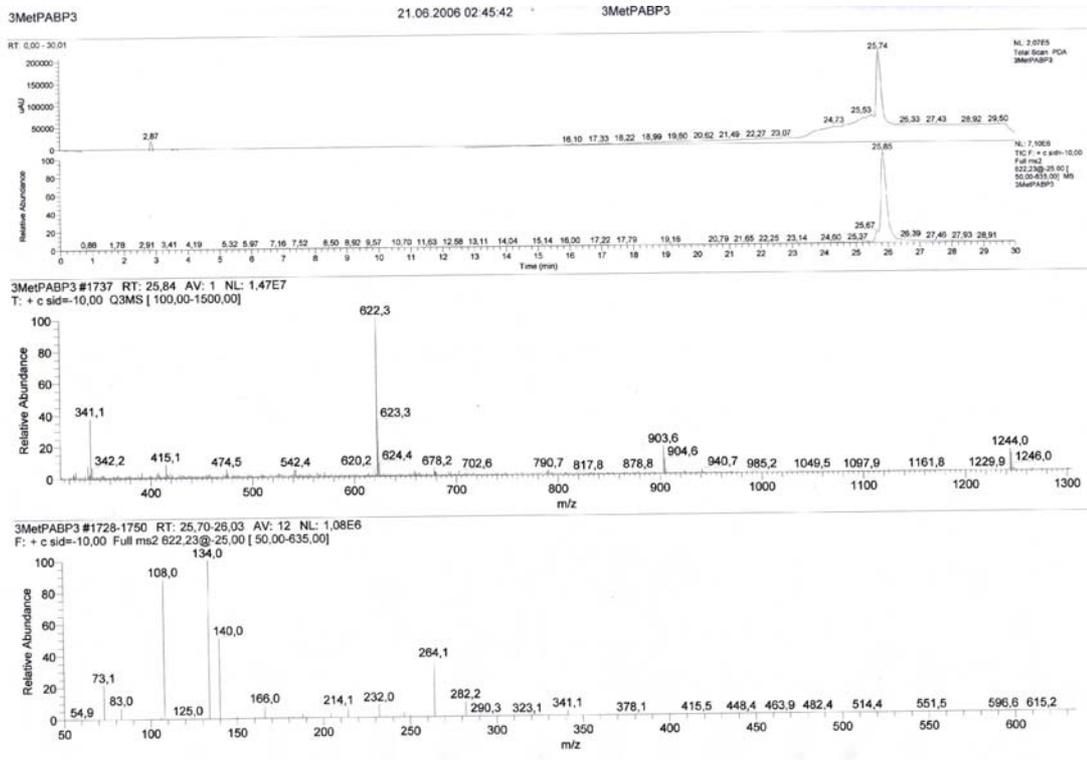


Novclobiocin 387

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

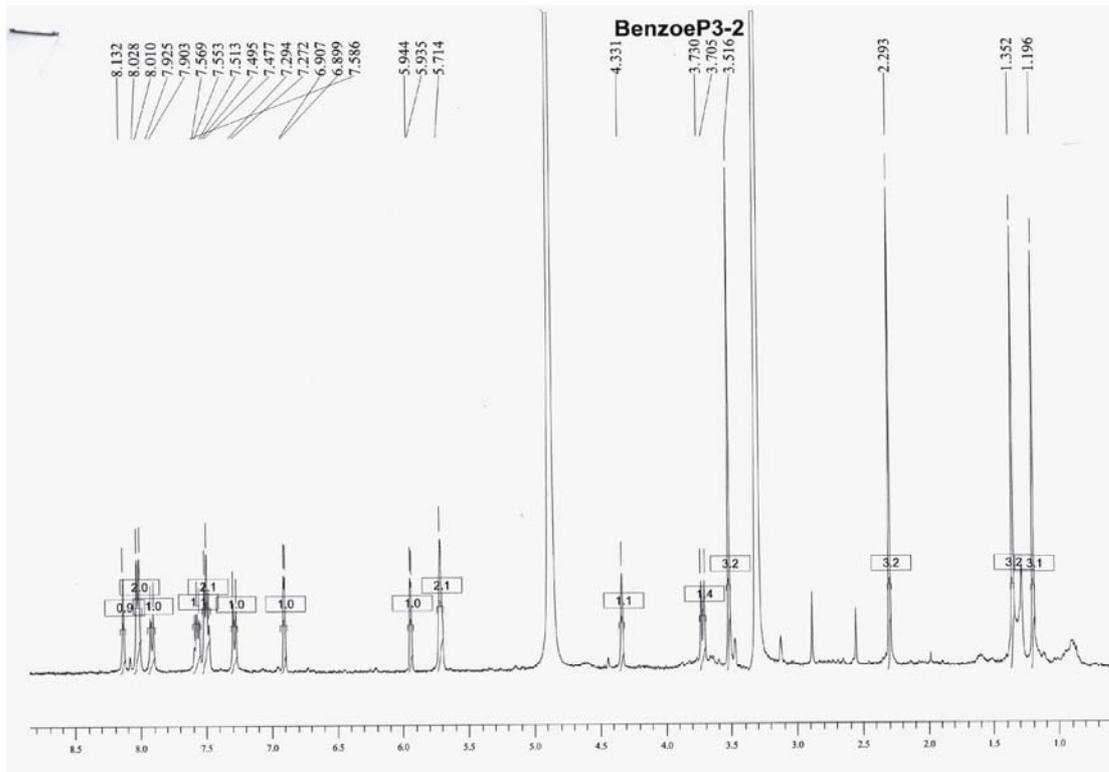


LC-MS/MS-Analyse

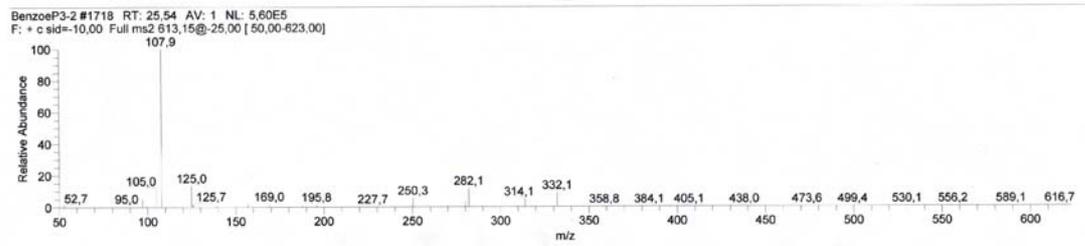
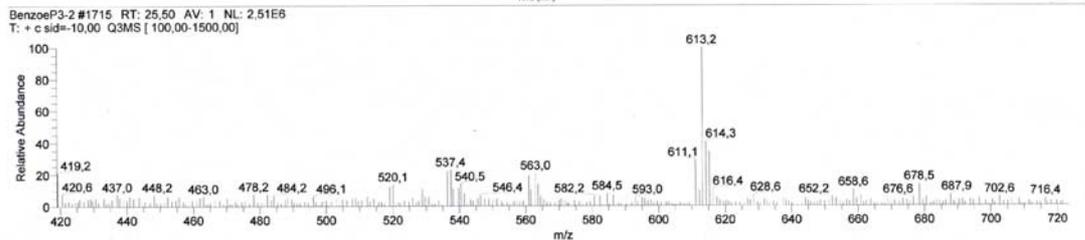
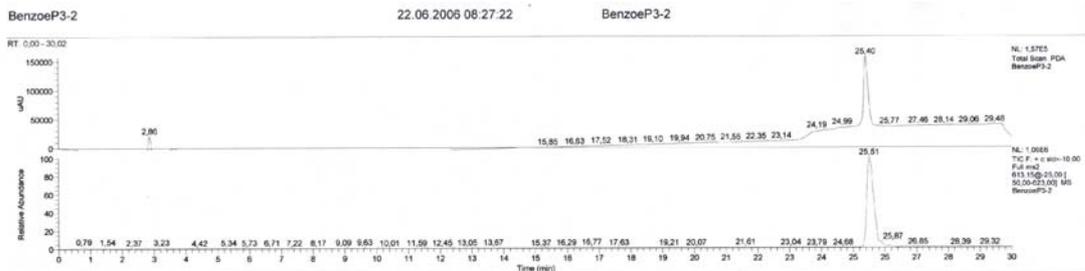


**Novclobiocin 601**

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

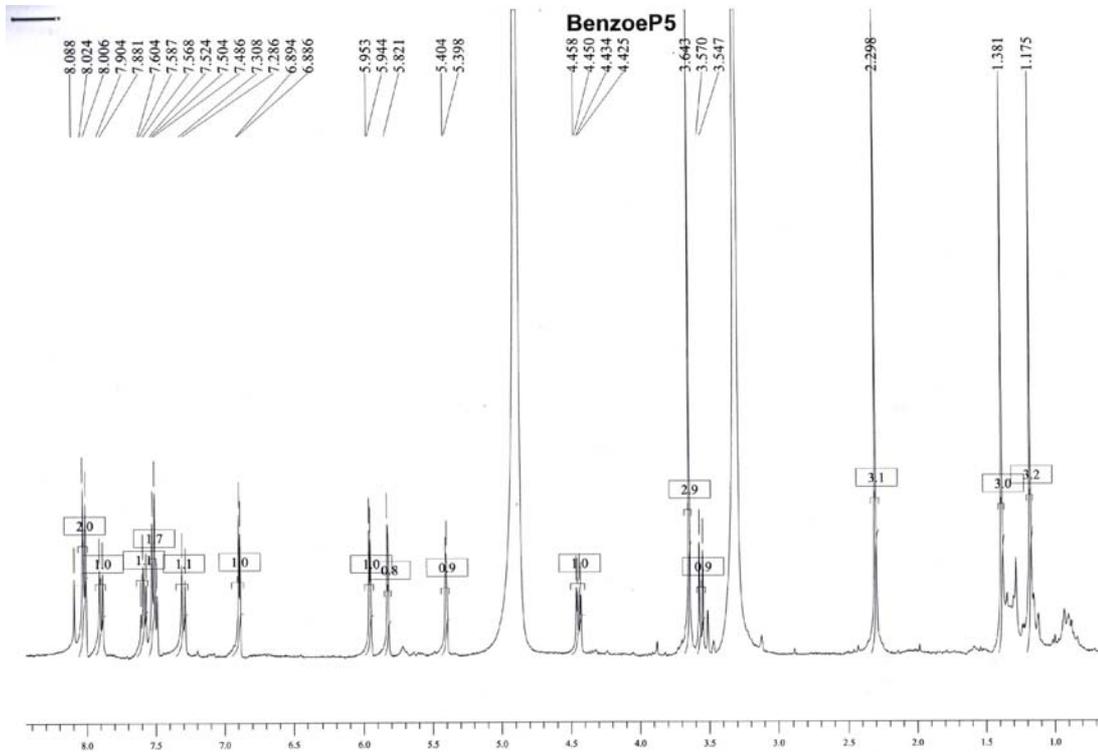


LC-MS/MS-Analyse

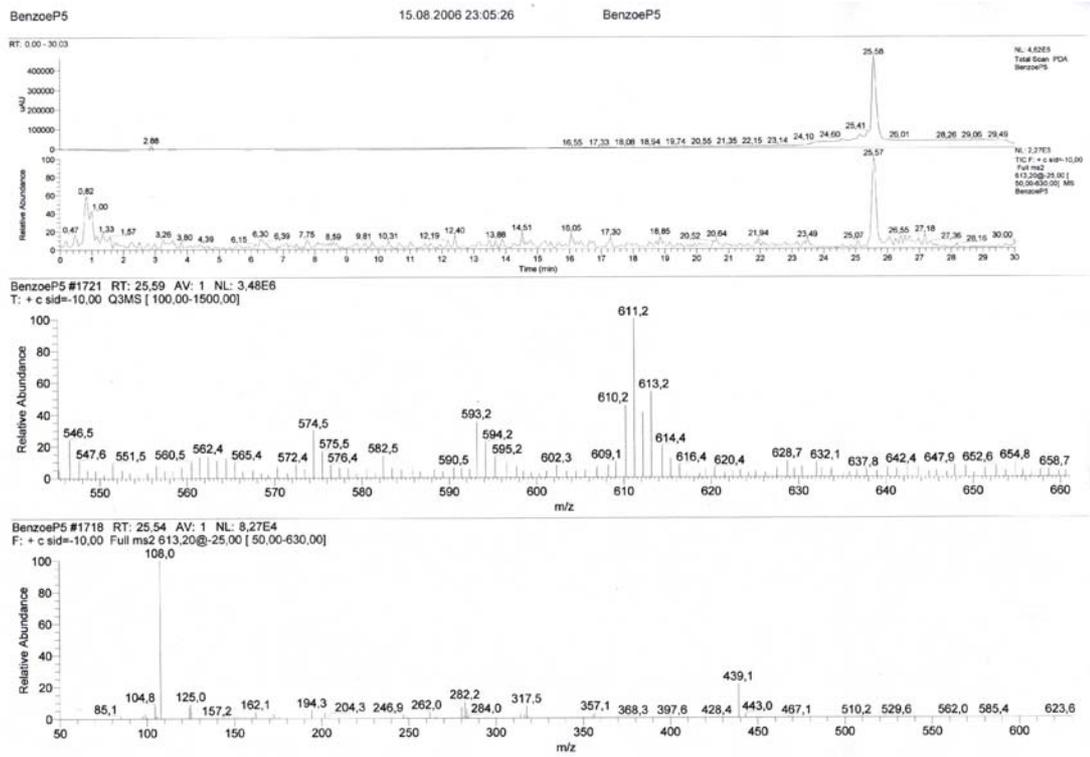


Novclobiocin 602

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

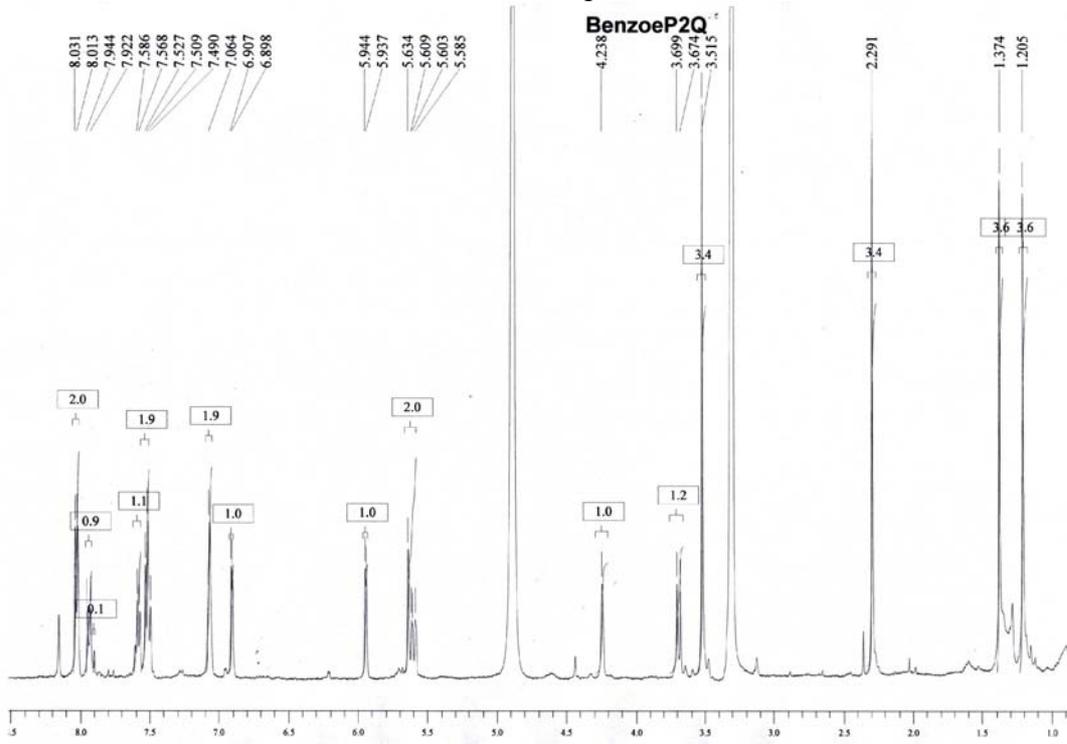


LC-MS/MS-Analyse

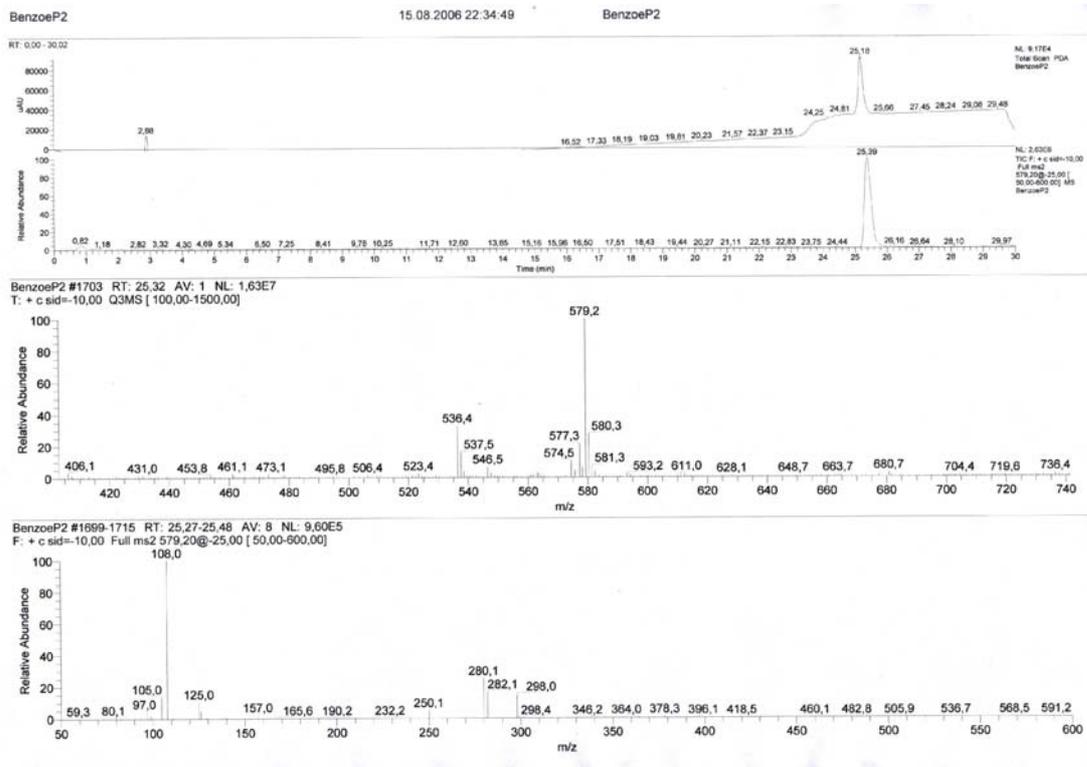


Novclobiocin 603

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

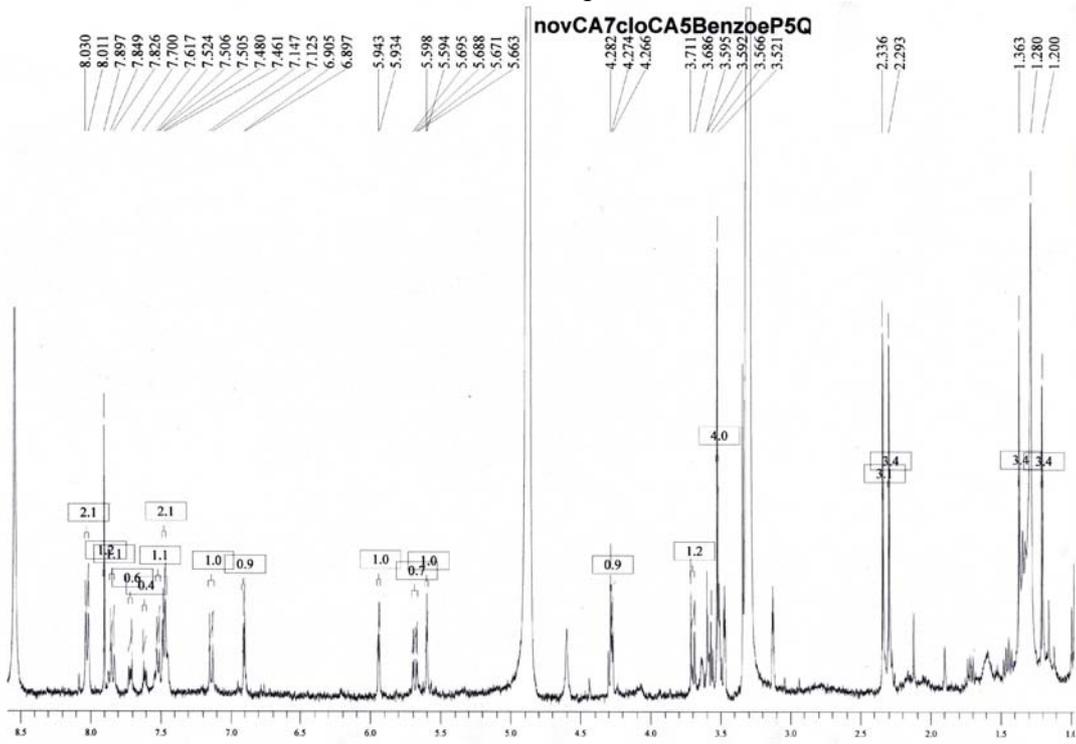


LC-MS/MS-Analyse

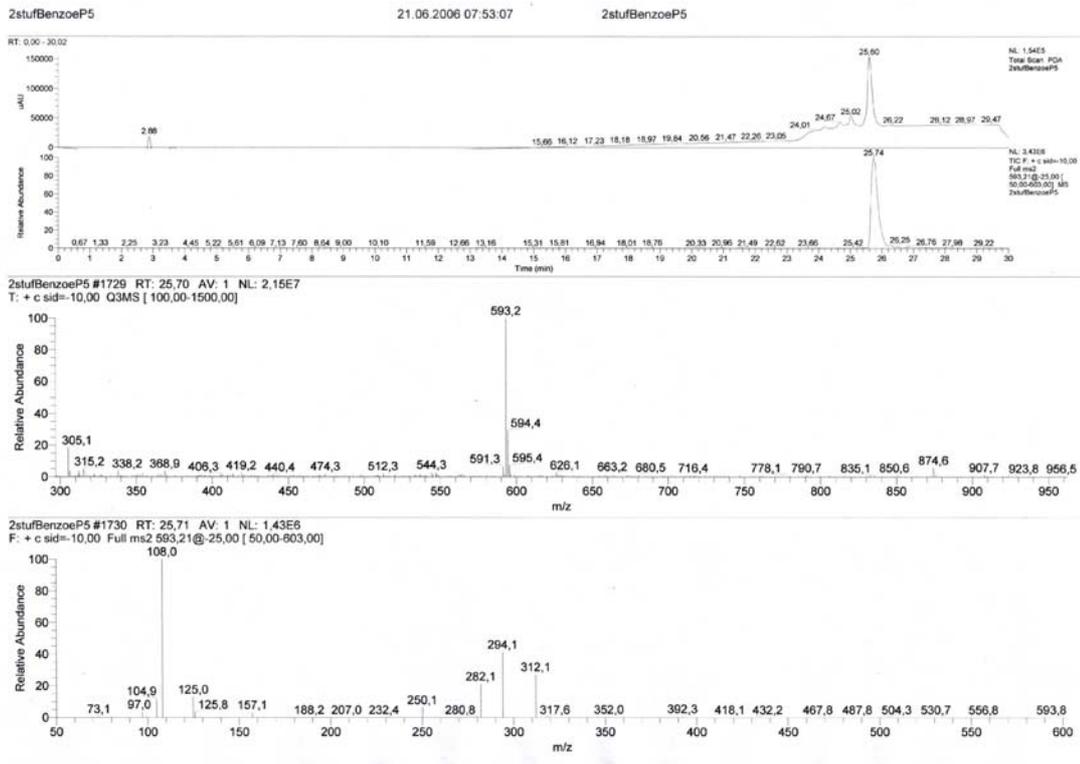


**Novclobiocin 604**

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

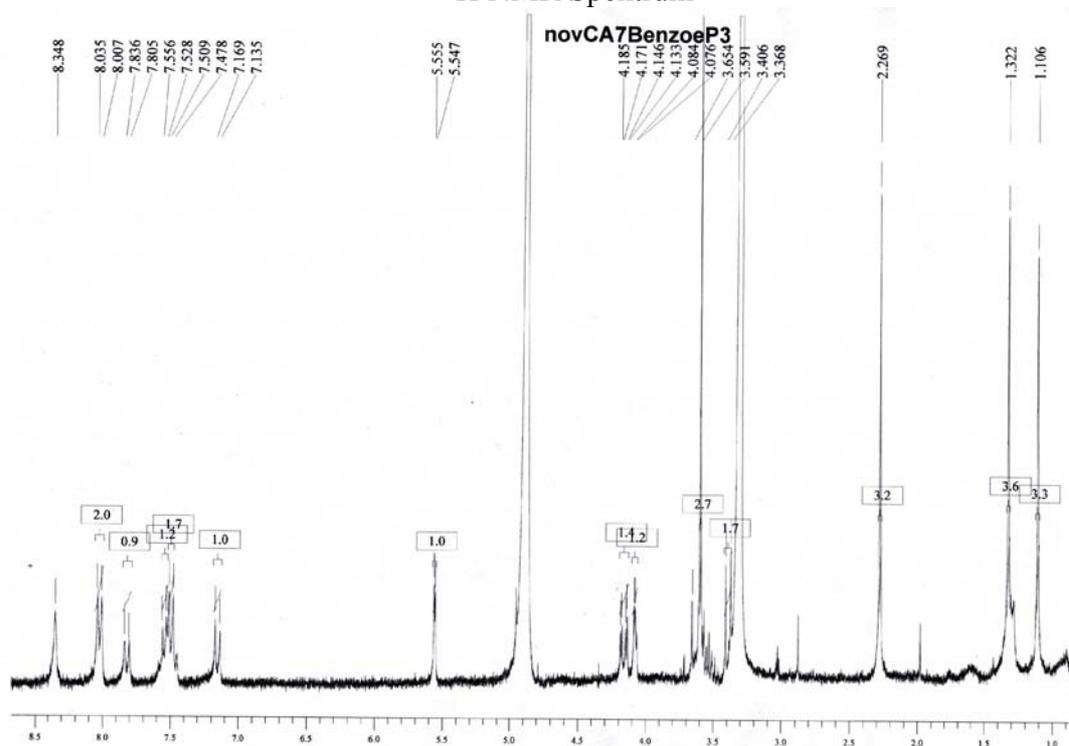


LC-MS/MS-Analyse

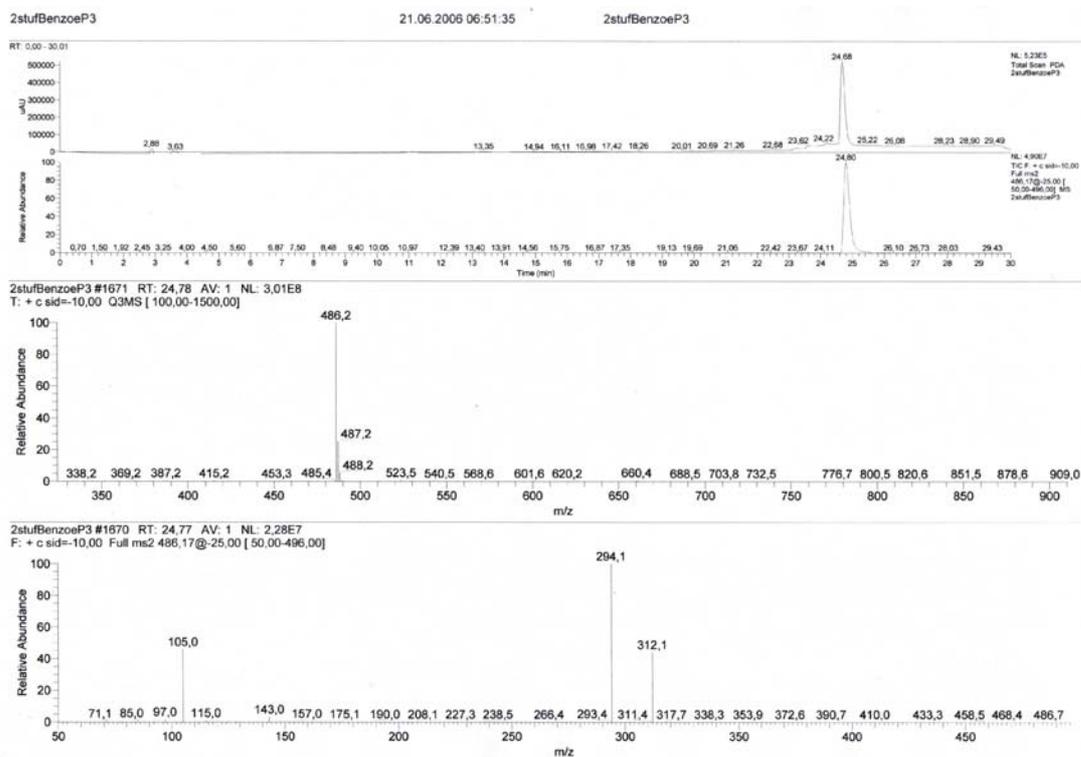


Novclobiocin 606

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

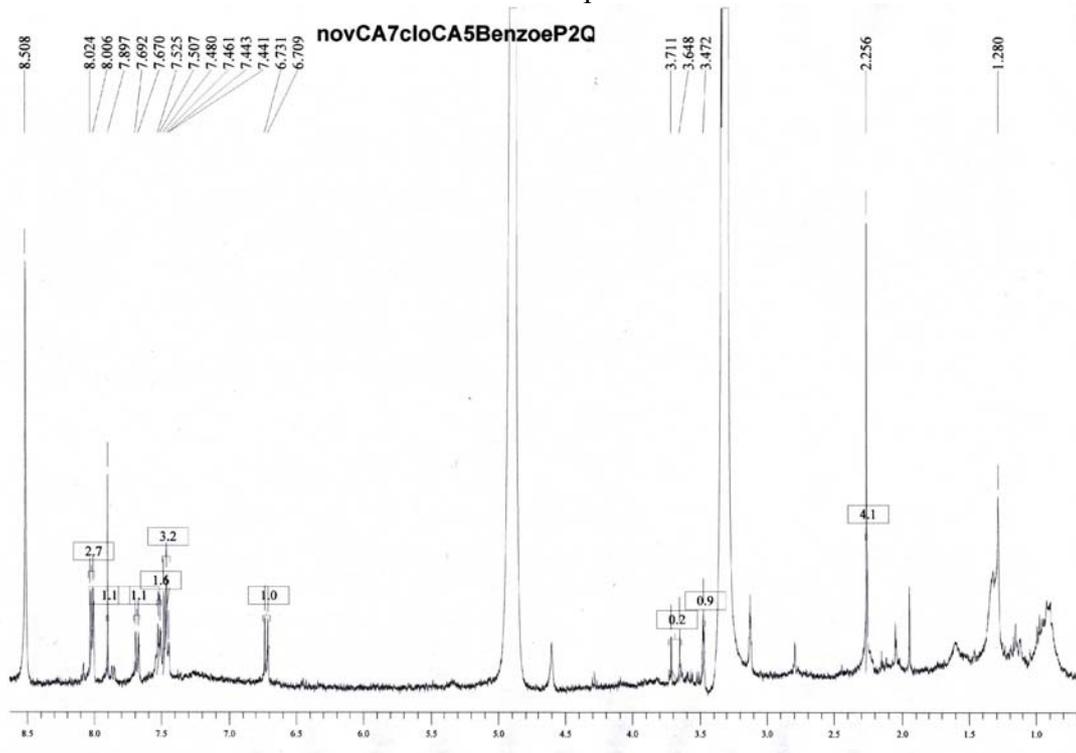


LC-MS/MS-Analyse

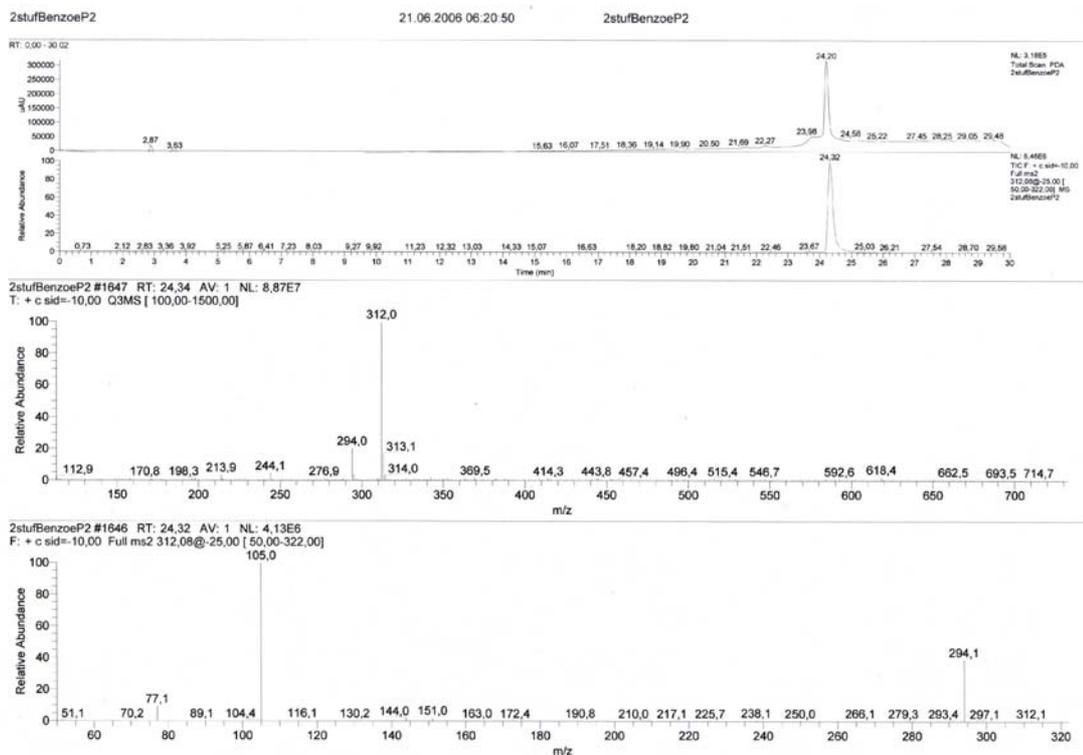


Novclobiocin 607

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

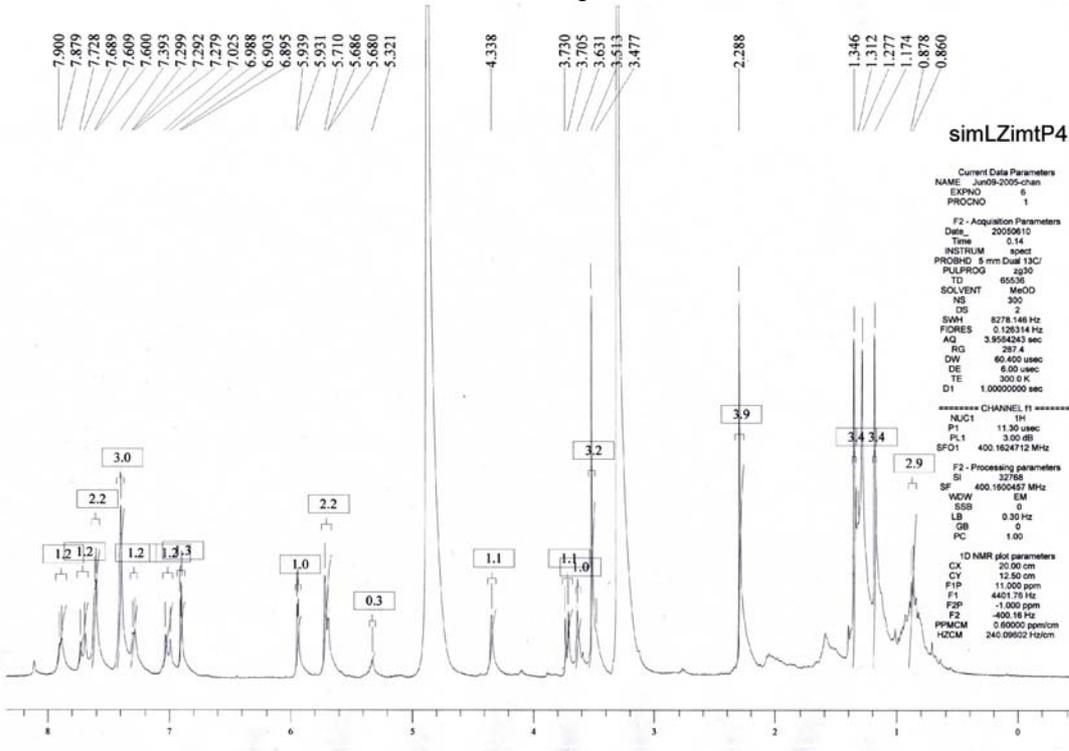


LC-MS/MS-Analyse

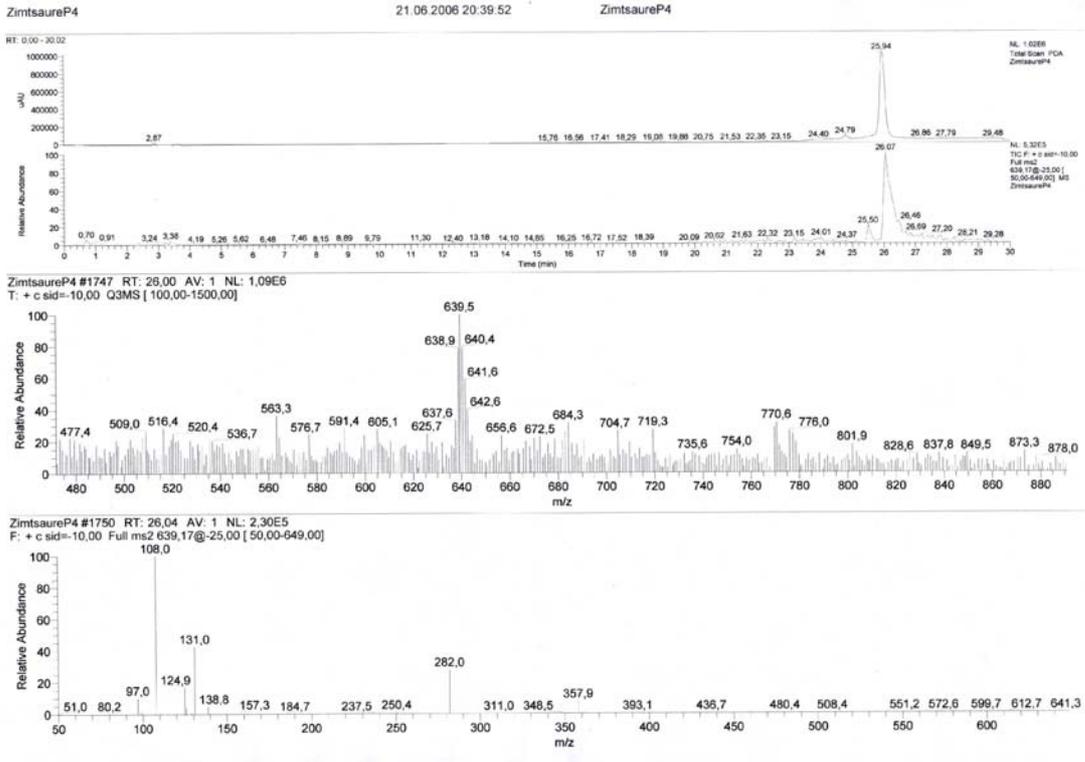


Novclobiocin 701

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

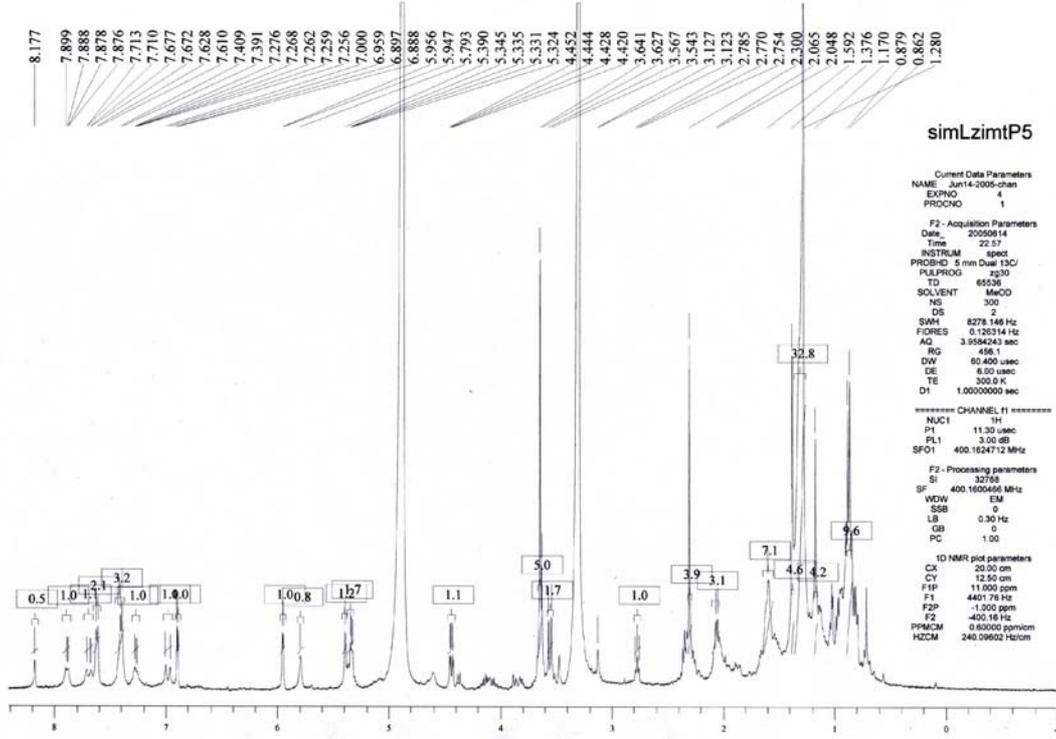


LC-MS/MS-Analyse

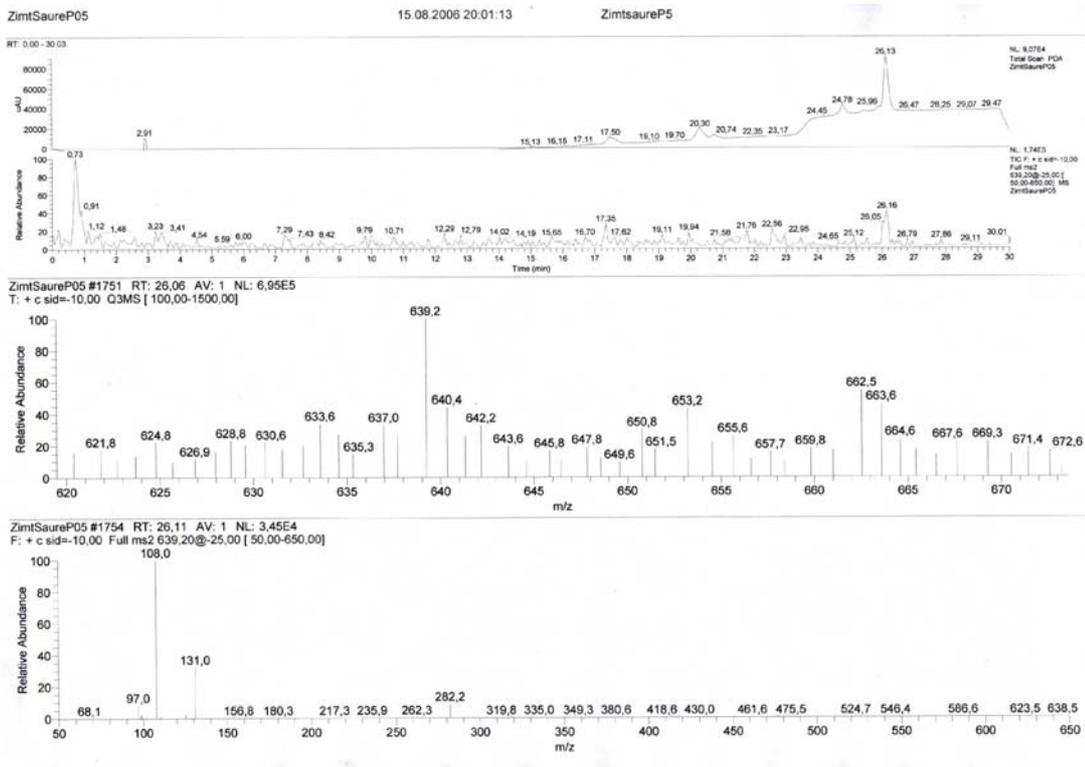


Novclobiocin 702

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

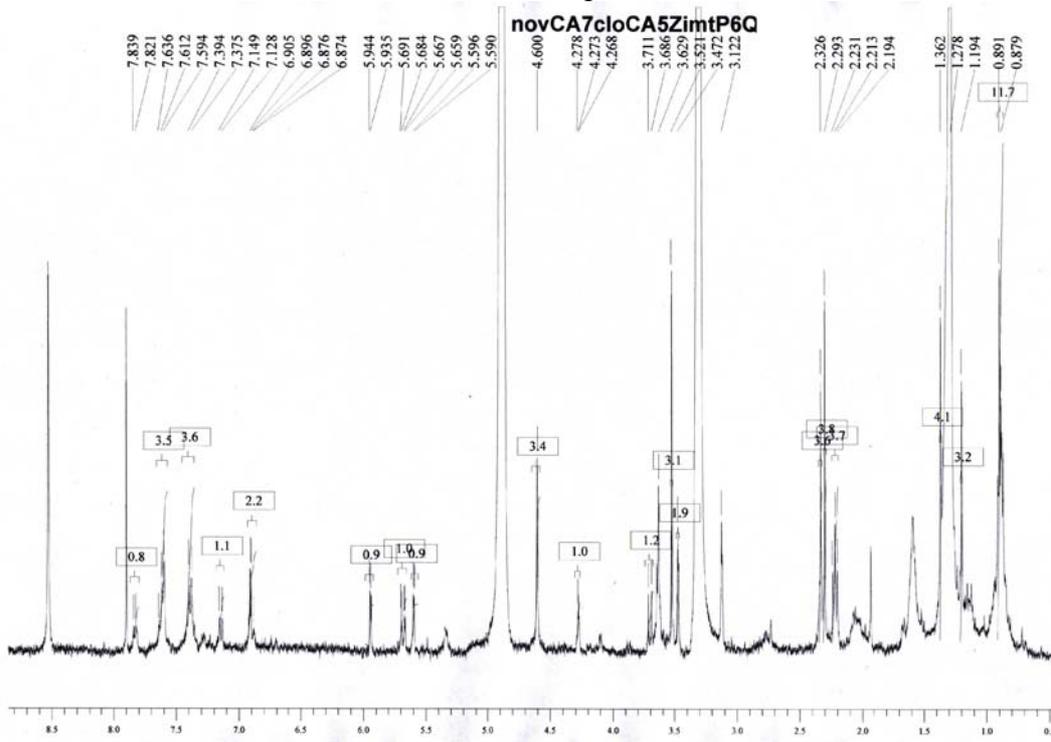


LC-MS/MS-Analyse

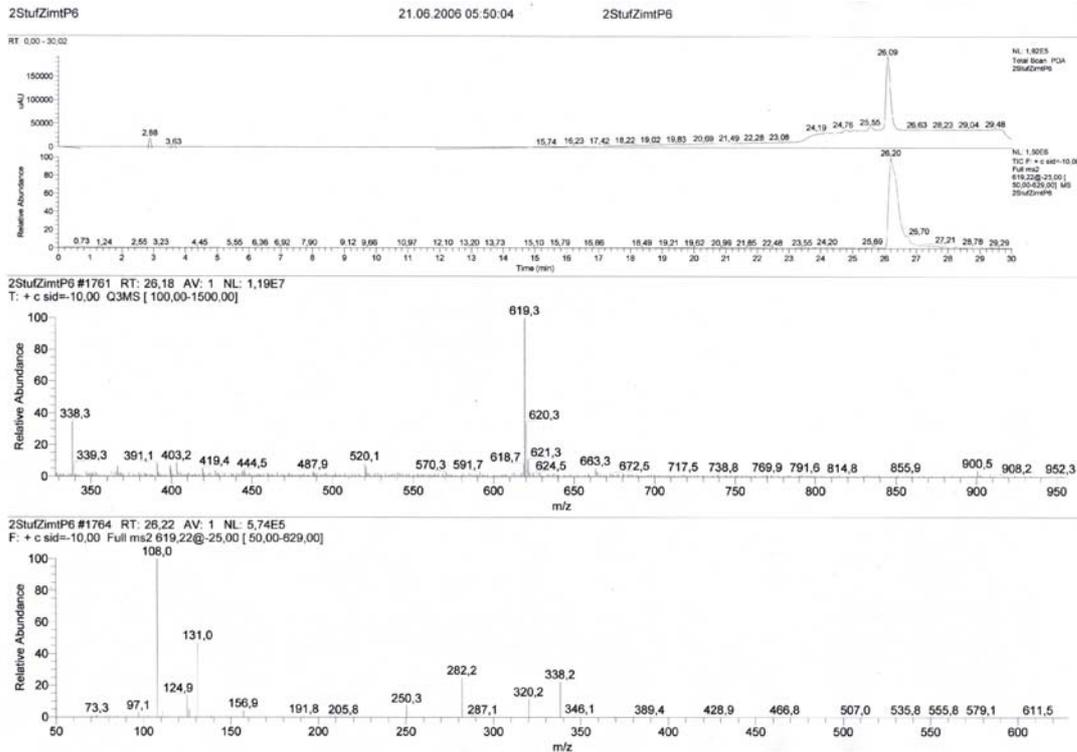


Novclobiocin 703

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

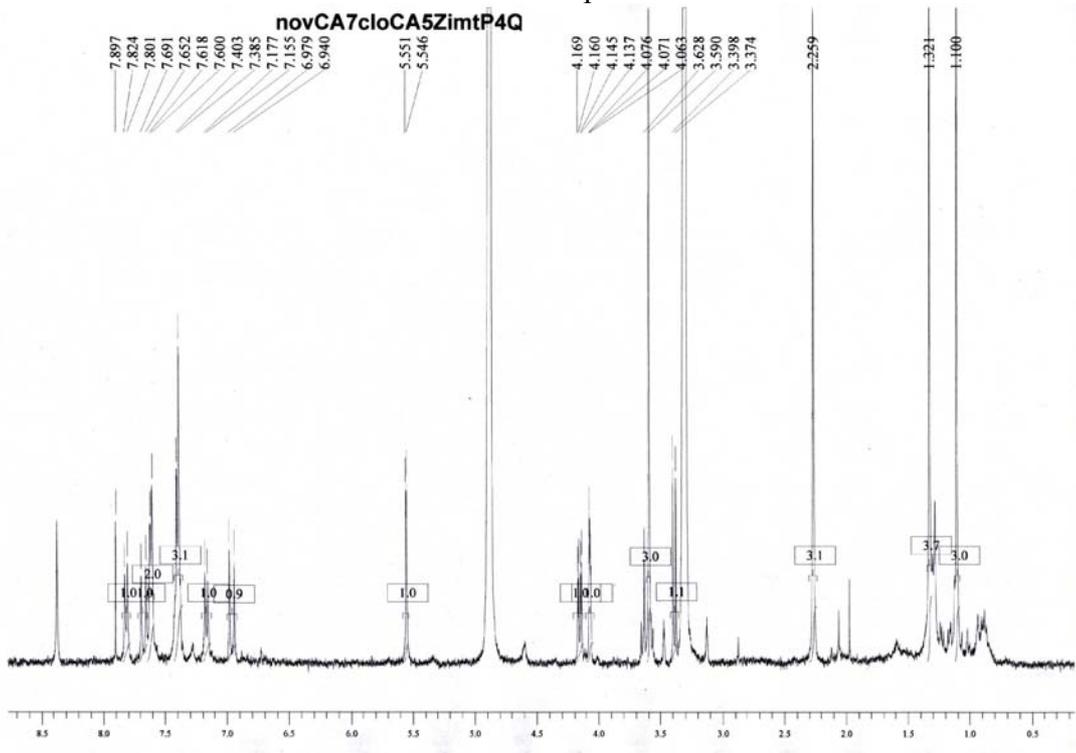


LC-MS/MS-Analyse

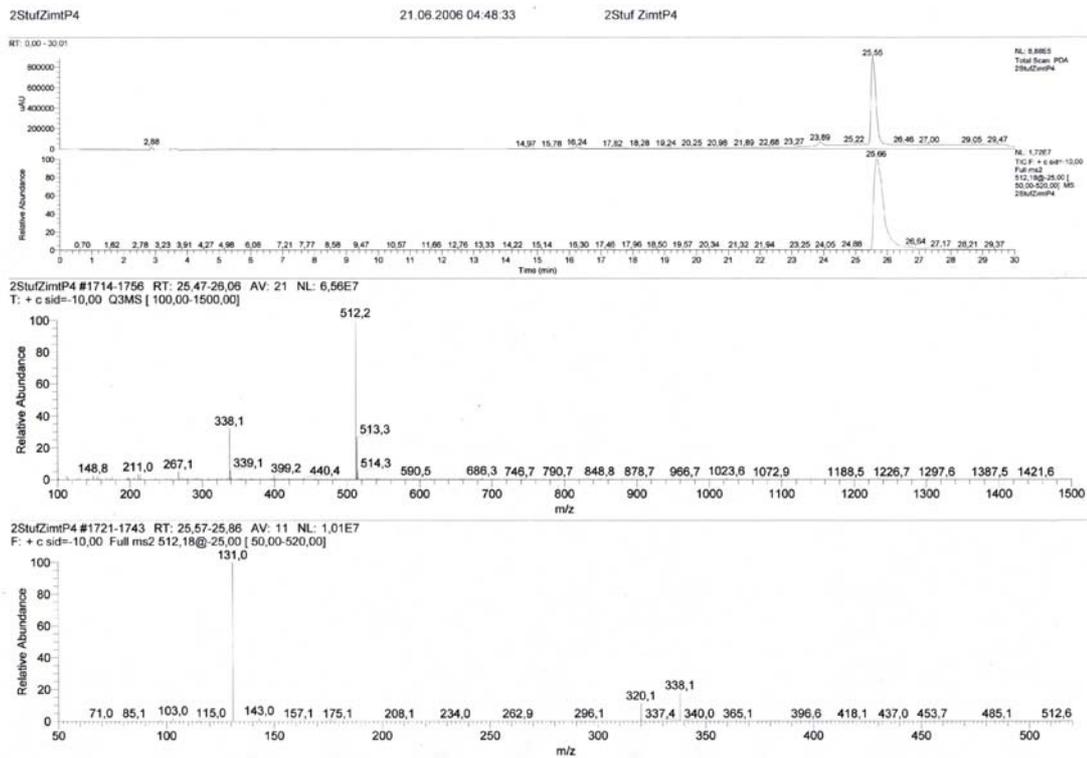


Novclobiocin 704

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

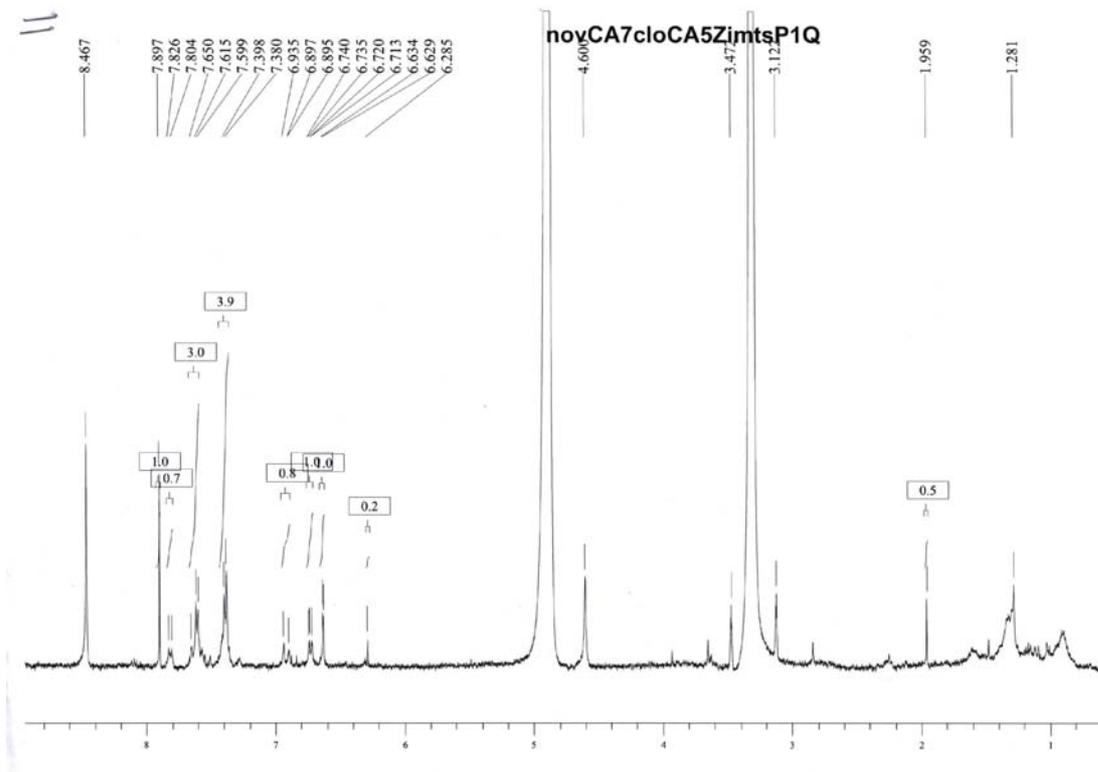


LC-MS/MS-Analyse

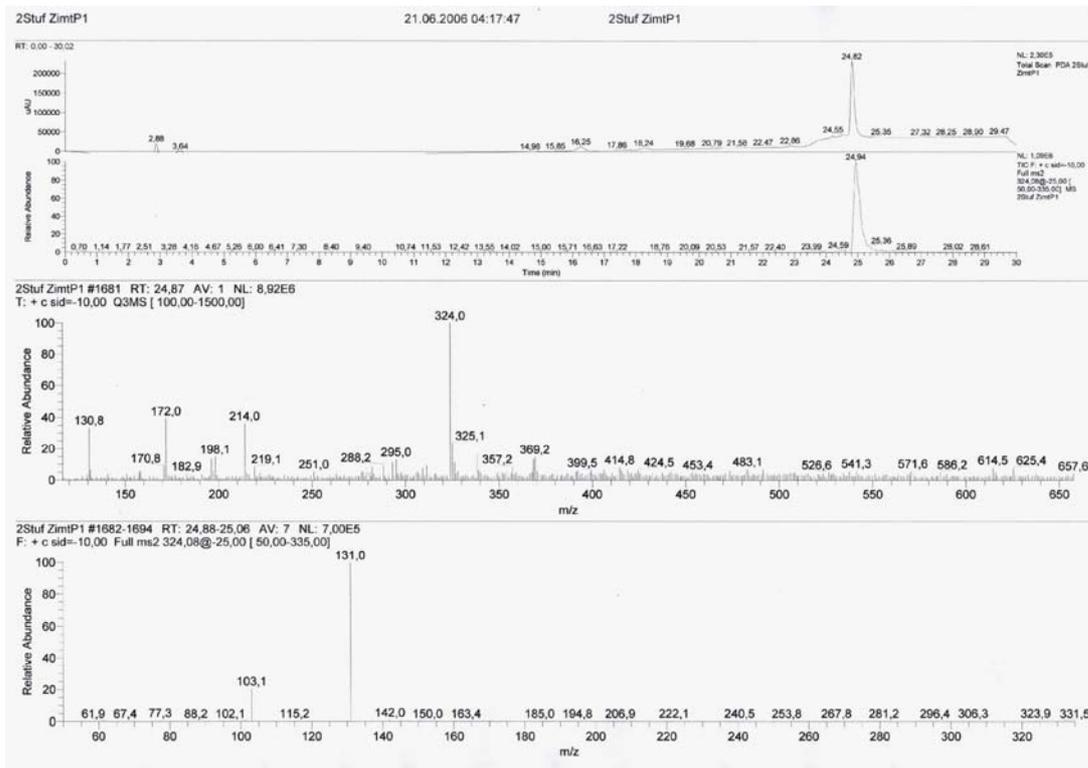


Novclobiocin 705

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

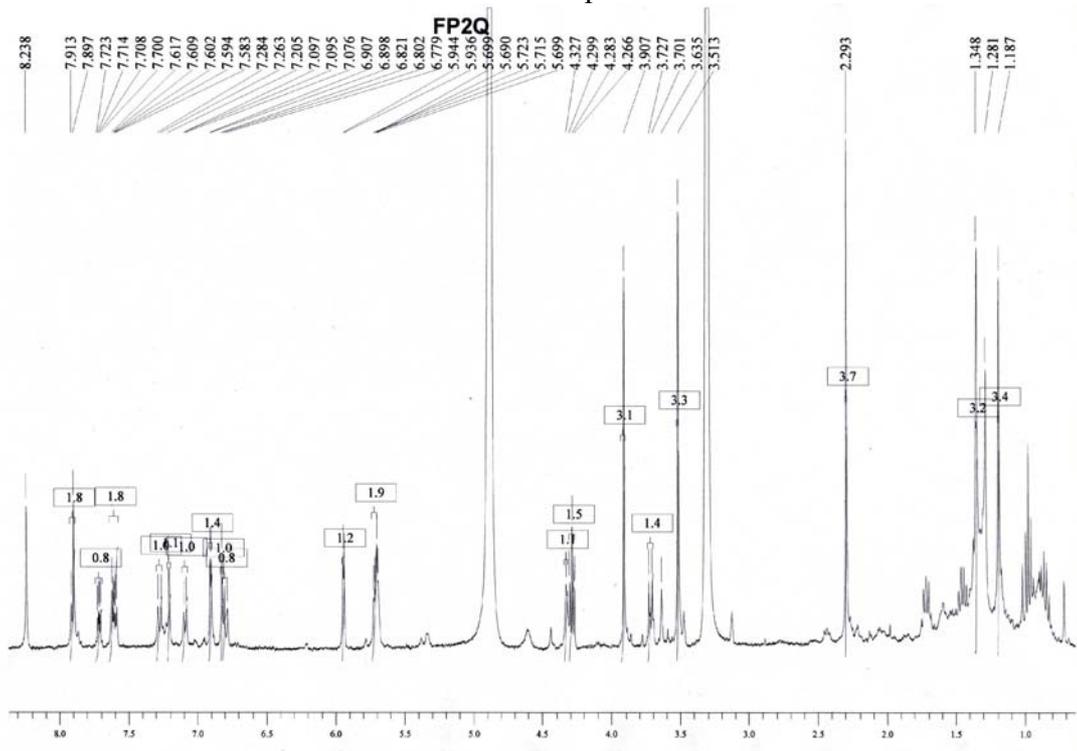


LC-MS/MS-Analyse

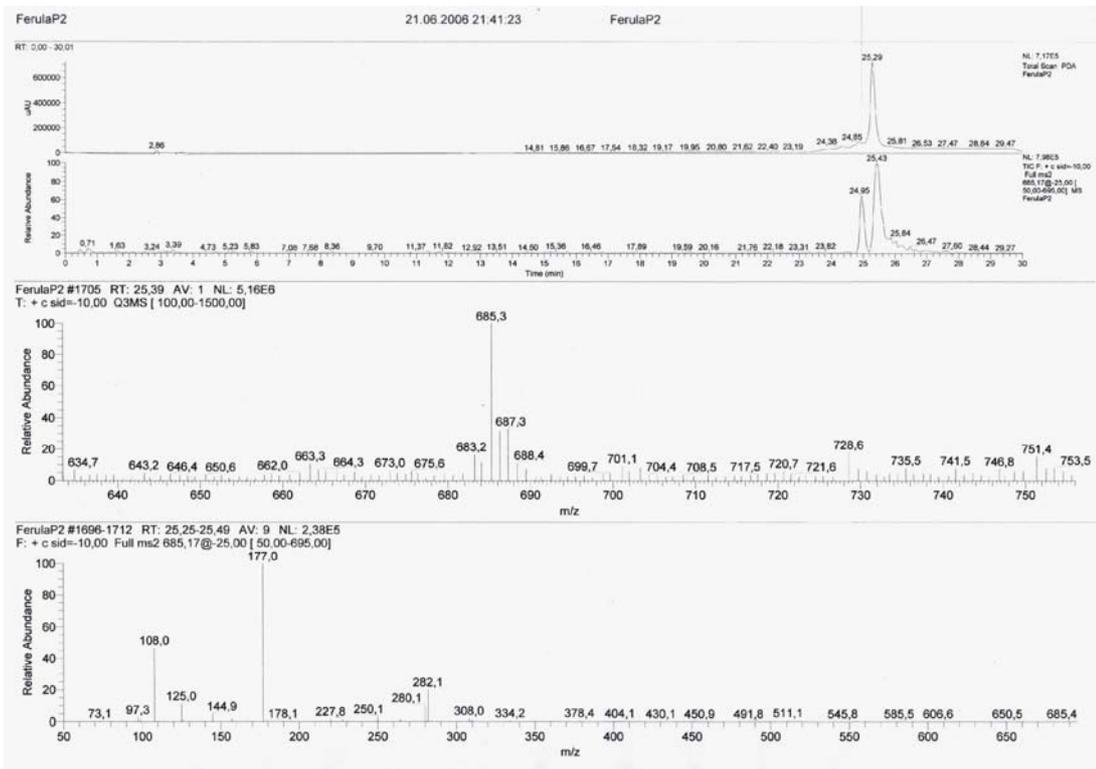


Novclobiocin 731

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

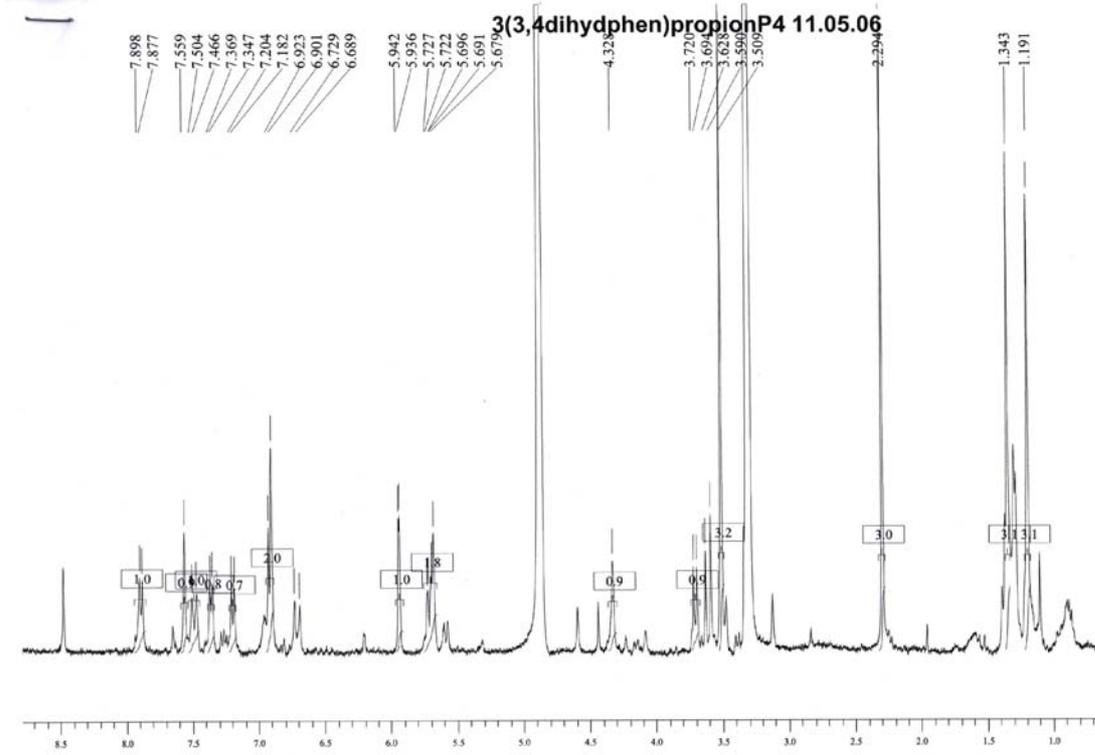


LC-MS/MS Analyse

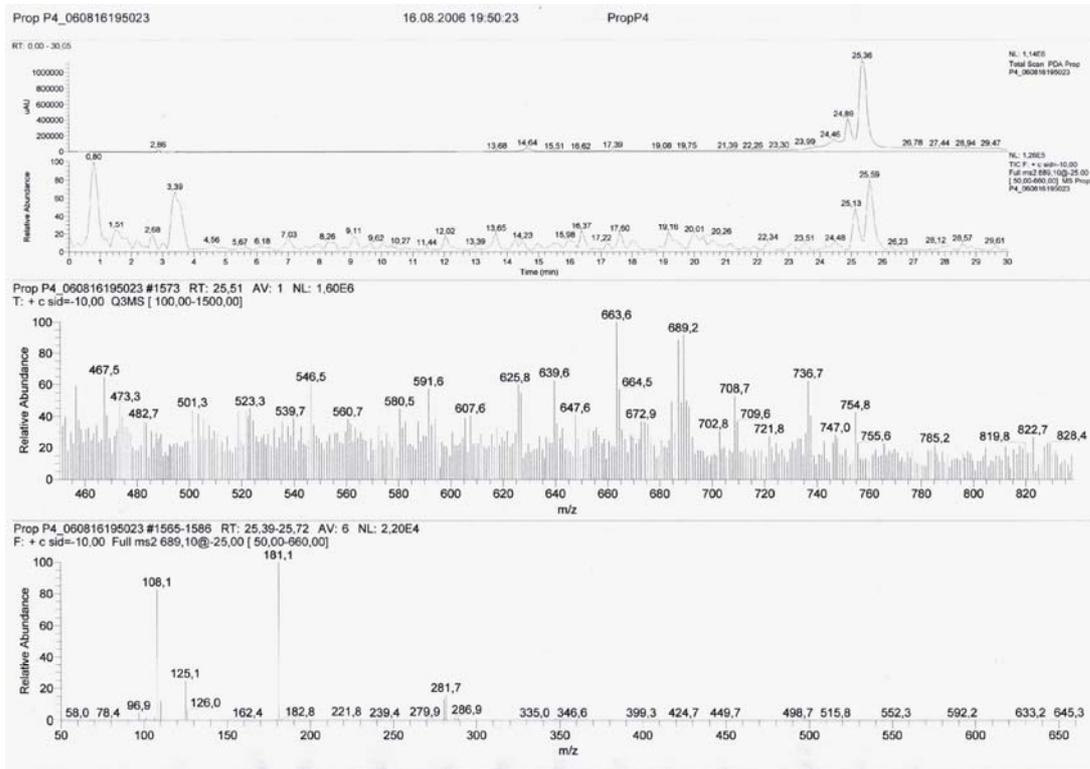


**Novclobiocin 741**

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

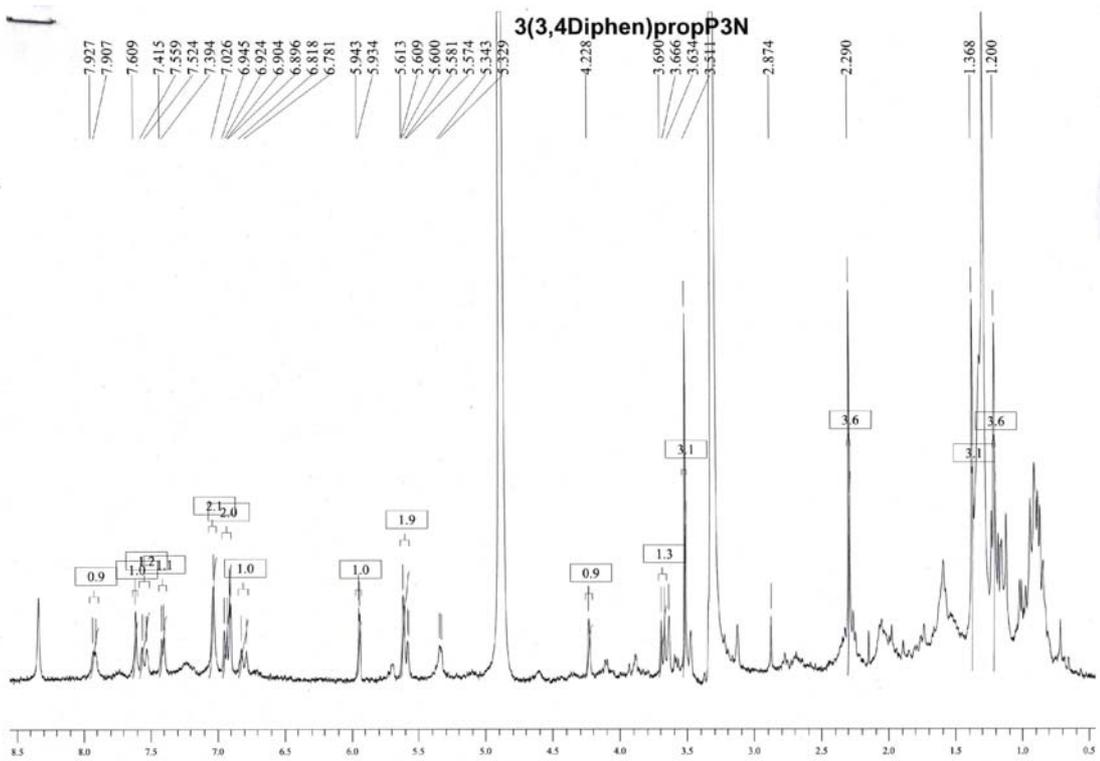


LC-MS/MS Analyse

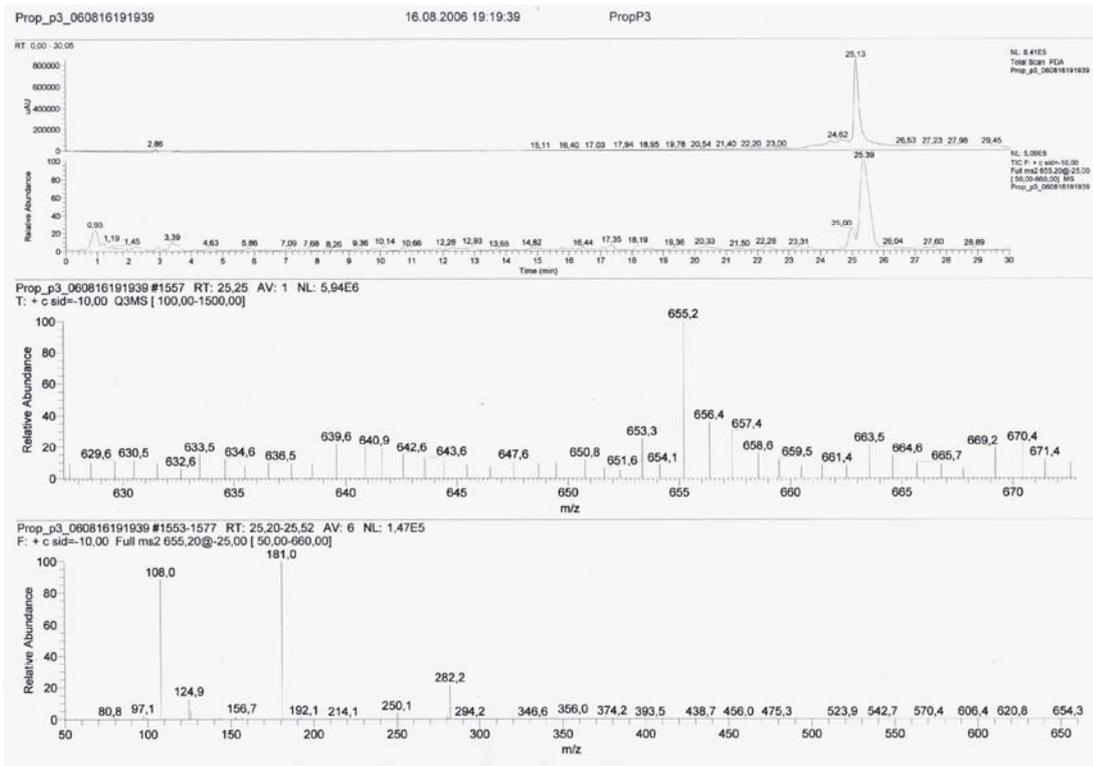


Novclobiocin 742

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



LC-MS/MS Analyse



## 6. <sup>1</sup>H NMR-Daten der Produkte der neuen Novclobiocine aus einstufiger und zweistufiger Fütterung

Die in der Tabelle aufgeführten <sup>1</sup>H NMR-Daten wurden in *d*4-Methanol bei 400 MHz bzw. bei 250 MHz aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde in ppm angegeben. Das Lösungsmittelsignal von Methanol (3,30 ppm) wurde als Referenz verwendet.

<sup>a</sup>br = breites Signal.

<sup>b</sup>Komplexes, überlappendes Signal, J nicht genau bestimmbar.

<sup>c</sup>Komplexes, überlappendes Signal, J nicht bestimmbar.

Position	δ, Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 201	Novclobiocin 202	Novclobiocin 203
2-H	7,63 s	7,62 s	7,63 s
6-H	7,63 s	7,62 s	7,63 s
7-H3	2,26 s	2,26 s	2,27 s
8-H3	2,26 s	2,26 s	2,27 s
5'-H	7,88 d (8,8)	7,85 d (6,1)	7,90 d (6,8)
6'-H	7,31 d (8,8)	7,31 d (6,1)	7,07 <sup>c</sup>
8'-H3	-	-	-
8'-H	-	-	7,07 <sup>c</sup>
1''-H	5,72 br <sup>a</sup> s	5,82 br <sup>a</sup> s	5,63 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,34 br <sup>a</sup> s	5,41 br <sup>a</sup> s	4,24 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,70 dd (3,3; 10,3)	4,44 dd (2,8; 9,6)	5,59 dd (2,2; 9,9)
4''-H	3,72 d (10,3)	3,56 d (9,6)	3,69 d (9,9)
6''-H3	1,18 s	1,17 s	1,20 s
7''-H3	1,35 s	1,38 s	1,37 s
8''-OCH3	3,52 s	3,65 s	3,51 s
3'''-H	6,90 d (3,7)	6,90 d (3,4)	6,90 d (3,5)
4'''-H	5,93 d (3,7)	5,95 d (3,4)	5,94 d (3,5)
6'''-H3	2,29 s	2,30 s	2,29 s

Position	δ, Multiplizität (J/Hz)
	Novclobiocin 204
2-H	7,65 s
6-H	7,65 s
7-H3	2,27 s
8-H3	2,27 s
5'-H	7,82 d (9,0)
6'-H	7,17 d (9,0)
8'-H3	2,27 s
8'-H	-
1''-H	5,55 d (1,2)
2''-H	4,07 t (3,2)
3''-H	4,16 dd (3,6; 9,6)
4''-H	3,39 d (9,6)
6''-H3	1,10 s
7''-H3	1,32 s
8''-OCH3	3,59 s
3'''-H	-
4'''-H	-
6'''-H3	-

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 217	Novclobiocin 218	Novclobiocin 219	Novclobiocinsäure 219A
2-H	7,79 br <sup>a</sup> s	7,78 br <sup>a</sup> s	7,79 br <sup>a</sup> s	7,78 d (1,6)
5-H	6,83 d (8,6)	6,81 d (8,4)	6,82 d (8,6)	6,82 d (8,6)
6-H	7,73 d (8,6)	7,72 d (8,4)	7,72 d (8,6)	7,72 dd (1,6; 8,6)
7-H2	2,63 t (7,4)	2,62 t (7,4)	2,62 t (7,4)	2,63 t (7,8)
8-H2	1,66 sext.(7,4)	1,65 <sup>c</sup>	1,65 sext. (7,4)	1,66 sext. (7,8)
9-H3	0,97 t (7,4)	0,96 t (7,4)	0,96 t (7,4)	0,97 t (7,8)
5'-H	7,83 d (8,8)	7,81 d (8,8)	7,81 d (9,0)	7,65 d (8,8)
6'-H	7,21 d (8,8)	7,15 d (8,8)	7,17 d (9,0)	6,84 d (8,8)
8'-H3	2,34 s	2,28 s	2,22 s	2,26 s
1''-H	5,62 d (2,0)	5,69 d (2,6)	5,55 d (1,6)	-
2''-H	4,28 br <sup>a</sup> s	5,37 t (2,6)	4,07 br <sup>a</sup> s	-
3''-H	5,67 dd (3,2; 10,0)	4,41 dd (3,2; 9,2)	4,12 dd (3,6; 9,6)	-
4''-H	3,71 d (10,0)	3,51 d (9,2)	3,39 d (9,6)	-
6''-H3	1,19 s	1,19 s	1,10 s	-
7''-H3	1,37 s	1,42 s	1,32 s	-
8''-OCH3	3,53 s	3,63 s	3,59 s	-
3'''-H	6,90 d (3,8)	6,88 d (3,8)	-	-
4'''-H	5,94 d (3,8)	5,94 d (3,8)	-	-
6'''-H3	2,29 s	2,29 s	-	-

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)			
	Novclobiocin 225	Novclobiocin 226	Novclobiocin 227	Novclobiocinsäure 228
2-H	7,79 s	7,79 s	7,79 s	7,78 s
5-H	6,85 d (8,4)	6,84 d (8,4)	6,84 d (8,4)	6,78 d (8,8)
6-H	7,76 d (8,4)	7,75 d (8,4)	7,75 d (8,4)	7,67 d (8,8)
7-H2	3,40 d (6,4)	3,40 d (6,8)	3,38 d (9,2)	3,40 d (6,4)
8-H	6,05 m	6,03 m	6,03 m	6,03 m
9a-H(trans)	5,03 d (10,0)	5,02 d (10,4)	5,02 d (10,0)	5,02 d (10,8)
9a-H(cis)	5,07 dd (1,2; 18,8)	5,06 dd (2,0; 17,2)	5,06 d (17,6)	5,07 d (18,0)
5'-H	7,82 d (8,8)	7,81 <sup>c</sup>	7,81 <sup>c</sup>	7,75 d (8,2)
6'-H	7,20 d (8,8)	7,16 d (8,8)	7,17 d (8,8)	6,85 d (8,2)
8'-H3	2,34 s	2,28 s	2,27 s	2,26 s
1''-H	5,62 d (1,6)	5,69 d (2,6)	5,55 d (2)	-
2''-H	4,28 br <sup>a</sup> s	5,37 t (2,6)	4,07 t (2,4)	-
3''-H	5,67 dd (3,2; 10,0)	4,41 dd (3,2; 9,0)	4,16 dd (3,2; 9,6)	-
4''-H	3,71 d (10,0)	3,51 d (9,0)	3,40 <sup>c</sup>	-
6''-H3	1,19 s	1,19 s	1,10 s	-
7''-H3	1,36 s	1,42 s	1,32 s	-
8''-OCH3	3,52 s	3,63 s	3,59 s	-
3'''-H	6,90 d (3,6)	6,88 d (3,6)	-	-
4'''-H	5,94 d (3,6)	5,94 d (3,6)	-	-
6'''-H3	2,29 s	2,29 s	-	-

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)
	Novclobiocin 241
2-H	8,28 d (1,8)
5-H	6,94 d (7,8)
6-H	7,71 d (7,8)
9-H	2,75 sept. (6,8)
10-H3	1,23 d (6,8)
11-H3	1,23 d (6,8)
5'-H	7,88 d (7,8)
6'-H	7,21 d (7,8)
8'-H3	-
8'-H	-
1''-H	5,70 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,35 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,71 dd (10,3; 3,0)
4''-H	3,71 d (10,3)
6''-H3	1,19 s
7''-H3	1,34 s
8''-OCH3	3,51 s
3'''-H	6,90 d (3,6)
4'''-H	5,94 d (3,6)
6'''-H3	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)
	Novclobiocin 281
2-H	8,19 br <sup>a</sup> s
5-H	6,94 d (8,2)
6-H	7,85 d (8,2)
5'-H	7,90 d (9,0)
6'-H	7,21 d (9,0)
8'-H3	-
1''-H	5,65 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,32 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,71 dd (3,2; 10,4)
4''-H	3,71 d (10,4)
6''-H3	1,20 s
7''-H3	1,35 s
8''-OCH3	3,51 s
3'''-H	6,90 d (3,4)
4'''-H	5,94 d (3,4)
6'''-H3	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 311	Novclobiocin 312	Novclobiocin 313
	Vanillobiocin	Isovanillobiocin	Dechlorvanillobiocin
2-H	7,59 s	7,62 s	7,61 s
5-H	6,86 d (8,2)	6,88 d (7,2)	6,87 d (7,6)
6-H	7,54 d (8,2)	7,54 d (7,2)	7,54 d (7,6)
7-OCH3	3,92 s	3,93 s	3,93 s
5'-H	7,87 d (8,8)	7,88 d (5,6)	7,92 d (7,1)
6'-H	7,29 d (8,8)	7,29 d (4,8)	7,05 <sup>c</sup>
8'-H	-	-	7,05 <sup>c</sup>
1''-H	5,72 br <sup>a</sup> s	5,82 d (1,2)	5,63 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,35 br <sup>a</sup> s	5,40 br <sup>a</sup> s	4,24 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,71 dd (2,4; 12,2)	4,45 dd (9,6; 3,2)	5,59 dd (2,5; 10,2)
4''-H	3,72 d (12,2)	3,56 d (9,6)	3,68 d (10,2)
6''-H3	1,18 s	1,18 s	1,20 s
7''-H3	1,35 s	1,38 s	1,37 s
8''-OCH3	3,51 s	3,64 s	3,51 s
3'''-H	6,90 d (3,2)	6,89 d (3,4)	6,90 d (3,5)
4'''-H	5,93 d (3,2)	5,95 d (3,4)	5,94 d (3,5)
6'''-H3	2,29 s	2,30 s	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)	
	Novclobiocin 315	Novclobiocin 314
2-H	7,64 d (2,3)	7,64 d (2,0)
5-H	6,84 d (8,4)	6,84 d (8,1)
6-H	7,54 dd (1,8; 8,4)	7,54 dd (2,0; 8,1)
7-OCH3	3,92 s	3,92 s
5'-H	7,86 d (8,5)	7,83 d (9,1)
6'-H	7,11 d (8,5)	7,13 d (9,1)
8'-H3	2,27 s	2,33 s
1''-H	5,53 d (2,4)	5,60 d (2,8)
2''-H	4,07 t (2,4)	4,28 t (2,8)
3''-H	4,16 dd (3,0; 9,4)	5,68 dd (3,0; 9,9)
4''-H	3,38 d (9,4)	3,70 d (9,9)
6''-H3	1,11 s	1,20 s
7''-H3	1,32 s	1,36 s
8''-OCH3	3,59 s	3,52 s
3'''-H	-	6,90 d (4,1)
4'''-H	-	5,94 d (4,1)
6'''-H3	-	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)	
	Novclobiocin 371	Novclobiocin 372
2-H	7,28 d (8,1)	7,31 d (8,3)
3-H	7,92 d (8,1)	7,93 d (8,3)
5-H	7,92 d (8,1)	7,93 d (8,3)
6-H	7,28 d (8,1)	7,31 d (8,3)
7-H	2,51 s	2,52 s
5'-H	7,89 d (8,4)	7,88 d (8,8)
6'-H	7,19 d (8,4)	7,19 d (8,8)
8'-H	-	-
1''-H	5,69 br <sup>a</sup> s	5,78 d (1,3)
2''-H	4,34 br <sup>a</sup> s	5,39 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,72 dd (3,0; 10,0)	4,45 dd (3,3; 9,7)
4''-H	3,71 d (10,0)	3,55 d (9,7)
6''-H3	1,20 s	1,18 s
7''-H3	1,35 s	1,38 s
8''-OCH3	3,51 s	3,64 s
3'''-H	6,91 d (3,8)	6,89 d (3,4)
4'''-H	5,94 d (3,8)	5,95 d (3,4)
6'''-H3	2,30 s	2,30 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)	
	Novclobiocin 384	Novclobiocin 385
2-H	7,70 br <sup>a</sup> s	7,70 br <sup>a</sup> s
5-H	6,72 d (9,2)	6,71 d (8,4)
6-H	7,67 d (9,2)	7,66 d (8,4)
7-H3	2,19 s	2,19 s
5'-H	7,83 d (9,4)	7,81 d (8,8)
6'-H	7,22 d (9,4)	7,16 d (8,8)
8'-H3	2,34 s	2,28 s
1''-H	5,62 d (1,4)	5,69 d (2,4)
2''-H	4,29 t (1,6)	5,37 t (3,2)
3''-H	5,67 dd (2,8; 9,8)	4,41 dd (2,8; 8,8)
4''-H	3,71 d (9,8)	3,51 d (8,8)
6''-H3	1,18 s	1,19 s
7''-H3	1,36 s	1,41 s
8''-OCH3	3,52 s	3,63 s
3'''-H	6,90 d (3,4)	6,88 d (3,8)
4'''-H	5,94 d (3,4)	5,94 d (3,8)
6'''-H3	2,29 s	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 601	Novclobiocin 602	Novclobiocin 603
2-H	8,02 d (7,2)	8,02 d (7,4)	8,02 d (7,0)
3-H	7,48 t (7,2)	7,50 t (7,4)	7,51 t (7,0)
4-H	7,57 t (6,8)	7,58 t (7,4)	7,59 t (7,0)
5-H	7,48 t (7,2)	7,50 t (7,4)	7,51 t (7,0)
6-H	8,02 d (7,2)	8,02 d (7,4)	8,02 d (7,0)
5'-H	7,91 d (8,8)	7,89 d (9,0)	7,93 d (9,2)
6'-H	7,28 d (8,8)	7,30 d (9,0)	7,07 <sup>c</sup>
8'-H	-	-	7,07 <sup>c</sup>
1''-H	5,71 <sup>c</sup>	5,82 d (1,6)	5,64 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,33 br <sup>a</sup> s	5,40 t (2,4)	4,24 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,71 <sup>c</sup>	4,44 dd (9,4; 3,2)	5,59 dd (9,6; 2,8)
4''-H	3,72 d (10,0)	3,56 d (9,4)	3,69 d (9,6)
6''-H3	1,20 s	1,18 s	1,20 s
7''-H3	1,35 s	1,38 s	1,37 s
8''-OCH3	3,52 s	3,64 s	3,51 s
3'''-H	6,90 d (3,4)	6,89 d (3,4)	6,90 d (3,0)
4'''-H	5,94 d (3,4)	5,95 d (3,4)	5,94 d (3,0)
6'''-H3	2,29 s	2,30 s	2,29 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 604	Novclobiocin 606	Novclobiocinsäure 607
2-H	8,02 d (7,4)	8,02 d (7,2)	8,02 d (7,2)
3-H	7,46 t (7,4)	7,51 <sup>b</sup> t (7,2)	7,46 t (7,2)
4-H	7,52 t (7,4)	7,53 <sup>b</sup> t (7,2)	7,53 t (7,2)
5-H	7,46 t (7,4)	7,51 <sup>b</sup> t (7,2)	7,46 t (7,2)
6-H	8,02 d (7,4)	8,02 d (7,2)	8,02 d (7,2)
5'-H	7,84 d (9,0)	7,82 d (8,3)	7,69 d (8,8)
6'-H	7,14 d (9,0)	7,15 d (8,3)	6,77 d (8,8)
8'-H3	2,34 s	2,27 s	2,26 s
8'-H	-	-	-
1''-H	5,60 d (1,6)	5,55 d (2,2)	-
2''-H	4,27 t (3,2)	4,07 t (2,2)	-
3''-H	5,68 dd (2,8; 9,8)	4,16 dd (3,3; 9,5)	-
4''-H	3,70 d (9,8)	3,39 d (9,5)	-
6''-H3	1,20 s	1,11 s	-
7''-H3	1,36 s	1,32 s	-
8''-OCH3	3,52 s	3,59 s	-
3'''-H	6,90 d (3,4)	-	-
4'''-H	5,94 d (3,4)	-	-
6'''-H3	2,29 s	-	-

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)	
	Novclobiocin 701	Novclobiocin 702
1-H	7,01 d (15,3)	6,98 d (16,4)
2-H	7,71 d (15,3)	7,69 d (16,4)
4-H	7,60 d (6,8)	7,62 d (7,1)
5-H	7,39 m	7,39 <sup>b</sup> t (7,1)
6-H	7,39 m	7,39 <sup>b</sup> t (7,1)
7-H	7,39 m	7,39 <sup>b</sup> t (7,1)
8-H	7,60 d (6,8)	7,62 d (7,1)
5'-H	7,89 d (8,2)	7,89 d (8,5)
6'-H	7,29 d (8,2)	7,27 d (8,5)
8'-H	-	-
1''-H	5,71 br <sup>a</sup> s	5,79 br <sup>a</sup> s
2''-H	4,34 br <sup>a</sup> s	5,39 br <sup>a</sup> s
3''-H	5,68 dd (2,4; 9,8)	4,44 dd (3,3; 9,6)
4''-H	3,72 d (9,8)	3,56 d (9,6)
6''-H3	1,17 s	1,17 s
7''-H3	1,36 s	1,38 s
8''-OCH3	3,51 s	3,64 s
3'''-H	6,90 d (3,4)	6,89 d (3,5)
4'''-H	5,94 d (3,4)	5,95 d (3,5)
6'''-H3	2,29 s	2,30 s

Position	$\delta$ , Multiplizität (J/Hz)		
	Novclobiocin 703	Novclobiocin 704	Novclobiocinsäure 705
1-H	6,89 d (14,0)	6,96 d (15,6)	6,92 d (14,7)
2-H	7,62 d (14,0)	7,67 d (15,6)	7,63 d (14,7)
4-H	7,60 d (7,4)	7,61 d (7,4)	7,61 d (6,8)
5-H	7,38 <sup>b</sup> t (7,4)	7,39 <sup>b</sup> t (7,4)	7,38 <sup>b</sup> t (6,8)
6-H	7,38 <sup>b</sup> t (7,4)	7,39 <sup>b</sup> t (7,4)	7,38 <sup>b</sup> t (6,8)
7-H	7,38 <sup>b</sup> t (7,4)	7,39 <sup>b</sup> t (7,4)	7,38 <sup>b</sup> t (6,8)
8-H	7,60 d (7,4)	7,61 d (7,4)	7,61 d (6,8)
5'-H	7,83 d (8,0)	7,81 d (9,0)	7,81 d (8,9)
6'-H	7,14 d (8,0)	7,16 d (9,0)	6,73 dd (2,0; 8,9)
8'-H	-	-	6,63 d (2,0)
8'-CH3	2,33 s	2,26 s	-
1''-H	5,59 d (2,2)	5,55 d (2,0)	-
2''-H	4,27 t (2,2)	4,07 t (2,0)	-
3''-H	5,68 dd (2,8; 9,8)	4,15 dd (3,6; 9,6)	-
4''-H	3,70 d (9,8)	3,39 d (9,6)	-
6''-H3	1,19 s	1,10 s	-
7''-H3	1,36 s	1,32 s	-
8''-OCH3	3,52 s	3,59 s	-
3'''-H	6,90 d (3,8)	-	-
4'''-H	5,94 d (3,8)	-	-
6'''-CH3	2,29 s	-	-

## **Danksagung**

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

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Heide, für die Überlassung des Themas sowie Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. S.-M. Li danke ich für die gute Betreuung, für die Unterstützung und für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. P. Ruth und Prof. Dr. O. Werz danke ich für die Bereitschaft, als weitere Prüfer die Prüfungskommission zu vervollständigen.

Herrn Dr. B. Gust möchte ich für die Unterstützung und die Diskussionen danken.

Bei Frau Susanne Hennig möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Prof. Dr. L.A. Wessjohann und Dr. M.-A. Dessoy (Halle/Saale) danke ich für die Überlassung verschiedener synthetischer 3,4-disubstituierter Benzoessäure-Derivate.

Dr. B. Kammerer danke ich für die LC-MS-Analysen der mutasynthetisch generierten Produkte und der Unterstützung bei weiteren Fragestellung der Arbeit.

Prof. Dr. M. Page, Dr. M. Stieger, Dr. S. Shapiro, Dr. C. Nuoffer und Dr. S. Reinelt (Basilea Pharmaceutica AG, Basel, Schweiz) danke ich für die Ermöglichung der Testung der neuen Aminocoumarine, für die Unterstützung und für die anregenden Diskussionen.

Bei Prof. Dr. A. Maxwell und Dr. M. Burrell (John Innes Centre, Norwich, UK) danke ich für die Durchführung der Supercoiling- und Triplex-Assays.

Bei Prof. Dr. F. Rohdich möchte ich mich für die Überlassung des Plasmids pACYCisc bedanken.

Prof. Dr. S. Stevanovic danke ich für die Durchführung der LC-MS-Analyse des exprimierten Proteins.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet haben: Silke Alt, Frau Bauer, Dr. Claudia Biegert, Volker Dangel, Dr. Alessandra da Silva Eustáquio, Katja Fay, Katrin Flinspach, Corinna Fischer, Dr. Anja Freitag, Gabi Frickmann, Dr. Ute Galm, Kerstin Glück, Alexander Grundmann, Yvonne Haagen, Johannes Haerle, Leonard Kaysser, Frau Lörcher, Thomas Luft, Ute Metzger, Dr. Florence Pojer, Heike Rapp, Orwah Saleh, Dr. Elisabeth Schmutz, Katharina Sedding, Stefanie Siebenberg, Nicola Steffan, Herr Trefzer, Dr. Inge Unsöld, Dr. Irmela Wagner, Emanuel Wemakor, Lucy Westrich, Manuel Wolpert und Dr. Hui Xu.

Außerdem danke ich besonders meinen Eltern und Jochen für die seelische und moralische Unterstützung, sowie für Kritik, Geduld und Beistand.

## VIII Akademische Lehrer

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

Prof. Dr. H.P.T. Ammon  
Prof. Dr. G. Drews  
Prof. Dr. G. Gauglitz  
Prof. Dr. L. Heide  
Prof. Dr. K.-A. Kovar  
Prof. Dr. S. Laufer  
Prof. Dr. S.-M. Li  
Prof. Dr. U. Nagel  
PD. Dr. H. Pommer  
Prof. Dr. P.C. Schmidt  
Prof. Dr. J.E. Schultz  
Prof. Dr. Wankmüller

## **IX Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Christine Anderle  
Geburtsdatum: 21. Juli 1976  
Geburtsort: Hechingen

### **Schulbildung**

09/1983-07/1987 Grundschole Burladingen  
09/1987-07/1993 Progymnasium Burladingen  
09/1993-07/1996 Gymnasium Gammertingen  
(Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)

### **Hochschulbildung und Praktika**

10/1996-09/2000 Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
(Abschluss: 2. Staatsexamen)  
10/2000-09/2001 Pharmaziepraktikum in der U-Apotheke, Stuttgart  
12/2001 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin  
02/2002-09/2002 Apothekerin in der U-Apotheke, Stuttgart  
10/2002-04/2007 Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Molekularbiologische  
und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der  
Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Clorobiocin“ unter  
der Anleitung von Prof. Dr. L. Heide, Pharmazeutisches Institut,  
Universität Tübingen.