

**Molekularbiologische und biochemische
Untersuchungen der Phenazin- und
Furanonaphthochinon I-Biosynthese
in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Yvonne Haagen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Heide

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-P. Fiedler

*Der Himmel hat den Menschen als Gegengewicht zu den vielen
Mühseligkeiten des Lebens drei Dinge gegeben:
die Hoffnung, den Schlaf und das Lachen.*

Immanuel Kant

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Publikationen:

Y. Haagen, K. Glück, K. Fay, B. Kammerer, B. Gust and L. Heide:

A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042.

Chembiochem 2006 (12), 2016-27

G. Bringmann, **Y. Haagen**, G. Gulder, T.A. Gulder, L. Heide

Biosynthesis of the isoprenoid moieties of furanonaphthoquinone I and endophenazine A in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042.

Journal of Organic Chemistry 2007, 72, 4198-4204

Y. Haagen, I. Unsöld, L. Westrich, B. Gust, S. Richard, J. Noel and L. Heide

A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates.

FEBS Letters 2007 (581), 2889-2893

Y. Haagen und L. Heide

Verfahren zur Herstellung prenylierter aromatischer Verbindungen, sowie Substanzen, die nach diesem Verfahren herstellbar sind

Patentanmeldung Deutsches Patentamt Aktenzeichen 10 2007 021 149.1

Poster:

Molecular cloning, sequence analysis and functional proof of a novel phenazine antibiotic gene cluster from *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042.

Tagung „Genetics of Industrial Microorganisms“, Prag, 24.-28. Juni 2006

Meinen Lieben

I	Einleitung	1
1.	Isoprenoide Naturstoffe.....	1
1.1	Struktur, Bedeutung und Herkunft	1
1.2	Biosynthese von Isoprenoiden in <i>Streptomyces</i>	2
2.	Phenazine.....	4
2.1	Struktur, Vorkommen und Bedeutung	4
2.2	Biosynthese	5
2.3	Prenylierte Phenazine.....	6
3.	Furanonaphthochinon I.....	8
3.1	Vorkommen, Struktur und Bedeutung	8
3.2	Biosynthese von Furanonaphthochinon I	9
4.	Prenyltransferasen.....	10
5.	Zielsetzung der Arbeit.....	12
II	Material und Methoden	14
1.	Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme	14
1.1	Chemikalien und Medienbestandteile.....	14
1.1	Materialien zur Chromatographie	15
1.2	Enzyme und Kits.....	16
2.	Nährmedien und Puffer.....	16
2.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	17
2.2	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	17
2.3	Produktionsmedien zur Kultivierung von <i>Streptomyces</i>	18
2.4	Antibiotika	19
2.5	Puffer und Lösungen	20
2.5.1	Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	20
2.5.2	Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese	20
2.5.3	Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.5.4	Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung	22
2.5.5	Lösungen zur Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	23
2.5.6	Puffer zur Proteinreinigung	23
2.5.7	Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	23
3.	Plasmide, Primer und Bakterienstämme.....	24

3.1	Plasmide	24
3.2	Primer	26
3.3	Bakterienstämme	27
4.	Kulturbedingungen	28
4.1	Kulturbedingungen für <i>E. coli</i>	28
4.2	Kulturbedingungen von <i>Streptomyces</i>	28
4.2.1	Anzucht in Flüssig- und Festmedien	28
4.2.2	Herstellung von Glycerindauerkulturen und Sporensuspensionen	28
4.2.3	Screening der <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042-Deletionsmutanten (Replica Plating)	29
5.	Methoden der Molekularbiologie	29
5.1	Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA	29
5.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	29
5.1.2	Alkoholfällung	29
5.1.3	Konzentrationsbestimmung	30
5.2	Agarosegel-Elektrophorese	30
5.2.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
5.3	Enzymatische DNA-Manipulation	31
5.3.1	Restriktionsverdau	31
5.3.2	Ligation von DNA-Molekülen	31
5.4	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	31
5.4.1	CaCl ₂ -vermittelte Transformation	31
5.4.2	Elektroporations-vermittelte Transformation	32
5.5	Konjugation von <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042 mit <i>E. coli</i>	33
5.6	Isolierung von DNA aus Bakterien und Streptomyceten	34
5.6.1	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse)	34
5.6.2	Isolation genomischer DNA aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042 ...	34
5.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
5.7.1	PCR zur Amplifikation der Apramycin-Kassette von pIJ773	35
5.7.2	PCR zur Klonierung von <i>fnq26</i> zur heterologen Expression in <i>E. coli</i>	35
5.8	Southern Hybridisierung	36
5.8.1	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der Random-Prime-Methode	36
5.8.2	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der PCR-Labeling-Methode	36
5.8.3	Southern Blot	36
5.8.4	Hybridisierung und Detektion	37
5.9	Herstellung einer Cosmidbank	37

5.10	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen	38
6.	Methoden der Biochemie	38
6.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
6.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	39
6.3	Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC™).....	39
6.4	Heterologe Expression von <i>fnq26</i> in <i>E. coli</i>	39
6.5	Reinigung von Fnq26 als Histidin-Fusionsprotein mittels Nickel-Affinitätschromatographie	40
6.6	Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen	41
6.7	Bestimmung der Enzymaktivität von Fnq26	41
7.	Konstruktion der Deletionsmutanten und Komplementierung.....	42
7.1	Inaktivierung des Gens <i>fnq26</i>	42
7.2	Inaktivierung des Gens <i>fnq28</i>	43
7.3	Herstellung einer Doppelmutante ($\Delta fnq26fnq28$)	43
7.4	Inaktivierung der Gene <i>fnq26-28ephzBCDEGA</i>	43
7.5	Komplementierung der $\Delta fnq26-28ephzBCDEGA$ Mutante	43
8.	Isolierung von Sekundärstoffen aus Streptomyceten und Pseudomonaden	44
8.1	Extraktion von <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042	44
8.2	Extraktion von <i>Streptomyces anulatus</i> nach Gebhardt <i>et al.</i> (2002)	44
8.3	Isolierung von Flaviolin aus <i>Pseudomonas putida</i> (pFG154-1) nach Gross <i>et al.</i> (2006).....	44
9.	Fütterungsexperimente von <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042 mit [¹³ C ₂] Natriumacetat und [2- ¹³ C] Glycerol	45
10.	Analytik niedermolekularer Substanzen.....	45
10.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	45
10.1.1	Geräte, Säulen und Fließmittel.....	45
10.1.2	Analytik der Sekundärstoffe aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042	46
10.1.3	Präparativer Assay und Analytik der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen	46
10.1.4	Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen	47
10.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	47
10.3	LC-MS.....	47
III	Ergebnisse	48
1.	Identifizierung eines Biosynthesegencluster für Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042	48

1.1	Identifizierung von Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042.....	48
1.2	Klonierung und Sequenzierung des Biosyntheseegenclusters.....	48
1.3	Sequenzanalyse des Inserts von Cosmid 3-6H.....	49
1.3.1	Gene der Phenazinbiosynthese.....	51
1.3.2	<i>fnq26</i> und <i>fnq28</i> : zwei Prenyltransferasegene	52
1.3.3	<i>fnq27</i> : ein Methyltransferasegen	52
1.3.4	Gene der FNQ I-Biosynthese	52
1.3.5	<i>fnq19</i> : ein putatives Mevalonatkinasegen.....	53
1.3.6	Gene der S-Adenosylmethioninsynthese	53
1.3.7	Transporter und Regulatoren.....	53
1.3.8	Gene unbekannter Funktion und Gene des Primärstoffwechsels	54
1.4	Funktionsnachweis des Biosyntheseegenclusters: Herstellung von Deletionsmutanten und Untersuchung deren Sekundärstoffproduktion	54
1.4.1	Inaktivierung der Gene <i>fnq26</i> und <i>fnq28</i>	54
1.4.2	Inaktivierung aller Gene von <i>fnq26</i> bis <i>ephzA</i>	56
1.4.3	Sekundärstoffproduktion der Deletionsmutanten.....	57
1.4.4	Komplementierung der $\Delta fnq26-28ephzBCDEGA$ -Mutante.....	58
2.	Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase Fmq26 aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042	59
2.1	Sequenzanalyse und Klonierung von <i>fnq26</i>	59
2.2	Überproduktion und Reinigung	60
2.3	Isolierung von Flaviolin als Substrat für Fmq26 aus <i>Pseudomonas putida</i> (pFG154-1).....	60
2.4	Identifizierung der enzymatischen Produkte.....	61
2.5	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von Fmq26.....	65
2.5.1	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes.....	65
2.5.2	Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH, Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren.....	66
2.5.3	Bestimmung der kinetischen Parameter.....	67
2.5.4	Testung verschiedener Substrate.....	68
3.	Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs der Isopreneinheiten in Endophenazin A und Furanonaphthochinon I.....	70
3.1	Vorversuche zu den Fütterungsexperimenten.....	70
3.2	Fütterungen mit [$^{13}\text{C}_2$]Natriumacetat und [2- ^{13}C]Glycerol	72
3.2.1	NMR-Analyse von FNQ I und Endophenazin A nach Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]Natriumacetat.....	73
3.2.2	NMR-Analyse von FNQ I und Endophenazin A nach Fütterung von [2- ^{13}C]Glycerol.....	76

IV	Diskussion	78
1.	Identifizierung eines Biosyntheseegenclusters für Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus <i>Streptomyces cinnamomensis</i> DSM 1042	78
1.1	Gene der Phenazin-Biosynthese	78
1.2	Zwei Prenyltransferasegene <i>fnq26</i> und <i>fnq28</i>	79
1.3	Das Methyltransferasegen <i>fnq27</i>	79
1.4	Gene der FNQ I-Biosynthese	80
1.5	Ein putatives Mevalonatkinasegen <i>fnq19</i>	81
1.6	Ein putatives SAM-Biosyntheseegencluster	81
1.7	Schlussfolgerungen	82
2.	Die Prenyltransferase <i>Fnq26</i>	85
3.	Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs der Isopreneinheiten in Furanonaphthochinon I und Endophenazin A.....	87
V	Zusammenfassung	91
VI	Literatur	93
VII	Anhang	103
1.	MS-MS-Spektren von Endophenazin A, Endophenazin B und FNQ I	103
2.	MS-MS- und NMR-Spektren von Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin, 4-Hydroxybenzoesäure und ihren prenylierten Produkten 1, 2, 3, 4 und 5.....	105
3.	¹³ C-NMR Spektren der Substanzen nach Fütterung von [¹³ C ₂]Acetat und [2- ¹³ C]Glycerol.....	116
VIII	Danksagung	138
IX	Akademische Lehrer	140
X	Lebenslauf	141

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
aa	Aminosäure
bp	Basenpaare
bidest	bidestilliert
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Da	Dalton
dem.	demineralisiert
d.h.	das heißt
1,3-DHN	1,3-Dihydroxynaphthalin
1,6-DHN	1,6- Dihydroxynaphthalin
2,7-DHN	2,7- Dihydroxynaphthalin
DIG	Digoxigenin
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMS	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylenediamintetraessigsäure)
ESI	Electron spray impact
FNQ I	Furanonaphthochinon I
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography (Säulenchromatographie von Proteinen)
FPP	Farnesyldiphosphat
g	Gramm
GC-Gehalt	Gehalt an Guanosin und Cytosin
GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
4-HBA	4-Hydroxybenzoat
4-HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
incl.	inklusive
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid

k	kilo
K_{av}	Koeffizient zur Erstellung einer Kalibrierungskurve
kb	Kilobasen
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
Lsg	Lösung
M	molar
Mb	Megabasen
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
n	nano
nt	Nukleotide
NaOH	Natronlauge
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat-Agarose
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
OD	Optische Dichte
Orf	Open reading frame (Offener Leserahmen)
p.a.	zur Analyse
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP_i	Diphosphat (Pyrophosphat)
ppm	parts per million
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease (Ribonuklease)
RP	reversed phase
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofolat
THN	1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
V_0	Ausschlussvolumen
V_e	Elutionsvolumen

V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
V_t	Totvolumen
Vol.	Volumenteile
w	Gewicht
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

I Einleitung

1. Isoprenoide Naturstoffe

1.1 Struktur, Bedeutung und Herkunft

Isoprenoide, auch als Terpene oder Terpenoide bezeichnet, sind Naturstoffe, deren Struktur sich formal durch Vervielfachung von C5-Isopreneinheiten (Isopren= 2-Methylbutadien) aufbaut (s. Abb. I.1) (Hänsel *et al.*, 1999).

Isoprenoide kommen in allen Organismen vor, insbesondere in grünen Pflanzen. Mit mehr als 23 000 bekannten Strukturen stellen sie eine große und strukturell vielfältige Gruppe unter den Naturstoffen dar (Sacchetti and Poulter, 1997). Aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede und den damit verbundenen unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften haben Isoprenoide die verschiedensten biologischen Aktivitäten und pharmakologischen Eigenschaften. Neben den reinen Terpenen sind sog. Hybrid-Naturstoffe mit isoprenoiden Resten ebenfalls eine wichtige Stoffgruppe (siehe Tabelle I.1). Viele in der Vergangenheit und Gegenwart eingesetzte Arzneistoffe gehören in diese Klasse. Aber auch Coenzyme (Ubichinon und Plastochinon) und Vitamine (Tocopherol, Phyllochinon und Menachinon) tragen Reste terpenoiden Ursprungs.

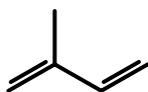


Abb. I.1 Isopren (2-Methylbutadien)

Tab. I.1: Isoprenoid-Hybride und ihre biologische Aktivität

Naturstoff	Quelle	Isoprenoid-Hybrid	Biolog. Aktivität
Khellin	Pflanzlich	Polyketid	bronchospasmolytisch
Mycophenolsäure	Pilzlich	Polyketid	immunsuppressiv
Tetrahydrocannabinol	Pflanzlich	Polyketid	narkotisch, antiemetisch
Rotenon	Pflanzlich	Isoflavonoid	insektizid
Psoralen	Pflanzlich	Cumarin	photosensibilisierend
Novobiocin	Bakteriell	Cumarin	antibiotisch
Lucidin	Pflanzlich	Anthrachinon	mutagen
Emetin	Pflanzlich	Isochinolinalkaloid	emetisch
Ergometrin	Pilzlich	Ergotalkaloid	Uterotonikum
Reserpin	Pflanzlich	Indolalkaloid	antihypertensiv
Vincristin	Pflanzlich	Indolalkaloid	antineoplastisch
Taxol	Pflanzlich	Taxusalkaloide	antineoplastisch
Strychnin	Pflanzlich	Indolalkaloid	toxisch
Lyngbyatoxin	Bakteriell	Indolalkaloid	inflammatorisch
Chinin	Pflanzlich	Chinolinalkaloid	gegen Malaria
Camptothecin	Pflanzlich	Chinolinalkaloid	Topoisomeraseinhibitor

Auch aus der Gattung *Streptomyces* sind mehrere Substanzen bekannt, die aus dem Terpenstoffwechsel stammen. Streptomyceten sind grampositive Bodenbakterien

und gehören zu den wichtigsten Naturstoffproduzenten und produzieren als bakterielle Sekundärstoffe verschiedene biologisch aktive Substanzen (Hopwood, 2007). Sie produzieren eine Reihe von Substanzen terpenoiden Ursprungs, die strukturell unterschiedlich zu Isoprenoiden aus eukaryotischen Zellen sind (Dairi, 2005). Isoprenoid-Hybride aus *Streptomyces* enthalten eine oder mehrere unterschiedlich lange Prenylseitenketten in ihren Strukturen, wie z.B. Cumarine (Novobiocin und Clorobiocin), Naphthochinone (Naphterpin, Furaquinocin, Napyradiomycin und Furanonaphthochinon I), Phenazine (Lavanducyanin, Benthocyanin und Endophenazine A-C) und andere aromatische Verbindungen.

1.2 Biosynthese von Isoprenoiden in *Streptomyces*

Die Biosynthese von Isoprenoiden erfolgt in Tieren und Archaeobakterien über den Mevalonatweg (Eisenreich *et al.*, 2004; Kuzuyama and Seto, 2003). Dabei wird Isopentenylidiphosphat (IPP) aus drei Molekülen Acetyl-CoA über 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonsäure synthetisiert (s. Abb. I.2). Es existiert jedoch ein alternativer Biosyntheseweg, der als Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) bezeichnet wird. Die Bildung von Isoprenoiden über den mevalonatunabhängigen MEP-Weg konnte in Bakterien, Grünalgen und in höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Eisenreich *et al.*, 1997; Rohmer *et al.*, 1993; Schwender *et al.*, 1996). Bei diesem alternativen Biosyntheseweg sind Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat die Vorstufen. Sie werden via 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) und 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) zu IPP umgewandelt (s. Abb. I.3).

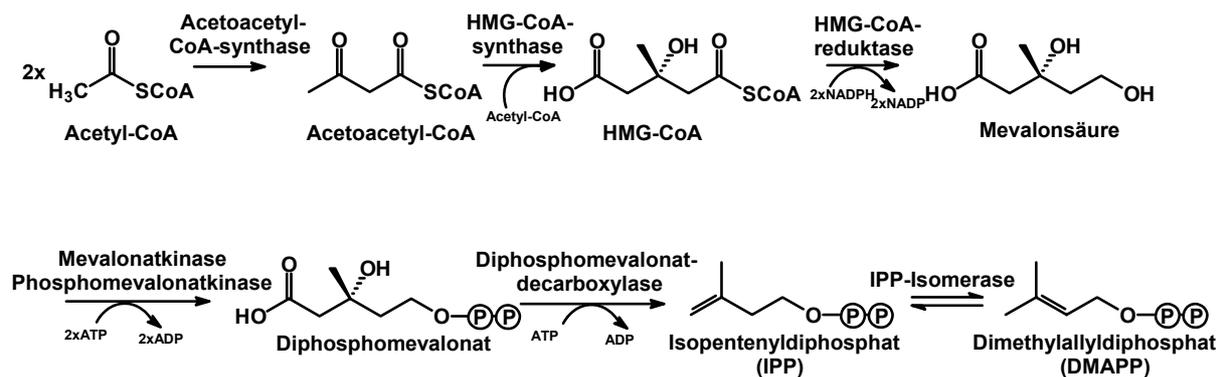


Abb. I.2 Biosynthese von IPP über den Mevalonatweg

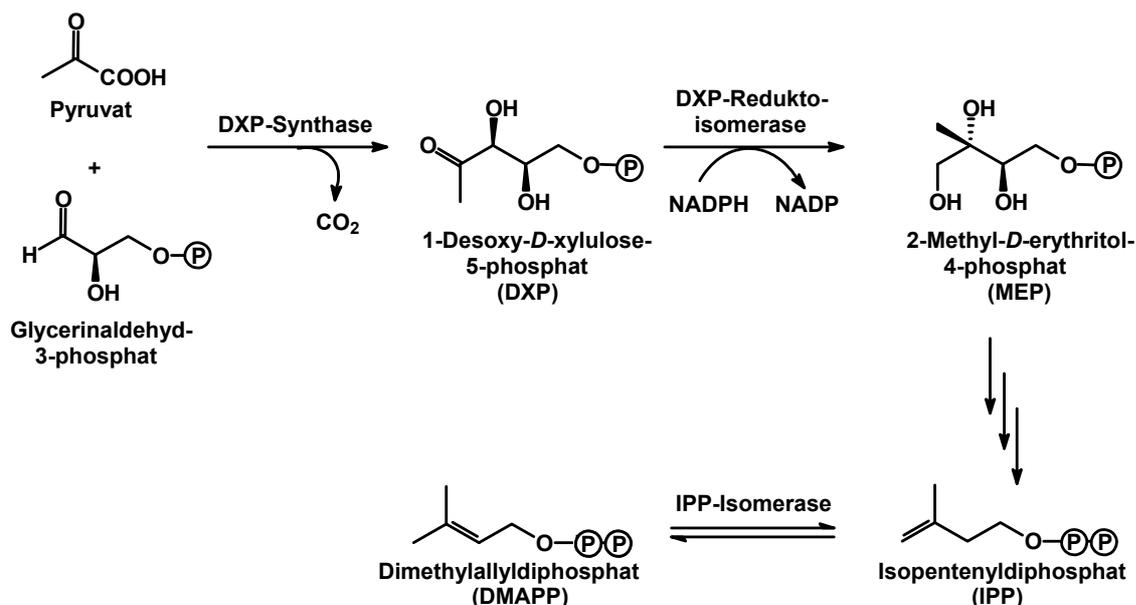


Abb. I.3 Biosynthese von IPP über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg)

Streptomyceten benutzen den MEP-Weg zur Biosynthese von Metaboliten des Primärstoffwechsels, wie z.B. Menachinon (Kuzuyama and Seto, 2003; Seto *et al.*, 1996), sowie für die Produktion der Isopreneinheiten einiger Sekundärstoffe wie Pentalenolacton (Cane *et al.*, 1979; Kuzuyama and Seto, 2003), Carquinostatin B (Orihara *et al.*, 1997), Moenomycin A (Endler K. *et al.*, 1998) und Novobiocin (Li *et al.*, 1998; Orihara *et al.*, 1998). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass einige *Streptomyces*-Arten zusätzlich den Mevalonatweg zur Bereitstellung von IPP nutzen und diesen Stoffwechselweg anscheinend ausschließlich für die Produktion von Sekundärstoffen verwenden (Kuzuyama and Seto, 2003). Fütterungsexperimente mit [¹³C]markierten Vorstufen haben gezeigt, dass die Isoprenoideinheiten von Naphterpin (Seto *et al.*, 1996; Shin-Ya *et al.*, 1990), Furaquinocin (Funayama *et al.*, 1990), Napyradiomycin (Shiomi *et al.*, 1987), BE-40644 (Seto *et al.*, 1998) und Terpentecin (Isshiki *et al.*, 1986) über den Mevalonatweg synthetisiert werden. Die Ergebnisse der Fütterungsexperimente wurden durch neuere genetische Daten untermauert, die zeigen, dass die Produzenten von Furaquinocin, Naphterpin, Terpentecin und BE-40644 in ihrem Genom Gene enthalten, die für die sechs benötigten Enzyme des Mevalonatwegs kodieren: HMG-CoA-Synthase, HMG-CoA-Reduktase, Mevalonatdiphosphatdecarboxylase, Phosphomevalonatkinase, Mevalonatkinase und Typ-II-IPP-Isomerase (Hamano *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2000). Diese sechs Gene sind in den vier Genclustern in derselben Reihenfolge in einem einzigen Operon angeordnet und die orthologen Gene zeigen im Durchschnitt mehr als 70% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene. Durch heterologe Expression wurde nachgewiesen, dass diese Gene die Biosynthese von IPP über den Mevalonatweg steuern.

2. Phenazine

2.1 Struktur, Vorkommen und Bedeutung

Mehr als 6 000 Phenazinstrukturen sind bekannt und mehrere Hundert davon besitzen unterschiedliche biologische Aktivitäten (Laursen and Nielsen, 2004). Phenazine sind planare, heterozyklische, stickstoffhaltige Metabolite und aufgrund ihrer hohen Elektronendichte leicht für Redoxreaktionen zugänglich. Sie haben antibiotische und antimykotische Eigenschaften, außerdem zeigen sie Aktivität gegen Tumoren, Malaria und Parasiten (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Laursen and Nielsen, 2004).

Natürlich vorkommende Phenazine werden ausschließlich von Bakterien als Sekundärstoffe gebildet (Turner and Messenger, 1986). Die meisten werden von *Pseudomonas*- und *Streptomyces*-Arten sowie von einigen marinen Bakterienarten und Bodenbakterien produziert (Laursen and Nielsen, 2004). Die aus *Pseudomonas*-Arten isolierten Phenazine sind meist einfache Strukturen (Laursen and Nielsen, 2004), wie z.B. die schon im 19. Jahrhundert aus *Pseudomonas aeruginosa* isolierten Phenazine Pyocyanin und Chlororaphin oder das seit der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bekannte violette Iodinin aus *Pseudomonas aureofaciens* (Turner and Messenger, 1986) (s. Abb. I.4). Das von dem human-pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* gebildete Pyocyanin färbt das Sputum von Patienten mit zystischer Fibrose blau und hemmt als bakterieller Virulenzfaktor die Ziliarfunktion des Flimmerepithels in den Lungen (Mavrodi *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 1987).

Dagegen wurden aus *Streptomyces* auch komplexere Strukturen isoliert, wie z.B. Griseolutein (Umezawa *et al.*, 1950) oder Esmeraldin (Keller-Schierlein *et al.*, 1988) (s. Abb. I.4). Diese höher substituierten Phenazine besitzen neben der antibiotischen Wirkung auch Radikalfängereigenschaften und zeigen Aktivität gegen Tumoren (Laursen and Nielsen, 2004).

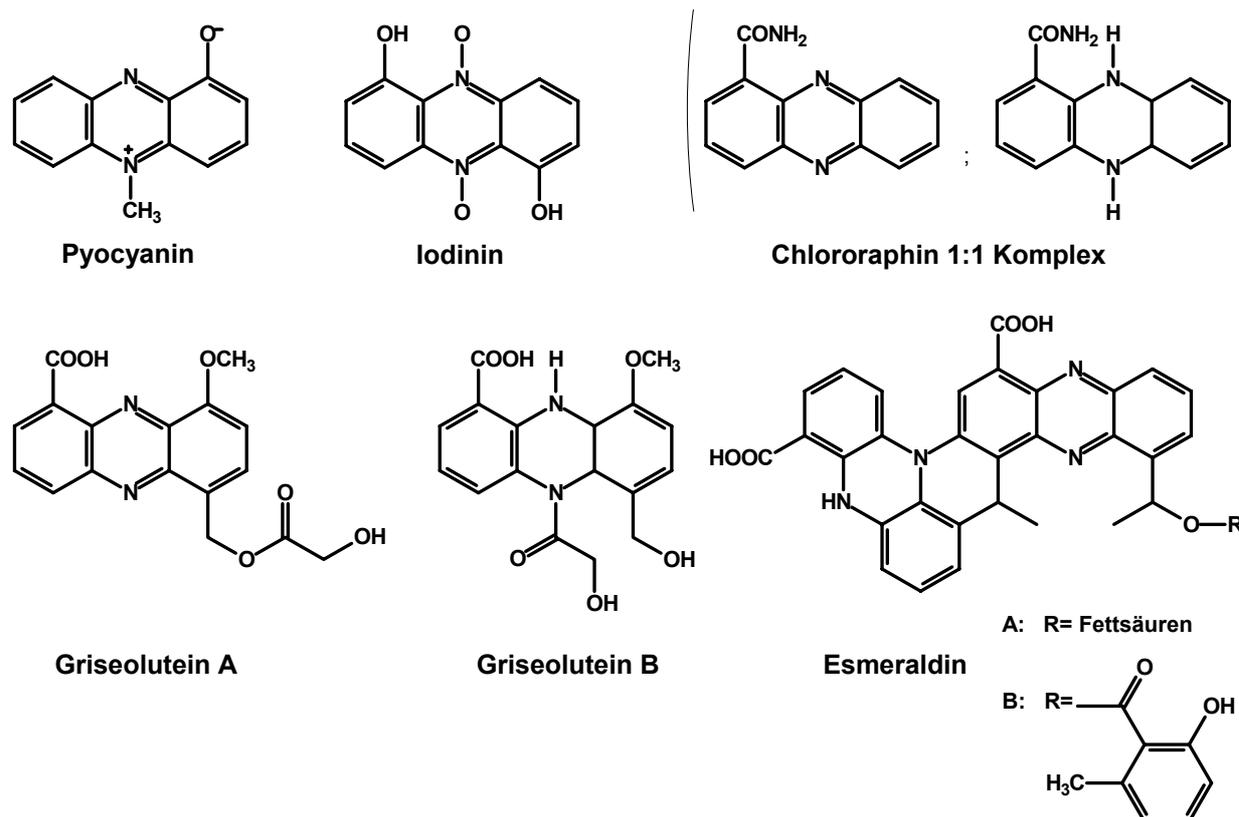


Abb. I.4 Strukturen verschiedener Phenazine

2.2 Biosynthese

Die Biosynthese des Phenazingrundgerüsts wurde in mehreren Studien mit radioaktiv markierten Vorstufen in *Pseudomonas* untersucht. Chorisminsäure nimmt dabei anscheinend eine Schlüsselrolle ein (Mavrodi *et al.*, 2006). Der hypothetische Biosyntheseweg von Phenazin-1-carbonsäure in *P. fluorescens* 2-79 ist in Abb. I.5 dargestellt (Mavrodi *et al.*, 2006).

Die Beteiligung von PhzC, PhzE und PhzD an der Bildung von 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat (DAHP), 2-Amino-2-desoxy-isochorisminsäure (ADIC) und 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHHA) ist experimentell belegt (McDonald *et al.*, 2001; Parsons *et al.*, 2003). Dagegen ist die Funktion von PhzA, PhzB und PhzG weitgehend unklar (Mavrodi *et al.*, 2006). PhzF scheint für die Isomerisierung von DHHA benötigt zu werden, bevor dann durch Dimerisierung und Oxidation das Phenazingerüst entsteht (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2004). Die beiden Stickstoffatome des Heterozyklus stammen von Glutamin, dessen Aminogruppe enzymatisch auf Chorisminsäure übertragen wird (s. Abb. I.5).

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits mehrere Phenazin-Biosynthesegencluster aus verschiedenen *Pseudomonas*- und *Erwinia*-Arten bekannt (Georgakopoulos *et al.*, 1994; Giddens *et al.*, 2002; Mavrodi *et al.*, 1998; Pierson, III and Thomashow, 1992). In Abb. I.5 ist das Biosynthesegencluster aus *P. fluorescens* 2-79 (McDonald *et al.*, 2001) schematisch dargestellt.

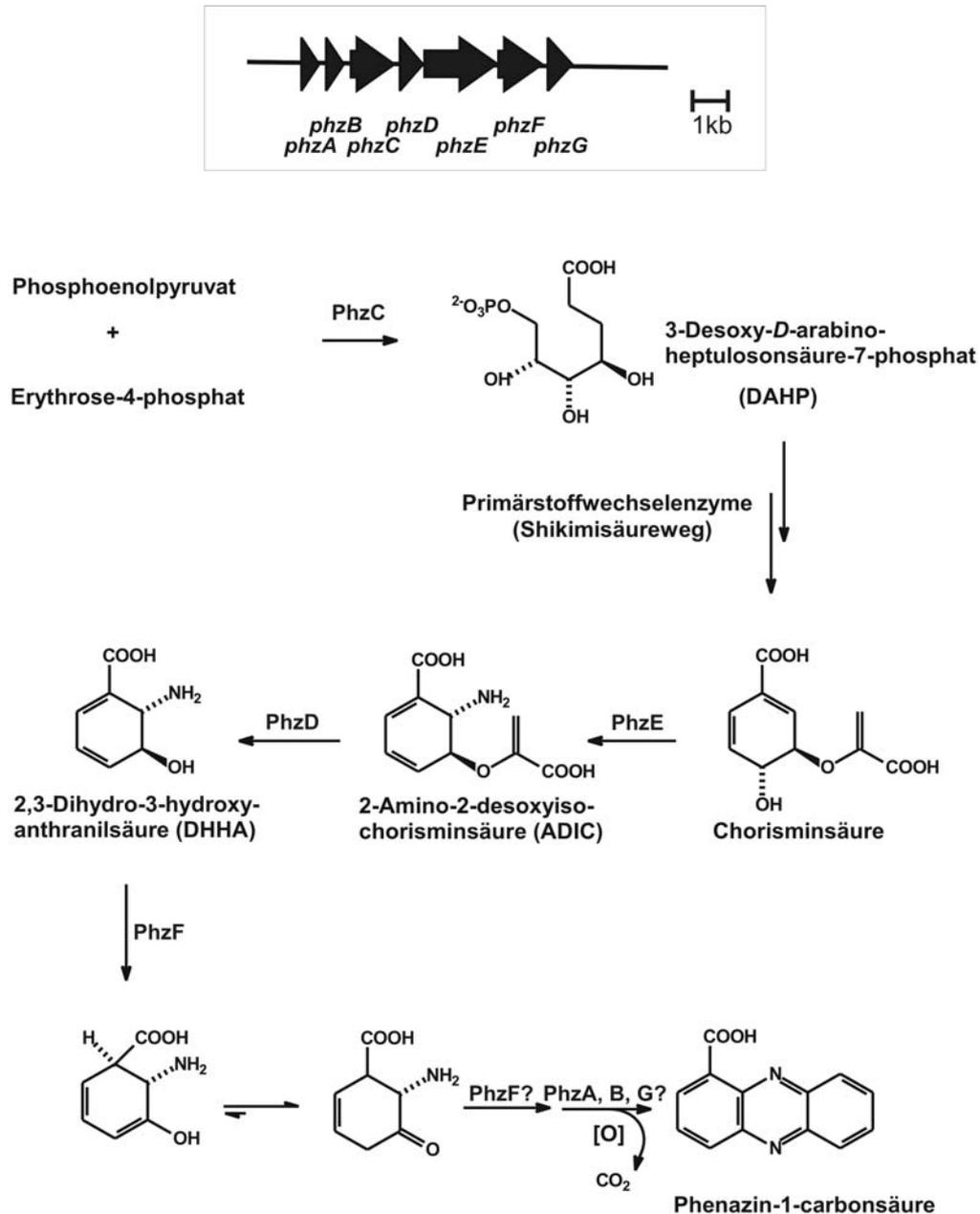


Abb. 1.5 Phenazin-Biosynthesegencluster aus *P. fluorescens* 2-79 und hypothetischer Biosyntheseweg von Phenazin-1-carbonsäure.

2.3 Prenylierte Phenazine

Aus *Streptomyces* sind sowohl C- als auch N-prenylierte Phenazine isoliert worden (s. Abb. 1.6). Das von *S. prunicolor* gebildete N-prenylierte Benthocyanin B zeigt *in vitro* starke Radikalfängereigenschaften (Laursen and Nielsen, 2004). Lavanducyanin aus *Streptomyces* sp. strain CL190 zeigt hingegen Aktivität gegen bestimmte Tumorzelllinien und eine kompetitive Hemmung der Testosteron-5 α -Reduktase (Laursen and Nielsen, 2004).

Die C-prenylierten Endophenazine A-C wurden zusammen mit Endophenazin D und Phenazin-1-carbonsäure als Sekundärmetabolite aus *S. anulatus* 9663 beschrieben, der als endosymbiontischer Stamm aus dem Verdauungstrakt einer Assel isoliert

wurde (*Isopoda Gen. spec.*) (Gebhardt *et al.*, 2002; Krastel *et al.*, 2002). Die Endophenazine A und C zeigen antibiotische Aktivität gegen grampositive Bakterien und einige Pilze, wohingegen für Endophenazin B keinerlei biologische Aktivität gezeigt werden konnte (Gebhardt *et al.*, 2002). Endophenazin A und B haben eine schwach herbizide Wirkung gegen *Lemna minor*.

Tax *et al.* haben zusammen mit Phenazin-1-carbonsäure ein an Position 6 C-prenyliertes Phenazin aus *S. cinnamonensis* ATCC 15413 isoliert (Tax *et al.*, 1983). Die berichteten spektroskopischen Daten von Endophenazin A (Krastel *et al.*, 2002) waren identisch mit denen der von Tax *et al.* beschriebenen 1,6-substituierten Substanz, weshalb Krastel *et al.* davon ausgingen, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Ergebnisse von NOE-Messungen (Nuclear Overhauser Effect) zeigten jedoch, dass die Dimethylallylseitenkette nicht an Position 6 sondern an Position 9 des Phenazinrings gebunden ist (Krastel *et al.*, 2002).

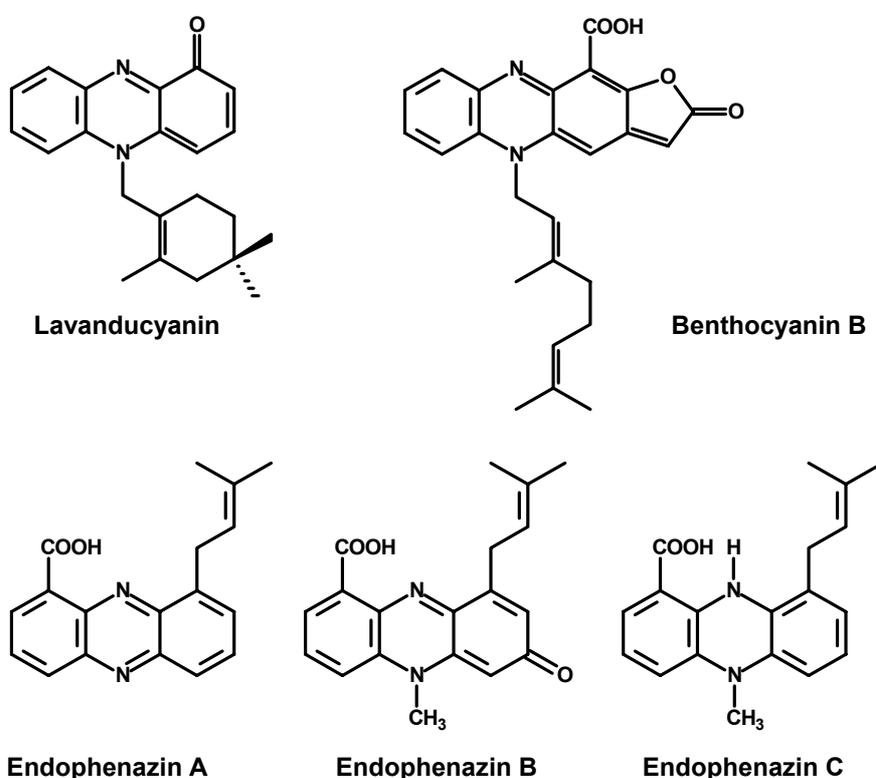


Abb. I.6 Strukturen von *Lavanducyanin*, *Benthocyanin B* und *Endophenazin A-C*

Das *N*-prenylierte Phenazin Lavanducyanin wird vom Naphterpinproduzenten *Streptomyces* sp. strain CL190 gebildet (Imai *et al.*, 1989), in dessen Genom ein komplettes Mevalonat-Biosynthesegencluster gefunden wurde (Takagi *et al.*, 2000). Die Prenyleinheit von Naphterpin stammt aus dem Mevalonatstoffwechsel, weshalb Kuzuyama und Seto spekulierten (2003), dass auch die Prenyleinheit von Lavanducyanin aus dem Mevalonatstoffwechsel stammt. Kuzuyama *et al.* (2002) untersuchten die Produzenten von Aestivophenin und Benthocyanin mittels Southern Hybridisierung unter Verwendung der konservierten Bereiche der HMG-

CoA-Reduktase als Sonde. Die Autoren konnten bei beiden Produzenten eine Kreuzhybridisierung mit der Sonde zeigen. Insofern erscheint es plausibel, dass die Isopreneinheiten von Aestivophoenin und Benthocyanin auch über den Mevalonatweg synthetisiert werden (Kuzuyama and Seto, 2003).

3. Furanonaphthochinon I

3.1 Vorkommen, Struktur und Bedeutung

Furanonaphthochinon I (FNQ I) ist ein Polyketid-Isoprenoid-Hybrid, was als Meroterpenoid bezeichnet wird (Simpson, 1998). Es ist zusammengesetzt aus einem acetogenen Naphthochinongerüst und einer zyklisierten Geranylseitenkette (s. Abb. I.7). FNQ I wurde von Sedmera *et al.* (1991) aus *S. cinnamomensis* ATCC 15413 isoliert und beschrieben.

FNQ I ist strukturell verwandt mit Naphterpin aus *Streptomyces* sp. strain CL 190 (Shin-ya *et al.*, 1990) und Furaquinocin A und D aus *Streptomyces* sp. strain KO-3988 (Funayama *et al.*, 1989) (s. Abb. I.7). Alle diese Substanzen haben antimikrobielle, antioxidative, antivirale und antiinflammatorische Eigenschaften und zeigen zudem Aktivität gegen Tumoren (Kuzuyama *et al.*, 2005).

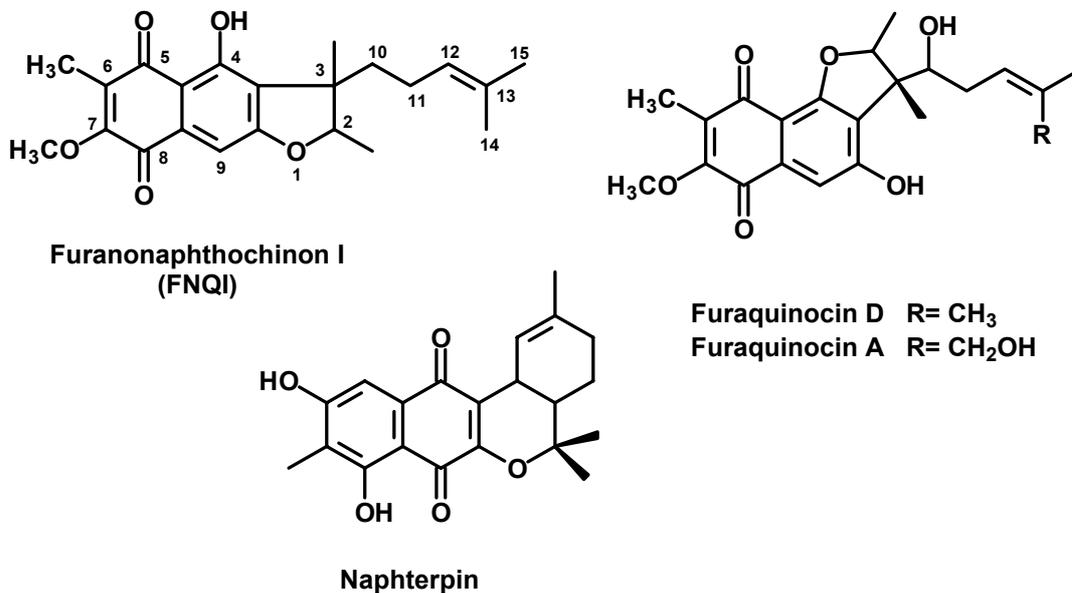


Abb. I.7 Strukturen von Furanonaphthochinon I (FNQ I), Naphterpin und Furaquinocin A und D

Ein weiteres Furanonaphthochinon FNQ 3 (s. Abb. I.8) wurde aus der Rinde von *Tecoma ipe* isoliert bzw. später synthetisch hergestellt (Nagata *et al.*, 1998). Wie auch FNQ 13, das ebenfalls von Nagata *et al.* synthetisch hergestellt wurde, ist FNQ 3 aktiv gegen Pilze, gramnegative und grampositive Bakterien, darunter auch einige Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme (Nagata *et al.*, 1998). Außerdem konnte für FNQ 3 *in vitro* eine gute Aktivität gegen leukämische Tumorzellen gezeigt werden (Desmond *et al.*, 2005).

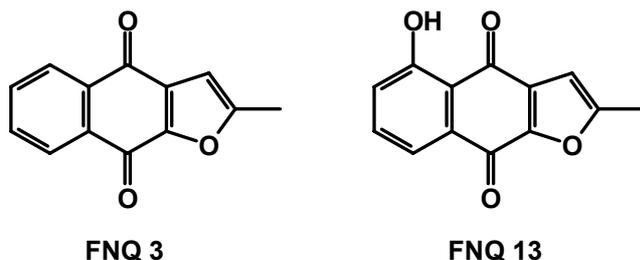


Abb. I.8 Strukturen von FNQ 3 und FNQ 13

3.2 Biosynthese von Furanonaphthochinon I

Furanonaphthochinon I (FNQ I) ist zusammengesetzt aus einem Naphthochinongerüst und einer zyklisierten isoprenoiden Seitenkette (s. Abb. I.7). Die Isopreneinheit kann sowohl aus dem Mevalonat- als auch aus dem Methylerythritolphosphatstoffwechsel (s. Abb. I.2 und Abb. I.3) stammen. Durch Fütterungsversuche mit [^{13}C]markiertem Acetat wurde nachgewiesen, dass die Isopreneinheiten der Meroterpenoide Naphterpin, Furaquinocin, Napyradiomycin, BE-40644 und Terpentecin über den Mevalonatweg gebildet werden (Funayama *et al.*, 1990; Isshiki *et al.*, 1986; Seto *et al.*, 1996; Seto *et al.*, 1998; Shin-Ya *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1987).

Das Naphthochinongerüst von FNQ I leitet sich sehr wahrscheinlich von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN) ab. Die oben erwähnten Fütterungsexperimente haben für die Biosynthese von Naphterpin, Furaquinocin und Napyradiomycin gezeigt, dass ein symmetrisches Intermediat, wahrscheinlich THN, vorkommen muss (Funayama *et al.*, 1990; Shin-Ya *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1987). THN entsteht durch Kondensation von fünf Molekülen Malonyl-CoA unter enzymatischer Katalyse einer THN-Synthase. Für RppA aus *S. griseus* (Funa *et al.*, 1999; Funa *et al.*, 2002) und aus *S. antibioticus* IFO 13271 (Funa *et al.*, 2005) sowie für ein ähnliches Protein aus *S. coelicolor* (Austin *et al.*, 2004; Izumikawa *et al.*, 2003) wurde die Funktion als THN-Synthase nachgewiesen. THN wird unter Beteiligung von MomA, einer Monooxygenase, enzymatisch zu Flaviolin oxidiert (Funa *et al.*, 2005). In Abb. I.9 ist der hypothetische Biosyntheseweg für FNQ I schematisch dargestellt.

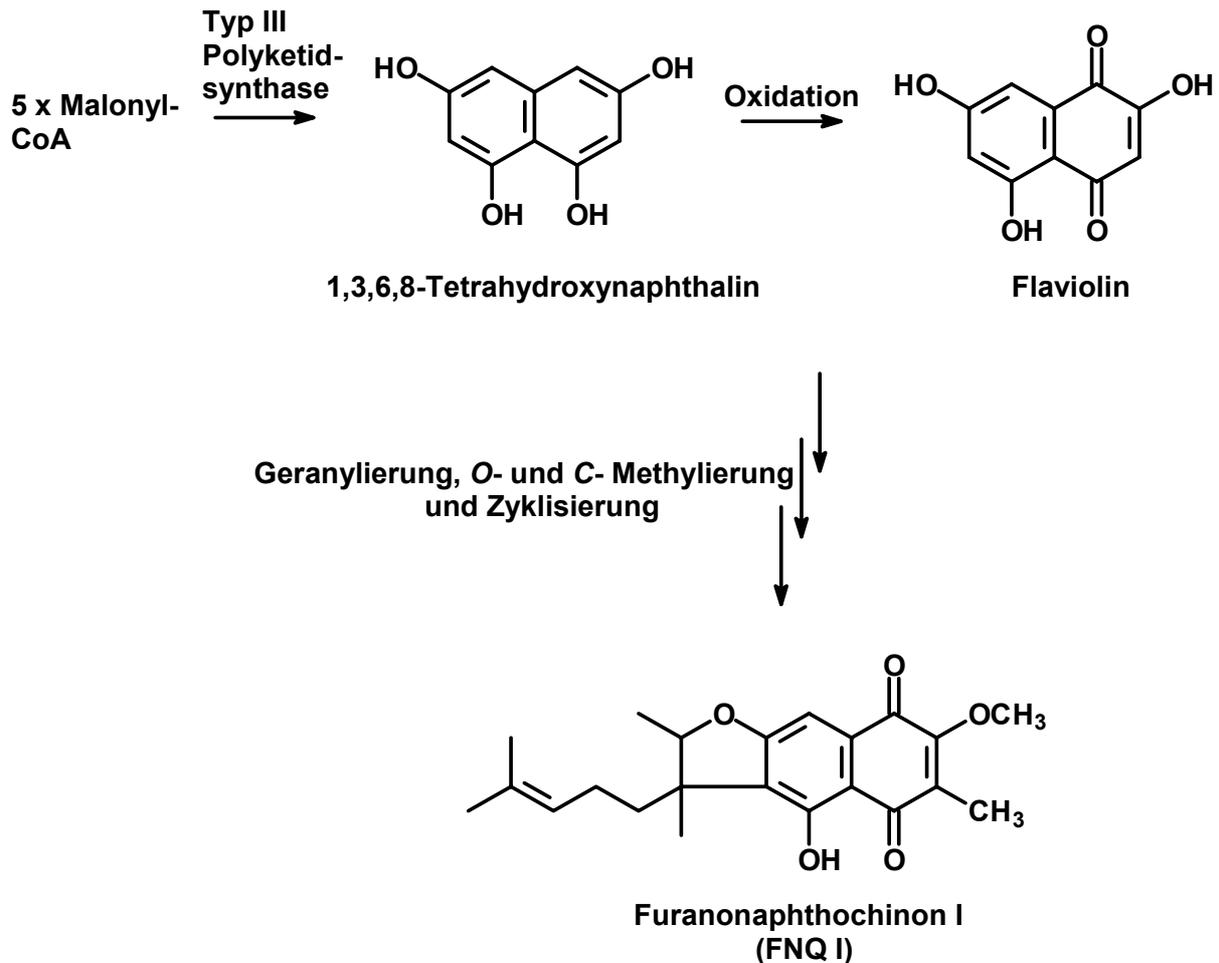


Abb. 1.9 Schematische Darstellung des hypothetischen Biosynthesewegs von FNQ I in *S. cinnamonensis* DSM 1042

4. Prenyltransferasen

Prenyltransferasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die die Alkylierung von elektronenreichen Systemen durch Isoprendiphosphate katalysieren. Als Prenylakzeptor kommen Isopentenylidiphosphat (IPP), Prenyldiphosphate höherer Ordnung, aromatische Moleküle oder Proteine in Frage.

Die Prenylierung von aromatischen Verbindungen hat zu einer großen Vielfalt von Sekundärstoffen in der Natur geführt. Die entstehenden Hybrid-Isoprenoide unterscheiden sich oftmals in ihren Eigenschaften und biologischen Aktivitäten von ihren nicht-prenylierten Vorstufen (Botta *et al.*, 2005b). Insofern nehmen sogenannte „aromatische Prenyltransferasen“ eine Schlüsselrolle ein, da sie die Verknüpfung des Isoprenoidrestes mit einem Aromaten aus dem Polyketid-, Shikimat- oder Phenylpropan-Weg katalysieren. Dennoch ist bisher wenig über Prenyltransferasen bekannt, die die Übertragung eines Isoprenoidrestes auf Aromaten katalysieren. Dahingegen sind *trans*-Prenyltransferasen aus dem Terpenstoffwechsel oder auch Proteinprenyltransferasen intensiver erforscht worden (Liang *et al.*, 2002).

Einige aromatische Prenyltransferasen sind in der Vergangenheit untersucht worden. Meist handelte es sich dabei um Enzyme aus dem Primärstoffwechsel wie z.B. UbiA aus der Ubichinon-Biosynthese (Melzer and Heide, 1994), MenA aus der Menachinon-Biosynthese (Suvarna *et al.*, 1998), Slr1736 aus der Tocopherol-Biosynthese (Schledz *et al.*, 2001) oder Pds2 aus der Plastochinon-Biosynthese (Collakova and DellaPenna, 2001). LePGT1 und 2 aus der Shikonin-Biosynthese in *Lithospermum erythrorhizon* sind dagegen aromatische Prenyltransferasen aus dem Sekundärstoffwechsel (Yazaki *et al.*, 2002). Alle diese Prenyltransferasen sind membrangebundene Proteine, deren enzymatische Aktivität von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen abhängig ist und die das typische Prenyldiphosphat-Bindemotiv (D/N)DXXD enthalten.

Erst seit wenigen Jahren ist eine neue Klasse von aromatischen Prenyltransferasen aus Streptomyceten bekannt, die dieses (D/N)DXXD-Motiv nicht aufweisen. Diese Klasse umfasst CloQ und NovQ, die in der Biosynthese der Aminocoumarinantibiotika Clorobiocin und Novobiocin für die Verknüpfung einer Dimethylallyleinheit mit C-3 von 4-Hydroxyphenylpyruvat verantwortlich sind (Pojer *et al.*, 2003), sowie Orf2 aus der Naphterin-Biosynthese. Orf2 verknüpft eine Geranyleinheit mit verschiedenen phenolischen Substraten, wobei das genuine Substrat von Orf2 bisher noch unbekannt ist (Kuzuyama *et al.*, 2005). Während die enzymatische Aktivität von CloQ unabhängig von zweiwertigen Kationen ist, benötigt Orf2 die Anwesenheit von Magnesium.

Die Röntgenstruktur von Orf2 wurde von Kuzuyama *et al.* (2005) aufgeklärt. Orf2 besitzt eine neuartige Proteinstruktur, die sog. Prenyltransferase-Barrel (PT-Barrel). Im Gegensatz zur weit verbreiteten α/β -Barrel weist diese PT-Barrel nicht parallele, sondern antiparallele β -Faltblattstränge auf, bedingt durch die regelmäßige Wiederholung eines α -Helix/ β -Faltblatt/ β -Faltblatt/ α -Helix-Motives (Kuzuyama *et al.*, 2005).

Die Prenyltransferasen dieser Klasse sind alle lösliche, monomer vorliegende Biokatalysatoren, die zum Teil ein ungewöhnliches Spektrum von aromatischen Substraten akzeptieren.

Einige pilzliche aromatische Prenyltransferasen sind ebenfalls in jüngster Zeit identifiziert und charakterisiert worden. Dazu gehört auch FgaPT1, ein Enzym aus der Fumigaclavin-Biosynthese aus *Aspergillus* (Unsöld and Li, 2006), das eine sog. „reverse“ Verknüpfung der Dimethylallyleinheit mit dem aromatischen Substrat katalysiert, was bedeutet, dass die Bindung des Prenyldiphosphates zum Aromaten über C-3 des Prenyldiphosphates erfolgt (Williams *et al.*, 2000).

Eine weitere reverse Prenyltransferase ist LtxC aus der Lyngbyatoxin-Biosynthese aus *Lyngbya majuscula* (Edwards and Gerwick, 2004).

Bis zu Beginn dieser Arbeit war noch keine reverse Prenyltransferase aus *Streptomyces* bekannt.

5. Zielsetzung der Arbeit

Streptomyces cinnamomensis DSM 1042 produziert zwei Arten von Sekundärstoffen mit isoprenoiden Strukturen: das geranylierte Naphthochinon Furanonaphthochinon I (FNQ I) und prenylierte Phenazine, insbesondere Endophenazin A. Zu Beginn dieser Arbeit waren zwar schon einige Phenazin-Biosynthesegencluster aus verschiedenen Organismen, vor allem aus *Pseudomonas*-Stämmen bekannt, jedoch keines für prenylierte Phenazine und ebenso keines aus *Streptomyces*.

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Analyse des Biosynthesegenclusters für Endophenazin A in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. Der Vergleich mit den bereits bekannten Phenazin-Biosynthesegenclustern aus anderen Organismen sollte die Identifizierung der Phenazin-Biosynthesegene und möglicherweise auch eines putativen Prenyltransferasegens erlauben.

Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Nachweis der Endophenazin A-Produktion in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042
- Herstellung einer Cosmidbank von *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042 und Screening mit einer Sonde (*esmA*) aus dem Esmeraldin-Biosynthesegencluster aus *Streptomyces antibioticus* Tü2706
- Sequenzierung und Analyse des putativen Endophenazin A-Biosynthesegenclusters
- Funktionelle Analyse des Genclusters durch Geninaktivierungsexperimente

Die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeiten ergab, dass im Genom von *S. cinnamomensis* die Biosynthesegencluster von Endophenazinen und FNQ I unmittelbar aneinander grenzen. An der Schnittstelle beider Gencluster konnten zwei putative Prenyltransferasegene, *fnq26* und *fnq28*, identifiziert werden. Die Inaktivierungsexperimente bewiesen, dass *fnq26* an der FNQ I-Biosynthese beteiligt ist.

Sequenzanalysen deuteten darauf hin, dass Fmq26 zu einer kürzlich identifizierten, neuen Klasse von aromatischen Prenyltransferasen gehört.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war daraufhin die biochemische Untersuchung der Prenyltransferase Fmq26.

Dazu wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- Klonierung des putativen Prenyltransferasegens *fnq26* in einen Expressionsvektor
- Heterologe Überproduktion der Prenyltransferase Fmq26

- Reinigung und biochemische Charakterisierung der Prenyltransferase
- Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von Fnq26

In dem untersuchten Biosynthesegencluster von *S. cinnamomensis* wurde das Gen *fnq19* identifiziert, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu Mevalonatkinasen hat. Jedoch fehlen die Gene für die anderen fünf Enzyme des Mevalonat-Biosyntheseweges. Diese Tatsache warf die Frage nach dem biosynthetischen Ursprung der Isoprenoideinheiten von FNQ I und Endophenazin A auf.

Dieser Frage wurde durch Fütterungsversuche mit [^{13}C]markierten Vorstufen nachgegangen. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann in Würzburg durchgeführt.

Folgende Arbeiten wurden im Rahmen dieses Projektes durchgeführt:

- Optimierung der Produktionsmengen von Endophenazin A und FNQ I
- Fütterungsexperiment mit [$^{13}\text{C}_2$]Acetat, Isolierung der beiden Sekundärstoffe und deren Analyse mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie
- Fütterungsexperiment mit [2- ^{13}C]Glycerol, Isolierung der beiden Sekundärstoffe und deren Analyse mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie

II Material und Methoden

1. Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme

1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vorwiegend von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden hauptsächlich von der Firma Difco (Augsburg) verwendet. Die Referenzsubstanzen Endophenazin A, B, C und D, sowie Sporen von *S. anulatus* 9663 wurden freundlicherweise von H.-P. Fiedler (Tübingen) und Furanonaphthochinon I von J. Spizek und P. Sedmera (Prag, Tschech. Republik) zur Verfügung gestellt.

GPP wurde im Arbeitskreis von L. Heide von I. Unsöld nach Woodside *et al.* (1993) chemisch synthetisiert.

Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle II.1 Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Hersteller	Bezeichnung
Acros Organics	1,3-Dihydroxynaphthalin 2,7-Dihydroxynaphthalin
Bioline GmbH, Luckenwalde	dNTP Mix
Biozym, Oldendorf	Agarose
Boehringer, Ingelheim	CSPD
Difco, Heidelberg	Nutrient Broth
Fluka, Taufkirchen	4-Hydroxybenzoat
Cambrex Bio Science, Rockland, USA	NuSieve [®] GTG [®] Agarose
Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA	[2- ¹³ C]Glycerol [¹³ C ₂]Natriumacetat
Heirler, Radolfzell	Magermilchpulver
IN Farmatik	Phenazin-1-carbonsäure
Merck, Darmstadt	EDTA Pepton Fermtech [®] Mannitol Phosphorpentoxid Rinderserumalbumin (BSA) Uvasol Acetonitril-d3 Uvasol Methanol-d4
Roth, Karlsruhe	Agar 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) 1,4-Dithiothreitol (DTT) Glucose Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG)

Hersteller	Bezeichnung
	Maleinsäure Natriumdodecylsulfat (SDS) Roti® Phenol/Chloroform (pH 8,0) Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Ameisensäure
Serva, Heidelberg	Coomassie Brilliant Blau R-250 N-Lauroylsarkosin (Na-Salz, 35%)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (TRIS) 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) Bromphenolblau Corn Steep liquor 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS) 3-(Cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (CAPSO) 1,6-Dihydroxynaphthalin Dimethylformamid (DMF) Dimethylsulfoxid (DMSO) EDTA N-tris(Hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure (TAPS) 4-Hydroxyphenylpyruvat Imidazol β-Mercaptoethanol Naringenin Olivetol Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1,4-Piperazinediethanesulfonsäure (PIPES) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) Resveratrol
SOBO Naturkost, Köln	Sojamehl
Südzucker, Mannheim	Saccharose, feine Raffinade

1.1 Materialien zur Chromatographie

Die Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung der Materialien erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Tabelle II.2 Chromatographiematerial

Hersteller	Säulenmaterial
Agilent, Waldbronn	Eclipse XDB-C18 (Fertigsäule, 5 µm, 150 x 4,6 mm)
Amersham Biosciences, Freiburg	Sephadex LH-20 Sephadex G-25 PD-10, NAP-10 (Fertigsäulen)
C+S Chromatographie Service, Düren	Multospher 120 RP 18 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 8 mm)
GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden	Benzamidin Sepharose
Qiagen, Hilden	Ni-NTA-Agarose (Suspension)

1.2 Enzyme und Kits

Tabelle II.3 Enzyme, Größenstandards und Kits

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences, Freiburg	Alkalische Phosphatase DNase I Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit Restriktionsendonukleasen T4-DNA-Ligase
Fluka, Ulm	Lysozym (76000 U/mg)
GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe	1 kb DNA-Leiter High Molecular Weight Marker (bis 48,5 kb) Precision Protein Standards™
Macherey-Nagel, Düren	NucleoBond® AX 100 NucleoSpin® Extract 2 in 1
Merck, Darmstadt	Proteinase K
New England Biolabs, Schwalbach	Restriktionsendonukleasen 100 bp DNA Leiter
Plant Biosciences Limited, Norwich, UK	REDIRECT® technology: PCR-targeting system in <i>Streptomyces coelicolor</i>
Promega, Mannheim	<i>Pfu</i> DNA Polymerase <i>Taq</i> DNA Polymerase pGEM®-T Vector System I
Qiagen, Hilden	RNase A
Roche Applied Science, Mannheim	DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert Expand High Fidelity PCR System PCR DIG Labeling Mix
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Lysozym Thrombin
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande	Gigapack® III XL Packaging Extract Restriktionsendonukleasen

2. Nährmedien und Puffer

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

2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium (Sambrook and Russell, 2001)

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

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

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

(zur Herstellung von Cosmidgenbanken)

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

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

TB-Medium

(zur Proteinexpression)

Bacto-Trypton	12,0 g
Bacto-Hefeextrakt	24,0 g
Glycerol	4,0 ml

Die Bestandteile werden in 900 ml dem. Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend werden 100 ml einer sterilen Lösung von 0,17 M KH₂PO₄ und 0,72 M K₂HPO₄ zugegeben.

SOB-Medium

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

Die Bestandteile werden in 800 ml dem. Wasser gelöst, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend werden 10 ml einer sterilen 1 M MgCl₂-Lösung zugegeben. (Für PCR-Targeting wird das Medium ohne den Zusatz von Mg²⁺-Ionen verwendet)

2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *Streptomyces*

HA-Medium

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

Die Bestandteile werden in 800 ml dem. Wasser gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. Anschließend wird 1 ml einer sterilen 1 M CaCl₂-Lösung zugegeben.

MS (mannitol-Soya flour)-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

Mannitol	20,0 g
Sojamehl	20,0 g
Agar	20,0 g

Das Mannitol wird in 1 l mit Leitungswasser gelöst. Davon werden jeweils 100 ml in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit je 2,0 g Agar und 2,0 g Sojamehl gegossen. Anschließend wird zweimal autoklaviert (115°C, 15 min) mit Schütteln zwischen beiden Autoklaviergängen.

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

Nutrient broth	8,0 g
Agar	20,0 g

Die Bestandteile werden mit dem. Wasser zu 1 l gelöst und anschließend autoklaviert.

2xYT-Medium (Kieser *et al.*, 2000)

(zur Konjugation)

Hefeextrakt	10,0 g
Trypton	16,0 g
NaCl	5,0 g

Die Bestandteile werden mit dem. Wasser zu 1 l gelöst und anschließend autoklaviert.

YMG (Yeast-Malt-Glucose)-Medium

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

Die Bestandteile werden in 800 ml dem. Wasser gelöst, auf pH 7,3 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

2.3 Produktionsmedien zur Kultivierung von *Streptomyces*

Produktionsmedium für *S. cinnamonensis* DSM 1042:

(Sedmera *et al.*, 1991)

NaCl	5,0 g
Sojamehl	15,0 g
Glycerol	50,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g
CaCO ₃	3,0 g

Die Bestandteile werden in 800 ml Leitungswasser suspendiert, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Modifiziertes Produktionsmedium für *S. cinnamonensis* DSM 1042:
(für Fütterungsexperimente (Bringmann *et al.*, 2007))

NaCl	2,5 g
Sojamehl	3,0 g
Glycerol	10,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,15 g
CaCO ₃	1,5 g

Die Bestandteile werden in 800 ml Leitungswasser suspendiert, auf pH 7,0 eingestellt, auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Produktionsmedium für *S. anulatus*:
(Gebhardt *et al.*, 2002)

Glucose	10,0 g
Maisstärke	10,0 g
Pepton Fermtech®	5,0 g
CaCO ₃	3,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
NaCl	1,0 g
Glycerol 86%	10,0 g
Corn Steep liquor	5,0 g

Die Bestandteile werden in 1 l Leitungswasser suspendiert und autoklaviert.

2.4 Antibiotika

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

Tabelle II.4 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml] (Lösungsmittel)	Arbeitskonzentration [µg/ml]	Hersteller
Apramycin	50 (H ₂ O)	50	Fluka, Taufkirchen
Carbenicillin	50 (H ₂ O)	50-100	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	25 (Ethanol)	25-50	Merck, Darmstadt
Kanamycin	50 (H ₂ O)	50	Sigma, Taufkirchen
Tetracyclin	25 (Ethanol)	12,5	Sigma, Taufkirchen

2.5 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

Tabelle II.5 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und von genomischer DNA aus Streptomyceten

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Lösung 1 (Lagerung: 4°C)	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/mL
Lösung 2 (nicht autoklaviert)	NaOH	0,2 M
	SDS	1% (m/v)
Lösung 3	Kaliumacetat pH 4,8	3 M
Natriumacetatlösung	Natriumacetat pH 5,2	3 M
TE-Puffer	Tris-HCl	10 mM (pH 7,5)
	EDTA	1 mM
TSE-Puffer	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	Saccharose	10,3% (m/v)
	EDTA	25 mM
SM-Puffer	Tris-HCl	6,95 g (pH 7,5)
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
	NaCl	5,8 g
	Gelatine-Lsg. (2%)	350 µl
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

2.5.2 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese

Tabelle II.6 Puffer und Lösungen zur DNA-Gelelektrophorese. Nur der 50 x TAE-Puffer wurde autoklaviert.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl	2 M (pH 7,8)
	Natriumacetat	0,5 M
	EDTA	50 mM
Ladepuffer (Lagerung: 4°C)	Glycerin	30% (m/v)
	Bromphenolblau	0,25% (m/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung (Lagerung: 4°C)	Ethidiumbromid	1 mg/l

2.5.3 Puffer und Lösungen zur Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteingelelektrophorese wurde eine Mini-PROTEAN® II Elektrophorese-Kammer von BIO-RAD verwendet. Die einzelnen Lösungsbestandteile der Gele wurden in der genannten Reihenfolge zusammen gemischt und die polymersierende Mischung sofort gegossen.

Tabelle II.7 Puffer und Lösungen zu Proteingelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung	
Trenngel (12%)	H ₂ O _{bidest}	3,35 mL
	1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL
	Rotiphorese® Gel 30	4,0 mL
	SDS [10% (m/v)]	0,1 mL
	APS [10% (m/v)]	0,05 mL
	TEMED	0,005 mL
Sammelgel (4%)	H ₂ O _{bidest}	6,1 mL
	0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 mL
	Rotiphorese® Gel 30	1,33 mL
	SDS [10% (m/v)]	0,1 mL
	APS [10% (m/v)]	0,05 mL
	TEMED	0,01 mL
Probenpuffer (Laemmli-Puffer) (Laemmli, 1970)	0,5 M Tris (pH 6,8)	1,25 mL
	Glycerin	1 mL
	SDS [10% (m/v)]	2,0 mL
	Bromphenolblau [0,05% (m/v)]	0,2 mL
	β-Mercaptoethanol	0,5 mL
	H ₂ O _{bidest}	ad 10,0 mL
10 x Laufpuffer	Tris-HCl	30,0 g
	SDS	10,0 g
	Glycin	144,0 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 L
Fixierlösung	H ₂ O _{bidest}	70 mL
	Methanol	20 mL
	Essigsäure	10 mL
Coomassie Brilliant Blau G250- Lösung	Coomassie Brilliant Blau G250	0,25% (w/v)
	H ₂ O _{bidest}	45 mL
	Methanol	45 mL
	Essigsäure	10 mL
Entfärberlösung	H ₂ O _{bidest}	45 mL
	Methanol	45 mL
	Essigsäure	10 mL

2.5.4 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Tabelle II.8 Puffer und Lösungen für Southern-Blot-Hybridisierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	100 mM (pH 7,5)
	NaCl	150 mM
Blocking-Solution (frisch herstellen oder bei -20°C lagern)	Magermilchpulver gelöst in 100 ml Maleinsäurepuffer	3,0 g
Detektionspuffer	Tris-HCl	100 mM (pH 9,5)
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
Depurinierungslösung	HCl	250 mM
Denaturierungslösung	NaOH	500 mM
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung	Tris-HCl	500 mM (pH 7,5)
	NaCl	3 M
20 x SSC	tri-Natrium-Citrat	300 mM (pH 7,0)
	NaCl	3 M
Prähybridisierungslösung (frisch herstellen oder bei -20°C lagern)	20 x SSC	25,0 mL
	Magermilchpulver	3,0 g
	SDS [10% (m/v)]	0,2 mL
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)]	0,29 mL
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 mL
Hybridisierungslösung (frisch herstellen oder bei -20°C lagern)	20 x SSC	2,5 mL
	Magermilchpulver	0,15 g
	SDS [10% (m/v)]	0,02 mL
	N-Lauroylsarkosin [35% (m/v)]	0,029 mL
	H ₂ O _{bidest}	ad 10,0 mL
2 x Waschpuffer	20 x SSC	10,0 mL
	SDS [10% (m/v)]	1,0 mL
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 mL
0,5 x Waschpuffer	20 x SSC	2,5 mL
	SDS [10% (m/v)]	1,0 mL
	H ₂ O _{bidest}	ad 100,0 mL
Tween-Waschpuffer	Tween 20	0,2 mL
	Maleinsäure-Puffer	100,0 mL

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

Tabelle II.9 Stammlösungen zur Blau-Weiß-Selektion

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

2.5.6 Puffer zur Proteinreinigung

Tabelle II.10 Puffer zur Reinigung von Proteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration

Puffer	Zusammensetzung	
Lysepuffer	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	Tween 20	1%
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
	PMSF	0,5 mM (frisch zugeben)
Waschpuffer	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	20 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Elutionspuffer	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	500 mM
	Imidazol	250 mM
	Glycerol	10% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)
Aufbewahrungspuffer Fnq26	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	NaCl	100 mM
	1,4-Dithiothreitol	2 mM
Puffer C	Tris-HCl	50 mM (pH 8,0)
	NaCl	150 mM
Dialysepuffer	Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM (frisch zugeben)

2.5.7 Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung

70 mg Serva Blau R 250 wurden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 100 ml 85%iger Phosphorsäure (m/v) gemischt. Diese Lösung wurde anschließend mit H₂O_{bidest.} zu 200 ml verdünnt. Diese 5 x Stammlösung wurde bei 4°C in einem Glasgefäß im

Dunkeln aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1:5 mit H₂O_{bidest} verdünnt und über ein Faltenfilter filtriert (Bradford, 1976).

3. Plasmide, Primer und Bakterienstämme

3.1 Plasmide

Tabelle II.11 Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Hersteller
pBluescript SK(-)	Klonierungsvektor, Amp ^R , f1(-)-Origin, ColE1-Origin, <i>lacZα</i>	Stratagene
SuperCos1	Cosmidvektor, Amp ^R , Neo ^R , S40-Origin	Stratagene
pGEM [®] -T	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang, <i>lacZα</i> , ori, f1-Origin, Amp ^R	Promega

Tabelle II.12 Plasmide und Cosmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₈ -Tag und C-terminalen (His) ₆ -Tag	(Jez <i>et al.</i> , 2000)
3E11	auf pOJ446 basierendes Cosmid, enthält Gene des Esmeraldinclusters aus <i>Streptomyces antibioticus</i> Tü2706	H.G. Floss und T.-W. Yu, persönliche Mitteilung
pIJ773	pBluscript SK(-)-Derivat, enthält Inaktivierungskassette <i>aac(3)IV</i> (Apra ^R) + <i>oriT</i>	GeneBank AX657066
pIJ776	pBluscript SK(-)-Derivat, enthält Inaktivierungskassette <i>neo</i> (Kan ^R) + <i>oriT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ784	pBluscript SK(-)-Derivat, enthält Inaktivierungskassette <i>aac(3)IV</i> (Apra ^R) + <i>oriT</i> zur Deletion der <i>bla</i> Sequenz	Bertolt Gust (pers. Mitteilung)
pIJ787	SuperCos1-Derivat, das <i>bla</i> Gen (Amp ^R) wurde durch eine Kassette ersetzt (<i>oriT</i> , Tet ^R , attP, intΦC31, Kan ^R)	A. Eustáquio (2004)
pFG154-1	Expressionskonstrukt für <i>Pseudomonas putida</i> , Kan ^R , Chitin-Tag, <i>rppa</i> (PKS III aus <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56)	(Gross <i>et al.</i> , 2006)
pUMV19	Auf pUC118 basierendes Plasmid, enthält ein 6,7 kb großes <i>SnaI</i> -Fragment aus dem Genom von <i>Streptomyces</i> sp. strain CL190 mit <i>OrfA-E</i> und <i>hmgr</i>	GenBank AB037666
pUWL201	<i>E. coli</i> -Streptomyceten-Shuttle-Vektor, Amp ^R , Thio ^R , konstitutiver ermE*-Promotor, pIJ101-Origin, ColE1-Origin	(Doumith <i>et al.</i> , 2000)
pLW34	Klonierungskonstrukt für <i>fnq28</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; PCR amplifiziertes Fragment (959 bp, Primer <i>fnq28_for</i> und <i>fnq28_rev</i>) aus 3-6H, kloniert in pGEM [®] -T	L. Westrich, diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pLW35	Klonierungs-konstrukt für <i>fnq26</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; PCR amplifiziertes Fragment (926 bp, Primer <i>fnq26_for</i> und <i>fnq26_rev</i>) aus 3-6H, kloniert in pGEM [®] -T	L. Westrich, diese Arbeit
pLW36	Expressions-konstrukt für <i>fnq28</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; 945 bp <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III Fragment aus pLW34, kloniert in pHis8 nach Thrombinschnitt in AS-Sequenz GSHGGS vor Start-M	L. Westrich, diese Arbeit
pLW37	Expressions-konstrukt für <i>fnq26</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; 918 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I Fragment aus pLW35, kloniert in pHis8 nach Thrombinschnitt in AS-Sequenz GSHGGS vor Start-M	L. Westrich, diese Arbeit

Tabelle II.13 Eigene Plasmid-Konstrukte. Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pYM01	3,4 kb-Fragment aus Cosmid 3-6H durch <i>Pst</i> I-Restriktionsverdau, kloniert in pBluescript SK(-)
pYM02	Klonierungs-konstrukt für <i>esmG</i> aus <i>Streptomyces antibioticus</i> Tü2706; PCR amplifiziertes Fragment (747 bp, Primer <i>esmGexpr_for</i> und <i>esmGexpr_rev</i>) aus 3E11, kloniert in pGEM [®] -T
pYM03	Expressions-konstrukt für <i>esmG</i> aus <i>Streptomyces antibioticus</i> Tü2706; 739 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I Fragment aus pYM02, kloniert in pUWL201
pYM04	Expressions-konstrukt für <i>fnq26</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; 912 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I Fragment aus pLW35, kloniert in pUWL201
pYM05	Expressions-konstrukt für <i>fnq28</i> aus <i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042; 951 bp <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I Fragment aus pLW34, kloniert in pUWL201
pYM06	von pUWL201 abgeleitetes Plasmid, <i>tsr</i> Gen (<i>Tsr</i> ^R) wurde durch Kasette aus pIJ776 ersetzt (<i>ori</i> T, <i>Kan</i> ^R)
pYM07	von pYM04 abgeleitetes Plasmid, <i>tsr</i> Gen (<i>Tsr</i> ^R) wurde durch Kasette aus pIJ776 ersetzt (<i>ori</i> T, <i>Kan</i> ^R)
pYM08	von pYM05 abgeleitetes Plasmid, <i>tsr</i> Gen (<i>Tsr</i> ^R) wurde durch Kasette aus pIJ776 ersetzt (<i>ori</i> T, <i>Kan</i> ^R)
Cosmid	
9-9A	auf SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält Teile des Biosynthesegenclusters für prenylierte Phenazine und Furanonaphthochinon I (identisch zu 3-6H)
3-6H	auf SuperCos1 basierendes Cosmid, enthält Teile des Biosynthesegenclusters für prenylierte Phenazine und Furanonaphthochinon I
ephzYM01	von 3-6H abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kasette aus pIJ787 ersetzt (<i>ori</i> T, <i>Tet</i> ^R , <i>att</i> P, <i>int</i> ΦC31, <i>Kan</i> ^R)
ephzYM02	von 9-9A abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kasette aus pIJ787 ersetzt (<i>ori</i> T, <i>Tet</i> ^R , <i>att</i> P, <i>int</i> ΦC31, <i>Kan</i> ^R)
ephzYM03	von 3-6H abgeleitet, Gen <i>fnq26</i> durch Kasette aus pIJ773 ersetzt (<i>aac</i> (3)IV (<i>Apra</i> ^R)+ <i>ori</i> T)
ephzYM04	von 3-6H abgeleitet, Gen <i>fnq28</i> durch Kasette aus pIJ773 ersetzt (<i>aac</i> (3)IV (<i>Apra</i> ^R)+ <i>ori</i> T)
ephzYM05	von ephzYM03 abgeleitet, Resistenzkasette durch <i>Spe</i> I-Restriktionsverdau und Religation entfernt (<i>Apra</i> ^S)

Plasmid	Beschreibung
ephzYM06	von ephzYM04 abgeleitet, ResistenzKassette durch <i>SpeI</i> -Restriktionsverdau und Religation entfernt (<i>Apra^S</i>)
ephzYM07	von ephzYM05 abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kassette aus pIJ784 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)
ephzYM08	von ephzYM06 abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kassette aus pIJ784 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)
ephzYM09	von ephzYM05 abgeleitet, Gen <i>fnq28</i> durch Kassette aus pIJ773 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)
ephzYM10	von 3-6H abgeleitet, Gene <i>fnq26-ephzA</i> durch Kassette aus pIJ773 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)
ephzYM11	von 3-6H abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kassette aus pIJ784 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)
ephzYM12	von 3-6H abgeleitet, <i>bla</i> Gen durch Kassette aus pIJ773 ersetzt (<i>aac(3)IV</i> (<i>Apra^R</i>)+ <i>oriT</i>)

3.2 Primer

Tabelle II.14 Oligonukleotide. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer für die Herstellung von Plasmiden oder DNA-Sonden oder zur Deletion von Genen sind im Folgenden aufgeführt. Unterstrichene Basen sind Restriktionsschnittstellen. Bei den Primern für Inaktivierungen sind die zur genomischen DNA homologen Enden fettgedruckt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/ Sonde
Primer zum Screening der Cosmidbank		
esmA_for	GTC TGA CGC CAA GCA GCA GG	phzB-Sonde
esmA_rev	TCA GGT GGG GAT TCC CTC CC	phzB-Sonde
esmC_for	CCC GCA GAA GAT CGT TCC GA	phzG-Sonde
esmC_rev	GAG TAG AGC AGC CGC TTG TG	phzG-Sonde
esmG_for	CTT TGT GCT CCC CGC CGA GA	phzF-Sonde
esmG_rev	GAC GCC CTG GAG GAT CTC GA	phzF-Sonde
Primer zur Deletion von <i>fnq26</i>		
fnq26del_for	GTG TCC TGC GCG CGC GAG AAG GTA TGG CCC ATC CTG GCC ATTCCG GGG ATC <u>ACT AGT</u> CC C	ephzYM03
fnq26del_rev	GGG GGC TGA CCG GGC GGG GCG CGG GGG CGT GCG GGT CAA CTA <u>GTC</u> TGG AGC TGC TTC	ephzYM03
Primer zur Deletion von <i>fnq28</i>		
fnq28del_for	GCC GCG CAC ACG CGC CGA GCG CAC ATG GAG GAG AGA TGA TTC CGG GGA TCA CTA <u>GTC</u> C	ephzYM04
fnq28del_rev	GGT CCG GGC TCA GG CAA TTC ACG AGC GGC GGG GCG TCA <u>ACT AGT</u> CTG GAG CTG CTT C	ephzYM04
Primer zur Deletion von <i>fnq26-ephzA</i>		
phzdel_for	TGT CCT GCG CGC GCG AGA AGG TAT GGC CCA TCC <u>TGG</u> CTA GCA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C	ephzYM10
phzdel_rev	CTT TTT TGC TTG TGT GCT GAG GGT GCC CCT GGG TGG ATA CTA <u>GTA</u> GGC TGG AGC TGC TTC	ephzYM10
Primer zur Expression von <i>fnq26</i>		
fnq26_for	TGG ATC <u>CAT</u> GAT GTC GGG AAC CGC CG	pLW35
fnq26_rev	<u>CCT</u> CGA GTC TAG AGG GTC AGG AAC GGC CGC CG	pLW35
Primer zur Expression von <i>fnq28</i>		

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid/ Sonde
fnq28_for	A <u>GGA TCC</u> ATG TCC CCA GTC ACT GGC AC	pLW34
fnq28_rev	T <u>TCT AGA AAG CTT</u> AGG CAA TTC ACG AGC GGC G	pLW34
Primer zur Expression von <i>esmG</i>		
esmGexpr_for	<u>GCG GAT CCA</u> GAA AAT AGC GAG GGA G	pYM02
esmGexpr_rev	<u>TCT AGA GCG</u> CGT CAT ATC CGC AG	pYM02
Primer zur Deletion der Amp^R (<i>bla</i>) und Tsr^R (<i>tsr</i>)		
bla_for	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC	ephzYM12
bla_rev	TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC ACC TAT CTC AGC GAT TGT AGG CTG GAG CTG CTT C	ephzYM12
tsr_for	GAG TTG GAC ACC ATC GCA AAT CCG TCC GAT CCC GGC TAG CAT TCC GGG GAT CCG TCG ACC	pYM06, pYM07, pYM08
tsr_rev	TCG TGC AGC GCG ATT CCG AGG GAA ACG GAA ACG TTG CTA GCT GTA GGC TGG AGC TGC TTC	pYM06, pYM07, pYM08

3.3 Bakterienstämme

Tabelle II.15 Bakterienstämme von *E. coli*, *Pseudomonas* und *Streptomyces*

<i>E. coli</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
XL1 Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ Δ(mcrA) 183 Δ(mcr CB-hsd SMR-mrr)173</i> [F' <i>proAB⁺ lacI^f lacZ ΔM15 Tn10 (tet^f)</i>]	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen
BW25113	K12 Derivat, <i>ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i>	(Datsenko and Wanner, 2000)
ET 12567(pUZ8002)	DNA-Methylase negativer Stamm Cml ^R , Tet ^R (<i>dam⁻, dcm⁻, nsdM⁻</i>), enthält pUZ8002 (Kan ^R , <i>oriT</i> RP4 Derivat)	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> (pFG152-1)	Kan ^R , produziert Flaviolin	(Gross <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. cinnamonensis</i> DSM 1042	Wildtypstamm, Endophenazin und Furanonaphthochinon I-Produzent	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>S. anulatus</i>	Wildtypstamm, Endophenazin-Produzent	(Gebhardt <i>et al.</i> , 2002)
<i>S. cinnamonensis</i> (ephzYM03)	Apra ^R	diese Arbeit
<i>S. cinnamonensis</i> (ephzYM04)	Apra ^R	diese Arbeit
<i>S. cinnamonensis</i> (ephzYM09)	Apra ^R	diese Arbeit

<i>E. coli</i>	Beschreibung/relevante Marker	Hersteller/Referenz
<i>S. cinnamonensis</i> (ephzYM10)	Apra ^R	diese Arbeit
<i>S. cinnamonensis</i> (ephzYM12)	Apra ^S (wiederhergestellter „Wildstamm“)	diese Arbeit

4. Kulturbedingungen

4.1 Kulturbedingungen für *E. coli*

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

Für die Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden 2 ml Bakteriensuspension abzentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4°C), die Zellen mit 800 µl frischem LB-Medium und 400 µl 30%iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und bei -70°C gelagert.

4.2 Kulturbedingungen von *Streptomyces*

4.2.1 Anzucht in Flüssig- und Festmedien

Zur Kultivierung von *Streptomyces* wurden verschiedene Fest- und Flüssigmedien verwendet (s. II 2.2). Als Standardmedium für die Stammhaltung und für DNA-Isolierungen dienten HA-Festmedium und YMG-Flüssigmedium. Entsprechende Selektionsantibiotika wurden den Medien zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 28°C oder 30°C in Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen und zusätzlich einer Metallspirale pro Kolben unter Schütteln mit 190 rpm kultiviert. Agarplatten wurden bei 28°C oder 30°C im Brutschrank inkubiert.

4.2.2 Herstellung von Glycerindauerkulturen und Sporensuspensionen

Für die Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden 1-3 Tage alte Flüssigkulturen verwendet. Nach Zentrifugation der Kultur (10 min, 3000 x g, 4°C) wurden die Zellen in Glycerin 15% (v/v) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Menge in 10-15 ml Glycerin 15% resuspendiert und die Dauerkulturen in Aliquoten von 0,5 bis 1 ml bei -70°C gelagert. Zur Inokulation von 50 ml Flüssigmedium wurden 250-500 µl Glycerindauerkultur eingesetzt, dabei konnte gegebenenfalls durch Verwendung von Insulinspritzen eine Homogenisierung des Mycels erreicht werden.

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurden Sporen einer einzelnen Kolonie oder einer Sporensuspension auf HA-Agarplatten (siehe s. II 2.2) ausgestrichen und anschließend 3-6 Tage bei 30°C bis zur ausreichenden Sporulation inkubiert. Dann wurden pro Platte 5-8 ml einer sterilen wässrigen 0,1%igen Tween 20-Lösung zugegeben und die Sporen mit einer Impföse abgekratzt. Die Suspension wurde

anschließend abgeschwemmt und 1 min stark gevortext. Nach Filtration über sterile Watte wurden die Sporen pelletiert (5 min, 3000 x g, 4°C) und in Glycerin 20% resuspendiert. Die Sporensuspension wurde in Aliquoten zu 200 µl bei -70°C gelagert.

4.2.3 Screening der *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042-Deletionsmutanten (Replica Plating)

Zur Feststellung der Antibiotikaresistenz und zum Screening von Double-Cross-Over-Mutanten wurden Sporen der Mutantenstämme von *S. cinnamonensis* auf HA-Platten mit Apramycin (50 µg/mL) gestrichen und nach 5 Tagen mittels eines sterilen Samtstempels zuerst auf Kanamycin-haltigen (50 µg/mL) Nutrient-Agar (s. II 2.2) und danach auf Apramycin-haltigen (50 µg/mL) Nutrient-Agar übertragen. Die Platten wurden bei 30°C mehrere Tage inkubiert und dann jeweils eine Kolonie, die auf Apramycin jedoch nicht auf Kanamycin gewachsen war, wieder auf eine HA-Platte mit Apramycin (50 µg/mL) gestrichen. Dieselbe Prozedur wurde noch einmal wiederholt, bis keine der Kolonien mehr auf Kanamycin wuchs.

5. Methoden der Molekularbiologie

5.1 Methoden zur Reinigung, Konzentrierung und Quantifizierung von DNA

5.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v; Rotiphenol[®], Roth) durchgeführt. Die zu extrahierende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform versetzt und 1 min kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (5-10 min, 17000 x g, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass nichts von der Interphase verschleppt wurde. Der Vorgang wurde gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurden verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt.

5.1.2 Alkoholfällung

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

Fällung mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,1fachen Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5-3fachen Volumen absoluten Ethanols

(Endkonzentration ca. 70%) gemischt und 20 min bei -70°C aufbewahrt. Die DNA wurde durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C) pelletiert, mit $600 \mu\text{l}$ Ethanol 70% gewaschen, erneut zentrifugiert und nach dem Trocknen des Pellets in TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst.

Fällung mit Isopropanol

Für größere Volumina wurde Isopropanol zur Fällung verwendet. Dazu wurde das 0,8-1fache Volumen reinen Isopropanols zur DNA-Lösung gegeben. Die DNA wurde durch Zentrifugation ($20000 \times g$, 30 min, 4°C) pelletiert, mit $600 \mu\text{l}$ Ethanol 70% gewaschen, erneut zentrifugiert und nach dem Trocknen des Pellets in TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst.

5.1.3 Konzentrationsbestimmung

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

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

mit F als Verdünnungsfaktor.

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

5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Alle für die Agarosegel-Elektrophorese verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle II.6 aufgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen in einer Standardkonzentration von 0,8% Agarose in 1xTAE-Puffer. Zur Analyse von genomischer DNA wurden Gele mit 0,4% Agarose eingesetzt, kleine DNA-Fragmente unter 500 bp wurden mit 2% NuSieve[®]GTG[®] Agarose getrennt. DNA-Präparationen wurden nach Mischen mit Ladepuffer im Verhältnis 3:1 auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese-Geschwindigkeit betrug in der Regel 3-5 V/cm. Zur Detektion wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 15-30 min in Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und mit UV-Durchlicht bei 312 nm analysiert. Zur Dokumentation wurde das Eagle-Eye-II-System (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt.

Geräte:

Gelkammern: Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100

Hoefler HE 99X

Spannungsgeber: Gene Power Supply GPS 200/400, Pharmacia

Detektion: Transilluminator IL-200 M, Bachofer

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

5.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

5.3 Enzymatische DNA-Manipulation

5.3.1 Restriktionsverdau

Analytische Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 10-30 µl mit verschiedenen Restriktionsenzymen in den mitgelieferten Reaktionspuffern unter den jeweils vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Präparative Restriktionsverdau zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in größeren Volumina bis zu 200 µl durchgeführt.

5.3.2 Ligation von DNA-Molekülen

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde in der Regel durch Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h durchgeführt. Wenn dies nicht zum Erfolg führte, wurde die Ligation bei 16°C über Nacht durchgeführt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden (blunt end) wurde eine Reaktionstemperatur von 4°C mit Inkubation über Nacht gewählt. Bei der Ligation von Inserts <1 kb mit einem Vektor wurden die beiden Komponenten in einem Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die Ligationsansätze enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1 U T4-DNA-Polymerase, 0,1 mM rATP und 1xLigationspuffer. Die Ligationsansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur CaCl₂-vermittelten Transformation von *E. coli* verwendet.

5.4 Transformation von DNA in *E. coli*

5.4.1 CaCl₂-vermittelte Transformation

Nach Sambrook und Russell (2001)

Herstellung kompetenter Zellen:

100 ml LB-Medium wurden nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 1-3 ml einer Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie inokuliert und bei 37°C und 170

rpm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,6 kultiviert. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4°C durchgeführt. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (2000 x g, 10 min) in 30 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 x g, 10 min). Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung mit 15% Glycerin (v/v) resuspendiert und in 200 µl-Aliquots bei -70°C gelagert.

Transformation:

Pro Transformationsansatz wurden 200 µl $CaCl_2$ -kompetente *E. coli*-Zellen mit 1-10 µl der einzubringenden DNA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer 2-minütigen Hitzeschockbehandlung bei 42°C unterworfen (Wasserbad) und unmittelbar darauf einige Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde 1 ml LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und die Zellen 60 min bei 37°C inkubiert. 200 µl des Ansatzes wurden auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach kurzer Zentrifugation des restlichen Ansatzes (1000 x g, 2 min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig im Rücklauf resuspendiert und auf eine weitere LB-Agarplatte ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion:

Bei Transformationen mit Klonierungsvektoren, welche das *lacZ'*-Gen enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Dazu wurden die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus X-Gal-Lösung, IPTG-Lösung und sterilem H_2O (s. Tabelle II.9) bestrichen und ca. 30 min offen unter der Sterilbank zum Verdampfen des toxischen Lösungsmittels DMF getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

5.4.2 Elektroporations-vermittelte Transformation

Plasmide mit einer Größe von mehr als 30 kb (vor allem Cosmide) und PCR-Fragmente wurden durch die effizientere Elektroporationsmethode (Transformationsrate: $10^9 - 10^{10}$ Transformanten/µg DNA) unter Verwendung der *E. coli* Pulser™-Transformations-Apparatur (BIO-RAD, Cell) in *E. coli* eingebracht.

Herstellung elektro-kompetenter Zellen:

Mit 1-3 ml einer Übernachtskultur wurden 50 ml LB (evt. mit Antibiotikumzusatz) angeimpft und die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C kultiviert. Die Kultur wurde erst 30 min auf Eis stehen gelassen und dann abzentrifugiert (2000 x g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und dann mit 50 ml eiskaltem 10%igem Glycerol gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und mit 25 ml 10%igem Glycerol gewaschen. Nach

erneuter Zentrifugation wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und je Elektroporation 50 µl dieser Zellen verwendet. Der Rest wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die Herstellung elektro-kompetenter Zellen von *E. coli* BW25113 (pIJ790n) (REDIRECT® technology kit for PCR targeting) für PCR-Targeting (Gust *et al.*, 2003) wurde SOB-Medium mit Chloramphenicol (50 µg/ml) verwendet und bei 30°C kultiviert, da das Plasmid pIJ790n einen temperatursensitiven Replikationsstartpunkt hat. Zur Induktion der Expression der λ-Red Proteine wurden der Kultur 500 µl 1 M L-Arabinose zugesetzt. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und die Zellen dann sofort abzentrifugiert (2000 x g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und mit 50 ml eiskaltem 10%igem Glycerol gewaschen. Es wurde wieder zentrifugiert, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und mit 25 ml 10%igem Glycerol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und je Elektroporation 50 µl dieser Zellen verwendet.

Elektroporation:

Zu 50 µl der kompetenten Zellen wurden 1 µl DNA (ca. 200 ng, in bidest. Wasser gelöst) pipettiert und die Mischung dann in die Elektroporationsküvette gefüllt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Konstanten durchgeführt: 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Dann wurde sofort 1 ml eiskaltes LB-Medium zupipettiert und die Zellen bei 30°C (wenn ein weiteres PCR Targeting geplant war) bzw. 37°C 1 h geschüttelt. Anschließend wurde auf mehrere LB-Platten (mit den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert und bei der entsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert.

5.5 Konjugation von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 mit *E. coli*

50 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1-2 ml einer Vorkultur von *E. coli* ET 12567 (pUZ8002) Zellen, die das zu konjugierende Konstrukt enthielten, inokuliert. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert, dann wurden die Zellen geerntet (2000 x g, 4°C, 5 min), zweimal mit sterilem 10%igem LB-Medium gewaschen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Währenddessen wurden 50 µl Sporen von *S. cinnamonensis* Wildtyp ($8 \cdot 10^8$ KBE/µl) zentrifugiert (3000 x g, 4°C, 10 min), um das Glycerol zu entfernen. Die Sporen wurden in 1 ml 2xYT-Medium (s. II 2.2) resuspendiert und 10 min bei 50°C pregerminiert (Kieser *et al.*, 2000). Je 500 µl wärmebehandelte Sporen wurden zu 500 µl *E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig gemischt, abzentrifugiert und sehr vorsichtig in 200 µl LB-Medium resuspendiert und danach auf MS-Platten ausplattiert. Diese wurden offen unter der Sterilbank getrocknet und anschließend im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Nach ca. 16 h wurde mit 0,5 mg Nalidixinsäure und 1,25 mg des entsprechenden Selektionsantibiotikum pro Platte überschichtet.

5.6 Isolierung von DNA aus Bakterien und Streptomyceten

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

E. coli-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C und 170 rpm in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Das Pellet aus 1,5 ml Bakterienkultur (Zentrifugation 1500 x *g*, 5 min, 4°C) wurde in 250 µl Lösung 1 (s. Tabelle II.5) durch vortexen resuspendiert, vorsichtig mit 250 µl Lösung 2 gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse der Bakterien war an der schleimigen Konsistenz der klaren Lösung erkennbar. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 250 µl Lösung 3 die Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages hauptsächlich aus genomischer DNA und Proteinen. Nach Zentrifugation (17000 x *g*, 10 min, 4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Fällung der DNA erfolgte unter Verwendung von Isopropanol. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst.

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

5.6.2 Isolation genomischer DNA aus *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042

50 ml einer 38 h alten Kultur in YMG-Medium wurden abzentrifugiert (2750 x *g*, 4°C, 10min), mit 25 ml TSE Puffer gewaschen und bei -20°C gelagert.

Die Zellen wurden in 4 ml TSE-Puffer (s. Tabelle II.5) mit 3,5 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase resuspendiert und 60 min im Wasserbad bei 37°C unter mehrmaligem Invertieren inkubiert. Dann wurden 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 1 ml SDS-Lösung 2% (m/v) pH 8,0 und 30 min Inkubation im Wasserbad bei 60°C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 10 ml TE-Puffer zugegeben und die klare Lösung mit 8 ml Phenol-Chloroform 30 min geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde die Mischung 20 min bei 3000 x *g* (4°C) zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und die Phenol-Chloroform-Extraktion mehrere Male wiederholt.

Schließlich wurde die wässrige Oberphase mit ca. demselben Volumen Isopropanol überschichtet und die genomische DNA mit einer angeschmolzenen Pasteurpipette gefischt. Die DNA wurde sofort mit 70%igem eiskaltem Ethanol abgespült und nach kurzem Trocknen in 2 ml TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Weiterstadt) durchgeführt. Die verwendeten

Oligonucleotid-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt. Je 5-10 µl des erhaltenen PCR-Produktes wurden mit Hilfe eines Agarose-Gels analysiert.

5.7.1 PCR zur Amplifikation der Apramycin-Kassette von pIJ773

Die Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette aus pIJ773 (REDIRECT® Technology kit for PCR Targeting (Gust *et al.*, 2003)) sind in Tabelle II.16 angegeben. Die Template-DNA wurde vorher mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten.

Tabelle II.16 PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Apramycin-Kassette von pIJ773

Substanz	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x)	1x
Primer	je 50 pmol
Template (Kassette)	ca. 100 ng
dNTPs	je 0,2 mM
DNA-Polymerase	2,5 U
DMSO	5% (v/v)
Endvolumen	50 µl

Zyklus	Temperatur	Zeit	Cyclen
Hotstart	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	10
Annealing	50°C	45 s	
Elongation	72°C	90 s	
Denaturierung	94°C	45 s	15
Annealing	55°C	45 s	
Elongation	72°C	90 s	
Endelongation	72°C	5 min	1
Ende	4°C	∞	1

Anschließend wurde eventuell noch vorhandene zirkuläre Template-DNA durch Restriktionsverdau mit *DpnI* geschnitten, die DNA gefällt, in TE-Puffer oder H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

5.7.2 PCR zur Klonierung von *fnq26* zur heterologen Expression in *E. coli*

Tabelle II.17 PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *fnq26*

Substanz	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x)	1x
Primer	je 50 pmol
Template (3-6H)	100 ng
DMSO	5% (v/v)
dNTPs	je 0,2 mM
DNA-Polymerase	2,5 U
Endvolumen	50 µl

Zyklus	Temperatur	Zeit	Cyclen
Hotstart	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	45 s	25
Annealing	64°C	45 s	
Elongation	72°C	90 s	
Endelongation	72°C	5 min	1
Ende	4°C	∞	1

Für die Amplifikation von *fnq26* zur heterologen Expression in *E. coli* wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt.

Zur Klonierung und Überexpression von *fnq26* wurde unter Verwendung der *fnq26_for* und *fnq26_rev* ein 926 bp großes DNA-Fragment mittels PCR aus dem Cosmid 3-6H amplifiziert. Durch den Primer *fnq26_for* wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle und durch den Primer *fnq26_rev* eine *Xho*I-Schnittstelle eingeführt. Die *Xho*I Schnittstelle lag hinter dem natürlichen Stopcodon von *fnq26*.

Anschließend wurde das PCR-Produkt gefällt, in TE-Puffer oder H₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

5.8 Southern Hybridisierung

5.8.1 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der Random-Prime-Methode

Das zu markierende DNA-Fragment wurde nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Trennung aus dem Agarosegel isoliert. Ganze Plasmide oder Cosmide als Sonde wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, so dass Fragmente zwischen 500 bp und 3 kb entstanden. Ca. 1 µg isolierte DNA wurde zur Markierung mit dem DIG-High Prime DNA-Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) nach der Vorschrift des Herstellers bearbeitet. Nach beendeter Reaktion wurde zur Abtrennung von überschüssigen Nucleotiden eine Ethanol-fällung mit 4 M LiCl als Salzkomponente durchgeführt. Die fertige Sonde wurde in TE-Puffer gelöst und eine Quantifizierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.8.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden nach der PCR-Labeling-Methode

Die Herstellung der DIG-markierten Sonden erfolgte durch PCR. Statt der unmarkierten dNTPs wurde der DIG Labeling Mix (Roche) verwendet, nach der PCR wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt, in TE-Puffer aufgenommen und die Sonde nach Vorschrift des Herstellers quantifiziert.

5.8.3 Southern Blot

Genomische DNA wurde mit ausgewählten Enzymen geschnitten und auf dem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde der DIG-Marker Nr. VII (Roche) eingesetzt. Das Agarosegel wurde nach erfolgter Elektrophorese und Kontrolle durch

Ethidiumbromid-Färbung bei RT 5 min in Depurinierungslösung und anschließend zweimal 15 min in Denaturierungslösung unter Schütteln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten von je 15 min in Neutralisierungslösung wurde der DNA-Transfer durchgeführt. Unter Ausnutzung von Kapillarkräften fand der DNA-Transfer auf eine HybondTM-N Nylonmembran (Amersham Pharmacia biotech) über einen Zeitraum von ca. 16 h mit 20 x SSC-Puffer (s. Tabelle II.8) statt. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese anschließend auf der Vorderseite 1 min und auf der Rückseite 30 s mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt.

5.8.4 Hybridisierung und Detektion

Die zur Hybridisierung und Detektion verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle II.8 beschrieben. Die Membran wurde zunächst mit Prähybridisierungslösung 4 h bei 68°C prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde mit 10 ml Hybridisierungslösung (ca. 25 ng Sonde/ml) gemischt und vor Benutzung durch Erhitzen auf 100°C für 10 min denaturiert, anschließend schnell in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Membran anschließend zweimal 10 min mit 10 ml 2 x Waschpuffer bei RT und zweimal 20 min mit 10 ml 0,5 x Waschpuffer bei 68°C behandelt. Die Membran wurde danach 10 min in Tween-Waschpuffer gewaschen und 30 min in Blocking-Solution inkubiert. Nach Zugabe von Antikörperlösung (10 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) auf 100 ml Blocking Solution) wurde für weitere 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran in Tween-Waschpuffer (je 20 min) und 5 min Äquilibrierung in Detektionspuffer wurde detektiert. Dazu wurde die Membran mit 800 µl CSPD-Lösung (8 µl CSPD Reagenz (Roche) auf 800 µl Detektionspuffer) benetzt, 5 min bedeckt bei Raumtemperatur inkubiert, in eine Fotokassette eingelegt und 30-120 min bei 37°C mit einem Hyperfilm ECL-Röntgenfilm (Amersham Biosciences) inkubiert.

Zur Entfernung der Sonden für eine weitere Detektion wurde die Membran mit Wasser gewaschen und zweimal 15 min bei 37°C unter Schütteln mit Stripping-Lösung (0,2 N NaOH, 0,1% SDS) behandelt. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC-Puffer gewaschen und bei 4°C gelagert.

5.9 Herstellung einer Cosmidbank

Die chromosomale DNA von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 wurde mit *Sau3AI* partiell verdaut, dephosphoryliert und in den mit *BamHI/XbaI* verdauten Cosmidvektor SuperCos1 ligiert. Der Ligationsansatz wurde mit Hilfe des Gigapack[®] III XL Packaging Extraktes (Stratagene, Heidelberg, Germany) in Phagen verpackt und in *E. coli* XL1 Blue MRF' transduziert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Einzelkolonien wurden mit sterilen Zahnstochern in sterile Mikrotiterplatten mit LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) überführt und 16-24 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die so erstellte Cosmidbank mittels eines Stempels erneut auf Carbenicillin-haltige LB-Agarplatten übertragen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Mikrotiterplatten wurden durch Zusatz von 20% Glycerin konserviert und die Cosmidbank bei -70°C gelagert.

Für die erste Screening-Runde wurden die Klone in Pools zu 48 Klonen unterteilt. Die Pools, die im ersten Screening positiv waren, wurden dann in einer zweiten Screening-Runde zu 8er-Pools untersucht. In einer dritten Runde wurden dann die positiven 8er-Pools als Einzelklone untersucht. Positive Klone wurden anschließend mittels Restriktionskartierung und Sequenzierung näher untersucht.

5.10 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Doppelstrangsequenzierung des Cosmids 3-6H (Insertgröße: 42187 bp) wurde von der Firma Genotec (Daejeon, Korea) ausgeführt. Sonstige Sequenzierarbeiten wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) mit Hilfe der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer durchgeführt.

Die Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes DNASIS Version 2.1 (Hitachi Software Engineering, San Bruno, USA). Homologievergleiche auf DNA- und Aminosäureebene wurden in GeneBank mit dem BLAST-Programm (Version 2.0) durchgeführt.

6. Methoden der Biochemie

6.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Berechnung des Proteingehaltes von Lösungen wurde eine Kalibriergerade mit BSA erstellt. Hierfür wurden 3 bis 4 Messpunkte zwischen 1 und 10 µg BSA (durch Verdünnen einer Stammlösung mit 100 µg BSA/ml) ermittelt. Je 100 µl Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (s. II 2.5.7) gemischt und nach 5 min (bei Raumtemperatur) wurde die Absorption bei 595 nm vermessen. Als Referenz (Nullabgleich) diente eine Probe mit 100 µl Wasser mit Bradford-Reagenz. Die Kalibriergerade wurde für jede Versuchsreihe neu erstellt. Die zu bestimmende Probe wurde so verdünnt, dass die Absorption im Bereich von 0,3-0,7 lag.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration gereinigter Proteine wurde alternativ auch über die Absorption bei 280 nm quantifiziert. Eine Absorption von 1 entspricht dabei ca. 1 mg/ml. Die Bestimmung des genauen Extinktionskoeffizienten erfolgte über die Aminosäuren-Sequenz mit Hilfe des „ExpASy World Wide Web molecular biology server of the Swiss Institute of Bioinformatics“.

6.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen für die Elektrophorese wurden genau nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Mini-PROTEAN[®] 3 Elektrophorese-Zelle der Firma Bio-Rad hergestellt (s. Tabelle II.7). Als Sammelgel wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet, als Trenngel diente ein 12%iges Gel (s. Tabelle II.7). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 200 V über 45 min durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden unmittelbar vor der Elektrophorese im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und 1 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. 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 90 min entfärbt, anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen.

6.3 Säulenchromatographie von Proteinen (FPLC[™])

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

Pumpen:

externe Pumpe für Probenauftrag: Pump P-1

Fließmittelpumpen: High Precision Pump P-500

Detektoren:

UV-Detektor: Monitor UV-M II

Leitfähigkeitsdetektor: Conductivity Monitor

Fraktionssammler: FRAC 200

Steuerung: Controller LCC-501 Plus

Aufzeichnung: Recorder REC 102

Es wurden wässrige Fließmittelsysteme mit einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 µm).

6.4 Heterologe Expression von *fnq26* in *E. coli*

6 x 1 l TB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) wurden mit je 35 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium mit Kanamycin 50 µg/ml und Chloramphenicol 35 µg/ml) von *E. coli*

BL21(DE3)pLysS, transformiert mit pLW37, inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Die Induktion der Protein-Expression erfolgte nach Abkühlung auf 20°C mit 0,5 mM IPTG. 6 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (2700 x g, 10 min, 4°C) und bei -20°C eingefroren.

6.5 Reinigung von Fnq26 als Histidin-Fusionsprotein mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Die Zellen (Zellpellet von 6 l nach Proteinexpression) wurden mit 200 ml Lysepuffer (s. Tabelle II.10) versetzt und bei 4°C unter Rühren aufgetaut (20-30 min). Generell wurde Schaumbildung soweit möglich vermieden. Die Mischung wurde anschließend so lange mit Ultraschall (Branson Sonifier 250) behandelt, bis eine niedrig viskose Mischung entstand und die DNA zerstört war (etwa 30 min). Eine Erwärmung auf über 12°C wurde soweit möglich vermieden. Das Homogenisat wurde 45 min bei 55000 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert. Zwei PD-10 Säulen (d= 1,6 cm) wurden mit je 4 ml 50%iger Ni-NTA-Suspension (Qiagen, Hilden, Deutschland) befüllt. Nachdem sich das Gel abgesetzt hatte, wurde das Wasser aus der Säule gelassen und eine zweite Fritte knapp über der Ni-Agarose eingebracht. Die Säulen wurden mit 20 ml Lysepuffer äquilibriert, anschließend wurde die lösliche Proteinfraction über die Säulen gegeben. Die Säulen wurden dann mit je 50 ml Waschpuffer gewaschen und jede Säule wurde zweimal mit 6 ml Elutionspuffer eluiert. Die Säulen wurden mit weiteren 10 ml Elutionspuffer gespült, um anschließend für einen weiteren Durchgang mit je 20 ml Lysepuffer äquilibriert zu werden. Die Eluate, die viel Protein enthielten wurden vereinigt, über Sephadex G25 PD-10-Säulen in Aufbewahrungspuffer (s. Tabelle II.10) umgepuffert, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts und zur Überprüfung, ob der His₈-Tag einen Einfluß auf die Enzymeigenschaften hat, wurde der His₈-Tag mit Thrombin abgespalten. Die Proteinlösung wurde mit 2 U Thrombin (für 35 mg Protein) 16 Stunden gegen Dialysepuffer (s. Tabelle II.10) bei 4°C dialysiert.

Danach wurden je eine kleinere Säule mit 1 ml 50%iger Benzamidin-Sepharose-Suspension bzw. 50%iger Ni-Agarose-Suspension befüllt, mit Wasser aufgefüllt, eine zweite Fritte eingesetzt und nachdem das Wasser abgelassen worden war, wurde mit je 10 ml Dialyse-Puffer äquilibriert, wobei für die Ni-NTA-Säule Imidazol (C_{end} = 20 mM) zugesetzt wurde, um zu verhindern, dass geschnittenes Protein unspezifisch bindet. Das Dialysat wurde zur Entfernung des Thrombins zuerst über die Benzamidin-Sepharose-Säule und zur Entfernung des His-Tags anschließend über die Ni-NTA-Säule gegeben. Jede Säule wurde mit 2 x 0,5 ml Dialysepuffer nachgespült.

Die Proteinlösung wurde im Amicon Centriprep YM-10 bei 3000 x g auf maximal 13 ml aber maximal 20 mg/ml aufkonzentriert, um dann auf die Superdex-200-Säule (Pharmacia XR26K 26/60) aufgetragen zu werden. Als Fließmittel diente Tris-Puffer (s. Tabelle II.10) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die entsprechenden

Fraktionen des Hauptpeaks wurden vereinigt, nochmals mit Amicon Centriprep YM-10 konzentriert, mit einem Volumenteil Tris-Puffer (25 mM TrisHCl, pH 8, 2 mM DTT) verdünnt und aliquotiert bei -70°C gelagert.

6.6 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von Fnq26 wurde von I. Unsöld durchgeführt. Dazu wurde von ihr eine HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule, die zuvor mit Puffer C (s. Tabelle II.10) äquilibriert worden war, mit Dextranblau 2000 (2000 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa) kalibriert. Das Bettvolumen (V_t) wurde mit Aceton bestimmt, das Ausschlussvolumen (V_0) mit Dextranblau 2000. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Anschließend wurde das Enzym über die Säule laufen gelassen und durch Aktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen das Elutionsvolumen (V_e) bestimmt.

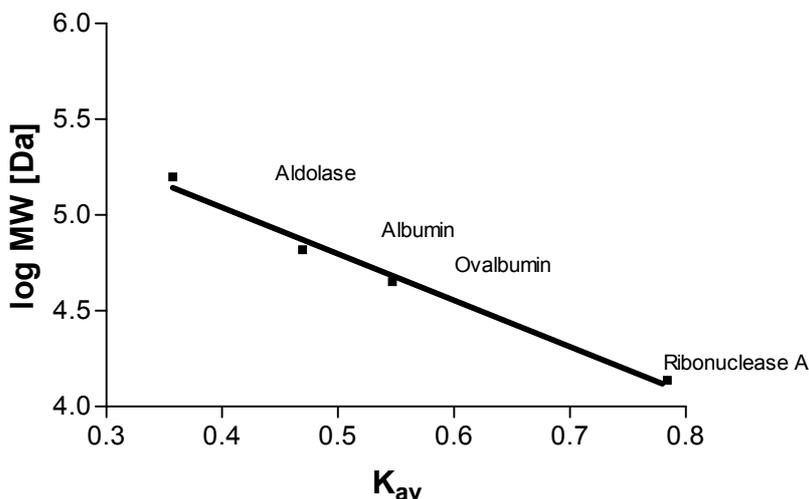


Abb. II.1 Kalibriergerade für die Superdex 200- Gelfiltrationssäule: zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde der Koeffizient K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. K_{av} berechnet sich als: $K_{av}=(V_e-V_0)/(V_t-V_0)$ (Daten von I. Unsöld).

6.7 Bestimmung der Enzymaktivität von Fnq26

Der Standardreaktionsansatz (50 μL) enthielt 100 mM Na-TAPS (pH 8,5), 0,5 mM Flaviolin (bzw. 4 mM 1,3-DHN oder 2 mM 4-HBA), 2 mM GPP, 10 mM Ascorbinsäure und 10-50 μg gereinigtes Fnq26. MgCl_2 oder andere Metallionen wurden mit 10 mM eingesetzt. Nach Inkubation für 10 min bei 30°C wurde die Reaktion mit 100 μl Ethylacetat/Ameisensäure (975:25) abgestoppt. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurde die organische Phase zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand in Methanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Es wurde eine Eclipse XDB-C18 Säule (150 x 4,6 mm, 5 μm , Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem linearen Gradient von 20 bis 100% Acetonitril über 30 min in

1%iger Ameisensäure verwendet. Detektiert wurde bei 288 nm (für Flaviolin und 1,3-DHN) oder bei 260 nm (für 4-HBA).

Für quantitative Bestimmungen wurden routinemäßig Doppelbestimmungen durchgeführt.

7. Konstruktion der Deletionsmutanten und Komplementierung

Für die Inaktivierung der Gene *fnq26*, *fnq28* sowie des 9 kb-Fragments im Bereich von *fnq26* bis einschließlich *ephzA* wurde das Protokoll REDIRECT[®] Technology Kit für PCR-Targeting verwendet.

Die *oriT*/Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3)IV/oriT*) wurde mittels Restriktionsverdau mit *Hind*III, *Eco*RI und *Dra*I aus dem Plasmid pIJ773 geschnitten. Die Amplifizierung der Kassette erfolgte wie unter II 5.7.1 beschrieben unter Verwendung der Primer P-forward 5'-(N₃₉) ATT CCG GGG ATC ACT AGT CC C-3' und P-reverse 5'-(N₃₉) A CTA GTC TGG AGC TGC TTC-3'. Die 39 nt sind homolog zu der Region vor und nach dem DNA-Fragment, das deletiert werden soll und repräsentieren den Bereich für die λ -Red vermittelte Rekombination. Die unterstrichenen Buchstaben zeigen die Schnittstelle für *Spe*I. Eventuell noch anwesende Template-DNA wurde nach der PCR durch Restriktionsverdau mit *Dpn*I geschnitten. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für die Deletion der genannten Gene bzw. des Genbereiches im Cosmid 3-6H durch λ -Red vermittelte Rekombination nach Angaben des Herstellers REDIRECT[®] Technology Kit (Gust *et al.*, 2003) verwendet (s. II 5.4.2). Cosmide, welche die Resistenzkassette integriert hatten, wurden isoliert und durch Restriktionsverdau analysiert.

Die Cosmide wurden danach in *E. coli* ET12567 (pUZ8002) transformiert (s. II 5.4.2) und mittels Konjugation (s. II 5.5) in den Wildtyp von *S. cinnamonensis* DSM 1042 eingebracht. Die Apramycin-resistenten, aber Kanamycin-sensitiven Klone wurden durch Southern Blot Analyse (s. II 5.8) überprüft.

Für die Entfernung der Resistenzkassette wurde die Cosmid-DNA mit *Spe*I geschnitten und über Nacht bei 16°C religiert.

7.1 Inaktivierung des Gens *fnq26*

Die Resistenzkassette zur Deletion von *fnq26* wurde mit den Primern *fnq26del_for* 5'-**GTG TCC TGC GCG CGC GAG AAG GTA TGG CCC ATC CTG GCC** ATT CCG GGG ATC ACT AGT CC C-3' und *fnq26del_rev* 5'-**GGG GGC TGA CCG GGC GGG GCG CGG GGG CGT GCG GGT CAA** CTA GTC TGG AGC TGC TTC-3' amplifiziert (s. Tabelle II.16). Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region am Anfang und unmittelbar nach dem Stopcodon von *fnq26*. Die *Spe*I-Schnittstelle ist unterstrichen. Durch λ -Red vermittelte Rekombination entstand das Cosmid *ephzYM03*.

7.2 Inaktivierung des Gens *fnq28*

Die Resistenzkassette zur Deletion von *fnq28* wurde mit den Primern *fnq28del_for* 5'-**GCC GCG CAC ACG CGC CGA GCG CAC ATG GAG GAG AGA TGA TTC CGG GGA TCA CTA GTC** C-3' und *fnq28del_rev* 5'-**GGT CCG GGC TCA GG CAA TTC ACG AGC GGC GGG GCG TCA ACT AGT** CTG GAG CTG CTT C-3' amplifiziert (s. Tabelle II.16). Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *fnq28*. Die *SpeI*-Schnittstelle ist unterstrichen. Durch λ -Red vermittelte Rekombination entstand das Cosmid *ephzYM04*.

7.3 Herstellung einer Doppelmutante (Δ *fnq26fnq28*)

Um eine Doppelmutante herzustellen, in der beide putativen Prenyltransferasegene deletiert sind, wurde die *aac(3)/V/oriT* -Kassette aus Cosmid *ephzYM03* durch Restriktionsverdau mit *SpeI* und Religation entfernt, wodurch Cosmid *ephzYM05* entstand. In diesem Cosmid wurde dann *fnq28* durch die amplifizierte Apramycin-Kassette (s. Tabelle II.16 und II 7.2) mittels λ -Red vermittelte Rekombination ersetzt und es entstand Cosmid *ephzYM09*

7.4 Inaktivierung der Gene *fnq26-28ephzBCDEGA*

Die Resistenzkassette zur Deletion des 9 kb großen Fragments von *fnq26* bis *ephzA* wurde mit den Primern *phzdel_for* 5'-**TGT CCT GCG CGC GCG AGA AGG TAT GGC CCA TCC TGG CTA GCA** TTC CGG GGA TCC GTC GAC C-3' und *phzdel_rev* 5'-**CTT TTT TGC TTG TGT GCT GAG GGT GCC CCT GGG TGG ATA CTA GTA** GGC TGG AGC TGC TTC-3' amplifiziert (s. Tabelle II.16). Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region am Anfang von *fnq26* und unmittelbar nach dem Stopcodon von *ephzA*. Die *NheI* und *SpeI*-Schnittstellen sind unterstrichen. Durch λ -Red vermittelte Rekombination entstand das Cosmid *ephzYM10*.

7.5 Komplementierung der Δ *fnq26-28ephzBCDEGA* Mutante

Zur Herstellung eines konjugierbaren Komplementierungskonstruktes wurde in die Ampicillinresistenz *bla* auf dem Backbone von SuperCos1 von Cosmid 3-6H die *aac(3)/V/oriT*-Kassette aus *pIJ773* eingebracht. Die Kassette wurde mit den Primern *bladel_for* 5'-**ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC**-3' und *bladel_rev* 5'-**TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC ACC TAT CTC AGC GAT TGT** AGG CTG GAG CTG CTT C-3' amplifiziert. Die fettgedruckten Buchstaben repräsentieren den 39 nt Homologiebereich zu der DNA-Region unmittelbar vor und nach *bla*. Durch λ -Red vermittelte Rekombination entstand das Cosmid *ephzYM12*.

ephzYM12 wurde mittels Konjugation in *S. cinnamonensis* ($\Delta fnq26-28ephzBCDEGA$) eingebracht. Die erhaltenen Klone wurden auf Apramycin- und Kanamycinresistenz gescreent (Single-Cross-Over-Mutanten). Anschließend wurde auf Double-Cross-Over-Mutanten selektiert, die sensitiv gegen beide Antibiotika waren. Die gefundenen Double-Cross-Over-Mutanten wurden ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert und extrahiert wie unter II 8.1 beschrieben.

8. Isolierung von Sekundärstoffen aus Streptomyceten und Pseudomonaden

8.1 Extraktion von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042

Der Wildtyp sowie sämtliche Defektmutanten wurden für 48 h in 50 ml YMG-Flüssigmedium kultiviert. 50 ml Produktionsmedium (Sedmera *et al.*, 1991) wurden dann mit 2,5 ml dieser Vorkultur inokuliert und danach für 120 h bei 30°C mit 190 rpm geschüttelt. Zur Kultivierung aller Defektmutanten wurden den Medien Apramycin (30 µg/ml) und Nalidixinsäure (15 µg/ml) zugesetzt.

Zur Isolierung von Endophenazin A und Furanonaphthochinon I (FNQ I) wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3500 x g, 4°C) und mit 10 ml Methanol 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Extrakte wurden mit 10 ml 1 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 gemischt und danach mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde entnommen, das Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand in 1,5 ml Methanol aufgenommen. Die Extrakte wurden dann mit Hilfe der HPLC analysiert.

Die Extraktion des Mediums erfolgte wie bei Gebhardt *et al.* (2002) für *S. anulatus* beschrieben (s. II 8.2).

8.2 Extraktion von *Streptomyces anulatus* nach Gebhardt *et al.* (2002)

50 ml des Produktionsmediums wurden mit Sporen von *S. anulatus* beimpft und 48 h bei 30°C und 210 rpm kultiviert. 2,6 ml dieser Kultur wurden verwendet, um 50 ml frisches Produktionsmedium zu inokulieren. Unter denselben Bedingungen wurde nochmals für 96 h kultiviert.

Die Kulturbrühe wurde mit Salzsäure auf pH 4 gebracht und mit demselben Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt. Das organische Lösungsmittel wurde abrotiert und der Rückstand in Methanol aufgenommen.

8.3 Isolierung von Flaviolin aus *Pseudomonas putida* (pFG154-1) nach Gross *et al.* (2006)

Zur Isolierung von Flaviolin wurden 2 l LB Medium (50 µg Kan/mL) mit je 10 ml Übernachtskultur von *Pseudomonas putida* (pFG154-1) beimpft und 72 h bei 30°C und 190 rpm kultiviert.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 2700 x *g*, 4°C), der Überstand (2 l) mit 400 ml 6 M HCl versetzt und danach zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und zur Trockenheit eingengt. Der ölige Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und der Rohextrakt durch Säulenchromatographie über eine Sephadex LH20-Säule aufgetrennt. Es wurde Methanol als Elutionsmittel verwendet und die Flussrate wurde auf 2 ml/min eingestellt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 12 ml aufgefangen und mit Hilfe der HPLC (s. II 10.1) überprüft. Die Fraktionen wurden entsprechend den HPLC-Ergebnissen vereinigt und das Fließmittel abrotiert.

Die NMR- und MS-Spektren sind im Anhang, S. 107 abgebildet.

9. Fütterungsexperimente von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 mit [¹³C₂] Natriumacetat und [2-¹³C] Glycerol

S. cinnamonensis DSM 1042 wurde für 48 h in 50 ml YMG-Flüssigmedium kultiviert. 50 ml des modifizierten Produktionsmediums (s. II 2.2) wurden dann mit 2,5 ml dieser Vorkultur inokuliert und mit je 50 mg sterilem [¹³C₂]Natriumacetat (in H₂O_{dest.} gelöst und auf pH 7,0 eingestellt) bzw. 50 mg sterilem [2-¹³C]Glycerol (mit H₂O_{dest.} verdünnt) versetzt. Insgesamt 40 Kolben je Fütterung (entspricht 2 l Gesamtvolumen) wurden dann für 120 h bei 30°C mit 190 rpm geschüttelt.

Zur Isolierung von Endophenazin A und Furanonaphthochinon I (FNQ I) wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 3500 x *g*, 4°C) und mit 400 ml Methanol 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Extrakte wurden in einem Scheidetrichter mit 400 ml 1 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 gemischt und danach zweimal mit 250 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde eingengt (50 ml) und dann zweimal mit 0,1%iger Essigsäure gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde vollständig abgezogen und der ölige Extrakt auf Trockeneis nach Würzburg in den Arbeitskreis von Prof. G. Bringmann geschickt.

10. Analytik niedermolekularer Substanzen

10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

10.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analytik und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienen „Agilent 1100 series“ HPLC-Anlagen der Firma Agilent (Waldbronn). Zur Detektion wurde ein UV-Durchflußdetektor eingesetzt. Die Steuerung der Geräte und die Auswertung der Ergebnisse erfolgten über Chemstation-Software. Die Anlagen setzten sich zusammen aus einer binären Pumpe (G1312A Bin Pump), einem Degasser (G1379A Degasser), einem Autosampler (G1329A ALS), einem Thermostat (G1320B ALS Therm) sowie einem UV-Detektor (G1314A VWD). Zu analytischen Zwecken erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 1 ml/min über eine RP-18-Säule (Eclipse XDB-

C18, 150 x 4.6 mm, 5 µm; Agilent, Waldbronn), der eine Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm, 40 µm; C+S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war. Für die präparative Isolierung erfolgte die Trennung bei einer Flussrate von 2,5 ml/min über eine Multospher RP-18-Säule (250 x 8 mm, 5 µm; C+S Chromatographie Service, Düren), der eine Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (50 mm x 10 mm, 40 µm; C+S Chromatographie Service, Düren) vorgeschaltet war. Als Fließmittelkomponenten wurden Acetonitril (HPLC-grade), Ameisensäure (p. a.) bzw. Phosphorsäure und H₂O_{bidest} verwendet. Die Fließmittel wurden vor Gebrauch durch Filtration über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) von Partikeln befreit und unter Vakuum entgast.

10.1.2 Analytik der Sekundärstoffe aus *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042

Sämtliche Extrakte von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 sowie alle Defektmutanten wurden mit Hilfe der HPLC (Agilent 1100 series, Waldbronn) analysiert. Dazu wurde eine RP-18-Säule (Eclipse XDB-C18; 150 x 4.6 mm; 5 µm; Agilent, Waldbronn) bei einer Flußrate von 1 ml/min und ein linearer Gradient von Acetonitril in 0,1% wässriger Phosphorsäure benutzt (10-100% über 20 min). Detektiert wurde bei 260 und 365 nm. Zusätzlich wurde ein UV-Spektrum von 200 bis 400 nm mit Hilfe eines Photodioden-Array-Detectors aufgezeichnet. Außerdem wurden Massenspektren (ESI) aufgenommen (Spektren und Tabelle s. Anhang S. 103/104, Tabelle VII.1).

10.1.3 Präparativer Assay und Analytik der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen

Zur Identifizierung der enzymatischen Produkte der Fng26-Reaktion wurden 100 mM Na-TAPS (pH 8,5), 2 mM Flaviolin (bzw. 2 mM 1,3-DHN oder 2 mM 4-HBA), 2 mM GPP, 10 mM MgCl₂ und 10 mM Ascorbinsäure in 50 ml-Reaktionsansätzen bei 30°C 3 h inkubiert. Die Ansätze wurden mit jeweils 200 µl Ethylacetat/Ameisensäure (975:25) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und die enzymatischen Produkte über präparative HPLC aufgereinigt. Es wurde eine Multospher 120 RP 18 Säule (250 x 8 mm, 5 µm, CS Chromatographie Service, Düren) bei einer Flussrate von 2,5 ml/min verwendet. Es wurde ein linearer Gradient von Acetonitril in 0,1% wässriger Ameisensäure benutzt (70-100% über 30 min). Detektiert wurde bei 288 nm für Flaviolin und 1,3-DHN bzw. 260 nm für 4-HBA.

Die Produkte wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (s. II 10.2) und der Massenspektrometrie (s. II 10.3) analysiert.

10.1.4 Quantifizierung der enzymatischen Produkte der Prenyltransferase-Reaktionen

Die Quantifizierung der entstandenen enzymatischen Produkte aus der Fnq26-Reaktion erfolgte durch Vergleich mit den jeweils eingesetzten Substraten.

10.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-spektroskopischer Analysen wurden die Proben über Nacht gut im Exsikkator getrocknet und in deuteriertem Lösungsmittel (Merck) aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden mit Hilfe eines Avance 400 Spektrometers (Bruker, Karlsruhe, Germany) aufgenommen.

10.3 LC-MS

Zur LC-MS-Analyse wurde ein Flüssigchromatograph mit einer GromSil 120 Säule (150 x 2 mm, 3 μm) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min verwendet, der an ein Elektronspray Ionisation (ESI) Massenspektrometer Finnigan LCQ Duo (Thermo-Finnigan, San Jose, CA) gekoppelt war, verwendet. Die Elektronspray-Spannung betrug 4,5 kV, die Kapillarspannung betrug 38 V und die Kapillartemperatur betrug 250°C. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet.

III Ergebnisse

1. Identifizierung eines Biosynthesegenclusters für Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042

Das erste Ziel dieser Arbeit war, das Biosynthesegencluster für Endophenazin A aus *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042 zu identifizieren. Der Vergleich mit bekannten Phenazin-Biosynthesegenclustern aus anderen Organismen sollte die Identifizierung der Phenazin-Biosynthesegene und möglicherweise auch eines putativen Prenyltransferasegens erlauben.

Vor einer Klonierung des Phenazin-Biosynthesegenclusters sollte jedoch sichergestellt werden, dass der Stamm *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042 Endophenazin A und Furanonaphthochinon I (FNQ I) produziert.

1.1 Identifizierung von Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042

S. cinnamomensis DSM 1042 wurde 120 h bei 30°C und mit 190 rpm in dem von Sedmera *et al.* (Sedmera *et al.*, 1991) beschriebenen Medium kultiviert. Danach wurden die Zellen sowie das Medium extrahiert (s. II 8.1 und II 8.2). Von H.-P. Fiedler (Tübingen) wurden freundlicherweise Endophenazin A-D Referenzsubstanzen und von J. Spizek (Prag) eine Probe von Furanonaphthochinon I (FNQ I) zur Verfügung gestellt. Kommerziell erhältliche Phenazin-1-carbonsäure stand ebenfalls zur Verfügung.

Durch Vergleich von Retentionszeit, UV-Absorptionsspektren und massenspektrometrischen Fragmentierungsmustern gelang es, die Produktion von Phenazin-1-carbonsäure (1,2 mg/l), Endophenazin A (4 mg/l) und FNQ I (8 mg/l) nachzuweisen. Endophenazin B konnte ebenfalls in Spuren nachgewiesen werden. Nach Zentrifugation der Kultur waren 95% dieser Substanzen im Zellpellet zu finden, nur ca. 5% im überstehenden Medium.

1.2 Klonierung und Sequenzierung des Biosynthesegenclusters

Um das gesuchte Phenazin-Biosynthesegencluster zu finden, wurde eine Cosmidbank von *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042 im Vektor SuperCos1 angelegt.

Die Gene *phzA* und *phzB* aus dem Phenazin-Biosynthesegencluster aus *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Mavrodi *et al.*, 1998) sind zueinander sowie zu den orthologen Genen aus anderen Phenazin-Biosynthesegenclustern hochkonserviert, zeigen aber nur geringe Ähnlichkeit mit anderen Genen in den Datenbanken. *esmA*, ein orthologes Gen zu *phzB* aus einem putativen Esmeraldin-Biosynthesegencluster (Struktur s. Abb. I.4) aus *Streptomyces antibioticus* Tü2706 wurde freundlicherweise

von H. G. Floss und T.-W. Yu zur Verfügung gestellt (H. G. Floss und T.-W. Yu, University of Washington, Seattle, USA; unveröffentlichte Ergebnisse).

Southern-Hybridisierung der genomischen DNA von *S. cinnamomensis* mit *esmA* als Sonde ergab ein deutliches einzelnes Signal. Daher wurde diese Sonde für das Screening der Cosmidbank mittels Southern-Hybridisierung verwendet. Aus 960 Cosmiden wurden zwei positive Cosmide erhalten. Die beiden Cosmide 3-6H und 9-9A wurden mittels Restriktionsanalyse und Ansequenzierung des Inserts von beiden Seiten miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass es sich um zwei identische Cosmide handelte. Schließlich wurde das Insert von Cosmid 3-6H vollständig sequenziert.

1.3 Sequenzanalyse des Inserts von Cosmid 3-6H

Eine computergestützte Sequenzanalyse des Inserts (42187 bp) von Cosmid 3-6H ergab insgesamt 31 offene Leserahmen (Orfs) (s. Abb. III.1).

Im Rahmen der Diplomarbeit von K. Fay wurde das Insert eines weiteren mit 3-6H überlappenden Cosmids 6-1D (41930 bp) komplett sequenziert und die erhaltene Sequenz analysiert (Fay, 2005). Die Inserts überlappten im Bereich von *fnq14/fnq15*. Insgesamt ist somit ein 81 kb großer Bereich des Genoms von *S. cinnamomensis* sequenziert und analysiert worden. Die gefundenen Orfs des 73 kb großen Bereiches von Orf1 bis einschließlich Orf14 sind in der EMBL-Nucleotide Sequence Database unter der Accession-Nummer AM384985 hinterlegt.

In Tabelle III.1 sind alle identifizierten Orfs im Insert von Cosmid 3-6H (*fnq14* bis *Orf23*) aufgelistet. Einige Orfs hatten große Ähnlichkeit zu Genen aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster aus *Streptomyces* sp. strain KO-3988 (Kawasaki *et al.*, 2006). Furaquinocin A (s. Abb. I.7) ist strukturell sehr ähnlich zu FNQ I. Einige Orfs hatten Sequenzähnlichkeit mit Phenazin-Biosynthesegenen aus *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Mavrodi *et al.*, 1998). Aus diesem Grund sind die entsprechenden orthologen Gene aus diesen beiden Biosynthesegenclustern im Vergleich zu den gefundenen Orfs aus *S. cinnamomensis* angegeben.

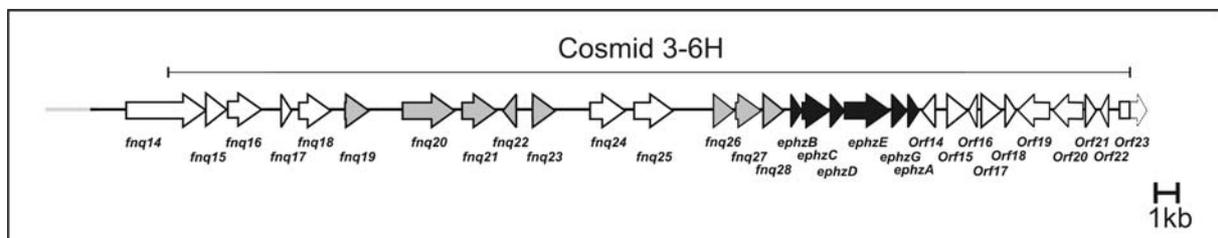


Abb. III.1 Schematische Darstellung der gefundenen Orfs im Insert von Cosmid 3-6H. Die putativen Phenazin-Biosynthesegene sind schwarz und die putativen FNQ I-Biosynthesegene sind grau dargestellt.

Tabelle III.1 Identifizierte Orfs im Insert von Cosmid 3-6H

Orf (aa= Aminosäuren)	Orfs aus den Genclustern für Furaquinocin (fur) oder Phenazin (phz)	% Identität zu Fur oder Phz Proteinen	Ähnlichkeit zu Proteinen und deren Herkunft (% Identität der Produkte)	Accession Nr.
<i>fnq14</i> (1167 aa)			Methioninsynthase aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680 (86%)	NP_827843
<i>fnq15</i> (301 aa)			5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase aus <i>S. atroolivaceus</i> (80%)	AAN85549
<i>fnq16</i> (487 aa)			Adenosylhomocysteinase aus <i>S. argillaceus</i> (88%)	CAK50773
<i>fnq17</i> (152 aa)			Putativer Transkriptionsregulator aus <i>S. coelicolor</i> (34%)	NP_627555
<i>fnq18</i> (465 aa)			Transmembrantransporter aus <i>S. carzinostaticus</i> (50%)	AAM77999
<i>fnq19</i> (348 aa)	<i>MK</i> (335 aa)	63%	Mevalonatkinase aus <i>S. spec.</i> CL190 (65%)	BAB07790
<i>fnq20</i> (759 aa)	<i>fur16</i> (682 aa)	54%	Hypothetisches Protein SAV 5825 aus <i>S. avermitilis</i> (46%)	NP_827002
<i>fnq21</i> (500 aa)	<i>fur17</i> (484 aa)	72%	Carboxymuconatcycloisomerase aus <i>S. spec.</i> 2065 (52%)	AAD40814
<i>fnq22</i> (212 aa)	<i>fur18</i> (209 aa)	53%	OvmZ aus <i>S. antibioticus</i> ATTC 11891 (33%)	CAG14961
<i>fnq23</i> (352 aa)	<i>fur19</i> (352 aa)	69%	trans-Polyprenyldiphosphatsynthetase aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 (40%)	AAK46514
<i>fnq24</i> (516 aa)			Putative Monooxygenase aus <i>S. avermitilis</i> MA- 4680 (40%)	NP_822921
<i>fnq25</i> (569 aa)			Cytochrome B Untereinheit SC 2148 aus <i>S. coelicolor</i> (58%)	NP_626404
<i>fnq26</i> (300 aa)	<i>fur7</i> (307 aa)	64%	Prenyltransferase CloQ aus <i>S. roseochromogenes</i> (24%)	AF329398-29
<i>fnq27</i> (372 aa)	<i>fur6</i> (378 aa)	74%	SAM-abhängige Methyltransferase aus <i>S. tubercidicus</i> (29%)	AAT45283
<i>fnq28</i> (304 aa)			putative Prenyltransferase CloQ aus <i>S. roseochromogenes</i> (23%)	AF329398-29
<i>ephzB</i> (162 aa)	<i>phzB</i> (162 aa)	78%	Putatives Enzym der Phenazin Biosynthese	AAC18901
<i>ephzC</i> (391 aa)	<i>phzC</i> (400 aa)	60%	3-Desoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat (DAHPh) Synthase	AAC18902
<i>ephzD</i> (207 aa)	<i>phzD</i> (207 aa)	65%	2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHHA)- Synthase	AAC18903
<i>ephzE</i> (654 aa)	<i>phzE</i> (637 aa)	59%	2-Amino-2-desoxy-isochorisminsäure (ADIC)- Synthase	AAC18904
<i>ephzG</i> (226 aa)	<i>phzG</i> (222 aa)	54%	Putative FMN-abhängige Oxidase	AAC18906

Orf (aa= Aminosäuren)	Orfs aus den Genclustern für Furaquinocin (fur) oder Phenazin (phz)	% Identität zu Fur oder Phz Proteinen	Ähnlichkeit zu Proteinen und deren Herkunft (% Identität der Produkte)	Accession Nr.
<i>ephzA</i> (169 aa)	<i>phzA</i> (163 aa)	49%	Putatives Enzym der Phenazin Biosynthese	AAC18900
<i>Orf14</i> (203 aa)			WrbA NAD(P)H:Chinonoxido-reduktase WrbA aus <i>Nocardiooides</i> sp. JS614 (52%)	ZP_00657310
<i>Orf15</i> (308 aa)			Putativer Sigmafaktor aus <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 (71%)	CAJ88151
<i>Orf16</i> (121 aa)			Hypothetisches Protein aus <i>Polaromonas</i> sp. JS666 (40%)	YP_549457
<i>Orf17</i> (310 aa)			Putativer Sigmafaktor aus <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 (71%)	CAJ88151
<i>Orf18</i> (157 aa)			Hypothetisches Protein SAV788 aus <i>S. avermitilis</i> MA-4680 (77%)	NP_821963
<i>Orf19</i> (486 aa)			JadZ aus <i>S. venezuelae</i> (oxidoreductase-like- protein) (51%)	AAL82808
<i>Orf20</i> (460 aa)			Rv3161c aus <i>M. tuberculosis</i> , putative Dioxigenase (39%)	NP_217677
<i>Orf21</i> (162 aa)			Hypothetisches Protein SAV1135 aus <i>S.</i> <i>avermitilis</i> MA-4680 (45%)	NP_822310
<i>Orf22</i> (122 aa)			Konserviertes Protein aus <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 (41%)	CAJ89922
<i>Orf23</i> (443+ aa)			Konserviertes Protein aus <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	CAJ89733

Orfs im Insert von Cosmid 3-6H aus *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 verglichen mit Genen aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster *Streptomyces* sp. strain KO-3988 (Kawasaki *et al.*, 2006) (Accession-Nummer in GeneBank AB212624) aus dem Phenazin-Biosynthesegencluster *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (Mavrodi *et al.*, 1998) (Accession-Nummer in GeneBank L48616).

1.3.1 Gene der Phenazinsynthese

Die Sequenzanalyse des 42 kb großen Inserts von Cosmid 3-6H zeigte, dass sechs orthologe Gene aus dem Biosynthesegencluster von *Pseudomonas fluorescens* 2-79 auch in *S. cinnamonensis* vorhanden sind (Abb. III.1 und Tabelle III.1). Diese sechs Orfs wurden in Anlehnung an die sechs orthologen Gene aus *P. fluorescens* als *ephzB*, *ephzC*, *ephzD*, *ephzE*, *ephzG* und *ephzA* bezeichnet. Die sechs Gene zeigen eine Sequenzähnlichkeit von 49-78% auf Aminosäureebene zu den orthologen Genen aus *P. fluorescens*. Mit Ausnahme der Position von *ephzA* und dem Fehlen eines orthologen Gens für *phzF* sind alle Gene in derselben Reihenfolge angeordnet wie in *P. fluorescens*.

Die Genprodukte von *phzC*, *phzE* und *phzD* sind an der Bildung von 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat (DAHP), 2-Amino-2-desoxy-isochorisminsäure (ADIC) und 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHHA) in *Pseudomonas* beteiligt

(McDonald *et al.*, 2001; Parsons *et al.*, 2003). Dagegen ist die Funktion von PhzA, PhzB und PhzG bisher ungeklärt (Mavrodi *et al.*, 2006). PhzF scheint für die Isomerisierung von DHHA benötigt zu werden, bevor dann durch Dimerisierung und Oxidation das Phenazingerüst entsteht (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2004). Auf dem insgesamt 81 kb großen sequenzierten Bereich des Genoms von *S. cinnamomensis* konnte kein orthologes Gen für *phzF* gefunden werden.

1.3.2 *fnq26* und *fnq28*: zwei Prenyltransferasegene

S. cinnamomensis produziert das geranylierte Naphthochinon FNQ I und prenylierte Phenazine, in der Hauptsache Endophenazin A (s. Abb. I.6 und Abb. I.7). In der Sequenz des Inserts von 3-6H befinden sich direkt neben dem putativen Phenazin-Biosynthesegencluster *ephzBCDEGA* mit *fnq26* und *fnq28* zwei Orfs, deren Genprodukte Sequenzähnlichkeit zu CloQ (Pojer *et al.*, 2003) aus der Clorobiocin-Biosynthese und zu Orf2 (Kuzuyama *et al.*, 2005) aus der Naphtherpin-Biosynthese aufweisen. Ein orthologes Gen zu *fnq26* wurde mit *fur7* auch im Furaquinocin-Biosynthesegencluster identifiziert (Tabelle III.1).

Im Folgenden (s. III 1.4) wird die Untersuchung der Funktion von *fnq26* bzw. *fnq28* in der Biosynthese von FNQ I und Endophenazin A beschrieben.

1.3.3 *fnq27*: ein Methyltransferasegen

Zwischen den beiden putativen Prenyltransferasegenen *fnq26* und *fnq28* wurde *fnq27* identifiziert. Fmq27 weist Ähnlichkeit zu einer SAM-abhängigen Methyltransferase aus *S. tubericus* sowie zu Fur6 aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster auf.

Durch Inaktivierungsversuche wurde die Beteiligung von Fmq27 am Methyltransfer auf das Kohlenstoffatom an Position 6 von FNQ I nachgewiesen und eine Beteiligung an der *N*-Methylierung in der Biosynthese von Endophenazin B ausgeschlossen (Glück, 2006).

1.3.4 Gene der FNQ I-Biosynthese

Die Gene *fnq20*, *fnq21*, *fnq22* und *fnq23* im Insert von Cosmid 3-6H zeigen alle Ähnlichkeit zu Genen aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster und sind außerdem in exakt derselben Reihenfolge angeordnet wie dort (s. Abb. III.1). Deswegen kann vermutet werden, dass diese vier Gene der Biosynthese von FNQ I zuzuordnen sind. Fmq20 bzw. Fur16 zeigen Sequenzähnlichkeit zu einem hypothetischen Protein aus *S. avermitilis*. Fmq21 und Fur17 haben Ähnlichkeit zu einer Carboxymuconatcycloisomerase, die die Bildung von 3-Carboxy-*cis,cis*-muconat katalysiert, indem ein Angriff eines Carbonyl-Sauerstoffs auf eine Doppelbindung mit anschließender Zyklisierung stattfindet (Yang *et al.*, 2004). Möglicherweise ist daher Fmq21 am Ringschluß der Geranylseitenkette in der Biosynthese von FNQ I beteiligt. Fmq22 bzw. Fur18 zeigen Ähnlichkeit zu OvmZ aus

S. antibioticus ATTC 11891. OvmZ ist ein Protein aus der Ovidomycin-Biosynthese, dessen Funktion jedoch unbekannt ist (Lombo *et al.*, 2004). Fnq23 bzw. Fur19 zeigen Sequenzähnlichkeit zu einer *trans*-Polyprenyldiphosphatsynthetase aus *M. tuberculosis* CDC1551 (Fleischmann *et al.*, 2002). Daher könnte Fnq23 an der Bereitstellung von Geranyldiphosphat in der Biosynthese von FNQ I beteiligt sein.

1.3.5 *fnq19*: ein putatives Mevalonatkinasegen

18 kb upstream des putativen Phenazin-Biosynthesegenclusters *ephzBCDEGA* befindet sich ein Orf, *fnq19*, der Sequenzähnlichkeit zu Mevalonatkinasegenen aus Streptomyeten-Arten hat. Ein ähnliches Gen (*MK*) wurde im Furaquinocin-Biosynthesegencluster aus *Streptomyces* sp. strain KO-3988 zusammen mit fünf weiteren Mevalonatgenen gefunden, die gemeinsam die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) steuern (Kawasaki *et al.*, 2006). In der gesamten Sequenz des Inserts von 3-6H sowie auch in der Sequenz von 6-1D konnte außer *fnq19* kein weiteres putatives Mevalonatgen identifiziert werden.

Diese Tatsache führte zu der Frage über welchen Biosyntheseweg die Isopreneinheiten von Endophenazin A und FNQ I bereitgestellt werden.

Dies ist Gegenstand des dritten Teiles der vorliegenden Arbeit.

1.3.6 Gene der S-Adenosylmethioninsynthese

Am Rand des 42 kb großen Inserts des Cosmids 3-6H befinden sich drei Orfs *fnq14*, *fnq15* und *fnq16*, deren Genprodukte Sequenzähnlichkeit zu Enzymen zeigen, die an der Bereitstellung von S-Adenosylmethionin (SAM) beteiligt sind. SAM wird im Primärstoffwechsel synthetisiert. Fnq14 zeigt Sequenzähnlichkeit zu einer Methioninsynthase aus *S. avermitilis* MA-4680, Fnq15 zu einer N5,N10-Methylen-tetrahydrofolatreduktase aus *S. atroolivaceus* und Fnq16 hat wiederum Sequenzähnlichkeit zu einer S-Adenosylhomocysteinase aus *S. argillaceus*. Auf dem Insert von 6-1D wurden später *fnq12* und *fnq13* identifiziert. Fnq12 hat Ähnlichkeit zu einer SAM-Synthase aus *S. rochei* und Fnq13 zu einer Adenosinkinase aus *Frankia* sp. Ccl3. Gemeinsam bilden diese fünf Orfs ein putatives SAM-Biosynthesegencluster.

1.3.7 Transporter und Regulatoren

Fmq18 zeigt Ähnlichkeit zu einem Transmembrantransporter aus *S. carzinostaticus* (50%) und könnte an der Sekretion der Sekundärmetabolite beteiligt sein.

Fmq17 hat Sequenzähnlichkeit zu einem Transkriptionsregulator aus *S. coelicolor* (34%) und könnte daher eine regulatorische Funktion haben.

1.3.8 Gene unbekannter Funktion und Gene des Primärstoffwechsels

Orf16, Orf18, Orf21, Orf22 und Orf23 haben Ähnlichkeit zu hypothetischen bzw. konservierten Proteinen, deren Funktion unklar ist.

Fnq24 hat Sequenzähnlichkeit zu einer Monooxygenase aus *S. avermitilis* (40%), Fnq25 zur Cytochrom B Untereinheit aus *S. coelicolor* (58%) und Orf20 zu einer putativen Dioxygenase (39%). Orf14 hat genau wie Fnq10 Ähnlichkeit zu einer Chinon-Oxidoreduktase (52%) (Patridge and Ferry, 2006). Die Funktion dieser Proteine ist unklar, sie könnten aber eventuell modifizierende Aufgaben in der Sekundärstoffbiosynthese übernehmen. Orf19 zeigt Sequenzähnlichkeit zu JadZ aus der Jadomycin-Biosynthese in *S. venezuelae* (51%) (Wang *et al.*, 2002), dessen Funktion jedoch unbekannt ist. Jadomycin ist ebenfalls ein Sekundärmetabolit mit einer Polyketidstruktur.

Orf15 und Orf17 haben starke Ähnlichkeit (71%) zu einem Sigmafaktor aus *S. ambofaciens* ATCC 23788 (Choulet *et al.*, 2006). Sigmafaktoren sind als Initiationsfaktoren an der Transkription beteiligt und werden dem Primärstoffwechsel zugeordnet.

1.4 Funktionsnachweis des Biosynthesegenclusters: Herstellung von Deletionsmutanten und Untersuchung deren Sekundärstoffproduktion

1.4.1 Inaktivierung der Gene *fnq26* und *fnq28*

Zum funktionellen Nachweis der Beteiligung der beiden putativen Prenyltransferasegene *fnq26* und *fnq28* an der Biosynthese von Endophenazin A oder FNQ I wurden zunächst *fnq26* und *fnq28* jeweils getrennt voneinander und später zusätzlich gemeinsam inaktiviert. Für die Herstellung der Inaktivierungskonstrukte wurden die beiden Gene jeweils durch die Apramycinresistenz-Kassette aus pIJ773 mittels λ -Red-vermittelter Rekombination im Cosmid 3-6H ersetzt (s. II 7.1 und 7.2). Die beiden veränderten Cosmide ephzYM03 und ephzYM04 wurden durch Konjugation (s. II 5.5) in den Wildtyp von *S. cinnamonensis* eingebracht und die erhaltenen Exkonjuganten auf ihr Resistenzverhalten überprüft (s. II 4.2.3). Single-Cross-Over-Mutanten waren sowohl resistent gegenüber Apramycin als auch gegenüber Kanamycin, wohingegen Double-Cross-Over-Mutanten gegenüber Apramycin resistent jedoch gegenüber Kanamycin sensitiv waren. Nur Double-Cross-Over-Mutanten wurden weiterverwendet und der Genotyp dieser Mutanten mittels Southern Blotting (II 5.8) überprüft. Dazu wurde chromosomale DNA mit *Pst*I bzw. *Nco*I geschnitten und mit DIG-markiertem 3-6H als Sonde hybridisiert.

Abbildung III.2 zeigt die Ergebnisse von jeweils drei Defektmutanten, die als $\Delta fnq26$ - und $\Delta fnq28$ -Mutanten bezeichnet wurden. Die Deletion des Gens *fnq26* (Abb. III.2a) wurde sowohl durch die Anwesenheit der 4,4 kb und 574 bp Banden als auch durch Abwesenheit der 3,3 kb und 1 kb Banden nachgewiesen. Die 1 kb Bande wurde durch eine weitere etwa 1 kb große Bande in Wildtyp (WT) und Mutanten überlagert.

Die Deletion des Gens *fnq28* (Abb. III.2b) wurde durch Anwesenheit einer 3,2 kb Bande und Abwesenheit einer 2,7 kb Bande gezeigt.

Da es möglich erschien, dass die beiden putativen Prenyltransferasen sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können, wurde eine Doppelmutante hergestellt, bei der beide putativen Prenyltransferasegene inaktiviert waren (s. II 7.3). Dazu wurde die Apramycinresistenz-Kassette durch Schneiden mit *SpeI* und anschließender Religation aus Cosmid ephzYM03 entfernt, das Gen *fnq28* durch eine Apramycinresistenz-Kassette mittels λ -Red-vermittelter Rekombination ersetzt und das entstandene Cosmid ephzYM09 durch Konjugation in den Wildstamm von *S. cinnamonensis* eingebracht. Die erhaltenen Exkonjuganten wurden wieder auf ihr Resistenzverhalten überprüft und der Genotyp dreier Double-Cross-Over-Mutanten mittels Southern Blotting überprüft. Dazu wurde chromosomale DNA mit *BglII* geschnitten und mit DIG-markiertem 3-6H als Sonde hybridisiert. In Abbildung III.2c sind die Ergebnisse von drei Defektmutanten dargestellt, die als $\Delta fnq26\Delta fnq28$ -Mutanten bezeichnet wurden. Die Deletion der Gene *fnq26* und *fnq28* wurde durch die Abwesenheit der 2,9 kb, 1,7 kb, 1 kb und 438 bp Banden und durch Anwesenheit der 3,9 kb und 2 kb Banden gezeigt.

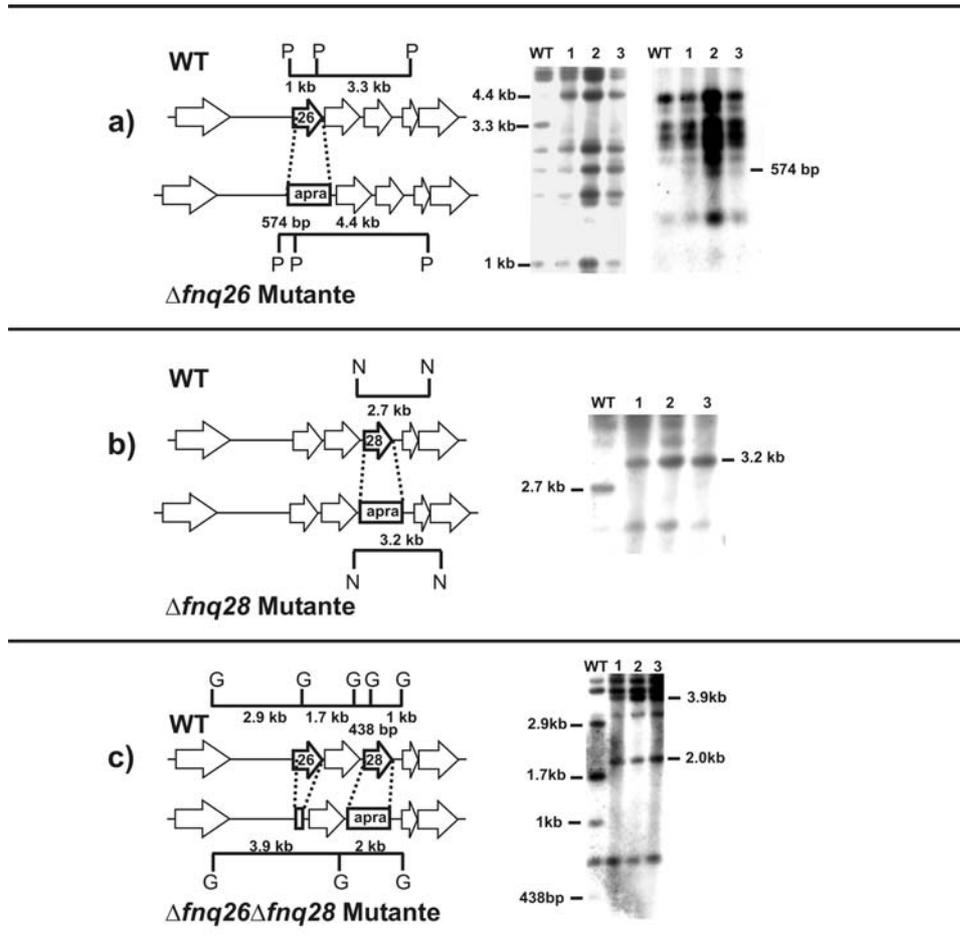


Abb. III.2 Inaktivierung der Gene *fnq26* und *fnq28*. DIG-markiertes Cosmid 3-6H wurde als Sonde für Southern Hybridisierung verwendet. Es wurden jeweils drei Mutanten mit dem Wildtyp (WT) von *S. cinnamonensis* verglichen. a) *fnq26* Inaktivierung: chromosomale DNA der Mutanten und des WT wurde mit *Pst*I (P) geschnitten. Der WT zeigt eine 3,3 kb und eine 1 kb Bande. Die Mutanten zeigen eine 4,4 kb und 574 bp Banden. Die 1 kb Bande wurde durch eine weitere etwa 1 kb große Bande in WT und Mutanten überlagert. b) *fnq28* Inaktivierung: Der WT zeigt eine 2,7 kb und die Mutanten eine 3,3 kb Bande nach Restriktionsverdau von chromosomaler DNA mit *Nco*I (N). c) Doppelinaktivierung der Gene *fnq26* und *fnq28*: Chromosomale DNA der Mutanten und des WT wurde mit *Bgl*III (G) geschnitten. Der WT zeigt 2,9 kb, 1,7 kb, 1 kb und 438 bp Banden, die Mutanten hingegen 3,9 kb und 2 kb Banden.

1.4.2 Inaktivierung aller Gene von *fnq26* bis *ephzA*

Um die Frage zu klären, ob es sich bei den gefundenen *ephzBCDEGA* Genen um ein funktionelles Phenazin-Biosynthesegencluster handelt, wurde der komplette 9 kb große Bereich vom Startcodon von *fnq26* bis zum Stopcodon von *ephzA* durch eine Apramycinresistenz-Kassette mittels λ -Red-vermittelter Rekombination ersetzt (s. II 7.4). Das entstandene Cosmid *ephzYM10* wurde durch Konjugation in *S. cinnamonensis* eingebracht und nach Screening auf Double-Cross-Over-Mutanten der Genotyp zweier $\Delta fnq26$ -*fnq28**ephzBCDEGA*-Mutanten mittels Southern Blotting überprüft. Dazu wurde chromosomale DNA des Wildtyps sowie der Mutanten mit *Bam*HI geschnitten und mit DIG-markiertem 3-6H als Sonde hybridisiert. In

Abbildung III.3 sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Mutanten dargestellt. Die Deletion der Gene wurde durch die Abwesenheit von fünf Banden (9,7 kb, 3,6 kb, 1,5 kb, 987 und 808 bp) und durch Anwesenheit der 6,3 kb und 2,9 kb Banden gezeigt. Die 987 bp Bande wurde durch eine weitere Bande in Wildtyp und Mutanten überlagert.

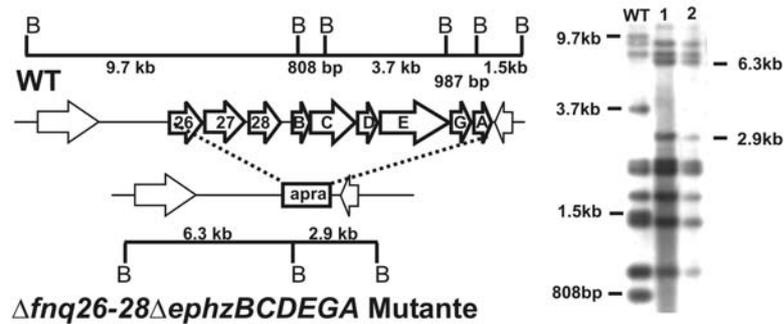


Abb. III.3 Inaktivierung aller Gene von *fnq26* bis *ephzA*: chromosomale DNA von WT und zwei Mutanten wurden mit *Bam*HI (B) geschnitten und mit DIG-markiertem Cosmid 3-6H als Sonde hybridisiert. Der WT zeigt fünf Banden von 9,7 kb, 3,6 kb, 1,5 kb, 987 bp und 808 bp, die Mutanten hingegen zwei Banden von 6,3 kb und 2,9 kb. Die 987 bp Bande wurde durch eine weitere Bande in WT und Mutanten überlagert.

1.4.3 Sekundärstoffproduktion der Deletionsmutanten

Alle Mutanten sowie der Wildtyp wurden in dem modifizierten Medium nach Sedmera *et al.* (1991) (s. II 2.3) zur Sekundärstoffproduktion 120 h bei 30°C mit 190 rpm kultiviert und anschließend extrahiert (s. II 8.1). Die Analyse der Extrakte der $\Delta fnq26$ -, $\Delta fnq28$ - und $\Delta fnq26\Delta fnq28$ -Mutanten mittels HPLC mit Detektion bei einer Wellenlänge von 260 nm zeigte, dass von allen drei Mutantentypen weiterhin Endophenazin A (Rt 18,4 min) in vergleichbarer Menge (ca. 4 mg/l) wie vom Wildtyp produziert wurde (s. Abb. III.4). Jedoch fehlte im Chromatogramm der $\Delta fnq26$ - und der $\Delta fnq26\Delta fnq28$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp der FNQ I-Peak bei 17,2 min. Dieses Ergebnis zeigte, dass *fnq26* an der Biosynthese von FNQ I beteiligt ist. Die $\Delta fnq28$ -Mutanten bildeten sowohl Endophenazin A als auch FNQ I (s. Abb. III.4). Dieses Ergebnis gab keinerlei Hinweis darauf, was für eine Bedeutung *fnq28* hat.

Die HPLC-Analyse der $\Delta fnq26\text{-}fnq28\text{-}ephzBCDEGA$ -Mutanten ergab, dass weder Endophenazin A noch FNQ I produziert worden war (s. Abb. III.4). Dieses Inaktivierungsexperiment zeigte somit, dass dieser Genabschnitt einschließlich der Gene *ephzBCDEGA* tatsächlich in die Biosynthese von Endophenazin A involviert ist.

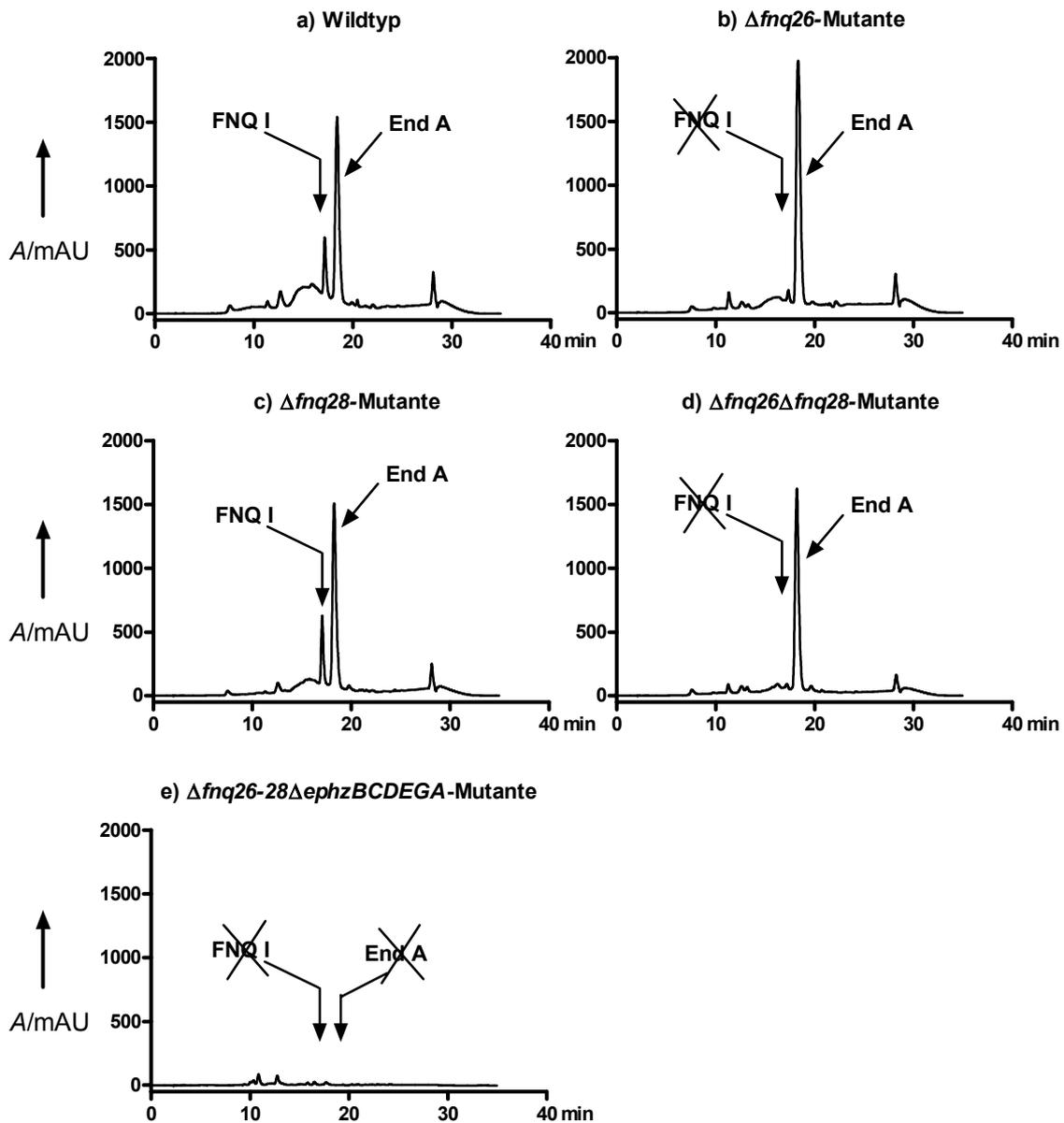


Abb. III.4 HPLC-Chromatogramme a) des Wildtyps, b) der $\Delta fnq26$ -, c) der $\Delta fnq28$ -, d) der $\Delta fnq26\Delta fnq28$ - und e) $\Delta fnq26-28\Delta ephzBCDEGA$ -Mutanten von *S. cinnamonensis*. Detektion bei 260 nm. EndA= Endophenazin A, FNQ I= Furanonaphthochinon I.

1.4.4 Komplementierung der $\Delta fnq26-28\Delta ephzBCDEGA$ -Mutante

Die $\Delta fnq26-fnq28\Delta ephzBCDEGA$ -Mutanten wurden mit einem Konstrukt komplementiert, welches durch Modifikation mittels λ -Red-vermittelter Rekombination aus dem „Wildtypcosmid“ 3-6H entstanden ist (s. II 7.5). Um den für die Konjugation notwendigen *oriT* einzubringen, wurde die Ampicillinresistenz (*bla*) des SuperCos1-Backbones durch die Apramycinresistenz-Kassette aus pIJ773 ersetzt. Dieses Konstrukt (*ephzYM12*) wurde durch Konjugation in die $\Delta fnq26-fnq28\Delta ephzBCDEGA$ -Mutanten eingebracht und die Exkonjuganten auf Verlust der Apramycinresistenz

überprüft. Die erhaltenen komplementierten Mutanten, die $\Delta fnq26$ - $fnq28ephzBCDEGA$ -Mutanten, sowie der Wildtyp wurden in dem von Sedmera *et al.* (1991) beschriebenen Medium kultiviert und die produzierten Sekundärstoffe extrahiert. Die Sekundärstoffproduktion der erhaltenen Mutanten glich wieder der des Wildtyps von *S. cinnamonensis*, wobei insgesamt bei dieser Kultivierung nur ca. 25% der sonst üblichen Menge an Sekundärstoffen gebildet wurde (Endophenazin A 1 mg/l und FNQ I 2 mg/l) (s. Abb. III.5).

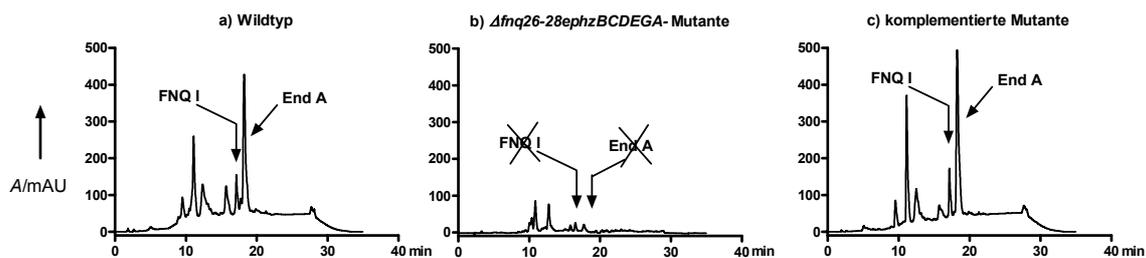


Abb. III.5 HPLC-Chromatogramme a) des Wildtyps, b) der $\Delta fnq26$ -28ephzBCDEGA-Mutanten und c) der komplementierten Mutanten von *S. cinnamonensis*. Detektion bei 260 nm. EndA= Endophenazin A, FNQ I= Furanonaphthochinon I.

2. Charakterisierung der rekombinanten, gereinigten Prenyltransferase Fmq26 aus *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042

Im sequenzierten Bereich des Genoms von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 befindet sich 2,5 kb upstream der Phenazin-Biosynthesegene das Gen *fnq26*. Durch Inaktivierungsversuche wurde bestätigt, dass Fmq26 in die Biosynthese von Furanonaphthochinon I (FNQ I) in *S. cinnamonensis* involviert ist. Da FNQ I revers geranyliert zu sein scheint, war zu vermuten, dass *fnq26* möglicherweise für eine „reverse Geranyltransferase“ kodiert und Fmq26 somit ein interessantes Protein zur Untersuchung einer weiteren löslichen Prenyltransferasen mit aromatischen Substraten darstellt.

2.1 Sequenzanalyse und Klonierung von *fnq26*

Das erwartete Genprodukt von *fnq26* ist ein Protein mit 300 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 32,7 kDa. Die Sequenzanalyse zeigte, dass Fmq26 24% Sequenzähnlichkeit zu CloQ und 42% zu Orf2 hat. Fur7 aus der Furaquinocin-Biosynthese hat eine Sequenzähnlichkeit von 64% zu Fmq26.

fnq26 wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert. Zur Amplifikation wurden Primer verwendet, durch die eine *Bam*HI-Schnittstelle vor dem Startcodon und eine *Xho*I-Schnittstelle 9 nt hinter dem Stopcodon in das resultierende 926 bp PCR-Fragment eingebracht wurden. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T[®] kloniert, was das

Klonierungskonstrukt pLW25 ergab. Nach Überprüfen der Richtigkeit der Sequenz wurde *fnq26* über *Bam*HI/*Xho*I in den Expressionsvektor pHis8 (Jez *et al.*, 2000) umkloniert, was das Expressionskonstrukt pLW37 ergab.

Die Klonierung wurde von L. Westrich durchgeführt.

2.2 Überproduktion und Reinigung

fnq26 wurde als Expressionskonstrukt pLW37 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert, Fmq26 anschließend als Histidin-Fusionsprotein exprimiert und aus der löslichen Proteinfraction mit Nickel-NTA-Agarose gereinigt. Der His₈-Tag wurde mit Thrombin abgespalten und das Protein mittels Gel-Chromatographie zur Homogenität gereinigt (durchgeführt von I. Unsöld) (Abb. III.6). Die aus dem SDS-Gel abgelesene Größe des gereinigten Proteins entsprach dem berechneten Molekulargewicht (His₈-Protein: 35,7 kDa und Thrombin-gespaltenes-Protein: 33,2 kDa).

Aus 1 l Kultur konnten 35 mg His₈-Protein und nach Thrombinabspaltung 15 mg gereinigtes Fmq26 gewonnen werden.

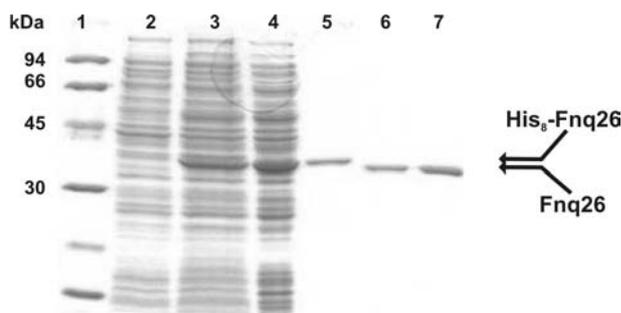


Abb. III.6 SDS-Gel nach Reinigung von Fmq26. Spur 1: Proteingrößenstandard, Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion, Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion mit IPTG, Spur 4: lösliches Protein nach Induktion mit IPTG, Spur 5: Eluat nach Ni-Affinitätschromatographie, Spur 6: nach Thrombin-Spaltung, Spur 7: gereinigtes Protein nach FPLC

2.3 Isolierung von Flaviolin als Substrat für Fmq26 aus *Pseudomonas putida* (pFG154-1)

In der Biosynthese von Furanonaphthochinon I (FNQ I) entsteht sehr wahrscheinlich 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN) ausgehend von 5 Molekülen Malonyl-CoA unter Mitwirkung der putativen Typ-III-Polyketidsynthase Fmq6 (Fay, 2005). Dieses wird dann zu Flaviolin (s. Abb. III.7) oxidiert. Aus diesem Grund kommt Flaviolin als Substrat für die Prenylierungsreaktion durch Fmq26 in Frage.

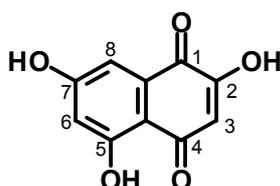


Abb. III.7 Struktur von Flaviolin

Zur Gewinnung von Flaviolin wurde *Pseudomonas putida* (pFG154-1) nach Gross *et al.* (2006) kultiviert, extrahiert und der Rohextrakt über eine Sephadex LH-20 Säule gereinigt (s. II 8.3). Aus 2 l Kultur konnten 39 mg Flaviolin gewonnen werden.

Es wurde ein ^1H -NMR-Spektrum (s. Anhang, S. 107) aufgenommen, das gut mit der Literatur übereinstimmte (s. Tabelle III.2) (Gross *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2005).

Die Isolierung und Reinigung von Flaviolin wurde von K. Flinspach durchgeführt.

2.4 Identifizierung der enzymatischen Produkte

Das gereinigte Enzym Fnq26 wurde mit Geranyldiphosphat (GPP) und Flaviolin (Abb. III.8 A), 1,3-Dihydroxynaphthalin (1,3-DHN; Abb. III.8 B) bzw. 4-Hydroxybenzoat (4-HBA; Abb. III.8 C) inkubiert (s. II 6.7). Durch HPLC-Analyse wurden die Produktpeaks in den Reaktionsansätzen mit nativem Enzym detektiert. In den Reaktionsansätzen mit hitzeinaktiviertem Enzym (10 min bei 100°C) konnten die Produktpeaks nicht beobachtet werden.

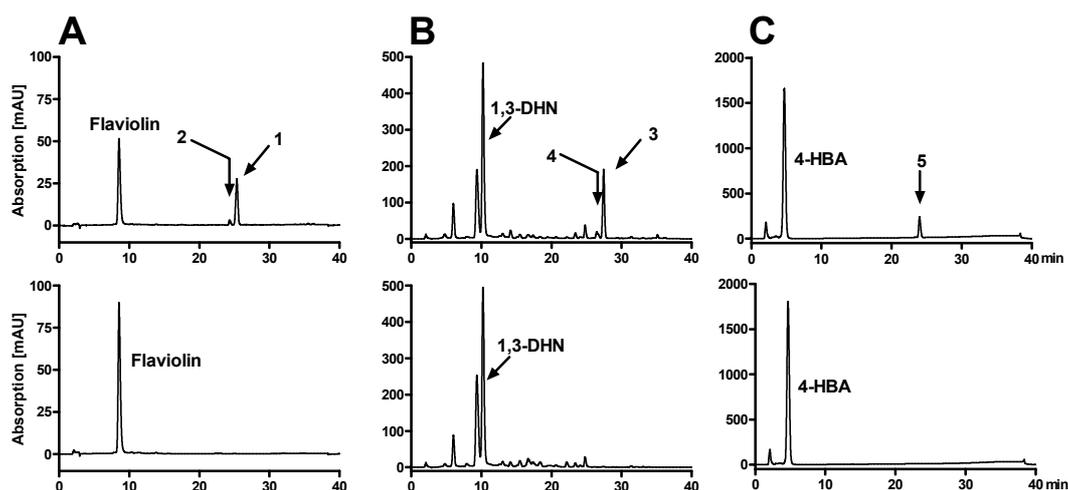


Abb. III.8 HPLC Chromatogramme von Prenyltransferaseassays mit Fnq26. Detektion A und B: bei 288 nm, C: bei 260 nm. Oben: Inkubation mit nativem Enzym. Unten: hitzeinaktiviertes Enzym. A) Inkubationsansatz mit Flaviolin und GPP mit den Reaktionsprodukten 1 und 2. B) Inkubationsansatz mit 1,3-DHN und GPP mit den Reaktionsprodukten 3 und 4. C) Inkubationsansatz mit 4-HBA und GPP mit Reaktionsprodukt 5.

Die enzymatischen Produkte wurden präparativ gereinigt und mit Hilfe der Massenspektrometrie und der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert.

Die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsansätze zeigte eindeutig, dass es sich bei den enzymatischen Produkten der drei verschiedenen Substrate um einfach geranylierte Verbindungen handelte, deren Molekulargewicht jeweils um 136 g/mol größer war als das der Substrate, was genau einer Geranyleinheit entspricht (siehe Anhang S. 115, Tabelle VII.2).

Die Struktur der Reaktionsprodukte wurde durch Vergleich der NMR-Spektren der Produkte mit den entsprechenden Substraten aufgeklärt.

Im ^1H -NMR-Spektrum von Flaviolin sind die beiden Signale der Protonen an Position 6 und 8 des Flaviolingerüsts gekoppelt (s. Tabelle III.2), wohingegen das Signal des Protons an Position 3 als Singulett erscheint. Der Produkthauptpeak im Chromatogramm des Reaktionsansatzes mit Flaviolin (Abb. III.8 A, **1**) hat dieselben Signale wie Flaviolin für 6-H und 8-H, jedoch ist das Signal an Position 3 verschwunden, was beweist, dass die Geranylseitenkette an C-3 von Flaviolin gebunden ist. Stattdessen erscheinen zwei Signale zweier chemisch verschiedener vinyliischer Protonen (4,93 und 4,86 ppm) an Position 1' der Prenylseitenkette, die beide mit dem Proton an Position 2' koppeln, was zu einem Doppeldublett für dieses Proton führt (6,29 ppm; 10,8 und 17,8 Hz). Diese Signale sind typisch für eine sog. „reverse“ Prenylierung, d.h. dass die Geranylseitenkette nicht über C-1' sondern über C-3' mit Flaviolin verknüpft ist (Abb. III.9 A, **1**). Solche Strukturen sind in der Literatur beschrieben und deren Daten stimmen mit den hier berichteten überein (Cardellina *et al.*, 1979; Unsöld and Li, 2006).

Im Inkubationsansatz mit Flaviolin entstand ein weiteres Produkt (Abb. III.8 A, **2**), mit derselben Masse wie **1**. Das ^1H -NMR-Spektrum dieser Substanz zeigte dieselben Protonensignale des Flaviolingerüsts wie Produkt **1**. Jedoch erschienen bei 3,16 ppm die Signale zweier chemisch identischer Protonen an Position 1' des Geranylrestes, die mit dem Proton an Position 2' koppeln, weshalb dessen Signal als breites Triplett (5,12 ppm) erscheint (s. Tabelle III.2). Diese Signale sind für regulär geranylierte Substanzen beschrieben worden (Inouye *et al.*, 1979) und der Vergleich derer mit den hier beschriebenen Signalen zeigt, dass der Prenylrest von Produkt **2** regulär über C-1' mit Flaviolin verknüpft ist (Abb. III.9 A, **2**).

Im Inkubationsansatz mit 1,3-DHN entstanden ebenfalls zwei Produktpeaks mit demselben Molekulargewicht (Abb. III.8 B, **3** und **4**). Die ^1H -Spektren von **3** und **4** (s. Tabelle III.3 und 4) zeigten, dass keines der aromatischen Protonen von 1,3-DHN verschwunden war. Zusätzlich waren alle Signale einer Geranylseitenkette vorhanden. Das Signal, das den beiden Protonen an C-1' zugeordnet wurde, erschien bei 4,66 bzw. 4,73 ppm, was auf eine Etherbindung zwischen C-1' und einer der aromatischen Hydroxygruppen hindeutet. Im ^{13}C -Spektrum von **3** erschien ein Signal bei 66,5 ppm, das C-1' zugeordnet wurde und ebenfalls auf eine Etherbindung schließen lässt. Diese Daten beweisen, dass es sich bei beiden Produkten **3** und **4** um O-prenylierte Substanzen handelt, bei denen der Prenylrest regulär über C-1' des Geranyldiphosphat verknüpft ist (Abb. III.9 B).

Mit 4-HBA als Substrat entstand nur ein Reaktionsprodukt (Abb. III.8 C, **5**). Auch hier war im ^1H -NMR-Spektrum keines der aromatischen Protonensignale verschwunden, stattdessen waren wie bei **3** und **4** die Signale eines Geranylrestes vorhanden (s. Tabelle III.5), der über eine Etherbindung verknüpft ist. Es handelt sich auch hier um eine regulär O-prenylierte Substanz (Abb. III.9 C).

Sämtliche Spektren befinden sich im Anhang (ab S. 105).

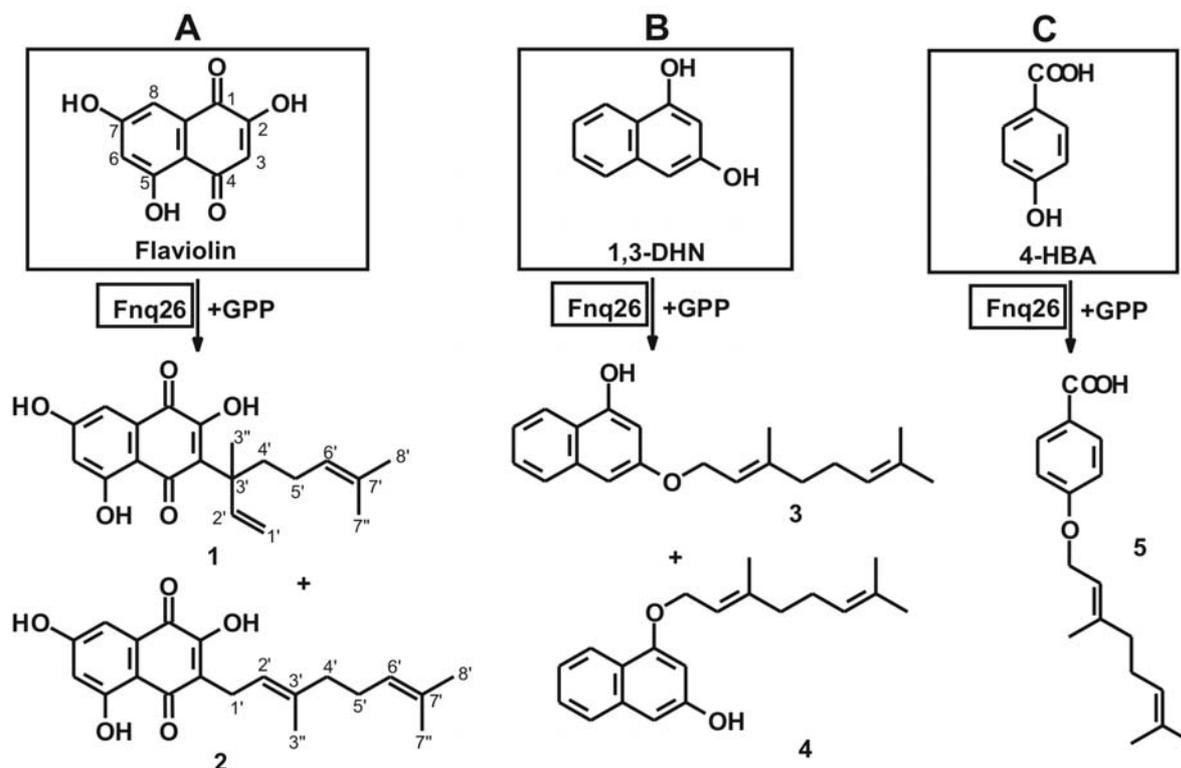


Abb. III.9 Die von Fng26 katalysierten Prenylierungsreaktionen. A) Inkubationsansatz mit Flaviolin und GPP mit den Reaktionsprodukten 1 und 2. B) Inkubationsansatz mit 1,3-DHN und GPP mit den Reaktionsprodukten 3 und 4. C) Inkubationsansatz mit 4-HBA und GPP mit Reaktionsprodukt 5.

Tabelle III.2 $^1\text{H-NMR}$ von Flaviolin und seinen prenylierten Produkten. Die Spektren wurden bei 400 MHz in CD_3CN aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben.

Proton	Flaviolin δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 1 δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 2 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-3	6,12; s	-	-
H-6	6,61; d (2,4)	6,57; d (2,3)	6,56; d (2,0)
H-8	7,05; d (2,4)	6,99; d (2,3)	7,00; d (2,0)
2H-1'		4,93; 1H, d (17,8) 4,86; 1H, d (10,8)	3,16; 2H, d (6,6)
H-2'		6,29; dd (10,8; 17,8)	5,12; br t (6,6)
CH_3 -3''		1,54; s	1,73; s
2H-4'		2,09; m	2,03; m
2H-5'		1,92; m	1,96; m
H-6'		5,05; br t (7,1)	5,03; br t (6,6)
CH_3 -7''		1,48; s	1,53; s
CH_3 -8'		1,53; s	1,58; s

Tabelle III.3 $^1\text{H-NMR}$ von 1,3-Dihydroxynaphthalin und seinen prenylierten Produkten. Die Spektren wurden bei 400 MHz in MeOD aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben.

Proton	1,3-Dihydroxynaphthalin δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 3 δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 4 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-2	6,50; d (2,0)	6,54; d (1,8)	6,52; d (1,8)
H-4	6,66; d (2,0)	6,71; d (1,8)	6,76; d (1,8)
H-5	7,56; d (8,2)	7,58; d (8,2)	7,67; d (8,2)
H-6	7,35; ddd (1,3; 6,9; 8,2)	7,37; ddd (1,3; 6,9; 8,2)	7,40; ddd (1,3; 6,9; 8,2)
H-7	7,20; ddd (1,3; 6,9; 8,2)	7,22; ddd (1,3; 6,9; 8,2)	7,26; ddd (1,3; 6,9; 8,2)
H-8	8,06; d (8,2)	8,08; d (8,2)	8,08; d (8,2)
2H-1'		4,73; d (6,4)	4,66; d (6,6)
H-2'		5,62; br t (6,4)	5,55; br t (6,6)
CH ₃ -3''		1,84; s	1,82; s
2H-4' +2H-5'		2,18; 4H, m	2,17; 4H, m
H-6'		5,16; br t (6,6)	5,15; br t (6,6)
CH ₃ -7''		1,65; s	1,65; s
CH ₃ -8'		1,70; s	1,68; s

Tabelle III.4 $^{13}\text{C-NMR}$ von 1,3-Dihydroxynaphthalin und seinem prenylierten Produkt. Die Spektren wurden bei 100 MHz in MeOD aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben.

C-Atom	1,3-Dihydroxynaphthalin (ppm)	Produkt 3 (ppm)
C1	157,2	157,5
C2	102,0	102,5
C3	156,2	157,2
C4	101,9	99,9
C4a	137,7	137,4
C5	127,9	128,1
C6	127,3	127,3
C7	123,5	123,4
C8	122,9	122,7
C8a	122,1	121,5
C1'		66,5
C2'		123,3
C3'		142,5

C-Atom	1,3-Dihydroxynaphthalin (ppm)	Produkt 3 (ppm)
C3''		18,2
C4'		41,0
C5'		27,8
C6'		125,4
C7'		133,0
C7''		17,1
C8'		26,3

Tabelle III.5 $^1\text{H-NMR}$ von 4-Hydroxybenzoesäure und seinem prenyliertem Produkt. Die Spektren wurden bei 400 MHz in CD_3CN aufgenommen. Die δ -Werte werden in ppm angegeben.

Proton	4-Hydroxybenzoesäure δ , Multiplizität (J/Hz)	Produkt 5 δ , Multiplizität (J/Hz)
H-2+H-6	7,86; 2H, br d (8,8)	7,90; 2H, br d (8,8)
H-3+H-5	6,77; 2H, br d (8,8)	6,86; 2H, br d (8,8)
2H-1'		4,82; d (7,1)
H-2'		5,49; br t (7,1)
CH_3 -3''		1,81; s
2H-4'+2H-5'		2,16; 4H, m
H-6'		5,14; br t (6,7)
CH_3 -7''		1,64; s
CH_3 -8'		1,69; s

2.5 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von Fnq26

2.5.1 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von Fnq26 nach Thrombinspaltung wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer kalibrierten Superdex-200-Säule (s. II 6.6) durchgeführt (durchgeführt von I. Unsöld). Für das aktive Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 39,1 kDa bestimmt. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht der rekombinanten Prenyltransferase nach His_8 -Abspaltung mit Thrombin beträgt 33,2 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Fnq26 in seiner aktiven Form als Monomer vorliegt, wie es auch für CloQ und Orf2 berichtet wurde (Kuzuyama *et al.*, 2005; Pojer *et al.*, 2003).

2.5.2 Abhängigkeit der Prenyltransferaseaktivität von pH, Zeit, Proteinmenge und Cofaktoren

Die Produktbildung durch die gereinigte, rekombinante Prenyltransferase Fnq26 zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Proteinmenge bis zu 50 µg pro 50 µl Assay (s. II 6.7). Eine lineare Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit konnte bis zu 30 min beobachtet werden. Die Aktivität war bei pH 8,5 optimal (Abb. III.10) mit halbmaximaler Aktivität bei pH 7,5 und 9,2.

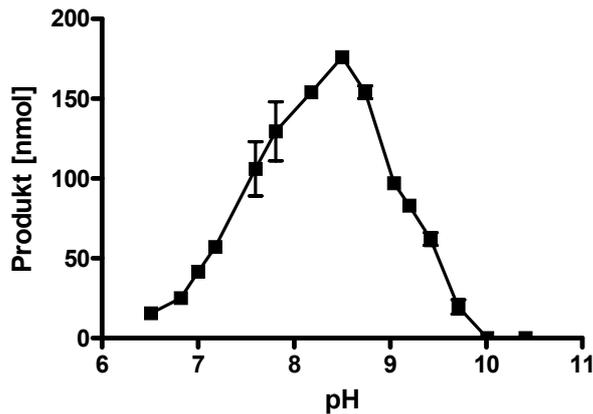


Abb. III.10 pH-Abhängigkeit der Aktivität von Fnq26

Natriumascorbat (10 mM) wurde standardmäßig zum Reaktionsansatz gegeben, um die oxidative Zersetzung der Substrate, vor allem von 1,3-DHN zu verringern. Die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} (10 mM Endkonzentration) war für die enzymatische Aktivität kaum bedeutsam. Auch die Zugabe von EDTA (10 mM) hatte keinen Einfluß auf die Reaktion. Dagegen hemmen Zink- und Manganionen (10 mM) die Aktivität deutlich, die Produktbildung wurde um 60-80% reduziert (Abb. III.11).

Es wurde kein Unterschied in den enzymatischen Eigenschaften zwischen dem His₈-Protein und dem Protein nach Thrombin-Spaltung beobachtet.

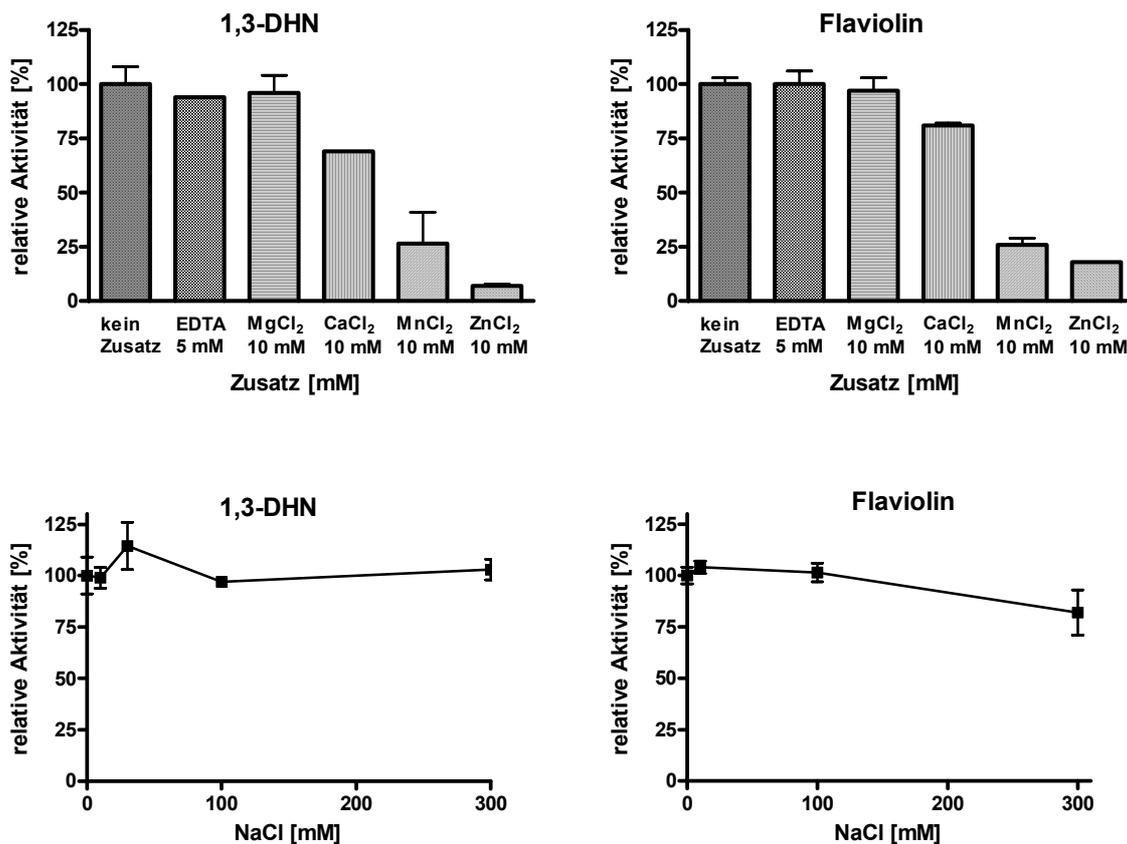


Abb. III.11 Abhängigkeit der Aktivität von Fng26 von Zusätzen in verschiedenen Konzentrationen

2.5.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Prenyltransferase-Aktivität von Fng26 folgt einer Michaelis-Menten Kinetik. Die K_m -Werte für die aromatischen Substrate wurden bei einer GPP-Konzentration von 2 mM bestimmt. Die typischen hyperbolen Kurven sind in Abb. III.12 dargestellt. Aus der Linearisierung der Kurve nach Lineweaver-Burk (s. Abb. III.12, unten) ergab sich für 1,3-DHN ein K_m -Wert von 1,9 mM. Für 4-HBA wurde aus mehreren Messreihen ein K_m -Wert von ungefähr 5,6 mM bestimmt (Kurven nicht abgebildet). Flaviolin hingegen zeigte einen wesentlich niedrigeren K_m -Wert (21 μ M) unter denselben Bedingungen. Der K_m -Wert wurde für GPP mit 2,1 μ M bestimmt unter Verwendung von Flaviolin (0,25 mM) als aromatisches Substrat. Mit 1,3-DHN (4 mM) als Prenylakzeptor ergab sich hingegen ein K_m -Wert von 27 μ M.

Die Wechselzahl wurde für 1,3-DHN mit $k_{cat} = 0,2 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Im Gegensatz dazu wurde 4-HBA mit einer etwas geringeren Reaktionsgeschwindigkeit umgesetzt ($k_{cat} = 0,14 \text{ min}^{-1}$). Für Flaviolin wurde eine Wechselzahl von $0,013 \text{ min}^{-1}$ bestimmt.

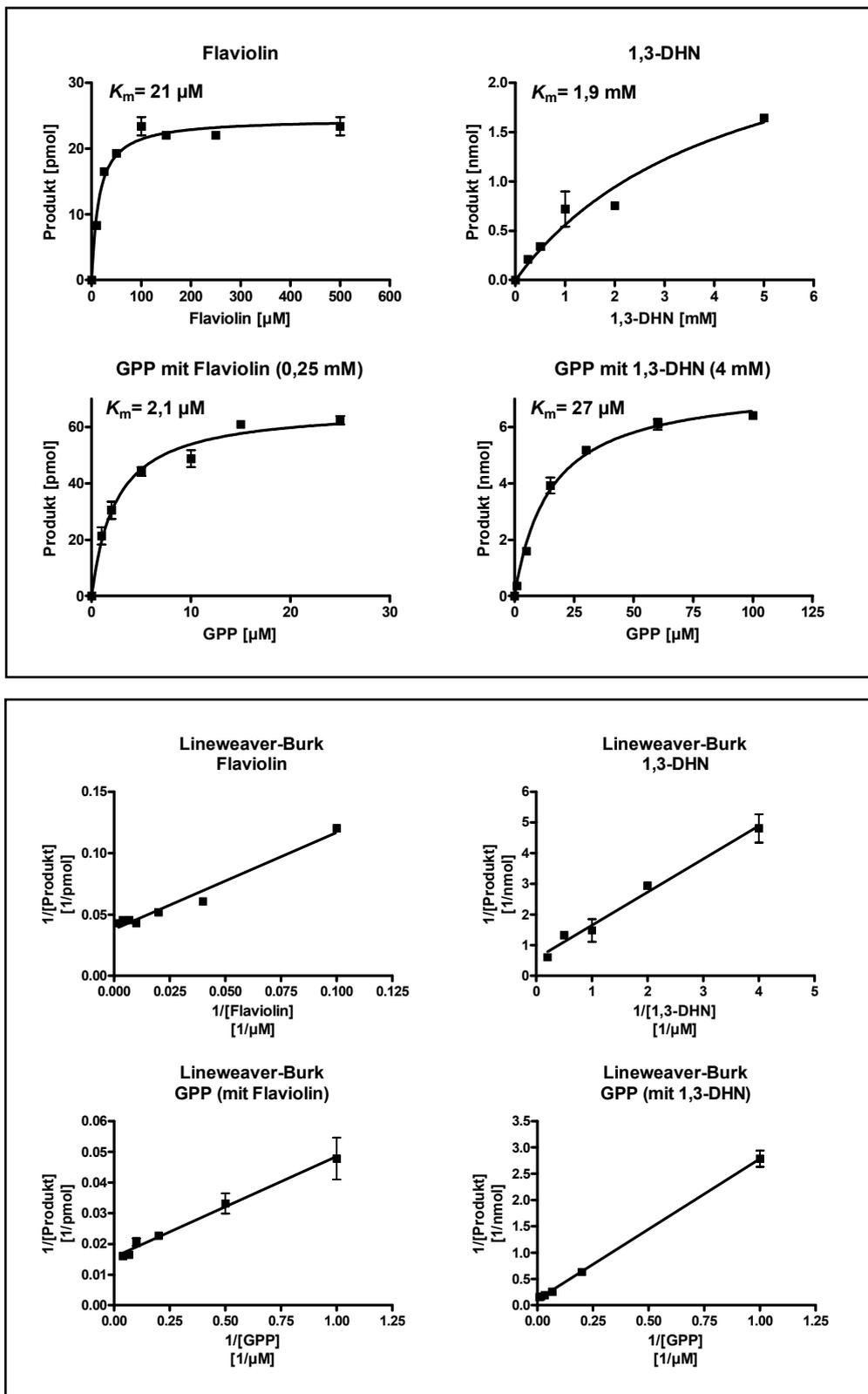


Abb. III.12 Bestimmung der K_m -Werte von Fmq26. Oben: hyperbole Kurven. Unten: Linearisierung nach Lineweaver-Burk.

2.5.4 Testung verschiedener Substrate

Verschiedene weitere aromatische Substrate wurden getestet (s. Tabelle III.6 und Abb. III.13). Wie bei Orf2 aus der Naphterpin-Biosynthese ist das native Substrat von

Fnq26 nicht bekannt. Keine detektierbare Produktbildung wurde mit 1,6-DHN, 4-Hydroxyphenylpyruvat, dem Substrat von CloQ, oder mit 2,7-DHN beobachtet. Mit dem Flavonoid Naringenin (1 mM) fanden 2% des Umsatzes mit 1,3-DHN als Substrat unter denselben Bedingungen statt. Wurde anstatt GPP DMAPP als Prenyldonor verwendet, wurde für Flaviolin 15%, für 1,3-DHN 24% und für 4-HBA 6% der Produktbildung von GPP beobachtet. Die Struktur dieser Produkte wurde jedoch nicht aufgeklärt. Mit FPP als Prenyldonor wurde keine detektierbare Produktbildung beobachtet.

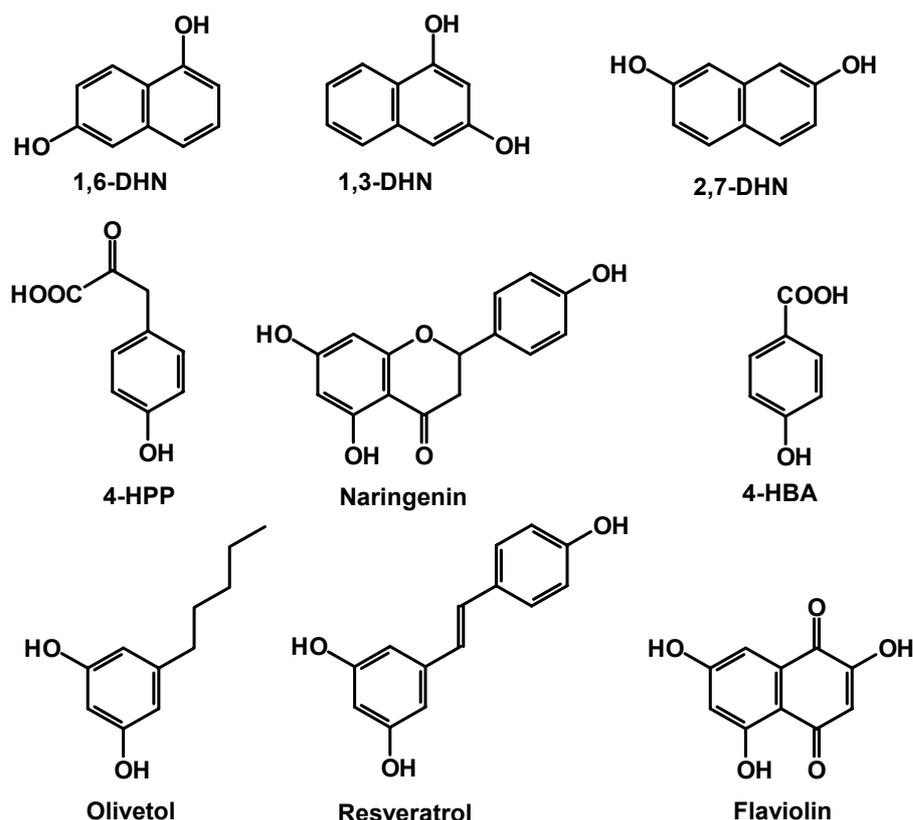


Abb. III.13 Strukturen der für Fnq26 getesteten aromatischen Substrate

Tabelle III.6 Substratspezifität von Fnq26

Substrat	Relative Aktivität [%]
1,3-Dihydroxynaphthalin (1,3-DHN)	100%
Flaviolin	7%*
4-Hydroxybenzoat (4-HBA)	60%
Naringenin	2%
1,6-Dihydroxynaphthalin (1,6-DHN)	< 0,1%
2,7-Dihydroxynaphthalin (2,7-DHN)	< 0,1%
4-Hydroxyphenylpyruvat (4-HPP)	< 0,1%
Geranyldiphosphat (GPP)	100
Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)	15% (Flaviolin), 24% (1,3-DHN), 6% (4-HBA)
Farnesyldiphosphat (FPP)	< 0,1%

* Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für Flaviolin war zwar 14-fach niedriger als für 1,3-DHN, aber gleichzeitig war auch der K_m -Wert 90-fach niedriger, so dass Flaviolin das mit höchster katalytischer Effizienz (V_{max}/K_m) umgesetzte Substrat darstellt.

3. Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs der Isopreneinheiten in Endophenazin A und Furanonaphthochinon I

Streptomycceten benutzen den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) für die Produktion von Primärmetaboliten terpenoider Struktur (Kuzuyama and Seto, 2003; Seto *et al.*, 1996) sowie für die Synthese einiger Sekundärstoffe. Dahingegen sind jedoch manche Streptomycceten in der Lage, zusätzlich für die Produktion von Sekundärmetaboliten den Mevalonatweg (MEV-Weg) zu nutzen (Kuzuyama and Seto, 2003). In einigen der Sekundärstoffproduzenten, für die die Nutzung des MEV-Weges schon durch Fütterungsexperimente gezeigt worden war, konnten in den Biosynthesegenclustern der isoprenoiden Sekundärstoffen jeweils sechs Gene des Mevalonatstoffwechsels identifiziert werden (Hamano *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2000).

Im insgesamt 81 kb großen sequenzierten Bereich des Genoms von *S. cinnamonensis* wurde *fnq19* als ein putatives Mevalonatkinasegen identifiziert. Jedoch konnten die restlichen fünf Gene, die für Enzyme des Mevalonatstoffwechsels kodieren, weder auf dem 47 kb großen Bereich upstream noch auf dem 33 kb großen Bereich downstream von *fnq19* gefunden werden.

Dies warf die Frage auf, über welchen Weg die Prenyleinheiten von Endophenazin A und Furanonaphthochinon I biosynthetisiert werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die im Folgenden beschriebenen Fütterungsversuche mit [¹³C]markierten Vorstufen durchgeführt. Dieses Projekt war ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe G. Bringmann an der Universität Würzburg. Die Fütterung und Extraktion der Substanzen waren eigene Arbeiten, die Reinigung der Substanzen sowie die Analyse der NMR-Spektren erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von G. Bringmann.

3.1 Vorversuche zu den Fütterungsexperimenten

Für solche Fütterungen wurden in der Vergangenheit oft [¹³C]markiertes Natriumacetat und [¹³C]markierte D-Glucose verwendet. Zunächst wurde untersucht, ob der Zusatz von D-Glucose und Natriumacetat zum Produktionsmedium einen Einfluß auf die Produktion der Sekundärmetabolite hat.

S. cinnamonensis produzierte 4 mg/l Endophenazin A und 8 mg/l Furanonaphthochinon I (FNQ I) unter den von Sedmera *et al.* (1991) beschriebenen Bedingungen. Dieses Medium enthält 5% Glycerol als Kohlenstoffquelle. Der Zusatz von Natriumacetat (Endkonzentration von 1 g/l) beeinflusste die Produktionsmenge der beiden Metabolite nicht, weshalb [¹³C]markiertes Natriumacetat für eine erste Fütterung verwendet wurde. Dagegen sank die produzierte Menge an Endophenazin A und FNQ I auf 0,1 mg/l bzw. 0,8 mg/l ab, nachdem Glycerol (Endkonzentration 5%) durch D-Glucose (Endkonzentration 1%) ersetzt worden war. Selbst der Zusatz von D-Glucose (Endkonzentration 1%) zum Originalmedium führte zu einem Absinken der Produktionsmenge der beiden Metabolite auf 1 mg/l bzw.

3 mg/l. Somit erschien [^{13}C]markiertes Glycerol besser geeignet für eine Fütterung als D-Glucose. Der Einbau von [2- ^{13}C]markiertem Glycerol führt zu einem vorhersagbaren unterschiedlichen Markierungsmuster, je nachdem, über welchen Biosyntheseweg die Isopreneinheit synthetisiert wird (s. Abb. III.15).

Um die Isotopen-Dilution der [^{13}C]markierten Vorstufen zu verringern, wurde der Glycerolgehalt auf 1% Endkonzentration verringert, was zur Folge hatte, dass die Produktion von Endophenazin A auf 1,5 mg/l sank. Die FNQ I Produktion wurde nicht beeinflusst.

In Abb. III.14 ist dargestellt, welches Einbaumuster von [$^{13}\text{C}_2$]Natriumacetat über den MEV-Weg in FNQ I bzw. Endophenazin A zu erwarten ist. Der Einbau von [2- ^{13}C]Glycerol in FNQ I bzw. Endophenazin A über die beiden möglichen Biosynthesewege ist in Abb. III.15 abgebildet.

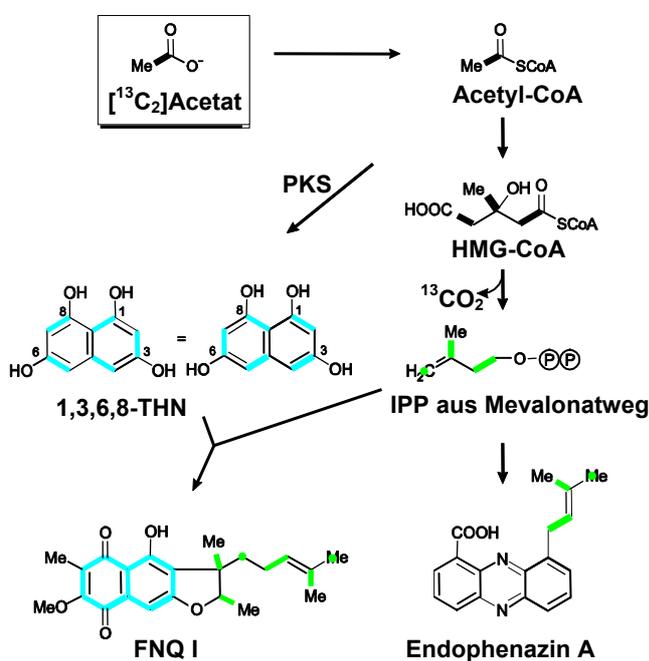


Abb. III.14 Erwarteter Einbau von [$^{13}\text{C}_2$]Acetat in FNQ I und Endophenazin A über den Mevalonatweg. [^{13}C]markierte Positionen sind schwarz (fett), grün (Mevalonatweg) und blau (Polyketidstoffwechsel) gekennzeichnet.

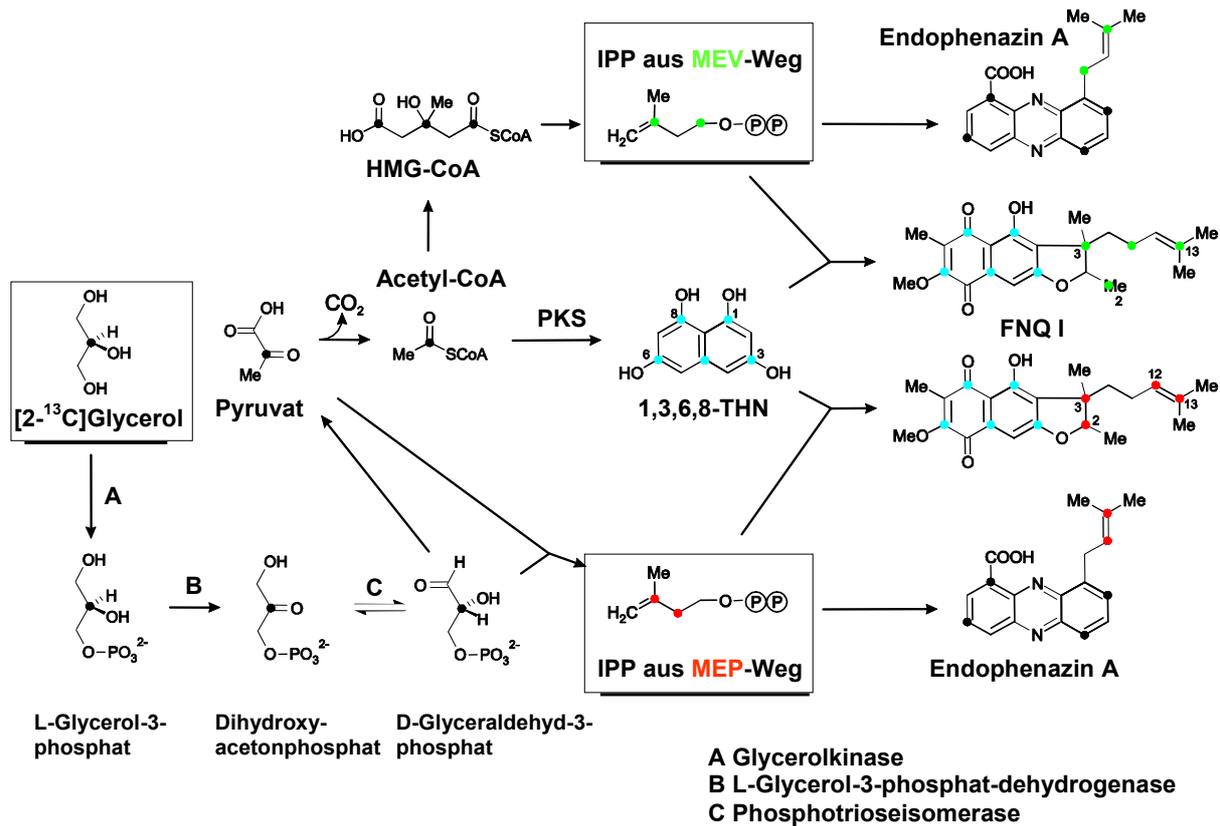


Abb. III.15 Erwarteter Einbau von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol in FNQ I und Endophenazin A über den Mevalonat- und den Methylerythritolphosphatweg (MEP). $[^{13}\text{C}]$ markierte Positionen sind schwarz (fett), grün (Mevalonatweg), rot (MEP-Weg) und blau (Polyketidstoffwechsel) markiert.

3.2 Fütterungen mit $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat und $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol

S. cinnamomensis wurde wie unter II 9 beschrieben kultiviert. Zu 2 l Kultur wurde eine sterile Lösung von 2 g $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat (eingestellt auf pH 7) bzw. 2 g steriles $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol gegeben. Die Kulturen wurden 120 h bei 30°C mit 190 rpm kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, mit Methanol extrahiert und nach Zugabe von Acetatpuffer (pH 4) mit Dichlormethan extrahiert. HPLC-Analyse der Extrakte ergab eine Produktionsmenge von 15 mg FNQ I und 1,8 mg Endophenazin A nach Fütterung mit $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat und eine Menge von 13 mg FNQ I und 1,3 mg Endophenazin A nach Fütterung mit $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol.

Die beiden Substanzen wurden anschließend präparativ gereinigt. Nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Acetat wurden 7 mg FNQ I und 1 mg Endophenazin A und nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol wurden 6 mg FNQ I und 0,8 mg Endophenazin A erhalten und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert (Spektren s. Anhang ab S. 116).

Die Zuordnung der ^{13}C -NMR Signale von FNQ I ist von Sedmera *et al.* (1991) publiziert worden. Für die meisten der C-Atome konnte diese Zuordnung durch Analyse der HMQC- und HMBC-NMR-Spektren der unmarkierten Substanz eindeutig bestätigt werden. Jedoch zeigten die hier erhaltenen Daten, dass die Zuordnung der Signale von C-4a und C-9 sowie von C-7 und C-9a revidiert werden muss. Beides

wurde später durch die Kopplungskonstanten nach der [$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterung bestätigt.

3.2.1 NMR-Analyse von FNQ I und Endophenazin A nach Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]Natriumacetat

Nach der Fütterung von [^{13}C]markiertem Acetat waren an allen Positionen des acetogenen Naphthochinonrings von FNQ I [^{13}C]-Atome detektierbar (s. Abb. III.16). Jedes dieser [^{13}C]-Atome koppelte mit seinen beiden Nachbartomen in gleichem Ausmaß (s. Tabelle III.7), was dadurch zu erklären ist, dass der Einbau von [$^{13}\text{C}_2$]Acetat in den Naphthalinring in zwei Markierungsmustern resultieren kann, deren Signale sich überlagern. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass in der Biosynthese von FNQ I ein symmetrisches Zwischenprodukt entsteht. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN). Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen von Naphthochinonen überein (Funayama *et al.*, 1990; Shin-Ya *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1987).

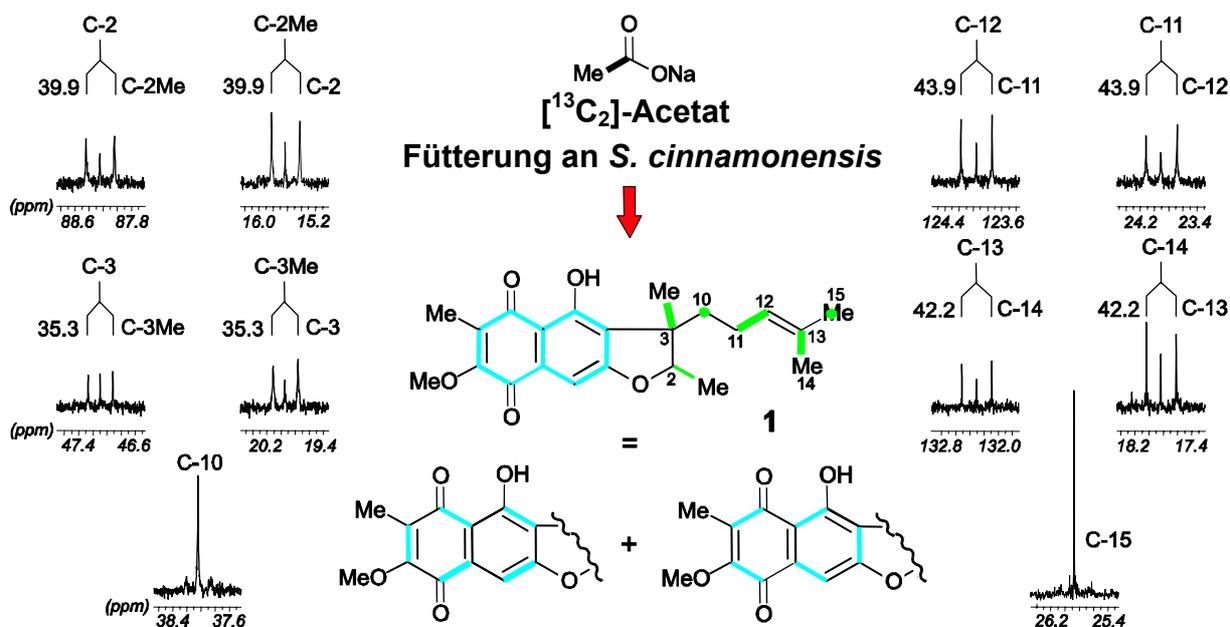


Abb. III.16 Markierung von FNQ I nach [$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterung von *S. cinnamomensis*. [^{13}C]markierte Positionen sind in grün (Mevalonatweg) und blau (Polyketidstoffwechsel) dargestellt. 2J Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Weder die Methylgruppe an Position 6 des Naphthochinonringes noch die Methoxygruppe an Position 7 zeigten eine [^{13}C]Markierung (s. Tabelle III.7 und Abb. III.16), was bedeutet, dass diese Substituenten erst später in einem weiteren Biosyntheseschritt angehängt werden, vermutlich unter Mitwirkung der S-Adenosylmethionin abhängigen Methyltransferasen Fmq9 und Fmq27 (Glück, 2006).

Die Hauptfrage war jedoch, über welchen Biosyntheseweg die Prenyleinheiten von FNQ I und Endophenazin A bereitgestellt werden.

Durch Analyse der Kopplungskonstanten der 10 isoprenoiden Kohlenstoffatome der Geranylseitenkette von FNQ I nach der [$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterung (s. Tabelle III.7 und Abb. III.16) konnten in jeder der beiden C5-Einheiten die Positionen zweier noch intakter [$^{13}\text{C}_2$]-Einheiten und eines einzelnen [^{13}C]-Atoms bestimmt werden. Die [$^{13}\text{C}_2$]-Einheiten wurden an den Positionen C-2/C-2Me ($^2J = 39,9$ Hz), C-3/C-3Me ($^2J = 35,3$ Hz), C-11/C-12 ($^2J = 43,9$ Hz) und C-13/C-14 ($^2J = 42,2$ Hz) gefunden, während die einzelnen [^{13}C]-Atome an Position C-10 und C-15 identifiziert wurden. Dieses Muster entsprach exakt der erwarteten Anordnung isoprenoider Atome aus dem Mevalonatstoffwechsel (s. Abb. III.14).

Tabelle III.7 ^{13}C -NMR: chemische Verschiebung und Anreicherungsrate von FNQ I, nach der Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]Acetat und [$2\text{-}^{13}\text{C}$]Glycerol. Die Nummerierung der Struktur folgt Sedmera et al. (1991). Die Anreicherungsrate ist als [^{13}C]-Atomprozent abzüglich des natürlichen Vorkommens angegeben.

C-Atom	$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterung			$[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Glycerolfütterung	
	δ (ppm)	Anreicherung (%)	2J (zu C)	δ (ppm)	Anreicherung (%)
2	88,2	3,9 ^{b)}	39,9 (2-Me)	88,3	1,5
2-CH ₃	15,6	3,9 ^{b)}	39,9 (2)	15,6	7,0
3	47,1	4,2 ^{b)}	35,3 (3-Me)	47,1	7,7
3-CH ₃	19,9	4,2 ^{b)}	35,3 (3)	19,9	0,2
3a	128,1	a)	61,1 (4); 75,1 (9a)	128,1	-0,4
4	161,4	a)	61,1 (3a); 72,0 (4a)	161,4	11,6
4a	109,7	a)	59,1 (5); 72,0 (4)	109,9	-0,4
5	184,1	a)	51,9 (6); 59,1 (4a)	184,1	7,5
6	133,9	a)	51,9 (5); 74,3 (7)	134,1	-0,2
6-CH ₃	9,6	-	-	9,6	1,3
7	157,0	a)	57,4 (8); 74,0 (6)	157,0	10,4
7-OCH ₃	60,9	-	-	60,9	1,4
8	181,1	a)	57,4 (7); 54,2 (8a)	181,3	0,4
8a	133,6	a)	54,2 (8); 66,0 (9)	133,6	7,0
9	108,7	a)	64,0 (9a); 65,4 (8a)	108,9	0,0
9a	156,7	a)	63,7 (9); 75,1 (3a)	156,8	9,5
10	38,0	4,0	-	38,0	-0,1
11	23,9	4,1 ^{b)}	43,9	23,9	5,9
12	124,0	4,1 ^{b)}	43,9	124,0	1,5
13	132,3	3,8 ^{b)}	42,2	132,3	10,1
14	17,8	3,8 ^{b)}	42,2	17,8	0,1
15	25,9	4,1	-	25,9	-0,1

^{a)} Die durchschnittliche Anreicherung der 10 C-Atome des aus dem Polyketidstoffwechsel stammenden Naphthochinonrings war 4,3%. Aufgrund der Kopplungen der Signale war eine genaue Messung an diesen Positionen nicht möglich.

^{b)} Durchschnittliche Anreicherung der beiden C-Atome einer [$^{13}\text{C}_2$]-Einheit.

Endophenazin A wurde in geringerer Menge von *S. cinnamensis* gebildet als FNQ I. Trotzdem gelang die Aufklärung des biosynthetischen Ursprungs durch die Fütterung mit [$^{13}\text{C}_2$]Acetat. Die ^{13}C -NMR-Spektren der isolierten Substanz ergaben eine starke Kopplung zwischen C-3' und C-5' ($^2J = 42,2$ Hz) und eine schwache Wechselwirkung von C-2' mit C-1' ($^2J = 43,7$ Hz, berechnet durch die Satelliten von C2') (s. Tabelle III.8 und Abb. III.17). Das Signal von C-1' war nicht sauber aufgelöst,

da es durch Verunreinigungssignale überlagert war. Das Signal von C-4' erschien wie erwartet hauptsächlich als Singulett. Auch für Endophenazin A konnte also gezeigt werden, dass der Dimethylallylrest aus dem Mevalonatstoffwechsel stammt.

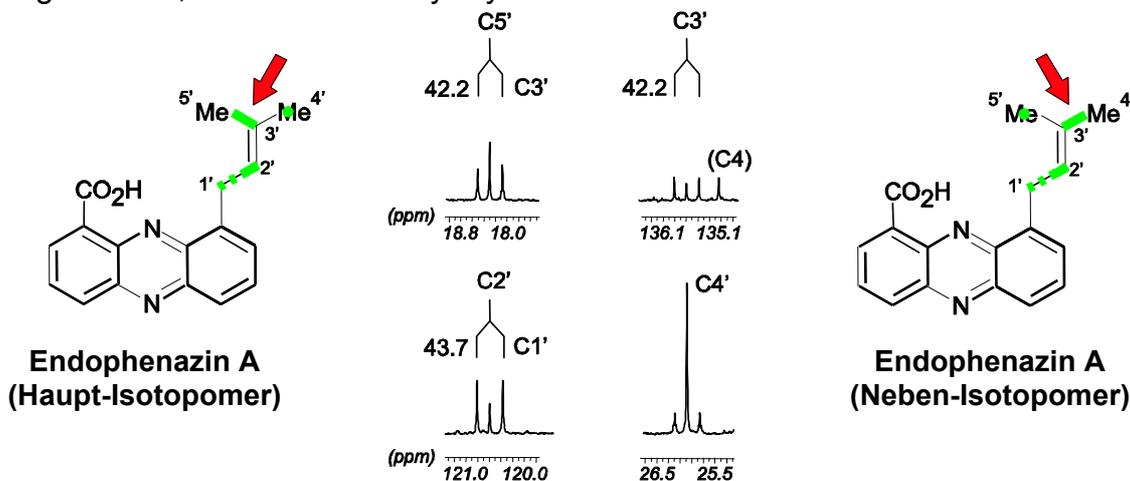


Abb. III.17 Markierung der Prenylseitenkette von Endophenazin A nach $[^{13}\text{C}_2]$ Acetatfütterung von *S. cinnamensis*. $[^{13}\text{C}]$ markierte Positionen sind in grün dargestellt. Die punktierte Linie beschreibt die erwartete $[^{13}\text{C}_2]$ -Einheit zwischen C2' und C1', was durch die ^2J Kopplung von C2' (43,7 Hz) nahe liegt.

Überraschenderweise wurde zudem eine schwache Kopplung zwischen C-4' und C-3' beobachtet, was auf einen in geringerem Ausmaß vorkommenden Einbau einer $[^{13}\text{C}_2]$ -Einheit an Position C-3'/C-4' hindeutet und die Bildung eines Isotopomers von Endophenazin A zur Folge hat, welches an Position 5' ein einzelnes $[^{13}\text{C}]$ -Atom aufweist (s. Tabelle III.8 und Abb. III.17). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für FNQ I an Position C-10 und etwas schwächer an Position C-15 gemacht (s. Abb. III.16), was auf eine nicht ganz strikte Stereoselektivität der DMAPP-IPP-Isomerase schließen lässt.

Tabelle III.8 ^{13}C -NMR chemische Verschiebung und Anreicherungsrate von Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Acetat. Die Anreicherungsraten wurden wie in Tabelle III.7 angegeben berechnet.

$[^{13}\text{C}_2]$ Acetatfütterung		
C-Atom	δ (ppm)	Anreicherung (%)
1	125,2	-
1-COOH	166,3	-
2	137,3	-
3	130,4	-
4	135,1	-
4a	143,3	-
5a	144,8	-
6	128,3	-
7	132,0	-
8	131,8	-
9	139,49	-
9a	139,42 ¹	-
10a	139,39 ¹	-
1'	30,1	n/a*

$[^{13}\text{C}_2]$ Acetatfütterung		
C-Atom	δ (ppm)	Anreicherung (%)
2'	120,6	3,9
3'	135,7	2,7
4'	26,0	2,2
5'	18,3	3,2

(*) Die Anreicherungsrate an C1' war nicht messbar, das Signal war durch Verunreinigungssignale überlagert.

3.2.2 NMR-Analyse von FNQ I und Endophenazin A nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol

Nach der Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol wurden die gereinigten Metabolite ebenfalls mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert, um einen möglichen zusätzlichen Beitrag des MEP-Weges zur Biosynthese der isoprenoiden Teilstrukturen von FNQ I und Endophenazin A zu detektieren.

Die Anreicherungsrate von $[^{13}\text{C}]$ in FNQ I ist in Tabelle III.7 angegeben. Der Naphthochinonring von FNQ I war wie erwartet an den Positionen C-4, C-5, C-7, C-8a und C-9a (Abb. III.18) markiert. Die Analyse der isoprenoiden Kohlenstoffatome ergab eine deutliche Markierung an den Positionen C-3 und C-13 (im Durchschnitt 8,9%). Diese beiden Positionen können sowohl über den MEV-Weg als auch über den MEP-Weg markiert werden (s. Abb. III.15). Zusätzlich waren die Positionen C-2Me und C-11 (im Durchschnitt 6,5% Anreicherung) deutlich markiert. Diese Positionen können hingegen nur durch den Einbau von $[^{13}\text{C}]$ über den MEV-Weg markiert werden. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass der isoprenoide Teil der Struktur hauptsächlich aus dem Mevalonatstoffwechsel stammt.

Jedoch waren auch die Positionen C-2 und C-12 markiert (jeweils 1,5% Anreicherung), wodurch ein zusätzlicher Beitrag des MEP-Stoffwechsels zur IPP-Synthese gezeigt werden konnte.

Entsprechend der Anreicherungsraten von $[^{13}\text{C}]$ an den entscheidenden Positionen (C-2Me und C-11 mit 6,5% bzw. C-2 und C-12 mit 1,5% Anreicherung) wurden die Beiträge der beiden Stoffwechselwege zur Biosynthese von FNQ I auf 80% für den Mevalonatweg und 20% für den MEP-Weg geschätzt.

Die produzierte Menge an Endophenazin A von 1,3 mg genügte nicht, um das Einbaumuster von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol zu bestimmen. Aus diesem Grund kann auch keine Aussage über den relativen Beitrag des MEP-Stoffwechsels zur Biosynthese der Dimethylallyleinheit von Endophenazin A gemacht werden.

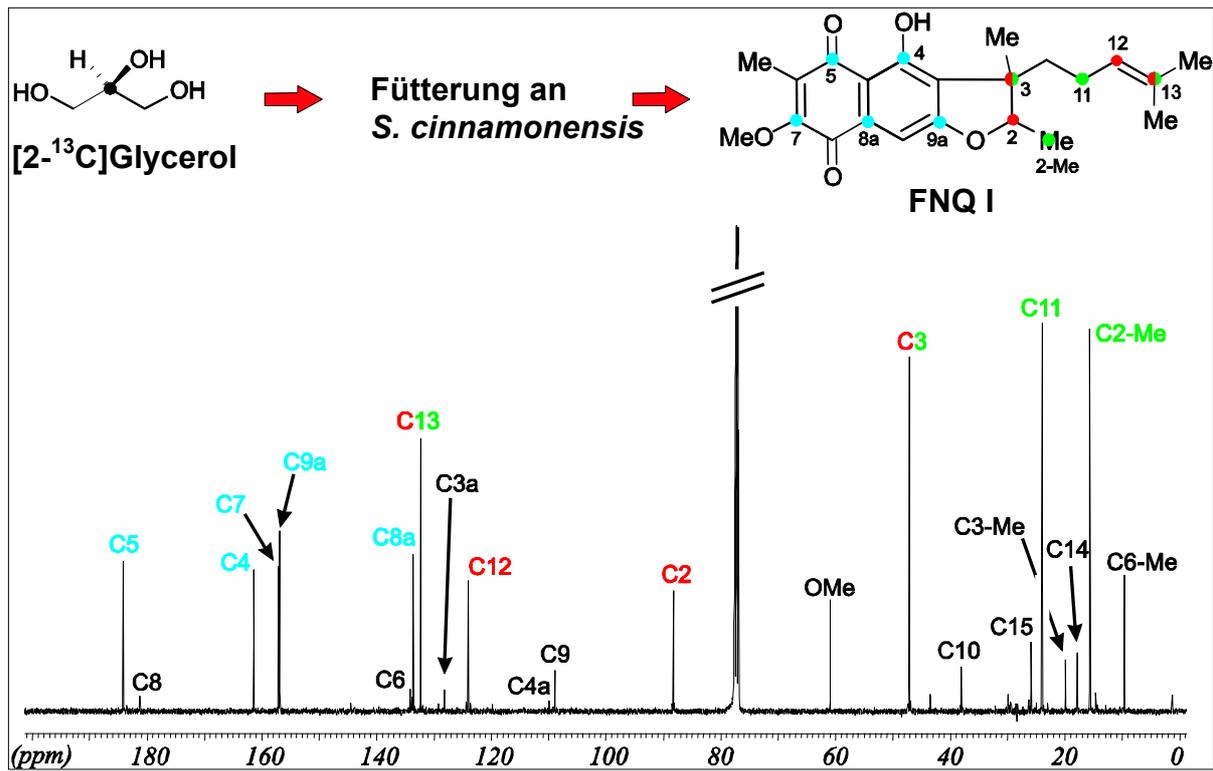


Abb. III.18 Markierung von FNQ I nach $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerolfütterung von *S. cinnamomensis*. ^{13}C markierte Positionen sind in grün (Mevalonatweg), blau (Polyketidstoffwechsel) und rot (MEP-Stoffwechsel) dargestellt.

IV Diskussion

1. Identifizierung eines Biosynthesegenclusters für Endophenazin A und Furanonaphthochinon I aus *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042

1.1 Gene der Phenazin-Biosynthese

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Klonierung, Sequenzierung und Analyse des Biosynthesegenclusters für Endophenazin A und das Auffinden eines putativen Prenyltransferasegens in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042.

Durch vergleichende Sequenzanalyse ist es gelungen, auf dem Insert von 3-6H sechs Orfs *ephzB*, *ephzC*, *ephzD*, *ephzE*, *ephzG* und *ephzA* zu identifizieren, die eine Sequenzähnlichkeit zu den entsprechenden orthologen Genen der Phenazin-Biosynthese aus *Pseudomonas fluorescens* 2-79 von 49-78% haben (Haagen *et al.*, 2006). Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Inaktivierungsexperiment konnte bestätigen, dass es sich bei den sechs genannten Orfs um für die Phenazin-Biosynthese essentielle Gene handelt. Genau wie in *P. fluorescens* sind die Gene alle in derselben Orientierung angeordnet und nur durch kleine intergenische Bereiche voneinander getrennt (max. 87 bp), was die Vermutung nahelegt, dass es sich um ein einziges Operon handelt. Diese Beobachtungen deuten auf eine enge evolutionäre Verwandtschaft zwischen den Biosynthesegenclustern in beiden Organismen hin (s. Abb. IV.2).

Offensichtliche Unterschiede im Vergleich zum Gencluster aus *P. fluorescens* sind die Position von *ephzA* und vor allem, dass ein orthologes Gen für *phzF* fehlt. PhzF wird eine Schlüsselrolle in der Biosynthese des Phenazingrundgerüsts zugeschrieben, indem es die Isomerisierung von 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure katalysiert. Jedoch konnte das instabile Zwischenprodukt nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden und für dieses Produkt sind zwei verschiedene Strukturen publiziert worden (Blankenfeldt *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2004). Inzwischen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von K. Flinspach (2007) das Insert eines weiteren Cosmids (8-4D) aus der Genbank von *S. cinnamomensis* komplett sequenziert und analysiert (s. Abb. IV.2). Auf diesem Genomabschnitt wurde ein orthologes Gen für *phzF* identifiziert und als *ephzF* bezeichnet (Flinspach, 2007). Wo sich dieser Genomabschnitt relativ zum Insert von Cosmid 3-6H befindet, ist jedoch unklar. In direkter Nachbarschaft zu *ephzF* befinden sich drei weitere Orfs *ephzA2*, *ephzG2* und *ephzC2*, die Sequenzähnlichkeit zu Genen der Phenazin-Biosynthese aus *P. fluorescens* haben (s. Abb. IV.2) (Flinspach, 2007). Zudem haben *EphzA2*, *EphzG2* und *EphzC2* im Durchschnitt weit über 90% Sequenzähnlichkeit zu den Genprodukten der in dieser Arbeit beschriebenen Gene *ephzA*, *ephzC* und *ephzG*.

Die Funktionen von PhzC, PhzE und PhzD in der Biosynthese von Phenazinen in *Pseudomonas* sind gut untersucht. Sie sind an der Bildung von 3-Desoxy-D-arabinoheptulosonsäure-7-phosphat (DAHP), 2-Amino-2-desoxy-isochorisminsäure (ADIC) und 2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHHA) beteiligt (McDonald *et al.*,

2001; Parsons *et al.*, 2003). Dagegen liegen keine experimentellen Daten für die Funktion von PhzA, PhzB und PhzG vor, weshalb ihre Rolle weitgehend unklar ist (Mavrodi *et al.*, 2006).

1.2 Zwei Prenyltransferasegene *fnq26* und *fnq28*

Endophenazin A und B sind an Position C-9 prenylierte Phenazin-1-carbonsäurederivate. Somit war zu erwarten, dass sich in der Nachbarschaft der Phenazin-Biosynthesegene ein putatives Prenyltransferasegen befinden würde. Mit *fnq26* und *fnq28* wurden gleich zwei putative Prenyltransferasegene gefunden, deren Genprodukte Sequenzähnlichkeit zu CloQ haben (s. Abb. IV.2) (Pojer *et al.*, 2003). Die hier beschriebenen Inaktivierungsversuche zeigten jedoch deutlich, dass weder Fmq26 noch Fmq28 in die Biosynthese von Endophenazin A involviert sind. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt von *fnq26* an der Biosynthese von FNQ I beteiligt ist (Haagen *et al.*, 2006). Ein putatives Phenazin-Prenyltransferasegen wurde etwa 13 kb upstream von *ephzF* auf dem erst vor kurzem sequenzierten Genomabschnitt von *S. cinnamonensis* gefunden (Flinspach, 2007). Die Vermutung liegt sehr nahe, dass es sich hierbei um das gesuchte Phenazin-Prenyltransferasegen handelt (s. Abb. IV.2).

Die Funktion von Fmq28 bleibt weiterhin unklar, da die Inaktivierungsexperimente keine sichtbare Veränderung in der Sekundärstoffproduktion zeigten. Es gibt mehrere Meroterpenoide, die doppelt prenyliert sind (Gomi *et al.*, 1987; Henkel and Zeeck, 1991; Shiomi *et al.*, 1986). Möglicherweise produziert auch *S. cinnamonensis* neben FNQ I in sehr geringer Menge ein solches doppelt prenyliertes Naphthochinon, für dessen Prenylierung Fmq28 verantwortlich ist. Ein Ausfall der Produktion hätte also nicht beobachtet werden können. Andererseits könnte Fmq28 seine Funktion im Laufe der Evolution auch verloren haben.

1.3 Das Methyltransferasegen *fnq27*

Zwischen *fnq26* und *fnq28* wurde das Gen *fnq27* identifiziert, dessen Genprodukt Sequenzähnlichkeit zu SAM-Methyltransferasen hat. Zunächst wurde vermutet, dass Fmq27 an der N-Methylierung des Phenazingrundgerüsts in der Biosynthese von Endophenazin B beteiligt ist. Durch Inaktivierungsexperimente konnte jedoch eine Beteiligung an der Biosynthese von Endophenazin B ausgeschlossen werden. Stattdessen wurde für Fmq27 die Beteiligung am Methyltransfer auf Position 6 von FNQ I nachgewiesen (s. Abb. IV.2) (Glück, 2006). In unmittelbarer Nähe der oben erwähnten erst kürzlich auf dem Insert von Cosmid 8-4D identifizierten Phenazin-Biosynthesegene *ephzF*, *ephzA2*, *ephzG2* und *ephzC2* wurde *ephzM* gefunden (Flinspach, 2007). EphzM zeigt große Sequenzähnlichkeit zu PhzM, eine Phenazin-spezifische Methyltransferase aus *P. aeruginosa* (Parsons *et al.*, 2007), weshalb sehr wahrscheinlich davon ausgegangen werden kann, dass EphzM für den Methyltransfer auf den Stickstoff des Phenazingerüsts in der Biosynthese von Endophenazin B verantwortlich ist (s. Abb. IV.2).

1.4 Gene der FNQ I-Biosynthese

Durch Sequenzvergleich mit Genen des Furaquinocin-Biosynthesegenclusters (Kawasaki *et al.*, 2006) konnten insgesamt 13 Orfs upstream der Phenazin-Biosynthesegene auf dem Insert von Cosmid 3-6H bzw. auf dem mit 3-6H überlappenden Insert von Cosmid 6-1D (Fay, 2005) dem FNQ I-Biosynthesegencluster zugeordnet werden (s. Abb. IV.2).

Durch Inaktivierungsexperimente wurde für das Genprodukt von *fnq26* eine Beteiligung an der Biosynthese von FNQ I nachgewiesen und die später nachgewiesene enzymatische Aktivität als Geranyltransferase (s. IV 2), deutet darauf hin, dass Fmq26 für den Geranyltransfer auf das Naphthochinongerüst verantwortlich ist (s. Abb. IV.2). Da Fmq26 sehr hohe Ähnlichkeit zu Fur7 hat, kann spekuliert werden, dass auch Fur7 eine solche Aufgabe in der Furaquinocin-Biosynthese übernimmt. Für Fmq27 konnte eindeutig bewiesen werden, dass dieses Enzym die C-Methylierung in der Biosynthese von FNQ I katalysiert (Glück, 2006), was darauf hindeutet, dass es sich auch bei dem ähnlichen Fur6 ebenfalls um ein solches Enzym handelt. Ebenso wurde die Funktion von Fmq9 als O-Methyltransferase durch ein Inaktivierungsexperiment nachgewiesen (Glück, 2006), insofern liegt nahe, dass es sich bei Fur4 auch um eine O-Methyltransferase handelt (s. Abb. IV.2).

Die Funktion von Fmq20 bzw. Fur16 bleibt unklar.

Fmq23 bzw. Fur19 haben Ähnlichkeit zu Polyprenyldiphosphatsynthetasen und sind eventuell an der Synthese von Geranyldiphosphat (GPP) beteiligt. Für Fmq21 bzw. Fur17 wurde eine Beteiligung an der Zyklisierung der Geranylseitenkette diskutiert (Haagen *et al.*, 2006), da es Ähnlichkeit zu einem Enzym hat, das die Bildung eines fünf-gliedrigen Lactonrings katalysiert (Yang *et al.*, 2004). Fmq22 bzw. Fur18 zeigen Ähnlichkeit zu OvmZ aus der Oviedomycin-Biosynthese (Lombo *et al.*, 2004). Oviedomycin ist ebenfalls ein Sekundärmetabolit aus dem Polyketidstoffwechsel. Über die Funktion dieser beiden Proteine kann derzeit nur spekuliert werden.

Die Genprodukte von *fnq6* auf dem Insert von Cosmid 6-1D (Fay, 2005) bzw. des orthologen Gens *fur1* zeigen große Ähnlichkeit mit RppA aus *S. griseus* (Funa *et al.*, 1999; Funa *et al.*, 2002) und *S. antibioticus* IFO 13271 (Funa *et al.*, 2005) sowie mit einem ähnlichen Protein aus *S. coelicolor* (Austin *et al.*, 2004; Izumikawa *et al.*, 2003). RppA ist eine Typ-III-Polyketidsynthase, die die Bildung von Tetrahydroxynaphthalin (THN) katalysiert. Somit sind Fmq6 bzw. Fur1 höchstwahrscheinlich für die Biosynthese des Polyketidrings verantwortlich. Fmq7 bzw. Fur2 haben Ähnlichkeit zu MomA, einer Monooxygenase aus *S. antibioticus* IFO 13271, welche die Oxidation von THN zu Flaviolin katalysiert (Funa *et al.*, 2005). Fmq4 bzw. Fur22 zeigen eine große Ähnlichkeit zu Regulatoren der SARP-Familie (Culebras *et al.*, 1999), was darauf hindeutet, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um Regulatoren der Biosynthese der Sekundärmetabolite handelt.

Die Funktionen von Fmq8 bzw. Fur3 haben Ähnlichkeit zu einer Aminotransferase aus *Acidothermus cellulolyticus* 11B. Da weder FNQ I noch Furaquinocin eine Aminogruppe in ihrer Struktur tragen, ist die Funktion dieses Proteins vollkommen unklar. Fmq11 bzw. Fur5 zeigen Ähnlichkeit zu einer Fettsäure-CoA-Ligase. Da

jedoch Funa *et al.* (1999) zeigen konnten, dass die THN-Synthase RppA Malonyl-CoA als Startermolekül verwendet, ist die Bedeutung dieses Gens im FNQ I-Biosynthesegencluster unklar.

1.5 Ein putatives Mevalonatkinasegen *fnq19*

In der Sequenz des Inserts von Cosmid 3-6H wurde *fnq19* identifiziert, das Sequenzähnlichkeit zum Mevalonatkinasegen *MK* aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster hat. *MK* ist eines von sechs Genen, die gemeinsam für die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat ausgehend von Acetoacetyl-CoA über den Mevalonatweg verantwortlich sind (Kawasaki *et al.*, 2006). Diese sechs Gene wurden in genau der gleichen Anordnung auch in den Biosynthesegenclustern anderer Isoprenoide aus Streptomycceten gefunden (Hamano *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2000). In der Gesamtsequenz der Inserts der Cosmide 3-6H und 6-1D konnten keine weiteren putativen Mevalonat-Biosynthesegene gefunden werden. Diese Tatsache stellte die Frage nach dem biosynthetischen Ursprung der Isopreneinheiten von FNQ I und Endophenazin A bzw. welche Bedeutung dieses einzelne Mevalonatkinasegen hat.

Vor Kurzem wurden auf dem Insert von Cosmid 8-4D etwa 12 kb upstream der erwähnten Gene *ephzF*, *ephzA2*, *ephzG2*, *ephzC2* und *ephzM* in direkter Nachbarschaft des putativen Phenazin-Prenyltransferasegens alle sechs erforderlichen Gene des Mevalonatstoffwechsels identifiziert (Flinspach, 2007). Neben einem weiteren putativen Mevalonatkinasegen wurden fünf Orfs gefunden, die für eine HMG-CoA-Synthase, eine HMG-CoA-Reduktase, eine Phosphomevalonatkinase, eine Mevalonatliphosphatdecarboxylase und eine Typ-II-PP-Isomerase kodieren und gemeinsam die Synthese von IPP bzw. DMAPP steuern könnten (s. Abb. IV.2).

1.6 Ein putatives SAM-Biosynthesegencluster

Die fünf Orfs im Überlappungsbereich der beiden Cosmidinserts von 3-6H und 6-1D von *fnq12* bis einschließlich *fnq16* könnten ein vollständiges Biosynthesegencluster für S-Adenosylmethionin (SAM) darstellen. SAM wird im Primärstoffwechsel durch den in Abb. IV.2 abgebildeten Zyklus bereitgestellt und für den enzymatisch katalysierten Methyltransfer benötigt (Stryer, 1995). Da es sich bei *Fnq9* und *Fnq27* um SAM-abhängige Methyltransferasen handelt (Glück, 2006), ist es durchaus plausibel, dass sich ein solches Gencluster in der Nähe dieser Gene befindet. *fnq12* und *fnq13* sind auf dem Insert von Cosmid 6-1D (Fay, 2005), *fnq14*, *fnq15* und *fnq16* auf dem Insert von Cosmid 3-6H lokalisiert. *Fnq12* zeigt Sequenzähnlichkeit zu einer SAM-Synthase, die unter Verwendung von ATP SAM bereitstellt. *Fnq13* hat Ähnlichkeit zu einer Adenosinkinase, die für die Verwertung von Adenosin benötigt wird. *Fnq14* zeigt Sequenzähnlichkeit zu einer Methioninsynthase, die Homocystein unter Verwendung von N5-Methyltetrahydrofolat als Cofaktor methyliert. N5-Methyltetrahydrofolat wird von einer N5,N10-Methyltetrahydrofolatreduktase

bereitgestellt, zu der Fhq15 Sequenzähnlichkeit zeigt. Fhq16 hat schließlich Ähnlichkeit zu einer S-Adenosylhomocysteinase, die S-Adenosylhomocystein (SAH) zu Adenosin und Homocystein spaltet.

Dies ist bislang das einzige Beispiel für ein SAM-Gencluster, das einen Teil eines Biosynthesegencluster für einen Sekundärstoff darstellt.

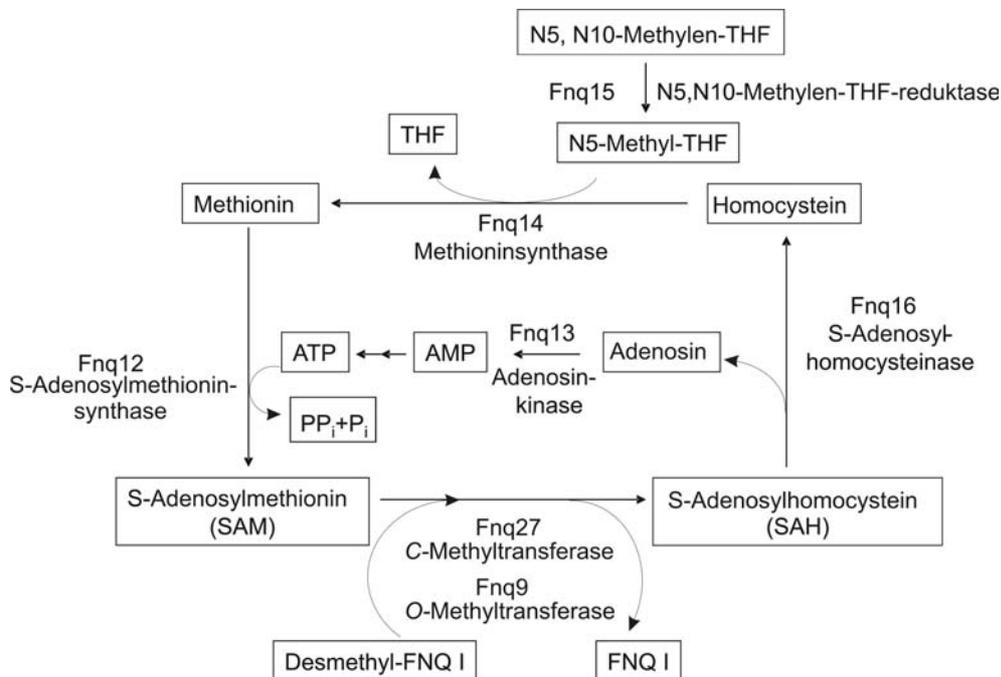


Abb. IV.1 Bereitstellung von S-Adenosylmethionin (SAM). Die Gene für Fhq12 und Fhq13 sind auf dem Insert von Cosmid 6-1D lokalisiert (Fay, 2005; Haagen et al., 2006). (THF=Tetrahydrofolat)

1.7 Schlussfolgerungen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gefundenen putativen Phenazin-Biosynthesegene *ephzB*, *ephzC*, *ephzD*, *ephzE*, *ephzG* und *ephzA* essentiell für die Endophenazin A-Biosynthese sind. Neben dem auf dem Insert von Cosmid 3-6H gefundenen 6 kb großen Phenazin-Biosynthesegencluster *ephzBCDEGA* konnte im Rahmen einer Diplomarbeit ein zweiter Genort gefunden werden, auf dem putative Phenazin-Biosynthesegene lokalisiert sind (Flinspach, 2007). Insgesamt betrachtet sind somit im Genom von *S. cinnamonensis* alle Orfs vorhanden, die als essentiell für die Biosynthese des Phenazingrundgerüsts gelten und auch in den Phenazin-Biosynthesegenclustern verschiedener anderer Organismen anwesend sind (Mavrodi et al., 2006). Von daher deuten die vorliegenden Ergebnisse nicht darauf hin, dass sich die Biosyntheseschritte der Phenazine in *Streptomyces* wesentlich von denen in *Pseudomonas* unterscheiden.

Unklar jedoch ist, wie weit die beiden Genorte voneinander entfernt sind und welche der doppelt vorkommenden Gene eine Rolle in der Biosynthese von Endophenazin A spielen. Die Tatsache, dass es zwei Abschnitte im Genom von *S. cinnamonensis* gibt, auf denen Phenazin-Biosynthesegene lokalisiert sind, könnte damit erklärt werden, dass es ursprünglich ein einzelnes Gencluster war, das dann im Laufe der

Evolution zumindest zum Teil dupliziert wurde. Diese Annahme würde auch erklären, dass die jeweils doppelt vorkommenden Orfs (*ephzA* bzw. *ephzA2*, *ephzC* bzw. *ephzC2* und *ephzG* bzw. *ephzG2*) sehr ähnlich zu einander sind (>90% Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene). Etwas unwahrscheinlicher ist hingegen die Möglichkeit, dass zwei Gencluster unabhängig von einander an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert wurden. Im vollständig sequenzierten Genom von *P. aeruginosa* PA01 wurden ebenfalls zwei Bereiche gefunden, auf denen Phenazin-Biosynthesegene lokalisiert sind, die etwa 2,7 Mb voneinander entfernt liegen (Stover *et al.*, 2000).

Durch vergleichende Sequenzanalyse mit dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster (Kawasaki *et al.*, 2006) konnte ein Bereich von knapp 50 kb upstream des *ephzBCDGA*-Operons der Biosynthese von FNQ I zugeordnet werden.

Es wurde gezeigt, dass das gefundene putative Prenyltransferasegen *fnq26* essentiell für die FNQ I-Biosynthese ist. Außerdem konnte im Rahmen der Diplomarbeit von K. Glück (2006) durch Inaktivierungsexperimente bewiesen werden, dass *fnq9* und *fnq27* für die Methylierungsschritte in der Biosynthese von FNQ I verantwortlich sind. So kann man schließlich davon ausgehen, dass sich das FNQ I-Biosynthesegencluster von *fnq1* bis *fnq28* über einen Bereich von 49 kb erstreckt.

Die enge strukturelle Verwandtschaft von FNQ I und Furaquinocin spiegelt sich auch auf genetischer Ebene in ihren Biosynthesegenclustern wider. In beiden Genclustern befinden sich Gene, die vermutlich für die Enzyme der Biosynthese des Polyketidgerüsts kodieren, sowie mehrere Gene, deren Genprodukte modifizierende Reaktionen in der Biosynthese katalysieren (s. Abb. IV.2). Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Biosynthesegenclustern ist das Fehlen eines kompletten Satzes an Mevalonatgenen in direkter Nachbarschaft der Biosynthesegene von FNQ I (s. Abb. IV.2). Ein weiterer deutlicher Unterschied im Vergleich zum Furaquinocin-Biosynthesegencluster sind die teilweise großen intergenischen Bereiche (bis zu 2,3 kb) im FNQ I-Biosynthesegencluster. Desweiteren wurde kein orthologes Gen für *fnq5* aus dem FNQ I-Biosynthesegencluster im Furaquinocin-Biosynthesegencluster gefunden, für dessen Genprodukt eine Beteiligung an der Zyklisierung bzw. Aromatisierung von THN diskutiert wurde (Haagen *et al.*, 2006). Für *fur20*, ein putatives *cis*-Isoprenyldiphosphatsynthasegen aus dem Furaquinocin-Biosynthesegencluster, wurde dafür kein orthologes Gen im FNQ I-Biosynthesegencluster gefunden.

Der Vergleich der beiden Biosynthesegencluster erlaubt Rückschlüsse auf die Biosynthese von anderen Meroterpenoiden wie Naphterpin (Shin-ya *et al.*, 1990), Napyradiomycin (Shiomi *et al.*, 1986), Marinon (Pathirana *et al.*, 1992), Neomarinon (Hardt *et al.*, 2000; Kalaitzis *et al.*, 2003) oder auch Naphthomevalin (Henkel and Zeeck, 1991). Es ist zu vermuten, dass auch in diesen Organismen orthologe Gene zu den beschriebenen Biosynthesegenen für FNQ I bzw. Furaquinocin vorhanden sind.

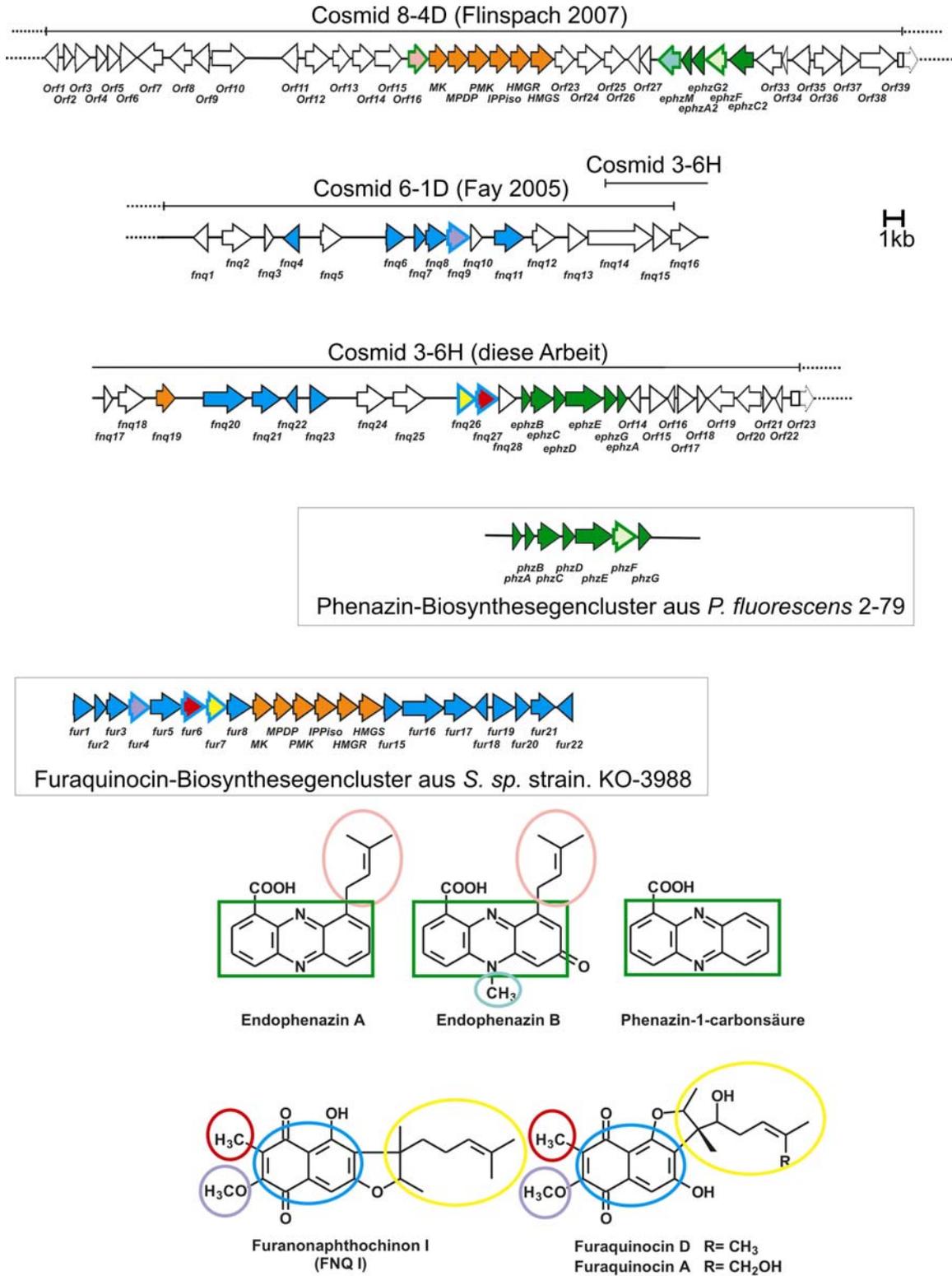


Abb. IV.2 Biosynthesegene und Strukturen der Sekundärmetabolite aus *S. cinnamomensis* DSM 1042 (Endophenazin A, Endophenazin B und FNQ I), *Streptomyces* sp. strain KO-3988 (Furaquinocin A) und *P. fluorescens* 2-79 (Phenazin-1-carbonsäure). In den entsprechenden Genclustern vorkommende Phenazin-Biosynthesegene sind grün dargestellt. Die orthologen Gene aus *S. cinnamomensis* und *Streptomyces* sp. strain KO-3988 bzw. der FNQ I-Biosynthese zugeordneten Gene sind blau dargestellt. Die Mevalonatgene sind orange ausgefüllt. Die den Genen entsprechenden Struktureinheiten sind in den entsprechenden Farben umrahmt.

2. Die Prenyltransferase Fnq26

Erst vor wenigen Jahren spekulierten Pojer *et al.*, dass es sich bei CloQ aus der Clorobiocin-Biosynthese um den ersten Vertreter einer neuen Klasse von Prenyltransferasen handeln könnte (Pojer *et al.*, 2003). CloQ zeigt keinerlei Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen und hat ungewöhnliche biochemische Eigenschaften.

Diese Annahme wurde etwas später durch die Untersuchungen von Orf2 bestätigt. Orf2 ist eine Prenyltransferase aus der Biosynthese von Naphterpin. Strukturbiologische Untersuchungen zeigten, dass dieses Enzym eine neuartige Proteinstruktur aufweist, die als „Prenyltransferase-Barrel“ bezeichnet wurde (Kuzuyama *et al.*, 2005).

Inaktivierungsversuche konnten bestätigen, dass es sich bei Fnq26 um ein Enzym handelt, das an der Biosynthese von Furanonaphthochinon I (FNQ I) beteiligt ist (Haagen *et al.*, 2006). In dieser Arbeit werden die Expression und biochemische Charakterisierung der Enzymeigenschaften von Fnq26 sowie die Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte beschrieben.

Durch Sequenzvergleich mit CloQ und Orf2 wurde spekuliert, dass es sich bei Fnq26 ebenfalls um eine Prenyltransferase dieser neuen Enzymklasse handeln könnte. Ähnlich wie Orf2 katalysiert Fnq26 C- und O-Geranylierungen verschiedener aromatischer Substrate. Zudem ist jedoch Fnq26 als bisher einziger Vertreter dieser Klasse in der Lage, die Geranylgruppe über C-3 des Prenyldiphosphates mit dem Substrat zu verknüpfen (Haagen *et al.*, 2007). Nur zwei andere Enzyme wurden beschrieben, die solche sog. „reversen“ Prenylierungen katalysieren, FgaPT1 und LtxC (Edwards and Gerwick, 2004; Unsöld and Li, 2006). Diese beiden Enzyme zeigten keinerlei Sequenzähnlichkeit zu Fnq26. In der Vergangenheit wurde spekuliert, dass solche „reversen“ Prenylierungen über eine reguläre Prenylierung eines Heteroatoms und einer anschließenden Claisen-ähnlichen-Umlagerung ablaufen, jedoch deuten die verfügbaren chemischen und biochemischen Daten eher auf einen direkten nucleophilen Angriff eines aromatischen Kohlenstoffs auf C-3 des Prenyldiphosphates hin (Unsöld and Li, 2006; Williams *et al.*, 2000). Einen zusätzlichen Hinweis in diese Richtung lieferte die Beobachtung, dass die Prenylierung von Flaviolin ausschließlich an C-3 stattfindet und keines der beiden Sauerstoffatome an den benachbarten Positionen C-2 und C-4 prenyliert wird.

Mit 1,3-Dihydroxynaphthalin (1,3-DHN) und 4-Hydroxybenzoat (4-HBA) als Substrate wurden ausschließlich reguläre O-Prenylierungen beobachtet, eine reverse C-Prenylierung konnte mit keinem der beiden Substrate nachgewiesen werden.

Die Prenylierung während der Biosynthese von FNQ I und dem strukturell sehr ähnlichen Furaquinocin (Kawasaki *et al.*, 2006) wird an Position C-6 von Flaviolin erwartet. Die von Fnq26 katalysierte Prenylierungsreaktion fand jedoch *in vitro* ausschließlich an Position C-3 statt. Durch die Struktur einer vinylogenen Carbonsäure ist jedoch die Position C-3 von Flaviolin stark aktiviert, was einen Angriff des Prenyldiphosphates an dieser Position erklären würde. Dies könnte darauf hindeuten, dass Flaviolin nicht das genuine Substrat von Fnq26 in der FNQ I-

Biosynthese ist. Eventuell ist ein früheres Intermediat aus der Biosynthese von Flaviolin (Funa *et al.*, 2005) das tatsächliche Substrat. Es ist ebenso möglich, dass ein späteres Zwischenprodukt das genuine Substrat ist, das schon an C-3 methyliert ist und/oder an Position 2 eine Methoxygruppe trägt, was die Struktur der vinylogenen Carbonsäure aufheben würde. Das Fütterungsexperiment mit [$^{13}\text{C}_2$]Acetat hat gezeigt, dass in der Biosynthese von FNQ I ein symmetrisches Zwischenprodukt entstehen muss, weshalb frühestens 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN) als Substrat für die Prenylierungsreaktion in Frage kommt (Bringmann *et al.*, 2007). Genauso ist der Mechanismus der Prenylierung in der Biosynthese von Naphterpin und dem verwandten Marinon (Pathirana *et al.*, 1992) bisher unklar. Diese Substanzen sind an Positionen prenyliert, die eigentlich durch Hydroxygruppen aus der THN-Biosynthese besetzt sein müssten.

Alle *trans*-Prenyltransferasen und die schon genannten membrangebundenen Prenyltransferasen mit aromatischen Substraten (Collakova and DellaPenna, 2001; Melzer and Heide, 1994; Schledz *et al.*, 2001; Suvarna *et al.*, 1998; Yazaki *et al.*, 2002) zeigen das typische (D/N)DXXD-Motiv, welches an der Prenyldiphosphat-Bindung und Mg^{2+} -Komplexierung beteiligt ist. Die enzymatische Aktivität dieser Enzyme ist von der Anwesenheit von Mg^{2+} - oder ähnlichen zweiwertigen Kationen abhängig. Die Prenyltransferasen der neuen CloQ/Orf2-Klasse haben kein (N/D)DXXD-Motiv, jedoch ist die enzymatische Aktivität von Orf2 von der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen abhängig (Kuzuyama *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu benötigt Fmq26 keine Mg^{2+} -Ionen für seine enzymatische Aktivität (Haagen *et al.*, 2007), wie es auch schon für CloQ (Pojer *et al.*, 2003) und HypSc (Kuzuyama *et al.*, 2005) berichtet wurde. Ähnlich verhalten sich auch die pilzlichen aromatischen Prenyltransferasen FgaPT1 und FgaPT2 aus der Fumigaclavin-Biosynthese (Unsöld and Li, 2005; Unsöld and Li, 2006), DMATS aus der Biosynthese der Ergotalkaloide (Gebler and Poulter, 1992), FtmPT1 aus der Tryprostatin B Biosynthese (Grundmann and Li, 2005) und CdpNPT, eine aromatische *N*-Prenyltransferase (Yin *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass gereinigtes CloQ-Protein keine Mg^{2+} - oder andere Metallionen enthält (Keller *et al.*, 2006; Pojer *et al.*, 2003). Aufgrund von Modellversuchen von CloQ wurde von Kuzuyama *et al.* (2005) diskutiert, dass ein positiv geladener Lysinrest eventuell als Ersatz für Mg^{2+} bei der Bindung des α -Phosphates des Prenyldonors fungiert (Kuzuyama *et al.*, 2005). Fmq26 enthält an der entsprechenden Stelle die basische Aminosäure Arginin (s. Abb. IV.3).

Mg^{2+} -Ionen beschleunigen die nicht-enzymatische hydrolytische Spaltung von Prenyldiphosphaten (Brems and Rilling, 1977). Die Mg^{2+} -Unabhängigkeit von löslichen Enzymen kann daher als Vorteil gegenüber membrangebundenen, magnesiumabhängigen Enzymen betrachtet werden (Wessjohann and Sontag, 1996). Die Entdeckung der neuen Enzymklasse könnte für die Arzneistoffentwicklung von Bedeutung sein, da diese löslichen, magnesiumunabhängigen Biokatalysatoren für die Erstellung von Substanzbibliotheken prenylierter aromatischer Substanzen bzw. für die chemoenzymatische Herstellung schon bekannter Arzneistoffe verwendet werden könnten (Botta *et al.*, 2005a; Koehl, 2005).

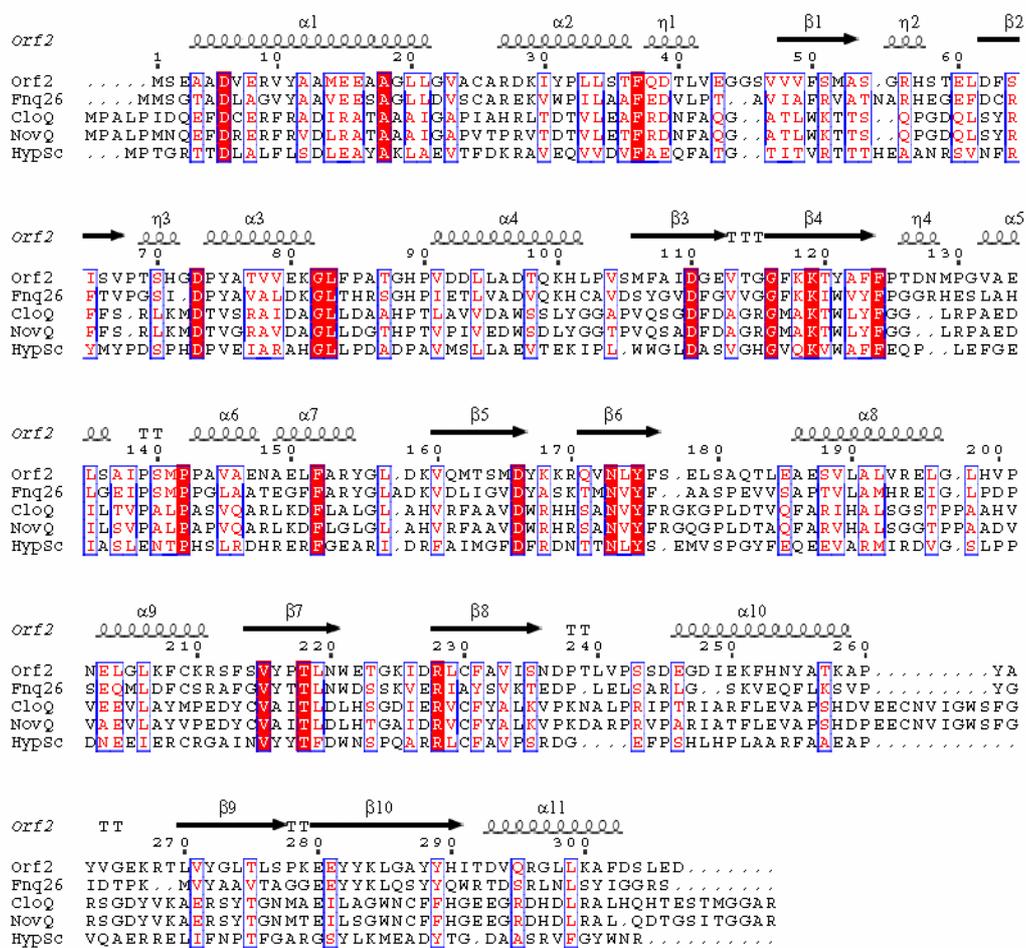


Abb. IV.3 Alignment von Fmq26 (CAL34101), CloQ (AAN65239), NovQ (AAF67510) and HypSc (AL939130) mit Orf2 (AB187169). Das Alignment wurde mit Hilfe von ESPript (<http://prodes.toulouse.inra.fr/ESPript>) unter Verwendung der Sekundärstruktur von Orf2 gemacht (RCSB protein data base 1ZWC). Fmq26, CloQ, NovQ und HypSc haben an der entsprechenden Stelle von Serin (Aminosäure 51) positiv geladene Aminosäuren. Weiß auf rot: konservierte Aminosäuren, blauer Rahmen: ähnliche Aminosäuren.

3. Untersuchung des biosynthetischen Ursprungs der Isopreneinheiten in Furanonaphthochinon I und Endophenazin A

Streptomyces cinnamonensis DSM 1042 produziert das geranylierte Naphthochinon FNQ I und prenylierte Phenazine, hauptsächlich Endophenazin A. Auf dem Insert von Cosmid 3-6H wurde *fnq19* identifiziert, dessen Genprodukt Sequenzähnlichkeit zu Mevalonatkinasen zeigte (Haagen *et al.*, 2006). In allen bisher bekannten Biosynthesegenclustern für Sekundärstoffe, die Gene des Mevalonatstoffwechsels enthalten, sind sechs Gene in einem einzigen ca. 6,8 kb großen Operon identifiziert worden, die die Synthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) bzw. Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) steuern (Hamano *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2000). Auf dem insgesamt 81 kb großen

sequenzierten Bereich des Genoms von *S. cinnamomensis* wurde außer *fnq19* keines der anderen fünf Mevalonatstoffwechselfgene gefunden. Daher lag die Vermutung nahe, dass in *S. cinnamomensis* ursprünglich zwar alle Gene des Mevalonatstoffwechsels vorhanden waren, dann jedoch fünf Gene im Laufe der Evolution verloren gegangen sind und seither IPP bzw. DMAPP für die Biosynthese von FNQ I und Endophenazin A über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) bereitgestellt werden, den Streptomyceten für die Biosynthese von isoprenoiden Metaboliten des Primärstoffwechsels benutzen (Kuzuyama and Seto, 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen [$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterungsexperimente zeigen jedoch sehr deutlich, dass die Isoprenoideinheiten von FNQ I und Endophenazin A hauptsächlich aus dem Mevalonatstoffwechsel stammen (Bringmann *et al.*, 2007). Durch das zusätzlich durchgeführte Fütterungsexperiment mit [2- ^{13}C]Glycerol konnte ein zusätzlicher Beitrag des MEP-Stoffwechsels zur Biosynthese der Geranyleinheit von FNQ I gezeigt werden. Aus den Anreicherungsdaten der [^{13}C]-Isotope an den entsprechenden Positionen konnte abgeschätzt werden, dass die Geranylseitenkette von FNQ I zu ca. 20% aus dem MEP- und zu ca. 80% aus dem Mevalonatstoffwechsel stammt (Bringmann *et al.*, 2007). Es ist jedoch denkbar, dass dieses Ergebnis durch einen möglichen Einfluß durch die Zufütterung von [^{13}C]markierten Substanzen verfälscht ist. Wie hoch der Beitrag des MEP-Weges zur Biosynthese der Prenyleinheit von Endophenazin A ist, konnte wegen zu geringer Substanzmenge nicht bestimmt werden.

Für einige Meroterpenoide wie Naphterpin, Furaquinocin, Napyradiomycin und Terpentecin wurde in den 80er Jahren durch Fütterungsstudien mit [^{13}C]markiertem Acetat gezeigt, dass ihre Isoprenoideinheiten über den Mevalonatweg gebildet werden (Funayama *et al.*, 1990; Isshiki *et al.*, 1986; Shin-Ya *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1987). Seto *et al.* konnten jedoch 1996 durch Fütterungsexperimente mit [U- ^{13}C]Glucose zeigen, dass die Isopreneinheit von Naphterpin zwar hauptsächlich aus dem Mevalonatstoffwechsel stammt, jedoch zu einem geringen Anteil auch über den MEP-Weg bereitgestellt wird (Seto *et al.*, 1996). Ebenso ergaben diese Fütterungsversuche, dass die Isopreneinheit des Primärstoffwechselproduktes Menachinon hauptsächlich über den MEP-Weg gebildet wird, jedoch konnte auch ein kleiner Beitrag des Mevalonatstoffwechsels gezeigt werden. Weitere Fütterungen mit [^{13}C]markiertem Acetat und [1- ^{13}C]Glucose haben außerdem gezeigt, dass die Isopreneinheit des Sekundärmetabolits BE-40644 aus *Actinoplanes* sp. A40644 ebenso größtenteils aus dem Mevalonat- jedoch zu einem geringen Anteil auch aus dem MEP-Stoffwechsel stammt (Seto *et al.*, 1998). Seto *et al.* (1998) spekulierten deshalb, dass der MEP-Weg zu einem frühen Zeitpunkt in der Wachstumsphase für die Synthese von IPP für den Einbau in Primärstoffe benutzt wird und dann zu einem späteren Zeitpunkt für die Produktion von Sekundärmetaboliten durch den Mevalonatweg abgelöst wird. Aus den hier beschriebenen Ergebnissen für *S. cinnamomensis* lässt sich nicht schließen, ob es sich um eine Übergangsperiode handelt, in der IPP aus beiden Stoffwechseln gleichzeitig für die Biosynthese von FNQ I verwendet wird, oder ob der MEP-Weg ständig zu einem kleinen Teil aktiv ist.

Ein ähnliches Phänomen wurde in Pflanzen beobachtet, wo Mevalonat- und MEP-Stoffwechsel in unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufen. Auch hier wurde ein gleichzeitiger Beitrag der beiden Stoffwechselwege für bestimmte Metabolite wie z.B. Gibbereline beschrieben (Bartram *et al.*, 2006; Hampel *et al.*, 2005; Jux *et al.*, 2001; Kasahara *et al.*, 2002).

Die beiden hier beschriebenen Fütterungsexperimente haben deutlich gezeigt, dass die Isoprenoideinheiten von FNQ I und Endophenazin A zum größten Teil aus dem Mevalonatstoffwechsel stammen. Dieses Ergebnis war insofern sehr überraschend, da die fünf anderen benötigten Mevalonatgene fehlten und eine einzelne Mevalonatkinase nicht allein für die Synthese von IPP bzw. DMAPP verantwortlich sein kann. Das bedeutete, dass sich die fehlenden Gene an einer anderen Stelle im Genom befinden müssen. Die Tatsache, dass sich die Mevalonatgene nicht in direkter Nähe zu dem Biosynthesegencluster für die Sekundärstoffe befinden, deren Isoprenoideinheiten sich erwiesenermaßen aus dem Mevalonatweg ableiten, ist an sich ungewöhnlich und bisher für Streptomyceten noch nicht beschrieben worden. Kuzuyama *et al.* (2002) haben spekuliert, dass für das gezielte Screening nach Biosynthesegenclustern für isoprenoide Sekundärmetabolite in *Streptomyces* die hochkonservierten Bereiche der HMG-CoA-Reduktase als Sonde geeignet sein könnten. Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass dieses Verfahren nicht uneingeschränkt erfolgreich sein muss, selbst wenn bekannt ist, dass die isoprenoiden Teile aus dem Mevalonatstoffwechsel stammen, da sich die Mevalonatgene nicht zwingend in der Nachbarschaft der Biosynthesegene des Sekundärmetaboliten befinden müssen.

Wie oben schon erwähnt wurde, ist in der Zwischenzeit ein Mevalonat-Biosynthesegencluster in *S. cinnamonensis* identifiziert worden (Flinspach, 2007). Es befindet sich etwa 12 kb upstream einiger putativer Phenazin-Biosynthesegene auf dem erst vor kurzem sequenzierten Genomabschnitt von *S. cinnamonensis*. Allerdings ist unbekannt, wo und in welchem räumlichen Verhältnis zum Biosynthesegencluster für FNQ I bzw. Endophenazin A sich dieser Abschnitt im Genom von *S. cinnamonensis* befindet.

Die [¹³C₂]Acetatfütterung zeigte zudem, dass die DMAPP-IPP-Isomerase nicht strikt stereoselektiv arbeitet (Bringmann *et al.*, 2007). Diese Beobachtung wurde auch bei früheren Fütterungsexperimenten in Pflanzen (Arigoni *et al.*, 1997) gemacht. Für die Typ-II-DMAPP-IPP-Isomerasen aus Streptomyceten ist noch nicht untersucht worden, ob diese Enzyme stereoselektiv arbeiten (Kaneda *et al.*, 2001).

Die Fütterung mit [¹³C₂]Acetat zeigte desweiteren, dass in der Biosynthese von FNQ I ein symmetrisches Zwischenprodukt entsteht. Sehr wahrscheinlich handelt es sich hierbei um THN, das vermutlich das Produkt der Kondensation von fünf Molekülen Malonyl-CoA unter enzymatischer Katalyse der putativen THN-Synthase Fmq6 ist (Fay, 2005). Die Entstehung eines symmetrischen Zwischenproduktes THN wurde schon in früheren Untersuchungen mit Naphthochinonen diskutiert (Funayama *et al.*, 1990; Shin-Ya *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1987). Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, dass die Prenylierung in der Biosynthese von FNQ I zu einem

früheren Zeitpunkt stattfindet und zeigt, dass frühestens THN als Substrat für die Prenylierungsreaktion in Frage kommt.

Prenyltransferasen katalysieren in der Regel die Knüpfung einer Bindung zwischen C-1 des Prenyldiphosphates (z.B. DMAPP oder GPP) und dem Kohlenstoff, Sauerstoff oder Stickstoff des Substrates. Die Struktur von FNQ I lässt jedoch vermuten, dass die Verknüpfung zwischen C-3 des Geranyldiphosphates (GPP) und dem Naphthochinongerüst stattfindet. Für einige isoprenoide Strukturen, wie z.B. Pentalenolacton oder Diterpene des Verrucosan-Typs, wurden strukturelle Umlagerungen der isoprenoiden Einheit berichtet (Cane *et al.*, 1981; Eisenreich *et al.*, 2004). Die Ergebnisse der hier beschriebenen Fütterungsexperimente zeigen, dass keine dieser intramolekularen Umlagerungen der Geranylseitenkette in der Biosynthese von FNQ I stattfinden. Sie deuten vielmehr daraufhin, dass der Geranylrest tatsächlich über C-3 des GPP mit C-3 von THN verknüpft wird. Untermuert wird diese Annahme durch die Beobachtung der reversen C-Prenylierung von Flaviolin an Position C-3 durch das gereinigte Enzym Fnq26 (Haagen *et al.*, 2007).

V Zusammenfassung

Streptomyces cinnamonensis DSM 1042 produziert zwei Arten von prenylierten Sekundärstoffen: Furanonaphthochinon I (FNQ I) und prenylierte Phenazine, insbesondere Endophenazin A. FNQ I ist ein acetogenes Naphthochinon aus dem Polyketidstoffwechsel, das einen zyklisierten Geranylrest trägt. Endophenazin A ist ein Phenazin-1-carbonsäurederivat, das an Position 9 einen Dimethylallylrest trägt. Zu Beginn dieser Arbeit waren einige Phenazin-Biosynthesegencluster aus verschiedenen Organismen, vor allem aus *Pseudomonas*-Stämmen bekannt, jedoch keines für prenylierte Phenazine und noch keines aus *Streptomyces* oder anderen Actinomyceten. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit nach dem Biosynthesegencluster für Endophenazin A in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 gesucht werden.

Es wurde eine Cosmidbank von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 erstellt und anschließend mit *esmA*, einer heterologen Sonde aus dem Esmeraldin-Biosynthesegencluster von *Streptomyces antibioticus* Tü2706, ein Screening für Cosmide durchgeführt, die Phenazin-Biosynthesegene enthalten. Zwei identische Cosmide wurden gefunden und das Insert des Cosmids 3-6H komplett sequenziert. Vergleichende Sequenzanalyse des 42187 bp großen DNA-Abschnittes ergab 31 offene Leserahmen (Orfs), darunter sechs putative Phenazin-Biosynthesegene, zwei putative Prenyltransferasegene und ein putatives Methyltransferasegen. Außerdem konnten einige Orfs mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Genen aus dem Biosynthesegencluster des prenylierten Naphthochinonderivates Furaquinocin gefunden werden, unter anderem ein putatives Mevalonatkinasegen. Zudem fanden sich am Randbereich des Inserts einige Gene, die hohe Ähnlichkeit zu Biosynthesegenen von S-Adenosylmethionin aufwiesen. Durch Inaktivierung der beiden putativen Prenyltransferasegene *fnq26* und *fnq28* gelang der Nachweis, dass *Fnq26* in die Biosynthese von FNQ I involviert ist, wohingegen die Funktion von *fnq28* nicht geklärt werden konnte. Durch Deletion aller neun Gene von *fnq26* bis einschließlich *ephzA* konnte gezeigt werden, dass dieser Genabschnitt, einschließlich der sechs putativen Phenazin-Biosynthesegene, an der Biosynthese von Phenazin-1-carbonsäure und Endophenazin A beteiligt ist.

Fnq26 wurde daraufhin in *E. coli* heterolog als His₈-Tag Protein überexprimiert und mit Hilfe der NTA-Nickelaffinitätschromatographie zur Homogenität gereinigt. Der Nachweis der Prenyltransferaseaktivität gelang mit verschiedenen aromatischen Substraten. *Fnq26* katalysiert die Geranylierung von Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin und 4-Hydroxybenzoat. Die enzymatischen Produkte wurden über präparative HPLC isoliert und deren Strukturen mittels spektroskopischer Methoden (MS und NMR) aufgeklärt. *Fnq26* katalysiert sowohl C- als auch O-Prenylierungen. Zudem ist *Fnq26* in der Lage, eine sehr ungewöhnliche sog. „reverse“ Prenylierung durchzuführen, bei der die Verknüpfung des

Geranyldiphosphates (GPP) mit dem aromatischen Substrat über C-3 des Prenyldiphosphates anstatt über C-1 stattfindet.

Desweiteren wurden die biochemischen Eigenschaften, die kinetischen Parameter und die Ionenabhängigkeit der enzymatischen Aktivität untersucht.

Fnq26 ist ein lösliches, monomeres Enzym von 39,1 kDa. Für 1,3-Dihydroxynaphthalin ergab sich ein K_m -Wert von 1,9 mM und für Flaviolin von 21 μ M. Für 4-Hydroxybenzoat wurde ein K_m -Wert von ungefähr 5,6 mM bestimmt. Der K_m -Wert für GPP betrug 2,1 μ M unter Verwendung von Flaviolin und 27 μ M unter Verwendung von 1,3-Dihydroxynaphthalin als Prenylakzeptor. Die Wechselzahl betrug für 1,3-Dihydroxynaphthalin 0,2 min^{-1} , für 4-Hydroxybenzoat 0,14 min^{-1} und für Flaviolin 0,013 min^{-1} .

Sequenzvergleiche zeigten, dass Fnq26 zu einer erst kürzlich identifizierten neuen Gruppe von löslichen Prenyltransferasen gehört, die aromatische Substrate prenylieren. Wie bei CloQ aus der Clorobiocin-Biosynthese, aber im Gegensatz zu Orf2 aus der Naphterpin-Biosynthese und zu allen *trans*-Prenyltransferasen ist die enzymatische Aktivität von Fnq26 nicht von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Mg^{2+} abhängig. Diese Eigenschaft macht das Enzym für chemoenzymatische Anwendungen besonders interessant.

Die Anwesenheit eines einzelnen putativen Mevalonatkinasegens im sequenzierten Bereich von *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 warf die Frage nach dem biosynthetischen Ursprung der Isoprenoideinheiten der beiden Sekundärmetabolite FNQ I und Endophenazin A auf. Für die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat über den Mevalonatweg sind nämlich neben der Mevalonatkinase fünf weitere Enzyme erforderlich, deren Gene aber nicht im Biosynthesegencluster enthalten waren. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von G. Bringmann, Universität Würzburg, wurde dieser Frage in zwei Fütterungsexperimenten nachgegangen. Durch Fütterung von [$^{13}\text{C}_2$]Acetat konnte gezeigt werden, dass sowohl der Dimethylallylrest von Endophenazin A als auch der Geranylrest von FNQ I hauptsächlich aus dem Mevalonatstoffwechsel stammen. Ein zweites Fütterungsexperiment mit [2- ^{13}C]Glycerol bewies, dass es einen zusätzlichen Beitrag des Methylerythritolphosphatweges zur Bereitstellung der Isopreneinheit von FNQ I gibt. Anhand der Einbauraten der [^{13}C]-Markierung an verschiedenen Positionen des FNQ I- Moleküls wurden der Beitrag des Mevalonatweges zur Isoprenoidbiosynthese auf 80% und der Anteil des MEP-Weges auf 20% geschätzt. Durch die [$^{13}\text{C}_2$]Acetatfütterung konnte außerdem gezeigt werden, dass in der Biosynthese von FNQ I ein symmetrisches Zwischenprodukt entstehen muss. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin, was bedeutet, dass die Prenylierung erst nach Bildung dieses Intermediates stattfinden kann.

VI Literatur

Arigoni,D., Sagner,S., Latzel,C., Eisenreich,W., Bacher,A., and Zenk,M.H. (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 10600-10605.

Austin,M.B., Izumikawa,M., Bowman,M.E., Udway,D.W., Ferrer,J.L., Moore,B.S., and Noel,J.P. (2004). Crystal structure of a bacterial type III polyketide synthase and enzymatic control of reactive polyketide intermediates. *J. Biol. Chem.*, **279**, 45162-45174.

Bartram,S., Jux,A., Gleixner,G., and Boland,W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, **67**, 1661-1672.

Blankenfeldt,W., Kuzin,A.P., Skarina,T., Korniyenko,Y., Tong,L., Bayer,P., Janning,P., Thomashow,L.S., and Mavrodi,D.V. (2004). Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 16431-16436.

Botta,B., Monache,G.D., Menendez,P., and Boffi,A. (2005a). Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 606-608.

Botta,B., Vitali,A., Menendez,P., Misiti,D., and Delle,M.G. (2005b). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 717-739.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Brems,D.N. and Rilling,H.C. (1977). On the mechanism of the prenyltransferase reaction. Metal ion dependent solvolysis of an allylic pyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8351-8352.

Bringmann,G., Haagen,Y., Gulder,T.A., Gulder,T., and Heide,L. (2007). Biosynthesis of the Isoprenoid Moieties of Furanonaphthoquinone I and Endophenazine A in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *J. Org. Chem.*, **72**, 4198-4204.

Cane,D.E., Rosshi,T., and Pachlatko JP (1979). The biosynthesis of pentalenolactone. *Tetrahedron Lett.*, **20**, 3639-3642.

Cane,D.E., Rossi,T., Tillman,A.M., and Pachlatko,J.P. (1981). Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis. Biosynthesis of pentalenolactone from [U-¹³C₆]glucose and [6-²H₂]glucose. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1838-1843.

Cardellina,J.H., Marnier,F.J., and Moore,R.E. (1979). Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science*, **204**, 193-195.

Choulet,F., Aigle,B., Gallois,A., Mangenot,S., Gerbaud,C., Truong,C., Francou,F.X., Fourrier,C., Guerineau,M., Decaris,B., Barbe,V., Pernodet,J.L.,

and Leblond, P. (2006). Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol.*, **23**, 2361-2369.

Collakova, E. and DellaPenna, D. (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **127**, 1113-1124.

Culebras, E., Martinez, E., Carnero, A., and Malpartida, F. (1999). Cloning and characterization of a regulatory gene of the SARP family and its flanking region from *Streptomyces ambofaciens*. *Mol Gen. Genet.*, **262**, 730-737.

Dairi, T. (2005). Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *J. Antibiot.*, **58**, 227-243.

Datsenko, K.A. and 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.

Desmond, J.C., Kawabata, H., Mueller-Tidow, C., Simamura, E., Heber, D., Hirai, K., and Koeffler, H.P. (2005). The synthetic furanonaphthoquinone induces growth arrest, apoptosis and differentiation in a variety of leukaemias and multiple myeloma cells. *Br. J. Haematol.*, **131**, 520-529.

Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.-M., Piepersberg, W., and Raynal, M.-C. (2000). Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 477-485.

Edwards, D.J. and Gerwick, W.H. (2004). Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11432-11433.

Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., and Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci.*, **61**, 1401-1426.

Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M.H., and Bacher, A. (1997). Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3889-3892.

Endler K., Schuricht, U., Hennig, L., and Welzel, P. (1998). Exploratory investigations into the biosynthesis of the antibiotic Moenomycin A. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 13-16.

Eustáquio, A.S., Gust, B., Li, S.-M., Pelzer, S., Wohlleben, W., Chater, K.F., and Heide, L. (2004). Production of 8'-halogenated and 8'-unsubstituted novobiocin derivatives in genetically engineered *Streptomyces coelicolor* strains. *Chem. Biol.*, **11**, 1561-1572.

Fay, K. (2005). Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Phenazinen und Furanonaphthochinon in *Streptomyces cinnamonensis*. Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Fleischmann, R.D., Alland, D., Eisen, J.A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J.F., Nelson, W.C.,

- Umayam,L.A., Ermolaeva,M., Salzberg,S.L., Delcher,A., Utterback,T., Weidman,J., Khouri,H., Gill,J., Mikula,A., Bishai,W., Jacobs,J.W., Jr., Venter,J.C., and Fraser,C.M. (2002).** Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.*, **184**, 5479-5490.
- Flinspach,K. (2007).** Antibiotika-Biosynthese in Streptomyceten: Identifizierung und Sequenzanalyse von Biosynthesegenen prenylierter Phenazine in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Funa,N., Funabashi,M., Yoshimura,E., and Horinouchi,S. (2005).** A novel quinone-forming monooxygenase family involved in modification of aromatic polyketides. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14514-14523.
- Funa,N., Ohnishi,Y., Ebizuka,Y., and Horinouchi,S. (2002).** Properties and substrate specificity of RppA, a chalcone synthase-related polyketide synthase in *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 4628-4635.
- Funa,N., Ohnishi,Y., Fujii,I., Shibuya,M., Ebizuka,Y., and Horinouchi,S. (1999).** A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, **400**, 897-899.
- Funayama,S., Ishibashi,M., Anraku,Y., Komiyama,K., and Omura,S. (1989).** Structures of novel antibiotics, furaquinocins A and B. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 7427-7430.
- Funayama,S., Ishibashi,M., Komiyama,K., and Omura,S. (1990).** Biosynthesis of furaquinocins A and B. *J. Org. Chem.*, **55**, 1132-1133.
- Gebhardt,K., Schimana,J., Krastel,P., Dettner,K., Rheinheimer,J., Zeeck,A., and Fiedler,H.-P. (2002).** Biosynthetic capacities of actinomycetes. 26. Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, **55**, 794-800.
- Gebler,J.C. and Poulter,C.D. (1992).** Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 308-313.
- Georgakopoulos,D.G., Hendson,M., Panopoulos,N.J., and Schroth,M.N. (1994).** Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2931-2938.
- Giddens,S.R., Feng,Y., and Mahanty,H.K. (2002).** Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087. *Mol. Microbiol.*, **45**, 769-783.
- Glück,K. (2006).** Antibiotika-Biosynthese in Streptomyceten: Untersuchung von Methyltransferase-Genen in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Gomi,S., Ohuchi,S., Sasaki,T., Itoh,J., and Sezaki,M. (1987).** Studies on new antibiotics SF2415. II. The structural elucidation. *J. Antibiot.*, **40**, 740-749.

- Gross,F., Luniak,N., Perlova,O., Gaitatzis,N., Jenke-Kodama,H., Gerth,K., Gottschalk,D., Dittmann,E., and Müller,R. (2006).** Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. *Arch. Microbiol.*, **185**, 28-38.
- Grundmann,A. and Li,S.M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, **151**, 2199-2207.
- Gust,B., Challis,G.L., Fowler,K., Kieser,T., and Chater,K.F. (2003).** PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 1541-1546.
- Haagen,Y., Glück,K., Fay,K., Kammerer,B., Gust,B., and Heide,L. (2006).** A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Chembiochem*, **7**, 2016-2027.
- Haagen,Y., Unsöld,I.A., Westrich,L., Gust,B., Richard,S., Noel,J., and Heide,L. (2007).** A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates. *FEBS Lett.*, **581**, 2889-2893.
- Hamano,Y., Dairi,T., Yamamoto,M., Kawasaki,T., Kaneda,K., Kuzuyama,T., Itoh,N., and Seto,H. (2001).** Cloning of a gene cluster encoding enzymes responsible for the mevalonate pathway from a terpenoid-antibiotic-producing *Streptomyces* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1627-1635.
- Hampel,D., Mosandl,A., and Wust,M. (2005).** Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. *Phytochemistry*, **66**, 305-311.
- Hänsel,R., Sticher,O., and Steinegger,E. (1999).** Pharmakognosie-Phytopharmazie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hardt,I.H., Jensen,P.R., and Fenical,W. (2000).** Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (Actinomycetales). *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2073-2076.
- Henkel,T. and Zeeck,A. (1991).** Secondary metabolites by chemical screening, 15. Structure and absolute configuration of naphthomevalin, a new dihydro-naphthoquinone antibiotic from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, **44**, 665-669.
- Hopwood,D.A. (2007).** Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Imai,S., Furihata,K., Hayakawa,Y., Noguchi,T., and Seto,H. (1989).** Lavanducyanin, a new antitumor substance produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, **42**, 1196-1198.

- Inouye,H., Ueda,S., Inoue,K., and Matsumura,H. (1979).** Quinones and related compounds in higher plants. Part 8. Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry*, **18**, 1301-1308.
- Isshiki,K., Tamamura,T., Sawa,T., Naganawa,H., Takeuchi,T., and Umezawa,H. (1986).** Biosynthetic studies of terpentecin. *J. Antibiot.*, **39**, 1634-1635.
- Izumikawa,M., Shipley,P.R., Hopke,J.N., O'Hare,T., Xiang,L., Noel,J.P., and Moore,B.S. (2003).** Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 510-515.
- Jeong,J.-C., Srinivasan,A., Gruschow,S., Bach,H., Sherman,D.H., and Dordick,J.S. (2005).** Exploiting the reaction flexibility of a Type III polyketide synthase through *in vitro* pathway manipulation. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 64-65.
- Jez,J.M., Ferrer,J.L., Bowman,M.E., Dixon,R.A., and 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.
- Jux,A., Gleixner,G., and Boland,W. (2001).** Classification of Terpenoids according to the Methylerythritolphosphate or the Mevalonate Pathway with Natural (12)C/(13)C Isotope Ratios: Dynamic Allocation of Resources in Induced Plants. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **40**, 2091-2094.
- Kalaitzis,J.A., Hamano,Y., Nilsen,G., and Moore,B.S. (2003).** Biosynthesis and structural revision of neomarinone. *Org. Lett.*, **5**, 4449-4452.
- Kaneda,K., Kuzuyama,T., Takagi,M., Hayakawa,Y., and Seto,H. (2001).** An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces sp.* strain CL190. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 932-937.
- Kasahara,H., Hanada,A., Kuzuyama,T., Takagi,M., Kamiya,Y., and Yamaguchi,S. (2002).** Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 45188-45194.
- Kawasaki,T., Hayashi,Y., Kuzuyama,T., Furihata,K., Itoh,N., Seto,H., and Dairi,T. (2006).** Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster. *J. Bacteriol.*, **188**, 1236-1244.
- Kawasaki,T., Kuzuyama,T., Furihata,K., Itoh,N., Seto,H., and Dairi,T. (2003).** A relationship between the mevalonate pathway and isoprenoid production in actinomycetes. *J. Antibiot.*, **56**, 957-966.
- Keller,S., Pojer,F., Heide,L., and Lawson,D.M. (2006).** Crystallization and preliminary X-ray analysis of the aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic cluster of *Streptomyces roseochromogenes*. *Acta Crystallogr. F*, **62**, 1153-1155.

- Keller-Schierlein, W., Geiger, A., Zähler, H., and Brandl, M. (1988).** Metabolites from microorganisms. 251. The esmeraldines A and B, green pigments from *Streptomyces antibioticus*, strain Tü 2706. *Helv. Chim. Acta*, **71**, 2058-2070.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Koehl, P. (2005).** Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 71-72.
- Krastel, P., Zeeck, A., Gebhardt, K., Fiedler, H.-P., and Rheinheimer, J. (2002).** Biosynthetic capacities of actinomycetes. 27. Endophenazines A-D, new phenazine antibiotics from the athropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.*, **55**, 801-806.
- Kuzuyama, T., Noel, J.P., and Richard, S.B. (2005).** Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature*, **435**, 983-987.
- Kuzuyama, T. and Seto, H. (2003).** Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 171-183.
- Kuzuyama, T., Takahashi, S., Dairi, T., and Seto, H. (2002).** Detection of the mevalonate pathway in *Streptomyces* species using the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J. Antibiot.*, **55**, 919-923.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laursen, J.B. and Nielsen, J. (2004).** Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.*, **104**, 1663-1685.
- Li, S.-M., Hennig, S., and Heide, L. (1998).** Biosynthesis of the dimethylallyl moiety of novobiocin via a non-mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2717-2720.
- Liang, P.H., Ko, T.P., and Wang, A.H. (2002).** Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3339-3354.
- Lombo, F., Braña, A.F., Salas, J.A., and Méndez, C. (2004).** Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891. *Chembiochem*, **5**, 1181-1187.
- MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., and MacNeil, T. (1992).** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, **111**, 61-68.
- Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W., and Thomashow, L.S. (2006).** Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **44**, 417-445.
- Mavrodi, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M., and Thomashow, L.S. (1998).** A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol.*, **180**, 2541-2548.

- McDonald, M., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S., and Floss, H.G. (2001).** Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 9459-9460.
- Melzer, M. and Heide, L. (1994).** Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**, 93-102.
- Nagata, K., Hirai, K.I., Koyama, J., Wada, Y., and Tamura, T. (1998).** Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 700-702.
- Orihara, N., Furihata, K., and Seto, H. (1997).** Studies on the biosynthesis of terpenoidal compounds produced by actinomycetes. 2. Biosynthesis of carquinostatin B via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces exfoliatus*. *J. Antibiot.*, **50**, 979-981.
- Orihara, N., Kuzuyama, T., Takahashi, S., Furihata, K., and 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.*, **51**, 676-678.
- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E., and Ladner, J.E. (2003).** Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry*, **42**, 5684-5693.
- Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., and Ladner, J.E. (2007).** Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **46**, 1821-1828.
- Parsons, J.F., Song, F., Parsons, L., Calabrese, K., Eisenstein, E., and Ladner, J.E. (2004).** Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Biochemistry*, **43**, 12427-12435.
- Pathirana, C., Jensen, P.R., and Fenical, W. (1992).** Marinone and debromomarinone: antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7663-7666.
- Patridge, E.V. and Ferry, J.G. (2006).** WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J. Bacteriol.*, **188**, 3498-3506.
- Pierson, L.S., III and Thomashow, L.S. (1992).** Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **5**, 330-339.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C.T., Li, S.-M., and Heide, L. (2003).** CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 2316-2321.

- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahn, H. (1993).** Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.*, **295 (Pt 2)**, 517-524.
- Sacchettini, J.C. and Poulter, C.D. (1997).** Creating isoprenoid diversity. *Science*, **277**, 1788-1789.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schledz, M., Seidler, A., Beyer, P., and Neuhaus, G. (2001).** A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.*, **499**, 15-20.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K., and Rohmer, M. (1996).** Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.*, **316 (Pt 1)**, 73-80.
- Sedmera, P., Pospíšil, S., and Novák, J. (1991).** New furanonaphthoquinone from *Streptomyces cinnamomensis*. *J. Nat. Prod.*, **54**, 870-872.
- Seto, H., Orihara, N., and Furihata, K. (1998).** Studies on the biosynthesis of terpenoids produced by actinomycetes. Part 4. Formation of BE-40644 by the mevalonate and nonmevalonate pathways. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 9497-9500.
- Seto, H., Watanabe, H., and Furihata, K. (1996).** Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aeriovifer*. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 7979-7982.
- Shin-Ya, K., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Seto, H. (1990).** Biosynthetic studies of naphterpin, a terpenoid metabolite of *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6025-6026.
- Shin-ya, K., Imai, S., Furihata, K., Hayakawa, Y., Kato, Y., Vanduyne, G.D., Clardy, J., and Seto, H. (1990).** Isolation and structural elucidation of an antioxidative agent, naphterpin. *J. Antibiot.*, **43**, 444-447.
- Shiomi, K., Iinuma, H., Hamada, M., Naganawa, H., Manabe, M., Matsuki, C., Takeuchi, T., and Umezawa, H. (1986).** Novel antibiotics napyradiomycins. Production, isolation, physico-chemical properties and biological activity. *J. Antibiot.*, **39**, 487-493.
- Shiomi, K., Iinuma, H., Naganawa, H., Isshiki, K., Takeuchi, T., and Umezawa, H. (1987).** Biosynthesis of napyradiomycins. *J. Antibiot.*, **40**, 1740-1745.
- Simpson, T.J. (1998).** Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Pathways. *Topics in Current Chemistry*, **195**, 1-48.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N.,**

Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959-964.

Stryer, L. (1995). Biochemistry. W. H. Freeman and Co., New York.

Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R., and Hudspeth, M.E. (1998). Menaquinone (vitamin K₂) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 2782-2787.

Takagi, M., Kuzuyama, T., Takahashi, S., and Seto, H. (2000). A gene cluster for the mevalonate pathway from *Streptomyces* sp. strain CL190. *J. Bacteriol.*, **182**, 4153-4157.

Tax, J., Sedmera, P., Vokoun, J., Urban, J., Karnetová, J., Stajner, K., Vanek, Z., and Krumphanzl, V. (1983). Phenazines from *Streptomyces cinnamonensis*. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **48**, 527-532.

Turner, J.M. and Messenger, A.J. (1986). Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microb. Physiol.*, **27**, 211-275.

Umezawa, H., Hayano, S., Maeda, K., Ogata, Y., and Okami, Y. (1950). On a new antibiotic, griseolutein, produced by streptomyces. *Jpn. Med. J. (Natl. Inst. Health Jpn.)*, **3**, 111-117.

Unsöld, I.A. and Li, S.M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, **151**, 1499-1505.

Unsöld, I.A. and Li, S.M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem*, **7**, 158-164.

Wang, L., White, R.L., and Vining, L.C. (2002). Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: genes in the jad cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone. *Microbiology*, **148**, 1091-1103.

Wessjohann, L. and Sontag, B. (1996). Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from overproducing strains of *Escherichia coli*: method development and substrate specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1697-1699.

Williams, R.M., Stocking, E.M., and Sanz-Cervera, J.F. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Top. Curr. Chem.*, **209**, 97-173.

Wilson, R., Pitt, T., Taylor, G., Watson, D., MacDermot, J., Sykes, D., Roberts, D., and Cole, P. (1987). Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *J. Clin. Invest*, **79**, 221-229.

Woodside, A.B., Huang, Z., and Poulter, C.D. (1993). Trisammonium geranyl diphosphate. *Organic Syntheses*, **66**, 211-215.

Yang, J., Wang, Y., Woolridge, E.M., Arora, V., Petsko, G.A., Kozarich, J.W., and Ringe, D. (2004). Crystal structure of 3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme from *Pseudomonas putida*, a fumarase class II type cycloisomerase: enzyme evolution in parallel pathways. *Biochemistry*, **43**, 10424-10434.

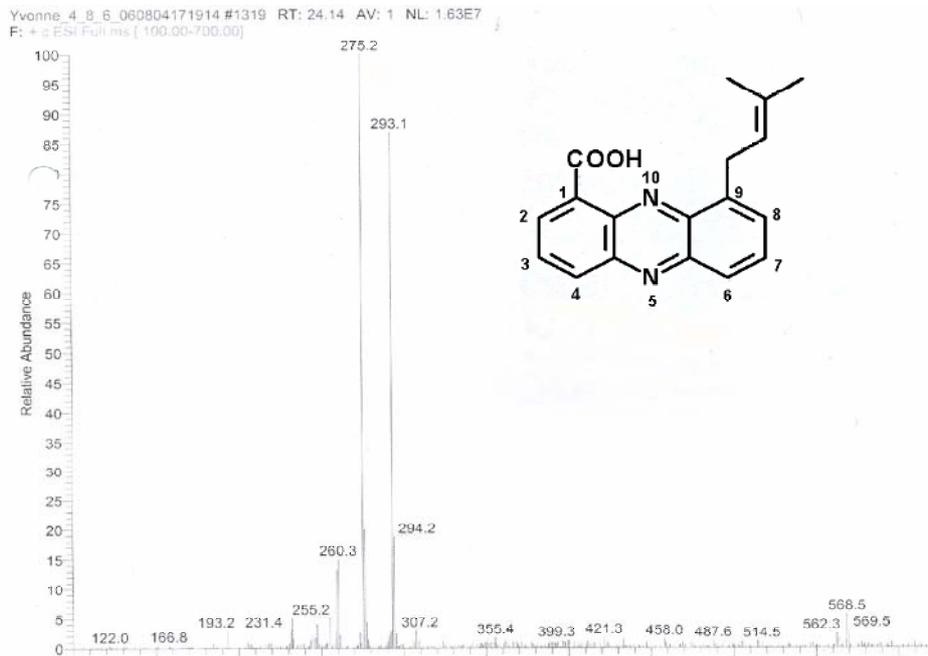
Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T., and Sato, F. (2002). Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6240-6246.

Yin, W.B., Ruan, H.L., Westrich, L., Grundmann, A., and Li, S.M. (2007). CdpNPT, an N-Prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: Overproduction, Purification and Biochemical Characterisation. *ChemBiochem*, **in press**.

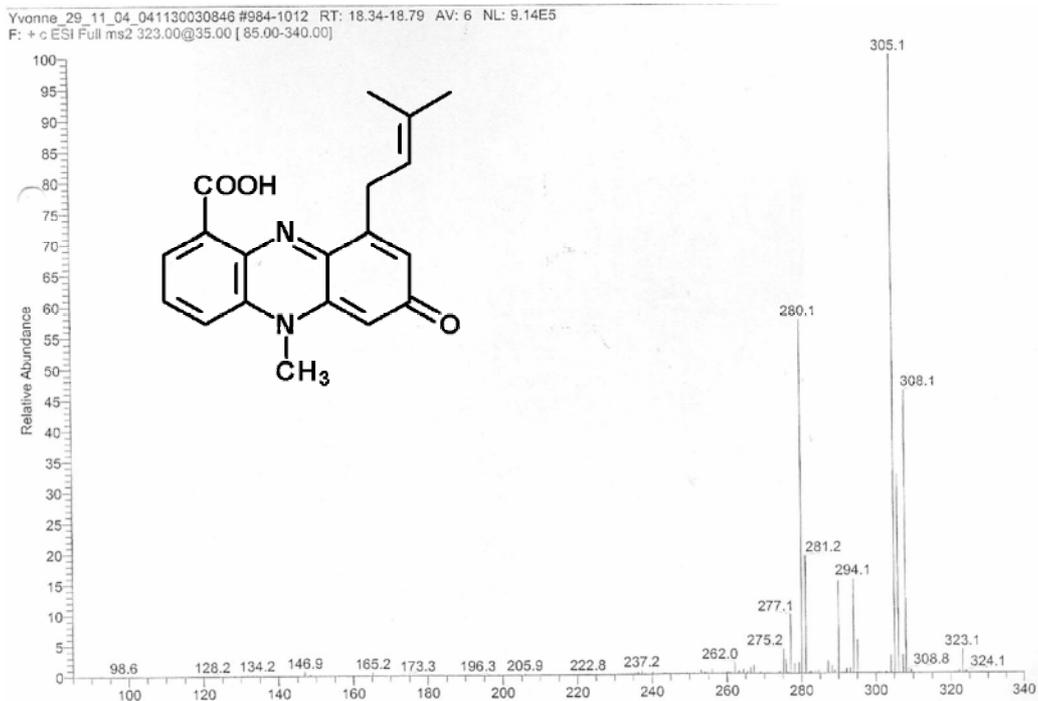
VII Anhang

1. MS-MS-Spektren von Endophenazin A, Endophenazin B und FNQ I

Endophenazin A aus Gesamtextrakt von *S. cinnamonensis* DSM 1042



Endophenazin B aus Gesamtextrakt von *S. cinnamonensis* DSM 1042



FNQ I aus Gesamtextrakt von *S. cinnamomensis* DSM 1042

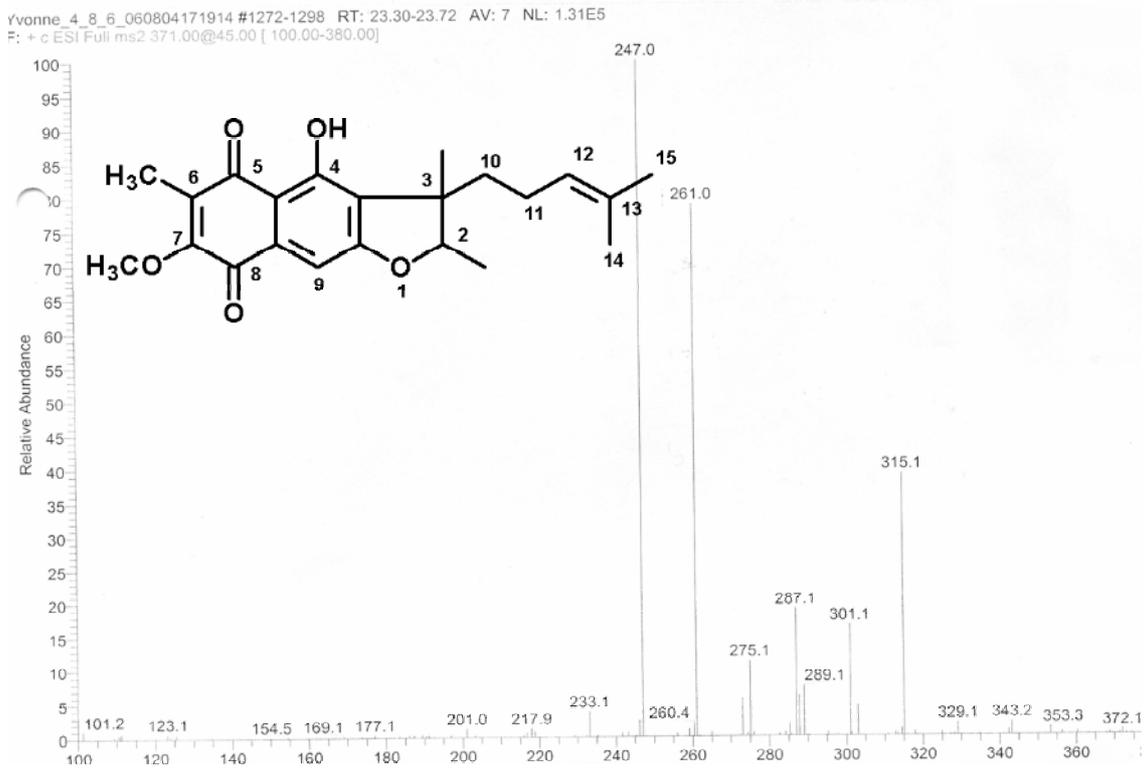


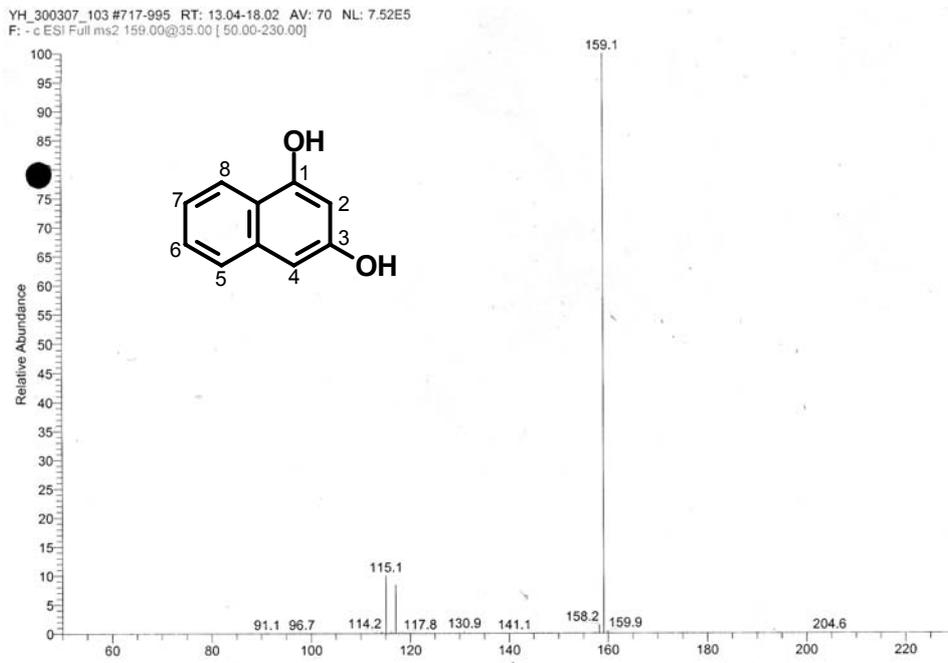
Tabelle VII.1: MS-Daten Endophenazin A, Endophenazin B und FNQ I

Substanz	Signale <i>m/z</i> (%)
Endophenazin A	293 [M+H] ⁺ (87), 275 (100), 260 (15), 255 (6), 232 (6)
Endophenazin B	323 [M+H] ⁺ (4), 308 (40), 305 (100), 294 (15), 290 (10), 280 (51), 277 (6)
FNQ I	371 [M+H] ⁺ (1), 315 (41), 301 (17), 289 (9), 287 (21), 275 (13), 261 (80), 247 (100)

2. MS-MS- und NMR-Spektren von Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin, 4-Hydroxybenzoesäure und ihren prenylierten Produkten 1, 2, 3, 4 und 5

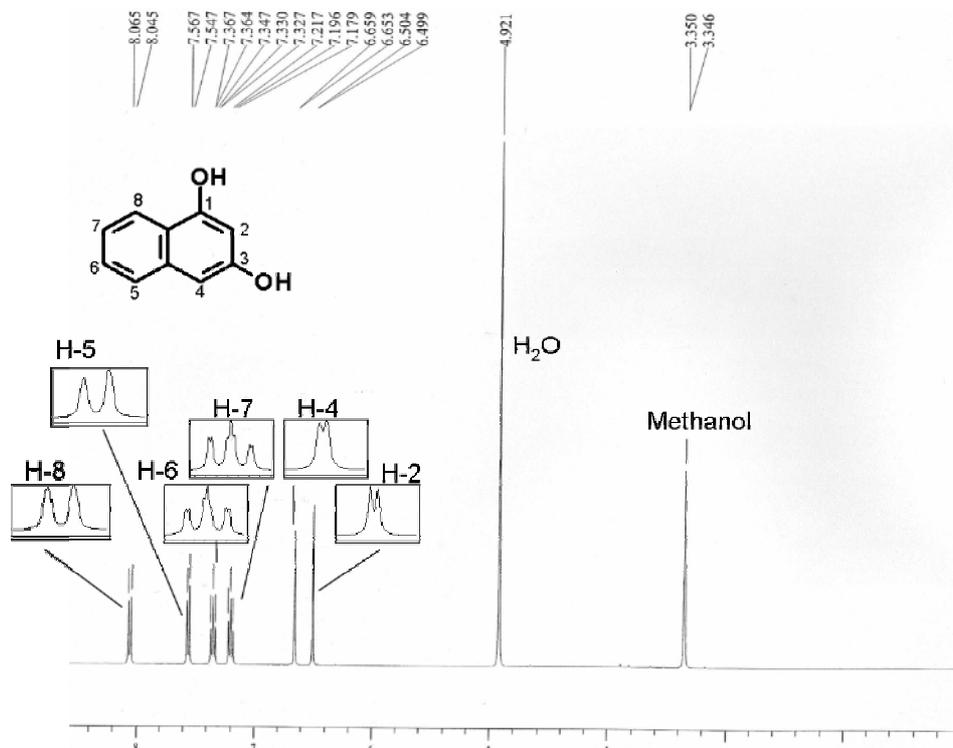
1,3-Dihydroxynaphthalin

MS-MS-Spektrum



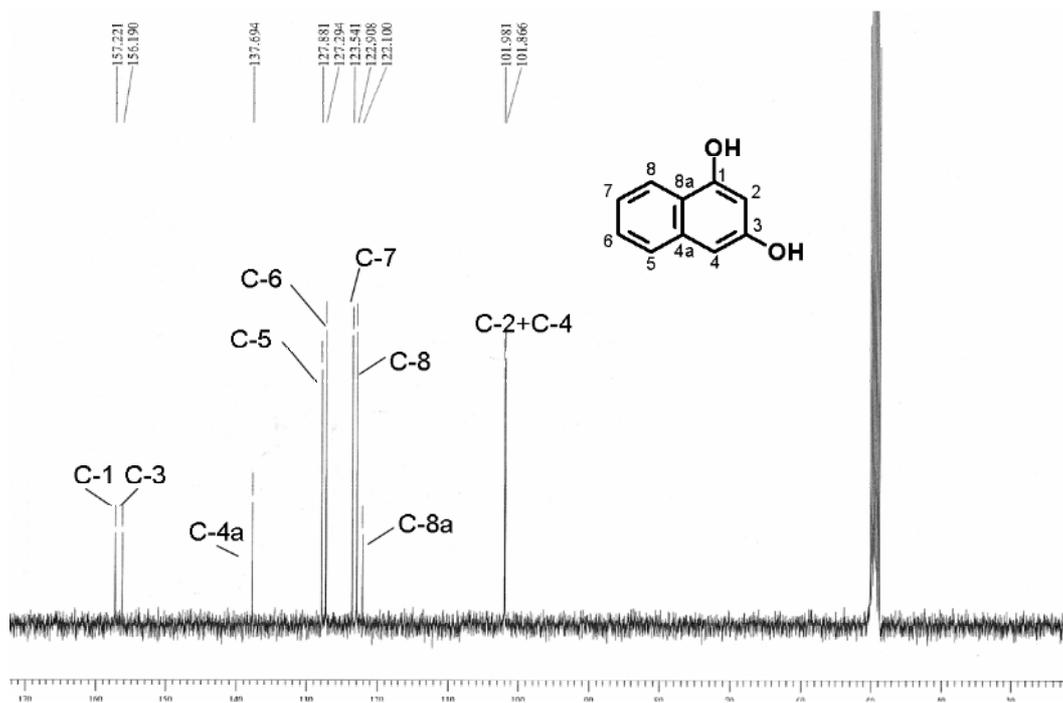
1,3-Dihydroxynaphthalin

$^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, MeOD)



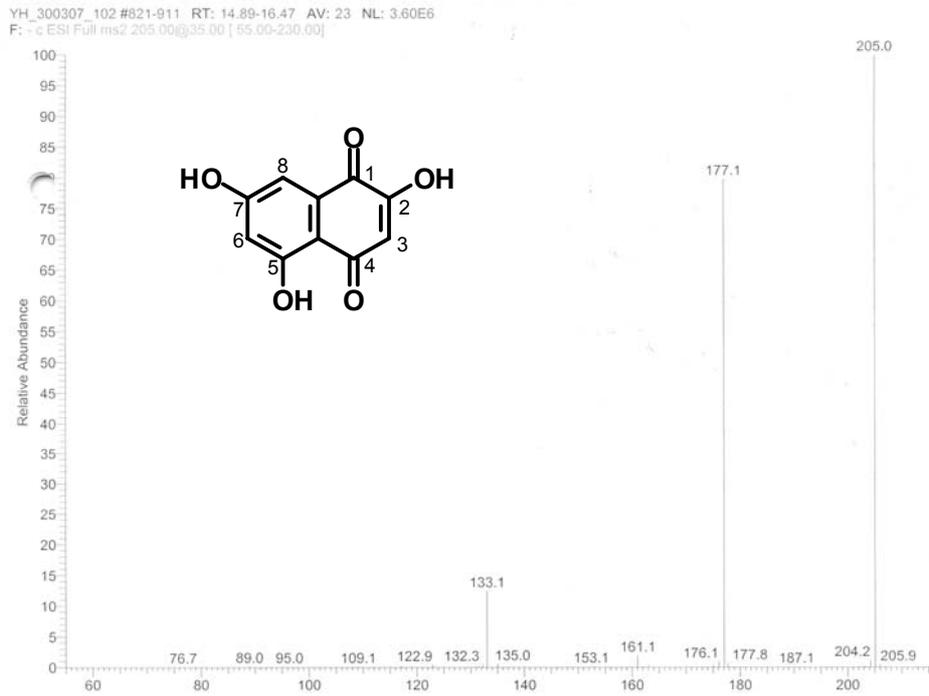
1,3-Dihydroxynaphthalin

$^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum (400 MHz, MeOD)

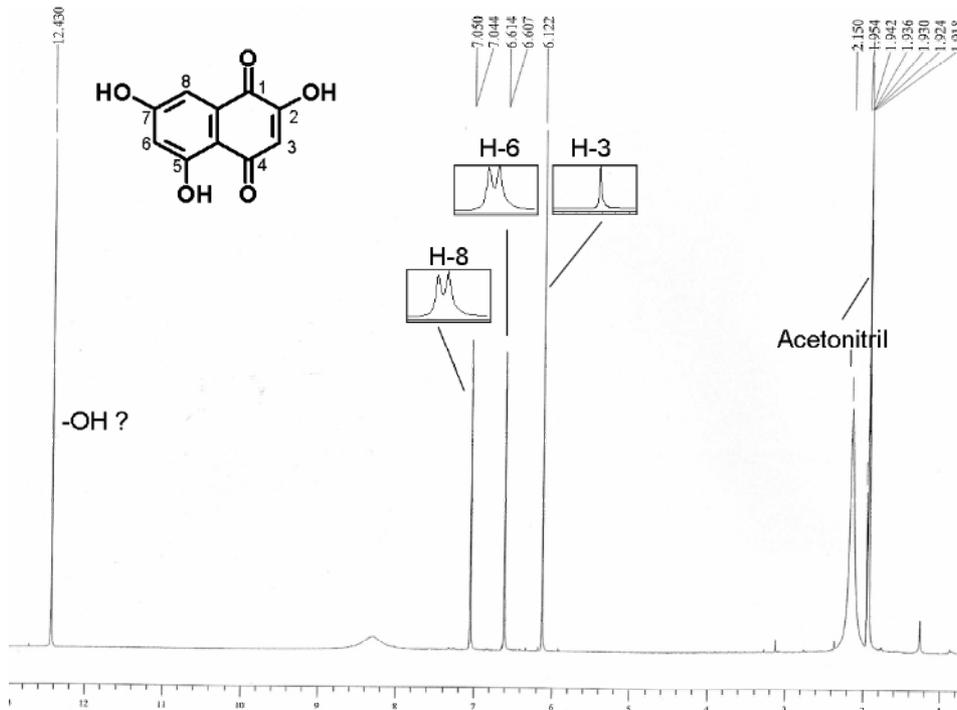


Flaviolin

MS-MS-Spektrum

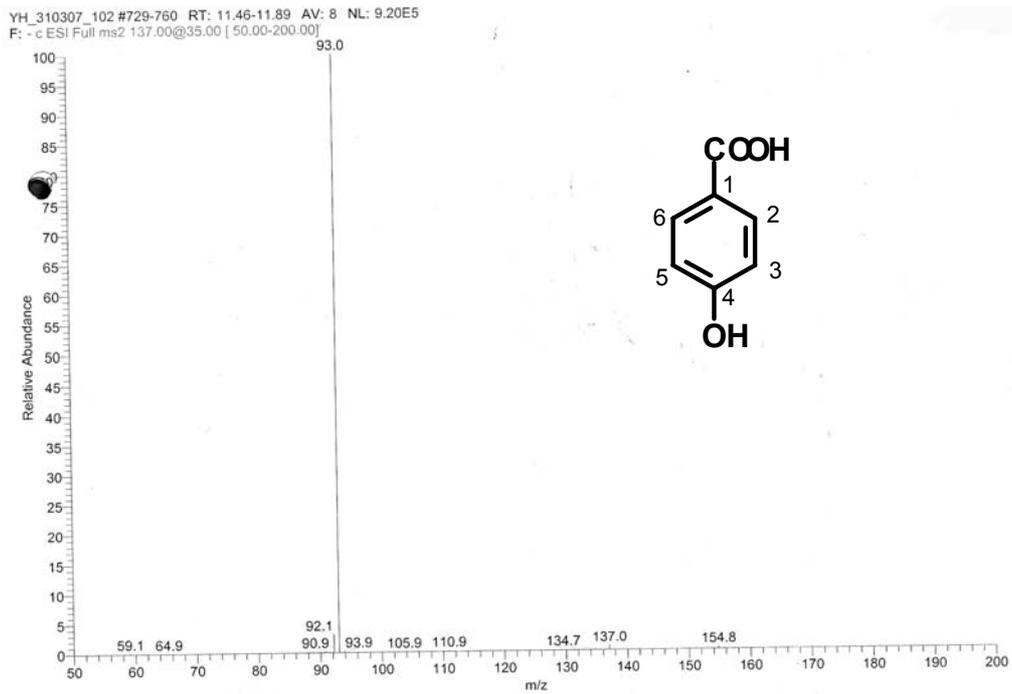
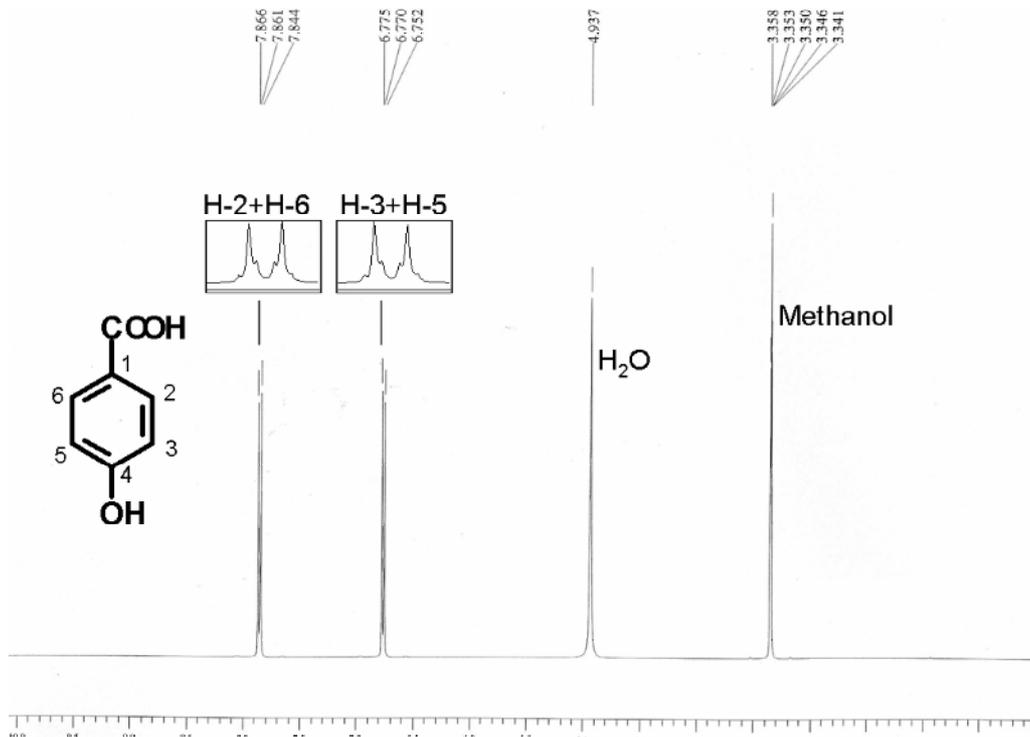


Flaviolin

 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, CD_3CN)

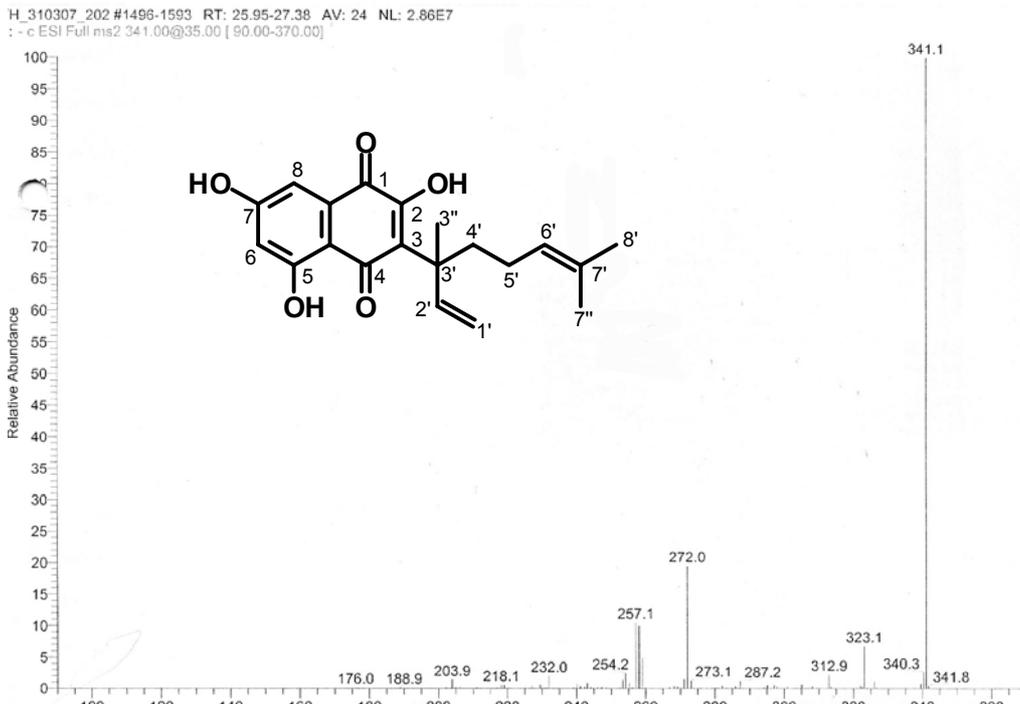
4-Hydroxybenzoessäure

MS-MS-Spektrum

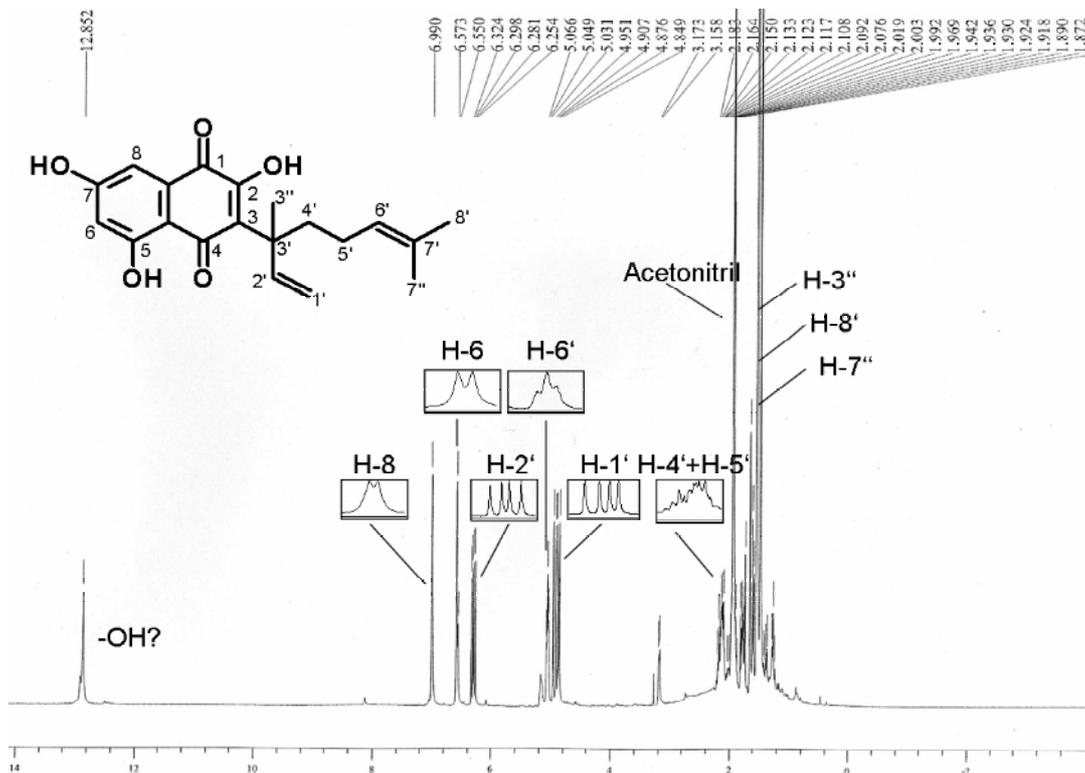
**4-Hydroxybenzoessäure**¹H-NMR Spektrum (400 MHz, MeOD)

Produkt 1

MS-MS-Spektrum



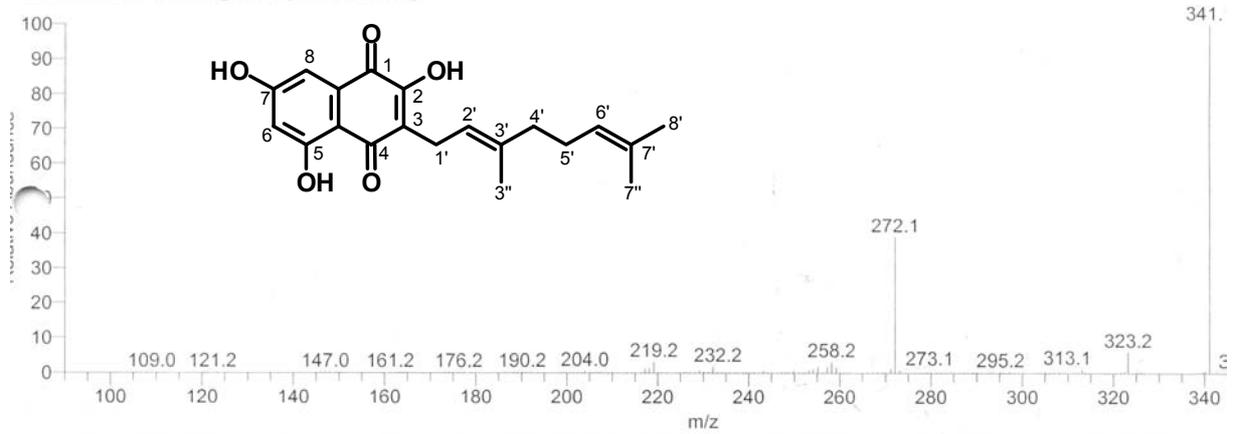
Produkt 1

 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, CD_3CN)

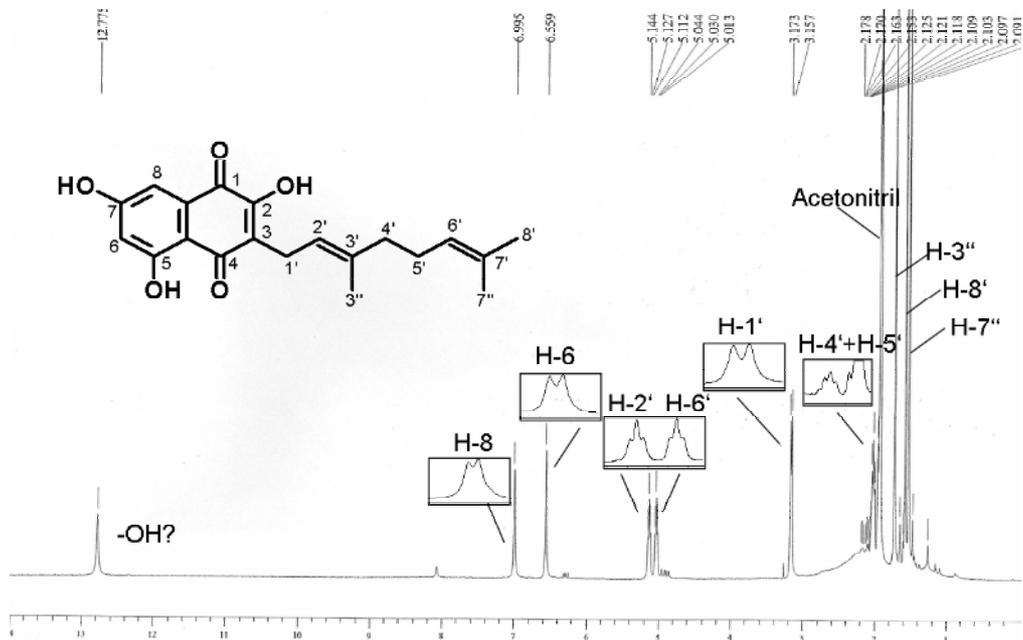
Produkt 2

MS-MS-Spektrum

f_310307_203 #1535-1621 RT: 27.11-28.45 AV: 22 NL: 2.48E7
 - c ESI Full ms2 341.00@35.00 [90.00-370.00]

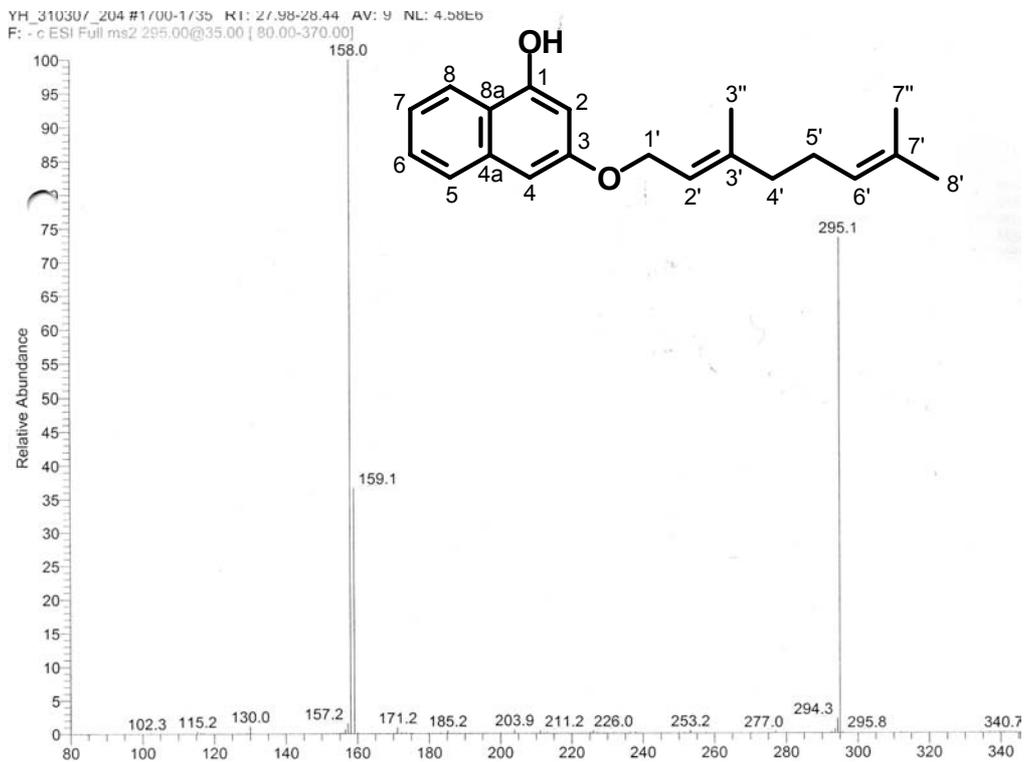


Produkt 2

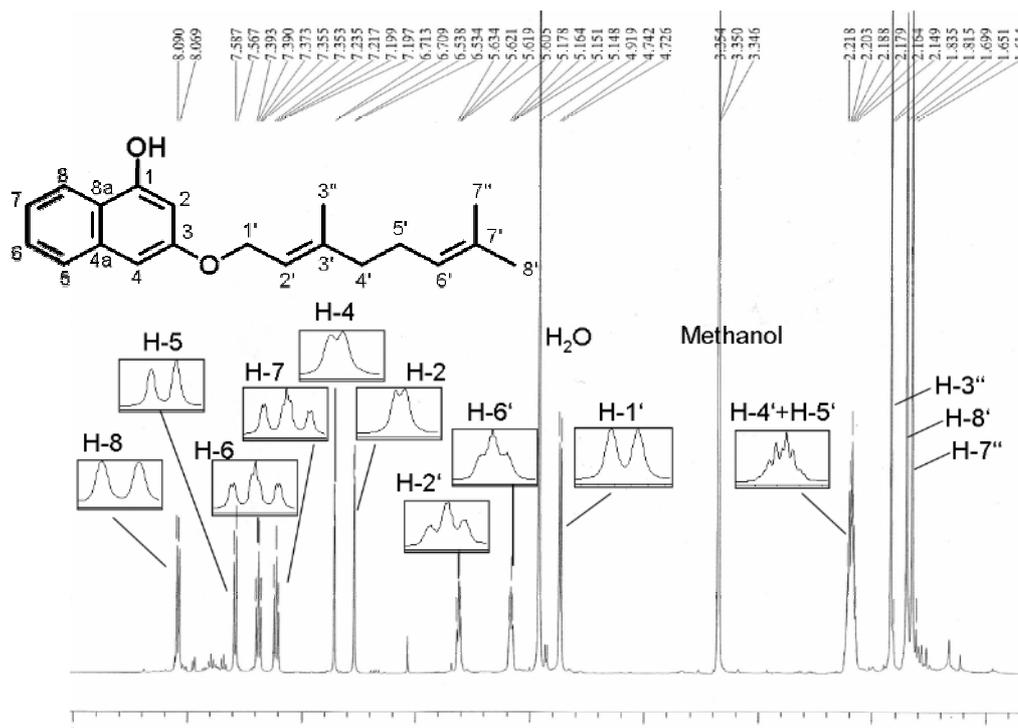
¹H-NMR Spektrum (400 MHz, CD₃CN)

Produkt 3

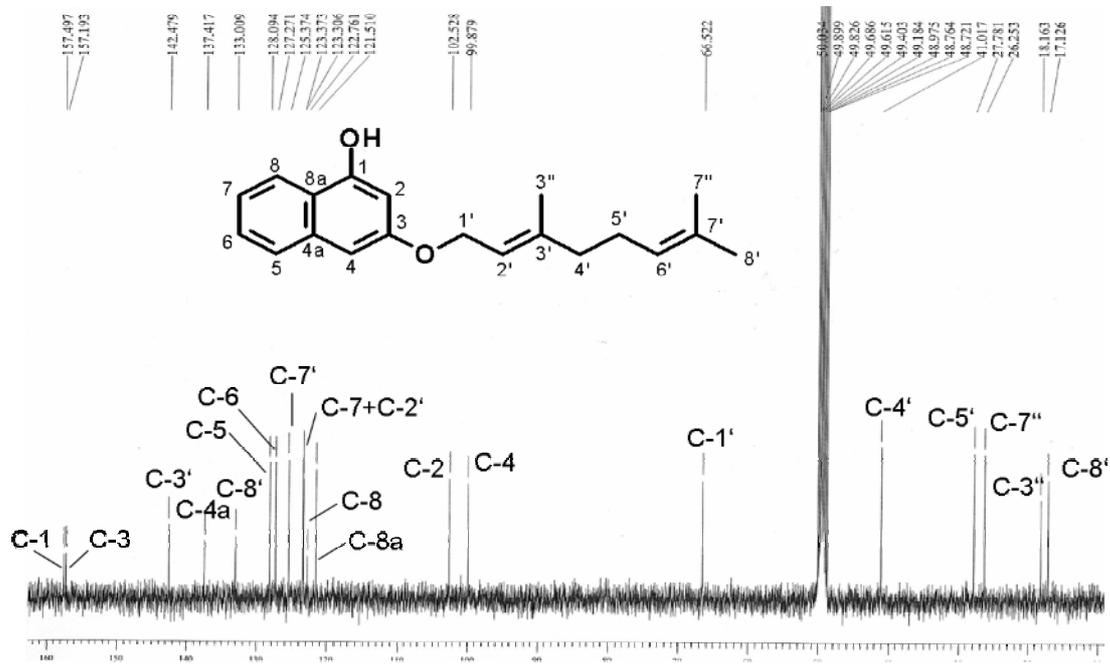
MS-MS-Spektrum



Produkt 3

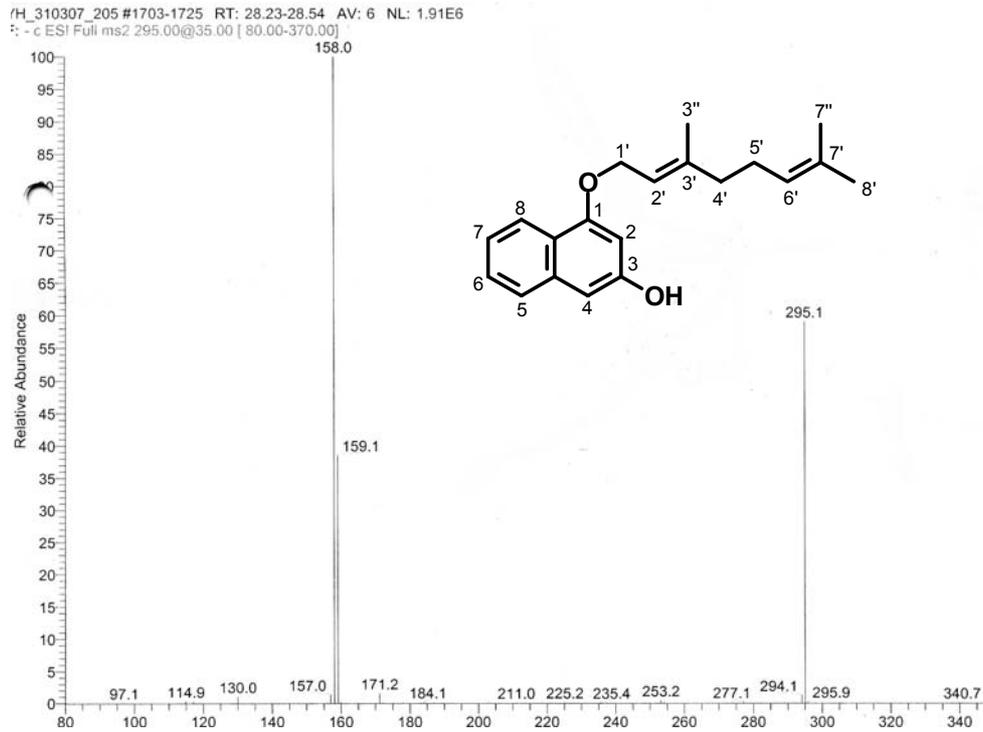
 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, MeOD)

Produkt 3

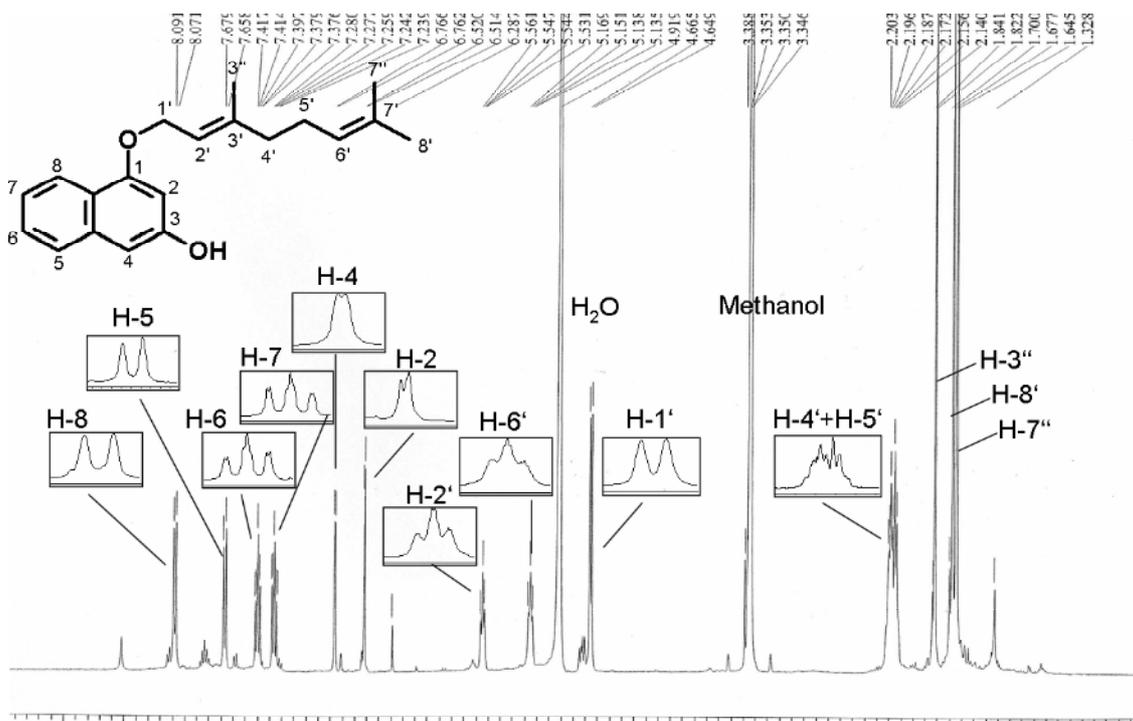
 ^{13}C -NMR Spektrum (400 MHz, MeOD)

Produkt 4

MS-MS-Spektrum

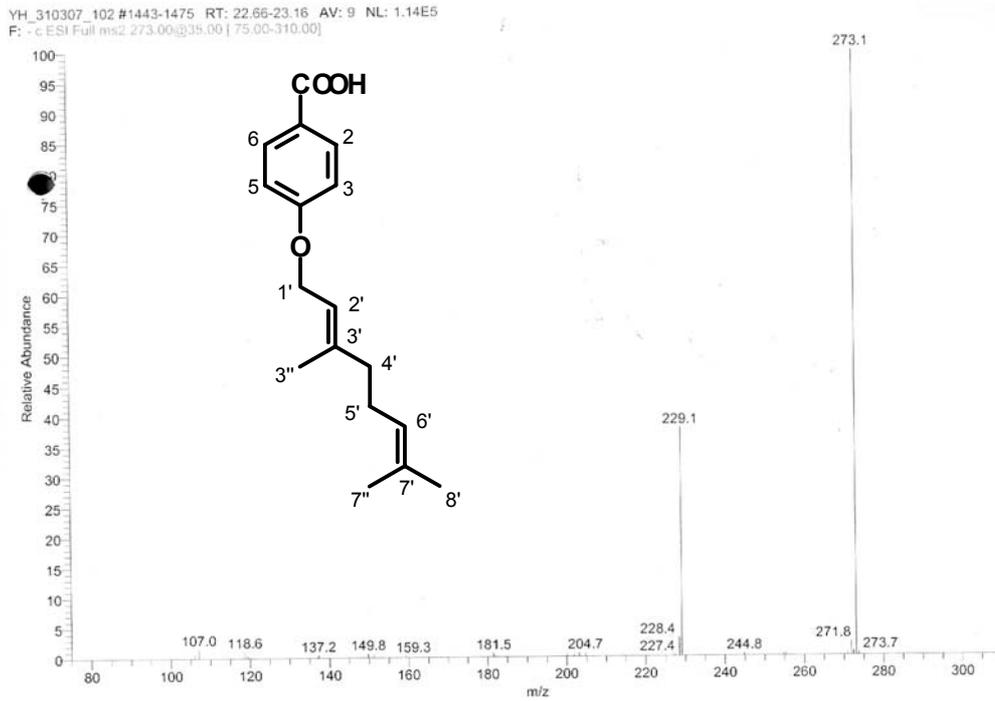


Produkt 4

¹H-NMR Spektrum (400 MHz, MeOD)

Produkt 5

MS-MS-Spektrum



Produkt 5

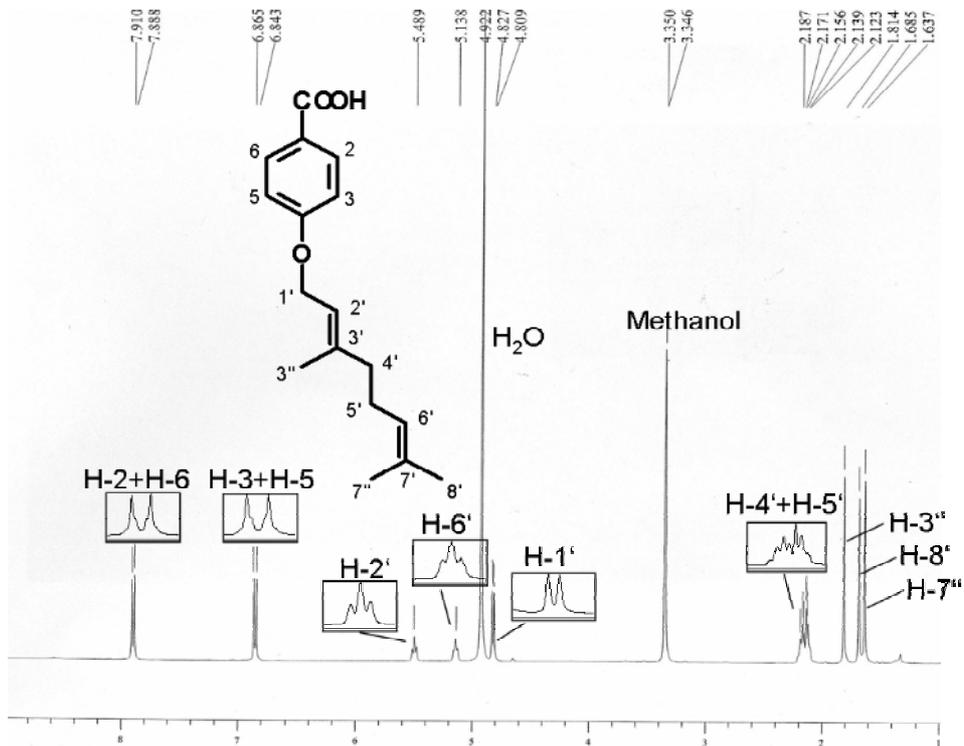
 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum (400 MHz, MeOD)

Tabelle VII.2: MS-Daten von Flaviolin, 1,3-Dihydroxynaphthalin, 4-Hydroxybenzoesäure und ihren prenylierten Produkten **1**, **2**, **3**, **4** und **5**

Substanz	Signale <i>m/z</i> (%)
Flaviolin	205 [M-H] ⁻ (100), 177 (80), 161 (2), 133 (13)
Produkt 1	341 [M-H] ⁻ (100), 272 (20), 258 (10), 257 (11), 323 (7)
Produkt 2	341 [M-H] ⁻ (100), 323 (8), 272 (40), 258 (4), 219 (4)
1,3-Dihydroxynaphthalin	159 [M-H] ⁻ (100), 323 (8), 115 (11)
Produkt 3	295 [M-H] ⁻ (74), 159 (36), 158 (100)
Produkt 4	295 [M-H] ⁻ (60), 159 (38), 158 (100)
4-Hydroxybenzoesäure	137 [M-H] ⁻ (100), 93 (48)
Produkt 5	273 [M-H] ⁻ (73), 229 (8), 137 (8), 136 (100), 135 (16), 92 (27)

3. ^{13}C -NMR Spektren der Substanzen nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ und $[2-^{13}\text{C}]\text{Glycerol}$

Tabelle VII.3: Berechnung der Anreicherungsraten für FNQ I nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]\text{Glycerol}$

C-Atom	C14U	C14L	Verhältnis (C14L/C14U)	C15U	C15L	Verhältnis (C15L/C15U)	durchschnittl. Verhältnis
2	1,23	2,73	2,22	0,84	2,09	2,49	2,35
2Me	1,39	9,68	6,96	0,95	7,42	7,81	7,39
3	0,93	6,95	7,47	0,63	5,32	8,44	7,96
3Me	1,27	1,45	1,14	0,87	1,11	1,28	1,21
3a	0,58	0,36	0,62	0,39	0,28	0,72	0,67
4	0,24	2,73	11,38	0,16	1,86	11,63	11,50
4a	0,38	0,23	0,61	0,26	0,17	0,65	0,63
5	0,47	3,5	7,45	0,33	2,68	8,12	7,78
6	0,53	0,43	0,81	0,37	0,33	0,89	0,85
6Me	1,24	2,59	2,09	0,85	1,99	2,34	2,21
7	0,35	3,46	9,89	0,24	2,65	11,04	10,46
7-OMe	1,03	2,19	2,13	0,7	1,68	2,40	2,26
8	0,29	0,37	1,28	0,2	0,28	1,40	1,34
8a	0,51	3,55	6,96	0,35	2,72	7,77	7,37
9	1,20	1,15	0,96	0,82	0,88	1,07	1,02
9a	0,68	6,15	9,04	0,46	4,71	10,24	9,64
10	1,31	1,16	0,89	0,9	0,89	0,99	0,94
11	1,55	9,33	6,02	1,06	7,14	6,74	6,38
12	1,21	2,67	2,21	0,82	2,05	2,50	2,35
13	0,47	4,49	9,55	0,32	3,44	10,75	10,15
14	1	1	1,00	0,68	0,77	1,13	1,07
15	1,46	1,31	0,90	1	1	1,00	0,95

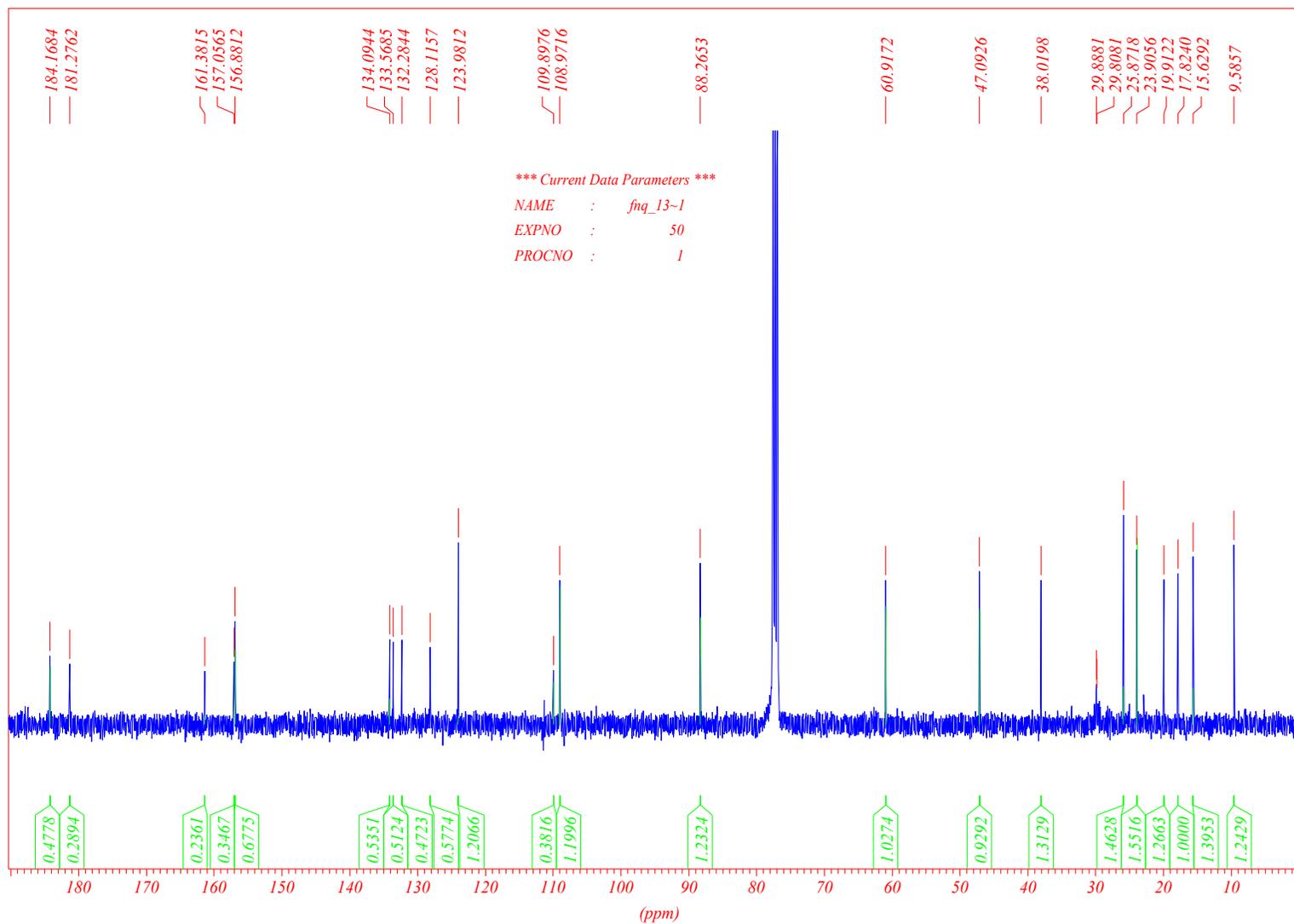
U = Integrale der entsprechenden Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum der unmarkierten Substanz

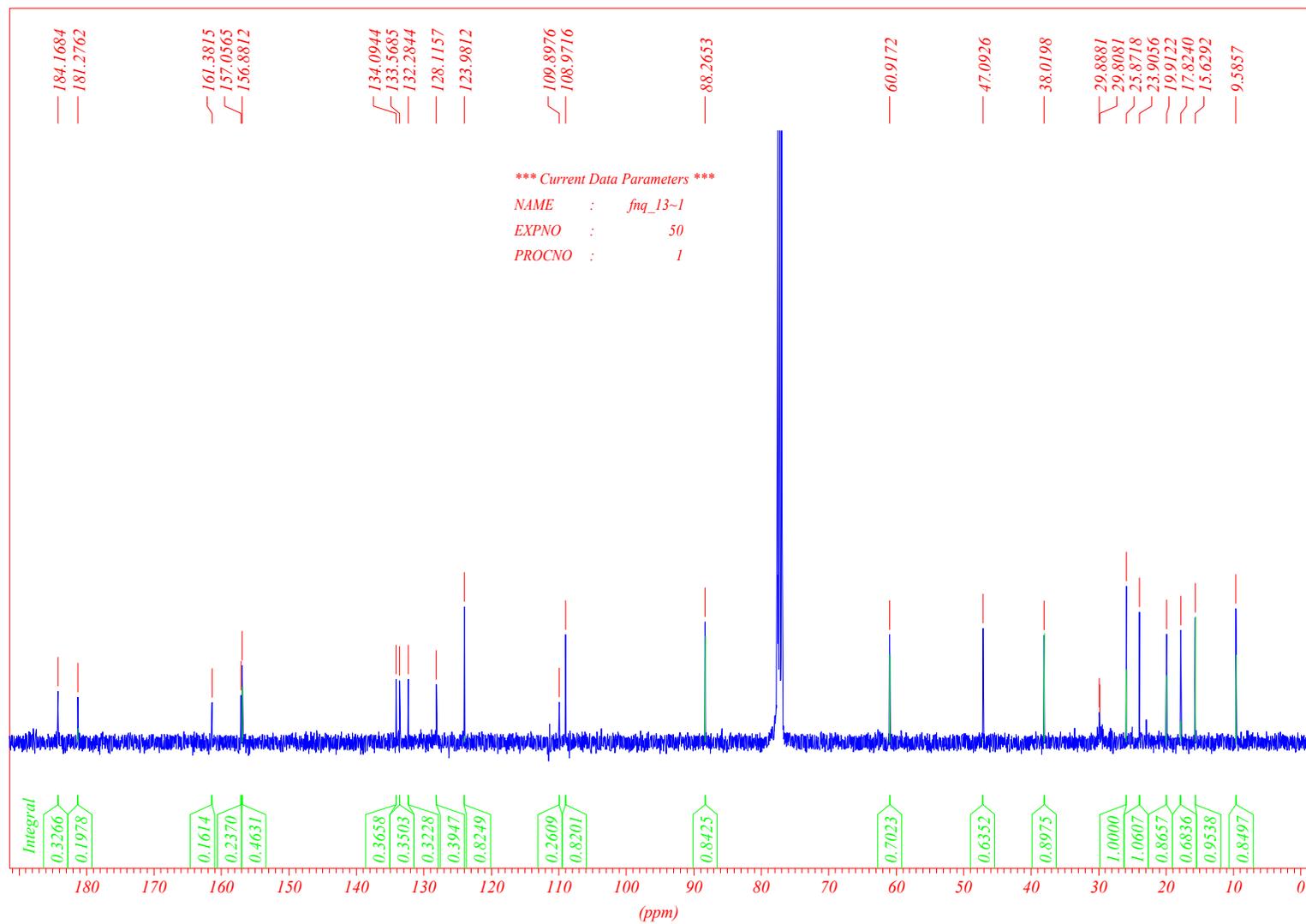
L = Integrale der entsprechenden Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum der markierten Substanz

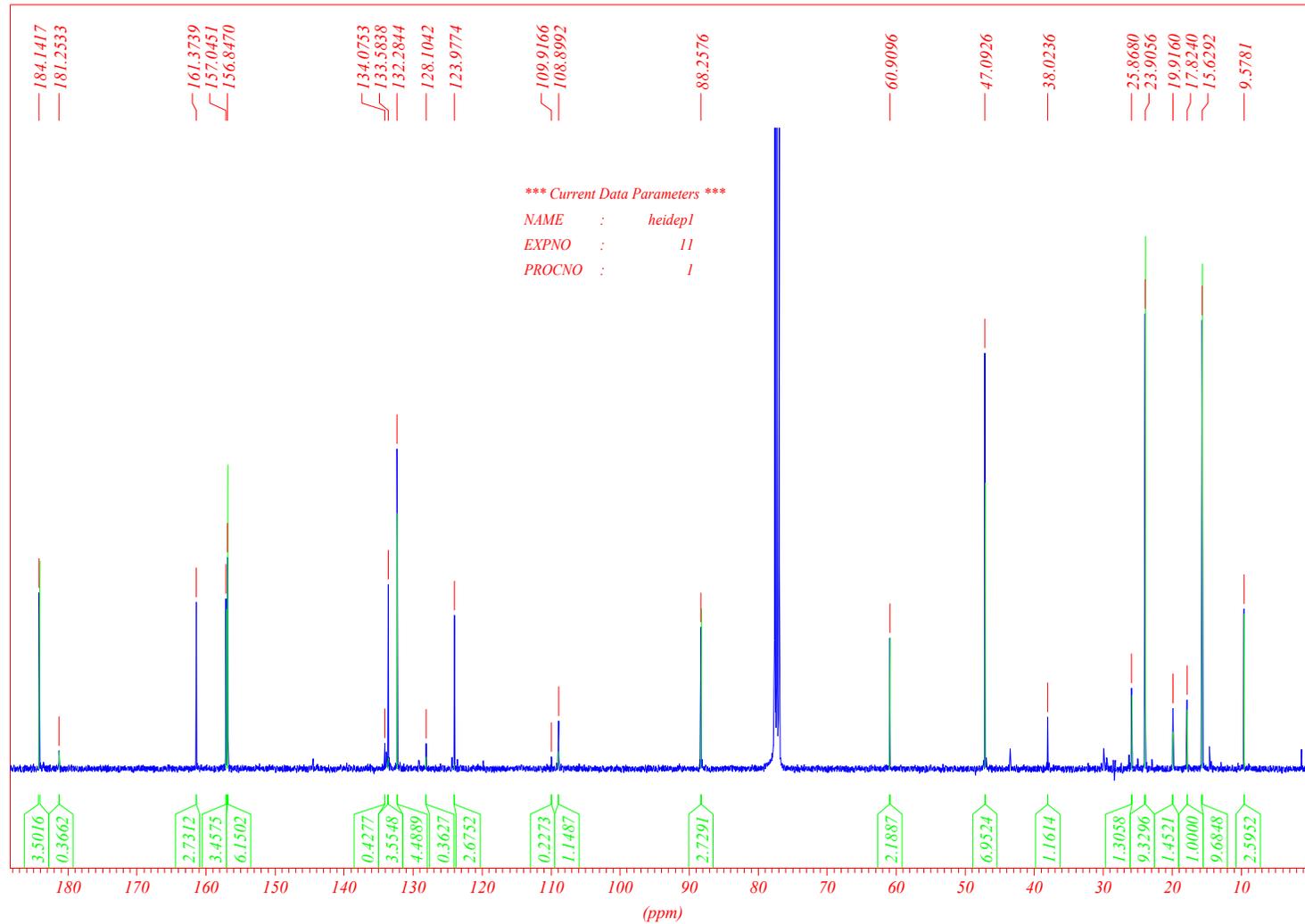
Durchschnittl. Verhältnis = $[(\text{C14L}/\text{C14U}) + (\text{C15L}/\text{C15U})]/2$

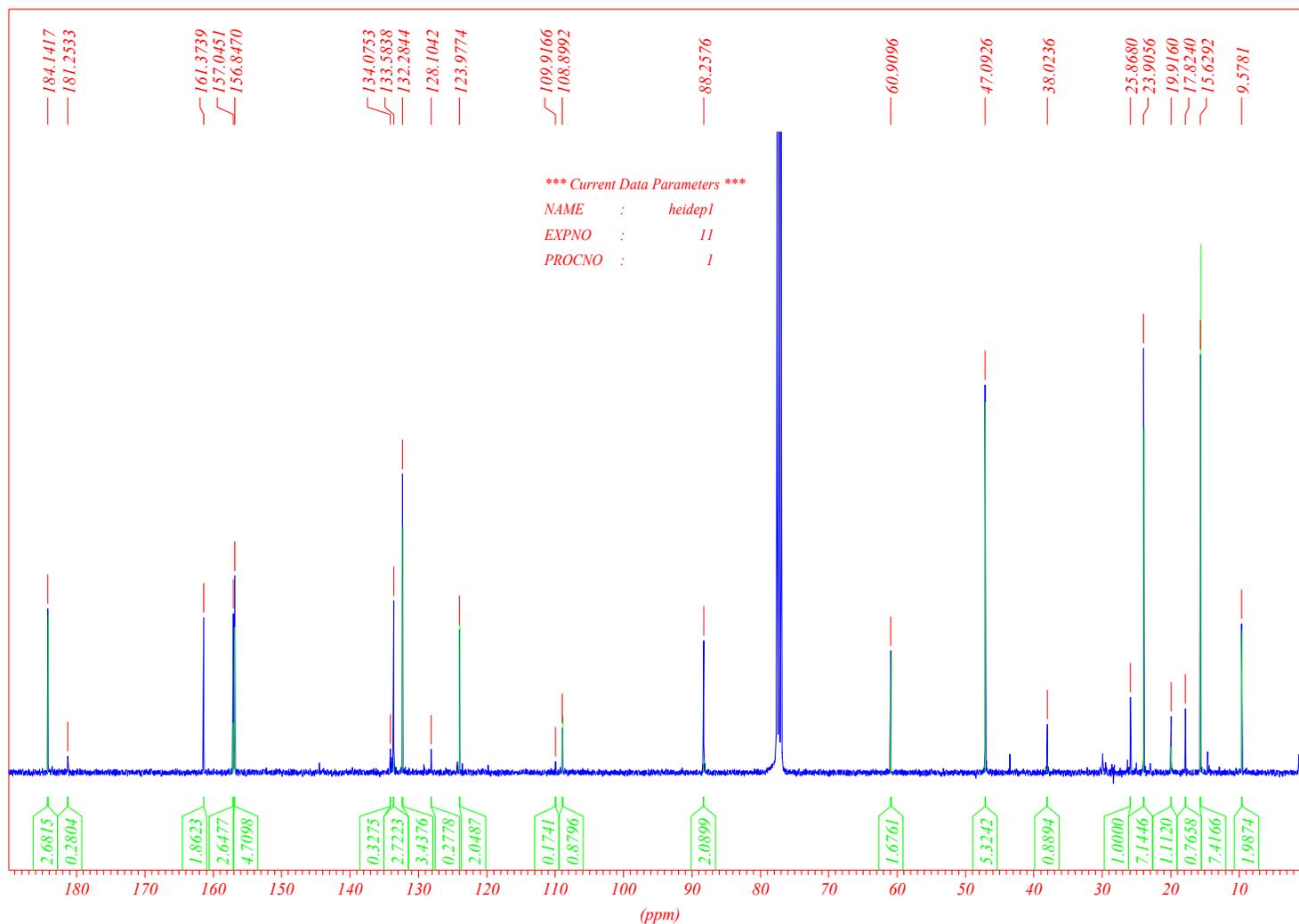
Relative Anreicherung = (Durchschnittl. Verhältnis) - 1

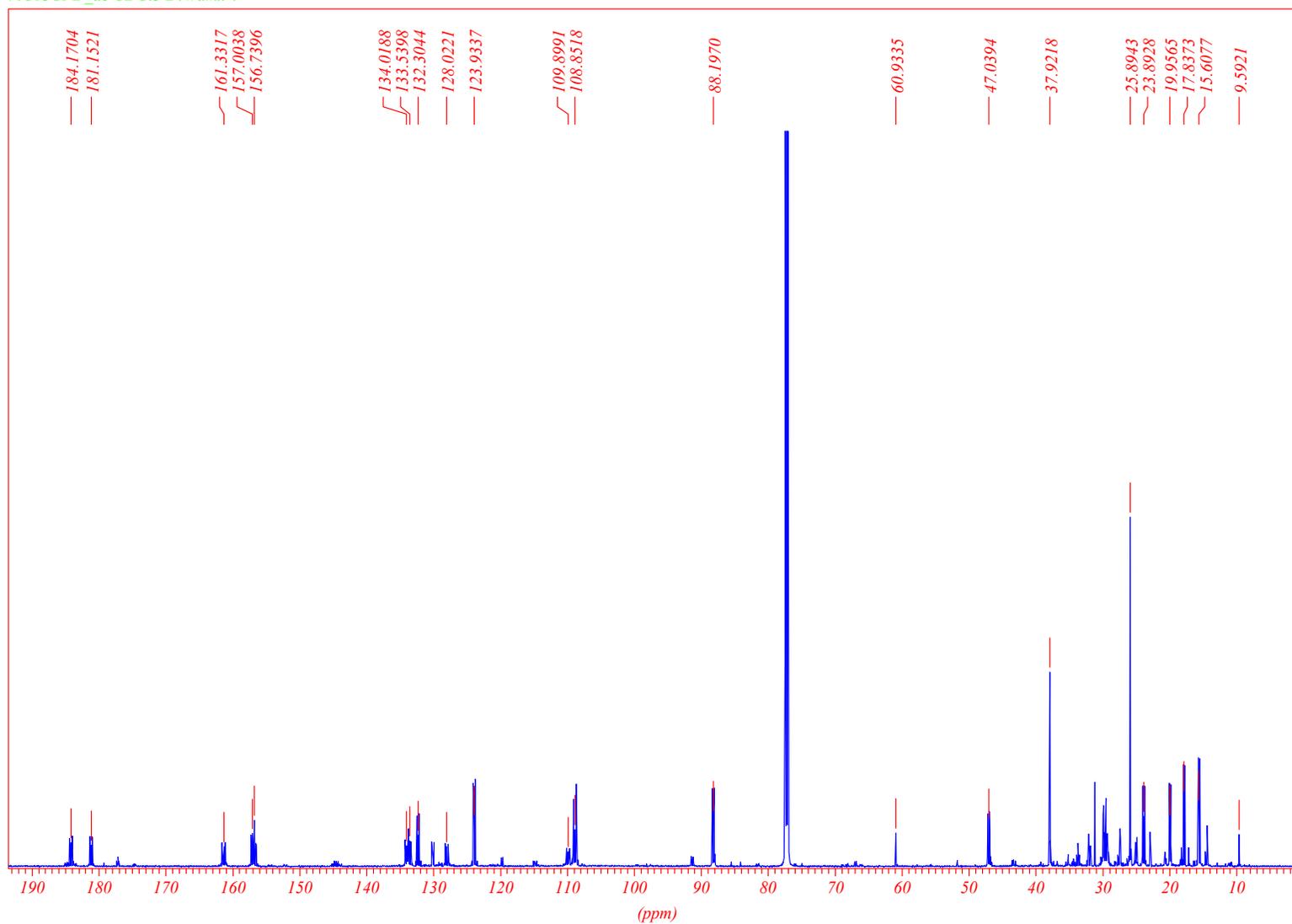
Geschätzte absolute Anreicherung = (Relative Anreicherung) \times 1,1 %

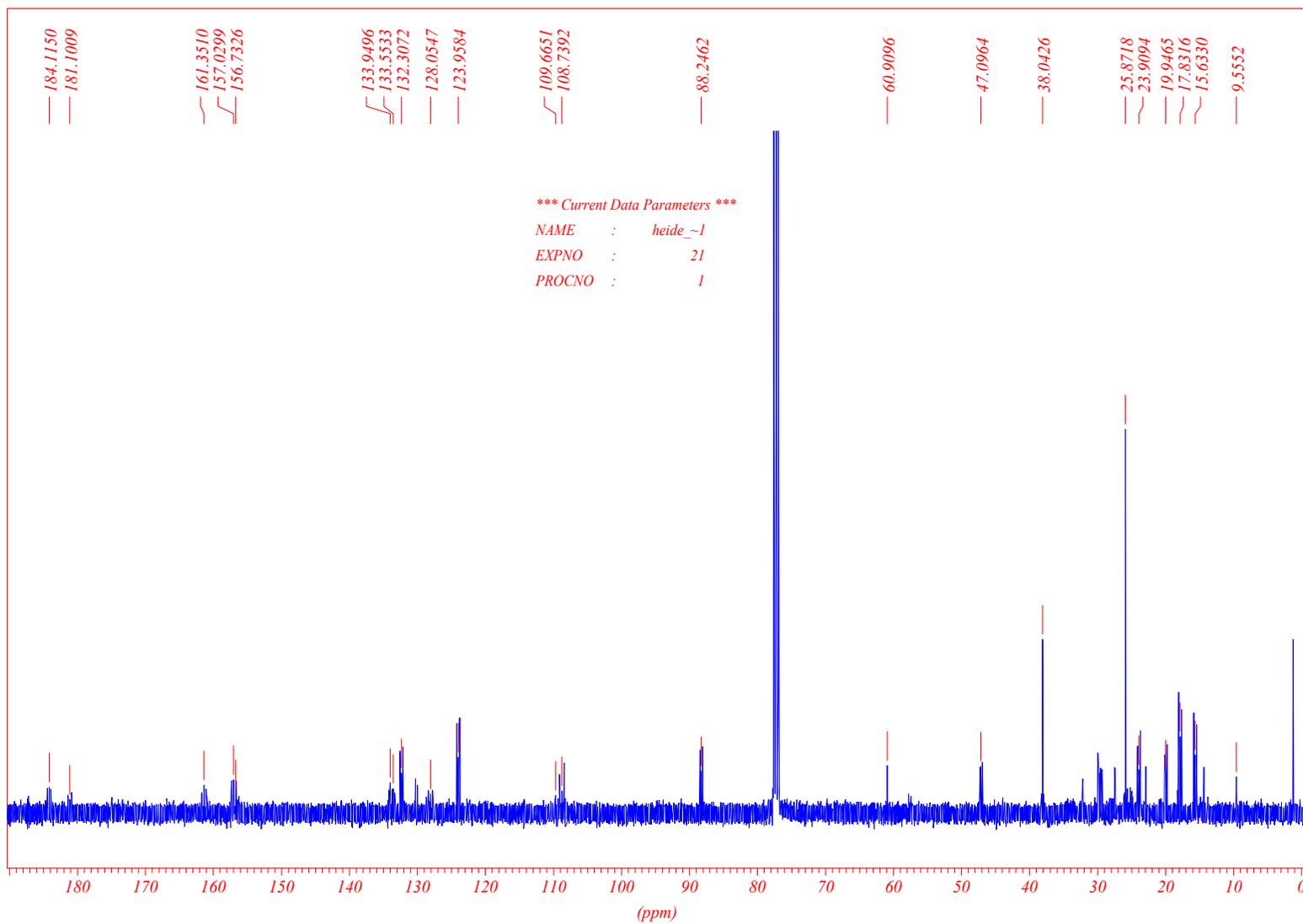
^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von unmarkiertem FNQ I / Interner Standard: C14

^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von unmarkiertem FNQ I / Interner Standard: C15

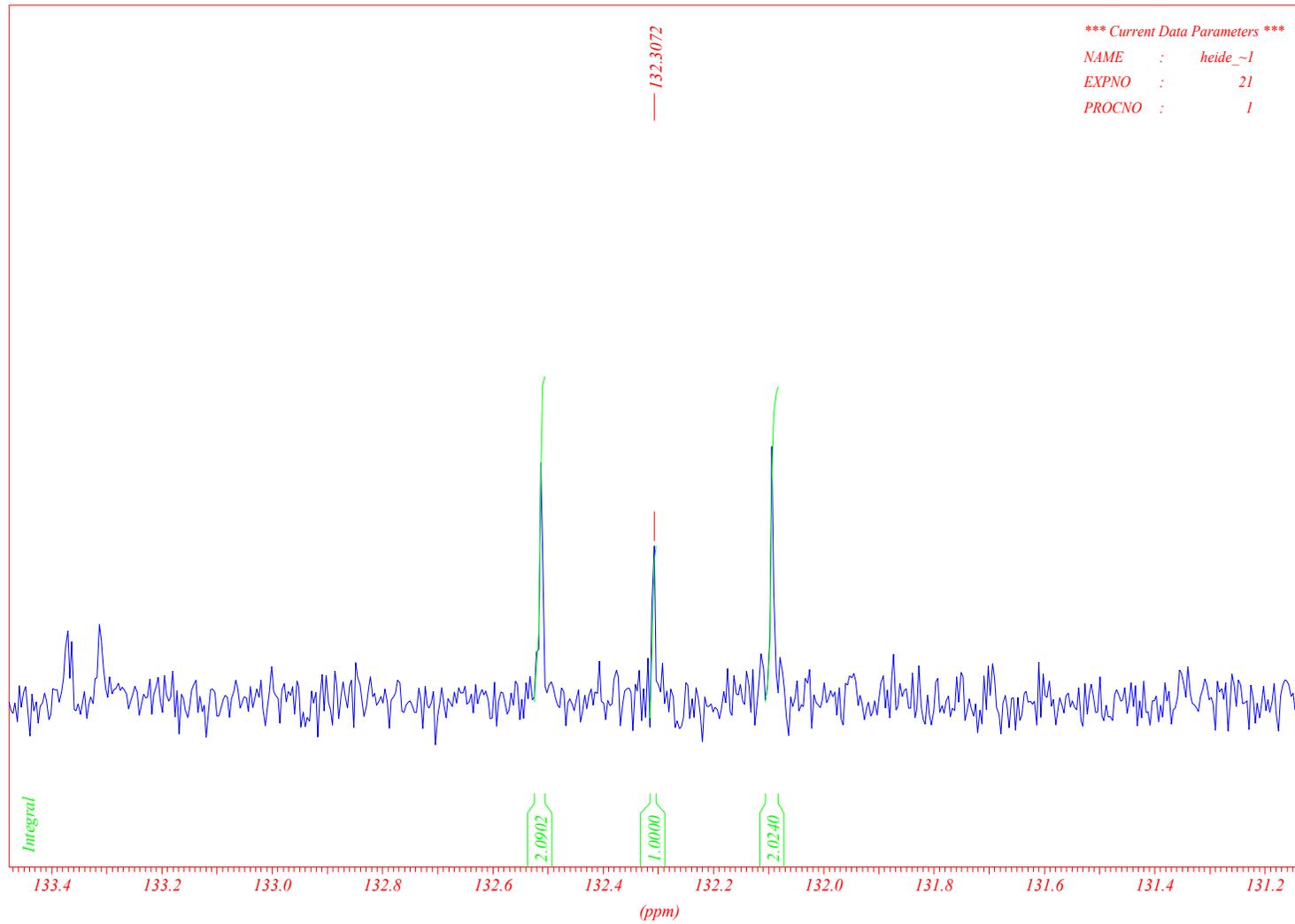
^{13}C NMR Spektrum von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol / Interner Standard: C14

^{13}C NMR Spektrum von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerol / Interner Standard: C15

^{13}C NMR Spektrum (600 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $^{13}\text{C}_2$ Natriumacetat

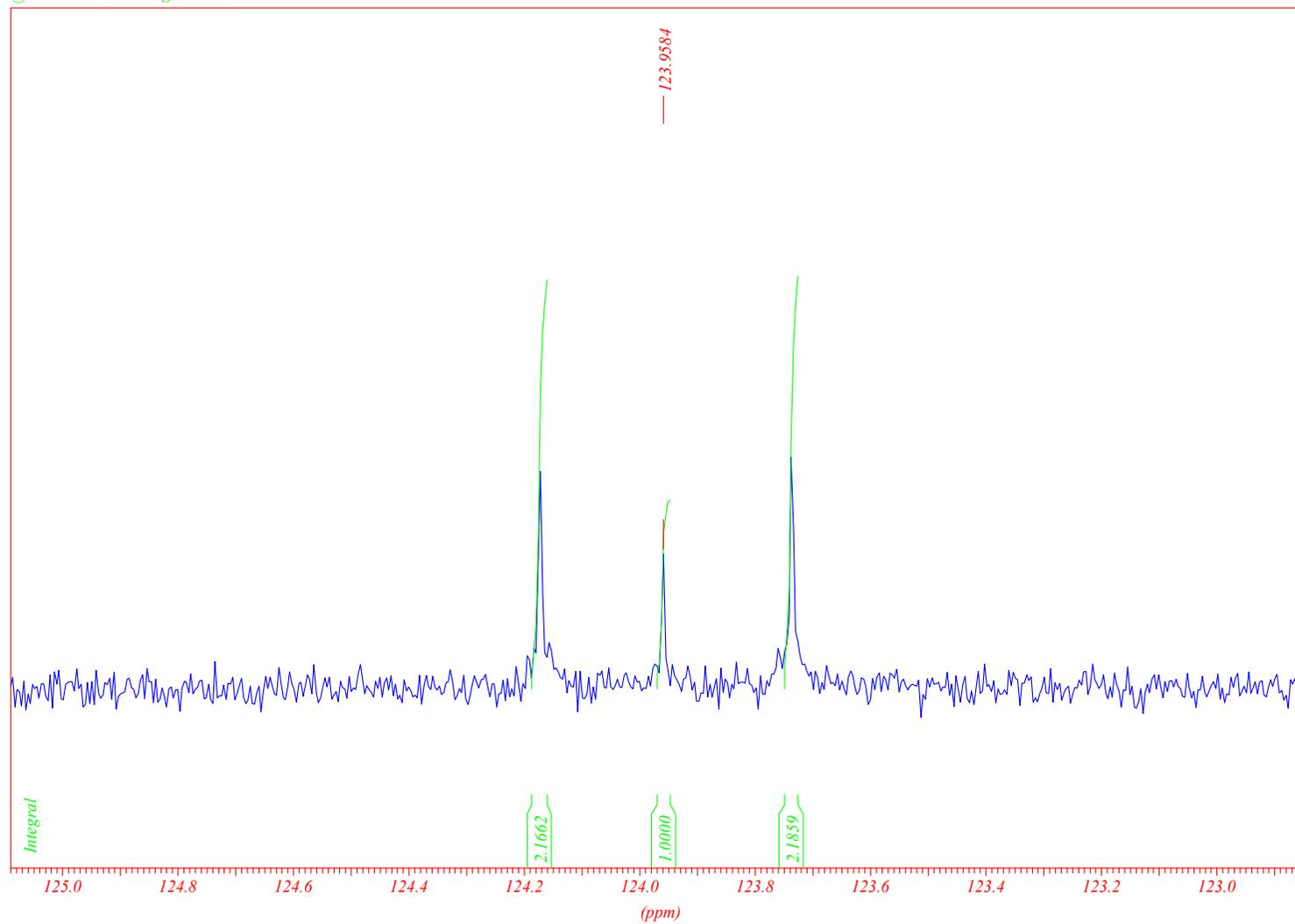
^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $^{13}\text{C}_2$ Natriumacetat

Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C13

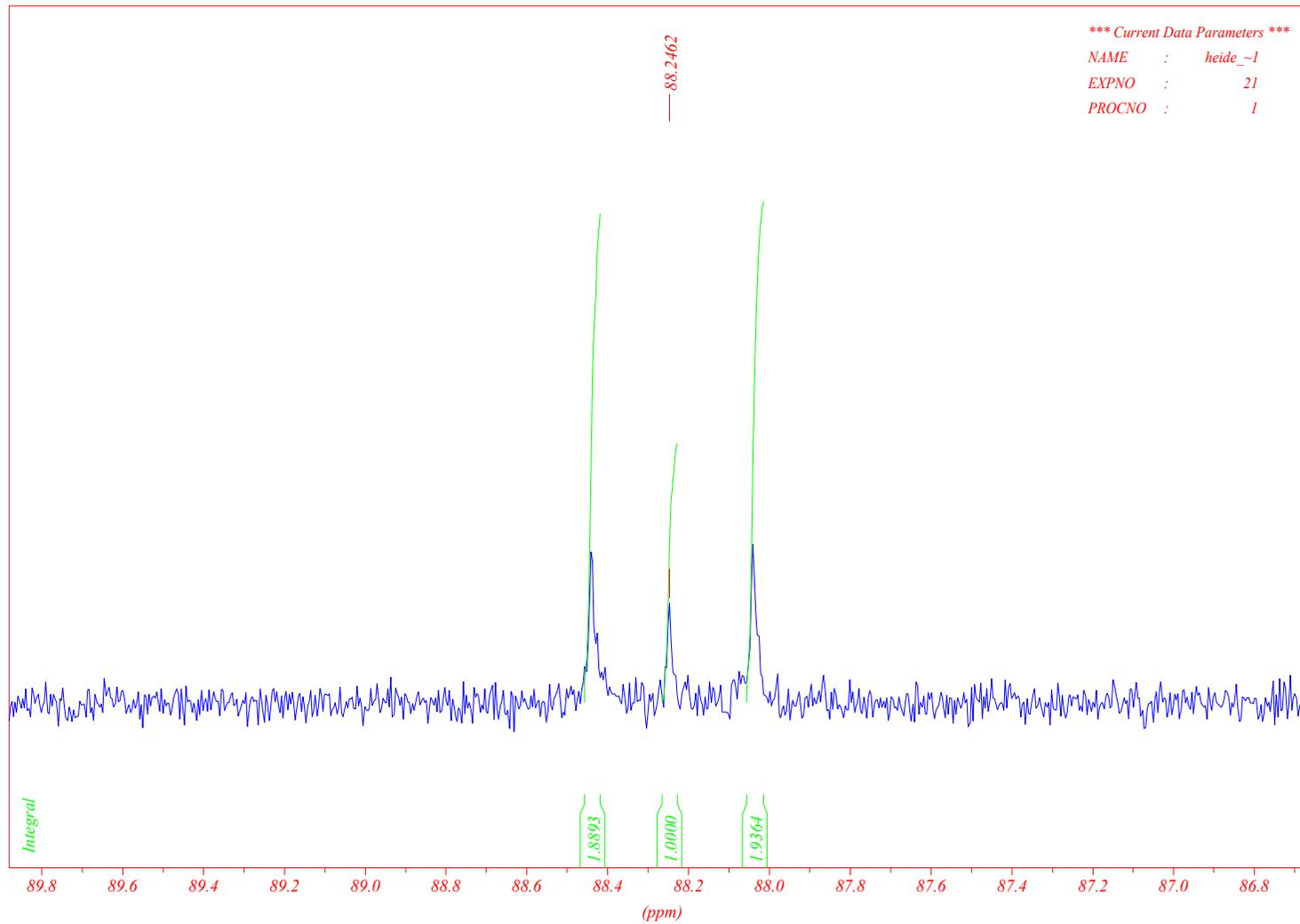


Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C12

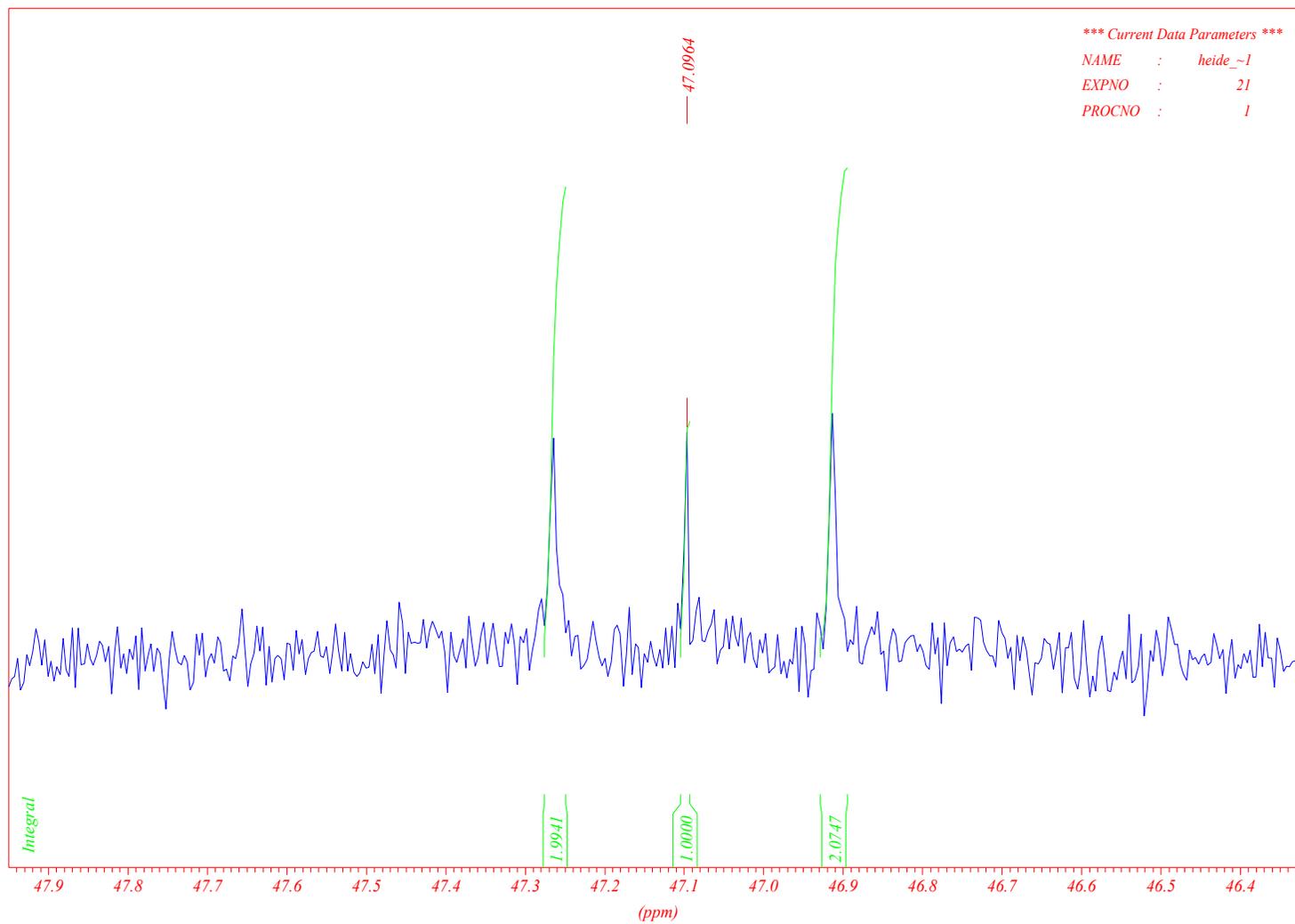
@C13CPD CDCl3 u tgronaue 23



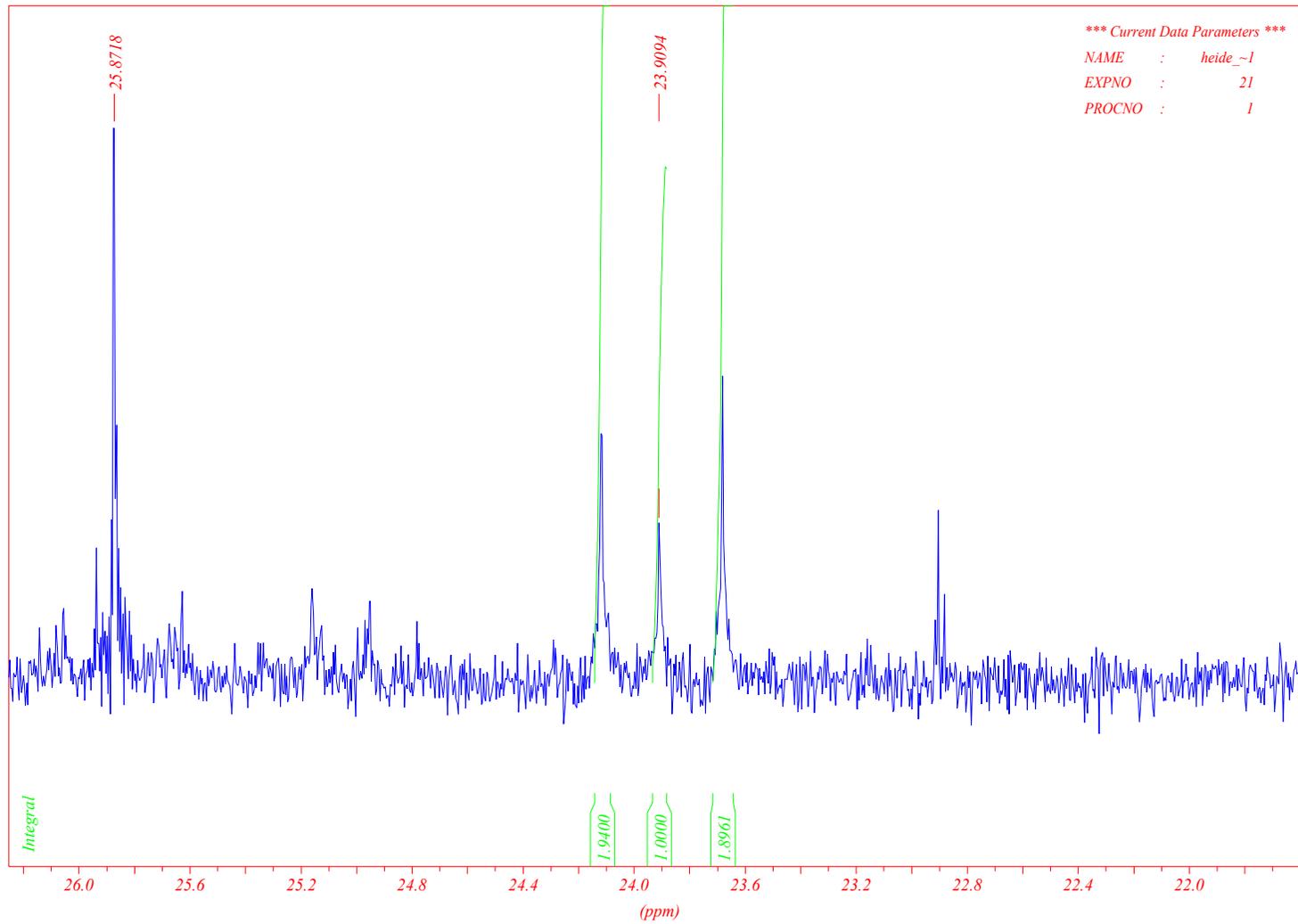
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C2



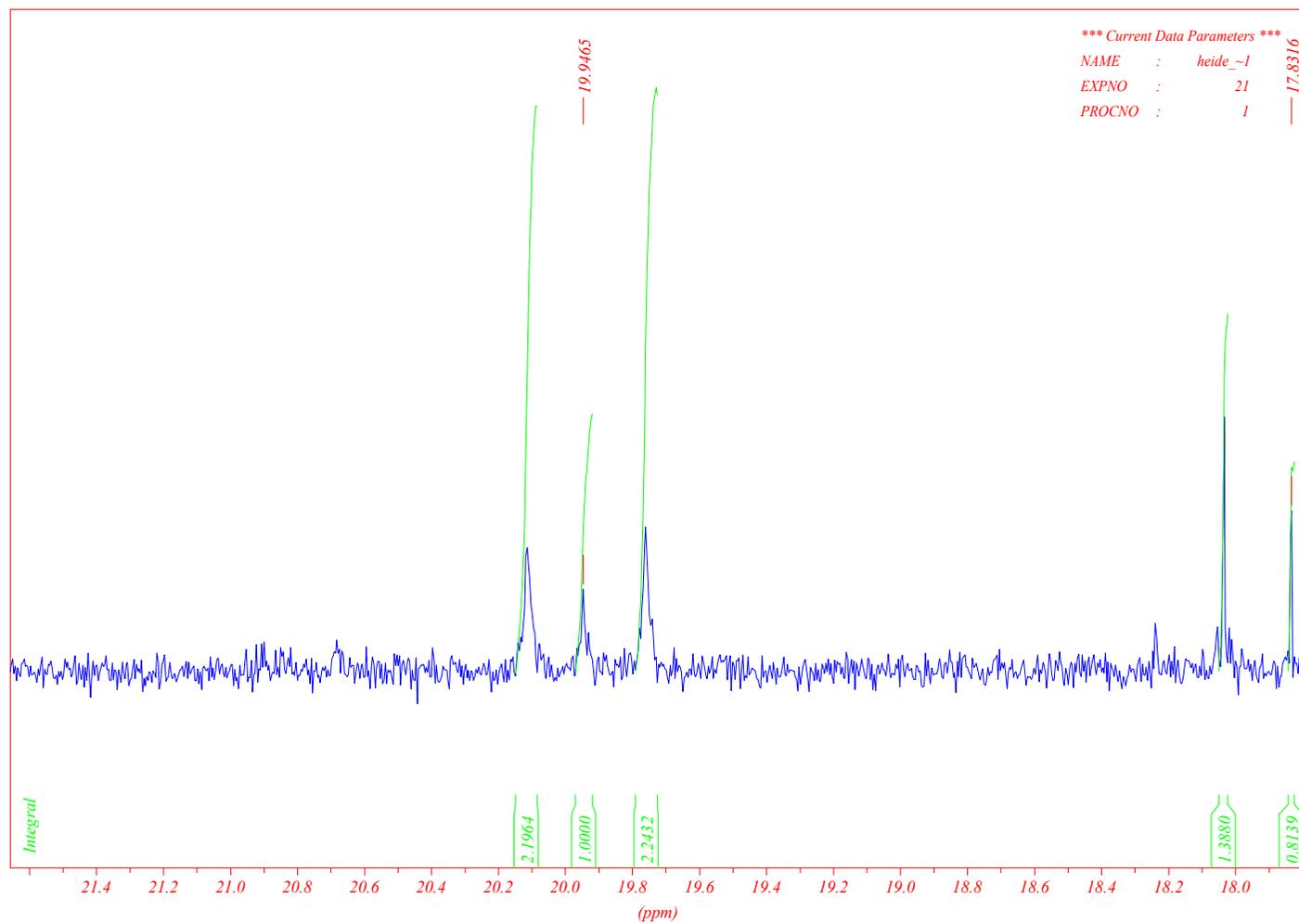
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C3



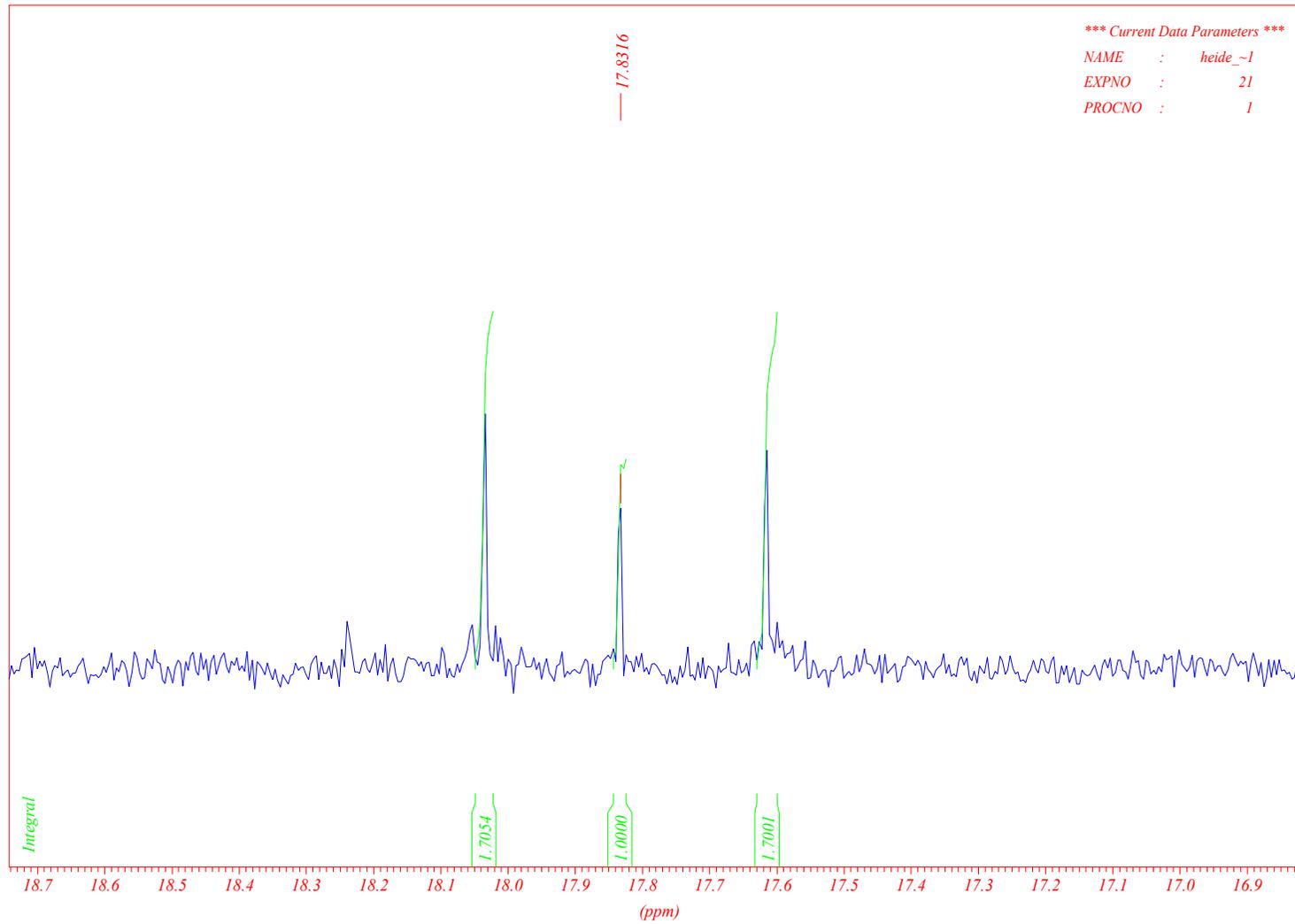
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C11



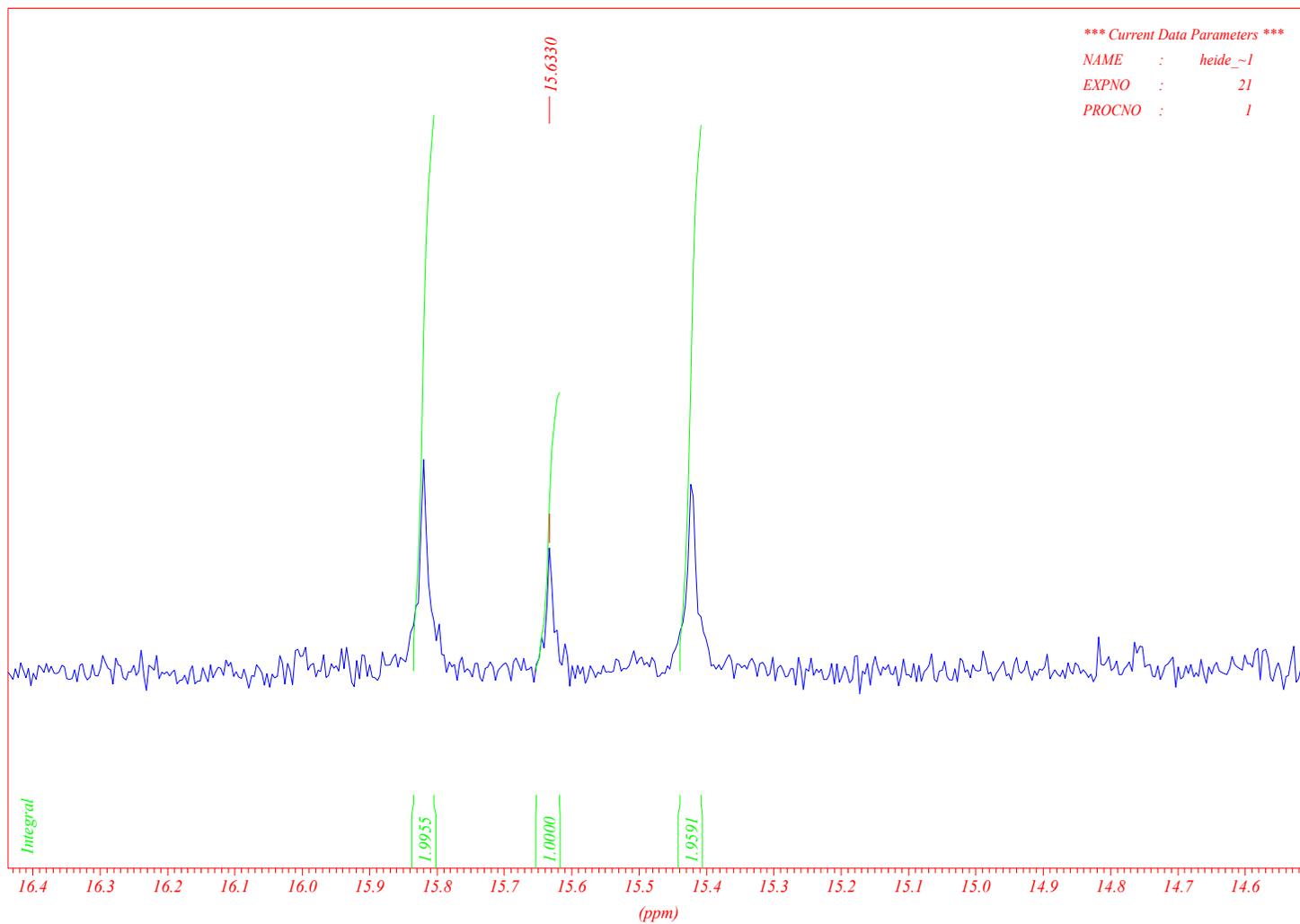
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]\text{Natriumacetat: C3Me}$

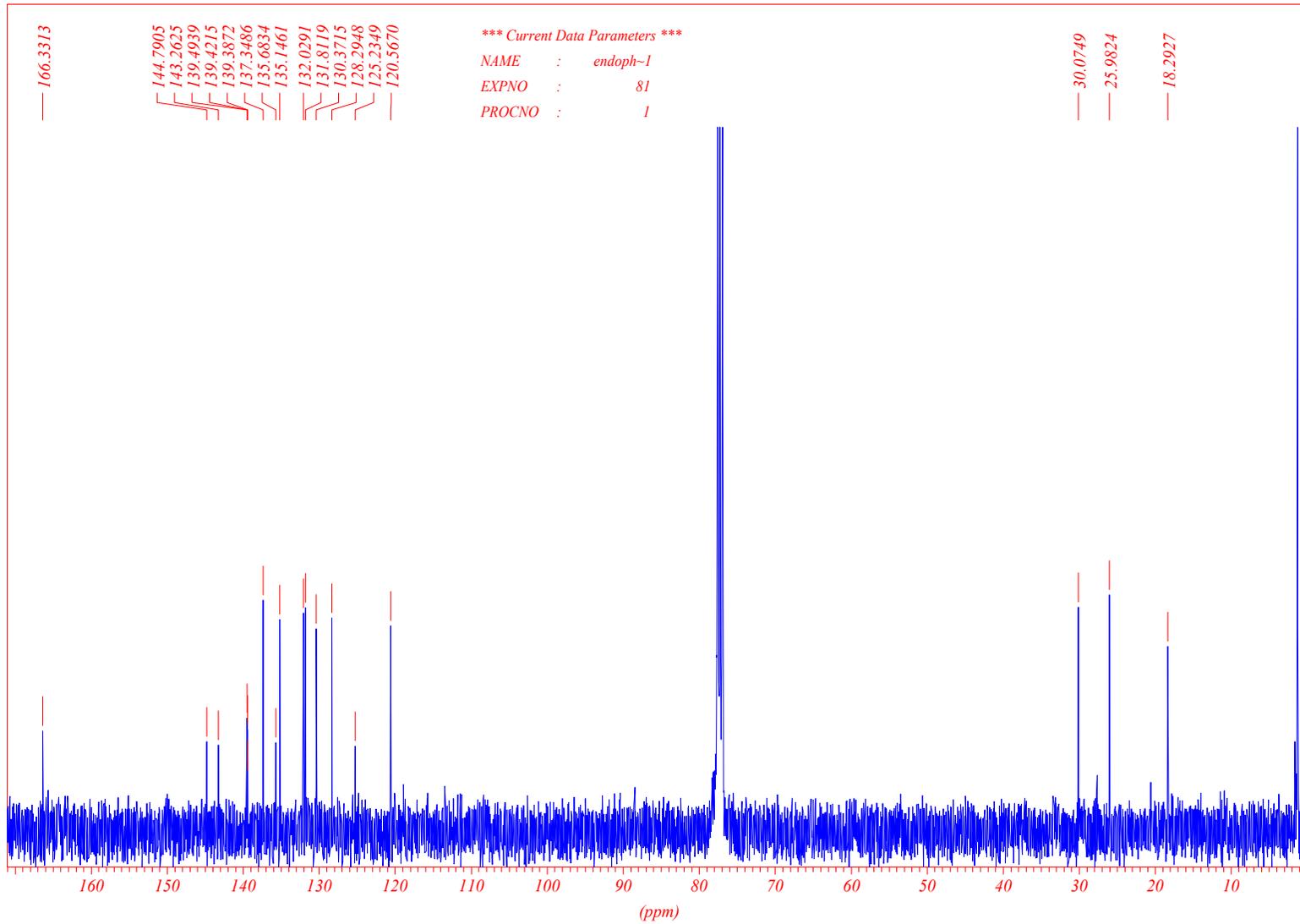


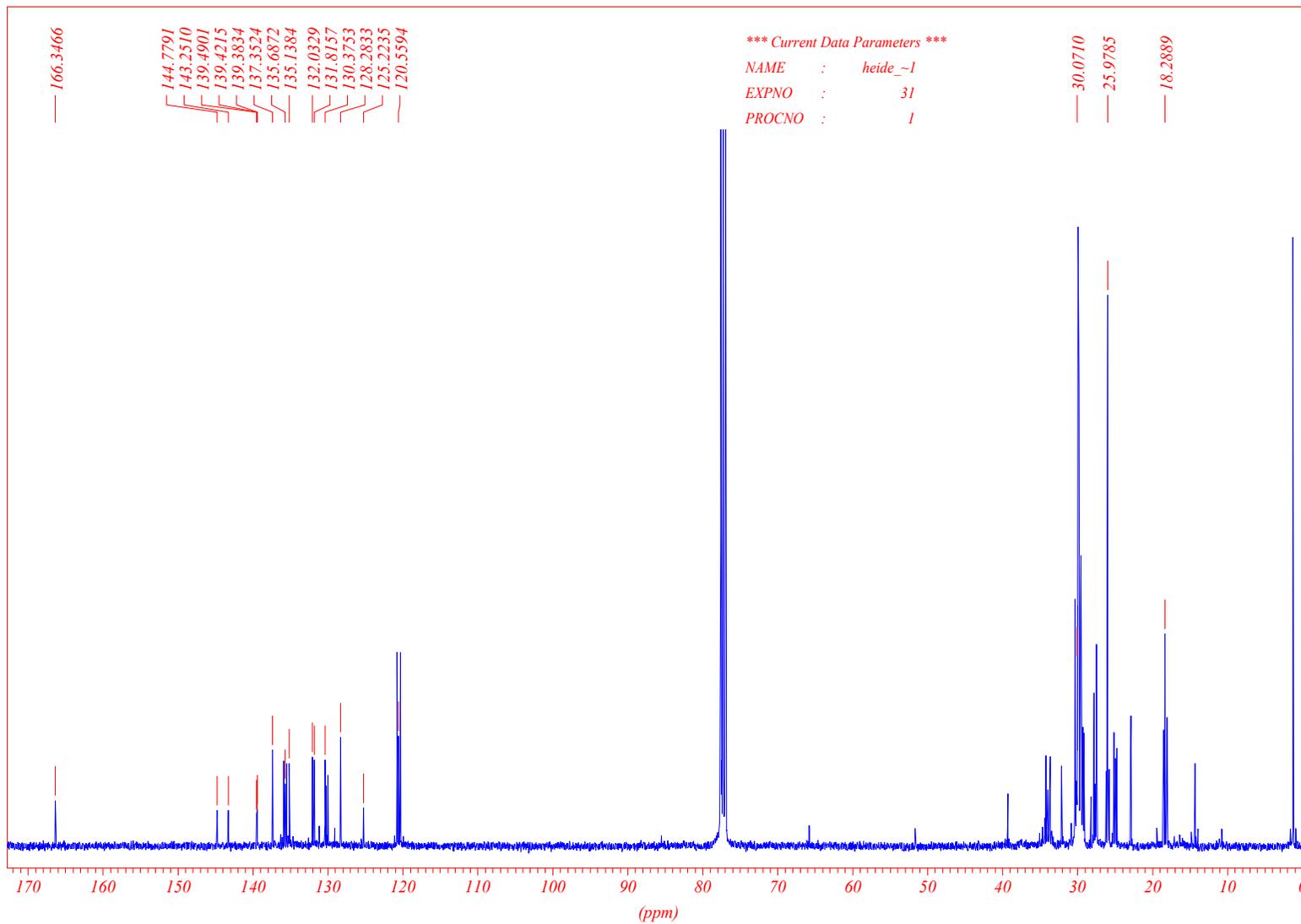
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C14



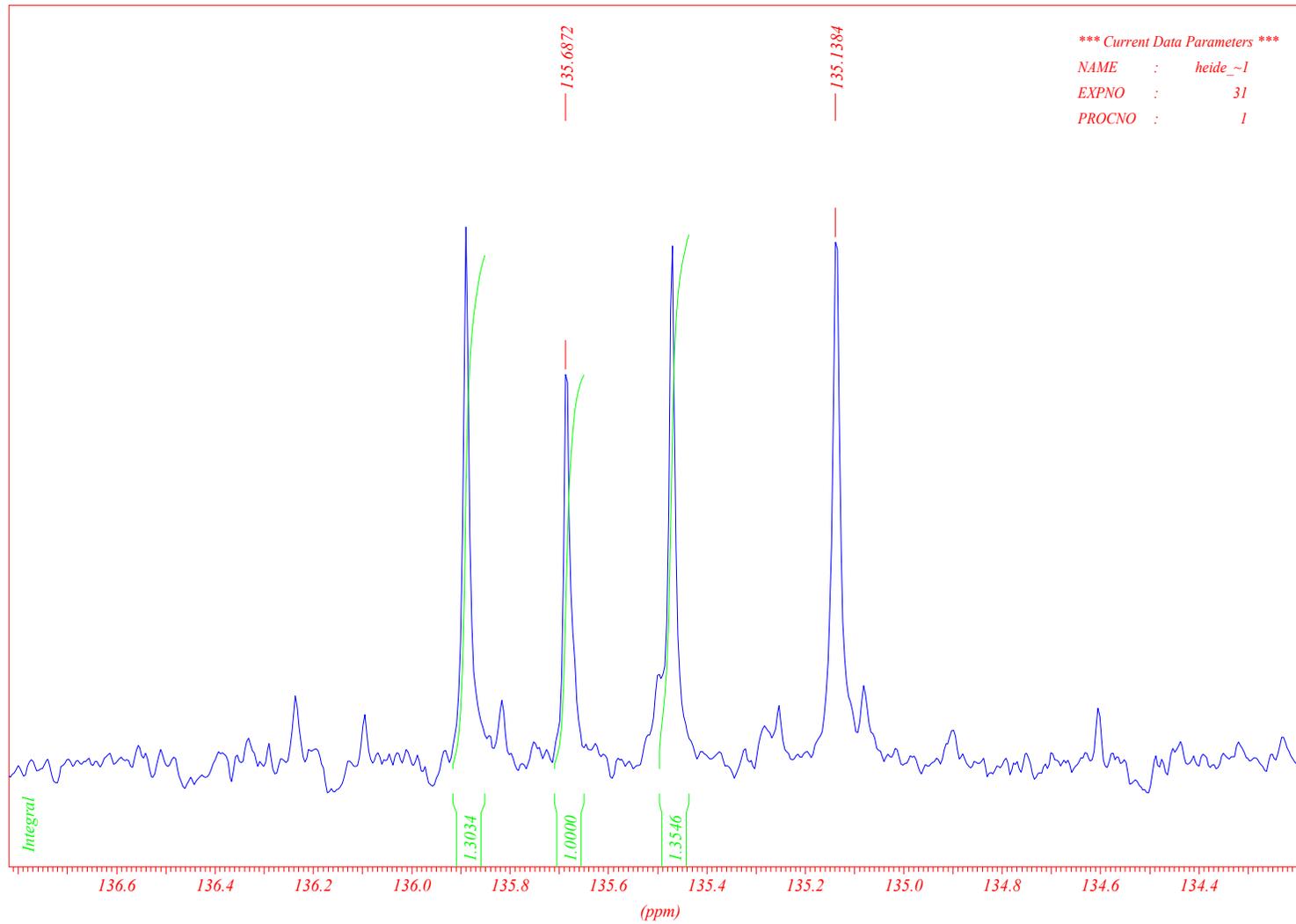
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem FNQ I nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C2Me



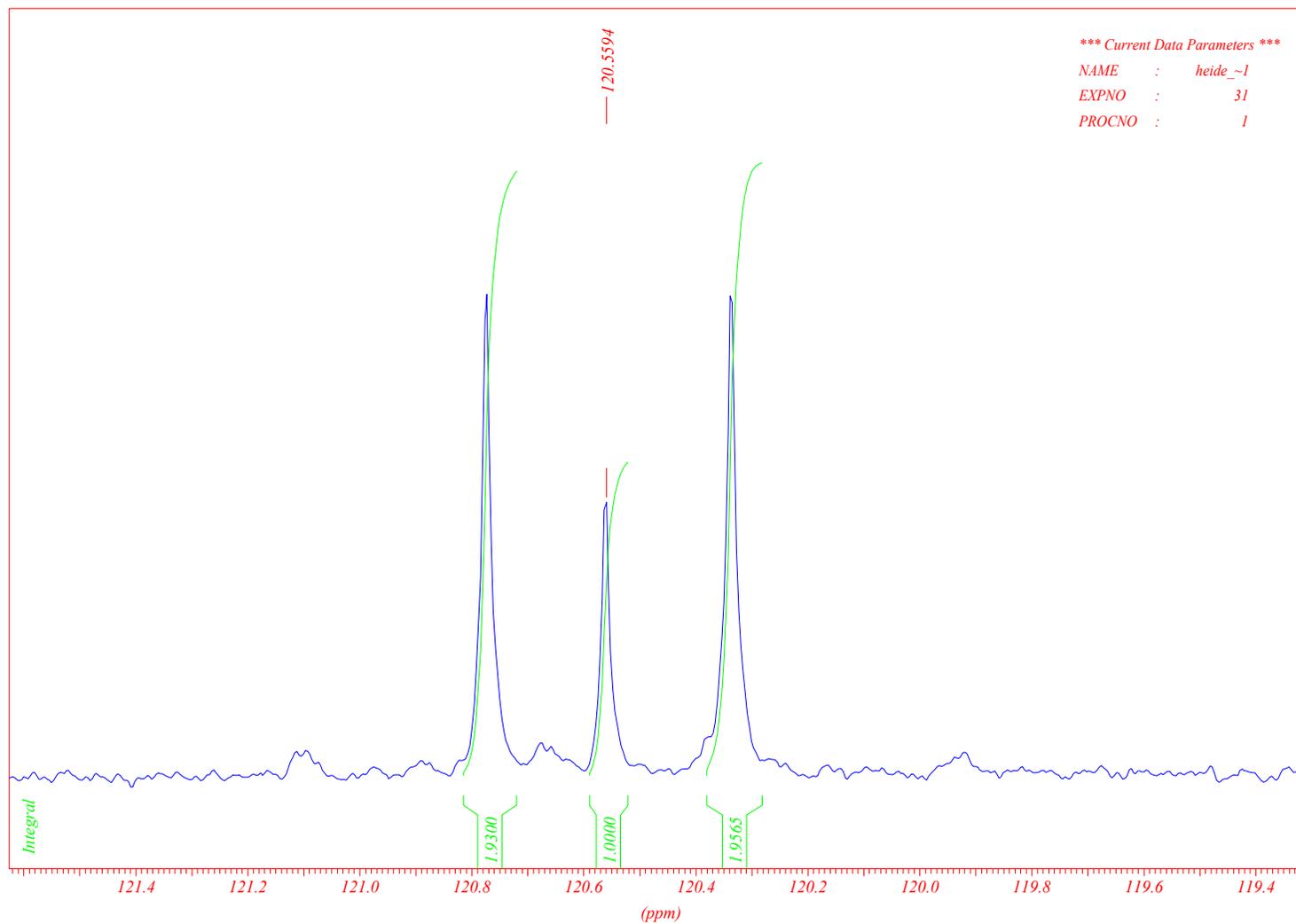
^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von unmarkiertem Endophenazin A

^{13}C NMR Spektrum (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $^{13}\text{C}_2$ Natriumacetat

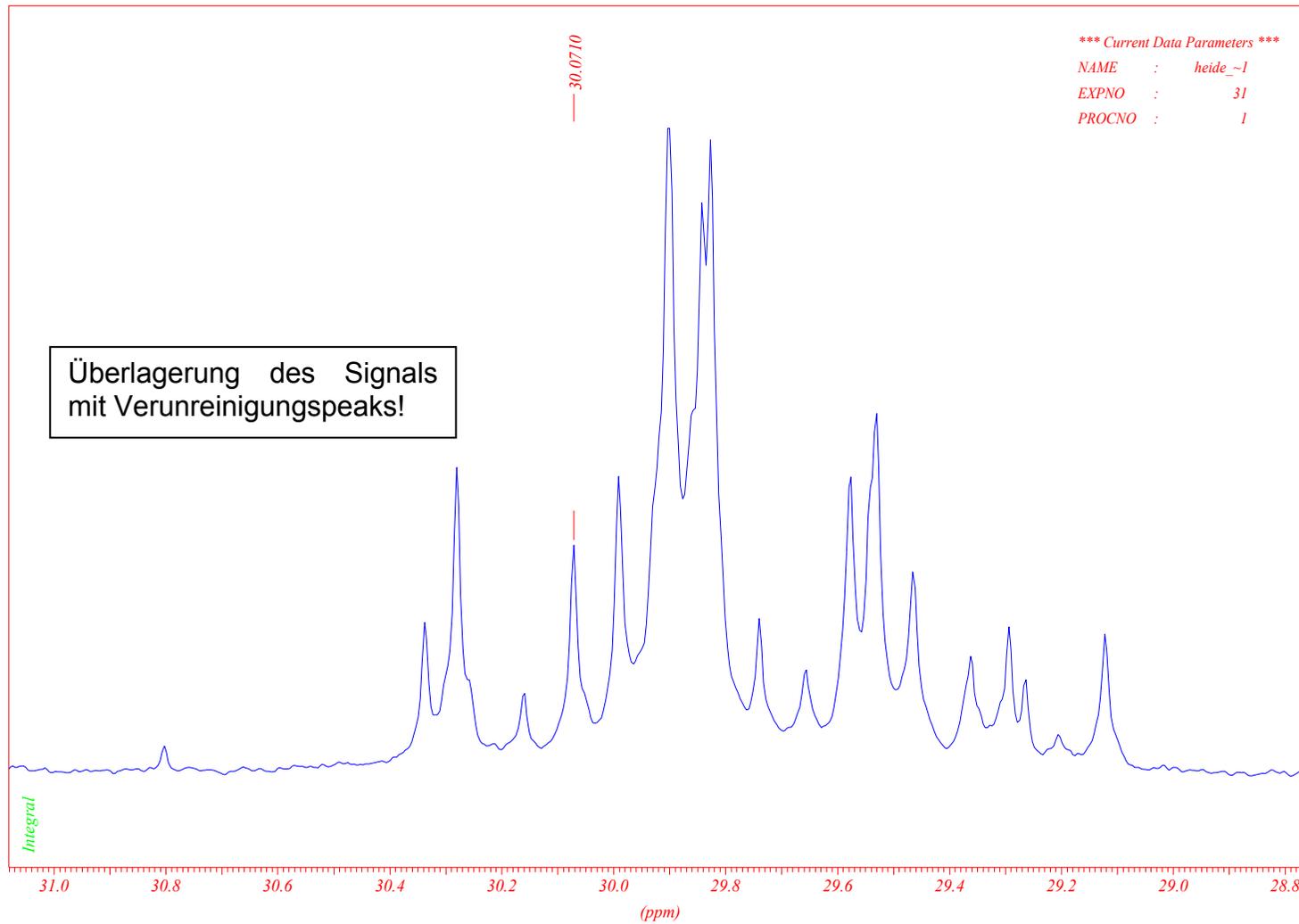
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]\text{Natriumacetat: C3'}$



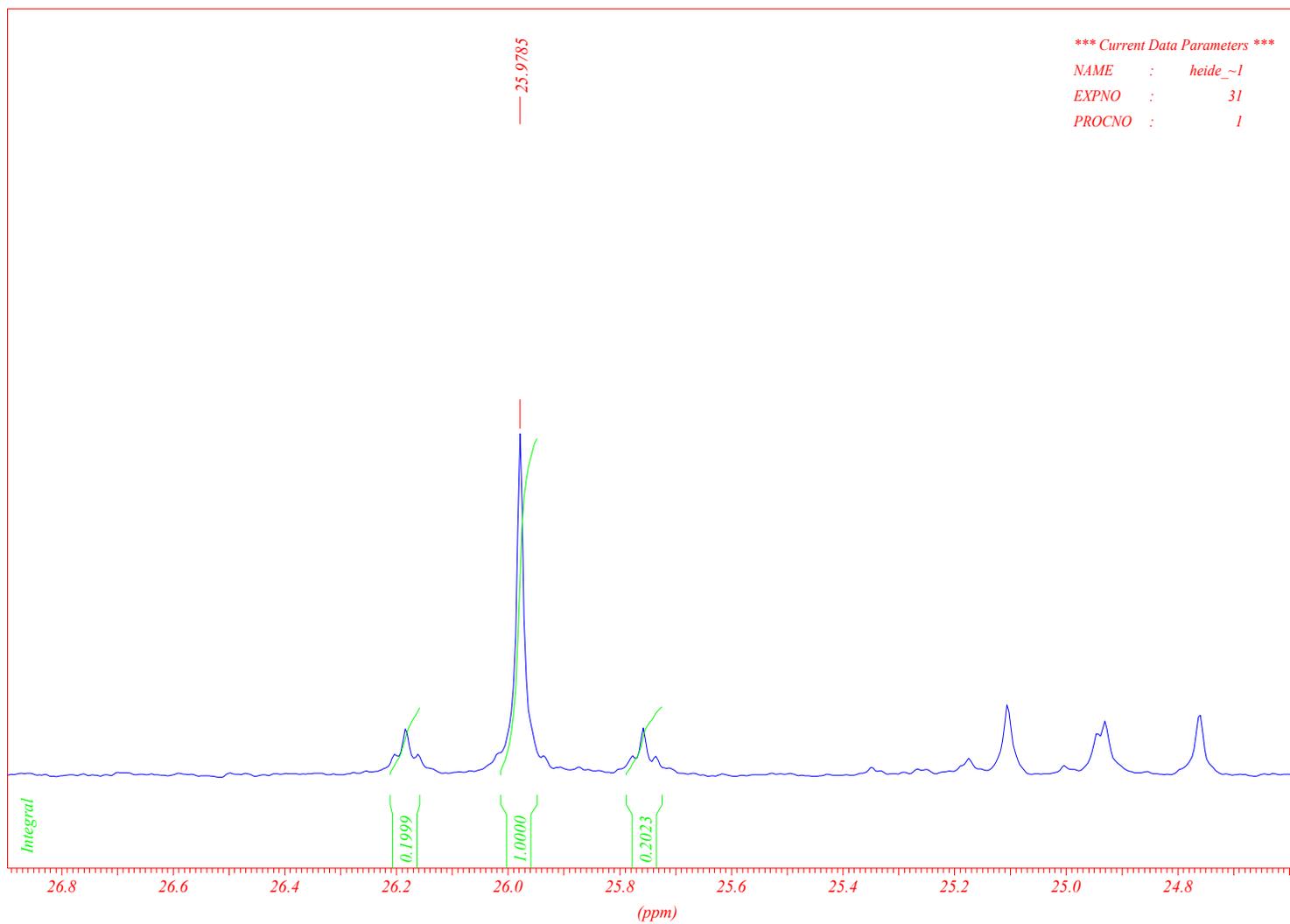
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]\text{Natriumacetat: C2'}$



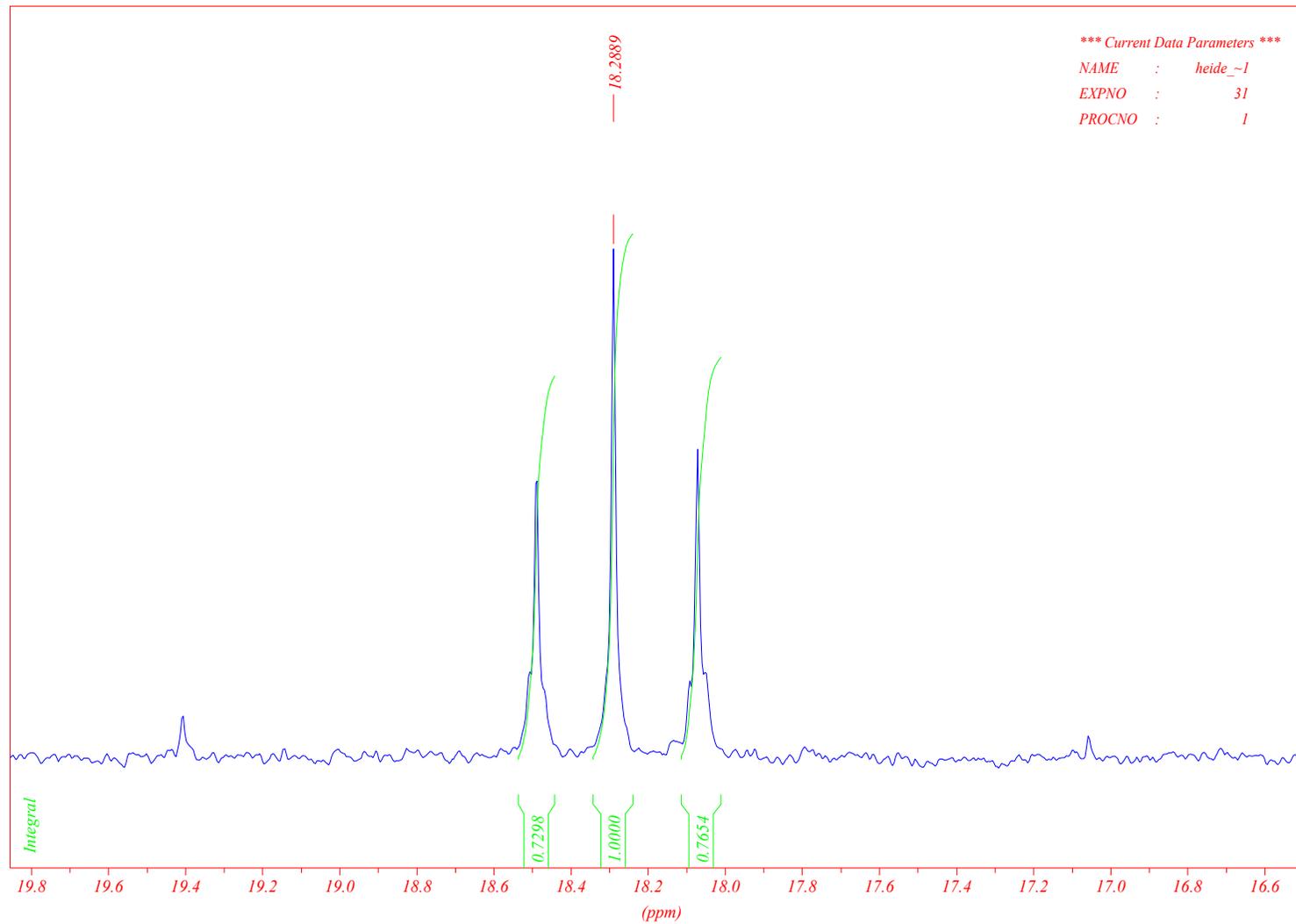
Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]\text{Natriumacetat: C1'}$



Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C4'



Vergrößerung des ^{13}C NMR Spektrums (400 MHz) von markiertem Endophenazin A nach Fütterung von $[^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat: C5'



VIII Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. L. Heide möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des spannenden Themas, die gute Betreuung und Unterstützung, seine immer offene Tür und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. H. P. Fiedler danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitstellung der Endophenazin-Referenzsubstanzen zu Beginn meiner Arbeit.

Bei Dr. Bertolt Gust bedanke ich mich für sein offenes Ohr und seine stets kompetenten Ratschläge, mit denen er mir bei vielen Problemen geholfen hat. Herrn Prof. Dr. S. M. Li danke ich für die gute Betreuung während seiner Tübinger Zeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Bringmann, Tanja Gulder und Tobias Gulder möchte ich mich für die sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen der Fütterungsexperimente bedanken.

Dr. Bernd Kammerer und Stefanie Reit danke ich ganz besonders für ihre Kompetenz in MS-Fragen und die stete Bereitschaft, auch am Wochenende ihren „M-Park“ für uns zu öffnen.

Meiner Laborpartnerin und Freundin Dr. Inge Unsöld danke ich sehr herzlich für die GPP-Synthese, die Bestimmung des Molekulargewichts von Fnq26 und unzählige fachliche Diskussionen. Ebenso wichtig waren viele fröhliche Unternehmungen, die gegenseitige Unterstützung im Labor und das gemeinsame Durchstehen so mancher Krise im Laufe eines Doktorandendaseins.

Katja Fay, Kerstin Glück und Katrin Flinspach danke ich ganz besonders. Ihre Arbeit und ihr großes Engagement haben sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen und waren mir über weite Strecken eine wichtige Motivationsquelle. Katrin Flinspach danke ich außerdem für die Isolierung von Flaviolin.

Bei Lucia Westrich bedanke ich mich für diverse Rettungsmanöver, die Blots in letzter Minute, die Klonierung von *fnq26* und *fnq28* und die netten Gespräche nicht nur beim „Peak-Auffangen“.

Anna-Lena Schupp danke ich für ihre große Hilfe bei der Durchführung des Zertifikatskurses und die vielen heiteren Abende in der Burgsteige 7.

Ebenso danke ich Susanne Hennig für die freundschaftliche Hilfe in den Anfangstagen und die vielen Gespräche über Gott und die Welt.

Herrn Trefzer, Frau Bauer und Gabi Frickmann danke ich für die hilfreiche Unterstützung im Laboralltag durch das Bereitstellen von Medien und das Spülen der Unmengen von Kolben. Bei Corinna Fischer und Frau Lörcher bedanke ich mich für die Abwicklung von Verwaltungsangelegenheiten.

Dr. Veit Bütterling, Julica Hiller-Norouzi und Florian Schlenker danke ich für viele interdisziplinäre, wissenschaftliche Diskussionen.

Meine lieben Kollegen haben maßgeblich dazu beigetragen, dass die vergangenen Jahre eine sehr schöne Zeit waren. Für das gemeinsame Bewältigen von Problemen des Laboralltags und das offene und freundschaftliche Klima in unserer 6. Ebene danke ich von Herzen: Alessandra, Alexander, Anja, Anna-Lena, Frau Bauer, Christine, Claudia, Corinna, Dieter, Elisabeth, Emmanuel, Florence, Gabi, Hanli, Hui, Irmela, Johannes, Katharina, Katja T., Katja F., Katrin, Kerstin G., Kerstin R., Leo, Frau Lörcher, Manuel, Herr Dr. Mechler, Nicola, Orwah, Rebekka, Silke, Shu-Ming, Steffanie, Susanne, Thomas, Herr Trefzer, Ute G., Ute M. und Volker.

Bei Dr. Alessandra Eustaquio, Manuel Wolpert, Ute Metzger und Volker Dangel möchte ich mich ganz besonders für etliche schöne Stunden unter Freunden bedanken.

Franziska Dürigen, Judith Haupt und Annette Tischleder danke ich für die vielen guten gemeinsamen Jahre und ihre Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit.

Bei Dorothee und Wolfram Haagen bedanke ich mich für ihr interessiertes und fröhliches Mitfiebern und ihr ausdauerndes Daumendrücken während der ganzen Zeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung, ihren liebevollen Beistand und die viele gute Laune, mit der sie immer an und auf meiner Seite waren.

Meinem lieben Ulf danke ich ganz einfach fürs „Bei-mir-sein“. Ohne seine Hilfe, sein Verständnis und seinen Rat wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

IX Akademische Lehrer

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

Dr. K. H. Bartels

Prof. Dr. F. C. Czygan

Prof. Dr. S. Ebel

Prof. Dr. U. Groß

Dr. M. Grünsfelder

Prof. Dr. A. Haase

Prof. Dr. C. Herdeis

Prof. Dr. M. J. Lohse

Prof. Dr. W. Lutz

Prof. Dr. P. Högger

Prof. Dr. U. Holzgrabe

Prof. Dr. C. Müller

Prof. Dr. M. Müller

Prof. Dr. P. Proksch

Prof. Dr. H. Rüdiger

Prof. Dr. T. Schirrmeister

Prof. Dr. S. Silbernagl

PD Dr. M. Veit

Dr. H. Walz

Prof. Dr. H. Wätzig

Prof. Dr. I. Zimmermann

X Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Yvonne Haagen, geb. Meier
Geburtsdatum: 27.12.1977
Geburtsort: Reutlingen

Schulbildung

1984 - 1988 St. Wolfgang Grundschule, Reutlingen
1988 - 1990 Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen
1990 - 1997 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Göppingen
1997 Abitur

Hochschulausbildung und Praktika

1997 - 2001 Pharmaziestudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2001 - 2002 Praktikum in der Barlach-Apotheke in Bad Boll
2002 Praktikum im Zentralinstitut Arzneimittelforschung in Sinzig
2002 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2002 Approbation als Apothekerin
2003 - 2007 Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2004 - 2007 Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation

Lehrtätigkeit

2003 - 2007 Organisation und Betreuung pharmazeutischer Praktika:
Exkursionen und Systematik der Arzneipflanzen
Arzneimittelinformation und Bewertung von klin. Studien
Gesamtkoordination des Zertifikatskurses Clinical Pharmacy

Auszeichnungen

1997 Scheffelpreis der Literarischen Gesellschaft Karlsruhe
2002 Fakultätspreis der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Würzburg
2006 FEMS Fellowship Student Grant